

YINGXIANG DASHUJUEXING DE  
NAOSHENJINGTONGLU YANJIU

# 影响大鼠觉醒的 脑神经通路研究



谢丽娟 陈焕文◎著



知识产权出版社

全国百佳图书出版单位

YINGXIANG DASHUJUJUEXING DE  
NAOSHENJINGTONGLU YANJIU

# 影响大鼠觉醒的 脑神经通路研究



谢丽娟 陈焕文◎著



知识产权出版社  
全国百佳图书出版单位

## 内容提要

本书进行了基于神经通路的大鼠的三个昏迷实验研究,目的是较为确切地了解与大鼠昏迷相关的神经机制。这一研究结果的获得有利于人类对自身的了解,同时更有利于临床中相关疾病的治疗。

责任编辑:罗斯琦

## 图书在版编目(CIP)数据

影响大鼠觉醒的脑神经通路研究/谢丽娟,陈焕文著.  
—北京:知识产权出版社,2011.12  
ISBN 978-7-5130-1007-8

I. ①影… II. ①谢… ②陈… III. ①鼠科—脑神经—神经通路—研究  
IV. ①Q959.837.04

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第254151号

## 影响大鼠觉醒的脑神经通路研究

YINGXIANG DASHU JUEXING DE NAOSHENJING TONGLU YANJU

谢丽娟 陈焕文 著

---

出版发行:知识产权出版社

社 址:北京市海淀区马甸南村1号

网 址: <http://www.ipph.cn>

发行电话:010-82000860 转 8104/8102

责编电话:010-82000860 转 8240

印 刷:北京中献拓方科技发展有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

版 次:2012年7月第1版

字 数:80千字

ISBN 978-7-5130-1007-8/Q·014(3880)

邮 编:100088

邮 箱:bjb@cnipr.com

传 真:010-82005070/82000893

责编邮箱:luosiqi@cnipr.com

经 销:新华书店及相关销售网点

印 张:6.5

印 次:2012年7月第1次印刷

定 价:25.00元

---

出版权专有 侵权必究

如有印装质量问题,本社负责调换。

# 前 言

研究证实,各种原因所致脑神经系统损害的症状和体征,都需要以其意识和觉醒状态为基础来进行解释和评价<sup>[1,2]</sup>,很多重症脑神经系统疾病,都涉及意识状态的改变和严重的昏迷<sup>[3, 4, 5]</sup>,临床上常见的进入急症室的病人中约有3%是各种疾病引起的昏迷病人<sup>[6, 7]</sup>,在临床上脑损害所造成的昏迷一直被认为是病情危笃的表现<sup>[8, 9, 10]</sup>。因此,对于昏迷这种严重意识障碍神经机制的研究就显得尤为重要。

长期以来人们一直致力于脑损伤昏迷研究,期望了解脑损伤引起昏迷的神经机制<sup>[11, 12, 13]</sup>。但是到目前为止,这一工作的进展还不够理想<sup>[14]</sup>,还没有能够达到让人类可以清楚地认识哺乳类动物神经机制的目的,更不用说还可以推广到治疗人类疾病的程度上来。

当前国内外昏迷研究者将很多精力集中在动物脑损伤所致昏迷的实验研究上,采用的主要方法有:弥漫性轴索损伤方法、脑颅内压升高方法、脑干损伤方法、颅内水囊占位法、人为制造脑出血法<sup>[15, 16]</sup>以及线刀损伤法<sup>[17]</sup>等。

在弥漫性轴索损伤所致昏迷实验中,瞬时旋转造成的损伤最常见,主要因头部挥鞭样或加速性旋转运动形成的剪应力造成神经轴索损伤所致,在显微镜下见神经轴索断裂、轴浆溢出、轴浆运输受损甚至中断,觉醒相关递质的运输及释放受到影响,信号不能传递至皮

