DOI：10.13194/j.jlunivtcm.2011.11.25.fenggk.086

益神启窍方对实验昏迷大鼠昏迷状态的影响

丰广魁[1]，程全[2]，奚肇庆[3]，吴春梅[1]

（1.江苏省连云港市中医院，江苏 连云港 222004；2.中南大学湘雅医院神经外科，湖南 长沙 410000；
3.江苏省中医院，江苏 南京 210029）

摘 要：目的：观察益神启窍方对弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤大鼠昏迷状态的影响及可能机制。方法：采用“弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤动物模型”造模，取雄性SD大鼠36只，随机分为4组，正常组7只、假手术组7只、对照组12只、中药组12只，造模前1周中药组每天灌胃益神启窍方中药配方颗粒，模型组只灌胃等剂量的生理盐水，电镜观察脑组织损伤程度，和观察从麻醉到角膜反射、从麻醉到四肢爬行时间、呼吸恢复时间及神经功能障碍评分（mnss）。结果：假手术组与正常组“麻－爬”时间无显著差异（$P<0.05$）；中药组“麻－角”时间与假手术组有显著差异（$P<0.05$），与对照组有显著性差异（$P<0.05$）；中药组“麻－爬”时间与假手术组有显著差异（$P<0.05$），与对照组有显著性差异（$P<0.05$），中药组与对照组呼吸恢复时间有显著性差异（$P<0.05$），中药组与对照组损伤清醒后神经功能障碍评分有显著性差异（$P<0.05$），电镜对照组见血管外周、轴突水肿，神经纤维水肿、溶解，轴突内线粒体、胶质细胞水肿，中药组多数神经元、血管、神经纤维正常，仅见部分轴突内线粒体水肿，树突有灶性水肿，胶质细胞、血管外周水肿。结论：中药益神启窍方能缩短实验大鼠的昏迷时间、自主呼吸恢复时间，改善神经功能障碍评分和减轻脑组织损伤程度，有显著的促醒作用和脑保护作用，这可能与其具有兴奋中枢神经、改善血供、降低氧耗有关。

关键词：益神启窍方；昏迷；大鼠；弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤；促醒
中图分类号：R-332 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-842X(2011) 11-0023-04

Effect of Yishen Qiqiao Prescription on Coma State of Experimental Rats

FENG Guang-kui[1], CHENG Quan[2], XI Zhao-qing[3], WU Chun-mei[1]

(1.Lianyungang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lianyungang 222004, Jiangsu, China;
2. Department of Neurosurgery of Xiangya Hospital Affiliated to Zhongnan University, Changsha 410000, Hu'nan, China; 3. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

Abstract: *Objective*: To observe the effect and mechanism of Yishen Qiqiao prescription on the coma state of experimental rats due to diffuse axonal injury combined with focal brain contusion. *Methods*: The model was built based on the animal model of diffuse axonal injury combined with focal brain contusion. 36 male SD rats were randomly divided into 4 groups: normal control group (n=7), sham-operated group (n=7), control group (n=12), TCD group (n=12). TCD group were supplied with Yishen Qiqiao granule by intragastric administration every day for one week before model-building, while the control group were only supplied with isodose saline. The brain injury was observed by electron microscope. The time from anesthesia to cornea reflection, crawl, and breath recovery was recorded and the neural function disorder was evaluated. *Results*: There was no significant difference in the time from anesthesia to crawl between the sham-operated group and normal control group ($P<0.05$). But significant difference was observed in the time from anesthesia to cornea reflection between TCD group and sham-operated group ($P<0.05$) as well as TCD group and control group ($P<0.05$). Significant difference was also observed in the time from anesthesia to crawl between TCD group and sham-operated group ($P<0.05$) as well as TCD group and control group ($P<0.05$). There was significant difference in the time of breath recovery and neural function disorder evaluation between TCD group and control group ($P<0.05$). Swollen was observed in peripheral vessel, axons, nerve fibers, mitochondria and gliocytes in the axons under electron microscope in control group. The most neurons, vessels and nerve fibers were normal in TCD group, swollen was observed in some mitochondria of the axons, gliocytes, and peripheral vessel, focal swollen was observed in some dendrites. *Conclusions*: Yishen Qiqiao prescription has a significant role in wake-promoting and brain-protecting by shortening the time of coma and breath recovery of rats, improving the neural function disorder evaluation and alleviating the degree of brain injury, which may be related with its function of exiting central nerve, promoting blood supply and reducing oxygen consumption.

