

Orexin-A 对缺血性脑损伤昏迷大鼠促醒作用的研究

贾小兵 李露斯 叶建宁 张旭

【摘要】 目的 建立一种新的大鼠缺血性脑损伤昏迷模型,并观察 Orexin-A 对昏迷大鼠的促醒作用。方法 通过改良后的四血管阻塞法(4-VO+6号(直径0.60mm)针头“针控线栓法”)建立大鼠缺血性脑损伤昏迷模型。大鼠在昏迷后120min经侧脑室注射 Orexin-A 及其受体拮抗剂(SB-334867),观察各组大鼠昏迷时间和脑电、皮质神经元单位放电频率的变化。结果 改良后的4-VO能够明显延长大鼠的昏迷时间,达到6~8h且动物无死亡,与4-VO+4.5号(直径0.45mm)和7号(直径0.70mm)针头“针控线栓法”在昏迷时间上比较差异有统计学意义($F=344.43, P<0.01$)。高剂量 Orexin-A(4nmol/10 μ l)治疗组大鼠的昏迷时间明显缩短,脑电 δ 波比例减少,前额叶皮质神经元单位放电频率增强,与改良后的4-VO组比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而低剂量 Orexin-A(2nmol/10 μ l)治疗组变化不明显。结论 ①改良后的4-VO适合做大鼠缺血性脑损伤昏迷模型。②高剂量的 Orexin-A 对缺血性脑损伤昏迷大鼠有明显的促醒作用。

【关键词】 昏迷; 大鼠; 模型; Orexin-A; 促醒

Study on arousal effect of Orexin-A in rat in coma due to ischemic brain injury JIA Xiao-bing*, LI Lu-si, YE Jian-ning, ZHANG Xu. * Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: YE Jian-ning (Email: jningye@tom.com)

【Abstract】 Objective To reproduce an ischemic brain injury coma model and explore the arousal effect of Orexin-A. **Methods** An ischemic brain injury coma model was reproduced in rats by partial four-vessel occlusion (4-VO with a needle of 0.60 mm in diameter in the lumen to create stenosis of the internal carotid arteries). One hundred and twenty minutes after the onset of coma, Orexin-A or its antagonist (SB-334867) was given intraventricularly, and the time of coma and changes in electroencephalogram (EEG) were observed, and the unit discharge of neurons in the prefrontal cortex was recorded. **Results** Partial occlusion of four internal carotid arteries, reducing the lumens to 0.60 mm, could prolong the time of coma to 6-8 hours with the rats still alive. The duration of coma showed a significant difference compared with that in rats who underwent 0.45 mm or 0.70 mm stenosis of the internal carotid arteries ($F=344.43, P<0.01$). Intraventricular Orexin-A in a dose of 4 nmol/10 μ l could obviously decrease the duration of coma with a decrease in δ wave and increase in unit discharge rate of neurons in coma rats ($P<0.05$ or $P<0.01$), but no significant change was observed when the dose was 2 nmol/10 μ l. **Conclusion** ①Creating stenosis of all four internal carotid arteries is suitable to reproduce ischemic brain injury with coma in rats. ②Intracerebroventricular injection of Orexin-A (4 nmol) has a potent arousal effect on ischemic brain injury coma in rats.

【Key words】 coma; rat; model; Orexin-A; arousal

昏迷是临床上很多重大疾病和危重疾病常见和特征性表现,有较高的发生率和致死率,至今临床上对昏迷的逆转与治疗仍然缺乏有效的手段^[1]。昏迷机制仍有待进一步阐明,近年来研究表明,Orexin作为一种新型的兴奋性神经递质在觉醒的发生和维持过程中起着重要作用^[2]。本研究旨在摸索一种较理想的大鼠缺血性脑损伤昏迷模型,并观察 Orexin-

