

培元化瘀方对家兔慢性硬膜下血肿的实验研究

范小璇¹李陇平²赵晓平¹侯文¹李崇楠²胡靖²冯照群²陈杰²
(1. 陕西中医药大学附属医院神经外科, 陕西 咸阳 712000;
2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

【摘要】目的: 研究培元化瘀方对家兔慢性硬膜下血肿的干预作用及血肿外膜 VEGF 表达的影响。方法: 硬膜下少量多次注血改良法制备家兔慢性硬膜下血肿模型, 造模成功的家兔被随机分为模型组、培元化瘀方低剂量治疗组、培元化瘀方高剂量治疗组; 模型组给予生理盐水灌胃治疗 (每次 15ml, 2 次/日), 培元化瘀方低剂量治疗组给予培元化瘀方灌胃治疗 (3.1g/kg/次, 2 次/日), 培元化瘀方高剂量治疗组给予培元化瘀方灌胃治疗 (6.2g/kg/次, 2 次/日), 每组灌胃治疗 7 天。对各组家兔治疗前后行神经功能评估; 观察治疗后各组家兔硬膜下残余液体体积变化; HE 染色法观察血肿外膜病理形态学变化; 免疫组织化学染色法测定血肿外膜中 VEGF 表达水平。结果: 培元化瘀方低、高剂量治疗组神经功能改善明显, 与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$); 培元化瘀方低、高剂量治疗组的血肿吸收速度比模型组快($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且高剂量治疗组优于低剂量组($P < 0.05$); 培元化瘀方低、高剂量治疗组血肿外膜炎性反应较模型组轻而纤维组织增生相对成熟; 培元化瘀方低、高剂量治疗组血肿外膜 VEGF 表达较模型组降低($P < 0.05$, $P < 0.05$)。结论: 培元化瘀方促进家兔慢性硬膜下血肿的吸收; 培元化瘀方减轻血肿外膜炎性反应, 加快血肿局部纤维修复, 降低血肿外膜 VEGF 表达, 从而减少病理性血管形成是其治疗慢性硬膜下血肿的重要机制之一。

【关键词】慢性硬膜下血肿; 中医药; 培元化瘀方; 血管内皮生长因子

Experimental study of Peiyuanhuayu Decoction on Rabbit with Chronic Subdural Hematomas

FAN Xiao-xuan¹, LI Long-ping², ZHAO Xiao-ping¹, HOU Wen¹, LI Chong-nan²,
HU Jing², FENG Zhao-qun², CHEN Jie²

(1. Neurosurgery Dept of Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional

Chinese Medicine, Xiayang 712000, Shaanxi, China; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, Shaanxi, China)

【 Abstract 】 Objective : Research on the interventional effect of peiyuanhuayu decoction on rabbit with chronic subdural hematomas and outer membrane hematoma effects of VEGF expression. **Methods:** Subdural injection repeated small blood modified methods make rabbit model of chronic subdural hematoma, Successful model rabbits were randomly divided into model group, peiyuanhuayu decoction lower dose treatment group and peiyuanhuayu decoction high dose treatment group. Model group was given saline lavage treatment (15 ml /time, 2times/day); Peiyuanhuayu decoction lower dose treatment group was given peiyuanhuayu decoction lavage treatment (3.1 g/kg/times, 2 times/day); Peiyuanhuayu decoction high dose treatment group was given peiyuanhuayu decoction lavage treatment (6.2 g/kg/times, 2 times/day), Each group of lavage treatment for 7 days. For each rabbit neurological assessment before and after the treatment, Observed subdural residual liquid and measuring the volume. HE staining observation hematoma outer membrane pathomorphism changes; Immunohistochemical staining method to determine the level of VEGF expression in outer membrane hematoma. **Results :** Compared with model group, peiyuanhuayu decoction low and high dose treatment group neural function improved significantly ($P<0.05$); Peiyuanhuayu decoction low and high dose treatment group of hematoma absorption rate is faster than model group ($P<0.05$, $P<0.01$), and high dose treatment group is better than that of low dose group ($P<0.05$); Peiyuanhuayu decoction low and high dose treatment group hematoma outer membrane inflammatory reaction light and fibrous tissue hyperplasia is relatively mature than the model group; Peiyuanhuayu decoction low and high dose treatment group hematoma outer membrane VEGF expression was lower than the model group ($P<0.05$, $P<0.05$). **Conclusions :** Peiyuanhuayu decoction promote the absorption of rabbit chronic subdural hematoma; Peiyuanhuayu decoction reduce hematoma outer membrane inflammatory reaction, accelerate the local hematoma fiber repair, reduce hematoma outer membrane VEGF expression, thus reducing the pathological blood vessel formation its the important mechanism of the treatment of

