

回神颗粒减轻中度创伤性脑损伤大鼠脑水肿的疗效机制

崔俊波^{1,2}, 陈宝贵²

(1.中国中医科学院博士后科研流动站 北京 100700;2.天津中医药大学附属武清中医院 天津 301700)

[摘要] **目的** 探讨回神颗粒对中度创伤性脑损伤(TBI)脑水肿的疗效机制。**方法** 应用液压性脑损伤装置建立中度TBI模型,创伤压力为(170±10) kPa,作用时间为(20±2) ms,随机将大鼠分为6组:正常组、假手术组、模型3 d组、模型7 d组、治疗3 d组、治疗7 d组。治疗3 d组和7 d组于创伤后即刻用2 mL药液(含回神颗粒0.27 g)灌胃1次,此后分别于每日早晚各灌胃1次,每次2 mL药液。采用双光束荧光分光光度计测定6组动物脑细胞内游离钙浓度;采用荧光定量PCR检测6组动物脑组织内N-甲基-D-天门冬氨酸受体1(NMDAR-1)、水通道蛋白4(AQP-4)的变化。采用光镜和扫描电镜观察6组动物脑损伤区脑细胞的病理形态学改变。**结果** 与正常组比较:模型3 d组细胞内游离钙明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。治疗3 d组细胞内游离钙的浓度较模型3 d组明显降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与正常组比较:模型3 d组、模型7 d组NMDAR-1及AQP-4的表达均明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。治疗3 d组NMDAR-1及AQP-4的表达均较模型3 d组明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。光镜和电镜下观察模型3 d组、模型7 d组、治疗3 d组和7 d组均可见到明显的脑细胞损伤的病理形态学改变。与正常组和假手术组比较,存在明显区别;与模型3 d组和模型7 d组比较,应用回神颗粒后,治疗3 d组和7 d组的脑损伤区病理形态学改变明显减轻。**结论** 回神颗粒能够减轻创伤性脑水肿,维持细胞的正常结构,减轻创伤性脑损伤。其作用机制可能为遏制钙超载、减轻NMDAR-1及AQP-4的过度表达。

[关键词] 创伤性脑损伤;脑水肿;细胞内游离钙;N-甲基-D-天门冬氨酸受体1;水通道蛋白4;回神颗粒;人参;石菖蒲;鹿角

[中图分类号]R285.5

[文献标识码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.01.006

The Mechanism Research of Huishen Granule Alleviate Hydrocephalus on Moderate Traumatic Brain Injury Model Rats

CUI Junbo^{1,2}, CHEN Baogui²

(1. Post Doctoral Research Station, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Wu Qing TCM Hospital Affiliated to Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 301700, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of Huishen Granule on hydrocephalus of moderate traumatic brain injury (TBI). **Methods** Using the equipment of fluid percussion injury (FPI) to establish moderate FPI model in SD rats. The traumatic pressure was (170 ±10) kPa, traumatic time was (20 ±2) ms. The rats were randomly divided into 6 groups: normal group, sham group, model 3 d group, model 7 d group, treatment 3d group, treatment 7 d group. The 3 d and 7 d treatment group were immediately given 2 mL fluid (contain 0.27 g Huishen Granule) by gavage. Then the rats were given by gavage twice for 2 mL every time in morning and evening. The concentration of $[Ca^{2+}]$ in brain cells was examined by using double-beam fluorescent spectrophotometer. The change of NMDAR-1 and AQP-4 in all 6 groups was determined by using fluorescence quantitative polymerization chain reaction (PCR). The TBI pathological change of all 6 groups were observed by using optical microscope and election microscope. **Results** Compared with the normal group, the $[Ca^{2+}]$ of model 3 d group was increased obviously, the difference was statistically significant ($P<0.01$). Compared with model 3 d group, the $[Ca^{2+}]$ of treatment 3 d group was decreased obviously, with statistical significance ($P<0.01$). Compared with the normal group, the NMDAR-1 and AQP-4 expressions of model 3 d group and model 7 d group were increased obviously,

[收稿日期]2015-06-30

[基金项目]全国名老中医传承工作室建设项目[国中医药人教发(2011)41];全国中医药传承博士后资助项目[国中医药人教函(2013)240号];天津市“131”创新型人才第一层次人选培养工程[津人才(2013)9]。

[作者简介]崔俊波,男,医学博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合治疗脑病研究及名中医学术经验继承应用工作,E-mail:clevertwins@163.com。

which had statistical significance ($P < 0.01$). Compared with model 3 d group, the NMDAR-1 and AQP-4 of treatment 3 d group descended significantly, which had statistic significance ($P < 0.05$). The TBI pathological change of model 3 d group, model 7 d group, treatment 3 d group and treatment 7 d group were observed under optical microscope and electron microscope. Compared with the normal and sham-operation groups, it had obvious difference. Compared with model 3 d group and model 7 d group were significantly alleviated. **Conclusion** Huishen Granule can alleviate traumatic hydrocephalus, maintain the normal structure of neurone, and lessen the TBI. The mechanisms probably were by inhibiting calcium overload and down regulating the NMDAR-1 and AQP-4 expressions.

