

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.23.014

实验研究

不同活血化瘀方剂对重型颅脑损伤急性期大鼠的应用风险

韦春珠, 彭玲玲, 黄宗轩, 刘鑫杰, 潘宇政*

(广西医科大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市双拥路 6 号, 530021)

摘要 目的 探讨不同活血化瘀方剂对重型颅脑损伤 (sTBI) 急性期大鼠的影响。方法 306 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、脑蛋白水解物组、桃红四物汤、血府逐瘀汤组、通窍活血汤组、补阳还五汤组 7 组。除正常组外其余各组采用改良的 Feeney 自由落体方法制备 sTBI 大鼠模型。造模成功后脑蛋白水解物组、桃红四物汤组、血府逐瘀汤组、通窍活血汤组、补阳还五汤组分别给予相应药物 1.11 mg/200 g、2.04 g/200 g、3.12 g/200 g、1.92 g/200 g、5.74 g/200 g 灌胃, 正常组和模型组给予生理盐水 3 ml/200 g 灌胃, 各组每日均灌胃 1 次, 连续 7 天。灌胃后随时统计大鼠死亡率, 在第 1、3、7 天分别观察大鼠脑组织病理评分, 检测血清微管相关蛋白 Tau、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 含量。结果 实验期间正常组与脑蛋白水解物组大鼠无死亡, 其余各组大鼠死亡主要集中在前 4 天, 前 4 天与正常组比较, 模型组、桃红四物汤组、血府逐瘀汤组大鼠死亡率都显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 桃红四物汤组、血府逐瘀汤组大鼠死亡率也明显升高 ($P < 0.01$), 而通窍活血汤组、补阳还五汤组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常组同时间相比较, 各给药组大鼠脑组织病理评分及血清 Tau、GFAP 水平在 3 个时间段均明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组同时间比较, 第 1 天血府逐瘀汤组、通窍活血汤组和补阳还五汤组大鼠病理评分升高, 桃红四物汤组、血府逐瘀汤组、补阳还五汤血清 GFAP 蛋白水平升高 ($P < 0.05$); 而在第 3 天除桃红四物汤组外, 其余各给药组病理评分较模型组降低; 脑蛋白水解物组、通窍活血汤组、补阳还五汤血清 Tau、GFAP 水平降低 ($P < 0.05$); 第 7 天各给药组病理评分及血清 Tau、GFAP 水平均降低 ($P < 0.05$)。结论 sTBI 急性期使用桃红四物汤及血府逐瘀汤会加重病情, 增加死亡风险。用活血化瘀药来治疗 sTBI 急性期的最佳时间段可能在发生损伤第 4 天后, 并且以通窍活血汤和补阳还五汤效果最好。

关键词 重型颅脑损伤; 活血化瘀; 桃红四物汤; 血府逐瘀汤; 通窍活血汤; 补阳还五汤; 死亡风险

重型颅脑损伤 (severe traumatic brain injury, sTBI) 归属于中医学“瘀血证”范畴。临床上有大量报道运用桃红四物汤、血府逐瘀汤、通窍活血汤及补阳还五汤等活血化瘀方剂治疗颅脑损伤收到良好效果^[1-4], 但这些报道中患者多处于颅脑损伤恢复期。对于急性期 sTBI 患者应用活血化瘀药治疗报道还较少并存在争论。有学者认为 sTBI 急性期应用活血化瘀药效果较差, 建议慎用^[5]。因此, 本研究观察 sTBI 急性期不同时间段大鼠的死亡率、脑组织病理改变及微管相关蛋白 Tau、胶质纤维

酸性蛋白 (GFAP) 等指标, 探讨中医活血化瘀经典方剂桃红四物汤、血府逐瘀汤、通窍活血汤及补阳还五汤 4 个方剂对 sTBI 急性期大鼠死亡风险以及病情变化的影响。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 306 只, 体重 250 ~ 300 g, 购于广西医科大学实验动物研究中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (桂) 2014-0002, 使用许可证号: SYXK (桂) 2014-0003。实验经广西医科大学伦理委员会批准, 批件号: 2014-KY-NSFC-148。

1.2 药物

桃红四物汤组成: 当归 9 g、熟地黄 12 g、川

基金项目: 国家自然科学基金 (81460687); 广西壮族自治区卫生计生中医药科技专项 (GZLC14-29)

