麝香酮对脑损伤大鼠脑保护作用的研究

姜　涛　黄李法　周水晶　崔建军　叶　强

摘要　**目的**　观察麝香酮鼻腔给药对创伤性脑损伤模型大鼠脑保护作用影响。**方法**　SD 大鼠按随机数字法分为假手术组、模型组和治疗组，每组各 50 只，通过控制性皮层撞击制备创伤性脑损伤模型，假手术组只进行手术及麻醉程序，无冲击损伤过程。治疗组采用大鼠在体鼻腔循环灌流法将麝香酮（1.8 mg/kg）从鼻腔给药，30 min/次，2 次/日，共 7 日。检测各组动物干预前（T1）、干预第 3 日（T2）、干预第 5 日（T3）、干预后（T4）脑组织含水量，干预结束后采用免疫组织化学方法分析检测脑源性神经营养因子（brain derived neurotrophic factor，BDNF）和神经生长因子（nerve growth factor，NGF）表达。**结果**　与假手术组比较，模型组 T1 -4 脑含水量升高（$P<0.05$），NGF、BDNF 表达降低（$P<0.01$）。与模型组比较，治疗组 T1 -3 脑含水量降低（$P<0.05$），NGF、BDNF 表达升高（$P<0.01$）。**结论**　创伤性脑损伤后鼻腔给予麝香酮可降低脑含水量，减轻脑水肿，促进嗅鞘细胞分泌 BDNF 和 NGF。

关键词　麝香酮；创伤性脑损伤；神经营养因子；神经生长因子；鼻腔给药；嗅鞘细胞

Brain Protection of Muscone in Rats with Brain Injury　JIANG Tao, HUANG Li-fa, ZHOU Shui-jing, CUI Jian-jun, and YE Qiang　*Department of Neurosurgery, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (310018)*

ABSTRACT　Objective　To observe cerebral protective effect of muscone (nasal administration) on traumatic brain injury model rats. Methods　SD rats were divided into the sham-operation group, the model group, and the treatment groups according to random digit table, 50 in each group. Traumatic brain injury model was established by controlled cortical strike. Rats in the sham-operation group received surgery and anesthesia procedures only, with no strike. Muscone (1.8 mg/kg) was delivered to rats in the treatment group using in situ nasal perfusion, 30 min each time, twice daily for 7 successive days. Water content of brain tissue was detected in each group before intervention (T1), at day 3 of intervention (T2), day 5 of intervention (T3), and after intervention (T4), respectively. Expression levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) were detected using immunohistochemical analysis. Results　Compared with the sham-operated group, water content of brain tissue increased ($P<0.05$), and expression levels of NGF and BDNF decreased in the model group at T1, T2, T3, and T4 ($P<0.01$). Compared with the model group, water content of brain tissue decreased ($P<0.05$), and expression levels of NGF and BDNF increased ($P<0.01$) in the treatment group at T1, T2, and T3. Conclusion　Nasal administration of muscone could reduce water content of brain tissue, alleviate cerebral edema, promote secretion of BDNF and NGF by olfactory ensheathing cells in traumatic brain injury rats.

KEYWORDS　muscone; traumatic brain injury; neurotrophic factor; nerve growth factor; nasal drug delivery; olfactory ensheathing cell

芳香开窍类中药麝香对多种不同类型的脑损伤具有保护作用，可减轻脑神经元损伤，脑功能恢复加快，是开窍醒神的主要原因[1]，麝香酮是麝香主要有效成分，具有保护缺血神经元和促进神经功能恢复作用[2]，而源于鼻黏膜的嗅鞘细胞（olfactory ensheathing cells，OECs）及其分泌多种神经营养因子（neurotrophic factor，NTF）在中枢神经损伤后对受损的神经元有保护作用和促进轴突再生的能力[3,4]，本研究通过鼻腔给药使麝香酮在鼻腔内对 OECs 直接接