[**Keywords**] traumatic brain injury; hydrocephalus; intracellular free calcium concentrations; NMDAR-1; AQP-4; Huishen Granule; ginseng; acorus gramineus; antlers

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI), 也称为脑外伤, 是指由各种原因的创伤引起的脑组织损害。创伤性脑水肿是 TBI 后最重要的继发性病理生理反应, 故脑水肿作为 TBI 时的一种严重病理生理反应仍是危及生命的关键因素^[1]。本实验采用中度 TBI 大鼠模型, 观察回神颗粒对中度 TBI 后细胞内钙、AQP-4、NMDAR-1 含量的影响及脑损伤区脑细胞的病理形态学改变, 探讨回神颗粒减轻创伤性脑水肿的作用环节。

1 材料与方法

1.1 动物来源及分组

SPF 级、雄性 SD 大鼠 50 只, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证编号: SCXK(京) 2002-0003。体质量 (320 ± 10) g, 实验大鼠于动物室内分开笼中喂养, 室内温度为 (17 ± 3) °C, 湿度为 (50 ± 20)%, 每日光照 12 h, 并提供约 50 g 全营养鼠粮及足量清洁饮水。SPSS 软件随机分为 6 组: 正常组和假手术组各 7 只; 模型 3 d 组及 7 d 组、治疗 3 d 组及 7 d 组均为每组 9 只。

1.2 主要仪器和试剂

液压颅脑损伤装置 (美国弗吉尼亚州立大学制造, 天津环湖医院神经外科研究所提供)、DY-1 型动物立体定位头架 (天津市医疗器械研究所)、显微成像系统 (日本 OLYMPUS)、H-600 透射电镜 (日立)、F-4500 双光束荧光分光光度计 (日立)、FTC-2000 型荧光定量 PCR 扩增仪 (上海枫岭生物技术有限公司)、GIS2000 凝胶图像分析系统 (上海天能公司)、荧光定量 PCR 主反应液 (大连宝生物公司)、胎牛血清 (Sigma 公司) 等。

1.3 颅脑创伤模型的制作

参照崔俊波等^[2]文献中方法, 应用液压性创伤性装置, 调整打击锤角度至 12° , 则产生的压力大小 (170 ± 10) kPa, 作用时间为 (20 ± 2) ms, 即可制作中度 TBI 模型, 选取造模成功的动物进入试验环节。

1.4 干预方法

治疗组: 依据回神颗粒 (天津市武清区中医医院提供, 制剂许可证号为: 津 XZ20010039, 5 g/袋, 相当于生药 15 g/袋) 临床应用剂量: 3 次/d \times 10 g/次 = 30 g/d, 则标准体质量大鼠剂量为 $30 \text{ g/d} \times 0.018 = 0.54 \text{ g/d}$, 用 4 mL 生理盐水稀释成药液, 并于创伤后即刻用 2 mL 药液灌胃 1 次, 其后再分别于每日早晚各灌胃 1 次, 每次 2 mL 药液。其余各组: 创伤后即刻不灌胃, 其后再分别于每日早晚各灌胃 1 次, 每次 2 mL 生理盐水。

1.5 取材时间及方法

模型 3 d 组、治疗 3 d 组于损伤后 3 d 处死动物; 因假手术组未进行实际脑创伤造模, 故在 3 d 时间点时未处死动物。假手术组、正常组、模型 7 d 组、治疗 7 d 组均于实验 7 d 时一起处死动物。每组各取 6 只动物取脑。

取脑方法: 大鼠取俯卧位, 沿颅顶正中线从枕后部直至鼻尖切开大鼠头皮, 暴露大鼠颅骨。用拆线剪在枕后横断颈椎, 从椎管内沿正中线向前剪开枕骨至后囟。再以拆线剪沿正中线剪开鼻骨、额骨至前囟, 轻轻打开颅腔, 暴露出大鼠脑组织。用剪刀轻轻将与脑组织相连的脑膜剪除。将鼠脑取出, 选取损伤区脑组织约 400 mg 并立即投入液氮中, 荧光定量 PCR 检测时使用。选取损伤区脑组织约 200 mg 并立即放入冰的 Hanks 液, 检测细胞内钙时使用。选取损伤区脑组织及海马区组织, 按照光镜及电镜检查具体要求处理及保存标本。