chronic subdural hematoma.

【 Keywords 】 Chronic subdural hematoma; Traditional Chinese medicine; Peiyuanhuayu decoction; VEGF

慢性硬膜下血肿(Chronic subdural hematoma, CSDH)是神经外科常见疾病,CS 占颅内血肿的 10%, 占硬膜下血肿的 25%^[1], 尤其好发于老年人。目前手术治疗仍是 CSDH 的首选治疗方法, 但术后血肿的复发和临床症状不明显的患者不愿意接受手术成为治疗过程中倍感困惑的两大问题。中医药是现代医学治疗中的重要组成部分, 对解决这一问题具有明显的优势, 临床上培元化瘀方用于治疗 CSDH, 取得了良好的疗效。我们通过制备家兔 CSDH 动物模型, 探讨培元化瘀方对家兔 CSDH 的干预作用及其机理, 为培元化瘀方的临床应用提供更多的实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康新西兰成年家兔 30 只, 雌雄不限, 7-10 月龄, 体重(2.5±0.5kg), 第四军医大学实验动物中心提供(合格证号: SCXK-军 2012-0007)。

1.1.2 中药制备 培元化瘀方(组成: 黄芪 30g、当归 15g、生地 12g、熟地 12g、党参 6g、红花 12 g、桃仁 6g、地龙 6g、黄精 12g、鹿角胶 6g、甘草 6g)。按原方煎制成 1g/ml 的溶液, 由陕西中医药大学附属医院制剂中心制备。

1.1.3 主要试剂及仪器 0.9%生理盐水(北京新里程药业有限公司); 3%戊巴比妥(北京普博斯生物); 4%多聚甲醛(武汉博士德公司); 抗原修复液(中杉金桥); 鼠抗兔 VEGF 抗体(美国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔(精彩生物公司); DAB 试剂盒(中杉金桥); 中性树脂胶(中杉金桥); 磷酸盐缓冲液(PBS)(陕西博达生物科技有限公司); 苏木素-伊红染料(陕西博达生物科技有限公司); 石蜡标本脱水机(德国 LEICA 公司); 石蜡自动包埋机(德国 LEICA 公司); 恒冷切片机(德国 LEICA 公司); 恒温摊片烘片烤片机(上海精密科学仪器有限公司); 微量进样器(北京华仪三谱仪器有限公司); 牙科钻(广州安华医疗科技有限公司); 倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司); 16 排 CT(德国西门子公司); IPP6.0 病理图文采集及分析系统(美国 Media Cybernetics 公司)。