* 通讯作者: pyz79298@sina.com, (0771) 5356515

芎 6 g、白芍 9 g、桃仁 9 g、红花 6 g; 通窍活血汤组成: 赤芍 3 g、川芎 3 g、桃仁 9 g、大枣 7 枚、红花 9 g、老葱 5 g、生姜 9 g、麝香 0.15 g; 血府逐瘀汤组成: 桃仁 12 g、红花 9 g、当归 9 g、生地黄 9 g、牛膝 9 g、川芎 4.5 g、桔梗 4.5 g、赤芍 6 g、枳壳 6 g、甘草 6 g、北柴胡 3 g; 补阳还五汤组成: 黄芪 120 g、当归尾 6 g、赤芍 6 g、地龙 3 g、川芎 3 g、红花 3 g、桃仁 3 g。药材均购于广西医科大学第一附属医院中药房, 用水煎提取浓缩方法制作成含生药量浓度为 2 g/ml 中药水提取物 (其中通窍活血汤中麝香溶于水提取物后再浓缩)。

1.3 主要试剂及仪器

脑蛋白水解产物片 (上海长城药业有限公司, 国药准字: H31022990); Tau 蛋白 Elisa 试剂盒 (批号: Y10019382)、GFAP 蛋白 Elisa 试剂盒 (批号: W31019753), 均为武汉华美公司产品; 水合氯醛 (上海展云化工有限公司, 批号: 180920); HE 染色液 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: 170609)。

酶标仪 (赛默飞世尔仪器有限公司, Multiskan FC 型); 正置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司, BX53F + DP73 + cellsens 型); 大鼠脑立体定向仪 (成都泰盟科技有限公司, 89-00136 型); 牙科钻 (成都康发医疗器械有限公司, 20011034 型); 高速冷冻离心机 (长沙英泰仪器公司, TDL5M 型)。

1.4 动物分组、造模及给药

按随机数字表法将 SD 大鼠分成 7 组: 正常组、模型组、脑蛋白水解物组、桃红四物汤组、血府逐瘀汤组、通窍活血汤组、补阳还五汤组, 正常组、脑蛋白水解物组每组 18 只, 模型组、桃红四物汤组、血府逐瘀汤组、通窍活血汤组、补阳还五汤组每组 54 只。若实验途中大鼠死亡, 则随即补上相应大鼠, 记录死亡大鼠数。sTBI 大鼠模型的制备采用改良的 Feeney's 自由落体法^[9]。大鼠术前严格进食 12 h, 用 10% 水合氯醛 (0.70 ml/200 g) 腹腔注射麻醉, 采用俯卧位将其固定在脑立体定位仪上, 将其头部毛发剔除并局部消毒, 沿头顶正中切开头皮, 剥离骨膜, 使矢状缝、冠状缝及左侧顶骨暴露, 在确保硬脑膜完整的情况下, 用牙科钻钻出一个距离矢状缝左侧 2.5 mm, 冠状缝后 1.5 mm 的直径为 5 mm 的骨窗, 用 50 g 砝码沿高为 20 cm 的自制套管上滑落, 撞击在大鼠骨窗上厚度约 3.5 mm、直径 4 mm 的圆形钢板垫上。打击完成后, 用骨蜡填闭骨窗, 逐层缝合头皮后消毒伤口。术后

6 h 对造模大鼠进行神经功能缺损评分, 评分 ≥ 2 分的大鼠表明模型成功^[9], 否则模型失败, 将剔除出组, 重新造模。

造模成功后脑蛋白水解物组、桃红四物汤组、血府逐瘀汤组、通窍活血汤组、补阳还五汤组分别给予相应药物 1.11 mg/200 g、2.04 g/200 g、3.12 g/200 g、1.92 g/200 g、5.74 g/200 g 灌胃。药物剂量换算方法按照《药理实验方法学》^[10]中公式计算: 大鼠剂量 = (人的用量 $\times$ 换算系数 0.018 $\times$ 3.16 倍) / 2, 正常组和模型组大鼠在造模后 6 h 给予生理盐水 3 ml/200 g 灌胃。各组每日均灌胃 1 次, 连续灌胃 7 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 大鼠死亡及一般情况观察 每天定时观察各组大鼠的摄食、饮水、尿量、毛色、精神状态、行为活动状况以及死亡数量, 并进行统计。

1.5.2 血清 Tau 和 GFAP 水平检测 在给药第 1、3、7 天对各组大鼠进行冰上取材, 每个时间点 6 只。麻醉后, 将大鼠固定, 剖腹, 经腹主动脉采血, 4℃、3000 g 离心 5 min, 取上清液, 储存于 -80℃ 冰箱。Tau、GFAP 蛋白检测按 ELISA 试剂盒说明书进行, 酶标仪 450 nm 波长测量各孔的光密度 (OD 值), 用 Curve Exert 1.4 制作标准曲线, 计算出样本的实际浓度值。

