

通咽喷雾剂对短暂性大脑中动脉栓塞模型大鼠 吞咽功能的干预效应



袁清洁¹, 冯学功¹, 刘建勋², 徐立², 郝文杰¹, 宋文婷², 姚明江², 王光蕊²

摘要:目的 观察通咽喷雾剂(TY Spray)对短暂性大脑中动脉栓塞(tMCAO)模型大鼠吞咽功能的影响。方法 将大鼠随机分为 Sham 组、tMCAO 组、tMCAO + TY Spray 组。tMCAO 组采用线栓法阻塞大鼠大脑中动脉,于 90 min 后再灌注,以建立 tMCAO 大鼠模型。tMCAO + TY Spray 组大鼠在造模后给予通咽喷雾剂口咽部喷雾用药,Sham 组、模型组给予等量生理盐水。观察大鼠一般营养状况并记录死亡数;于 7 d、14 d 时,记录大鼠体重及进食水量;于 14 d 时,观测大鼠吞咽潜伏期及吞咽次数。结果 tMCAO 组大鼠除表现为吞咽潜伏期延长和吞咽次数减少等吞咽直接指标的异常,还表现为毛发干枯少泽、活动度减低、体型瘦弱、精神状态不佳、死亡率高、体重下降和体重增量/体重比值下降、进食量减少、进水量减少和进水量/体重比值下降等吞咽间接指标的异常。tMCAO + TY Spray 组大鼠未见吞咽潜伏期延长和吞咽次数减少,而表现为吞咽次数明显增加,在进食量/体重比值方面虽与 tMCAO 组大鼠相比差异无统计学意义,但表现出一定的改善趋势,在 14 d 时的进水量/体重比值与 tMCAO 组大鼠相比明显增加。结论 通咽喷雾剂可有效改善 tMCAO 组大鼠的吞咽功能,在改善进食水方面亦显示出较好的改善趋势。

关键词:脑卒中;吞咽障碍;短暂性大脑中动脉栓塞;通咽喷雾剂;吞咽潜伏期;吞咽次数

中图分类号:R743 R289.5 文献标识码:A doi:10.12102/j.issn.1672-1349.2019.13.011

Influences of Tongyan Spray on Swallowing Function in Rats with Transient Middle Cerebral Artery Occlusion YUAN Qingjie, FENG Xuegong, LIU Jianxun, XU Li, HAO Wenjie, SONG Wenting, YAO Mingjiang, WANG Guangrui

Beijing Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing 100039, China

Abstract: Objective To investigate the effects of Tongyan Spray (TY Spray) on swallowing function of transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) rats. **Methods** Rats were randomly divided into Sham, tMCAO, tMCAO + TY Spray group. The middle cerebral artery of rats in the tMCAO group was blocked by introducing nylon threads, and then re-infused 90 minutes later to establish the rat model of tMCAO. TY Spray was given to rats in tMCAO + TY Spray group by oropharyngeal spray after modeling, Sham group and model group were replaced with the same amount of normal saline. General nutritional status of rats was observed and deaths were recorded. At 7 d and 14 d, the rats' body weight, food intake and water intake were measured. At 14 d, the onset latency and number of swallows were measured. **Results** Rats in tMCAO group manifested as not only the abnormal swallowing direct indicators containing prolonged onset latency and reduced numbers of swallow, but also manifested as the abnormal indirect indicators containing dry hair, reduced activity, body emaciated, poor mental state, high mortality, weight loss and decreased weight growth rate, reduced food intake, reduced water intake and decreased water intake per body weight. Rats in tMCAO + TY Spray group didn't show prolonged onset latency and reduced numbers of swallow, however manifested as significant increase in numbers of swallow. Although there was no statistical difference on the food intake per body weight when compared with rats in tMCAO group, a better improvement trend was shown in tMCAO + TY Spray group. At 14 d, water intake per body weight of rats in tMCAO + TY Spray group was significantly increased when compared with that in tMCAO group. **Conclusion** Tongyan spray can effectively improve the swallowing function of tMCAO rats, and has a good improvement trend in improving the food and water intake.