层。还有一次性打击负荷伤实验，液压冲击伤和落体撞击伤实验等，也可以造成动物弥漫性轴索损伤。几种实验所致的轴索损伤多呈局灶性、非弥漫性分布，神经轴索受损、神经元胞体变形的同时，也存在血管的损伤和组织的水肿，引起昏迷的因素中，除轴索损伤外，脑挫裂伤、脑实质出血及蛛网膜下腔出血等也起了一定的作用，致昏迷条件及参数难以准确界定，损伤常只造成动物的短期无意识，很难复制延长性昏迷状态，稳定性差，动物容易死亡。因此，我们认为，这几种实验研究并不理想，更多复制的是脑损伤或脑出血的体征，同时，这些实验存在引起昏迷位置不确定和导致昏迷神经机制不明的问题。

脑颅内压升高损伤所致昏迷实验中，提出的方法是猫硬膜外腔置放水囊，水囊注入盐水后造成持续、缓慢和渐进性的颅内压增高，一定时间后去除水囊，即可形成昏迷状态。该实验同样存在引起昏迷位置不确定和导致昏迷神经机制不明的问题。

脑干损伤昏迷实验中常用的方法有电解和线刀两种损伤方式。脑干（特别是中脑）损伤后会引昏迷，常见有常鹏飞等，以不同强度电流损毁中脑网状结构，可造成猫不同程度的意识障碍。该实验并没有确切地给出昏迷的神经机理。

除了上述几类常见的昏迷实验外，还有颅内水囊占位、脑出血昏迷实验，附有水囊的导管置入动物硬膜外或硬膜下腔，注入液体，使硬膜外、下腔体积扩大，形成脑疝直至深度昏迷，大脑及脑干反应消失，脑电图呈直线，瞳孔扩大和角膜反射消失可明确为深昏迷状态。脑出血方法分诱导性和外伤性出血两种，诱导性脑出血是将自体尾静脉血、股动脉血或胶原酶注入脑内一定部位诱导血肿形成，使动物发生严重昏迷。

另外，还有研究使用了包括去大脑僵直实验和中脑损伤昏迷实验，方法是利用不同的手术器械，通过满意的暴露、定位后，横断中

脑。从而损伤中脑网状结构造成持续昏迷，该实验无法确定动物昏迷的原因是由于网状结构损伤还是由于轴索被切断所引起的。另外，常鹏飞等<sup>[53]</sup>还以猫中脑网状结构注入鹅膏蕈氨酸后也致损伤昏迷。

上述这些实验虽说部分成功的模仿了某些昏迷特征，但是大部分实验不能指出昏迷所引起的较明确的损伤位置，或者是同时引起的损伤位置较多，虽有研究确定了中脑网状结构和昏迷之间有确定的关系，但却不能指出引起昏迷的神经机制是单纯的网状结构在起作用还是因为切断了过路轴索阻止了信息上传。在以往的意识与昏迷研究中，基于神经通路的基础上进行逐级实验研究方法进行的研究尚未见报道。

是否中脑以上其他部位还具有导致昏迷的作用位点？那些位点又是哪里？是否存在与哺乳动物意识、昏迷直接相关的神经通路？以往的研究及相关经验告诉我们，昏迷的发生有着多种的可能性，既有可能是发生于大脑的弥漫性损伤，也有可能发生在大脑内信息传递的某个开关性通路的不畅通或高度抑制上。那么，在大脑内信息传递的那个开关性通路不畅或是被高度抑制时，有可能导致哺乳动物意识丧失？那些起主要作用的通路是我们长期以来所一直关注的问题。几年来我们查阅了国内外的相关资料，也同时作了一些相关的研究<sup>[18, 19, 20, 21, 22, 23]</sup>。曾有临床研究资料显示，当脑干的下1/3段或延髓以下部位受到损伤时，并不会使动物产生严重的昏迷；人的脑干中部肿瘤，往往会引起无眠状态等<sup>[21, 25, 26]</sup>。

我们实验室曾用海人酸毁损中脑网状结构，则大鼠出现了数小时的谵妄状态，之后，大鼠的意识状态会得到基本恢复；我们又用线刀毁损法毁损中脑被盖则引起了大鼠意识的完全丧失，出现长时稳定的昏迷状态。那么继续上行的神经通路中还可能有哪一条与大鼠的意识状态是密切相关的呢？

我们知道,中脑腹侧被盖(VTA)是以网状结构为主,从脑干网状结构开始,直至丘脑并进入皮层广泛处,这是一个经典的并且公认的与觉醒有关的传导方式,同时是否还存在着其它的直接而且确切的通路也可能与觉醒相关?这是我们长期以来一直关注的问题。