1.5.3 脑组织病理学评分 用多聚甲醛将脑组织固定过夜, 经梯度脱水、石蜡包埋后, 3 μ m 厚冠状切片, 待行 HE 染色。HE 染色的切片采用盲法, 每张切片随机选择 10 个高倍视野 ($\times 200$), 观察脑组织病理变化, 参照文献^[11]中镜下病理评分法对各组大鼠神经元、胶质细胞、毛细血管及出血情况评分: 出现少量神经元、神经纤维水肿等计 1 分; 散在形胶质细胞水肿计 1 分; 部分毛细血管扩张、水肿计 1 分。出现广泛神经元水肿、神经纤维疏松化, 胞核形态不规则, 核固缩、神经元凋亡, 神经纤维网结构破坏计 2 分; 广泛胶质细胞水肿计 2 分; 广泛毛细血管扩张、水肿, 毛细血管内皮细胞破坏计 2 分; 出现核固缩、神经元凋亡计 3 分; 嗜神经元现象, 脑脓肿计 3 分; 毛细血管坏死, 脑实质内点、片状出血计 3 分, 总分为 18 分。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行处理。计量资料服从正态分布且方差齐用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验; 计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况的观察

正常组大鼠食欲良好,毛发、尿量、尿色、体型、精神状态及行为活动尚可。模型组大鼠饮食减少,毛发暗黄无泽,饮食、尿量减少,尿色偏黄,体型较正常鼠瘦弱,肢体偏瘫,向右侧旋转转圈,精神萎靡不振。与模型组比较,脑蛋白水解物组大鼠在用药后第 1 天开始出现饮食增多,毛发逐渐润泽,饮食、尿量增多,右侧旋转频次减少等,且随时间延长而逐步好转;而桃红四物汤组和血府逐瘀汤组在用药后的前 3 天上述症状无明显好转,通窍活血汤组和补阳还五汤组大鼠在给药后第 1 天则出现饮食增多,毛发逐渐润泽,饮食、尿量变多,向右侧旋转转圈频次减少,精神状态逐渐转好等现象,并随时间延长逐步改善,且改善的程度均明显高于脑蛋白水解物组。

2.2 各组大鼠实验期间死亡情况比较

表 1、表 2 示,实验期间除正常组与脑蛋白水解物组大鼠无死亡外,其他组大鼠均出现不同数量的死亡。并且死亡时间主要集中在前 4 天,因此我们比较了前 4 天各组大鼠的死亡情况。结果显示,与正常组+脑蛋白水解物组比较,模型组、桃红四物汤组、血府逐瘀汤组大鼠死亡数量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,桃红四物汤组、血府逐瘀汤组大鼠死亡情况也明显升高 ($P < 0.01$),而通窍活血汤组、补阳还五汤组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠不同时间脑组织病理学改变比较

光镜下观察到正常组大鼠脑组织结构完整,神经细胞大小、形态正常,排列整齐,细胞核清晰可见,未见组织出血水肿。模型组大鼠可见片状分布的脑组织间隙出血、水肿,胞核发生偏移,大量单核细胞、浆细胞等炎性细胞浸润,核固缩,局部脑组织发生溶解、坏死,故镜下可见局部松散的脑

表 2 各组大鼠前 4 天死亡情况比较 [只 (理论频数)]

组别	鼠数	死亡	未死亡
正常组+脑蛋白水解物组	36	0 (13.9)	36 (22.1)
模型组	54	19 (20.8)	35 (33.2)
桃红四物汤组	54	36 (20.8)	18 (33.2)
血府逐瘀汤组	54	36 (20.8)	18 (33.2)
通窍活血汤组	54	13 (20.8)	41 (33.2)
补阳还五汤组	54	14 (20.8)	40 (33.2)

注:() 中为 χ^2 检验的“理论频数”;为降低 I 类错误的可能性,将正常组和脑蛋白水解物组合并,以 $\alpha/2 (k-1) = 0.005$ 为检验水准, k 为组数,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义

