

Exploration of Tongqiao Huoxue Tang in a traumatic cerebral infarction rat model

Jinhao Che¹ Jinsuo Bao^{2*}

1. Inner mongolla minzu university, Tongliao, Inner mongolla, 028000, China

2. Inner Mongolia University for Nationalities Affiliated Hospital, Tongliao, Inner mongolla, 028000, China

Abstract

Objective: To investigate the therapeutic effects of Tongqiao Huoxue Decoction (TCHD) in traumatic cerebral infarction rat models and explore its potential association with cerebroside secretion. Data analysis revealed that TCHD treatment significantly improved neurological deficits in rats with moderate and high concentrations of injury, demonstrating time-dependent and concentration-dependent mechanisms. The trauma-induced brain tissue structure and ischemic hippocampal neuron morphology showed marked improvement, along with enhanced spatial navigation performance in water maze tests and elevated ceramide expression. **Conclusion:** TCHD may enhance ceramide production, reduce infarcted brain area in traumatic cerebral infarction rats, and improve neurobehavioral functions including learning and spatial memory.

Keywords

Traumatic cerebral infarction; Tongqiao Huoxue Decoction; Water maze; Craniocerebral injury; Neurofunctional activity; Ceramide

通窍活血汤在创伤性脑梗死大鼠模型中的探索

车进好¹ 包金锁^{2*}

1. 内蒙古民族大学, 中国·内蒙古 通辽 028000

2. 内蒙古民族大学附属医院, 中国·内蒙古 通辽 028000

摘要

目的为探索中药通窍活血汤在创伤性脑梗死大鼠模型治疗方面的作用, 并初步探讨其对大脑神经酰胺分泌的可能关联或影响。数据分析后探讨通窍活血汤对创伤性脑梗死大鼠模型的治疗效果和可能机制。**结果:** 通窍活血汤治疗后, 中浓度和高浓度大鼠神经功能损伤情况明显改善, 并具有时间依赖性和浓度相关性, 外伤性损伤脑组织结构和缺血性海马神经元形态明显改善, 水迷宫空间探索定位功能改善, 神经酰胺表达明显增高。**结论:** 通窍活血汤可能参与上调神经酰胺的表达, 降低创伤性脑梗死大鼠的脑梗死面积并改善神经行为学和学习 and 空间记忆能力。

关键词

创伤性脑梗死; 通窍活血汤; 水迷宫; 颅脑损伤; 神经功能活动; 神经酰胺

1 引言

创伤性脑梗死是脑部受到外力作用后, 在非特定时间内伴发或增发的脑组织血液灌注异常的缺血缺氧性损伤和脑血管病变, 引起局部脑组织供血不足导致脑组织阻塞, 坏死并导致患者出现脑组织功能不全神经系统症状和体征。常见症状有头痛头晕, 恶心呕吐, 肢体麻木, 偏瘫失语, 认知功能障碍, 平衡功能障碍, 严重者出现脑疝, 脑干损伤等并发症。目前在神经外科领域以对症综合诊疗为主, 但多预后

不佳。中药通窍活血汤已经在颅脑损伤患者和脑梗死患者中得到了较为确切论证, 诊疗效果得到一定程度肯定。但在创伤性脑梗死的临床应用研究中研究较少。希望通过同时进行颅脑损伤和脑梗死损伤大鼠试验模型的建立, 推断并评估通窍活血汤对创伤性脑梗死患者的有效性, 降低医疗风险 [1][2]。

2 试验材料和方法

取 100 只 SD 大鼠, 适应性喂养 3 天后行 Morris 水迷宫试验, 其中定位航行试验 4 天, 并于第 5 天行空间探索试验, 初步形成空间探索记忆, 隔 1 天后利用改良的 Feeney 自由落体撞击法建立创伤性脑梗死大鼠颅脑损伤模型, 并继续立即连续行改良的 Zealong 法建立右侧 MCAO 线栓法构建大脑中动脉栓塞再灌注损伤模型。

