



类 别	省自然科学基金 (面上项目)
学科组	医学科学部 (H)

黑龙江省科学基金项目申请书

2018年度

项目名称: 交叉电项针对豚鼠脑出血后咳嗽反射重塑的神经源性炎症机制的研究

申 请 人: 蔡国锋

依托单位: 黑龙江中医药大学

通讯地址: 黑龙江省哈尔滨市香坊区和平路24号

电子信箱: wulongels@163.com

电 话 : 0451-87878135

手 机 : 13845071440

申请日期: 2017-09-24 20:43:51

黑龙江省自然科学基金委员会
2017年制



填 写 说 明

一、省科学基金项目根据《黑龙江省科学基金资助项目及资金管理暂行办法》（黑科联发[2011]96号）组织实施，面向全省，主要用于资助自然科学方面的基础研究和应用基础研究。

二、项目申请书是申报省科学基金项目的重要依据，要认真如实填写。内容必须真实、详实，所附材料齐全。

三、项目名称应当紧紧围绕项目核心创新内容，简明、准确地反映出创新内容和特征，要简洁、明确，字数限定在30个汉字以内。

四、基本信息要填写完整，不得空白，项目内容要重点突出、条理清晰、方案具体、指标合理、科学预期，经费预算要符合国家、省科研经费管理的相关规定，支出合理。

五、申请书中

“三、申报项目的研究基础”，“四、申报项目情况”，“五、项目经费预算”中不得出现主要研究人员（前三名）姓名，依托单位、合作单位名称，出现者为初审不合格。（前三名人员的姓名必须以“申请人”，“第二人”，“第三人”代替；依托、合作单位名称以“依托单位”，“合作单位1”，“合作单位2”代替，其他单位名称可以用实名）

六、申报项目如有合作单位，第一个合作单位必须在基金管理系统上注册，然后在系统中对申报项目网上推荐（同依托单位操作），否则项目申报无效。



一、基本信息

申请人	姓名	蔡国锋	性别	男	出生年月	1980-03-25
	学历	博士研究生	学位	博士学位	职称	副主任医师
	电话	0451-87878135		电子邮箱	wulongels@163.com	
	手机	13845071440		从事专业	针灸临床	
	留学国别			归国时间		
	工作单位	黑龙江中医药大学				
依托单位	名称	黑龙江中医药大学				
	单位性质	高等院校		邮编	150040	
	所在实验室			实验室等级		
	科研部门联系人	杨波		电子邮箱	kejichu@yeah.net	
	电话	82193038		手机	13352516088	
	单位地址	黑龙江省哈尔滨市香坊区和平路24号				
合作单位	名称					
申请项目	学科代码	H2718 中医针灸				
	研究年限	2018-07-01- - ->2020-12-31				
摘要	<p>(概述姓名主要内容、创新点、预期目标和主要成果,限500字)</p> <p>脑出血气管切开后患者的肺感染发生率和死亡率居高不下,主要原因是咳嗽反射障碍。因此,咳嗽反射重塑对于就只脑出血气切患者,具有十分重要的临床应用价值。我们在临床证据及成功建立脑出血咳嗽反射障碍豚鼠模型基础上,进行交叉电项针促进咳嗽反射重塑的机理研究。创新性的采用交叉电项针的方法,作用于咳嗽反射中枢,通过轴索反射,来探讨交叉电项针的外周机制。运用ILISA法测定豚鼠肺组织SP含量,同时采用FQ-PCR法检测SP受体NK1、VR1的mRNA的水平和VR1、PGP-9.5及NF-200的表达,来观察其对轴索反射的影响,阐明咳嗽反射重塑的外周神经源性炎症机制,为交叉电项针促进咳嗽反射重塑的外周机制研究奠定基础,同时也为其中枢机制研究提供思路。</p>					
关键词用分号分开,最多5个		交叉电项针;脑出血;咳嗽反射重塑;神经源性炎症				

[illegible]3 / 31



提示：申请书

“三、申报项目的研究基础”，“四、申报项目情况”，“五、项目经费预算”中不得出现主要研究人员（前三名）姓名，依托单位、合作单位名称，出现者为初审不合格。（前三名人员的姓名必须以“申请人”，“第二人”，“第三人”代替；依托、合作单位名称以“依托单位”，“合作单位1”，“合作单位2”代替，其他单位名称可以用实名）

三、申报项目的研究基础

(一)项目组主要研究人员（前三名）的学历和研究工作经历





(二)承担项目情况(申请人正在承担或已完成（主持或参加）国家、省（部）、市项目)

序号	项目名称	批准号	计划名称	起止年月	课题组排名	进展或完成情况	项目来源
1	交叉电项针促进脑出血后气管切开插管患者咳嗽反射重建的研究	12521515	黑龙江省教育厅面上项目	2012-01-01至2014-12-01	第一	已结题	厅/市计划
2	交叉电项针促进脑梗死后气管切开插管患者咳嗽反射重塑的研究	ZHY12-Z049	黑龙江省中医药管理局面上项目	2012-01-01至2014-12-01	第一	已结题	厅/市计划
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							



(三)曾获科技奖励情况

序号	获奖项目名称	获奖时间	奖项名称	奖励等级	授奖部门（单位）
1	交叉电项针促进脑梗死后气管切开插管患者咳嗽反射重塑的研究	2017-06-06	2017年度黑龙江省医疗卫生新技术应用奖	一等奖	黑龙江省卫生和计划生育委员会
2	以应用型人才为目的的《神经病学》教学培养机制研究	2017-07-05	黑龙江省高等教育学会第二十二次优秀高教研究成果奖	三等奖	黑龙江省高等教育学会
3					
4					
5					
6					
7					
8					
本表只能填写以下科技奖励： 1. 省、自治区、直辖市、市（地）政府设立的科技奖励； 2. 经登记备案的社会力量设立的科技奖励； 3. 国际组织和外国政府授予的科技奖励。					



(四)代表性论文(著)