1.6 双光束荧光分光光度计测定细胞内钙^[3-4]

取大鼠脑损伤区 (正常组取等同于损伤区位置) 脑组织 200 mg, 于 Hanks 液中洗尽血迹。37 °C 中 0.25% 的胰蛋白酶消化 30 min, 冰的含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液终止消化, 过 200 目筛网, 滤液 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, Hanks 液洗 2 次, 悬浮在含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中, 最终制成细胞浓度为 2×10^6 个/mL 的细胞悬液。取细胞悬液

10 μL , 加入 10 μL 台盼蓝溶液染色, 观察细胞活性, 要求细胞成活率达 85% 以上。将上述细胞悬液进行 2000 r/min 离心 4 min, 弃上清液, 加入 1 mL 的乐氏液; 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温 5 min, 加 3 μM 的 Fura-2/AM, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 将细胞悬液 2000 r/min 离心 4 min, 弃上清液, 加 1 mL 乐氏液溶解沉淀, 洗涤后 2000 r/min 离心 4 min; 弃上清液, 再加入乐氏液溶解沉淀, 重悬细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 5 min, 室温避光待用。

荧光分光光度计测定钙离子荧光强度测定条件为: 激发光栅为 5 nm, 发射光栅为 10 nm; 以 300~420 nm 扫描激发光谱, 如峰值在 340 nm, 则表明 Fura-2 已负载入细胞内, 即可进行细胞内钙的检测。固定激发波长为 340 nm/380 nm, 发射波长为 500 nm 条件下, 测定静息状态及最大及最小 Ca^{2+} 浓度; 1~2 min 达基线后, 观测 2~3 min, 待基线稳定; 加入 10% 浓度的 triton-100 获得样本的最大荧光值; 加入过量 0.5 mol/L 的 EDTA 获得样本的最小荧光值。结果计算: $[\text{Ca}^{2+}]_i = kd \cdot (sf_2/sb_2) \cdot [(R-R_{\min}) / (R_{\max}-R)]$ 。其中, kd: Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数, 为 224 nmol/L; sf₂: 在无 Ca^{2+} 状态下 380 nm 激发的荧光强度; sb₂: 在饱和 Ca^{2+} 状态下 380 nm 激发的荧光强度; R: 每次测得的荧光比值; R_{max} 指 Fura-2 的所有结合部位均为 Ca^{2+} 所饱和时所测得的所测得的荧光比值; R_{min} 指所有 Fura-2 均为游离形式时所测得的荧光比值。

1.7 荧光定量 PCR 检测 AQP-4、NMDAR-1^[5-6]

取无菌留取的大鼠脑组织 100 mg 以 Trizol 一步法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 含量, 分装后 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用 cDNA 逆转录与 PCR 扩增一步法试剂盒 (Takara 公司), 在 PCR 仪中进行荧光定量 PCR 反应。采用 ABI 公司的 PRIMER EXPRESS 2.0 软件设计, 设计 NMDAR-1 合成引物如下: 上游序列 5c-TGAACATGACGGGCTCTGGG-TA-3c; 下游序列: 5c-GAGCTGAAGTCCGATGATGCC-3c。设计 AQP-4 合成引物如下: 上游序列 5c-TGA ACA TGA CGG GCT CTG GGT A-3c; 下游序列: 5c-GAG CTG AAG TCC GAT GAT GCC-3c。反应液配制: 5 μL 的 10 \times RT-PCR 缓冲液, 10 μL 的 MgCl_2 , 5 μL 的 dNTP, 1 μL 的 RNA 酶抑制剂, 1 μL LAMV 优化的逆转录酶, 1 μL LAMV 优化的 TaqDNA 聚合酶, RNA 及上、下游引物各 1 μL , 加去除 RNA 酶的 H_2O 至 50 μL 。反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min 使逆转录酶失活, 94 $^{\circ}\text{C}$

变性 30 s, 54.8 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 扩增 35 个循环, 全部循环结束后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。在延伸过程中搜集荧光信号, 于每次扩增的同时设置无 cDNA 的阴性对照。结果由荧光定量 RT-PCR 仪自带软件进行分析。