Morris 水迷宫试验: 强制试验动物大鼠游泳, 学习寻找隐藏在水中平台的一种试验, 主要用于测试试验动物对空

【作者简介】车进好 (1979—), 男, 中国山东日照人, 硕士, 主治医师, 从事神经外科学研究。

【通讯作者】包金锁 (1968—), 男, 蒙古族, 中国内蒙古通辽人, 硕士, 正高, 主任医师, 从事神经外科研究。

间位置觉和方向觉(空间定位)的学习记忆能力。老鼠厌恶在水中的状态,同时游泳对老鼠来说是十分消耗体力的活动,它们会本能的寻找水中的逃避场所,该记忆过程涉及收集与空间定位有关的视觉信息,再对这些信息进行处理,整理,记忆加固,然后再取出,目的是能成功的航行并且找到隐藏在水中的平台,最终从水中逃脱。

3 Morris 水迷宫的组成部分

大鼠圆形水池,直径160cm,高50cm,水深50cm,池底跟池壁样色相同,水温保持在27±2℃,池壁上标记四个等距离点N.E.S.W作为试验的起始点,分水池为四个象限,在水池的西南象限中央放置平台,平台与池壁同心圆距离相等。平台跟池壁同色,直径12cm,高29cm,没于水下1cm,使平台不可见。水池内壁四个象限分别在等高度固定位置区贴有黄色卡纸剪切的三角形,正方形,圆形及六边形等几何图形参照物,供大鼠定位平台。

遮光帘可有效遮蔽杂散光进入试验区域。采用遮光帘和间接光源避免光对图像采集时的干扰。

自动录像记录系统:包括摄像机·监视器·计算机(装有图像采集卡及分析软件)。摄像机装于水池上方约3m处,并与监视器和计算机相连接。

电脑及分析软件:提取出Morris水迷宫实验中实验动物的运动轨迹,并据此计算出丰富的行为学定量指标,增加了试验的可信性;试验结果可直接生成Excel文件,便于SPSS, SAS等分析统计软件中作进一步分析处理。提供指标有总路程·平均速度,上台时间即潜伏期,运动轨迹图(BMP格式),四个象限逗留的时间和路程。

4 试验方法

定位航行试验:大鼠第一次游泳时,一般不会找到藏于水面下的平台。若大鼠入水游泳60-90s内仍未找到水池中的站台或未能爬上平台时,可将大鼠引导于站台上站立10-30s,使大鼠体会站台上的感觉,并识别周围几何标记图形。大鼠站上平台后在平台上站立5-10s。将大鼠从平台上拿出后擦干水珠并电吹风机吹干保暖,休息20分钟以后进行下一次训练,依次从池壁四个起始点将大鼠面向池壁放入水池作4次训练,自由录像记录系统记录大鼠找到平台的时间和游泳路径。一般情况下,试验进行5天,大鼠就能学会以最快最佳的轨迹搜索到站台的确切位置。

空间探索实验:定位航行试验结束24小时后,撤离平台,在电脑屏幕上用圆形环标记站台原来所在位置。任选一个固定入水点将大鼠放入水中,记录大鼠在90s内的游泳路径,记录大鼠在目标象限的停留时间和穿越目标象限的次数,并依据图像轨迹观察大鼠的空间定位能力以及在空间探索过程中的变化规律。