Keywords: post-stroke; dysphagia; transient middle cerebral artery occlusion; Tongyan spray; onset latency of swallow; numbers of swallow

脑卒中是神经源性口咽部吞咽障碍的常见原因^[1],脑卒中发生 72 h 内有一半以上的病人存在吞咽障碍,尽管很多急性脑卒中幸存者的吞咽障碍可短期内自发缓解,但仍有约 50% 的脑卒中后吞咽障碍病人吞咽功能恢复缓慢^[2]。脑卒中后吞咽障碍可使吸入性

肺炎等肺部并发症的发生风险增加 12 倍^[3],且与营养不良、脱水密切相关,严重影响病人和看护者的生活质量,增加了病死率,延长了住院时间。因此,尽早采取有效的治疗干预有望改善病人临床结局。目前,针灸、行为干预(包括吞咽训练和食物调整)、药物、神经肌肉电刺激、咽部电刺激、物理刺激、经颅直流电刺激、经颅磁刺激等吞咽疗法被用来治疗脑卒中后吞咽障碍。然而,除针灸、行为干预疗法可减少吞咽障碍和咽部电刺激可减少咽部传送时间外,其他吞咽疗法的有效性仍不确定^[4]。另外一项 Meta 分析研究显示,针灸治疗脑卒中后吞咽障碍的短期疗效和安全性肯定,但远期疗

基金项目 国家自然科学基金项目(No.81273705)

作者单位 1.北京市中西医结合医院(北京 100039);2.中国中医科学院西苑医院基础医学研究所,中药药理北京市重点实验室

通讯作者 冯学功, E-mail:bjcwhfxg@sina.com

引用信息 袁清洁,冯学功,刘建勋,等.通咽喷雾剂对短暂性大脑中动脉栓塞模型大鼠吞咽功能的干预效应[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(13):1965-1969.

效尚无可靠的循证医学证据支持^[5],而且针灸、吞咽训练等的实际疗效还与操作者专业技能水平^[6]、病人的认知水平及依从性等有关,故对于初涉临床的医师或看护人员来说更是难以实施。

通咽喷雾剂(Tong-Yan Spray, TY Spray)是由生姜、威灵仙、肉桂三味中药组成的复方喷雾制剂,已获国家发明专利(专利号 ZL 2011 1 0035741.X)。在前期随机对照临床试验研究中发现其治疗脑卒中后吞咽障碍的有效率高达 71.7%,且用药方便,可控性及稳定性好,安全性高^[7]。近年来,日本学者研究发现短暂性大脑中动脉栓塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)模型大鼠表现出吞咽潜伏期延长和吞咽次数减少的吞咽功能改变^[8-9],提示该模型可用于脑卒中后吞咽障碍的相关研究。因此,本研究即采用这一模型,从吞咽潜伏期、吞咽次数等吞咽直接指标和大鼠一般营养状态、存活状况、体重、进食水量等吞咽间接指标方面,研究通咽喷雾剂对 tMCAO 大鼠吞咽功能的干预效应,以期后续研究提供借鉴与思路。

1 材料与方 法

1.1 实验仪器、耗材、试剂 尼龙栓线(北京西浓科技有限公司 2432-50A1 型);微量注射泵(保定兰格恒流泵有限公司, LSP01-1A 型);高精度张力换能器(北京新航兴业科贸有限公司 JZ300 型);Powerlab 生理实验系统(PowerLab/8sp, ADInstruments 公司);软件 LabChart 7.37 (Chinese)(v7 for Windows, ADInstruments 公司);小动物麻醉机(美国 MIDMARK 公司, MatrXVIP3000 型);异氟烷(鲁南贝特制药有限公司,批号:64170901)。

1.2 通咽喷雾剂的组成 通咽喷雾剂以生姜、威灵仙、肉桂为原料制成。生姜辛散温通;化痰开窍;利咽;威灵仙通行十二经络,是古人治疗鱼骨梗喉的常用药;再配伍以肉桂活血利咽通窍药,共奏化痰祛瘀、利咽通窍之功。

1.3 实验动物 SD 大鼠,雄性,体重 200~220 g, SPF 级,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2016-0002。合格证号:11401500040369。