A 对缺血性脑损伤昏迷大鼠的促醒作用。

1 材料与与方法

1.1 实验动物及分组:健康成年雄性 SPF 级 SD 大鼠 130 只,体重 180~220 g,3~4 月龄(由本校实验动物中心提供)。按随机数字表法分组,其中 80 只大鼠用于筛选模型方法,分为 4 组($n=20$):A 组用传统的四血管阻塞法(4-VO)造成缺血 30 min;B 组在 4-VO 基础上+4.5 号(直径 0.45 mm)针头“针控线栓法”^[3];C 组在 4-VO 基础上+6 号(直径 0.60 mm)针头“针控线栓法”;D 组在 4-VO 基础上+7 号(直径 0.70 mm)针头“针控线栓法”。另 50 只大鼠按选择的模型方法进行实验,随机分为 4 组:昏迷模型对照组($n=11$);低剂量 Orexin-A 治疗组($n=13$);高剂量 Orexin-A 治疗组($n=13$);

基金项目:全军“十一五”医学科研基金资助项目(06MB237);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC 2006BB5091)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学第一附属西南医院神经内科(贾小兵,李露斯);第三军医大学第二附属新桥医院神经内科(叶建宁),麻醉科(张旭)

通讯作者:叶建宁,博士,Email:jningye@tom.com

作者简介:贾小兵(1974-),男(汉族),四川省人,硕士研究生,主治医师,Email:jxiaobing2005@sina.com。

Orexin-A 受体拮抗剂 (SB-334867, 英国 Tocris 公司) 干预组 ($n=13$)。每组 3 只用于检测前额叶皮质 (PFC) 神经元放电情况。

1.2 缺血性脑损伤昏迷大鼠模型制备:参照本室方法给大鼠均安放皮质层脑电 (ECoG)^[4], 记录电极。将脑电信号输入微机进行处理。用 40 mg/kg 戊巴比妥麻醉大鼠后, 颈后正中切口显露第一颈椎双侧翼孔, 插入微型双极电凝镊, 烧灼翼孔, 缝合伤口。24 h 后颈前正中切口, 暴露双侧颈总动脉, 游离后置 0-0 号丝线, 待动物清醒后用显微动脉夹夹闭双侧的颈总动脉使脑部供血完全阻断, 30~60 s 内大鼠昏迷, 放开固定, 脑电图 (EEG) 呈直线为 4-VO 模型成功。待完全缺血 30 min 后, A 组松开动脉夹, 其余组按“针控线栓法”在颈总动脉近心侧距颈内动脉 (ICA) 和颈外动脉 (ECA) 分叉约 1.5 cm 处放置注射用针头并用 0-0 号丝线扎紧, 拔出针头、松开动脉夹, 间断缝合皮肤后消毒伤口, 肌肉注射 (肌注) 青霉素 400 kU 预防感染, 观察各组大鼠昏迷时间。

1.3 模型评价方法

1.3.1 昏迷评价:采用传统的 6 级分法^[5]判定大鼠意识状态, 其中 V、VI 级被认为是昏迷状态。在四血管阻断缺血后, 大鼠若没有昏迷或发生震颤、翻转, 以及复灌时发生痉挛、癫痫, EEG 显示不是一直线, 则动物被淘汰^[6]。从 4 个模型组中找出昏迷时间最长、死亡率最低的一组作为后续实验组的模型。

1.3.2 数字减影血管造影 (DSA):参照周振华创建的不同颈动脉狭窄大鼠模型方法^[3], 用公式计算狭窄率 [狭窄率 = $(1 - S1/S2) \times 100\%$, 其中 S1、S2 分别代表狭窄部分和正常血管相同部位横断面积], 狭窄程度: 面积狭窄率 < 30% 为轻度狭窄, 30%~69% 为中度狭窄, 70%~99% 为重度狭窄, 100% 为闭塞。从 C 组中取 3 只大鼠测量颈动脉狭窄率, A、B、D 组颈动脉狭窄率取自前期实验结果。