序号	论文（著）名称	刊名	作者	影响因子	年卷页码（xx年xx卷xx页）	发表时间（年月日）	是否国内完成	SCI他引次数	EI他引次数	他引总次数
1	交叉电项针对脑出血后气管切开插管患者咳嗽反射的重塑：随机对照研究	中国针灸	申请人	1.43	35(1):3-6	2015-01-05	是	0	0	3
2	交叉电项对脑出血后气管切开插管患者吞咽功能及肺感染恢复的随机单盲对照观察	中医药信息	申请人	0.82	32(1):76-79	2015-01-12	是	0	0	5
3	交叉电项针促进脑梗死后气管切开插管患者咳嗽反射的随机单盲对照观察	针灸临床杂志	申请人	0.89	31(1):21-24.	2015-02-10	是	0	0	6
4	交叉电项针对脑梗死后气切插管患者吞咽及肺感染的影响	上海针灸杂志	申请人	1.25	04:293-296	2015-04-16	是	0	0	7
5	Effect of cross electro-nape-acupuncrure on cough reflex remodeling in patients with cerebral infarction through tracheostomy tubes-preliminary data from a single-blinded, randomized cuntrolled study	The 3rd Internatonal Symposium on IT in Medicine and Education	申请人	0	356-359, guangzh ou, 2011. 12. 09-11.	2010-12-14	是	0	3	3
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										



总 计 :		3	24
-------	--	---	----



(五)获得专利情况

序号	授权项目名称	专利类型	授权国家（地区）	授权号	发明人位次
1	一种便于多次膀胱内取尿样的导尿管	实用新型专利权	中国	ZL 2013 2 0401293.5	第一
2	一种头囊式胃管	实用新型专利权	中国	ZL 2013 2 0401294.X	第一
3	一种防误吸胃管	实用新型专利权	中国	ZL 2012 2 0007540.9	第一
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
授权发明专利总计（项）			授权实用新型专利 总计（项）		3



四、申报项目情况

(一)项目研究目的、意义及国内外研究现状与存在问题(附主要的参考文献及出处)

一、研究意义

脑出血后肺感染的发生率为25.15% - 46.20%，死亡率为12.5% - 47%

[1]。肺感染发生率与死亡率如此之高，大多患者是咳嗽反射减弱或消退所致[2]。因此，咳嗽反射的重塑就变得格外重要了，因为这对于救治脑出血后咳嗽反射障碍的患者具有十分重要的理论与临床应用价值。经过多年的临床实践，我们采用“交叉电项针”这一新方法，治疗脑出血后咳嗽反射障碍气管切开插管患者，从而促进气道保护性咳嗽反射的重塑[3]，来清除气道的分泌物和异物，预防呼吸道感染和控制呼吸道感染的加重，在该研究方向已经完成了两项厅局级临床科研课题，临床疗效确切[2]，因此，进一步进行相应机制研究。

二、国内外研究现状及发展动态分析

(一)脑出血与咳嗽反射障碍的关系

脑出血是指非外伤性脑实质内出血，属中医中风病范畴。其患病人数约占所有脑卒中病人的10%-20%，住院病死率往往高达43%-

51%[4]。我们结合临床实践和查阅文献发现，脑出血死亡率居高不下的一个重要的原因，就是患者咳嗽反射障碍，进而导致口咽或胃部的内容物及其产生的细菌的吸入而窒息或者感染，咳嗽反射会阻止患者口咽或胃部的内容物和细菌的吸入[5]。所以咳嗽反射的重塑意义重大，但目前针灸促进基底节区脑出血后咳嗽反射重塑的研究还刚起步，临床确定有效[2]，其机制有待进一步深入研究。

(二)咳嗽反射的研究进展

咳嗽反射是复杂的神经生理反射过程，气道的咳嗽感受器受到刺激后被激活，冲动经迷走神经传入脑干咳嗽中枢，再经传出神经活化相应的肌群产生咳嗽[6]。喉、气管和支气管内壁粘膜上皮内的感受器能接受机械性刺激和化学性刺激，大支气管以上部位的感受器对机械刺激特别敏感，支气管以下部位的感受器对化学刺激敏感[7-9]，这些感受器受到刺激时，冲动由迷走神经的传入纤维传至延髓的咳嗽反射中枢，然后经传出神经到声门和呼吸肌等处，引起一系列协调而有次序的动作。咳嗽动作的开始，先为短促而深的吸气，然后声门关闭，腹肌和肋间内肌强烈收缩，使肺内压大大升高，常可比大气压高100毫米汞柱或更多，继而声门突然开放，在高压力差推动下，气流从肺内快速冲出，排出呼吸道内的异物和过多的分泌物，这样可以清洁、保护



和维持呼吸道的畅通。

（三）咳嗽反射机制研究

咳嗽反射的机制主要包括咳嗽刺激物、外周咳嗽受体、咳嗽传入神经纤维、咳嗽中枢定位、神经递质及传出神经[10]，同时受皮层控制。因此，咳嗽反射重塑的机制大致分为中枢机制和周围机制两个方向，大脑皮层及上运动神经元、皮质核束的神经调控属中枢机制。外周神经递质、咳嗽受体及传入、传出神经研究属外周机制。目前，咳嗽反射重塑研究主要集中在周围机制上，尤其集中在气道神经源性炎症机制ANI（airway neurogenic inflammation）。

1、SP与咳嗽反射重塑及ANI的关系

在动物实验中给予外周神经肽受体拮抗剂，能降低辣椒素诱导的咳嗽敏感性并有效治疗咳嗽，证实神经肽参与了咳嗽反射[11]。近年来，感觉神经肽P物质(Substance P, SP)在咳嗽敏感性中的作用日益受到重视。SP是一种广泛分布于外周和中枢神经系统中具有众多生物活性的小肽，发现较早，是神经源性气道炎症中的一种重要介质。SP通过多种形式影响气道组织并可诱发神经源性炎症如扩张血管和增加血管通透性、使气道平滑肌收缩、活化气道炎症细胞、增加气道腺体分泌等[12]。许多实验结果证实了神经肽参与促进咳嗽反射的产生，外周神经肽受体拮抗剂可以明显减小辣椒素诱导的咳嗽敏感性来治疗咳嗽[13-