1.4 实验方法

1.4.1 通咽喷雾剂的制备 制备工艺:由中国中医科学院中药研究所中药制剂研究中心按既定工艺制作作为成品(规格:每瓶 25 mL,每毫升含生药 1 g)。先将生姜榨汁,备用;再将生姜渣与肉桂、威灵仙一起水蒸气蒸馏提取挥发油,备用;药渣加水煎煮,药液过滤、浓缩,乙醇沉淀取上清药液。精制药液加入生姜汁、挥发油,增溶、矫味、灌装,制得成品。

1.4.2 动物分组及给药 将 SD 大鼠分为 3 组:Sham 组(10 只)、tMCAO 组(30 只)、tMCAO+TY Spray 组(30 只)。于造模后 6 h 时,tMCAO+TY Spray 组大鼠给予通咽喷雾剂口咽部喷雾用药,Sham 组和 tMCAO 组给予等量生理盐水。每日 1 次,每次 1 喷,约 0.09 mL。

1.4.3 tMCAO 模型的建立 4%水合氯醛腹腔注射麻醉(1 mL/100 g)麻醉,以恒温电热毯将动物体温维持在 37℃,仰卧位固定大鼠,沿颈部中线作纵向切口约 1 cm,钝性分离右侧胸锁乳突肌和胸骨舌骨肌的肌间隙,暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),依次分离右侧 CCA、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA),结扎 ECA、CCA 近心端,并在 CCA 靠近 ICA、ECA 分叉处预留活结,动脉夹夹闭 ICA 远心端。于 ECA 与 ICA 分叉处作一“V”字形切口,插入尼龙线栓,松开 ICA 动脉夹,继续插入线栓至稍有阻力后略回撤,线栓插入深度 18~22 mm,尼龙线外留约 1 cm,于远心端预留活结处结扎 CCA,用于固定线栓。缝合颈部切口,留置于外的尼龙线栓尾端用油性笔涂黑。90 min 后将尼龙线栓轻轻提拉至略有阻力,表明线的头端已抽出颈内动脉,实现再灌注,剪去拨出部分的线栓,完成手术。Sham 组除不插入尼龙线栓外,其手术过程同模型组。

1.4.4 大鼠一般状态、死亡率观测 观察一般营养状况,包括毛发光泽度、精神、日常活动等情况,记录死亡大鼠情况。

1.4.5 神经功能评估 以 Longa 5 分制为评分标准^[10]:0 分,无神经损伤症状(提示无神经功能缺损);1 分,不能完全伸展左侧前爪(提示轻度局灶性神经功能缺损);2 分,向非缺血侧转圈(提示中度局灶性神经功能缺损);3 分,行走时向非缺血侧倾倒(提示严重局灶性神经功能缺损);4 分,不能自发行走,意识昏迷(提示意识水平低下)。

1.4.6 大鼠体重、进食量、进水量测定 于 7 d、14 d 时,记录大鼠体重及 24 h 的进食量和进水量。

1.4.7 吞咽功能评估 于 14 d 时,观测大鼠 50 s 内由蒸馏水引发的吞咽潜伏期及吞咽次数。1.5%~2.0%异氟烷维持麻醉下,大鼠仰卧位固定,颈部中线切口约 1 cm,暴露二腹肌前腹,高精度张力换能器一端连接二腹肌前腹,另一端与 Powerlab 生理实验系统相连。经大鼠口腔插入直径 0.5 mm 软管直达舌根部,使用微量注射泵以 3 μ L/s 的速度注入蒸馏水 50 s,停止 1 min 后,再次重复以上步骤 3 次,LabChart 软件记录大鼠 50 s 内的吞咽次数和从刺激开始至第 1 次吞咽发生的

时间即吞咽反应时间。计算 3 次测量的平均数,即得平均吞咽潜伏期和吞咽次数。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 20.0 统计软件处理。计量资料若符合正态分布,采用单因素方差分析 one-way ANOVA;若不符合正态分布或方差不齐,则采用非参数检验;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

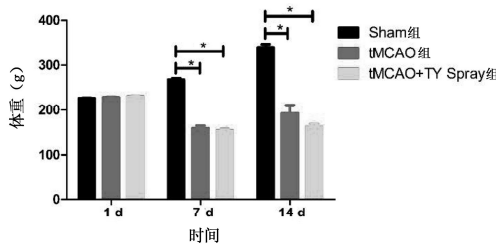
造模后 6 h 时,对各组大鼠进行神经功能评分,除去死亡大鼠及评分为 0 分、1 分、3 分、4 分的大鼠,纳入评分为 2 分的大鼠进入后续实验。