基金项目：浙江省中医药科技计划项目（No. 2010ZA030）
作者单位：浙江省中医院神经外科（杭州 310018）
通讯作者：姜　涛，Tel：0571 -86919377，E-mail：jtao516@126.com
DOI：10.7661/CJIM.2016.06.0724

触,检测麝香酮对 OECs 分泌的 NTF 的影响及脑组织含水量变化,探寻麝香酮对创伤性脑损伤脑保护的机制及治疗脑损伤的有效手段。

材料与方法

1 动物 健康 SD 雄性大鼠 150 只,鼠龄 3 ~4 月,体重 300 ~350 g,由浙江中医药大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(桂)2011 -0003。本实验在浙江中医药大学清洁级动物实验室完成。实验前动物在饲养环境中适应性饲养 3 日,饲养温度(22 ±2)℃,12 h 明暗循环,自由饮食和饮水,通风良好,术前 12 h 禁食不禁水。

2 药物 麝香酮,纯度为 99.3%,购自济南宏生堂制药有限公司,批号:20120609。用 1% 吐温 -80 生理盐水配制成浓度为 1 g/L 的麝香酮乳剂。

3 试剂及仪器 脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)和神经生长因子(nerve growth factor,NGF)免疫组化检测试剂盒(德国宝灵曼公司,批号:1673509);RM2025 切片机(德国 LEICA 公司);EG1140H 包埋机;Olympus BX50F-3 双目显微镜(日本奥林巴斯株式会社);计算机图像分析系统(GM-2000B 生物医学图像分析系统,北京航空航天大学生产)。电磁路脑损伤撞击器(型号 PCI3000 -1,武汉一鸿科技有限公司)。

4 颅脑创伤模型制备及分组 实验动物按随机数字法分为假手术组、模型组、治疗组,每组各 50 只。参照 Brody DL 等[5] 建立的定量脑皮质挫伤(controlled cortical impact injury, CCI)方法,采用 Benchmark TM 颅脑损伤撞击器制作创伤性脑损伤(traumatic brain injury,TBI)模型。操作如下:大鼠实验前禁食 12 h,不禁水,全部实验均为无菌操作。大鼠用 2% 戊巴比妥(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后,俯卧位置于立体定向头架,无菌条件下于中线切开头皮,剥离骨膜,暴露右顶骨。矢状缝中线旁开 2.5 mm,冠状缝与人字缝之间钻一骨孔,直径 6 mm,暴露硬脑膜。将电磁颅脑损伤撞击器的传动装置部分直接安装在脑立体定位仪上,通过使用脑立体定位仪的操纵臂将撞击头与鼠头矢状面呈 8°,与冠状面平行呈垂直固定于大鼠硬脑膜上,使撞击头末端与硬脑膜呈垂直接触。通过撞击器设置,采用 5 mm 直径撞击头,以 4 m/s 撞击速度,2 mm 打击深度,打击 120 ms 制备中度创伤性脑损伤。完成脑损伤制作后立即给予移除撞击器,并缝合头皮切口。待观察到大鼠自主呼吸恢复后放回饲养笼,进行损伤后观察。制模过程中 2 只因麻醉意外死亡,4 只因损伤硬脑膜而丢弃,共补充 6 只。假手术组只进行上述手术及麻醉程序,无冲击损伤过程。

5 干预方法 治疗组麝香酮鼻腔给药:采用脑损伤模型大鼠在体鼻腔循环灌流法[6]。大鼠腹腔注射乌拉坦(2 g/kg)麻醉,取仰卧位在颈部做切口,暴露食管和气管后,在气管切口并插入聚乙烯管以保证动物呼吸。然后另取一根聚乙烯管通过食管插至鼻腔后部,封闭鼻颚通道,以防止药液从鼻腔流入口腔。再用一根聚乙烯管与插入大鼠鼻腔后部的管子连接,管子的另一端与麝香酮接触。麝香酮剂量 1.8 mg/kg,相当于临床成人日用量的 2 倍,本实验将灌流液体积固定为 6 mL,循环液流速 2.5 mL/min。取 6 mL 药液置量筒中,37 ℃水浴恒温,将蠕动泵进液管插入量筒底部,启动蠕动泵,待大鼠鼻中药液滴出时开始计时,30 min/次,2 次/日,共 7 日。模型组和假手术组不予治疗。

