论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0750-03

Orexin-A 对急性乙醇中毒昏迷大鼠的实验性促醒疗效研究

贾晓军[1],王艳芳[2],赵红梅[3],谌小维[1],张春青[1],胡志安[1,3] (第三军医大学基础医学部:[1]神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,[3]基础医学教学实验中心,重庆 400038;[2]内蒙锡盟阿巴嘎旗医院内科,阿巴嘎旗 011400)

提 要:目的 建立大鼠急性乙醇中毒昏迷模型,观察 orexin-A 对昏迷动物的促醒作用。**方法** 取成年雌性 SD 大鼠 74 只,分别通过腹腔注射乙醇的方法建立大鼠急性乙醇中毒昏迷实验模型。通过翻正反射判断大鼠意识状态的改变;通过脑电图判断脑电活动变化。**结果** 给予腹腔注射 32% 乙醇(14 ml/kg)后,大鼠行为状态和脑电图变化符合昏迷诊断标准。同对照组比较,高剂量 orexin-A 治疗组(7.70 nmol/kg)大鼠翻正反射消失持续时间明显缩短,行为觉醒改变较为显著,而低剂量治疗组(3.85 nmol/kg)行为变化不明显。此外,给予高剂量 orexin-A 可引起大鼠脑电活动改变,同给药前比较,δ 波显著减少。**结论** 侧脑室使用 orexin-A 对昏迷大鼠具有促醒治疗作用。

关键词: orexin-A;乙醇中毒;昏迷;促醒;翻正反射;脑电图

中图法分类号: R595.6;R749.620.5;R977.6 **文献标识码**: A

Arousal effects of orexin-A on coma induced by acute alcohol intoxication in rats

JIA Xiao-jun[1], WANG Yan-fang[2], ZHAO Hong-mei[3], CHEN Xiao-wei[1], ZHANG Chun-qing[1], HU Zhi-an[1,3] ([1]Department of Neurobiology, [3]Experimental Center of Basic Medicine, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Medicine, The Abagaqi Hospital of Ximeng, Abagaqi 011400, Inner Mongolia, China)

Abstract: Objective To establish a rat model of acute alcohol intoxication-induced coma and to investigate roles of orexin-A in treatment of coma. **Methods** Intraperitoneal injection of alcohol was used to cause coma in 74 adult male Sprague-Dawley rats. Changes in the conscious state were judged by loss of righting reflex (LOR). Electroencephalogram (EEG) recordings were used to evaluate the changes in activity of rat brain. **Results** After administration of 32% alcohol (14 ml/kg), both behavioural states and EEG patterns of rats met the diagnosis criterion of coma. In behavioral observations, orexin-A at dose of 7.70 nmol/kg induced significant decrease in the duration of loss of righting reflex (LOR) as compared with the control group, whereas orexin-A at dose of 3.85 nmol/kg had no obvious effects on the duration of LOR. In EEG experiments, 7.70 nmol/kg orexin-A markedly reduced δ activities in coma rats. **Conclusion** The intracerebroventricularl injection of orexin-A has a potent arousal effect on acute alcohol intoxication-induced coma of rats.

Key words: orexin-A; alcohol intoxication; coma; arousal; righting reflex; electroencephalogram

昏迷(coma)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。昏迷为临床常见急症,其病因较多且复杂,归纳起来,主要包括外伤、血管性疾病以及药物中毒。但无论病因如何,一旦发生昏迷,预后往往较差。因此,昏迷发生机制研究和促醒治疗的探索目前已成为医学领域的一大热点和难点[1]。

近年来,觉醒发生和维持机制取得了突破性的进展,觉醒系统以及觉醒启动脑区相继得以鉴定,这为昏迷促醒治疗的探索提供了许多新的思路。已经知道,下丘脑后外侧区 orexins(orexin-A 和 orexin-B)能神经元在觉醒的发生和维持过程中起着关键作用,被称为觉醒启动区[2,3]。多个实验表明,在生理状态下,外源性给予 orexins 可明显延长和增强觉醒,并减少睡眠[4],因此 orexins 具有明确的促觉醒作用。然而,orexins 对于昏迷患者是否同样具有促醒作用,还有待进一步证实。在本实验中,我们首先通过腹腔给予乙醇建立稳定的急性药物中毒性昏迷模型,随后观察 orexin-A 对急性乙醇中毒昏迷大鼠的促醒作用。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及仪器

orexin-A,购自美国 Sigma 公司,批号:113K49511;无水乙

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370465);重庆市科学基金资助项目(2003-2005)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370465) and the Science Foundation of Chongqing (2003-2005)