表 1 不同时间各组大鼠存活情况

组别	时间	死亡(只)	存活(只)	合计(只)	死亡率(%)
Sham 组	6 h	0	10	10	0.0
	24 h	0	10	10	0.0
	7 d	0	10	10	0.0
	14 d	0	10	10	0.0
tMCAO 组	6 h	0	26	26	0.0
	24 h	4	22	26	15.4
	7 d	9	17	26	34.6
	14 d	12	14	26	46.2 ¹⁾
tMCAO+TY Spray 组	6 h	0	20	20	0.0
	24 h	2	18	20	10.0
	7 d	5	15	20	25.0
	14 d	8	12	20	40.0 ¹⁾

与 Sham 组同时间比较,1) $P < 0.05$

2.3 大鼠体重变化情况 体重方面:各组大鼠基线体重组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);7 d、14 d 时,tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组体重均较 Sham 组明显减轻,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),tMCAO 组与 tMCAO+TY Spray 组大鼠体重比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见图 1。体重增量/体重比较方面:7 d 时,tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组体重增量/体重均较 Sham 组明显减小,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),tMCAO 组与 tMCAO+TY Spray 组大鼠体重增量/体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$);14 d 时,各组间大鼠体重增量/体重差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见图 2。

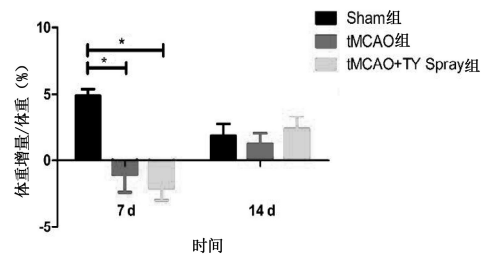


与 Sham 组比较, * $P < 0.01$

图 1 各组大鼠 1 d、7 d、14 d 的体重比较

2.1 大鼠一般状态 tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组大鼠普遍表现为毛发干枯少泽、活动度减低、体型瘦弱、精神状态不佳;tMCAO+TY Spray 组少部分大鼠表现出一般状态略好于 tMCAO 组的趋势。

2.2 不同时间各组大鼠存活情况比较 6 h、24 h、7 d 时,各组死亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);14 d 时,与 Sham 组相比,tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组死亡率增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组死亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 1。



与 Sham 组比较, * $P < 0.01$

图 2 各组大鼠 7 d、14 d 的体重增量/体重比较

2.4 大鼠进食量变化情况 进食量方面:7 d 时,tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组大鼠进食量均较 Sham 组明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组进食量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);14 d 时,tMCAO 组大鼠进食量较 Sham 组明显减少 ($P < 0.01$),tMCAO+TY Spray 组与 Sham 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见图 3。进食量/体重方面:7 d 时,各组间大鼠进食量/体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$);14 d 时,tMCAO 组大鼠进食量/体重与 Sham 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),tMCAO+TY Spray 组进食量/体重较 Sham 组增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

详见图 4。

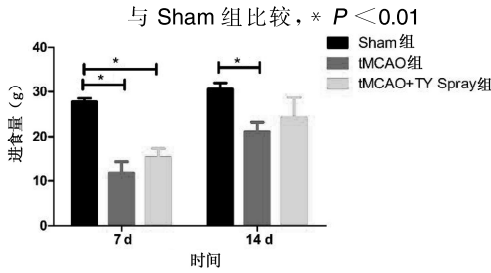


图 3 各组大鼠 7 d、14 d 进食量比较

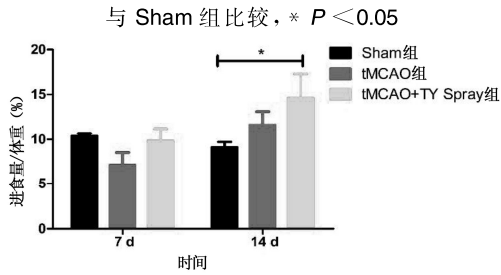


图 4 各组大鼠 7 d、14 d 进食量/体重比较

2.5 大鼠进水量变化情况 进水量方面:7 d、14 d 时,tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组大鼠进水量均较 Sham 组明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组进水量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 5。进水量/体重方面:7 d 时,tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组大鼠进水量/体重均较 Sham 组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),tMCAO 组、tMCAO+TY Spray 组两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);14 d 时,tMCAO 组大鼠进水量/体重较 Sham 组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),tMCAO+TY Spray 组与 Sham 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),与 tMCAO 组比较,tMCAO+TY Spray 组大鼠进水量/体重增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见图 6。