1.2 造模与分组

1.2.1 模型制备 对硬膜下少量多次注血法^[2]进行改进, 制备家兔慢性硬膜下血肿模型。具体操作: 3%戊巴比妥 (30 mg/kg)耳缘静脉麻醉家兔, 取俯卧位于兔台固定, 术区消毒铺巾, 纵行切开头皮暴露右侧颅骨。于顶部冠状缝后方、矢状缝外侧使用牙科钻磨开颅骨, 形成大小约 3mm×3mm 骨窗, 充分暴露硬脑膜, 于骨窗处硬膜上刺一小孔, 将软管 (麻醉用硬膜外导管) 一端置于硬膜下腔, 骨蜡封闭骨窗固定软管, 逐层缝合肌层再次固定软管。耳缘静脉抽取 0.5mL 自体血, 经由软管缓慢注入硬膜下腔。保持家兔头低位 10min, 以使血液凝固于硬膜下。之后分别于造模术后第 3、6、9、12、15 天重复注血操作, 均为 0.5 mL/次。注血过程中有些家兔会出现短暂的肢体抽搐或一过性呼吸暂停, 尽可能避免由于颅内压骤升后呼吸暂停而导致的动物死亡, 注血完成后, 待家兔生命体征平稳后放入笼中继续饲养。

1.2.2 分组及干预方法 造模术后 21 天行颅脑 CT 扫描, 观察硬膜下血肿形成情况。CT 成像筛选出造模成功的家兔, 按照随机数字表法将其随机分为生分为 3 组: 模型组、培元化痰方低剂量治疗组 (以下简称低剂量治疗组)、培元化痰方高剂量治疗组 (以下简称高剂量治疗组)。分组后模型组开始给予生理盐水灌胃治疗 (每次 15ml 2 次/日, 灌胃 7 天); 低剂量治疗组给予培元化痰方灌胃治疗 (3.1g/kg/次, 稀释至 15ml 2 次/日, 灌胃 7 天); 高剂量治疗组给予培元化痰方灌胃治疗, (6.2g/kg/次, 稀释至 15ml 2 次/日, 灌胃 7 天)。(根据“体表面积与剂量换算”理论计算家兔的日剂量, 以人的剂量换算所得剂量为动物低剂量、2 倍为高剂量)

1.3 观察指标 采用 Purdy 评分标准, 对各组家兔灌胃前及灌胃后第 1、3、5、7 天行神经功能评估; 灌胃后第 8 天, 麻醉各组家兔, 切开头皮暴露右侧颅骨, 持针器咬除部分骨瓣, 注意保持硬膜完整, 使用微量进样器吸取硬膜下残余液体, 比较各组体积差异; 剥离血肿外膜, 进行常规的甲醛固定、石蜡包埋及组织切片, HE 染色法观察血肿外膜病理形态学变化; 免疫组织化学染色法测定血肿外膜中 VEGF 表达水平。

1.4 统计学方法 计量资料以均数±标准差表示 ($\bar{x} \pm s$), 应用 SPSS16.0 统计软件分析检测结果, 组间差异比较采用单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模结果 本实验至末次注血结束时家兔存活 21 只, 其中 1 只死于麻醉过量, 3 只于造模后死亡, 5 只在造模术后陆续注血过程中死亡。死亡率为 30.0%。

2.2 神经功能评分 采用 Purdy 评分标准对各组家兔治疗前及治疗后第 1、3、5、7 天行神经功能评估。对家兔的意识、行为、转头、转圈及偏盲五个方面进行神经功能评分。总得分最低分为 2 分, 表示完全正常, 无神经功能缺陷; 总得分最高分为 11 分, 表示动物意识丧失或死亡。(见表 1)

表 1 治疗前后各组家兔神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后			
			第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
模型组	7	6.00±0.40	5.86±0.37	5.60±0.52	5.46±0.40	5.19±0.27
低剂量治疗组	7	6.15±0.64	5.82±0.28	5.30±0.58	4.71±0.34	3.88±0.23* ^{&}
高剂量治疗组	7	6.18±0.52	5.64±0.44	5.02±0.28	4.13±0.20	2.82±0.69* [△]

注: 与模型组比较* $P < 0.05$, # $P < 0.05$; 与治疗前比较

& $P < 0.05$, [△] $P < 0.05$; 与低剂量治疗组比较#[△] $P < 0.05$

2.3 硬膜下血肿液体积变化

各组家兔硬膜下血肿部位可吸出少量淡黄色血肿液, 其中高剂量治疗组有 1 只家兔硬膜下未吸出血肿液。(见表 2)