作者简介:贾晓军(1970-),男,山西省洪洞县人,硕士研究生,主治医师,主要从事昏迷促醒方面的研究。电话:(023)68772253

通讯作者:胡志安,电话:(023)68752253, E-mail: zhianhu@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-07-21;**修回日期**:2005-12-05

醇，成都科龙化工试剂厂提供，批号：20050806，以生理盐水稀释配制成 32% 乙醇溶液；人工脑脊液（artificial cerebrospinal fluid，aCSF）的配制：aCSF 中各种离子成分及其浓度（mmol/L）：NaCl 126，KCl 2.5，$CaCl_2$ 2，$MgCl_2$ 2，NaH_2PO_4 1.25，$NaHCO_3$ 26，葡萄糖 10。其余试剂为市售分析纯。RM6240 多道生理信号采集处理系统由成都仪器厂提供。

1.2　实验动物及分组

健康成年雌性 SPF 级 SD 大鼠 74 只（本校实验动物中心提供），体质量 230～270 g。行为学实验中，昏迷大鼠 54 只，用随机数排序分组法分为 3 组，对照组（A 组）、低剂量 orexin-A 治疗组（B 组）及高剂量治疗组（C 组）各 18 只。EEG 记录中，昏迷大鼠 20 只，用随机数排序分组法分为 2 组，对照组（D 组）及治疗组（E 组）各 10 只。

1.3　昏迷模型建立及行为评价

参照 Yacoubi 等[5]建立的模型，我们建立了大鼠急性乙醇中毒昏迷模型，方法为腹腔注射 32% 乙醇溶液（14 ml/kg）。根据文献[6]报道，一般将大鼠的意识状态分为 6 级：Ⅰ级：在笼内活动如常；Ⅱ级：在笼内活动减少；Ⅲ级：在笼内活动减少并运动失调；Ⅳ级：当背部放在笼的底部时能滚动（翻正反射存在）但不能站立；Ⅴ级：翻正反射消失（loss of righting reflex，LOR）但对疼痛刺激有肢体回缩反应；Ⅵ级：对任何刺激无反应。其中Ⅴ、Ⅵ级被认为是昏迷状态。

1.4　脑电图（EEG）记录及分析

EEG 记录均在室温（24～26 ℃）下进行。昏迷大鼠固定于立体定向架后，安置电极。记录电极固定粘贴于顶、枕区，参考电极置于耳垂，于夜间 19:00 至 24:00 进行 EEG 记录。分别取给药起始前 5 min 和给药完毕后 5 min 时 30 s EEG 进行测量和分析。利用 RM6240 生物信号采集处理系统（2.0 版）（成都仪器厂），分析每段 EEG 中 δ（0.5～4 Hz）、θ（4～8 Hz）、α（8～12 Hz）以及 β 波的构成比。文献[7]报道，慢 δ 波活动通常作为睡眠深度的一项重要判断指标。本实验中，我们以 δ 波所占比例多少作为意识状态的脑电判别指标。给药后 δ 波所占百分比 / 给药前 δ 波所占百分比，使给药前 δ 波所占百分比标准化为 1。

1.5　Orexin-A 给药方式

大鼠翻正反射消失后，头部固定于江湾Ⅰ型 C 立体定向仪框架上，调整门齿沟平面高度使其比耳间线平面低 2.4 mm。参照 Paxinos 等图谱，选择侧脑室注射部位坐标点（A：前后；L：旁开；H：深度）：A：1.0 mm，L：2.0 mm，H：3.0 mm。B 和 C 组大鼠分别以 0.8～1 μl/min 的速度于昏迷后 30～60 min 内侧脑室微注入 3.85 nmol/kg 和 7.70 nmol/kg 两个不同剂量的 orexin-A（溶于 76.92 μl/kg 的 aCSF 中），E 组亦在 30～60 min 内侧脑室微注入 7.70 nmol/kg orexin-A；A、D 组分别采取同样方式注入同等量的 aCSF。