1.8 光镜观察

6 组动物每组随机选用 4 只动物作光镜观察。各组动物按时间要求再次麻醉后, 迅速取损伤区脑组织浸入 4% 多聚甲醛内 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 48 h 后, 修成厚 4 mm 块, 常规酒精脱水, 石蜡包埋, 行 5 μm 冠状切片, 作 H-E 染色, Olympus 显微镜下观察、照像。

1.9 电镜观察

6 组动物每组随机选用 3 只动物作电镜观察。各组动物按时间要求再次麻醉后, 迅速取损伤侧海马及损伤区脑组织, 投入 2.5% 戊二醛缓冲液中固定 5~10 min, 等组织稍变硬后, 在显微镜下修整为 1 mm³ 小块, 2% 戊二醛/0.1MPB (pH7.4) 内, 室温固定 2 h, 0.1 mol/L PBS 清洗 3 次, 每次 10 min, 1% 锇酸固定 30~120 min, 再用 0.1 mol/L 的 PBS 清洗 20 min, 按 50% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇、100% 丙酮 (2 次), 各 5 min 进行梯度脱水, 丙酮与环氧树脂 1:1 混合浸透 2 h, 再以纯环氧树脂包埋剂浸透 2 h, 包埋, 80 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内聚合 10 h, 修块, 半薄切片, 光镜定位后, 进行超薄切片, 醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色各 10 min, 扫描电镜观察、拍照、记录和分析。

2 统计学方法及数据处理

统计学处理使用 SPSS 11.5 统计软件。全部数据均以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示。细胞内钙、AQP-4、NMDAR-1 的组间差异显著性用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 两两比较方差齐时用 S-N-K 法, 方差不齐时用 Dunnett's T3 法, 以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 荧光定量 PCR 扩增结果

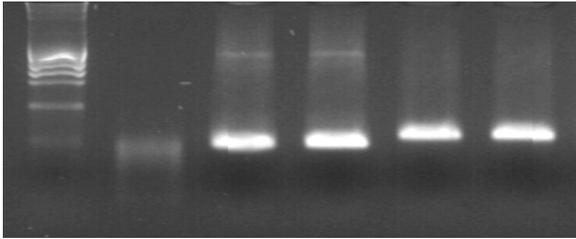
NMDAR-1 及 AQP-4 的荧光定量 PCR 扩增结果如图 1 所示。

3.2 重组质粒克隆鉴定结果

NMDAR-1 及 AQP-4 重组质粒克隆鉴定结果如图 2 所示。

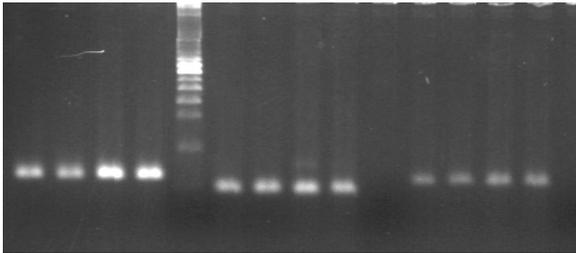
3.3 回神颗粒对中度 TBI 大鼠细胞内钙及 NMDAR-1 mRNA 及 AQP-4 mRNA 的表达影响

与正常组比较: 模型 3 d 组细胞内游离钙明显



从左至右依次:1.marker1,2.marker2,3-4.NMDAR-1,5-6.AQP-4

图1 各组大鼠脑组织 NMDAR-1 及 AQP-4 的
荧光定量 PCR 扩增电泳图



从左至右依次:1-4.G3PDH,5.marker1,6-9.NMDAR-1,10-13.AQP-4

图2 各组大鼠脑组织 NMDAR-1 及 AQP-4
重组质粒克隆电泳图

升高,具有显著性差异($P<0.01$)。治疗3 d组细胞内游离钙的浓度较模型3 d组明显降低,具有显著性差异($P<0.01$)。与正常组比较:模型3 d组、模型7 d组 NMDAR-1 及 AQP-4 的表达均明显升高,差异具有显著性($P<0.01$)。治疗3 d组 NMDAR-1 及 AQP-4 的表达均较模型3 d组明显降低,具有显著性差异($P<0.05$)。