组织,且随时间的延长,损伤越来越重,但在第 7 天该组大鼠脑组织间隙出血、水肿明显减轻,胞核发生偏移减少,且炎细胞浸润明显较少,局部脑组织发生溶解、坏死等减少。桃红四物汤组及血府逐瘀汤组在用药前 3 天出血、水肿、核固缩及炎细胞浸润区较 3 天后扩大,而通窍活血汤和补阳还五汤出血、水肿随时间较前吸收,核固缩及炎细胞浸润则随时间延长逐步减少。表 3 示,与正常组同时间比较,各给药组大鼠脑组织病理评分在 3 个时间段均明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,第 1 天血府逐瘀汤组、通窍活血汤组和补阳还五汤组大鼠病理评分升高 ($P < 0.05$);而在第 3 天除桃红四物汤组外,其余各给药组病理评分较模型组降低 ($P < 0.05$);在第 7 天各给药组病理评分均降低 ($P < 0.05$)。与脑蛋白水解物组同时间比较,第 1 天血府逐瘀汤组病理评分升高,第 3 天桃红四物汤组病理评分升高,第 7 天 4 个中药组病理评分均降低 ($P < 0.05$)。与桃红四物汤组同时间比较,第 3 天血府逐瘀汤组、通窍活血汤组和补阳还五汤组病理评分均降低,第 7 天补阳还五汤组病理评分亦降低 ($P < 0.05$)。各组组内与前一个时间点比较,模型组第 3 天病理评分升高,而第 7 天病理评分降低 ($P < 0.05$);血府逐瘀汤组、通窍活血汤组和补阳还五汤组病理评分均较前一个时间点降低,脑

表 1 各组大鼠每天死亡数 (只)

组别	鼠数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	合计
正常组	18	0	0	0	0	0	0	0	0
模型组	54	10	8	1	0	0	0	0	19
脑蛋白水解物组	18	0	0	0	0	0	0	0	0
桃红四物汤组	54	10	14	10	2	0	0	0	36
血府逐瘀汤组	54	15	10	9	2	0	0	0	36
通窍活血汤组	54	10	2	0	1	0	0	0	13
补阳还五汤组	54	7	4	2	1	0	0	0	14
合计	306	52	38	22	6	0	0	0	118

表 3 各组大鼠不同时间脑组织镜下病理学评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 3 天	第 7 天
正常组	6	0.50 ± 0.55	0.50 ± 0.55	0.33 ± 0.52
模型组	6	5.83 ± 1.17 [*]	7.17 ± 0.75 ^{**}	4.83 ± 0.41 ^{**}
脑蛋白水解物组	6	6.00 ± 1.27 [*]	4.83 ± 0.75 ^{*△}	4.00 ± 0.63 ^{*△}
桃红四物汤组	6	6.33 ± 0.82 [*]	7.00 ± 1.10 ^{*▲}	3.17 ± 0.75 ^{*△▲}
血府逐瘀汤组	6	7.00 ± 0.63 ^{*△▲}	5.00 ± 0.89 ^{*△#}	2.50 ± 0.55 ^{*△▲}
通窍活血汤组	6	6.83 ± 0.41 ^{*△}	4.67 ± 0.52 ^{*△#}	3.00 ± 0.63 ^{*△▲}
补阳还五汤组	6	6.67 ± 0.52 ^{*△}	4.50 ± 0.84 ^{*△#}	2.23 ± 0.82 ^{*△▲#}

注: 与正常组同时间比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与脑蛋白水解物组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与桃红四物汤组同时间比较, $\#P < 0.05$; 与本组前一个时间点比较, $\star P < 0.05$

蛋白水解物组第 3 天较第 1 天降低, 桃红四物汤组仅第 7 天较第 3 天较低 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠不同时间血清 Tau 水平比较

表 4 示, 与正常组同时间比较, 其余各组大鼠在 3 个时间点血清 Tau 水平均升高 ($P < 0.05$)。与模型组同时间比较, 第 1 天各给药组大鼠血清 Tau 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 在第 3 天除血府逐瘀汤组、桃红四物汤组外其余给药组血清 Tau 水平均降低, 在第 7 天各给药组大鼠血清 Tau 水平均降低 ($P < 0.05$)。与脑蛋白水解物组同时间比较, 第 1 天血府逐瘀汤组血清 Tau 水平升高, 第 3 天桃红四物汤组、血府逐瘀汤组血清 Tau 水平升高, 而通窍活血汤组、补阳还五汤组血清 Tau 水平降低; 第 7 天各中药组大鼠血清 Tau 蛋白水平均低于脑蛋白水解物组 ($P < 0.05$)。与桃红四物汤组同时间比较, 第 1 天血府逐瘀汤组血清 Tau 水平升高, 第 3、7 天血府逐瘀汤组、通窍活血汤组、补阳还五汤血清 Tau 水平均降低 ($P < 0.05$)。与血府逐瘀汤组同时间比较, 通窍活血汤组在第 1、3、7 天血清 Tau 水平均降低, 补阳还五汤组第 3、7 天血清 Tau 水平亦降低 ($P < 0.05$)。补阳还五汤组第 3、7 天血清 Tau 水平均低于同时间通窍活血汤组 ($P < 0.05$)。与本组前一个时间点比较, 通