1.4 Orexin-A 给药方式:在大鼠昏迷 120 min 后, 从侧脑室已埋好导管中以 0.8~1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 速度分别注入 2 nmol/10 μl 和 4 nmol/10 μl 的 Orexin-A [美国 Sigma 公司生产, 溶于人工脑脊液 (aCSF) 中] 及 SB-334867 10 $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$ ^[7]; 模型对照组采取同样方式注入等量 aCSF。

1.5 EEG 分析:用 EEG 记录昏迷大鼠全程脑电活动情况, 分析给药前和给药后 5 min EEG 中 δ 、 θ 、 α 及 β 波的比例, 以 δ 波所占比例作为意识状态的判别指标^[8], 即给药后 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。

1.6 PFC 神经元单位放电分析:参照文献^[9]方法安装记录电极, 额叶皮质自发电信号经微电极放大器输入 RM 6240 多道生理信号采集处理系统, 示波、监听并记录放电情况。

1.7 统计学处理:采用 SPSS 11.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析和 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 颈动脉造影狭窄率测量:C 组颈动脉狭窄率为 $(76.15 \pm 3.68)\%$, 为重度缺血; 与我们前期所测的 B 组 $(92.87 \pm 2.92)\%$ 和 D 组 $(66.19 \pm 5.37)\%$ 比较差异有统计学意义 ($F=390.83, P < 0.01$)。

2.2 模型组昏迷时间:A 组大鼠昏迷时间短 (1~2 h) 且不稳定, 能苏醒; B 组大鼠昏迷时间短 (2~3 h) 且不稳定, EEG 为直线, 动物常在 4 h 内死亡; C 组昏迷时间稳定在 6~8 h, 大鼠能成活; D 组昏迷时间短 (1~3 h) 且不稳定, 能苏醒。C 组跟其他组比较差异有统计学 ($F=344.43, P < 0.01$), 适合做缺血性脑损伤昏迷大鼠模型。

2.3 实验组大鼠缺血性昏迷及清醒后 EEG 变化情况 (图 1):在颈总动脉夹闭完全缺血后 EEG 几乎成一直线; C 组开始时仅有少量波形, 逐渐出现以 θ 波和 δ 波慢波为主要节律的脑电波型图, 随着意识状态进一步恢复, 动物清醒后可出现 α 波和 β 波快波为主要节律的脑电波型图, 注射 Orexin-A 及其受体拮抗剂后可出现慢波, 但与对照有差别, 12 h 后可恢复接近正常。

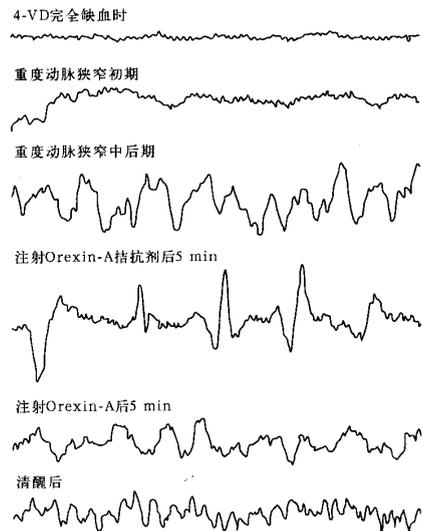


图 1 实验组大鼠缺血性昏迷及清醒后 EEG

2.4 Orexin-A对昏迷大鼠翻正反射消失时间、脑电、PFC神经元单位放电的影响(表1):与模型对照组比较,侧脑室注射Orexin-A后可缩短昏迷大鼠翻正反射消失的时间,给药后5min内脑电δ波比例减少,PFC神经元单位放电频率增加(P<0.05或P<0.01);而给SB-334867后的大鼠表现则相反,但这种作用可随时间的增加而减弱。

表1 Orexin-A对缺血性脑损伤昏迷大鼠的影响(̄x±s)

组别	昏迷时间(h)	脑电δ波比例(%)	放电频率(次/5 min)
模型对照组	6.79±1.06(11)	100.00±4.21(11)	7.33±2.31(3)
高剂量Orexin-A组	5.15±1.13(13) ^b	80.00±4.55(13) ^b	9.45±2.01(3) ^a
低剂量Orexin-A组	6.13±1.01(13) ^a	94.00±4.80(13) ^a	7.58±2.02(3)
SB-334867组	7.27±1.22(13) ^a	105.50±4.38(13) ^b	5.38±1.60(3) ^a