表 2 模型组与治疗组家兔硬膜下血肿液体积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血肿液 (μL)
模型组	7	56.95±4.83
低剂量治疗组	7	39.57±4.04*
高剂量治疗组	6	29.89±5.22***

注: 与模型组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与低剂量治疗组比较# $P < 0.05$

2.4 常规 HE 染色光镜观察

镜下可见血肿外膜出现大量新生毛细血管、成纤维细胞、炎性细胞。成纤维细胞活化明显, 提示纤维组织增生活跃并有不同程度的炎性反应。模型组与治疗组病理学变化表现相似, 但治疗组纤维组织趋于成熟, 炎性反应相对较轻。(见

图 1)

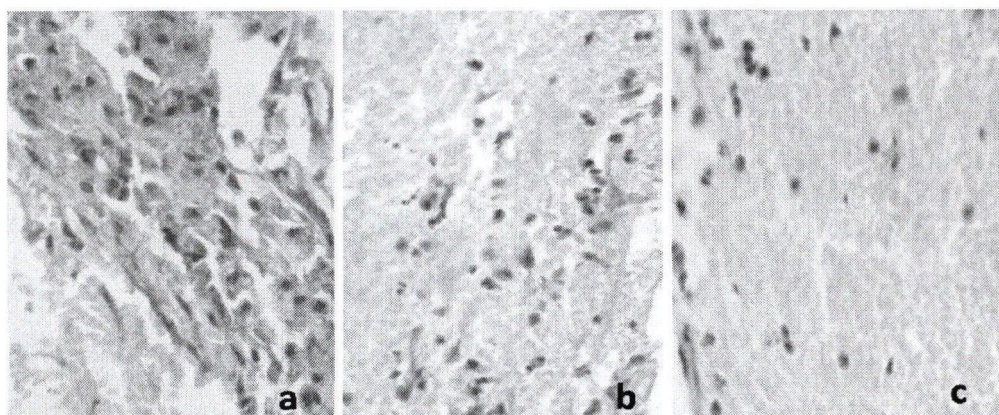


图 1 模型组与治疗组血肿外膜病理学变化 (HE×400)

注: a 为模型组、b 为低剂量治疗组、c 为高剂量治疗组

2.5 免疫组织化学结果

血肿外膜中 VEGF 阳性表达呈棕黄色, VEGF 的阳性表达可见于内皮细胞、纤维组织及浆细胞的表面。(见图 2、表 3)

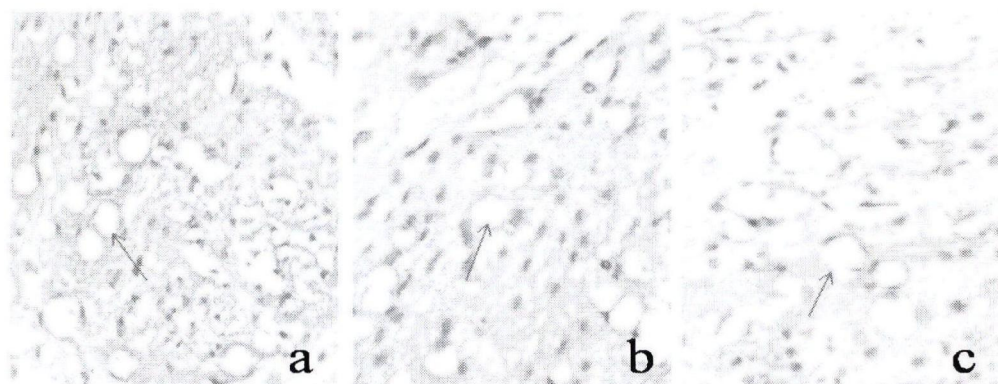


图 2 模型组与治疗组血肿外膜 VEGF 表达 (免疫组化×400)