窍活血汤组和补阳还五汤组在第 3 天血清 Tau 水平较第 1 天时降低 ($P < 0.05$), 模型组、脑蛋白水解物组、桃红四物汤组、血府逐瘀汤组、通窍活血汤组第 7 天血清 Tau 水平均较本组第 3 天时降低 ($P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠不同时间血清 GFAP 水平比较

表 5 示, 与正常组同时间比较, 其余各组大鼠在 3 个时间点血清 GFAP 水平均升高 ($P < 0.05$)。与模型组同时间比较, 第 1 天桃红四物汤组、血府逐瘀汤组、补阳还五汤组血清 GFAP 水平升高, 而通窍活血汤组降低 ($P < 0.05$); 第 3 天脑蛋白水解物组、通窍活血汤组、补阳还五汤组血清 GFAP 水平降低, 而桃红四物汤组、血府逐瘀汤组升高; 第 7 天各给药组血清 GFAP 水平均降低 ($P < 0.05$)。与脑蛋白水解物组同时间比较, 第 1 天桃红四物汤组、血府逐瘀汤组、补阳还五汤组血清 GFAP 水平升高 ($P < 0.05$), 第 3 天桃红四物汤组、血府逐瘀汤组血清 GFAP 水平升高, 通窍活血汤组、补阳还五汤降低 ($P < 0.05$), 第 7 天各中药组血清 GFAP 水平均降低 ($P < 0.05$)。与桃红四物汤组同时间比较, 第 1 天通窍活血汤组血清 GFAP 蛋白水平降低, 第 3、7 天血府逐瘀汤组、通窍活血汤组、补阳还五汤组血清 GFAP 蛋白水平

表 4 各组大鼠不同时间血清 Tau 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 3 天	第 7 天
正常组	6	219.78 ± 24.27	208.05 ± 20.34	232.60 ± 13.97
模型组	6	1253.96 ± 49.25 [*]	1283.67 ± 47.49 [*]	935.11 ± 17.01 ^{**}
脑蛋白水解物组	6	1226.95 ± 16.93 [*]	1036.98 ± 43.08 ^{*△}	850.36 ± 15.13 ^{*△}
桃红四物汤组	6	1229.18 ± 27.07 [*]	1383.97 ± 51.59 ^{*△▲}	631.03 ± 38.22 ^{*△▲}
血府逐瘀汤组	6	1283.67 ± 47.49 ^{*▲#}	1244.80 ± 47.11 ^{*▲#}	476.22 ± 25.22 ^{*△▲#}
通窍活血汤组	6	1231.87 ± 29.68 ^{*◇}	850.58 ± 28.04 ^{*△▲#◇}	424.09 ± 37.16 ^{*△▲#◇}
补阳还五汤组	6	1252.29 ± 25.22 [*]	335.71 ± 19.13 ^{*△▲#◇}	337.56 ± 19.19 ^{*△▲#◇}

注: 与正常组同时间比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与脑蛋白水解物组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与桃红四物汤组同时间比较, $\#P < 0.05$; 与血府逐瘀汤组同时间比较, $\diamond P < 0.05$; 与通窍活血汤组同时间比较, $\square P < 0.05$; 与本组前一个时间点比较, $\star P < 0.05$

表 5 各组大鼠不同时间血清 GFAP 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 3 天	第 7 天
正常组	6	35.50 ± 1.29	36.25 ± 1.71	35.25 ± 1.89
模型组	6	233.50 ± 2.65*	199.50 ± 8.74*★	149.75 ± 2.50*★
脑蛋白水解物组	6	230.50 ± 3.11*	185.50 ± 5.07*△★	126.50 ± 6.86*△★
桃红四物汤组	6	241.25 ± 2.63*△▲	250.50 ± 5.20*△▲★	93.00 ± 5.16*△▲★
血府逐瘀汤组	6	240.00 ± 3.16*△▲	239.25 ± 4.92*△▲#	106.25 ± 6.45*△▲#★
通窍活血汤组	6	226.75 ± 2.99*△#◇	111.50 ± 12.79*△▲#◇★	75.00 ± 10.80*△▲#◇★
补阳还五汤组	6	249.50 ± 1.29*△▲#◇□	54.25 ± 5.38*△▲#◇□★	62.75 ± 14.52*△▲#◇□

注: GFAP, 胶质纤维酸性蛋白; 与正常组同时时间点比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间点比较, △ $P < 0.05$; 与脑蛋白水解物组同时时间点比较, ▲ $P < 0.05$; 与桃红四物汤组同时时间点比较, # $P < 0.05$; 与血府逐瘀汤组同时时间点比较, ◇ $P < 0.05$; 与通窍活血汤组同时时间点比较, □ $P < 0.05$; 与本组前一个时间点比较, ★ $P < 0.05$