我们翻阅了大量相关资料,发现在关于觉醒研究中,大量的信息指向了组胺。Bovet等在1958年就发现组胺的主要功能之一就是调整唤醒,Peter等在1982年也证实了这一点,同时多种研究的结果也证实了组胺的这一功能<sup>[86, 87, 88, 89, 90, 91, 92]</sup>。脑神经元组胺经证实存在于一个上升的神经纤维通路中,这一通路的一部分是从中脑被盖(ventral tegmental area, VTA)经由乳头被盖束(mamillotegmental tract, MTG)进入乳头体(mammillary body, MB),再从乳头体向上经乳头丘脑束(mamillothalamic tract, MT)传入丘脑再到前脑各处,这一通路以往被我们称为旁通路。

为了进一步了解这一组胺通路与觉醒的关系,我们设计了三个毁损实验:第一,线刀毁损乳头被盖束,观察大鼠的觉醒状态;第二,线刀毁损乳头丘脑束,观察大鼠的觉醒状态变化结果。我们选择线刀毁损的方式,是考虑到我们要毁损的主要是神经元的轴索。通过这两个毁损实验的设计,我们意图进一步确切地了解阻断了组胺上传的通路对于大鼠觉醒状态的影响,进而了解影响大鼠觉醒的主要机制和通路,并为临床治疗提供较为确切的证据。

我们通过系列实验方法确定了基于神经通路的大鼠的两个稳定的昏迷毁损位点,确定了一条与觉醒状态相关的神经通路,那就是VTA-乳头体-丘脑通路。在这一实验过程中,我们通过电击被毁损大鼠VTA,观察几个相关脑区的原癌基因c-fos表达,确定了在毁损通路前后电刺激信息的上传情况,从形态学的角度对行为学观察结果进行了验证。

本书涉及了基于神经通路的大鼠的三个昏迷实验研究，目的是较为确切有效地了解意识与昏迷的神经机制。这一研究结果的获得有利于人类对自身的了解，同时更有利于临床中相关疾病的治疗。

本书共分三章：

第一章 大鼠第一个昏迷实验，以及两种毁损方法的结果比较；

第二章 大鼠第二个昏迷实验以及在电击被毁损双侧乳头被盖束（MTG）后的大鼠VTA时几个相关脑区原癌基因c-fos的表达；

第三章 大鼠第三个昏迷实验以及在电击被毁损双侧乳头丘脑束（MT）后的大鼠VTA时几个相关脑区的原癌基因c-fos的表达。



# 目 录

---

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 第一章 大鼠第一个昏迷实验以及两种毁损方法的结果比较 | / 3 |
| 1.1 材料和方法                  | / 5 |
| 1.1.1 实验动物及分组              | / 5 |
| 1.1.2 主要试剂和设备              | / 5 |
| 1.1.3 处理因素的施加              | / 6 |
| 1.1.4 大鼠意识及神经行为观察等级        | / 7 |
| 1.1.5 大鼠意识丧失后的喂养           | / 7 |
| 1.1.6 组织病理检查               | / 7 |
| 1.1.7 统计方法                 | / 7 |
| 1.2 实验结果                   | / 8 |
| 1.2.1 意识及神经行为变化            | / 8 |
| 1.2.2 生命体征变化               | / 8 |
| 1.2.3 瞳孔改变                 | / 9 |
| 1.2.4 超微结构及组织病理观察          | / 9 |

|       |                        |      |
|-------|------------------------|------|
| 1.3   | 讨论                     | / 10 |
| 1.3.1 | 通过KA毁损组大鼠得出的结论         | / 10 |
| 1.3.2 | 通过线刀毁损组与KA毁损组大鼠比较得出的结论 | / 11 |

