文章编号:1000-5404(2012)04-0307-04

论著

血必净对大鼠创伤性脑损伤保护作用的初步研究

蒋 涛[1],廖正步[1],但 炜[1],孙晓川[1],谢延风[1],王 超[1],周元国[2],刘 萍[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第七研究室,创伤,烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨血必净对颅脑损伤的保护作用及机制。**方法** 选取SD雄性大鼠108只,按随机数字表法分成假手术组、对照组、治疗组,每组36只,采用自由落体撞击伤方法制作创伤性脑损伤模型。治疗组大鼠伤后立即腹腔注射血必净4 mg/kg,每12小时重复1次。伤后24、72 h处死大鼠,用干、湿质量法测定脑含水量,测定MDA含量、SOD、GSH-Px活性及观察脑组织形态学改变。**结果** 与假手术组比较,对照组、治疗组大鼠脑含水量、MDA含量均显著增高($P<0.01$),SOD、GSH-Px活性显著下降($P<0.01$);与对照组相比,治疗组大鼠脑含水量、MDA含量均显著下降($P<0.05$),SOD活性显著增高($P<0.05$)。**结论** 血必净对大鼠创伤性脑损伤脑组织具有保护作用,其机制可能与减轻创伤后脑水肿、抑制氧自由基反应有关。

[关键词] 血必净;创伤性脑损伤;丙二醛;超氧化物歧化酶;含水量
[中图法分类号] R651.15;R285.5;R289.5 [文献标志码] A

Xuebijing injection protects rats against traumatic brain injury

Jiang Tao[1], Liao Zhengbu[1], Dan Wei[1], Sun Xiaochuan[1], Xie Yanfeng[1], Wang Chao[1], Zhou Yuanguo[2], Liu Ping[2] ([1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 7, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of Xuebijing injection, an intravenous fluid derived from a traditional Chinese prescription, Xuefu Zhuyu Decoction, on traumatic brain injury (TBI) in rats. **Methods** A total of 108 Sprague-Dawley (SD) male rats were randomly divided into 3 groups ($n=36$ for each group), sham-operation group, injured group and the Xuebijing injection treatment group. The injured models of TBI were inflicted with free-falling objects (5.88 N·m). The animals from treatment group received an intraperitoneal injection of Xuebijing injection every 12 h (4 mg/kg) immediately after injury, and those out of the other 2 groups received the same route and dose of normal saline. Rats were sacrificed in 24 and 72 h after TBI. The water contents of brain tissue were measured with dry-wet weight method, and the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and the content of malondialdehyde (MDA) were detected with the biochemical techniques. Pathological changes of brain tissues were observed after HE staining. **Results** Compared with the sham-operation group, the levels of MDA were increased significantly($P<0.01$), the activities of SOD and GSH-Px were remarkably reduced ($P<0.01$) in 24 and 72 h after TBI in the injured group and treatment group. But the above conditions in the treatment group were much better than in the injured group ($P<0.05$). **Conclusion** Xuebijing injection protects rats against TBI, which might be due to its alleviating traumatic brain edema and inhibiting oxidative stress.

[**Key words**] Xuebijing injection; traumatic brain injury; malondialdehyde; superoxide dismutase; water content

Supported by the National Nature Science Foundation of China (30801182). Corresponding author: Dan Wei, Tel: 86-23-89012796, E-mail: dan_wei@sina.com

颅脑创伤占全身创伤发生率的第2位,但致死率和致残率却居第1位[1]。减少颅脑创伤发生率和提高颅脑创伤研究及治疗水平,是全社会和医学界共同的责任。血必净是以古方血府逐瘀汤为基础,精炼出的静脉制剂,其作用为活血化淤、清热凉血、疏通络脉、溃散毒邪等,现主要用于治疗感染引起的全身炎性反应

[基金项目] 国家自然科学基金(30801182)
[通信作者] 但 炜,电话:(023)89012796,E-mail:dan_wei@sina.com

综合征及防治多器官功能障碍综合征的发生。目前血必净在创伤性脑损伤(traumatic brain injury,TBI)方面报道较少,其作用机制尚不明确。本研究采用自由落体法制作大鼠TBI模型,通过检测其脑内丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)活性、脑含水量及形态学变化,探讨其对颅脑损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与器材