Key words: Yishen Qiqiao prescription; coma; rats; diffuse axonal injury combined with focal brain contusion; wake-promoting

收稿日期：2011-05-18
基金项目：连云港市卫生局医学重点人才培养计划课题（ZC110）
作者简介：丰广魁（1962-），男，主任中医师，博士，研究方向：中医脑病临床工作。

益神启窍方是用于治疗植物状态的协定处方，由黄芪、当归、麝香、桃仁、石菖蒲、白芷组成，经观察能够改善持续性植物状态（PVS）疗效评分，提高促醒率[1]，对植物状态患者有较好治疗作用，但对实验大鼠的促醒影响尚不明了，本研究旨在观察该方对大鼠昏迷的影响，由于PVS的致病机理复杂，动物模型制作困难较多，美国多学科联合研究会报告指出，实验动物所指的延长性昏迷应该是超过1h的昏迷状态[2]，延长性昏迷模型在实验研究中常被采用用于PVS的实验研究[3]，而“冲击加速性模型”是昏迷模型的理想模型之一。故笔者采用“弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤动物模型”[4]，观察益神启窍方对实验昏迷大鼠昏迷时间的影响，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　实验动物和分组

健康雄性SD大鼠36只，由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供，体重350~380g，随机分为4组，正常组7只、假手术组7只、对照组12只、中药组12只，造模前1周中药组每天灌胃益神启窍方中药配方颗粒，剂量按成人量折算成大鼠剂量，中药配方颗粒由江阴天江药业有限公司提供，批号：黄芪1003066，桃仁1001066，石菖蒲1012275，白芷1011150，当归1002101，麝香由安徽省亳州市祥和药业有限公司提供，产地西藏，模型组只灌胃等剂量的生理盐水，生理盐水由湖南老百姓医药连锁有限公司提供。所有动物在中心供氧室温条件下饲养。

1.2　模型制作及方法

根据文献法[4]，是在Marmarou模型的基础上进行改进，即在其不锈钢垫片距中心2.5m处钻一直径为1.5m的小孔，置入一不锈钢圆柱，使之高出垫片平面3mm。手术前称重，腹腔内注射水合氯醛(10%，0.35mL/100g)麻醉大鼠，麻醉生效后，行气管切开，插入硅胶管，以清除气管内分泌物，防止呼吸道阻塞，呼吸机辅助呼吸。剪去头顶部的毛，在相当于矢状缝与人字缝交界处作正中切口，分开头皮和骨膜后，在右侧冠状缝和矢状缝之间，中线旁开3mm处钻一直径3mm的骨窗，避免伤及硬膜。用AA（aron alpha）胶将不锈钢垫片黏贴于颅顶正中位，并使垫片上突起的小圆柱嵌入骨窗内。将大鼠俯卧固定于海绵床上，保证大鼠头部位置端正，使垫片的中央正对致伤装置有机玻璃管的下口，并与砝码(铜质，450g)底面平行接触。通过悬线和滑轮将砝码提升至2m高度后放松悬线，使重锤垂直自由下落至圆形垫片上，海绵床连同大鼠要在打击后迅速撤离有机玻璃管下方，以防止再次打击。随后将大鼠转移至操作台上观察行为学改变，缝合头皮手术切口。每只大鼠观察自主呼吸恢复时间，从麻醉到角膜反射时间，从麻醉到四肢爬行时间，及在清醒后行神经功能障碍评分。