## 第二章 大鼠第二个昏迷实验以及在电击大鼠VTA后几个相关脑区的

### 原癌基因c-fos表达 / 15

|        |                            |      |
|--------|----------------------------|------|
| 2.1    | 材料和方法                      | / 16 |
| 2.1.1  | 实验动物与分组                    | / 16 |
| 2.1.2  | 主要试剂和设备                    | / 17 |
| 2.1.3  | 处理因素的施加                    | / 17 |
| 2.1.4  | 大鼠意识分级及意识丧失后的喂养            | / 19 |
| 2.1.5  | 银纤维工作电极                    | / 19 |
| 2.1.6  | 电刺激VTA与电极校准                | / 19 |
| 2.1.7  | 组织材料的处理                    | / 19 |
| 2.1.8  | 损伤位置及组织病理的电镜鉴定             | / 20 |
| 2.1.9  | c-fos免疫组织化学法(漂浮法)          | / 20 |
| 2.1.10 | 结果观察、图像采集以及统计学处理           | / 21 |
| 2.2    | 实验结果                       | / 21 |
| 2.2.1  | 意识及神经行为变化                  | / 21 |
| 2.2.2  | 生命体征变化                     | / 21 |
| 2.2.3  | 瞳孔改变                       | / 21 |
| 2.2.4  | EEG动态变化                    | / 22 |
| 2.2.5  | 观察组织病理及超微结构                | / 22 |
| 2.2.6  | 三种处理方式下,大鼠脑内齿状回c-fos表达对比观察 | / 22 |
| 2.2.7  | 正常大鼠只电击右侧VTA,不做其他的处理       | / 25 |

2.2.8 毁损双侧乳头被盖束 (MTG), 并伴有电击右侧VTA / 28

2.2.9 Fos阳性神经元表达的主要位置 / 31

2.3 讨论 / 31

2.3.1 本实验行为学观察结果显示 / 32

2.3.2 本实验c-fos结果显示 / 32

2.3.3 实验阳性神经元主要分布区 / 33

2.3.4 乳头被盖束与动物觉醒状态的相关性 / 33

### 第三章 大鼠第三个昏迷实验以及在电击大鼠VTA后几个相关 脑区的原癌基因c-fos表达 / 37

3.1 材料和方法 / 37

3.1.1 实验动物与分组 / 37

3.1.2 主要试剂和设备 / 38

3.1.3 处理因素的施加 / 38

3.1.4 大鼠意识分级及意识丧失后的喂养方法、电刺激VTA与电极校准方法、组织材料的处理方法、损伤位置及组织病理的电镜鉴定方法、c-fos免疫组织化学方法、结果观察、图像采集以及统计学处理等均与第二部分相同 / 39

3.2 实验结果 / 39

3.2.1 意识及神经行为变化 / 39

3.2.2 生命体征变化 / 40

3.2.3 瞳孔改变 / 40

3.2.4 EEG动态变化 / 40

3.2.5 组织病理及超微结构改变 / 40

|       |                           |      |
|-------|---------------------------|------|
| 3.2.6 | 两种处理方式下,大鼠脑内齿状回c-fos表达的变化 | / 40 |
| 3.3   | 讨论                        | / 44 |
| 3.3.1 | 行为学观察结果                   | / 44 |
| 3.3.2 | 本实验c-fos结果                | / 44 |
| 第四章   | 结论                        | / 49 |
|       | 参考文献                      | / 51 |
|       | 附 图                       | / 61 |
|       | 附录一                       | / 67 |
|       | 附录二                       | / 79 |
|       | 致 谢                       | / 89 |

# 第一章

大鼠第一个昏迷实验以及  
两种毁损方法的结果比较



# 第一章 大鼠第一个昏迷实验以及 两种毁损方法的结果比较

目前用于制作昏迷模型的动物种类较多，其中包括了小鼠、大鼠、兔、猫、狗、猪、猴、狒狒等。我们在选择动物时考虑了以下几个因素：第一，是所做的昏迷模型是否具有可推广性；第二，是动物对手术的耐受性；第三，是所做的昏迷模型的经济适用性。为此，我们选择了大鼠作为我们的实验对象。

目前，大鼠觉醒状态判定的方法很多<sup>[27, 28, 29]</sup>，应用较多的分级方法是传统的6级分法：第1级，在笼内活动如常；第2级，在笼内活动减少；第3级，在笼内活动减少并运动失调；第4级，当背部放在笼的底部时能滚动（翻正反射存在）但不能站立；第5级，翻正反射消失但对疼痛刺激有肢体回缩反应；第6级，翻正反射消失，对疼痛刺激无反应，同时耳翼反射、角膜反射消失，尾部挤捏不能诱出逃避反应。其中第5、6级被认为是昏迷状态。也有人用了5级的分法<sup>[29]</sup>：第1级，清醒、行走、进食、叫声正常；第2级，多睡少动、轻刺激即醒、眼球可随目标移动、不能站立、不进食；第3级，浅昏迷，四肢乱动、叫声异常、不能站立、可自动睁眼但不追随目标；第4级，中度昏迷，无自主运动、对痛刺激有反应、有吞咽和角膜反射；第5级，深昏迷，闭眼不