主要试剂:大鼠MDA、SOD、GSH-Px测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),血必净注射液(天津红日药业公司)。仪器:自由落体打击器;电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);DHG9123A型电热恒温干燥箱(上海一恒科技有限公司);4 ℃离心机(上海安亭科学仪器厂);光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 实验动物及分组

成年SD雄性大鼠108只,体质量(250±30)g,由重庆医科大学实验动物中心提供。实验动物用随机数字表法分为3组:假手术组、对照组和血必净治疗组(治疗组),每组36只。每组下设2个时相点,分别为伤后24、72 h,每个时相点18只,其中8只用于测脑含水量,8只用于取脑组织匀浆测MDA含量、SOD、GSH-Px活性,2只用于行脑组织病理形态学观察。

1.3 大鼠TBI模型的建立

用10%水合氯醛(0.35 g/kg)腹腔内注射麻醉大鼠后,剪去顶部皮毛,消毒皮肤后,沿中线左侧切开头皮,分离骨膜,于中线旁2 mm,紧挨冠状缝后钻一直径5 mm的圆形窗,硬膜保持完整,用Feeney法按自由落体致伤原理,撞击圆锥头端直径4 mm、高2.5 mm,通过撞击装置,将撞杆头端置骨窗处,用20 g砝码于30 cm高处通过一金属导杆坠落,撞击置于硬膜上的圆锥上致右顶叶脑挫裂伤,致伤冲击力为5.88 N·m。造模成功后血必净治疗组立即行腹腔内注射血必净4 ml/kg,每12小时重复1次。对照组模型制作方法与治疗组相同,但制模后腹腔仅注射等量生理盐水。假手术组仅用上述方法暴露硬膜但不致伤,也注射等量生理盐水。

1.4 脑含水量的测定

采用干、湿质量法[2],各组大鼠制模24、72 h后,断头取脑,以损伤为中心取一直径约6 mm的脑组织,用滤纸吸干血液、脑脊液,分别置于用预先称量的干净玻璃瓶内,用电子天平称湿质量。放入电热恒温干燥箱(100±2)℃烘烤48 h,同样方法称取烘干后脑组织干质量,根据(湿质量-干质量)/湿质量×100%的公式测算脑含水量百分率。

1.5 脑匀浆MDA、SOD、GSH-Px的检测

脑损伤24、72 h后断头取脑,取损伤区的脑组织100~200 mg,置于生理盐水中,冰上充分匀浆成10%的脑组织匀浆液,4 ℃ 3 000 r/min离心10 min,取上清液于-70 ℃保存,以供测定MDA、SOD、GSH-Px。双缩脲法测定蛋白质含量后,采用硫代巴比妥酸分光法测定MDA含量,黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性,采用比色法测GSH-Px活性(酶活力单位)。

1.6 脑组织病理学观察

按预定时间点,各组取鼠2只,在以损伤为中心取出1 g脑组织后,甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、切片,行苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察组织病理变化。

1.7 统计学分析

应用SPSS 17.0统计软件,计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组样本均数比较进行方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD法。

2 结果

2.1 各组大鼠脑含水量的变化

TBI后各治疗组的脑含水量均明显增加,其中治疗组、对照组与假手术组间差异有统计学意义($P<0.01$);伤后24 h,治疗组含水量低于对照组,但差异无显著性($P>0.05$),而伤后72 h差异有统计学意义($P<0.05$)。说明TBI能引起脑含水量增加,导致脑水肿;血必净治疗72 h后能降低脑含水量,减轻脑水肿。见表1。

表1 各组大鼠脑含水量的比较(%,$n=8$,$\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	72 h
治疗组	79.24±0.79[a]	79.46±0.52[ab]
对照组	79.79±0.43[a]	80.08±0.42[a]
假手术组	77.42±0.70	77.63±0.46

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

2.2 各组大鼠脑匀浆MDA、SOD、GSH-Px的检测结果

与假手术组比较,治疗组、对照组24、72 h MDA含量显著升高($P<0.01$),各时间点SOD、GSH-Px活性显著下降($P<0.01$)。与对照组比较,治疗组24、72 h MDA含量明显下降($P<0.05$),各时间点SOD活性明显升高($P<0.05$),GSH-Px活性有所上升,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