注:与对照组比较,^aP<0.05,^bP<0.01;括号内为动物数

3 讨论

昏迷是由于脑干上行网状激活系统或大脑皮质神经元广泛受损引起的严重意识障碍。临床上常见的重大疾病最终都有可能出现缺血、缺氧性脑损伤昏迷,现有的药物对改善患者的症状有一定疗效,但对其逆转尚缺乏特别有效的手段^[10],故对促醒药物的研究是近年来国内外研究的热点。

在缺血性昏迷基础研究中,由于研究方法对机体功能影响大,极易造成呼吸、循环系统衰竭,不容易建立持续、稳定和可靠的昏迷动物模型,很难形成理想的延长性昏迷。我们采用自建的“针控线拴法”制备大鼠模型,较好地解决了上述问题,Pulsinelli和Brierlev^[11]在1979年首次利用双侧椎动脉、双侧颈总动脉闭塞成功建立的大鼠全脑缺血/再灌注模型。由于全脑缺血对大鼠的脑组织损伤严重,而再灌注不仅没有使损伤的脑组织得以恢复,反而由于细胞内Ca²⁺超载、一氧化氮以及氧自由基等作用使损伤程度进一步加深^[12]。据文献报道,4-VO模型中完全缺血30min和45min再灌注后,72h内动物死亡率分别为15.0%和42.9%,因此为进行下一步的研究工作提高生存率^[13]。我们选用完全缺血30min作为标准,并在之后用6号针头“针控线拴法”造成重度颈动脉狭窄,使脑继续部分缺血,大鼠机体在短时间内受到多重打击出现昏迷。但随着机体的不断调整,仍可在一定时间内、一定程度上代偿恢复,而动物又不至于死亡,为我们进一步研究缺血性昏迷的促醒实验提供较好的动物模型。

在Orexin-A对缺血性昏迷大鼠促醒作用时发现,Orexin-A的促醒作用可能存在剂量-效应和时

间依赖关系,4nmol/10μl的Orexin-A可以使昏迷大鼠翻正反射消失的时间缩短、脑电δ波比例减少、PFC神经元单位放电频率增加;而用SB-334867后表现作用则相反。

Orexin活性肽是1998年在大鼠下丘脑外侧区域(LHA)发现,由Orexin能神经元分泌的具有重要作用的神经肽有Orexin-A、Orexin-B两个亚基,最初对Orexin生理功能的研究多集中在摄食行为和能量平衡方面^[14],但随后的神经解剖和分子生理学证据表明,含Orexin的纤维可投射到大脑中与睡眠和觉醒有关的区域,如大脑皮质、边缘系统、蓝斑、脑干和脊髓。近期研究表明,Orexin活性肽尤其是Orexin-A在生理状况下主要通过激活单胺能和胆碱能神经元对维持觉醒、减少睡眠进行调节^[15]。但在病理情况下,与各种意识障碍特别是昏迷的关系研究还不多,有文献报道在脑外伤患者脑脊液里发现Orexin-A的水平较正常人降低^[16];在一些昏迷患者的脑脊液中降低甚至检测不到Orexin-A^[17]。由于其在维持觉醒方面的特殊功能,我们推测其水平变化可能与昏迷发生相关。该实验以大鼠缺血性脑损伤昏迷模型也进一步证实了Orexin-A对其有一定的促醒作用,为昏迷的发生机制提出了新的认识以及为临床治疗提出了新的方向和途径。