差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。第 3、7 天通窍活血汤组、补阳还五汤组血清 GFAP 水平均低于同时点血府逐瘀汤组 ($P < 0.05$)。补阳还五汤组血清 GFAP 水平各时间点与通窍活血汤组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与本组前一个时间点比较, 第 3 天模型组、脑蛋白水解物组、通窍活血汤组、补阳还五汤组血清 GFAP 水平均降低, 第 7 天模型组、脑蛋白水解物组、桃红四物汤组、血府逐瘀汤组、通窍活血汤组血清 GFAP 水平亦降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

桃红四物汤、血府逐瘀汤、通窍活血汤和补阳还五汤是临床常用的活血化瘀方剂, 依据四方药物组成来看, 桃仁、红花、赤芍/白芍及川芎是共同的药物组成部分, 说明四方均有活血行气祛瘀的功效。除共同药物组成部分, 桃红四物汤中当归既活血又补血, 熟地黄补血养阴, 填精益髓, 该方大多为活血祛瘀药, 药少力专; 而血府逐瘀汤中四逆散行气和血, 牛膝通利血脉, 引血下行而化瘀, 加上桔梗理气活血使得该方活血化瘀力量更强; 通窍活血汤中去熟地黄、当归, 加麝香、老葱、生姜等与活血化瘀药相辅相成, 通窍祛瘀, 使得活血化瘀药力道恰到好处; 而补阳还五汤中除共同组成药物外, 有地龙通经活络, 黄芪扶助正气, 使得气虚得补, 经络得通, 气旺血行, 活血而不伤正。但也有研究者发现, 中药活血化瘀疗法对急性期颅脑损伤, 包括硬膜外血肿及慢性硬膜下血肿的疗效较差^[9]。我们在前期动物实验^[10-11]也发现, 活血化瘀方剂虽然可以减轻急性期 sTBI 继发性炎症反应, 但在 sTBI 急性期前 4 天也加重了大鼠的死亡。sTBI 急性期能否早期应用活血化瘀中药治疗还是一个存在争论的问题。

本实验我们对 sTBI 大鼠急性期应用活血化瘀方剂的风险进行了动态观察与研究, 并与临床 sTBI 常用的治疗药物——脑蛋白水解产物^[12]进行了比较。实验中观察到, 正常组大鼠食欲良好, 毛发顺滑光泽, 尿量、尿色、体型、精神状态及行为活动尚可。模型组大鼠饮食减少, 毛发暗黄无泽, 饮食、尿量减少, 尿色偏黄, 体型较正常鼠瘦弱, 肢体偏瘫, 向右侧旋转转圈或乱窜, 或精神萎靡不振。各给药组大鼠上述症状随时间延长逐渐改善, 并且通窍活血汤组和补阳还五汤组大鼠一般情况改善较早 (第 1 天), 效果较脑蛋白水解物组改善明显。同时观察到, 正常组与脑蛋白水解物组大鼠一般情况良好, 未见死亡, 而余下各组都出现了不同数量的死亡。与模型组比较, 各中药组在干预前 4 天大鼠死亡数量都有所增加, 其中桃红四物汤组、血府逐瘀汤组大鼠死亡数量升高最为明显, 而通窍活血汤组、补阳还五汤组未见明显升高, 说明急性期 sTBI 早期运用活血化瘀药存在一定风险。实验中, 我们还对急性期 sTBI 大鼠的脑组织病理进行评分, 结果显示, 模型组大鼠的脑组织评分明显升高, 但随着时间的发展, 评分逐渐降低, 但仍然高于正常组。给予各活血化瘀方剂后, 桃红四物汤组脑组织病理评分在第 1、3 天时无明显变化, 在第 7 天评分明显降低, 而血府逐瘀汤组、通窍活血汤组及补阳还五汤组的脑组织病理评分均在第 1 天有所升高, 第 3 天开始下降, 第 7 天降到最低值, 这与我们统计的各组死亡率趋势基本一致, 提示 sTBI 急性期早期运用活血化瘀方剂会存在加重病情的风险, 但这 3 方在第 3 天后可减轻 sTBI 大鼠脑损伤严重程度, 对治疗有积极作用。