16]。辣椒素、柠檬酸诱导的咳嗽均有SP释放增加，能抑制上述刺激诱发的咳嗽[14-16]。Mutoh等[13]通过向豚鼠孤束核注射SP这一方法，可以明显增强支气管C纤维传出冲动的输出。Moreaux等[14]发现气管灌洗液中SP物质明显增加，NK-1受体拮抗剂可以明显减弱咳嗽的发生。Sekizawa等发现，可通过吸入SP的方法，诱发慢性特发性咳嗽及呼吸道感染患者产生咳嗽[15]，他们推测SP易于透过黏膜上皮，从而激活突触反射的运动神经，产生神经源性炎症，刺激呼吸道咳嗽感觉神经末梢，导致咳嗽发生[15-17]。由此可见，肺内SP释放增加与ANI的产生直接相关。

2、NK1受体及VR1受体与咳嗽反射重塑及ANI的关系

研究表明，SP及NK1受体的释放增加可能是副流感病毒型（para influenza virus 3PIV3）感染性咳嗽CRS增高主要机制之一。在感染后NK1mRNA的表达随时间上调，说明SP及NK1受体在感染性咳嗽中起到关键作用[18]。NK1是SP的受体，广泛分布于外周和中枢神经系统[19]。



瞬时受体电位类香草酸受体亚型1 (transient receptor potential vanilloid-1, TRPV1), 也称辣椒素受体亚型1 (vanilloid receptor subtype 1, VR1), 是瞬时受体电位通道蛋白超家族的又一新成员。VR1是一种感受器, 可将刺激信息传输到中枢神经系统; 辣椒素受体 (vanilloid receptor, VR) 是一种效应器, 介导引起气道神经源性炎症, 会产生局部炎症[20]。VR1在肺泡周围和细支气管有表达, 在血管及上皮下平滑肌、气管上皮内的轴突末梢亦有表达, 其表达的多样性说明, VR参与咳嗽的产生[21]。气道平滑肌VR1表达显著增强, 这说明VR1参与了咳嗽的发生过程[22]。由此可知, NK1及VR1是产生ANI的重要标志。

3、蛋白基因产物PGP-9.5及NF-200与咳嗽反射重塑及ANI的关系

蛋白基因产物 (protein gene product, PGP-9.5) 可以标记呼吸道总神经纤维分布, PGP-9.5的表达水平及分布受到呼吸道病毒感染影响[23]。神经丝 (neurofilament, NF) 蛋白是神经元细胞骨架的主要组成部分, 它在所有神经元当中皆有表达。neurofilament-200 (NF-200) 是NF的一个亚群, 在神经元的发育、退化、衰老和再生过程中发生变化, 是豚鼠肺内发生ANI的一个标志。

综上所述, 咳嗽反射重塑的周围机制, 围绕着ANI炎性因子SP和相应受体NK1、VR1及蛋白基因产物PGP-9.5及NF-200的研究展开, 那么, 交叉电项针促进咳嗽反射的机制是否与ANI有关? 经过二十余年的临床实践, 我们创新性的将电针电极在颈部交叉相连应用于临床, 通过对200余例脑出血及脑梗死后咳嗽反射障碍, 气管切开插管患者的系统临床观察, 完成了省教育厅及省中医药管理局的两项科研课题并已结题。明确了“交叉电项针”促进咳嗽反射重塑的独特疗效[2,24,25]。并且将“交叉电项针”应用于呼吸机辅助呼吸患者的研究中, 初步证实了该方法也有助于咳嗽反射障碍呼吸机辅助呼吸患者的恢复, 降低患者死亡率、减少住院时间和降低住院费用, 也体现了针灸在重症医学领域中的重要作用。

三、研究假说: 本课题基于临床实践提出“交叉电项针”促进气道咳嗽反射的重塑, 拟通过动物实验深入探讨“交叉电项针”对豚鼠肺组织咳嗽反射相关蛋白以及神经炎性物质SP的影响, 有助于揭示“交叉电项针”促进咳嗽反射重塑的周围机制。



“交叉电项针”通过电场作用在豚鼠延髓的咳嗽反射中枢，经过反射弧的感传，咳嗽反射的调控，促进了神经末梢对P物质等的逆行性释放，也就是轴索反射，然后释放的P物质再作用于外周靶细胞，其受体NK1和VR1也随之增加，从而促进ANI，进而刺激有髓鞘的A δ 纤维快适应感受器（rapidly adapting receptors, RAR）从而实现了咳嗽反射的重塑。

我们拟对豚鼠肺组织SP、VR1、PGP-9.5及NF-200蛋白的表达和豚鼠肺组织的NK1、VR1的mRNA相对表达进行分析，从而为交叉电项针促进脑出血后咳嗽反射重塑的周围机制研究提供分子生物学证据。

四、总结

我们拟通过动物实验研究来证实，如果“交叉电项针”能够促进P物质的释放及NK1、VR1表达的变化，那么将为“交叉电项针促进咳嗽反射重塑的周围机制”假说提供实验依据，为咳嗽反射重塑的周围机制研究奠定基础，同时也为其中枢机制研究提供思路，也会对咳嗽反射障碍呼吸机辅助呼吸患者的治疗提供新的理论依据。