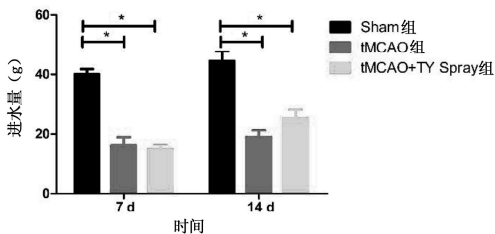


图 5 各组大鼠 7 d、14 d 进水量比较

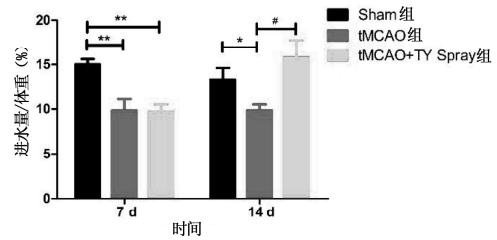


图 6 各组大鼠 7 d、14 d 进水量/体重比值比较

2.6 吞咽潜伏期、吞咽次数 14 d 时,与 Sham 组相比,tMCAO 组大鼠吞咽潜伏期延长,吞咽次数减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);tMCAO+TY Spray 组吞咽潜伏期与 Sham 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),吞咽次数较 Sham 组增加($P < 0.05$);tMCAO+TY Spray 组吞咽潜伏期与 tMCAO 组比差异无统计学意义($P > 0.05$),tMCAO+TY Spray 组吞咽次数较 tMCAO 组明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。详见表 2。

表 2 各组 14 d 时由蒸馏水引发的吞咽潜伏期和吞咽次数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	吞咽潜伏期 (s)	吞咽次数 (次)
Sham 组	10	4.8±0.8	17.8±1.9
tMCAO 组	14	10.5±1.5 ¹⁾	11.9±1.6 ¹⁾
tMCAO+TY Spray 组	12	7.4±1.0	23.5±1.6 ¹⁾²⁾

与 Sham 组比较,1) $P < 0.05$;与 tMCAO 组比,2) $P < 0.01$

3 讨论

线栓法制备大鼠 tMCAO 模型具有不开颅、对动物生理功能影响小、梗死效果确切、重复性好、能准确控制缺血及再灌注时间等优点。本研究中观察到 tMCAO 大鼠表现出吞咽潜伏期延长和吞咽次数减少,这与前述日本学者报道的 tMCAO 大鼠吞咽功能改变相一致,说明 tMCAO 大鼠模型应用于研究神经源性吞咽障碍具有较好的可行性。另外,本研究还发现 tMCAO 大鼠还存在毛发干枯少泽、活动度减低、体型瘦弱、精神状态不佳、死亡率高、体重下降和体重增量/体重比值下降、进食量减少、进水量减少和进水量/体重比值下降

等吞咽间接指标的异常,这也与脑卒中后吞咽障碍病人的临床表现相一致。通咽喷雾剂干预后,tMCAO + TY Spray 组大鼠未见吞咽潜伏期延长和吞咽次数减少,而表现为吞咽次数明显增加,在进食量/体重指标方面虽与 tMCAO 大鼠相比差异无统计学意义,但表现出较好的改善趋势,且在 14 d 时的进水量/体重与 tMCAO 组大鼠相比明显增加。

由上可知,通咽喷雾剂在改善 tMCAO 大鼠吞咽功能方面效果明确,可有效促进吞咽反射的恢复。另外,通咽喷雾剂在改善单位体重进食量与单位体重进水量方面也有一定作用,这与吞咽反射的恢复密切相关。本研究还发现,在单位体重进食量和吞咽频率指标方面,通咽喷雾剂干预组与 Sham 组相比明显增加,考虑可能存在以下两方面的原因:一是因吞咽频率的增加进而引起相应的单位体重进食量的增加,二是因为通咽喷雾剂内含有生姜、肉桂等药,可能促进了 tMCAO 大鼠的食欲,最终导致了单位体重的进食量增加。通咽喷雾剂起效的深层次机制仍需进一步研究验证。