1.3　神经功能障碍评分（mnss）

（1）运动功能测试：提起大鼠尾部时出现：①无前肢屈曲、收缩1分；②无后肢屈曲、收缩1分；③无法做到30s内大鼠头部扭动并偏离垂直轴角度大于100° 1分；④将大鼠置于水平面活动时：正常爬行0分，不能直线爬行1分，向偏瘫侧转圈2分，向偏瘫侧跌倒3分。（2）感觉功能测试：位置觉测试（视觉和触觉测试）1分；本体感觉测试(将大鼠前爪推向桌子边缘以刺激肌肉收缩)1分。（3）生理及异常反射：①耳廓反射(刺激耳道时头部摇动)消失1分；②角膜反射（棉签刺激角膜时眨眼）消失1分；③惊吓反射（突发声响引起大鼠惊恐嘶叫）消失1分。（4）异常活动测试：①大鼠不动或凝神1分；②出现寒战、发抖1分；③出现抽搐、肌阵挛、肌张力异常1分；正常对照组不给予任何处理。假手术组除不施打击外，余操作同前。

1.4　组织及切片处理

取造模后24h大鼠，用10%水合氯醛（330mg/kg）腹腔麻醉后，暴露心脏，注射针头经左心室心尖部插入升主动脉后快速滴注300mL生理盐水并同时剪开右心耳，接着快滴4℃的4%多聚甲醛固定液5min，再缓慢滴注，直至大鼠全身僵硬后取出整个脑组织固定。固定采用2.5%的戊二醛，24h以上，后固定采用1%的锇酸固定2h，实施4梯度脱水（50%、70%、90%、100%的丙酮脱水，每级10min×3次），环氧树脂混合液：纯丙酮=1：1，37℃，浸泡24h，Epon812、DDSA、MNA、DMP30，60℃，24h包埋成块；甲苯氨蓝染色观察，选取所需要的部位，瑞典产LKB-Ⅲ型超薄切片机切片，厚约500埃，醋酸铀、硝酸铅双重染色，日常H-7500型透射电镜观察、照片。

1.5　统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，实验数据采用SPSS17.0统计分析软件进行统计学分析。

2　结　果

2.1　各组大鼠意识恢复情况比较

假手术组与正常组“麻-爬”时间无显著差异（$P>0.05$）；中药组“麻-角”时间与假手术组有显著差异（$P<0.05$），与对照组有显著性差异（$P<0.05$）；中药组“麻-爬”时间与假手术组有显著差异（$P<0.05$），与对照组有显著性差异（$P<0.05$）。（见表1）

表1　大鼠脑损伤后意识恢复时间（min，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	麻-角*	麻-爬*
正常组	7	-**	104.6 ± 16.4③
假手术组	7	78.0 ± 10.2	97.1 ± 22.7
对照组	12	185.4 ± 57.4	203.3 ± 60.6
中药组	12	137.1 ± 31.3①②	158.8 ± 33.9①②

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与假手术组比较，$P<0.05$；③与假手术组比较，$P>0.05$。*“麻-角”是指从麻醉到有角膜反射的时间；“麻-爬”是指从麻醉到四肢爬行的时间。**正常组“麻-角”因故未观察。

2.2　各组损伤后自主呼吸恢复时间比较

对照组大鼠损伤后均出现呼吸停止现象，均给予呼吸机辅助呼吸，定期脱机观察自主呼吸恢复，对照组呼吸恢复时间平均为12.7min。中药组大鼠创伤后部分大鼠未出现呼吸停止现象，中药组呼吸恢复时间平均为5.2min，并且有显著差异（$P<0.05$）。（见表2）

表2　大鼠脑损伤后自主呼吸恢复时间（min，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	恢复时间
正常组	7	-
假手术组	7	-
对照组	12	12.7 ± 4.5
中药组	12	5.2 ± 6.5①