6 检测指标及方法

6.1 脑组织含水量检测 各组干预前(T1)、干预第 3 日(T2)、干预第 5 日(T3)、干预后(T4)分别取 10 只大鼠,断头处死后,立即取出伤侧大鼠脑组织,110 ℃恒温箱烘烤 24 h 至恒重。用干湿质量法计算脑组织含水量。脑组织含水量(%) =(湿质量 - 干质量)/湿质量 ×100%。

6.2 BDNF、NGF 表达检测 干预结束后取材,各组分别提取大鼠损伤侧皮层脑组织,行免疫组化染色及 HE 染色。各组分别取 10 只大鼠,先注射 10% 水合氯醛腹腔麻醉,然后经升主动脉快速灌注肝素化 0.9% 氯化钠注射液 150 mL,继之 4% 多聚甲醛液 200 mL 快速灌注,再用 300 mL 在 2 h 内慢速灌注,取脑组织浸入 4 ℃的 4% 多聚甲醛内固定 48 h,修成 4 mm 厚的小块,经酒精脱水,石蜡包埋,作 5 μm 的冠状切片,分析 BDNF、NGF 表达。各实验组大鼠脑组织切片经纯二甲苯脱蜡 2 次,每次 6 min,梯度乙醇脱二甲苯各 2 min 后经自来水漂洗、PBS 漂洗各 3 次,每次 2 min,加 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶,室温下 10 min 作用,切片放入沸腾的柠檬酸修复液中,继续加热至溶液冒小气泡但不沸腾,并保持 10 min后停止加热,冷却至室温,先流水冲洗,再 PBS 液洗 2 次,擦干切片组织周围表面水分,划隔离圈加入 5%BSA 封闭液,室温下作用 20 min 后吸去血清,不洗直接滴加对应的第一抗体兔抗(NGF、BDNF)100 μL/片(浓度稀释 1∶100),取 1 张切片滴加 PBS 做阴性对照,37 ℃恒温箱内 1 h 再 PBS 冲洗,

3 min ×3次，滴加羊抗兔生物素化二抗 100 μL/片，37 ℃ 恒温箱内 20 min 后 PBS 冲洗，3 min ×3 次，滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素 100 μL /片，37 ℃ 恒温箱内 20 min 经 PBS 洗后滴加入 DAB 显色液 100 μL /片，显色 3 ~5 min。HE 浅复染，梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后分析结果。操作过程中注意组织保持在湿润状态，不可干燥且所加试剂要完全覆盖组织。免疫组化结果在病理科医生未知实验分组条件下对所有标本进行分析判断。每张切片在 10 ×20 倍光镜下随机观察每组大鼠同一部位切片，选择 4 ~5 个不重复视野进行观察，并通过全自动图像分析系统，测出每张切片内脑组织 NGF、BDNF 染色平均光密度和染色面积率。测定每个视野下阳性反应的平均光密度、阳性反应面积和所有细胞总面积，计算阳性面积率[阳性面积率(%) = 单位面积中阳性反应的总面积/单位面积中细胞的总面积 × 100%]。阳性物质在胞质内呈棕黄色细颗粒状，细胞核为浅蓝色。

7　统计学方法　采用 SPSS 17.0 软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多个样本均数间的比较采用单因素方差分析，两样本均数间的两两比较行 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1　各组一般状态比较　造模过程中大鼠采食及饮水量明显减少，活动减少，毛色欠光泽，治疗组干预期间状态较先前活动增多，毛色有光泽，采食及饮水量明显增加。

2　各组各时间点大鼠脑含水量比较(表 1)　与假手术组同期比较，模型组 T1 -4 脑含水量升高($P < 0.05$)。与模型组同期比较，治疗组 T1 -3 脑含水量降低($P < 0.05$)。

