DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2011.06.020

中药益神启窍方对弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤大鼠脑 β-APP 表达的影响

丰广魁[1*]，程全[2]，奚肇庆[3]，吴春梅[4]

（1. 江苏省连云港市中医院脑病科，江苏 连云港 222004；2. 中南大学湘雅医院神经外科，湖南 长沙 410008；3. 南京中医药大学附属医院，江苏 南京 210029；4. 江苏省连云港市中医院药学部，江苏 连云港 222004）

摘要：目的 观察中药益神启窍方对弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤大鼠 β-APP 表达的影响及可能机制。**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、模型组 12 只、中药组 12 只，后 2 组再随机分为创伤后 6 h、12 h、24 h 3 组，每组 4 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，分别用 HE 染色和 β-APP 免疫组化染色，观察造模后 6 h、12 h、24 h 大鼠脑组织病理学改变和 β-APP 的表达。**结果** 假手术组与正常组 β-APP 表达差异无统计学意义（$P>0.05$）；中药组 6 h、12 h、24 h β-APP 表达均低于模型组、有显著性差异（$P<0.05$），但仍高于假手术组，有显著性差异（$P<0.05$）。HE 染色正常组、假手术组无异常；模型组可见脑实质水肿，血管扩张淤血，蛛网膜下腔出血，部分神经元肿胀和少量核固缩，中药组见脑实质水肿程度、血管扩张淤血轻微，见少量的蛛网膜下腔出血，部分神经元轻微肿胀和少量核固缩。**结论** 中药益神启窍方能够降低损伤脑组织中 β-APP 的表达，这可能与其具有脑保护作用有关。

关键词：弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤；大鼠；益神启窍方；β-APP

中图号：R285 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-0482(2011)06-0549-03

Effects of Yishen Qiqiao Fang on Cerebral β-APP Expression of Rats with Diffuse Axonal Injury and Focal Cerebral Contusion

***FENG Guang-kui*[1*]，*CHENG Quan*[2]，*XI Zhao-qing*[3]，*WU Chun-mei*[4]**

(1. *Encephalopathology Department, Lianyungang TCM Hospital, Lianyungang, 222004, China*; 2. *Neurosurgery Department, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410008 China*; 3. *Jiangsu Provincial TCM Hospital, Nanjing, 210029, China*; 4. *Department of Pharmacy, Lianyungang TCM Hospital, Lianyungang, 222004, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects and possible mechanisms of Yishen Qiqiao Fang on the expression of β-APP in the brain of rats with diffuse axonal injury and focal cerebral contusion. **METHODS** *Diffuse axonal injury and focal cerebral contusion animal model* was adopted as a sample. 36 male SD rats were randomly divided into four groups: 7 in normal group, 7 in sham-operated group, 12 in control group and 12 in Chinese drug group. The last two groups were randomly divided into three groups, namely post-traumatic 6 h, 12 h and 24 h, four in each group. Yishen Qiqiao Granule was lavaged in Chinese drug group every day one week before modeling, while the same amount of physiological saline was only lavaged in model group. Both groups were stained with HE and β-APP immunohistochemistry respectively, and then cerebral histopathological changes and β-APP expressions of rats were observed 6h, 12 h and 24 h after modeling. **RESULTS** There was no significant differences in sham-operated group and normal group with regard to β-APP expression ($P>0.05$); The β-APP expressions of Chinese drug group 6 h, 12 h, and 24 h were all lower than that of control group, indicating significant differences ($P<0.05$), but they were still higher than that of sham-operated group, suggesting significant differences (in 12 h) ($P<0.05$). HE staining was normal in normal group and sham-operated group; cerebral parenchyma edema, vascular congestion expansion, subarachnoid hemorrhage, a part of neuronal swelling and a small portion of nuclear condensation were presented in control group, whereas the mild cerebral parenchyma edema and vascular congestion expansion, a small amount of subarachnoid hemorrhage, a part of slight neuronal swelling and mild nuclear pyknosis were shown in Chinese drug group. **CONCLUSION** Yishen Qiqiao Fang can reduce β-APP expression in damaged brain tissues, which may be associated with its function of protecting the brain.