参考文献

1. 吴先琴，向月应。脑出血并发肺部感染原因分析及护理对策[J]. 慢性病学杂志，2015, (1): 112-113。
2. 申请人。交叉电项针对脑出血气管切开插管患者咳嗽反射的重塑：随机对照研究[J]. 中国针灸，2015, 35（1）：3-6。
3. Guofeng Cai, Zhe Zhuang, Haichun Zhou, Bo Sun, Hui Zhao, Kai Liu, Chenghai Yan, Lei Li, Dianquan Zhang, Qi Li, Ye Wang. Effect of cross electro-nape-acupuncrure on cough reflex remodeling in patients with cerebral infarction through tracheostomy tubes-preliminary data from a single-blinded, randomized controlled study. The 3rd International Symposium on IT in Medicine and Education. 2011: 356-359.
4. 童丹。脑出血的治疗进展[J]. 卒中与神经疾病，2002, 9（1）：58-61。
5. 钱淑文。调节吞咽和咳嗽反射预防老年人肺炎[J]. 国外医学(老年医学分册)，2002, (05):195-197。
6. 金炳植，金庆华。气管导管套囊的不同充气技术对围拔管期咳嗽反射的影响[J]. 临床医学，2011, (10):54-55。
7. Mutolo, D., F. Bongianini: Suppression of the cough reflex by inhibition of ERBK 1/2 activation in the caudal nucleus tractus solitarii of the rabbit. America Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2012, 302: R468-R476.



8. Sung,C.Y., T.H.Lee: Bronchorrhea following Stroke. *European Neurology*. 2012, 67(1): 57-62.
9. Smith, J.A.,A. Aliverti: Chest wall dynamics during voluntary and induced cough in healthy volunteers, *The Journal of Physiology*. 2012, 590(3): 563-574.
10. 容朝晖, 沈策。咳嗽反射机制的研究进展[J].
国外医学·呼吸系统分册2005, 25 (3) : 168-170。
11. Footitt J,Johnston SL: Cough and viruses in airways disease:mechanisms. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*: 2009, 22(2): 107-114.
12. Ricciardolo FL: Mechanisms of citric acid-induced bronchoconstriction. *Am J Med*: 2001, (Suppl18A)18S-24S.
13. Mutoh T Bonham AC Joad JP: Substance P in the nucleus of the solitary tract augments bronchopulmonary C fiber reflex output. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*:2000, 279: R1215-1223.
14. Moreaux B, Nemmar A, Vincke G: Role of substance P and tachykinin receptor antagonists in citric acid-induced cough in pigs. *Eur J Pharmacol*: 2000, 408: 305-312.
15. Sekizawa K Jia YX Ebihara T: Role of substance P in cough. *Pulm Pharmacol*: 1996, 93: 23-328.
16. Connor TM, Connell J, Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F: The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*: 2004, 201(2): 166-181.
17. Springer J Geppett IP, Fischer A(2003): Calcitonin gene-related Peptide a inflammatory mediator. *Pulm Pharmacol Ther*: 16:121-130.
- 18.18.
叶新民, 钟南山, 刘春丽, 赖克方, 陈如冲。副流感病毒感染豚鼠咳嗽反射敏感性变化及其神经源性炎症机制探讨[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27 (1) : 1-8。
- 19.19.
叶新民, 刘春丽, 钟南山, 陈如冲。感染后咳嗽及其神经源性炎症机制研究进展[J]. *中华哮喘杂志*, 2010, 4 (5) : 388-391。
20. Yang, Q. R.: Research of Micro Airstream Gyroscope Sensitive Mechanism. *Advanced Materials Research*. 2014, 889: 821-824.
21. Morice AH, Geppetti P: Cough.5: The type 1 vanilloid receptor: a sensory receptor for cough.*Thorax*:2004, 59(3): 257-258.
22. Groneberg DA, Niimi A, Dinh QT, Cosio B, Hew M, Fischer A, Chung KF: Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough.



American journal of respiratory and critical care medicine:2004, 170(12): 1276-1280.

23. Martínez-Marcos, A.: Controversies on the human vomeronasal system. European Journal of Anatomy 2014, 5(1): 47-53.

24.

申请人。交叉电项针对脑出血气管切开插管患者吞咽功能及肺感染恢复的随机单盲对照观察[J]. 中医药信息, 2015, 32 (1) : 76-79。

25.

申请人。交叉电项针促进脑梗死后气管切开插管患者咳嗽反射重塑的随机单盲对照观察[J]. 针灸临床杂志, 2015, 31 (1) : 21-24。



(二)项目已开展的前期研究(在申报项目的研究方向、研究内容方面已取得的探索性成果)

(1) 项目申请人长期从事基础及临床、科研工作，掌握相关理论知识和实验技能；项目组成员在临床工作中已为大量脑出血后气管切开咳嗽反射障碍患者进行治疗，疗效肯定，为本项目的顺利实施创造了良好的临床基础；

(2) 已在本项目的相关领域开展大量研究工作。

下面介绍一下本研究**建立脑出血并咳嗽反射障碍豚鼠模型的预实验**。

分组	空白组						
	20 μ L组 (n=10)	30 μ L组 (n=10)	40 μ L组 (n=10)	50 μ L组 (n=10)	60 μ L组 (n=10)	70 μ L组 (n=10)	
平均咳嗽次数/10min	19	13.67	10.33	8.33	6	5	4.67
死亡/周	0	0	0	0	1	7	9
意识丧失	0	0	0	0	2	7	9

1. 分组：根据注射自体股动脉血量的不同，将雄性纯白SPF级豚鼠70只，体重 300 ± 15 g之间，随机分成7组，每组10只。分别为空白对照组；20 μ L组；30 μ L组；40 μ L组；50 μ L组；60 μ L组和70 μ L组。

2. 方法：将豚鼠用戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉，俯卧位固定于立体定位仪上，头部正中切开头皮，暴露颅骨，在颅骨中线左侧5mm，冠状缝前钻一直径1mm的小孔，立体定向穿刺后，用微量注射器向左侧基底节内（靶点：前囟左侧4-5mm，冠状缝向前0.2mm，进针深度5-6mm，即基底节区），将未肝素化的自体股动脉血以20 μ L/min速度推进基底节区，留针10min，缓慢出针。术后局部喷洒庆大霉素，用牙科水泥封闭颅骨伤口，缝合头皮，局部皮肤采用碘酚消毒。