1.6　统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 t 检验。

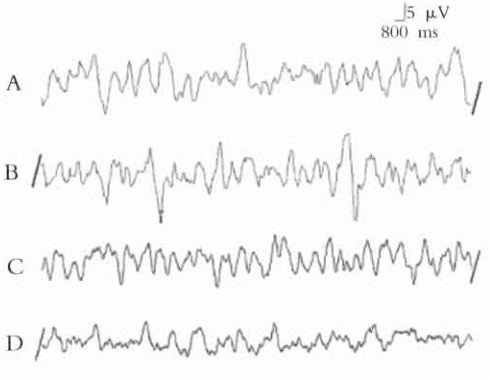
2　结果

2.1　Orexin-A 对昏迷大鼠翻正反射消失维持时间的影响

大鼠翻正反射消失后 30 min 时 A 组、B 组和 C 组大鼠分别经侧脑室微注入 aCSF、及高低两个不同剂量的 orexin-A（3.85 nmol/kg 和 7.70 nmol/kg）。注入过程中 A 组大鼠状态稳定，C 组大鼠可出现一定程度的呼吸急促、胡须震颤等相似的激动清醒反应，B 组大鼠反应不明显，30 min 内注射结束。统计 A、B 和 C 三组大鼠的翻正反射消失持续时间，分别为（3.11 ± 1.04）h、（2.80 ± 0.67）h 和（2.18 ± 0.63）h。A、B 组相差不显著（$P > 0.05$），A、C 组间（$P < 0.01$）及 B、C 组间（$P < 0.01$）相差显著。较对照组比，C 组大鼠翻正反射消失持续时间明显缩短，而 B 组不明显。

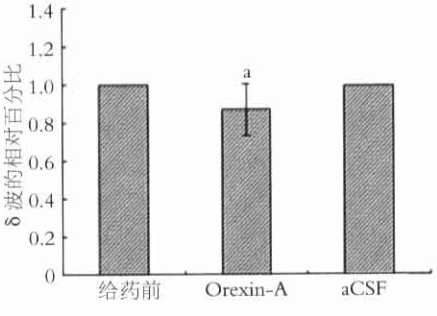
2.2　高剂量 orexin-A 对昏迷大鼠 EEG 的影响

大鼠翻正反射消失 30 min 后，D 和 E 组大鼠分别经侧脑室微注入 aCSF、及高剂量的 orexin-A（7.70 nmol/kg），随后进行脑电图记录。实验结果见图 1、2。可以看出，给予 orexin-A 后 δ 波所占比例明显减少（$n = 10$，$P < 0.05$）；而给予 aCSF 后，δ 波活动所占比例变化不明显（$n = 10$，$P > 0.05$）。



A：aCSF 侧脑室注射前；B：aCSF 侧脑室注射后；C：Orexin-A 侧脑室注射前；D：Orexin-A 侧脑室注射后

图 1　高剂量 orexin-A（7.70 nmol/kg）对乙醇中毒昏迷大鼠 EEG 的影响



a：$P < 0.05$，与给药前比较

图 2　Orexin-A 对乙醇中毒昏迷大鼠 δ 慢波活动所占比例的影响

3 讨论

昏迷是指一种意识完全丧失、不易唤醒的状态，常因觉醒机制的急性药物性麻醉或物理性损伤引起。昏迷预后差，致残及死亡率较高，其促醒治疗已引起很多研究者的重视。颅脑外伤、脑血管疾病和药物中毒是昏迷发生的三大主要病因，而其中乙醇中毒又是药物中毒的常见原因之一，逐渐成为国内外学者研究的热点[1]。由于中毒机制尚未完全明了，目前促醒药物仅局限于纳洛酮、醒脑静和麝香等，因此进一步明确其发生机制及研发更有效的新型促醒药物具有重要的现实意义。

为了进一步提高昏迷的救治成功率，需要继续深入研究昏迷发生的病理生理机制，而复制理想、稳定的昏迷动物模型则是这一研究能够得以开展的关键。昏迷对机体功能影响大，呼吸、循环系统极易衰竭，不容易建立持续、稳定和可靠的昏迷模型。鉴于已有文献报道急性乙醇中毒是导致昏迷的重要原因[8]，因此在本实验中我们考虑通过腹腔给予乙醇，以此建立急性乙醇中毒昏迷大鼠模型，从而为后续的昏迷机制研究和新型促醒措施的探索奠定基础。实验结果表明，经腹腔注射32%乙醇(14 ml/kg)后，大鼠在短时间内即出现翻正反射消失，意识状态Ⅴ～Ⅵ级，行为上符合昏迷判定标准；同时，脑电活动频率减慢，EEG频谱以δ波活动为主，EEG改变亦符合昏迷时的脑电慢波活动特征。昏迷时间通常维持在3 h左右，因此，该模型较为稳定。此外，急性乙醇中毒昏迷大鼠模型相似性好，易于复制；同时乙醇是生活中一种易得、合法及使用较广泛的药物，进而使得该模型经济适用。综上所述，我们所建立的急性乙醇中毒昏迷大鼠模型可以作为理想的药物中毒性昏迷模型。