在颅脑损伤后, 神经元受损可导致 Tau 被迫释放入血, 故检测 sTBI 大鼠血清 Tau 含量可间接反

应颅脑损伤的严重程度^[3]。郑国强^[4]研究表明, sTBI 患者在早期即可检测到血清 Tau 蛋白, 含量颅脑损伤程度呈正相关。杜若桑等^[5]研究证实, 血清 GFAP 减少可以反映脑损伤大鼠的严重程度。脑蛋白水解产物是一种从猪脑中分离提取的氨基酸和低分子肽, 含有神经组织氨基酸、特异多肽、神经营养因子、神经介质等主要成分^[6]。脑蛋白水解产物能通过血脑屏障进入脑神经细胞, 改善神经元的代谢, 从而诱导突触的传导, 促进神经元的分化, 保护神经细胞免遭各种缺血和神经毒素的损害^[7]。本实验结果显示, 模型组大鼠血清 Tau、GFAP 水平随时间的推移含量逐渐降低, 说明 sTBI 大鼠受伤后有一定的自我修复能力。脑蛋白水解物组大鼠血清 Tau 水平在前 3 天无明显变化, 在第 7 天时降低; GFAP 则随着时间延长含量逐步降低, 但仍然高于正常组。而给予桃红四物汤、血府逐瘀汤、通窍活血汤及补阳还五汤干预后, 发现第 1 天各组大鼠血清 Tau、GFAP 含量仍维持较高水平, 第 7 天各给药组大鼠血清 Tau、GFAP 水平均有不同程度的降低, 并且通窍活血汤组和补阳还五汤组作用强于脑蛋白水解物组, 说明通窍活血汤和补阳还五汤均对 sTBI 的恢复具有促进作用。在第 3 天桃红四物汤组、血府逐瘀汤组的血清 Tau、GFAP 含量仍维持较高水平, 直到第 7 天两组大鼠血清 Tau、GFAP 含量才下降, 提示在 sTBI 急性期早期给予桃红四物汤和血府逐瘀汤治疗可能会加重 sTBI 急性期的病情, 而通窍活血汤组和补阳还五汤组均是在第 3 天时间点开始降低, 第 7 天达到最低值, 表明通窍活血汤和补阳还五汤第 3 天开始对 sTBI 急性期的恢复具有积极意义。结合各组大鼠各个时间点死亡情况观察, 各个组大鼠死亡均集中在前 4 天, 提示在急性 sTBI 前 4 天运用活血化瘀药会增加死亡的风险, 而用活血化瘀药来治疗 sTBI 急性期的最佳时间段可能在发生损伤第 4 天后, 并且以通窍活血汤和补阳还五汤效果最好。

参考文献

- [1] 张勇军, 顾海琳. 桃红四物汤加味治疗脑外伤后综合征的临床观察 [J]. 河北中医, 2009, 31(12): 1818-1820.
- [2] 杨驰. 观察血府逐瘀汤治疗急性轻中度颅脑损伤的临床疗效 [J]. 中国实用医药, 2018, 13(6): 103-104.
- [3] 贾建真, 万小雪, 符涛, 等. 通窍活血汤联合西医常规疗法治疗创伤性颅脑损伤后意识障碍 30 例 [J]. 现代中医药, 2018, 38(1): 22-23.
- [4] 丘雄杰, 马秀文. 补阳还五汤治疗颅脑外伤后遗症 40 例的疗效分析 [J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(9): 6-7.
- [5] 沈冲, 陈飞, 杨海霞. 脑外伤早期运用活血化瘀中药临床体会 [J]. 中国中医急症, 2006, 15(12): 1407-1408.
- [6] FEENY DM, BOYESON MG, LINN RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat [J]. Brain Res, 1981, 211(1): 67-77.
- [7] 张均田. 现代药理实验方法 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1241.
- [8] 徐淑云, 卞如镰, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1543-1545.
- [9] 孔雷, 韩天权, 于颖彦, 等. 胰酶、细胞因子、高渗液和感染对大鼠脑损伤的形态学研究 [J]. 胰腺病学, 2004, 4(2): 98-101.
- [10] 王学敏, 安聪, 黄宗轩, 等. 血府逐瘀汤对重型颅脑损伤大鼠脑细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax 的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2018, 35(2): 166-169.
- [11] 安聪, 王学敏, 黄宗轩, 等. 王清任活血化瘀方剂对重型颅脑损伤大鼠 IL-6、IL-10 的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(12): 2659-2661.
- [12] 劳荣巨, 冯凤芳, 李伟恩, 等. 520 例住院患者注射用脑蛋白水解物应用合理性分析 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(5): 684-686, 690.
- [13] 杨文进, 郭义君, 童武松, 等. 急性颅脑损伤后早期血清 Tau 蛋白的动态变化及临床意义 [J]. 中国临床神经外科杂志, 2017, 22(8): 536-538.
- [14] 郑国强. 血清 Tau 蛋白在创伤性颅脑损伤病情及预后评估中的价值 [J]. 广东医学, 2018, 39(8): 1193-1196.
- [15] 杜若桑, 苑鸿雯, 郑淑美, 等. 早期针刺对创伤性脑损伤大鼠血清 GFAP 和 S-100B 蛋白水平的影响 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(9): 1589-1592.
- [16] ZHANG H, ZHANG X, XU B. Analysis and determination of biological activity of short-chain peptides from porcine brain hydrolysate [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 37(2): 333-339.
- [17] ZHAO HONGYI, YU L, JING Z, et al. Troxerutin cerebroprotein hydrolysate injection ameliorates neurovascular injury induced by traumatic brain injury-via endothelial nitric oxide synthase pathway Regulation [J]. Int J Neurosci, 2018, 128(12): 1118-1127.