注: a 为模型组、b 为低剂量治疗组、c 为高剂量治疗组, 箭头所示为阳性表达

表 3 免疫组化检测培元化痰方对各组家兔血肿外膜 VEGF 表达 (OD 值) 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF
模型组	7	0.132±0.011
低剂量治疗组	7	0.102±0.009*
高剂量治疗组	7	0.097±0.010*#

注: 与模型组比较*P<0.05; 与低剂量治疗组比较#P<0.05

3 讨论

目前 CSDH 的治疗仍以钻孔引流术为主, 然而尽管通过及时正规的手术治疗, 但由于其特定的高发人群和临床特点, 治疗效果并非十分理想, 术后依然有 2.3~33% 的复发率^[3]。随着分子生物学的发展及颅内硬脑膜和蛛网膜间细胞结构相关理论的提出, 局部炎症、纤溶亢进、血肿外膜新生血管形成及再出血等因素能很好的诠释 CSDH 的发病机制, 而 CSDH 发生和发展过程中的关键因素是血肿外膜新生血管形成及其反复再出血。新生血管形成需要多种生长因子参与调控, VEGF 为作用最强的促血管生成调控因子, 是新生血管形成必不可少的。在电镜下, CSDH 外膜贴近硬脑膜, 质地较厚, 含有丰富的纤维蛋白溶酶原和大量新生毛细血管。这种新生血管内皮细胞层薄弱, 基膜不成熟, 可反复地出血与生成, 从而刺激硬脑膜边界细胞不断增生, 使新膜持续形成, 进入一个恶性循环状态^[4]。研究证实在 CSDH 血肿腔及外膜中 VEGF 呈高表达状态^[5]。Osuka 等^[6]研究发现, VEGF 激活血肿外膜上的有丝分裂原活化蛋白激酶信号通路, 从而促进外膜血管生成。因此 CSDH 外膜新生血管形成及其反复再出血与 VEGF 的表达相关。

祖国医学认: “肾生髓, 脑为髓海”, “肾藏精, 精生髓”。脑为元神之府, 肾中精气足则髓盈, 上注于脑, 可统帅调节全身精神活动。《医林改错》中提出“年高无记性者, 脑髓渐空也”。《灵枢·贼风》曰: “有所坠堕, 恶血留内而不去。” CSDH 系颅脑损伤之后, 络伤血溢, 瘀血内停, 阻滞脑络, 该病又好发于老年人, 老年人肾中精气渐衰, 无以灌注, 致脑髓空虚则神无所归, 头伤日久, 耗气伤精, 气机失调致气血运行失常, 瘀阻于络, 脑失所养, 故头晕头痛; 气机逆乱; 元气亏虚, 无源化生行血, 不能布达四肢, 气血瘀滞, 血脉痹阻则肢体萎软偏废; 瘀阻日久则舌暗红或有瘀斑, 脉细涩。国医大师任继学^[7]教授认为髓由肾精所化, 脊髓上行于脑, 泌其津液润养脑髓。因此, 肾精的充足与脑髓之健旺密切相关。现代研究表明: “补肾”与“益脑髓”之间存有明显的生物学关系。研究揭示神经元的凋亡和神经干细胞的增殖分化与肾精的盛衰有关, 补肾中药能促进神经干细胞的更新, 补肾填精法可作为治疗中枢神经系统病变的重要原则^[8]。现代生物医学认为中医学中“脑髓”是以脑内神经元和神经营养因子为物质基础, 由于各种原因导致的神经元萎缩丢失以及神经营养因子减少即相当于中医学“髓海不