参考文献

- [1] 陆兵勋,尹恕,周亮,等.纳洛酮治疗中枢神经系统疾病致昏迷临床疗效观察[J].中国危重病急救医学,2002,14(1):53.
- [2] Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness[J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(3): 171-181.
- [3] 周振华,陈康宁,黄河清,等.不同程度颈动脉狭窄大鼠模型建立及脑内单胺类递质变化的研究[J].中风与神经疾病杂志,2006,23(4):402-405.
- [4] 樊双义,谌小维,樊宏孝,等.长时连续作业对大鼠觉醒能力的损害作用[J].第三军医大学学报,2005,27(21):2151-2153.
- [5] Anon. Medical aspects of the persistent vegetative state(1): the multi-society task force on PVS[J]. N Engl J Med, 1994, 330(21):1499-1508.
- [6] 李建生,李建国,赵君政,等.川芎嗪和参麦注射液对老龄大鼠脑缺血/再灌注多器官损伤的作用[J].中国中西医结合急救杂志,2000,7(5):289-294.
- [7] Smart D, Sabido-David C, Brough S J, et al. SB-334867-A: the first selective orexin-1 receptor antagonist[J]. Br J Pharmacol, 2001, 132(6): 1179-1182.
- [8] Vyazovskiy V V, Kopp C, Bösch G, et al. The GABAA receptor agonist THIP alters the EEG in waking and sleep of mice[J]. Neuropharmacology, 2005, 48(5): 617-626.
- [9] 陈伯成,赵红梅,谌小维,等.纳洛酮对麻醉大鼠前额叶皮层神经元单位放电的影响及其机制研究[J].第三军医大学学报,2005,27(23):2324-2327.
- [10] 杨继维,杨娥.醒脑静注射液在急诊昏迷患者中的作用[J].

中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(1): 40.

[11] Pulsinelli W A, Brierlev J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 10(3): 267-272.

[12] 毛德军, 唐咏春, 李菲, 等. 亚低温对大鼠脑缺血/再灌注后神经胶质细胞分泌神经生长因子的影响[J]. 中国危重病急救医学杂志, 2005, 17(3): 187.

[13] Toda S, Ikeda Y, Teramoto A, et al. Highly reproducible rat model of reversible forebrain ischemia; modified four-vessel occlusion model and its metabolic feature[J]. Acta Neurochir (Wien), 2002, 144(12): 1297-1304.

[14] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior[J]. Cell, 1998, 92(4): 573-585.

[15] Ohno K, Sakurai T. Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness [N]. Neuroendocrinol, 2007; 8-29(1).

[16] Rejdak K, Petzold A, Lin L, et al. Decreased CSF hypocretin-1 (orexin-A) after acute haemorrhagic brain injury[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005, 76(4): 597-598.

[17] Castillo P R, Mignot E, Woodruff B K, et al. Undetectable CSF hypocretin-1 in "hashimoto's encephalopathy" associated with coma[J]. Neurology, 2004, 62(10): 1909.

(收稿日期: 2008-01-23 修回日期: 2008-06-01)
(本文编辑: 李银平)

• 病例报告 •

脑梗死误诊 1 例

戴文森

【关键词】 脑梗死; 诊断; 误诊

介绍我院收治 1 例脑梗死患者, 现就其治疗体会报告如下。

1 临床资料

患者男性, 29 岁, 因“胸痛伴咳嗽、咯痰、咳血 15 d”入院。入院前 15 d 无明显诱因出现左侧第 4、5 肋间区刺痛感, 伴刺激性干咳, 咯少量鲜红色血丝痰, 卧位及深吸气时疼痛明显, 坐位可缓解, 院外按肺炎治疗 1 周后胸痛症状有所缓解。入院前 2 d 上述症状加重, 痰中带暗红色血块, 伴活动后胸闷、气喘。入院查体: 体温 36.4℃, 脉搏 82 次/min, 呼吸频率 18 次/min, 血压 120/70 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa)。胸廓无畸形, 胸骨无压痛, 双侧语颤无增强或减弱, 未触及胸膜摩擦感或皮下捻发感, 双肺叩诊呈清音, 呼吸音清晰、规整, 未闻及明显干湿性啰音, 左侧腋中线区可闻及轻度胸膜摩擦音。实验室检查: 白细胞 (WBC) 计数 $12.65 \times 10^9/L$, 血小板 (PLT) 计数 $303.0 \times 10^9/L$, 活化部分凝血活酶时间 (APTT) 30.90 s, 凝血酶原时间 (PT) 12.10 s, 凝血酶原时间-国际标准化比值 (PT-INR) 1.02, D-二聚体 1.6 mg/L。胸部 CT 平扫: ①肺内多发软