脑出血咳嗽反射障碍模型成功标准：咳嗽次数减少 > 50 %

采用“辣椒素引咳法”，脑出血造模后第2天开始检测。将豚鼠置于特制的密闭箱盒内，用超声雾化器以 $0.5\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 容量雾化吸入 $0.03\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 辣椒素2min引发咳嗽。计数10min内咳嗽次数，**正常咳嗽次数为10-20次，平均15次。连续检测7天，每天一次。咳嗽反射次数减少50 %以上，即小于7次/10min即为造模成功。**

3结果

3.1 咳嗽反射障碍模型与注血量关系

由表可见：

①基底节区注射血量在20-40 μ L区间均未出现豚鼠1周内的死亡现象，50 μ L组仅死亡1例，并且随着注射血量



的增加，平均咳嗽次数在逐渐降低，但20 μ L、30 μ L、40 μ L三组的平均咳嗽次数> 7次/10min。

②60 μ L组、70 μ L组咳嗽次数明显降低均<7次/10min，但是随着脑内注血量的增加，颅内占位效应的增加及神经功能缺失的增加、造成的死亡率高达70-90%。但咳嗽反射减弱程度与50 μ L组相差不大，因此，**可以界定基底节区注血50 μ L组为造模最理想选择，既保证了咳嗽反射障碍的成功，同时保证了模型的成活率。**

3.2 注血量与行为学观察

采用Longa评分法：0分没有神经功能缺失，1分右侧前爪不能完全伸展，2分行走时向右侧转圈，3分行走时身体向右侧倾倒，4分不能自发行走，有意识丧失。

分组	空白组	20 μ L组 (30 μ L组		40 μ L组	50 μ L组	60 μ L组	70 μ L组
	(n=10)	(n=10)	n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)
行为学Longa评分法	0	2	2.33	2.67	3	3.67	4
意识丧失	0	0	0	0	2	7	9

由上表可见：**随着注血量的增加，豚鼠行为学改变越来越明显，神经功能缺失逐渐增加，甚至出现了昏迷，意识障碍的出现也会显著增加模型死亡率。**

3.3注血后脑解剖学观察

采用戊巴比妥钠腹腔麻醉，断头猝死，取出完整脑组织，去除嗅球及额前部4mm，以左侧大脑半球中部，注射针孔处冠状位切割脑组织，可见基底节区脑出血造模成功。

注血	3mm	4mm	5mm	6mm	7mm	8mm	9mm
深度							
注血					破入	破入	破入
部位	外囊外侧	外囊	基底节	基底节	脑室	脑室	脑室

由上表可见：注血深度3mm和4mm略浅，5mm-6mm恰好在基底节区，符合造模要求，7mm-9mm均穿刺过深造成了血破入脑室不符合造模要求。

综上所述，**既保证能够得到可靠的基底节出血模型，同时能够保证咳嗽反射障碍指标和模型的高成活率和稳定性，注血量应为50 μ L，进针深度为5-6mm。**

已取得的研究工作成绩：



JJ2018ZR0959 2017-09-24 20:43:51

(1) 成功建立脑出血后咳嗽反射障碍的豚鼠模型，为“交叉电项针”促进咳嗽反射重塑的神经源性炎症机制研究提供模型基础；

(2) “交叉电项针”促进脑出血后咳嗽反射障碍患者的咳嗽反射重塑在临床应用上已得到证实，**完成两项厅局级课题的临床研究并在国际会议发表论文1篇（EI检索）。2015年1月在针灸类核心期刊发表“交叉电项针”促进咳嗽反射重塑文章4篇。**

① **申请人**。交叉电项针对脑梗死后气切插管患者吞咽及肺感染的影响[J]. **上海针灸杂志**, 2015, 04:293-296。

②**申请人**。交叉电项针对脑出血后气管切开插管患者咳嗽反射的重塑：随机对照研究，**中国针灸**, 2015, 35(1):3-6。

③ **申请人**。交叉电项对脑出血后气管切开插管患者吞咽功能及肺感染恢复的随机单盲对照观察，**中医药信息**, 2015, 32(1):76-79。

④ **申请人**。交叉电项针促进脑梗死后气管切开插管患者咳嗽反射的随机单盲对照观察，**针灸临床杂志**, 2015, 31(1):21-24。

⑤ **申请人**。Effect of cross electro-nape-acupuncrure on cough reflex remodeling in patients with cerebral infarction through tracheostomy tubes-preliminary data from a single- blinded, randomized cuntrolled study, **The 3rd Internatonal Symposium on IT in Medicine and Education**, 356-359, guangzhou, 2011, 12, 09-11。 **(EI收录)**



(三)研究内容和解决的关键问题(主要研究内容, 要解决的主要技术难点和问题, 研究的创新点等)

1、研究内容

① 豚鼠咳嗽反射敏感性 (cough reflex sensitivity, CRS) 和气道反应性 (airway responsiveness, AR) 测定;

② 豚鼠肺组织感觉神经肽P物质 (Substance P, SP) 含量及表达与CRS的关系;

③ 豚鼠肺组织NK1、VR1的mRNA 的表达水平与CRS的关系;

(4) 豚鼠肺组织VR1、PGP-9.5及NF-200蛋白的表达与CRS的关系。

2、拟解决的关键科学问题

(1) 通过动物实验来进一步证实“交叉电项针”能够促进咳嗽反射重塑

解决方案: 本项目通过在脑出血后咳嗽反射障碍豚鼠模型上, 运用“交叉电项针”进行干预, 运用动物体描仪进行客观、量化研究, 来进一步证实“交叉电项针”促进咳嗽反射重塑的确定性。