本研究的优点在于严格限定了纳入研究的模型动物的神经功能评分水平,保证了研究结果的均一性及可靠性,局限性或不足是不能明确 tMCAO 大鼠模型中已排除的其他分值的大鼠的吞咽情况。具体来说,本研究中仅纳入了术后神经功能缺损评分为 2 分的大鼠,剔除了 1 分和 3 分及以上的大鼠。主要原因在于:评分为 1 分的大鼠体重增长速度接近 Sham 组或正常大鼠,如不剔除组内大鼠体重差异较大,结果的一致性不好,不容易得出较为可靠的实验结果,且本实验采用的是单侧大脑中动脉栓塞的方法造模,而非可以引起双侧皮质延髓束损伤的动物模型,评分为 1 分的大鼠可能表现不出明显的吞咽功能障碍。若以体重、进食水功能作为观测指标,考虑最好剔除评分为 1 分的大鼠。另外,本研究是基于文献报道的新型脑卒中后吞咽障碍的大鼠模型,该模型大鼠的吞咽功能障碍发生在术后 2 周时,1 周时尚未见到明显的吞咽功能障碍。然而,评分为 3 分及以上的大鼠由于其神经功能缺损较重、一般状况更差,往往于 1 周内死亡而导致实验数据的偏倚,故亦将其剔除。本研究仅基于以上见于文

献报道的模型制作周期和对该模型的观察把握,仅纳入了神经功能缺损评分为 2 分的模型大鼠的数据,而对评分为 1 分或 3 分及以上大鼠,则需要设计更为严谨科学的实验方案以进一步验证。毕竟,临床上此部分病人群体的吞咽功能障碍也是值得关注的,很有研究价值。

参考文献:

- [1] TAKIZAWA C,GEMMELL E,KENWORTHY J, et al .A systematic review of the prevalence of oropharyngeal dysphagia in stroke, Parkinson's disease,Alzheimer's disease,head injury,and pneumonia[J].Dysphagia,2016,31(3):434-441.
- [2] ICKENSTEIN G W,HOHLIG C,PROSIEGEL M, et al .Prediction of outcome in neurogenic oropharyngeal dysphagia within 72 hours of acute stroke[J].J Stroke Cerebrovasc Dis,2012,21(7):569-576.
- [3] WIRTH R,SMOLINER C,JAGER M, et al .Guideline clinical nutrition in patients with stroke[J].Exp Transl Stroke Med,2013,5(1): 14.
- [4] GEEGANAGE C,BEAVAN J,ELLENDER S, et al .Interventions for dysphagia and nutritional support in acute and subacute stroke [J].Cochrane Database Syst Rev,2012,10(10):CD000323.
- [5] LI L X,DENG K,QU Y.Acupuncture treatment for post-stroke dysphagia:an update meta-analysis of randomized controlled trials [J].Chin J Integr Med,2018,24(9):686-695.
- [6] YE Q,XIE Y,SHI J, et al .Systematic review on acupuncture for treatment of dysphagia after stroke[J].Evid Based Complement Alternat Med,2017,2017:1-18.
- [7] FENG X,HAO W,DING Z, et al .Clinical study on Tongyan spray (通咽喷雾剂) for post-stroke dysphagia patients:a randomized controlled trial[J].Chinese Journal of Integrative Medicine,2012, 18(5):345-349.
- [8] SUGIYAMA N,NISHIYAMA E,NISHIKAWA Y, et al .A novel animal model of dysphagia following stroke[J].Dysphagia,2014,29 (1):61-67.
- [9] KAJII Y,SHINGAI T,KITAGAWA J, et al .Sour taste stimulation facilitates reflex swallowing from the pharynx and larynx in the rat [J].Physiol Behav,2002,77(2/3):321-325.
- [10] LONGA E Z,WEINSTEIN P R,CARLSON S, et al .Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.

(收稿日期:2018-12-13)

(本文编辑 郭怀印)