动、对任何刺激无反应。在我们的实验中我们所采用的是第一种六级分法。

以往人们认为网状结构中存在着生命中枢<sup>[30, 31, 32, ]</sup>，网状结构直接决定着动物的觉醒与否<sup>[33]</sup>。但是，我们仔细研究人们以往的实验以及所得出的推论发现，人们通过某些毁损中脑网状结构实验所得出的结论<sup>[34, 35, 36, 37]</sup>，可能主要是由于切断了神经元上下行轴索引起的，不能够确切地认定是网状结构本身的功能。或者也可以说，以往人们关于中脑网状结构的毁损实验的结论有可能混淆了网状结构、神经元上下行轴索以及某些并不属于网状结构的核团三者的功能关系。因此，人们通过这样的实验结果推论出来的对这种毁损所致昏迷的神经机制的结论还需要得到进一步的确证。也就是说，对中脑网状结构损伤所造成的相关影响以及是否可能造成意识严重障碍性的昏迷这一问题还需要进一步确认，以进一步区分中脑网状结构、神经元上下行轴索和那些不属于网状结构的核团三者各自的功能关系。

为此，我们设计了第一个实验。在这个实验中，在第一组大鼠中，我们运用海人酸（KA）药物毁损法毁损大鼠中脑腹侧被盖区位置的网状结构，观察大鼠的觉醒反应；在第二组大鼠中，我们用线刀毁损法切断大鼠中脑VTA上行神经轴索及其相关联系，同样观察大鼠的觉醒反应。在这两个实验中所使用的种毁损方法均会造成中脑网状结构的损伤，所不同的是：（1）KA毁损法仅选择性毁损中脑网状结构神经元胞体而不损伤过路轴索联系，这种毁损方法所造成的昏迷结果应该是由药物作用的急性发作和网状结构神经元以及相关的树突连接损伤所引起的，通过这一方法可以确定仅仅部分毁损中脑网状结构对大鼠觉醒状态的影响究竟有多大；（2）线刀毁损法则切断了神经元上下行的所有联系，既切断了网状结构也切断了上下行轴索，这种毁损方法所造成的昏迷结果应该是网状结构损伤和轴索损伤两种因素造





成的，通过这一方法得出的结果应该是网状结构和轴索损伤共同的作用。排除掉网状结构的影响，就可以得出上下行轴索被切断后，给信息传递带来的影响。

对两种毁损方法所得出的觉醒状态进行比较，可以有效地区别中脑网状结构、神经元上下行纤维以及几个主要核团三者各自的功能。并通过观察两种毁损方法所得出的行为学结果、视觉诱发电位变化、脑组织病理以及超微结构的改变，为结论提供强有力的证据。

## 1.1 材料和方法

### 1.1.1 实验动物与分组

选健康成年Sprague-Dawley (SD) 大鼠24只，重200克~300克，雌雄不拘，由湖南农业大学实验动物繁育中心提供。在动物实验室适应三天，实验室通风良好，室温24℃光照周期8:00~20:00，大鼠进食饮水自由，正常喂养，实验前称重，随机编号，分为3组，对照组5只，进入实验程序。

(1) KA损伤组 (n=8)。

(2) 线刀损伤组 (n=8)。

(3) 对照组 (n=8)。

此处的n均为已弃去位置不够准确的和手术过程中死掉大鼠后的数目。

### 1.1.2 主要试剂和设备

|                  |          |
|------------------|----------|
| 海人酸KA            | Sigma 公司 |
| 一抗 (c-fos-Ab)    | 北京中山生物公司 |
| 二抗生物素标记的羊抗兔IgG血清 | 北京中山生物公司 |
| 卵白素-生物素复合物       | 北京中山生物公司 |