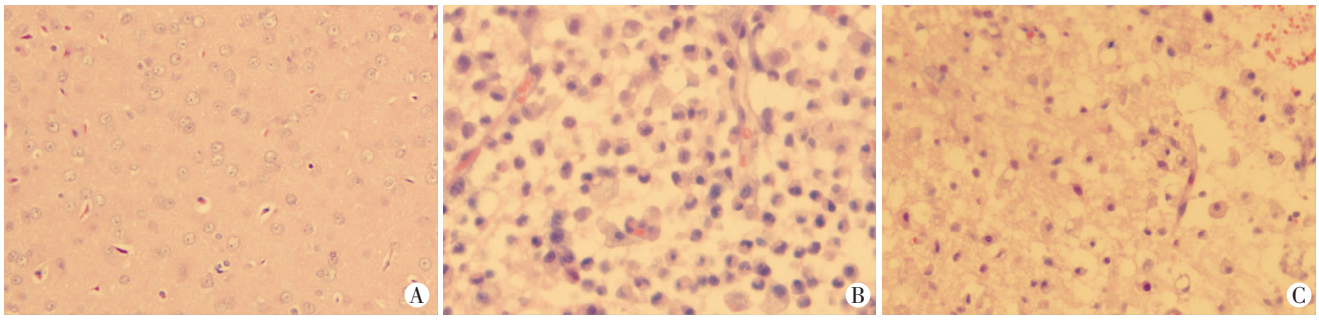
表2 各组大鼠匀浆MDA含量、SOD活性、GSH-Px活性的比较($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	GSH-Px
治疗组			
24 h	5.51±0.51[ab]	110.54±9.39[ab]	49.23±6.00[a]
72 h	5.65±0.41[ab]	109.20±10.94[ab]	53.29±5.52[a]
对照组			
24 h	6.06±0.46[a]	99.52±8.79[a]	46.21±5.96[a]
72 h	6.20±0.44[a]	96.56±7.78[a]	44.24±5.73[a]
假手术组			
24 h	4.50±0.33	130.81±6.84	94.86±9.75
72 h	4.54±0.38	134.83±9.68	107.43±15.50

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

2.3 组织病理观察

2.3.1 大体观察 假手术组各时间点脑组织表面光滑,沟回明显、清晰,无充血、肿胀及出血灶;对照组损伤区脑皮质表面有挫裂伤及点状出血灶,有充血、肿胀;治疗组脑损伤灶与对照组比较差异无显著性。



A:假手术组;B:对照组;C:治疗组

图 1 大鼠脑损伤后 72 h 各组病理学变化 (HE ×200)

2.3.2 光镜下观察 假手术组各时间点脑组织结构及细胞均正常,蛛网膜下腔稍充血及少许炎性细胞浸润。对照组创伤中心区有出血、神经细胞坏死,挫伤周边组织水肿、神经细胞肿胀,毛细血管塌陷、有血管外出血、胶质细胞肿胀,大量炎性细胞浸润。治疗组各时间点出现脑组织结构紊乱及局部出血、水肿、胞核固缩和炎性细胞浸润等现象,但较对照组对应时间点均有一定程度减轻。见图 1。

3 讨论

本实验采用自由落体撞击伤方法制作大鼠 TBI 模型,治疗组应用血必净治疗,通过检测治疗组与对照组脑含水量、自由基水平及观察脑组织病理变化来明确血必净对颅脑损伤的疗效。结果显示,与对照组比较,治疗组 SOD 活性明显增加,MDA 含量明显降低,伤后 72 h 脑含水量下降,表明血必净可以对 TBI 发挥保护作用。

目前 TBI 是神经外科常见病、多发病,是导致患者伤残和死亡的一个主要原因[3],世界每年发生颅脑损伤人数超过 1 000 万[4],给个人、家庭带来巨大的灾难,也给国家带来了极大的经济损失。

TBI 按病理生理改变分为原发性脑损伤和继发性脑损伤两大类。由于原发性脑损伤是不可逆的,因此如何预防和治疗脑外伤引起的继发性损伤日益受到人们的关注[5-6],但到目前为止,还没有一种能有效阻止继发性损伤的药物问世[7-9]。已经证实的氧自由基介导的氧化损害是继发性损伤主要机制之一[10]。正常生理状态下,通过线粒体呼吸链产生自由基,自由基生成和清除处于动态平衡,同时自由基在细胞内信号传递中也起重要作用[11]。