组织密度类肿块影, 建议 CT 增强; ②双侧胸膜增厚伴右侧胸腔少量包裹性积液。考虑肺部占位性质待定而行 CT 定位下经皮肺活检术, 病理回报: 肺组织一条, 大部分区域呈梗死, 出血状, 梗死肺泡轮廓尚在, 肺泡腔内有较多巨噬细胞和泡沫状物质, 肺泡壁毛细血管内有些空泡; 梗死周围的肺组织炎性肉芽增生, 肺泡上皮增生。免疫组化检查显示: 卡氏肺孢子虫染色阴性。PAM-Masson 染色: 未见病原体, 但小动脉血管内可见纤维素血栓形成。考虑肺梗死。再行双下肢和颈部血管彩超: 左侧股总静脉、股浅静脉血栓形成伴不完全阻塞, 右下肢深静脉血流缓慢, 其他血管血流通畅。肺动脉 MSCTA 检查: 两肺动脉改变, 符合肺栓塞表现。明确诊断后给予抗凝治疗, 病情稳定后出院门诊随访, 至今病情仍良好。

2 讨论

肺梗死是肺动脉发生栓塞后其支配区的肺组织因血流受阻或中断而发生的坏死, 为心肺血管疾病中常见的急症之一。栓子主要来自静脉系统或者右心, 临床上多为血栓, 尤其是深静脉血栓, 少见为癌栓、脂肪栓、羊水栓、空气栓及肺动脉的原位血栓等。临床症状为突发胸闷、气短、呼吸困难、胸痛、低热、咯血等, 影像学检查中 X 线及 CT 表现为肺内斑片状阴影、锥形实变, 可局限于一个肺段、肺叶, 也可多叶分布, 阴影特点为近胸膜侧密实, 肺门侧逐渐变淡以至正常。发病

年龄多在 50 岁以上。由于栓子的性质及栓塞的部位不同, 临床表现极不一致, 误诊率极高, 最容易误诊的疾病有: 冠心病、原发性肺动脉高压、肺部感染、心肌炎、先天性心脏病、心包炎、结核性胸膜炎、支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病^[1]。

该例患者仅 29 岁, 虽有胸痛和咯血, 胸部 CT 平扫提示肺内多发软组织密度类肿块影, 双侧胸膜增厚伴右侧胸腔少量包裹性积液。不管从临床表现还是影像学表现, 该患者都没有证据可以说明是肺梗死。最终诊断是通过经皮肺穿刺病理检查而证实的, 可以说是非常意外和危险的。究其原因主要有: ①临床医生对肺栓塞的认识不足; ②患者年轻, 且症状不典型; ③医生满足于常见病的诊断和苛求确诊依据。经皮肺穿刺活检术是一项简便、创伤性小的诊断技术, 对组织损伤小, 具有其他方法无可比拟的优越性^[2], 但通过其诊断肺梗死, 文献尚未有过报道。

参考文献

[1] 张运剑, 陆慰萱. 慢性血栓栓塞性肺动脉高压的现状与进展[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(8): 506-509.

[2] 段蕴铀, 韩志海, 张燕群. 经皮穿刺技术在肺部疾病诊治中的应用[J]. 海军总医院学报, 2007, 20(1): 28-31.

(收稿日期: 2008-04-07 修回日期: 2008-05-20)
(本文编辑: 李银平)

作者单位: 351100 福建省莆田学院附属医院呼吸内科

作者简介: 戴文森 (1973-), 男 (汉族), 福建省人, 副主任医师, 从事呼吸与危重病的研究。