利用改良的Feeney自由落体撞击法建立大鼠颅脑损伤模型,并继续立即连续行改良的Zealoug法建立右侧MCAO

线栓法构建大脑中动脉栓塞再灌注损伤模型,

建立大鼠颅脑损伤模型。

异氟烷麻醉成功后颅脑高精度数字显示立体定位仪平台固定大鼠头部及四肢,头皮消毒后取1ml注射器吸取稀释10倍的利多卡因按0.1ml/100g行大鼠头皮局部麻醉,于中轴线双侧耳间由前向后切开长约1.5cm头皮及皮下组织,动脉夹止血,剥离骨膜,充分显露凶门及颅骨,颅脑立体定位仪标记右侧凶门右侧3mm,冠状缝前3mm处标记并画圈,高速颅钻以圆圈标记中心开颅并扩大形成直径约6mm的圆形骨窗,清除骨末并无菌骨蜡止血,暴露完整的硬脑膜,再次用颅脑立体定位仪核准硬脑膜撞击位置无误,用40克打击棒沿金属套管从20cm高度自由落下,撞击针撞击硬脑膜并使撞击后压缩深度为2-3mm,下落冲击力造成大鼠右侧顶叶脑皮质损伤,打击完成后立即从致伤位置解除,硫酸庆大霉素注射液4-5滴滴入术区,逐层缝合头皮,对皮完整后碘伏棉球和酒精棉球消毒术区头皮[3]。

建大脑中动脉栓塞再灌注损伤模型。

将大鼠用5%异氟烷吸入麻醉后,电动剃毛机剃毛至颈部皮肤裸露,仰卧固定于颅脑立体定位手术台上,碘伏棉球和酒精棉球消毒完毕后右侧颈部切开皮肤和筋膜,分离肌肉,迷走神经和右侧颈部动脉,显露颈外动脉,颈内动脉和颈总动脉并放置垫片,准备4-0丝线结扎颈外动脉,微动脉夹夹闭颈内动脉,在颈总动脉近分叉处剪开小口,插入符合大鼠体重的硅胶包被线栓(直径0.38mm,广州佳灵生物技术有限公司),扎紧缝合线,松开微动脉夹,栓线插入据颈内动脉分叉处约18-20cm至大脑中动脉起始部,阻断血供后线栓远端标记并逐层缝合皮下及皮肤,对皮完整后碘伏棉球和酒精棉球消毒术区皮肤。自手术完毕及时90分钟后拔除线栓。

大鼠模型建立后将大鼠分组分笼饲养,建立空白组,模型组给予蒸馏水,及低剂量组,中剂量组和高剂量组,分别给予原药转化的0.1ml/100g剂量给药,喂食软化饲料,观察肢体活动及神经功能情况,连续检测体重并每日行头部及颈部切口换药2次,勤换清洁干燥的饲养笼垫料。

longa神经行为学评分

造模完成后第1天,第4天及第7天行longa神经行为学评分

评分越高表示神经功能缺损越严重

0分:正常,无神经功能缺损

1分:左侧前爪不能完全伸直,肢体屈曲内收,提尾悬空试验阳性,轻度神经功能缺损

2分:行走时向左侧转圈,左侧推抵抗力下降,并有左侧偏瘫,并有级症状

3分:行走时向左侧倾倒,自由活动向左侧划圈,并有级症状

4分:意识丧失,不能行走。

改良的 GarciaJH 神经功能缺损评分,

造模完成后第 1 天, 第 4 天及第 7 天行改良的 GarciaJH 神经功能缺损评分,

自主运动功能评分, 观察 5 分钟在笼内的活动:

3 分, 正常。2 分, 轻度影响。1 分, 重度影响。0 分, 无活动。

体态对称性评分, 提起尾部使之悬空, 观察四肢状态:

3 分, 体态对称。2 分, 不对称。1 分, 偏瘫。

前肢伸展运动评分, 提起大鼠尾部, 将前肢移向桌面边缘, 观察前爪伸展运动:

3 分, 伸展对称。2 分, 轻度不对称。1 分, 显著不对称。0 分, 偏瘫。

抓持和攀爬铁笼的能力评分,

3 分, 攀爬容易, 抓持有力。2 分, 一侧损害表现。1 分, 不能攀爬或转圈。

两侧身体触觉反射评分,

3 分, 双侧对称。2 分, 一侧反应迟钝。1 分, 一侧无反应。

双侧胡须触碰反应评分,

3 分, 双侧对称。2 分, 双侧不对称。1 分, 一侧无反应。

术后第 4 天至术后第 7 天连续 4 天再次行水迷宫定位航行试验, 术后第 8 天行空间探索试验, 由于创伤性脑梗死的损害作用, 大部分大鼠对既往的术前水迷宫初次记忆出现改变, 术后再次行阶段性水迷宫定位航行及空间探索试验^[4]。