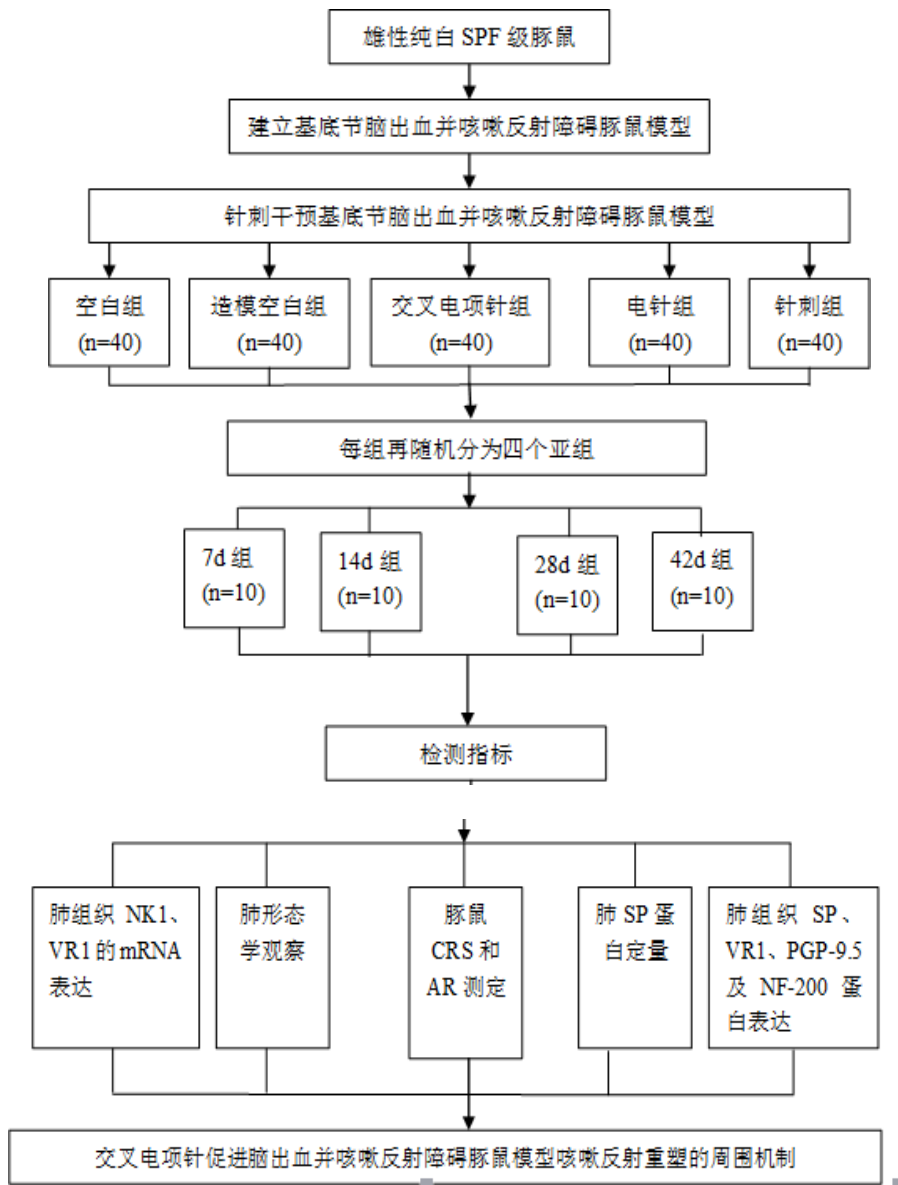
(2) 明确“交叉电项针”促进咳嗽反射重塑可能的周围机制

解决方案: 本项目通过对肺内神经末梢对P物质及咳嗽反射相关蛋白的测定, 将明确“交叉电项针”促进咳嗽反射重塑的周围机制, 可能是通过肺内神经源性炎症机制发挥作用的。即“交叉电项针”促进P物质逆行性释放, 其肺内受体也随之增加, 反向促进咳嗽反射, 从而实现了咳嗽反射重塑。



(四)项目研究方法、技术路线及可行性分析

1、技术路线



2、实验方法与手段

2.1 基底节脑出血并咳嗽反射障碍豚鼠的模型研究



JJ2018ZR0959 2017-09-24 20:43:51

选用雄性纯白SPF级豚鼠，体重 300 ± 15 g之间，于清洁级动物房饲养，温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度50~60%，人工照明，12h 光照，12h 黑暗，食用标准颗粒饲料，自由饮水。

2.1.1 造模注血

注血方法：将豚鼠用戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉，俯卧位固定于立体定位仪上，头部正中切开头皮，暴露颅骨，在颅骨中线左侧5mm，冠状缝或前钻一直径1mm的小孔，立体定向穿刺后，用微量注射器向左侧基底节内（靶点：前囟左侧4-5mm，冠状缝向前0.2mm，进针深度5-6mm，即基底节区），将未肝素化的自体股动脉血50 μL ，以20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 速度推进基底节区，留针10min，缓慢出针。术后局部喷洒庆大霉素，用牙科水泥封闭颅骨伤口，缝合头皮，局部皮肤采用碘酚消毒。

2.1.2 脑出血咳嗽反射障碍模型成功标准

采用“辣椒素引咳法”，脑出血造模后第2天开始检测。咳嗽次数减少50%以上为造模成功。

将豚鼠置于特制的密闭箱盒内，用超声雾化器以 $0.5\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 容量雾化吸入 $0.03\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 辣椒素2min引发咳嗽。计数10min内咳嗽次数，正常咳嗽次数为10-20次，平均15次。连续检测7天，每天一次。咳嗽反射平均次数小于7次/10min即为造模成功。

2.2 在造模成功基础上进行针灸动物实验，实验方法：

2.2.1 实验动物及分组：将雄性纯白SPF级豚鼠200只，体重 $300 \pm 15\text{g}$ 之间。随机分成5组，空白组、造模空白对照组、针刺组、电针组、交叉电针组，每组40只。各组再随机分为7d、14d、28d、42d四个亚组，每组10只。空白组及造模空白对照组不予以治疗。

2.2.2 针灸治疗方法

2.2.2.1 取穴：翳风（双侧）；风池（双侧）；针灸针规格：0.25mm \times 25mm不锈钢毫针；进针深度：10mm；脉冲宽度： $0.5 \pm 0.15\text{ms}$ ；脉冲重复频率： $2 \pm 0.5\text{Hz}$ 。