表 1　各组各时间点大鼠脑含水量比较　(%，$\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间点			
		T1	T2	T3	T4
假手术	10	78.8 ±1.0 *	78.5 ±1.0 *	78.7 ±1.0 *	78.6 ±1.0 *
模型	10	83.5 ±0.6	82.6 ±0.7	81.1 ±0.6	79.3 ±0.7
治疗	10	81.4 ±0.7 *	80.8 ±0.5 *	79.2 ±0.4 *	78.6 ±0.6

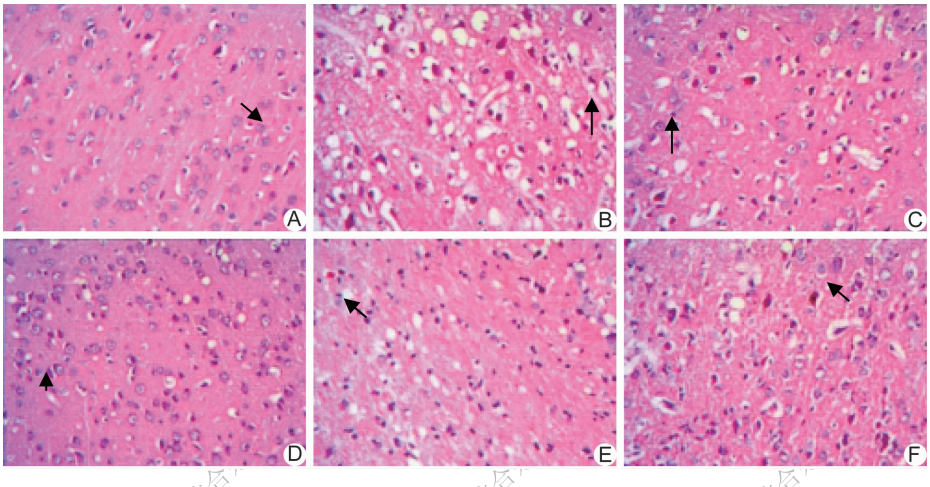
注：与模型组同期比较，*$P < 0.05$

3　各组 NGF、BDNF 表达比较(表 2，图 1)　与假手术组比较，模型组大鼠 NGF、BDNF 表达降低($P < 0.01$)。与模型组比较，治疗组 NGF、BDNF 表达升高($P < 0.01$)。

表 2　各组 NGF、BDNF 表达比较　($\bar{x} \pm s$)

分组	n	NGF		BDNF	
		平均光密度	阳性面积率(%)	平均光密度	阳性面积率(%)
假手术	10	0.854 ±0.032 *	0.443 ±0.023 *	0.752 ±0.031 *	0.454 ±0.024 *
模型	10	0.433 ±0.024	0.213 ±0.034	0.332 ±0.024	0.223 ±0.032
治疗	10	0.734 ±0.023 *	0.325 ±0.021 *	0.553 ±0.032 *	0.313 ±0.032 *

注：与模型组比较，*$P < 0.01$



注：A、D 为假手术组；B、E 为模型组；C、F 为治疗组；A-C 为 SABC 染色 NGF 蛋白表达；D-F 为 DAB 染色 BDNF 蛋白表达；阳性物质在胞质内呈棕色细颗粒状，细胞核为浅蓝色(箭头所指)

图 1　各组大鼠大脑皮质 NGF、BDNF 蛋白表达　(×200)

中国中西医结合杂志

讨　论

OECs 是一种特殊的神经胶质细胞,它起源于鼻黏膜,包裹嗅神经束进入嗅球,分布在嗅球第一、二层和嗅神经,并随嗅神经轴突进入脑内,包裹嗅神经使其与其他中枢神经系统细胞分隔开来。OECs 可诱导嗅神经长入中枢神经系统,嗅神经因此具有很强的再生能力,可不断更新,且再生的轴突可以穿过周围神经与中枢神经系统的交接区与嗅球建立突触联系,这样的过程每 1 ~2 个月重复循环 1 次,这一特殊的神经胶质细胞是中枢神经再生的外部条件,它们在中枢神经损伤后再生中发挥了重要作用[7,8]。