完整的学习和记忆功能需要依赖于大脑皮质的初级运动区, 运动前区皮质和位于皮质层的核区参与调控, 并依赖于海马体的整合作用, 并需要海马, 杏仁核复合体及运动区皮质纤维连接系统的完整性。创伤性脑梗死发生时侵害了有关记忆功能的解剖结构和联络环路, 出现对新内容记忆功能障碍以及对发病前所存储数据回忆障碍, 出现空间定位及学习和记忆过程的严重障碍。

大鼠脑组织 TTC 染色, 测量脑梗死体积,

既往试验数据表明, TTC 染色法测量的脑梗死体积与 MRIT2WI 序列测量的脑梗死体积无明显统计学差异。目前 TTC 染色法被认为是最准确有效, 应用最广泛的测量脑梗死体积的方法。TTC 是一种脂溶性光敏感复合物, 它能够与正常脑组织中的脱氢酶发生反应, 生成红色的不溶物质, 而缺血脑组织线粒体受损, 无法诱导显色反应而成白色, 从而能够区分正常和梗死的脑组织。

大鼠栓塞后第一天, 第五天经麻醉后取血, 并直接取脑, 在负 20℃冰箱速冻 20 分钟左右后将鼠脑置入专用脑槽, 做 2mm 厚度的连续切片, 通常共计五片, 将切片置于 2%TTC 中避光, 放入 37℃温箱或水浴锅 15 分钟均匀染色, 再用 4% 多聚甲醛固定, 染成红色的为正常脑组织, 白色的为梗死脑组织。将染色的脑片按切片顺序排列标号设计标尺并拍照, 利用 image 图像处理软件计算脑梗死体积并计算脑梗死比率。

大鼠脑组织 HE 染色, 观察脑皮质损伤部位神经纤维水肿及神经细胞坏死情况, 海马区细胞水肿及神经元坏死程度分级。

0 级, 神经元细胞形态基本正常, 胞核形态正常, 细胞核周围尼氏小体多, 此为基本正常细胞。

1 级: 神经元细胞形态基本正常, 胞核无明显形态学改变, 核周尼氏小体略减少,

2 级: 神经元细胞肿胀, 细胞边缘变凸出, 核周尼氏小体明显减少, 胞浆均匀, 核核常偏居一侧, 胞核无明显改变

3 级: 神经元细胞胞体缩小, 核周尼氏小体消失, 胞核内染色质浓缩, 核仁与染色质分界不清

4 级, 神经元细胞胞体及细胞核均浓缩, 尼氏小体消失, 细胞核裂解, 核仁消失, 细胞膜与周围界限清楚

5 级: 除上述变化外, 胞浆中出现空泡, 有部分坏死神经元细胞被吞噬细胞吞噬, 卫星细胞增多, 有的侵入胞体使细胞残缺不全。

行血清神经酰胺 Elisa 检测。

试验原理: 试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法。往预先包被神经酰胺抗体捕获抗体的包被微孔中, 依次加入标本, 标准品, HRP 标记的检测抗体, 经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色, TMB 在过氧化物酶的催化下转成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的人神经酰胺抗体成正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD) 值, 计算样品浓度。

统计学分析: 应用 SPSS 统计学软件分析水迷宫试验结果, 比较损伤后不同浓度通窍活血汤对大鼠既往学习及空间记忆能力的改变, 应用 SPSS 统计学软件分析不同浓度通窍活血汤对创伤性脑梗死大鼠脑组织体积的改变, 应用 SPSS 统计学软件分析不同浓度通窍活血汤对创伤性脑梗死大鼠 longa 神经行为学评分和改良的 GarciaJH 评分的改变, 应用 SPSS 统计学软件分析不同浓度通窍活血汤对创伤性脑梗死大鼠血神经酰胺 Elisa 检测结果的影响 [5]。