2.2.2.2 针刺组：平补平泻捻转行针，隔10min/次，30s/次，留针30min，每日1次。

2.2.2.3 电针组：电针电极不交叉，在同侧风池、翳风穴位相连。连续波，强度以头部微颤动为准，每次30min，每日1次。

2.2.2.4 交叉电项针组：电针电极在颈部交叉连接，即同侧风池与对侧翳风穴交叉相连。连续波，强度以头部微颤动为准，每次30min，每日1次。

2.2.3 处死动物及取材

腹腔注射戊巴比妥麻醉动物后，从股动脉放血后，将胸腔打开。分别在相应治疗后于第7、14、28、42 天处死动物。之后将右主支气管结扎，将右肺中下叶取下，先取肺组织50mg放置于含有Trizol或组织RNA保存液的EP管后、再取组织少许放入清洁的EP管中，做冰冻切片时用；也取组织少许放入含有甲醛固定液的EP管中，做组织病理学检查时用。

2.2.4 支气管肺泡灌洗液（BALF）及支气管肺泡灌洗细胞计数



(1) 方法：剪开气管上段，将灌流管插入，经气管插管将预温至37℃的生理盐水注入肺内，每次灌入2-3ml，1-2min后缓缓进行回抽，反复3次，使回收率大于70%。

(2) 处理：将BALF离心，条件为：1500转/min，低温离10min。离心后弃上清液PB溶解细胞沉淀，取100 μL用Z2细胞计数仪BECKMANCO MLTER计算出每毫升灌洗液中所含细胞总数；另取10 μL制作细胞涂片。

(3) 染色：光学显微镜下进行细胞分类计数。

2.3 实验结果检测

2.3.1 豚鼠CRS和AR的测定

2.3.1.1 豚鼠CRS 的测定

从造模第二日起，应用Buxco单腔非限制型小动物体描仪测定豚鼠的CRS，各组动物分别进行辣椒素咳嗽激发试验，判断CRS的指标主要是咳嗽总次数（CCnt），Buxco系统通过采集气流变化信号，计算曲线下面积（V2）以及气流半数峰值转换的时间，在通过模拟方程进行换算后判断是否咳嗽。总体辣椒素溶液是1ml，浓度是50 μmol/L，观测10min（包含雾化的时间）并记录CCnt，每日一次。

2.3.1.2 豚鼠AR 的检测

在检测CRS后，经过12h之后，再测定动物的增强呼气间歇（Enhanced Pause, Penh）（应用Buxco 无创肺功能仪进行检测）。使用MeCh（100 μL倍增浓度）雾化并激发Penh，测定其激发后的变化，激发浓度为从低到高，以2为公比的等比数列递增，从100mg/L开始递增至1600mg/L，记录MeCh每个浓度级激发下的Penh的数值，并取平均数。将各个MeCh激发浓度下的Penh 值转换为与生理盐水（NS）激发时Penh值的百分比，以 $Penh^0$ 表示，作为AR的评价指标，每日一次。

空白对照组及7d、14d、28d、42d四个亚组，开始针灸后每日采用BUXCO肺功能仪通过辣椒素和乙酰胆碱刺激测定CRS及AR，每日一次。

2.3.2 运用ELISA法进行豚鼠肺SP蛋白定量测定

制备匀浆液及检测SP蛋白定量方法：取新鲜肺组织（用电子天平称）100mg，先加入0.3ml醋酸（0.1M），为了使内源性激肽酶失去活性，将加入醋酸的肺组织置于100℃的水浴中，保持10min。之后将一定量的PBS液按照一定的比例加入，再用1-3ml玻璃匀浆器进行匀浆，条件为：3500rpm，离心20min后取上清液并在水浴之后-70℃温度下保存，或-70℃温度下保存，使用之前再匀浆。用ELISA 法测定肺组织SP的含量：采用竞争法测抗体，按照试剂盒说明书进行操作。

2.3.3 运用FQ-PCR法检测肺组织NK1、VR1的mRNA表达水平

除了先提取组织总RNA和无需标准品做标准曲线外，均按TaKaRa公司的试剂盒说明进行。结果计算：采用GAPDH作为内参照和 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法来计算NK1、VR1mRNA的表达水平。

2.3.4 应用免疫组化法测定肺组织SP、VR1、PGP-9.5及NF-200蛋白表达

2.3.4.1 免疫组化步骤



JJ2018ZR0959 2017-09-24 20:43:51

- (1) 烤好的石蜡组织切片常规脱蜡、水合。PBS洗3次，每次2min。
- (2) 3% 过氧化氢室温孵育10min。PBS洗3次，每次2min。
- (3) 抗原修复（微波炉修复，柠檬酸修复液）。PBS洗3次，每次2min。
- (4) 室温封闭30min。
- (5) 一抗4℃过夜，PBS洗3次，每次2min。
- (6) HRP标记免疫组化二抗室温孵育30min。PBS洗3次，每次2min。
- (7) DAB显色适当时间（根据镜下变化调整）。PBS洗3次，每次2min。
- (8) 苏木复染1-10min。
- (9) 水洗去多余染液，分化数秒，水洗，返蓝。
- (10) 常规脱水、透明。最后中性树胶封片。

2.3.4.2 采用半定量的方法对免疫组化结果进行图象分析

免疫组化图用Leica显微镜观察并拍照，之后比较蛋白表达强度（灰度）。按照染色深浅作半定量分析：0（无染色）；1（轻着色）；2（中着色）；3（强着色）；4（很强着色、接近黑色）。所有免疫组化照片皆由两名未参加本实验的研究人员进行分析，且每张照片最少分析5个高倍视野，且5个高倍视野皆为随机的。