KEY WORDS: diffuse axonal injury and focal cerebral contusion; rats; Yishen Qiqiao Fang; β-APP

收稿日期：2011-07-25；**修稿日期：**2011-10-09

基金项目：江苏省连云港市卫生局医学重点人才培养计划资助课题（ZC110）

作者简介：丰广魁（1962-），男，山西山阴人，江苏省连云港市中医院主任中医师，医学博士。*通信作者：lygfgk@163.com

弥漫性轴突损伤(DAI)是常见的弥漫性脑损伤类型,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[1],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[2],中药益神启窍方由黄芪、当归、麝香、桃仁、石菖蒲、白芷组成,能显著提高持续性植物状态(PVS)患者血清、脑脊液多巴胺含量[3],调节 PVS 患者脑脊液中氨基酸含量[4],研究旨在观察中药益神启窍方对弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤大鼠脑组织 β-APP 表达的影响。

1　材料

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(动物生产许可证号:SCXK(湘)2009-0004,使用许可证号:SYXK(湘)2011-0001),体质量 350～380 g。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。

2　方法与结果

2.1　动物分组

随机分为 4 组,正常组 7 只、假手术组 7 只、模型组 12 只、中药组 12 只,后 2 组再随机分为创伤后 6、12、24 h 3 组,每组 4 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,模型组只灌胃等剂量的生理盐水。

2.2　模型制作及组织切片处理

根据"弥漫性轴突损伤合并局灶性脑挫伤动物模型"[5]方法制作。手术前称质量,腹腔内注射水合氯醛麻醉后从气管插管从而保持呼吸,同时用模型方法进行打击。

正常组不给予任何处理。假手术组除不施打击外,操作同前。大鼠脑组织常规固定,取出固定好的脑组织,沿挫伤灶前、后端的脑组织作冠状切面取材,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,连续冠状切片,片厚约 5 μm。β-APP 免疫组化染色切片取顶叶皮层挫伤灶取 5 个视野(7 693.4 μm^2),应用 MIAS 医学图像分析系统测量,β-APP 选用阳性细胞数(N),β-APP SP 法免疫组化染色采用常规染色方法,试剂盒分别由武汉博士德公司、北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

2.3　统计学处理

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

2.4　结果

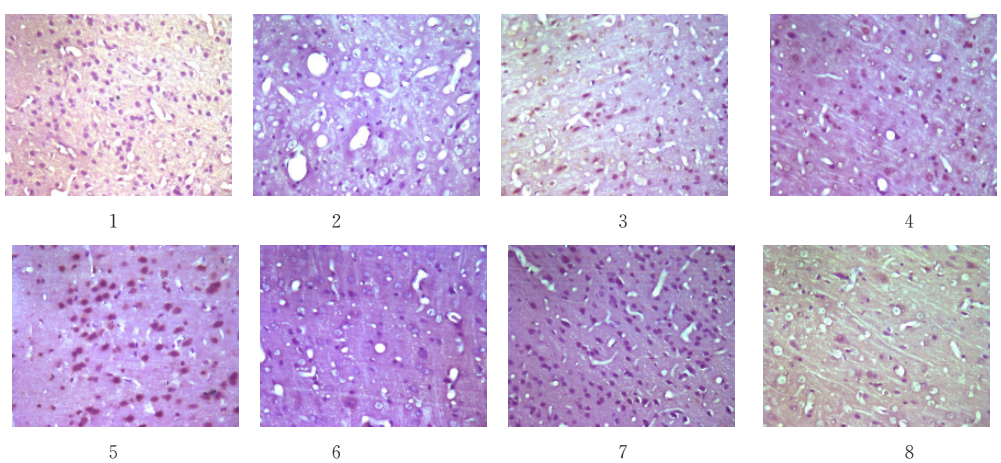
2.4.1　各组大鼠脑组织 β-APP 表达比较

结果见表 1、图 1。

表 1　各组大鼠脑组织 β-APP 比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	6 h	12 h	24 h
正常组	7	6.50±2.59	—	—
假手术组	7	7.00±1.87	—	—
模型组	12	31.75±6.18	17.25±4.35	56.50±5.00
中药组	12	19.75±2.21*△	10.76±1.71*△	32.11±3.74*△

注:与模型组比较,*$P<0.05$;与假手术组比较,△$P<0.05$。



注:1. 免疫染色正常组;2. 免疫染色假手术组;3. 免疫染色组 6 h;4. 免疫染色组 12 h;5. 免疫染色组 24 h;6. 免疫染色中药组 6 h;7. 免疫染色中药组 12 h;8. 免疫染色中药组 24 h