5 试验结果

水迷宫试验结果, 比较损伤后不同浓度通窍活血汤对大鼠既往学习及空间记忆能力的改变, 水迷宫空间探索定位功能改善, 靶象限停留时间及穿越次数, 中浓度组和高浓度组及模型组及低浓度组比较改善作用明显, 具有统计学意义。

大鼠神经功能损伤情况明显改善, longa 神经行为学评分并具有时间依赖性和浓度相关性, 中浓度组和高浓度组及模型组及低浓度组比较改善作用明显, 具有统计学意义。

大鼠神经功能损伤情况明显改善, 改良的 GarciaJH 神经功能损伤评分, 中浓度组和高浓度组及模型组及低浓度组比较改善作用明显, 具有统计学意义。

大鼠脑组织 HE 染色损伤脑组织结构和海马区神经元形态明显改善，显微镜下神经元变性程度中浓度组和高浓度组和模型组及低浓度组比较改善作用明显，具有统计学意义。

大鼠脑组织 TTC 染色，测量脑梗死体积，中浓度组和高浓度组和模型组及低浓度组比较改善作用明显，具有统计学意义

血清神经酰胺 Elisa 检测，中浓度组和高浓度组和模型组及低浓度组比较，具有统计学意义

6 结语

创伤性脑梗死属祖国医学“头部内伤病”之范畴，证属“气滞血瘀”。本方主要由赤芍，桃仁，川芎，红花白芷及麝香组成，方中赤芍中的芍药苷在兔和犬的试验中明确有扩张血管的作用，并能增强正常鼠的识别，学习和记忆能力，改善大鼠的空间辨别能力障碍。红花有抗凝血和血栓作用，使局部血栓溶解，并具有较强的镇痛，镇静作用，能活血通络，散瘀止痛。白芷中的脂溶性成份为香豆素类，具有散风除湿，通窍止痛的作用。神经酰胺是公认的第二信使，是细胞信号通路的中心分子，能够通过参与突触的形成并调节突触的可塑性影响学习和记忆过程，调节神经元的兴奋性和抑制性，调节神经元的发育，成熟和修复过程，调节下丘脑 - 垂体 -

靶器官轴的神经递质释放，存进神经细胞的代谢并促进新的神经连接的形成，对记忆的存储和检索非常重要。通窍活血汤具有拮抗神经毒性，抗氧化应激，改善脑血管痉挛，促进脑血管循环的作用，可能通过上调神经酰胺的表达，降低创伤性脑梗死大鼠的脑梗死面积并改善神经行为学和学习及空间记忆能力。

参考文献

- [1] 杜勇, 张淑敏, 基于网络药理学探讨通窍活血汤治疗颅脑损伤的作用机制, *WORLD CHINESE MEDICINE* AUGUST 2021. vol.16.NO》15 2282-2292
- [2] Cailin, et al. ACT001 attenuates microglia-mediated neuroinflammation after traumatic brain injury via inhibiting AKT/NFKB/NLRP3 pathway.[J]. *cell Commun signal*, 2022,
- [3] 李露露, 宋圆英, 胡馨予, 等. 丹参-川芎药对治疗脑梗死作用机制的网络药理及分子对接研究[J]. *成都中医药大学学报*, 2022, 45 (1): 44-51
- [4] 高京, 刘飞祥, 张运克. 中药调控PI3K/Akt 信号通路治疗脑缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *中国试验方剂学杂志*, 2024, 30 (06): 253-261
- [5] 齐大河, 丁萌萌, 王可欣等. 中医药干预脑缺血再灌注损伤的信号通路研究进展[J]. *中医学报*, 2023, 38 (08): 1666-1674