表1 回神颗粒对中度 TBI 大鼠细胞内钙、NMDAR-

	1mRNA 及 AQP-4mRNA 的影响			$(\bar{x}\pm s, n=6)$
	细胞内钙	NMDAR-1mRNA	AQP-4mRNA	
正常组	530.84±65.37	1.041 6±0.009 9	1.032 0±0.010 1	
假手术组	488.24±50.85	1.058 8±0.018 7	1.038 3±0.012 1	
模型3 d组	796.47±93.36**	1.066 5±0.009 1*	1.068 9±0.012 9*	
模型7 d组	566.87±16.01	1.056 9±0.003 4*	1.057 0±0.016 5*	
治疗3 d组	571.41±19.97##	1.051 4±0.009 8#	1.045 8±0.014 6#	
治疗7 d组	554.07±26.67	1.050 0±0.009 9	1.043 9±0.018 5	
F	24.855	3.538	5.177	
P	0.000	0.012	0.002	

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与同期模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.4 损伤区脑组织光镜结果

(1)正常组(图3-A):肉眼下脑组织表面光滑,沟回整齐、清晰,无充血,肿胀及出血灶。H-E染色后观察:脑组织结构正常,细胞排列有序,染色均匀,无出血、肿胀及损伤,未见炎性细胞浸润、血管扩张现象。皮层神经元细胞呈圆形或者椭圆形,核膜完整,核仁清晰可见,核仁淡染呈蓝色,周围神经纤维致密,着色均匀;(2)假手术组(图3-B)与正常组比

较,肉眼观察无明显差别,部分切片偶可见到少许神经元肿胀,体积增大,核膜欠清;(3)模型3 d组(图3-C):肉眼观察,骨窗对应处的脑皮质凹陷,脑皮质表面挫裂伤,其他部位脑组织弥漫肿胀。镜下观察:蛛网膜下腔出血可延及双侧大脑半球,以伤侧为明显,偶而可扩展到小脑表面。脑实质内有明显出血,累及额顶叶感觉运动区,并延及伤侧海马、外囊、纹状体和胼胝体,且出血灶周围血管扩张,微血管外间隙明显增大,神经胶质细胞和组织间隙水肿明显,炎性细胞浸润,部分红细胞被吞噬细胞吞噬,两侧半球有散在的损伤神经元,核呈固缩状。胞质与胞核黏附在一起,胞质强烈嗜伊红,呈严重缺血性改变。同时可见大量的中性粒细胞和单核巨噬细胞积聚在水肿带,部分浸润脑实质;(4)模型7 d组(图3-D):肉眼观察,骨窗对应处的脑皮质凹陷,脑皮质表面挫裂伤减轻,其他部位脑组织肿胀。镜下观察:蛛网膜下腔出血及脑实质内有出血部分吸收,组织水肿减轻,伤区炎症细胞略减少,胶质细胞和纤维组织增生,可见泡沫细胞,距受伤部位越远,上述损伤程度减轻越显著;(5)治疗3 d组(图3-E):肉眼观察骨窗对应处的脑皮质凹陷,脑皮质表面挫裂伤,其他部位脑组织肿胀。镜下观察:蛛网膜下腔出血颜色变淡,有部分吸收。脑实质出血灶周围血管扩张,微血管外间隙增大,神经胶质细胞和组织间隙水肿,部分炎性细胞浸润,可见红细胞被吞噬细胞吞噬,两侧半球有散在的损伤神经元,核呈固缩状。胞质与胞核黏附在一起,胞质嗜伊红;(6)治疗7 d组(图3-F):肉眼观察骨窗对应处的脑皮质凹陷,脑皮质表面挫裂伤明显减轻,其他部位脑组织无明显肿胀。镜下观察:蛛网膜下腔出血及脑实质内出血明显吸收,组织水肿减轻,伤区炎症细胞减少。

3.5 损伤侧脑组织及海马电镜结果

(1)正常组(图4-A):可见正常的内质网、线粒体、高尔基体和多聚核糖体等结构,胞体胞核形态、大小正常。可见正常形态毛细血管管腔,电镜下呈圆形或椭圆形,其内有较多红细胞,与管壁间有血浆形成的间隙,血管周围无环形水肿,可见正常海马神经元;(2)假手术组(图4-B):可见到正常的多聚核糖体和粗面内质网和近似于正常的血管,血管周围线粒体轻度肿胀,但血管周围无环形水肿;(3)模型3 d组(图4-C):可见到海马神经元固缩,胞浆内大量线粒体肿胀、水肿,胞核皱缩,甚至固缩,核膜凹陷,嵴断裂,多聚核糖体解聚,神经细胞胞体及突起固缩,电子密度增高,细胞及血管外周星形细胞突起