注：①与对照组比较，$P<0.05$。

2.3　各组神经功能障碍评分比较

正常组和假手术组评分均为0分，对照组和中药组评分之间有显著差异（$P<0.05$），中药组和假手术组评分之间有显著差异（$P<0.05$）。（见表3）

表3　大鼠损伤清醒后神经功能障碍评分

组别	n	神经功能障碍评分
正常组	7	0③
假手术组	7	0
对照组	12	7.2 ± 1.4②
中药组	12	2.1 ± 1.3①②

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与假手术组比较，$P<0.05$；③与假手术组比较，$P>0.05$。

2.4　肉眼形态学变化

所有创伤动物的脑组织均可见明显、广泛的蛛网膜下腔出血。右顶叶置小钢柱处可见脑挫伤，挫伤脑局部有点片状出血灶，大脑半球外观肿胀，不同程度的脑表面沟回消失，中药组较对照组程度为轻。

2.5　电镜脑组织损伤情况比较

中药组脑损伤程度低于对照组，对照组电镜见血管外周水肿，轴突水肿，神经纤维水肿、溶解，轴突内线粒体水肿，胶质细胞水肿，为绝大多数；中药组神经元正常，血管正常，神经纤维正常为多数，仅见部分轴突内线粒体水肿，树突有灶性水肿，胶质细胞水肿，血管外周水肿。详见图1~8。