Orexin-A是下丘脑后外侧区分泌的一种小分子觉醒肽，实验证明：生理状态下，3.85 nmol/kg的orexin-A具有较强的觉醒延长和增强作用[4]。研究表明，orexin-A可使麻醉大鼠的EEG模式发生“觉醒样”改变，进而影响麻醉的深度[9]。本实验显示剂量7.70 nmol/kg的orexin-A对急性乙醇中毒昏迷大鼠具有促醒治疗作用，翻正反射消失持续时间较对照组明显缩短，而3.85 nmol/kg的orexin-A治疗效果不显著。可以推测，orexin-A对昏迷大鼠的促醒作用可能存在剂量效应依赖关系。昏迷大鼠给予7.70 nmol/kg的orexin-A治疗后，即表现出一定的兴奋反应，如胡须震颤、呼吸急促等，这些变化可以认为是行为觉醒反应，翻正反射恢复提前被认为是orexin-A治疗后引起的明确行为促醒效应。另外，昏迷大鼠侧脑室给予7.70 nmol/kg orexin-A后EEG于5 min内即可发生“觉醒样”改变，脑电活动频率加快，δ波明显减少。以上结果表明，orexin-A可使急性乙醇中毒大鼠昏迷程度减轻，有明显的促醒治疗作用。

形态学已经证实，蓝斑、中缝背核、黑质及基底前脑、桥脚被盖核、中央灰质等相关觉醒脑区有较广泛的orexins神经纤维及受体分布，大脑皮层也有少量的orexins神经纤维支配。证据表明，orexins对以上各个觉醒脑区神经元有直接的兴奋作用。因此，下丘脑后外侧区的orexins能系统通常被认为是机体的“觉醒启动区”，负责协调觉醒系统统一发挥作用[2]。本室报道了orexin-A对大鼠前额叶皮层锥体神经元有直接的突触后兴奋作用[10]。此外，orexin-A还可引起大鼠皮层神经元胞内钙离子升高，这种钙离子升高效应是通过胞外钙内流介导的[11]。很显然，以上研究结果暗示，orexin-A对包括皮层在内的多个觉醒系统的直接兴奋作用可能是orexin-A促醒治疗急性乙醇中毒昏迷大鼠的机制之一。

本实验显示，orexin-A对急性乙醇中毒昏迷大鼠具有促醒治疗作用。但orexin-A主要是通过影响何种神经递质、通过皮层或皮层下觉醒系统发挥兴奋作用的还不清楚。有关orexin-A对昏迷大鼠皮层和皮层下觉醒系统的影响，以及orexin-A的促醒机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] PLUM F, POSNER J B. The diagnosis of stupor and coma[M]. Contemp Neurol Ser, 1972, 10: 1-286.

[2] JONES B E. Arousal systems[J]. Front Biosci, 2003, 8: s438-s451.

[3] SUTCLIFFE J G, DE-LECEA L. The hypocretins: setting the arousal threshold[J]. Nat Rev Neurosci, 2002, 3(5): 339-349.

[4] SHIGEMOTO Y, FUJII Y, SHINOMIYA K, *et al*. Participation of histaminergic H1 and noradrenergic alpha 1 receptors in orexin A-induced wakefulness in rats[J]. Brain Res, 2004, 1023(1): 121-125.

[5] EL-YACOUBI M, LEDENT C, PARMENTIER M, *et al*. Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A2A receptor blockade[J]. Neuropharmacology, 2003, 45(7): 977-985.

[6] STEPHENS J R, LEVY R H. Effects of valproate and citrulline on ammonium-induced encephalopathy[J]. Epilepsia, 1994, 35(1): 164-171.

[7] VYAZOVSKIY V V, KOPP C, BOSCH G, *et al*. The GABAA receptor agonist THIP alters the EEG in waking and sleep of mice[J]. Neuropharmacology, 2005, 48(5): 617-626.

[8] TOKUDA Y, NAKAZATO N, STEIN G H. Pupillary evaluation for differential diagnosis of coma[J]. Postgrad Med J, 2003, 79(927): 49-51.

[9] YASUDA Y, TAKEDA A, FUKUDA S, *et al*. Orexin a elicits arousal electroencephalography without sympathetic cardiovascular activation in isoflurane-anesthetized rats[J]. Anesth Analg, 2003, 97(6): 1663-1666.

[10] 宋承辉，胡志安. Orexin：觉醒通路中一种重要的下丘脑神经肽[J]. 第三军医大学学报，2003，25(13)：1207-1209.

[11] XIA J X, CHEN X W, CHENG S Y, *et al*. Mechanisms of orexin A-evoked changes of intracellular calcium in primary cultured cortical neurons[J]. Neuroreport, 2005, 16(7): 783-786.

(编辑 薛国文)