肿胀,严重的星形细胞胞浆肿胀,因缺血缺氧导致的细胞内皮细胞核反应性增大;(4)模型7 d组(图4-D):与模型3 d组比较,细胞损伤得到减轻,神经元接近正常,但仍可看到血管周围星形细胞突起肿胀、水肿,线粒体肿胀,嵴消失,因缺血缺氧导致的内皮细胞胞核反应性增大,因组织坏死、损伤导致细胞器退变而形成的髓样小体,凋亡早期的海马神经元;(5)治疗3 d组(图4-E),与模型3 d组比较,回神颗粒在保护海马神经元,减轻细胞水肿,维持血脑屏障完整性方面,均明显优于对照组。可见到近于正常的神经细胞,核内染色质细腻,多聚核糖体和粗面内织网基本正常,多数近于正常的海马神经元。但仍能见到TBI导致的损伤性改变:线粒体肿胀,嵴断裂,血管外周局部星形细胞突起肿胀;(6)治疗7 d组(图4-F),与模型7 d组比较,损伤明显减轻,细胞结构基本恢复正常。可见到正常的神经元和星形细胞,接近于正常的线粒体,轻度肿胀,无固缩,嵴清晰,多聚核糖体和粗面内织网正常。

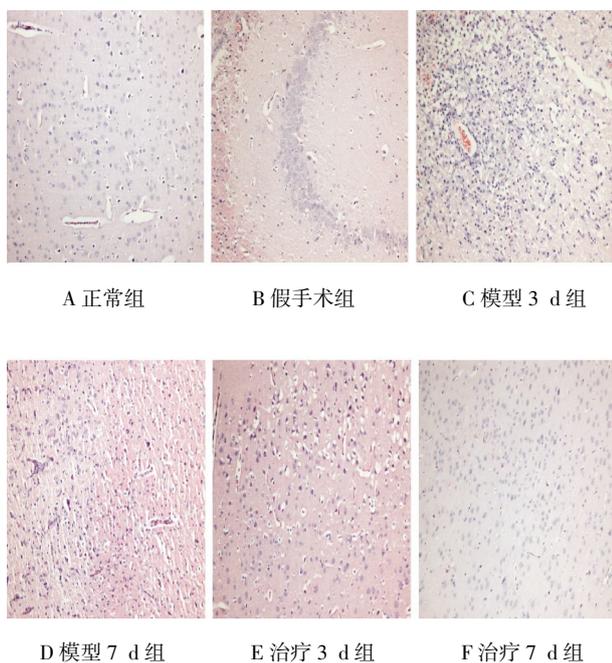


图3 各组大鼠损伤区脑组织光镜图($\times 100$)

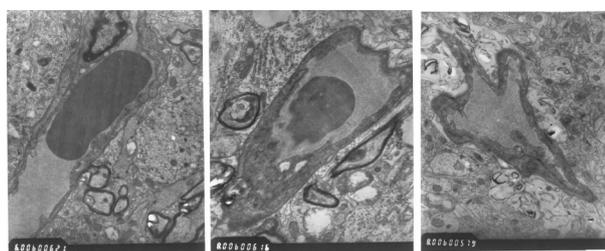


图4 各组大鼠损伤区脑组织及海马电镜图

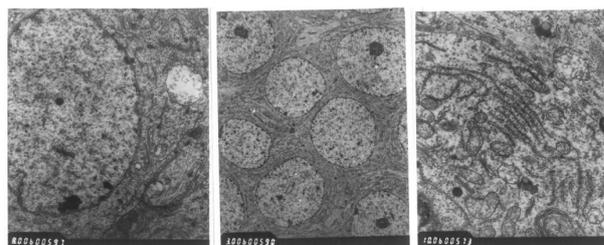


图4 各组大鼠损伤区脑组织及海马电镜图

图4 各组大鼠损伤区脑组织及海马电镜图

4 回神颗粒减轻创伤性脑水肿的机制探讨

创伤性脑水肿的发生机制十分复杂,其中钙离子超载^[7]、兴奋性氨基酸毒性^[8]、AQP-4 过度表达^[9]是创伤性脑水肿发生及发展的三个重要环节。崔俊波等^[10]认为TBI急性期出现气机逆乱而气泄、气脱,进而变证丛生。故气虚血瘀、脑窍闭阻为其主要病机,其治疗大法为补气化痰开窍法。回神颗粒为根据陈宝贵教授的经验方研制的院内制剂,主要由人参、石菖蒲、鹿角、灵芝、五味子、川芎、丹参七味药物组成。具有补益五脏精气、化痰祛瘀、开窍通络之功用。已在治疗脑梗塞、脑出血、痴呆^[11]、创伤性脑损伤^[12]等疾病方面进行广泛实验研究,并取得良好的临床疗效。通过上述实验研究,表明回神颗粒减轻创伤性脑水肿的机制主要包括如下方面:

4.1 回神颗粒遏制钙超载

钙对神经细胞损害和死亡起着决定作用,神经细胞内钙超载是多种病理过程最后导致神经元死亡的“共同途径”,故钙超载是脑损伤的重要发生机制之一^[13-14]。回神颗粒通过遏制TBI后胞浆内游离钙的升高而达到减轻脑水肿,保护脑细胞,减轻脑损害的作用。回神颗粒遏制TBI后胞浆内游离钙的升高的作用机制可能为:(1)减少兴奋性氨基酸释放,降低NMDAR的表达;(2)稳定细胞膜上NMDAR调控型Ca²⁺通道而阻止钙内流,避免钙离子大量内流和胞浆内钙超载。

4.2 回神颗粒减轻NMDAR-1的过度表达

颅脑损伤后脑水肿与兴奋性氨基酸的毒性作用有关,NMDAR-1是中枢神经系统兴奋性氨基酸谷氨酸离子型受体,NMDAR介导的神经元兴奋毒性损伤与脑损伤发生密切相关^[15]。研究表明:在正常大鼠大脑皮质内亦有适量NMDAR蛋白表达,TBI后表达迅速增高,表明脑损伤后NMDAR表达的变化参与了脑损伤急性期的病理生理过程。由于受体表达的增高,使得结合谷氨酸的量增加,从而加重了脑损伤后的兴奋性细胞毒性作用。应用回神颗粒可使损伤区脑组织中NMDAR-1mRNA的表达显著减

少,进而减轻谷氨酸的兴奋性细胞毒性,减轻脑损伤。

4.3 回神颗粒减轻 AQP-4 的过度表达

脑水肿是和脑部疾病治疗密切相关的病理过程,AQP-4 是膜水通道蛋白家族的一员,并在脑组织中高表达,是控制水进出脑组织的通道,其功能和表达与脑水肿密切相关^[16]。AQP-4 在创伤性脑水肿的形成过程中起关键性作用,脑创伤后 AQP-4 表达的上调是加重创伤性脑水肿的主要原因之一^[17]。TBI 后早期应用回神颗粒导致伤灶区脑组织中 AQP-4mRNA 水平的表达显著减少,表明回神颗粒通过维持细胞内环境的稳定,使神经元处于较适宜的环境,能从转录水平抑制 AQP-4 的表达。故抑制 TBI 后 AQP-4 的表达是回神颗粒减轻创伤性脑水肿的作用机制之一。

4.4 回神颗粒减轻 TBI 后病理学损伤

TBI 是外力作用于脑组织导致的脑损害,故 TBI 后可出现显著的脑组织及细胞的病理学改变,主要表现脑出血、蛛网膜下腔出血、脑水肿、轴索损伤、灶性细胞坏死、神经元变性坏死等脑部损害^[18-19],但创伤常亦累及心脏、肝脏等脏器,出现心肌损伤^[20]及应激性肝损害^[21]。本研究发现 TBI 后脑血管发生一系列病理变化,继而引起脑组织含水量的变化。同时发现颅脑损伤后大鼠出现弥漫性神经元的变性、水肿和坏死,表现为神经元的肿胀或皱缩,核仁消失,核膜溶解,胞质强烈嗜伊红,核酸进一步溶解消失。其中创伤后 3 d 最重,7 d 后受损神经元开始恢复。另外光镜和电镜病理观察提示:创伤后 3 d 毛细血管严重损伤,神经胶质细胞和组织间隙水肿明显,神经元胞体呈严重缺血性改变,导致微循环障碍,使脑组织发生继发性脑损伤。这一结果表明毛细血管和神经元结构变化与脑水肿的变化是一致的。通过光镜和电镜观察,与模型组比较,治疗组的 TBI 明显减轻,表明回神颗粒能减轻创伤性脑水肿,维持细胞的正常结构,减轻创伤性脑损伤。研究还发现:对于主要与脑水肿等急性期病变相关的 Ca^{2+} 、AQP-4 及 NMDAR-1 在 TBI 后 3 d 明显升高,此时模型组与治疗组相比,差异最显著。而 TBI 后 7 d 由于动物的自我修复机制,脑水肿减轻,故模型组的 Ca^{2+} 、AQP-4 及 NMDAR-1 亦明显下降,与治疗组比较,无明显差异,但脑损伤依然存在。故本研究提示:针对 TBI 后的不同时期应选用不同的观察指标。