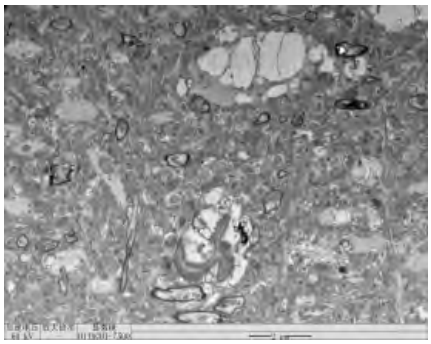


图1　对照组血管外周、轴突、神经纤维水肿



图2　对照组轴突内线粒体、外周性水肿

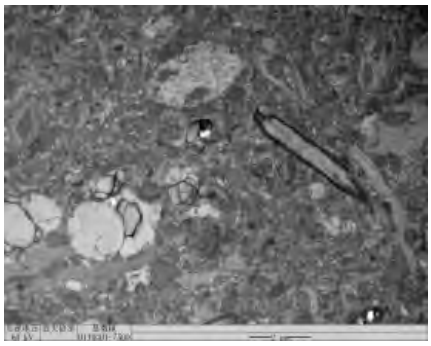


图3　对照组神经纤维水肿、溶解，轴突水肿



图4　对照组胶质细胞、神经纤维水肿

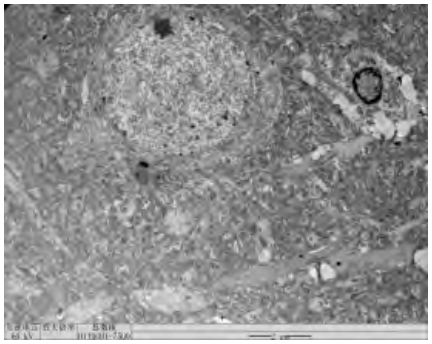


图5　中药组轴突内线粒体、胶质细胞水肿

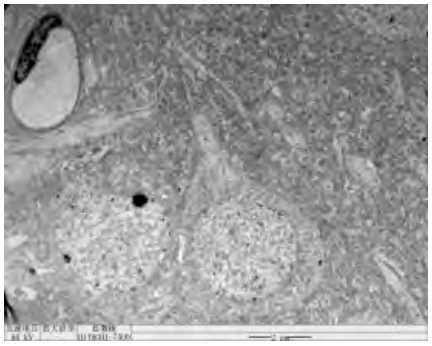


图6　中药组神经元、血管、神经纤维正常

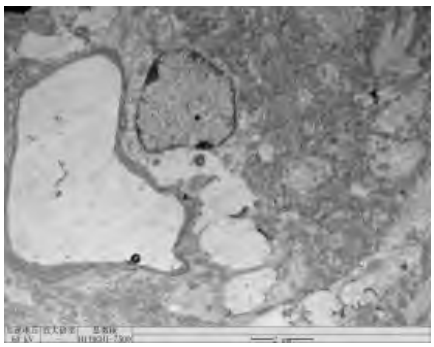


图7　中药组血管外周、胶质突起水肿



图8　中药组正常轴突、树突有灶性水肿

3 讨 论

昏迷是一种常见的急症表现，是上行网状激活系统机能受损所致的持续性深度意识障碍状态，不易唤醒。引发原因有很多，缺血、中毒、脑外伤等是常见的昏迷原因，弥漫性轴突损伤（DAI）是常见的弥漫性脑损伤类型，占重型颅脑损伤的28%~41%，其病死率高达42%~62%，并且是导致伤后植物状态的主要原因[5]，同时合并局限性脑损伤预后更差，在颅脑外伤伴有弥漫性轴突损伤时，持续性昏迷更常见[6]，因此，DAI最显著的临床特征是伤后长时间的持续性昏迷，这种昏迷并非由颅内血肿占位或脑挫伤所致，而是由于损伤脑内广泛纵横轴索导致上行激活系统和皮层广泛抑制的结果，从而使多数患者伤后即刻长时间深度昏迷，这种深度昏迷可致患者数小时内死亡或成植物状态或遗有重度残疾[7]。因此，弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤大鼠模型是理想的昏迷模型[4]，本实验采用脑外伤昏迷模型，观察益神启窍方对昏迷的作用。

祖国医学认为，头被仆击后，脑络损伤，气血逆乱，引致瘀血闭阻，脑络不畅，遂致神明受损，神机失灵，故见伤后神昏深长不醒，气血逆乱又可致津聚不行而痰浊自生，痰瘀博结、内阻必上逆于清窍而加重昏迷，以痰、瘀、闭为特征，治当以豁痰、化瘀、开窍为要，益神启窍方具有补气养血、活血化瘀、豁痰化浊、明蒙启闭、醒神开窍之功[8]，实验显示中药组出现角膜反射时间显著短于对照组（$P<0.05$），出现四肢爬行时间也显著短于对照组（$P<0.05$），中药组“麻－爬”时间（158.8min）甚至短于对照组“麻－角”时间（185.4min），表明中药组能缩短实验大鼠的昏迷时间，有显著的促醒作用；呼吸恢复时间中药组显著短于对照组（$P<0.05$），表明中药组有兴奋呼吸中枢作用；神经功能恢复中药组优于对照组（$P<0.05$），表明中药组有减轻脑损伤作用；从电镜看，中药组脑损伤程度低于对照组，中药组神经元、血管、神经纤维大多数正常，仅见少部分见轴突内线粒体水肿，树突有灶性水肿，胶质细胞水肿，血管外周水肿，且水肿程度为轻，表明中药组有明显的脑保护作用。

有关脑外伤昏迷的机制研究有很多，膜内外离子流改变是环节之一，在脑损伤发生时钙离子内流，并激活钙蛋白酶作用于神经元及神经胶质细胞，进而水解细胞蛋白，导致神经元及神经胶质细胞结构遭到破坏[9]。Bryan等[10]证实在中枢神经损伤时钠通道表达出现上调，对神经元及胶质细胞具有损伤性作用，它在中枢神经损伤中，扮演着与钙离子内流同样重要的角色，是导致神经元和神经胶质细胞损伤的重要因素。John[11]发现，轴突损伤后钠通道表达增加，导致钠内流，从而触发钠钙离子交换及电压门控性钙通道促进钙离子内流，加速了神经元及胶质细胞损伤。导致细胞毒性细胞肿胀、细胞内酸中毒以及钠原性钙离子内流而出现细胞缺血缺氧性死亡[12]。