足”，根据病因病机当以中医“补肾填髓”法辨治^[9]。CSDH的病机关键是肾精亏虚、瘀阻脑络，为本虚标实证，病位在脑，与肾密切相关。年轻人由于肾精充足，髓海充盈，故术后较易恢复，且较少见术后复发。老年人多以肾精亏虚，脑髓空虚为本，气滞血瘀，经脉瘀阻为其表，但单行钻孔引流术，引流出血肿腔积血，难以治疗患者肾精亏虚，脑髓空虚之本，故受压塌陷的脑组织复张情况不良；单使用活血化瘀之品，行气活血化瘀，使瘀血消散，气血运行通畅，经脉得以疏通，但肾精亏虚之本不能得到补益，故术后较易出现血肿复发；单用补益之品，虽能使肾精亏虚之本得以补养，但气滞血瘀，经脉瘀阻之表未得到消散，故患者临床症状不能得到明显缓解。因此，CSDH的中医治疗应当补益与化瘀兼顾。培元化瘀方中黄芪味甘性微温，为补中益气要药，当归味甘性温，为补血活血要药，二药合用为君，具有气血双补、养血活血、改善血行之功，使补中有动，行中有补。生地、熟地、党参、桃仁、红花为臣，生地养阴生津，熟地补血养阴，填精益髓，生熟二地共用，肾阴阳共补；党参味甘性平，补中益气、补血生津，助补肾滋阴，益精填髓之功；红花桃仁为活血化瘀之要药，桃仁苦甘而平，苦以泄滞血，甘以生新血，红花味辛而温，破血行血、和血调血之药，二药相须配伍后祛瘀之力大增。地龙通经活络助化瘀通络之力；鹿角胶补肾益精血，黄精益气补气养阴，共助补肾生津、培元固本之效，共为佐药。甘草调和诸药为使。全方配共达培元固本、化瘀通络之效。

本实验结果显示，经治疗后培元化瘀方组家兔较模型组家兔神经功能明显改善，硬膜下残余血肿液量较少甚至有个别已完全吸收，与模型组相比治疗组血肿外膜炎性反应程度相对较轻，纤维组织增生相对成熟，从而说明血肿的吸收已进入了后期阶段，进一步说明培元化瘀方能加快血肿的吸收速度，促进神经功能恢复。我们通过实验发现，CSDH家兔血肿外膜中VEGF大量表达，培元化瘀方治疗组血肿外膜VEGF阳性表达量低于模型组，且高剂量治疗组低于低剂量治疗组VEGF阳性表达，这证实，CSDH的血肿外膜中，新生血管的增生与VEGF的高度表达密切相关，培元化瘀方能减少并抑制血肿外膜中VEGF表达，从而减轻外膜新生脆弱血管生成速度，减缓新生血管反复再出血。我们得出培元化瘀方降低血肿外膜VEGF表达减少病理性血管形成是其治疗CSDH的重要机制之一。

【参考文献】

- [1] 王忠诚. 王忠诚神经外科学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2015: 409-411.
- [2] 刘建辉, 邢海亭, 姜文国, 等. 兔慢性硬膜下血肿模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(9): 1682.
- [3] Lindvall P, Koskinen L O. Anticoagulants and antiplatelet agents and the risk of development and recurrence of chronic subdural haematomas[J]. J Clin Neurosci, 2009, 16(10): 1287-1290.
- [4] Shim YS, Park CO, Hyun DK, et al. What are the causative factors for a slow progressive enlargement of a chronic subdural hematoma? [J]. Yonsei Med J, 2007, 48(2): 210-217.
- [5] Katano H, Kamiya K, Mase M, et al. Tissue plasminogen activator in chronic subdural hematoma as a predictor of recurrence [J]. J Neurosurg, 2006, 104(1): 79-84.
- [6] Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, et al. Activation of Ras/MEK/ERK signaling in chronic subdural hematoma outer membranes [J]. Brain Res, 2012, 1489: 98-103.
- [7] 任继学. 脑髓述要[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(3): 161-163.
- [8] 陈薇, 付于, 毕海. 基于“肾生髓”理论浅述肾精与脑认知功能的关系[J]. 天津中医药大学学报, 2012, 31(1): 54-56.
- [9] 李林, 魏海峰, 张兰, 等. 中医“肾生髓, 脑为髓海”现代生物学基础探讨[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(17): 1397-1400, 1417.