Application Risk of Different Prescriptions for Activating Blood Circulation and Resolving Blood Stasis in Rats with Acute Severe Craniocerebral Injury

WEI Chunzhu, PENG Lingling, HUANG Zongxuan, LIU Xinjie, PAN Yuzheng

(The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, 530021)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of different prescription for activating blood circulation and resolving blood stasis rats with severe traumatic brain injury (sTBI) in acute stages. **Methods** A total of 306 SD male rats were randomly divided into normal group, model group, brain protein hydrolysate group, *Taohong Siwu Decoction* (桃红四物汤) group, *Xuefu Zhuyu Decoction* (血府逐瘀汤) group, *Tongqiao Huoxue Decoction* (通窍活血汤) group and *Buyang Huanwu Decoction* (补阳还五汤) group. The sTBI rat model was prepared by the modified Feeney's free fall method except the normal group. After successful modeling, the brain protein hydrolysate group, the *Taohong Siwu Decoction* group, the *Xuefu Zhuyu Decoction* group, the *Tongqiao Huoxue Decoction* group and the *Buyang Huanwu Decoction* group were intragastrically given the corresponding drugs 1. 11 mg/200 g, 2. 04 g/200 g, 3. 12 g/200 g, 1. 92 g/200 g, 5. 74 g/200 g respectively. The normal group and the model group were given normal saline 3 ml/200 g, and each group was intragastrically administered once a day for 7 days. The mortality of rats was counted at any time after intragastric administration. The pathological scores of brain tissue were observed on the 1st, 3rd and 7th day, and the contents of serum microtubule-associated protein Tau and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were detected. **Results** During the experiment, there was no death in the normal group and the brain protein hydrolysate group. The deaths of the other groups were mainly during the first 4 days. Compared with the normal group, the death rate of the model group, the *Taohong Siwu Decoction* group and the *Xuefu Zhuyu Decoction* was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the death rate of the *Taohong Siwu Decoction* group and the *Xuefu Zhuyu Decoction* group were also significantly increased ($P < 0.01$). There was no significant difference between the *Tongqiao Huoxue Decoction* group and the *Buyang Huanwu Decoction* group ($P > 0.05$). Compared with the normal group, the brain histopathological scores and serum Tau and GFAP levels in the rats in all treated groups were significantly increased at 3 time points ($P < 0.05$). Compared with the model group at the same time point, the pathological scores of the rats in the *Xuefu Zhuyu Decoction* group, the *Tongqiao Huoxue Decoction* group and the *Buyang Huanwu Decoction* group increased on the first day, and the serum GFAP protein level of the *Taohong Siwu Decoction* group, the *Xuefu Zhuyu Decoction* group and the *Buyang Huanwu Decoction* group was increased ($P < 0.05$). On the 3rd day, in all groups except the *Taohong Siwu Decoction* group, the pathological scores were lower than those of the model group; The serum Tau and GFAP levels of the brain protein hydrolysate group, the *Tongqiao Huoxue Decoction* group and the *Buyang Huanwu Decoction* group decreased ($P < 0.05$). On the 7th day, the pathological scores, serum Tau and GFAP levels of all treated groups decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The use of *Taohong Siwu Decoction* and *Xuefu Zhuyu Decoction* in the acute phase of sTBI could aggravate the condition and increase the risk of death. The best time to treat the acute phase of sTBI with activating blood circulation and resolving blood stasis drugs may be after the 4th day of injury, and the effect of *Tongqiao Huoxue Decoction* and *Buyang Huanwu Decoction* is the best.

Keywords severe craniocerebral injury; promoting blood circulation and removing blood stasis; *Taohong Siwu Decoction* (桃红四物汤); *Xuefu Zhuyu Decoction* (血府逐瘀汤); *Tongqiao Huoxue Decoction* (通窍活血汤); *Buyang Huanwu Decoction* (补阳还五汤); risk of death

(收稿日期: 2018-12-04; 修回日期: 2019-04-10)

编辑: 邓 媛