益神启窍方对实验大鼠昏迷状态影响的确切机制尚不清楚，但可能与其组方中的以下药理作用有关，麝香小剂量具有兴奋中枢神经和苏醒作用[13]，尤其是兴奋呼吸中枢[14]，及抗脑缺血缺氧、抗脑水肿、改善微循环，具有脑损伤的保护作用[15]，具有神经胶质成熟因子样的作用，能够促进胶质细胞的分裂和生长[16]；石菖蒲具有兴奋脊髓、中脑和大脑，对脑组织有保护作用[17]；桃仁增加脑血流量，降低脑血管阻力[18]，白芷具有中枢兴奋作用，小剂量能兴奋延髓呼吸中枢、血管运动中枢，使呼吸兴奋，并有血管显著扩张作用及镇痛、抗炎作用[19]；黄芪能降低软脑膜血管的通透性[20]；及当归补血汤改善脑血供，提高耐缺氧等作用[21]有关，其机制可能与调节钠、钙通道，减少钠、钙离子内流有关。◆

参考文献

[1] 丰广魁，奚肇庆，刘涛，等，益神启窍方合并综合疗法对持续性植物状态患者PVS疗效评分的影响[J].中医杂志，2007，48（11）：999-1000.

[2] The multi-society task force on PVS. Medical aspects of the persistent vegetative state.Part 1[J].N Engi J med，1994，330：1499.

[3] 何江弘，李玉著.延长性昏迷的颅脑损伤动物模型[J].中国临床神经外科杂志，2000，5（1）：60-62.

[4] 王君宇，霍雷.弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤动物模型[J].湖南医科大学学报，2000，25（3）：233-237.

[5] 张小平，王建璞，蒲国华，等.异丙酚对大鼠脑弥漫性轴索损伤后的脑保护作用[J].中华麻醉学杂志，2000，20（12）：745-748.

[6] Youmans J. Neurological surgery[M]. 4th ed. Philadephia: Saunders，1996：1533-1546.

[7] 王君宇，姜冰，张明宇，等.34例脑弥漫性轴索损伤的临床特点与预后[J].中华创伤杂志，2001，17（1）：26-28.

[8] 丰广魁，奚肇庆.持续性植物状态(PVS)的中医证治[J].中华中医药学刊，2007，25（11）：2294-2296.

[9] Averna M，Stifanese R，De Tullio R，et al. Regulation of calpainactivity in ratbrain with altered Ca^{2+} homeostasis [J]. J Biol Chem，2007，282（4）：2656-2665.

[10] Hains BC，Klein JP，Saab CY，et al. Upregulation of sodium channel Nav1. 3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury [J]. J Neurosc，2003，23（26）：8881-8892.

[11] Wolf JA，Stys PK，Lusardi T，et al. Traumatic axonal injury induces calcium in fluxmodulated by tetrodotoxin-sensitive sodium channels [J]. J Neurosc，2001，21（6）：1923-1930.

[12] 谭海斌，游潮，黄光富，等.创伤性脑损伤后NF-kBp65、ICAM-1表达及其意义[J].中华神经外科疾病研究杂志，2006，5（5）：394-402.

[13] 曹婉如.麝香和麝香酮缩短大鼠戊巴比妥钠睡眠时间的探讨[J].中草药，1980（7）：309.

[14] 郝吉福，程怡.麝香的药理学研究概况[J].时珍国医国药，2004，14（4）：60.

[15] 李仪奎，胡月娟.麝香对中枢耐缺氧能力的探讨[J].中草药，1985（3）：19-21.

[16] 刘德福.麝香和冰片促进雪旺细胞生长作用的研究[J].哈尔滨医科大学学报，1986（4）：6.

[17] 方永奇，吴启端，等.石菖蒲对中枢神经系统兴奋-镇静作用研究[J].广西中医药，2001，24（1）：49.

[18] 王道芳.浅述桃仁与苦杏仁的药理及临床应用[J].基层中药杂志，2002，16（6）：61-62.

[19] 凤良元.五种不同产地白芷药理作用的比较研究[J].安徽中医学院学报，1990，9（2）：56.

[20] 吴大正，胡之壁.黄芪皂苷甲对组胺引起的大鼠脑软膜微血管内皮增加的影响[J].中国中药杂志，2001，26（12）：850-853.

[21] 刘计.当归补血汤的药理研究[J].中药药理与临床，1987，3（3）：7.