3、可行性分析：

3.1 我们经过长期的临床实践已经证实：“交叉电项针”能够促进脑出血后咳嗽反射障碍患者的咳嗽反射重塑，预实验脑出血后咳嗽反射障碍模型的成功建立，也为咳嗽反射重塑研究提供理论可行性。

3.2 技术依据：项目申请人已具备本项目所涉及的相关理论知识及实验技能，能够完成SP、VR1、PGP-9.5 及 NF-200蛋白的检测与定量分析，为实验的完成提供了技术可行性。

3.3 申请人所在的重症医学科为国家中医药管理局中医重症医学重点专科培育单位、黑龙江省中医药管理局中医重症医学重大专科，导师也具有设备完善的实验研究中心、细胞与分子神经生物学实验室等，为实验的完成提供了相应的设备。

3.4 项目团队人员构成合理，分工明确，能够保证实验的顺利完成



(五)项目学术思想及创新之处

- 1、学术思想：采用“交叉电项针”这一新方法，促进脑出血后咳嗽反射障碍豚鼠的咳嗽反射重塑，将电针电极在颈部交叉相连，使电场作用于咳嗽反射中枢，从而通过反射弧的调控来促进咳嗽反射重塑。
- 2、创新之处：将“交叉电项针”这一新方法，应用于促进咳嗽反射重塑的神经源性炎症机制的研究中，以明确“交叉电项针”促进咳嗽反射重塑的周围机制。同时，也将为其中枢机制的研究提供思路。



(六)项目研究涉及的学科交叉情况

本研究属于针灸学与重症医学的交叉学科研究范畴，将传统的国粹针灸学与现代重症医学相结合，充分发挥了中医针灸的特色优势，将针灸引入重症医学领域也体现了中医重症医学建设的创新与发展，同时引进了分子生物学技术，这不仅将为重症医学的发展提供新的治疗方法，而且也会促进针灸学的现代化与国际化。

(七)项目研究的预期目标

- 1、从实验角度证实交叉电项针能够促进脑出血后咳嗽反射障碍豚鼠咳嗽反射的重塑。
- 2、初步揭示交叉电项针促进咳嗽反射重塑的P物质靶点相关性。
- 3、探索交叉电项针促进咳嗽反射重塑的受体靶点相关性。
- 4、从而获得交叉电项针对脑出血后咳嗽反射重塑的神经源性炎症机制的分子生物学证据，可能为交叉电项针促进咳嗽反射重塑的中枢机制研究提供思路。



(八)预期研究的成果和水平（形成的主要成果，理论成果，专利、论文、专著的数量、指标及其水平等或其它相应考核的指标）

- 1、培养博士生1名；
- 2、在国际、国内学术刊物上发表论文6篇以上。

(九)项目预期应用前景或产业化前景

- 1、本研究获得的新技术将在同行业内进行推广
- 2、本研究的结论为下一步研究中枢机制奠定基础



(十)项目研究所具备的基本条件

1、已具备的实验条件

项目申请人所在的单位具有设备完善的实验研究中心、细胞与分子神经生物学实验室等，为此多学科的研究提供了所有必要的实验条件。

2、尚缺少的实验条件和拟解决的途径

脑出血后咳嗽反射障碍豚鼠模型的建立需要特定的定向钻颅设备，可由针灸研究所提供，攻读博士学位期间，申请人曾协助导师完成多项基础实验研究工作；本课题实验经费不足部分，自筹经费补助。



五、经费预算

预算编制人：蔡国锋

电话：13845071440

1、经费来源预算

单位：万元

年度	总计	2018年	2019年	2020年	备注
一、专项省拨经费	6.5	2.5	2	2	
二、自筹经费	3	1	1	1	
1、其他财政拨款					
2、单位自有资金	3	1	1	1	
3、企业配套资金					
4、其他货币资金					
经费来源合计	9.5	3.5	3	3	

经费来源合计=专项省拨经费+自筹经费

2、经费支出预算

单位：万元

预算科目名称	合计	专项省拨经费	自筹经费
一、直接费用	9.5	6.5	3
1、设备费	4.5	3	1.5
（1）购置设备费			
（2）试制设备费	4.5	3	1.5
（3）设备改造与租赁费			
2、材料费			
3、测试化验加工费	1.5	1	0.5
4、燃料动力费	0.75	0.5	0.25
5、差旅费			
6、会议费(举办会议)	1	0.75	0.25
7、国际合作与交流费			
8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1	0.75	0.25
9、劳务费(非本单位在编人员)	0.75	0.5	0.25
10、专家咨询费			
11、其他支出			
二、间接费用			
其中：绩效支出			
经费支出合计	9.5	6.5	3

经费支出合计=直接费用+间接费用

注：请按照我省《省级财政科研项目资金管理办法》（黑财规审〔2017〕12号）相关规定，填报相关“经费支出”科目。



六、依托单位学术委员会的审查意见（包括：对项目的意义、特色和创新及申请人的素质与水平等情况签署具体意见）

主任委员（签章）年月日

七、申请人承诺：

我保证申请书内容的真实性。如果获得基金资助，我将履行项目负责人职责，严格遵守《黑龙江省科学基金资助项目及资金管理暂行办法》的有关规定，切实保证研究工作时间，认真开展工作，按时报送有关资料。若填报失实和违反规定，本人将承担全部责任。

签字：

八、依托单位及合作单位承诺：

已按填报说明对申请人的资格和申请书内容进行了审核。申请项目如获资助，我单位保证对研究计划实施所需要的人力、物力和工作时间等条件给予保障，严格遵守《黑龙江省科学基金资助项目及资金管理暂行办法》的有关规定，督促项目负责人和项目组成员以及本单位项目管理部门按照省自然科学基金委员会的规定及时报送有关材料

依托单位公章

合作单位公章1：

合作单位公章2：

日期：日期：日期：



九、主要附件目录（另加页）

1. 申请人身份证扫描件
2. 申请人学历和学位证书扫描件
3. 申请人职称证书扫描件
4. 申请人使馆开具的留学证明扫描件（仅申报留学基金提供）
5. 其他