脑损伤后由于缺血、缺氧、出血及再灌注损伤致使自由基大量生成,自由基产生后能损害核酸、蛋白质及脂质,尽管体内存在抗氧化系统,但自由基的大量生成或抗氧化能力的下降导致细胞损害进行性加重和生理功能进行性下降[12-13],因此抗自由基治疗是防治继发性脑损伤的重要措施之一。

血必净的主要成分为赤芍、川芎、丹参、红花、当归,研究证实其具有抑制炎性介质、拮抗内毒素、清除氧自由基、改善微循环等作用[14-16]。由于颅脑损伤后存在炎性反应、氧自由基大量生成、微循环障碍等多种病理现象,理论上血必净可用于颅脑损伤的治疗。袁雪松等[17]已发现大鼠脑外伤后使用血必净,其血清 S100B 蛋白和 IL-6 含量较对照组显著下降,由此表明血必净能减轻脑损伤后的炎症反应。本实验通过检测脑含水量、氧自由基水平等方面来进一步明确了血必净对颅脑损伤的疗效,其机制可能与血必净注射液能够清除脑组织氧自由基、降低脂质过氧化、增强 SOD 活性,稳定细胞膜,减轻氧自由基和脂质过氧化物对神经元细胞的损伤,以及改善微循环、抑制炎症反应等有关。本研究中脑组织 HE 染色结果也显示:血必净治疗组大鼠损伤灶周围脑组织水肿、损伤范围、炎症反应较对照组有所改善。

综上所述,血必净可降低大鼠脑创伤后 MDA 水平,提高 SOD 活性,缓解脑水肿,因此我们认为血必净对大鼠 TBI 脑组织具有保护作用,其机制可能与减轻创伤后脑水肿、抑制氧自由基反应有关。

参考文献:

[1] Mechukaev A A, Mechukaev A M. Characteristics of traumatic death of people in high mountains[J]. Sud Med Ekspert, 2006, 49(6): 6-9.

[2] Kouzounias K, Kimiskidis V K, Siozos T, *et al*. Topiramate promotes neurological recovery in a new model of traumatic brain injury in rats [J]. Neuroscience, 2011, 183: 171-177.

[3] 邓均, 艾国平, 周桃莉, 等. G-CSF 动员循环间充质干细胞及其对小鼠颅脑损伤修复的可行性分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1131-1134.

[4] Kim J J, Gean A D. Imaging for the diagnosis and management of traumatic brain injury [J]. Neurotherapeutics, 2011, 8(1): 39-53.

[5] Armin S S, Colohan A R, Zhang J H. Vasospasm in traumatic brain injury[J]. Acta Neurochir Suppl, 2008, 104(13): 421-425.

[6] Zarubina I V, Shabanov P D. The significance of individual resistance to hypoxia for correction of the consequences of craniocerebral trauma [J]. Neurosci Behav Physiol, 2005, 35(2): 215 - 219.
[7] Sharma P, Benford B, Li Z Z, *et al*. Role of pyruvate dehydrogenase complex in traumatic brain injury and Measurement of pyruvate dehydrogenase enzyme by dipstick test[J]. J Emerg Trauma Shock, 2009, 2(2): 67 - 72.
[8] Stoica B, Byrnes K, Faden A I. Multifunctional drug treatment in neurotrauma[J]. Neurotherapeutics, 2009, 6(1): 14 - 27.
[9] Walker P A, Harting M T, Baumgartner J E, *et al*. Modern approaches to pediatric brain injury therapy[J]. J Trauma, 2009, 67(2 Suppl): S120 - S127.
[10] Hall E D, Vaishnav R A, Mustafa A G. Antioxidant therapies for traumatic brain injury[J]. Neurotherapeutics, 2010, 7(1): 51 - 61.
[11] Bayir H, Kagan V E. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory[J]. Crit Care, 2008, 12(1): 206.
[12] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2009, 14(1): 67 - 84.
[13] Adibhatla R M, Hatcher J F. Role of lipids in brain injury and diseases[J]. Future Lipidol, 2007, 2(4): 403 - 422.
[14] 何国鑫, 胡慧敏, 罗文朝, 等. 血必净注射液对急性肺损伤大鼠氧自由基变化的影响[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(12): 1916 - 1919.
[15] 杨丽娜, 马捷, 张毅勋, 等. 血必净注射液对兔心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2008, 2(4): 447 - 453.
[16] 李冰, 朱志宏, 田万管, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠肠系膜微循环动态变化的影响[J]. 中国全科医学, 2009, 12(10): 857 - 859.
[17] 袁雪松, 卞晓星, 戚传平. 血必净对大鼠外伤性脑损伤后血清S100B和IL-6水平的影响[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2009, 19(1): 35 - 38.