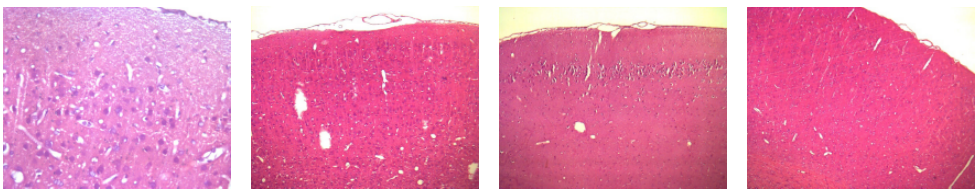
图 1　β-APP 免疫组化染色图片(×400)

2.4.2　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。于右顶叶放置小钢柱处可见脑挫裂伤、局部有点片状出血灶，大脑半球外观肿胀，程度不同的脑表面沟回消失，中药组损伤程度低于模型组。

2.4.3　大鼠光镜 HE 染色脑组织损伤情况比较

正常组、假手术组 HE 染色后脑皮质神经元结构、细胞形态正常，呈锥形或三角形，核膜完整，核仁淡染，清晰明显，纤维排列整齐，着色均匀；模型组 HE 染色后，病灶部位可见脑实质水肿，血管扩张淤血，见明显的蛛网膜下腔出血，部分神经元肿胀和少量核固缩；中药组 HE 染色后脑实质水肿程度轻微，血管扩张淤血少，见少量的蛛网膜下腔出血，部分神经元轻微肿胀和少量核固缩，见图 2。



1　2　3　4

注：1. HE 正常组；2. HE 假手术组；3. HE 模型组 24 h；4. HE 中药组 24 h

图 2　脑组织 HE 染色图片（×100）

3　讨论

β-APP 是一种跨膜蛋白，全称为淀粉样前体蛋白 β（β-Amyloid PrecursorProtein，β-APP），β-APP 在中枢神经系统内广泛存在，具有神经营养、促进突起发生、生长作用，该物质及其产物在脑损伤后表达增强，且与伤情、预后及颅内病理生理变化密切相关[6]，作为颅脑损伤后早期的检测指标具有重要的价值。

β-APP 是通过轴突快速转运机制运输的一种蛋白成分，在脑外伤时，β-APP 的轴突运输被打断而集聚或作为一种快速反应性蛋白而诱导增高，作为弥漫性轴突损伤（DAI）后即刻表达升高而被视为一种急性期蛋白的 β-APP，可能具有促进神经元轴突生长和保护神经元免受损伤的功能，因此，也被视作为 DAI 的病理诊断依据[7]。本次实验中，模型组、中药组均出现 β-APP 先升高后降低再升高的驼峰样改变。中药组 β-APP 6 h、12 h、24 h 均低于模型组，表明中药组有显著的减轻脑损伤、增加脑保护作用（$P<0.05$），HE 染色中药组所见脑实质水肿程度，血管扩张淤血，及部分神经元肿胀程度等均轻于模型组也说明中药组有明显的脑保护作用，但仍显著高于假手术组（$P<0.05$），表明中药组虽然能降低 β-APP 表达但仍不能降至正常。

中药组能减轻肉眼、及 HE 染色所见脑组织的损伤程度，及降低 β-APP 的表达，其机理尚不十分清楚，但可以推测弥漫性轴索损伤合并局限性脑损伤符合中医跌打损伤，络脉破溢，瘀血生成，痰瘀阻滞，气血失常，神明受蒙的病因病机，正与益神启窍方的功效对应，确切机制有待进一步研究。

参考文献：

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

[2]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.

[3]Feng GK, Liu T, Xi ZQ. Effect of Yishen Qiqiao Fang on dopamine content in serum and cerebrospinal fluid of patients in persistent vegetative statec[J]. Neural Regeneration Research, 2007, 2(7): 411-415.

[4]王培东，丰广魁，吴春平，等. 益神启窍方及综合疗法对持续性植物状态患者脑脊液氨基酸含量的影响[J]. 中华急诊医学杂志，2009，18(9)：973-976.

[5]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.

[6]李宗平，黄思庆. 颅脑损伤后 β-APP 及其产物在脑组织中的变化及临床意义[J]. 国外医学：神经病学神经外科学分册，2003，30(1)：30-32.

[7]Bell JE, Becher JC, Wyatt B, et al. Brain damage and axonal injury in a Scottish cohort of neonatal deaths[J]. Brain, 2005, 128(5): 1070-1081.

（编辑：李伟东　董宇）