研究表明,OECs 对受损的神经元有保护作用和促进轴突再生的能力。这是因为 OECs 能分泌多种 NTF,其中以神经生长因子 NGF 和 BDNF 作用最为重要。神经损伤后导致神经元的死亡及神经营养因子缺乏,而 OECs 分泌多种 NTF 则能改善损伤周边的局部环境,如 NGF 等[9],减少神经元的坏死,促进轴突的再生,刺激血管的生长,调节免疫应答及轴突导向分子,为神经损伤修复提供基础[10]。

颅脑损伤后,NGF 在神经再生和神经保护机制中起重要作用。颅脑损伤后 NGF 可诱导轴突定向生长,促进神经元的有丝分裂与分化,修复和再生神经的血管形成,阻止神经元继发性损害,支持神经元存活,改善神经系统功能[11]。BDNF 属 NGF 家族,在大脑神经元及胶质细胞中均可合成,不仅具有神经元保护和促进神经细胞的分化和再生功能,还对大脑损伤后脑功能恢复起重要作用[12]。

麝香具有开窍醒神功效,用于闭窍神昏证,临床上常用于脑损伤的治疗,其药理作用与中枢神经系统的功能关系密切,在中医治疗急重症中应用广泛。天然麝香主要有效成分是麝香酮,麝香酮又称 3 - 甲基环十三烷酮,分子式 $C_{16}H_{30}O$[13],麝香酮灌胃后 5 min 即可透过血脑屏障进入中枢神经系统,经尾静脉注射 5 min 可进入中枢神经系统,广泛分布于大脑、小脑、脑桥。中、低剂量的麝香酮能减少氯胺酮麻醉后乳鼠海马神经元凋亡[14]。麝香酮既能天然获取,又能人工合成,因此,选用麝香酮在创伤性脑损伤方面的作用进行深一步的研究。

研究证明麝香酮可通过抑制谷氨酸激活 N-甲基-D-天冬氨酸受体,导致钙流入和氧化应激,对脑缺血施加有效的神经保护活动[15]。

以往研究表明由包含麝香在内的芳香开窍药组成的嗅吸剂可以直接通过鼻黏膜 - 脑脊液途径进入脑脊液,突破或绕过血脑屏障,将药物靶向脑部起到缓解颅脑损伤合并蛛网膜下腔出血时脑血管痉挛的效果并改善了患者的预后[16]。

基于上述理由,本研究尝试把麝香酮和 OECs 的功效相联结研究增加内源性 NTF 的表达对颅脑损伤时受损神经元保护作用,目的是寻找到简单方便高效的方法来治疗脑损伤,本研究通过实验制作鼠颅脑损伤模型,目前最有价值被国内外颅脑创伤研究中心最常采用的是控制性皮层撞击模型。它可以很好地模拟临床,复制出局灶性和弥漫性损伤包括硬膜下血肿、蛛网膜下腔出血、白质损伤等病变,它采用国际标准化脑皮质挫伤撞击仪进行大鼠控制性皮层撞击模型,具有与人类创伤性脑损伤相似的病理过程。通过在体鼻腔循环灌流法给予麝香酮,使麝香酮充分接触刺激 OECs,通过免疫组织化学方法观察不同时间点 BDNF 和 NGF 表达变化,结果显示脑损伤后应用麝香酮给药增强了 BDNF 和 NGF 的表达,表明麝香酮可促进 OECs 分泌多种 NTF,这对促进脑损伤后神经功能恢复起到一定作用。

脑水肿为脑外伤后严重的并发症之一,脑闭合性外伤早期在血脑屏障通透性增加的同时,脑含水量亦显著增加,实验证明麝香可降低脑含水量,减轻脑缺血后脑水肿,从而保护脑缺血后继发神经元的损伤[17]。所以本研究同时行脑组织含水量检测,来明确麝香酮脑保护效果,结果显示大鼠后脑创伤后通过鼻腔给予麝香酮脑组织含水量相比模型组有明显下降。