(**收稿**:2011-10-17;**修回**:2011-11-20)
(编辑 王小寒)

(上接302页)

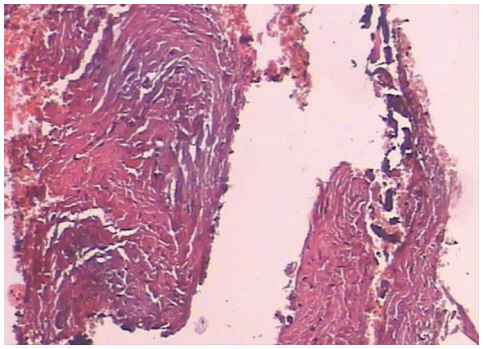


图2 种植体根部软组织HE染色观察 (×10)

2 讨论

国内外对鼻腭管这个解剖结构对种植体的影响有不同认识。国内学者多认为鼻腭管会干扰种植体的骨结合,而国外学者则认为鼻腭管会辅助固位。Artzi 等[7]在为1例鼻腭管较大的患者进行种植时发现,种植体进入了鼻腭管,9个月后种植周围成骨。同时切牙孔边变小,患者没有感觉上的异常。Peñarrocha 进行了7例植入鼻腭管的种植体,失败了1颗[5]。我们认为 Peñarrocha 提到的在鼻腭管内种植,应该充分去除鼻腭管内的软组织(包括神经和血管),并且充分利用鼻腭管的管道结构以利于种植的固位,植入和鼻腭管直径相匹配的种植体。

上颌骨的增龄性吸收是向心性的,而下颌较原颌弓窄和短。这就照成了"牙槽嵴对牙槽嵴"情况,甚至于反颌的出现。而在鼻腭孔内植入种植体,有利于种植体的受力。而鼻腭神经血管术损伤可以发生在拔出腭侧异位的尖牙和在鼻腭管内植入种植体。Filippi 等[8]报道在59例患者进行腭侧异位尖牙的拔出,均在腭侧翻瓣,均造成鼻腭神经血管术的损伤。但在4周后均恢复正常。而在该病例中,患者手术后4个月并没有明显的神经感觉异常。

在该病例中,最后种植体表面检出的组织为纤维结缔组织。考虑是鼻腭管内的组织爬行到种植体表面所至。而纤维结缔组织影响了骨结合的发生,导致最后种植体的松动失败。尽管有国外学者报道在鼻腭管内种植,成功率较高。但是相关文献报道较少,成功例数较少,还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] 韩科. 种植义齿 背景. 选择. 计划. 操作[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007.
[2] 牛学刚, 赵铱民, 邹昌旭. 切牙管应用解剖研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2002, 18(3): 250 - 252.
[3] Misch C. Premaxilla implant considerations: Treatment planning and surgery[M]// Misch C. Contemporary Implant Dentistry. St Louis: Mosby, 1999: 509 - 519.
[4] Scher E L. Use of the incisive canal as a recipient site for root form implants: preliminary clinical reports[J]. Implant Dent, 1994, 3(1): 38 - 41.
[5] Penarrocha M, Carrillo C, Uribe R, *et al*. The nasopalatine canal as an anatomic buttress for implant placement in the severely atrophic maxilla: a pilot study[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2009, 24(5): 936 - 942.
[6] Penarrocha M, Carrillo C, Boronat A, *et al*. Maximum use of the anterior maxillary buttress in severe maxillary atrophy with tilted, palatally positioned implants: a preliminary study[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2010, 25(4): 813 - 820.
[7] Artzi Z, Nemcovsky C E, Bitlitum I, *et al*. Displacement of the incisive foramen in conjunction with implant placement in the anterior maxilla without jeopardizing vitality of nasopalatine nerve and vessels: a novel surgical approach[J]. Clin Oral Implants Res, 2000, 11(5): 505 - 510.
[8] Filippi A, Pohl Y, Tekin U. Sensory disorders after separation of the nasopalatine nerve during removal of palatal displaced canines: prospective investigation[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 1999, 37(2): 134 - 136.

(**收稿**:2011-10-20;**修回**:2011-11-25)
(编辑 张 维)