上述研究表明:回神颗粒能够减轻中度 TBI 大鼠脑水肿,维持细胞的正常结构,减轻创伤性脑损伤。其作用机制为可能为:遏制钙超载、减轻 NMDAR-1 及 AQP-4 的过度表达。本研究明确了回神颗粒减轻创伤性脑水肿的初步作用机制及环节,为

回神颗粒治疗 TBI 提供理论依据。

致谢:中国医学科学院血液病研究所分子生物学国家重点实验室郑国光教授、王琳博士在细胞内钙检测;天津市第三中心医院分子生物学实验室高英堂研究员在 RT-PCR 检测;南开大学医学院车永哲教授在光镜观察;原北京天坛医院神经外科研究所孙昇临研究员在电镜观察中给予的指导及帮助。

参考文献:

- [1] 王晶,张培,王怡萌,等.创伤性脑损伤后脑水肿的分类及机制[J].沈阳医学院学报,2013,15(3):180-183
- [2] 崔俊波,梁建伟,陈宝贵.中度液压性创伤性脑损伤模型的建立与评估[J].时珍国医国药,2009,20(9):2 375-2 376.
- [3] 齐弘伟,江朝光,骆 苾,等.不同脑保护方法对神经元钙离子浓度的影响.中国体外循环杂志,2003,1(1):19-21.
- [4] 杨清滔,谷 江,石家齐,等.斯钙素 1 对肾瘤细胞生长调控的影响[J].贵阳医学院学报,2015,40(10):1 043-1 046.
- [5] 曹海燕,姜玉武,王静敏,等.无镁诱导惊厥后发育中神经元 NMDA 受体基因表达[J].中国神经科学杂志,2004,20(4):306-311.
- [6] 李燕华,孙善全.大鼠脑出血后 AQP4mRNA 的表达与 Ca^{2+} 关系的探讨[J].中国急救医学,2003,23(7):437-439.
- [7] 陈 澜,龚其海,石京山.创伤性脑损伤所致脑水肿发病机制研究[J].中国药物经济学,2013,15(8):51-53.
- [8] Anonymous.Molecular mechanism of brain injury and edema[J].Acta Neurochir,2000,76(S):27-28.
- [9] 崔向宁,尹 岭,王玉来.水通道蛋白 4 在大鼠创伤性脑水肿中的作用机制[J].中国康复理论与实践,2005,11(9):719-721.
- [10] 崔俊波,陈慧娟,陈宝贵.创伤性脑损伤急性期中医病机探讨[J].天津中医药,2008,25(1):40-41.
- [11] 张玉岭,陈宝贵.回神颗粒对双转基因阿尔茨海默病小鼠海马区 $A\beta_{1-42}$ 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2015,35(8):22-26.
- [12] 崔俊波,陈宝贵.回神颗粒治疗中度创伤性脑损伤的临床疗效观察[J].中华中医药杂志,2015,30(4):1 147-1 150.
- [13] 邵 阳,曾 琳,龙在云,等.瞬间冲击力致颅脑损伤过程中细胞内钙的变化[J].医用生物力学,2003,18(1):20-22.
- [14] 武俏丽,黄慧玲,李庆国,等.牛磺酸对液压冲击伤后神经细胞内钙超载的保护作用[J].中国现代神经疾病杂志,2009,9(4):382-386.
- [15] 骆 媛,王永安.N-甲基-D-天冬氨酸受体激活在脑缺血中的神经保护及神经毒性作用研究进展[J].2012,26(3):379-382.
- [16] 夏文政,胡韶山.水通道蛋白 4 与脑水肿研究进展[J].现代生物医学进展,2015,15(4):768-770.
- [17] 邓荣海,徐莹莹,赵枫萍,等.大鼠弥漫性神经轴索损伤后 AQP4 的表达[J].江汉大学学报(自然科学版),2006,34(1):67-70.
- [18] 张永亮,李灵芝,廖志钢,等.大鼠侧位液压冲击损伤动物模型的病理生理学观察[J].中国应用生理学杂志,2000,16(1):10-13.
- [19] 李上勋,王博维,刘 丹,等.创伤性脑损伤动物模型研究进展[J].法医学杂志,2011,27(4):286-289.
- [20] 高 燕,林 捷,李 毅,等.大鼠脑外伤后心肌损害与氧化应激的相关性研究[J].湖南中医药大学学报,2010,30(4):51-53.
- [21] 孟庆颖,王天懿,朱玉群,等.创伤性脑损伤后应激性肝损害的动物模型建立[J].湖南中医药大学学报,2010,30(6):3-6.