本次研究不足之处在于未设阳性对照药物组,未明确脑外伤后经鼻腔给予麝香酮是否优于其他给药途径。但以上研究结论提供了麝香酮在颅脑损伤中减轻脑神经元损伤、提供脑保护作用机制的一部分,为进一步探索麝香酮在颅脑创伤的治疗中潜在的开发应用价值提供了必要依据。麝香酮由鼻 - 脑传递系统将药物靶向脑部,在颅脑创伤疾病的治疗中提供脑保护的新途径,发挥传统中药最大功效,值得临床进一步研究应用。

参 考 文 献

[1] 沈映君主编. 中药药理学专论[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009:228 - 236.

[2] 沈强,刘亚敏. 麝香在神经系统疾病中的临床运用及其药理作用[J]. 中西医结合心脑血管疾病杂志, 2003, 1(4): 217 - 219.

[3] Pastrana E, Moreno-Flores MT, Avila J, et al. BDNF production by olfactory ensheathing cells

contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons[J]. Neurochem Int, 2007, 50(3): 491 -498.

[4] Runyan SA, Phelps PE. Mouse olfactory ensheathing glia enhance axon outgrow on a myelin substrate *in vitro* [J]. Exp Neurol, 2009, 216(1): 95 -104.

[5] Brody DL, Mac Donald C, Kessens CC, et al. Electromagnetic controlled cortical impact device for precise, graded experimental traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2007, 24(4): 657 -673.

[6] Hirai S, Yashiki T, Matsuzawa T, et al. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat[J]. Int J Pharm, 1982, 7: 317 -325.

[7] Kocsis JD, Lankford KL, Sasaki M, et al. Unique *in vivo* properties of olfactory ensheathing cells that may contribute to neural repair and protection following spinal cord injury[J]. Neurosci Lett, 2009, 456(3): 137 -142.

[8] Raisman G. Olfactory ensheathing cells and repair of brain and spinal cord injuries[J]. Cloning Stem Cells, 2004, 6(4): 364 -368.

[9] Wang YC, Xia QJ, Ba YC, et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes the recovery of neurological functions in rats with traumatic brain injury associated with down-regulation of bad [J]. Cytotherapy, 2014, 16 (7): 1000 -1010.

[10] Roet KC, Verhaagen J. Understanding the neural repair-promoting properties of olfactory ensheating cells [J]. Exp Neurol, 2014, 261:549 -609.

[11] 隋龙,宋锦宁. 神经生长因子对颅脑损伤的保护作用[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2009, 14(7): 325 -328.

[12] 王敏,邓世雄. 脑源性神经营养因子与外伤性脑损伤[J]. 创伤外科杂志, 2008, 10(2): 174 -176.

[13] 董万超,赵伟刚,刘春华. 麝香研究进展[J]. 特产研究, 2001, 23(2): 48 -58.

[14] 石永勇,李向宇,秦凯,等. 麝香酮对氯胺酮麻醉后乳鼠海马神经元凋亡的影响[J]. 广东医学, 2013, 34(11): 1645 -1645.

[15] Yu L, Wang N, Zhang Y, et al. Neuroprotective effect of muscone on glutamate-induced apoptosis in PC12 cells via antioxidant and Ca^{2+} antagonism[J]. Neurochem Int, 2014, 70(5): 10 -21.

[16] 姜涛,周杰,周水晶,等. 芳香开窍药嗅吸剂联合尼莫地平对创伤性蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的影响[J]. 中医杂志, 2015, 56(6): 492 -494.

[17] 吕丽莉,张作平,黄伟,等. 麝香酮对局灶性脑缺血大鼠模型的保护作用及对 BBB 转运功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(2): 31 -35.

(收稿:2015 -12 -07　修回:2016 -03 -15)

中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号,可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号"中国中西医结合杂志社"加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》、*Chinese Journal of Integrative Medicine* 的热点文章信息,同时可查看两本期刊的全文信息,欢迎广大读者订阅。

中国中西医结合杂志