

## 甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注脑损伤大鼠的保护作用

邹浩军<sup>1</sup>,林莉莉<sup>1</sup>,孙雪竹<sup>2</sup>,魏伟<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>无锡卫生高等职业技术学校药理教研室,江苏 无锡 214028;<sup>2</sup>皖西卫生职业学院,安徽 六安 237005;<sup>3</sup>安徽恒星药物研究所,安徽 合肥 230009)

**[摘要]** 目的:观察甲磺酸桂哌齐特对大鼠缺血性脑损伤保护作用。方法:线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)再灌注损伤模型,72只雄性SD大鼠随机分为6组:假手术组、模型组、甲磺酸桂哌齐特组(20、40、80 mg/kg)和马来酸桂哌齐特组,观察药物对脑缺血再灌注大鼠的血栓形成、血小板聚集、脑梗死体积和对脑组织病理形态学变化的影响。结果:与模型组比较,甲磺酸桂哌齐特(40、80 mg/kg)可减少缺血再灌注后脑梗死体积,抑制血栓形成和血小板聚集( $P < 0.05$ );同时可减轻脑组织神经元核固缩、溶解和脑细胞肿胀。与马来酸桂哌齐特相比无明显差异。结论:甲磺酸桂哌齐特对局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用。

**[关键词]** 甲磺酸桂哌齐特;缺血再灌注损伤;梗死体积;血栓形成;血小板聚集

**[中图分类号]** R743

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)10-1396-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20131013

## Protection effects of methanesulfonic acid cinepazideon on brain ischemia reperfusion in rats

Zou Haojun<sup>1</sup>, Lin Lili<sup>1</sup>, Sun Xuezh<sup>2</sup>, Wei Wei<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028; <sup>2</sup>West Anhui Health Vocational College, Luan 237005; <sup>3</sup>Anhui HengXing Drug Research Institute, Hefei 230009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the protective effect of methanesulfonic acid cinepazideon(CMI) on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Methods:** The local cerebral ischemia/reperfusion model was established by intraluminal thread occlusion of the middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. Seventy-two male SD rats were randomly divided into five groups: model group, sham group, CMI treatment group (20, 40, 80 mg/kg) and cinepazide maleate treatment group (40 mg/kg). Thrombosis, platelet aggregation, the infarction volume and pathomorphological changes of brain tissue were observed in each group. **Results:** Compared with model group, CMI could reduce infarct volume, thrombosis and inhibit platelet aggregation ( $P < 0.05$ ). Also it could reduce neurons karyopyknosis, dissolution and swelling of the brain cells. And the effects had no difference with cinepazide maleate. **Conclusion:** CMI has a marked neuroprotective effect on local cerebral ischemia reperfusion injury in rats.

**[Key words]** methanesulfonic acid cinepazideon; ischemia and reperfusion injury; infarct volume; thrombosis; platelet aggregation

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1396-1399]

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是人类常见的脑血管疾病,致残率与病死率较高,严重危害患者的健康。随着人们生活方式的改变,膳食结构不合理以及人口老年化等因素,脑卒中的发病率有明显上升趋势<sup>[1]</sup>。寻求理想的脑缺血治疗药物是一直心脑血管医药领域研究的热点。桂哌齐特对改善脑血管病患者神经缺损症状有一定作用,是临床效果较为肯定的治疗缺血性脑卒中的药物之一<sup>[2]</sup>,它具

备扩张脑血管、改善脑血流、减轻炎症、保护脑组织等作用<sup>[3-4]</sup>。

目前临床使用的是马来酸桂哌齐特,从药物化学角度,马来酸盐溶解性好,但其稳定性不及甲磺酸盐。已有文献表明马来酸桂哌齐特稳定性欠佳,见光易反应生成顺式马来酸桂哌齐特而影响药效<sup>[5]</sup>。甲磺酸桂哌齐特是改变酸根衍生而来的国家四类新药。本研究探讨甲磺酸桂哌齐特对脑缺血再灌注损

伤的保护作用并比较其与马来酸桂哌齐特作用的差异,旨在提供临床前药效学资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物与分组

雄性 SD 大鼠,体重 260~320 g[河南省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(豫)2010-0001]。72 只大鼠随机分为 6 组:假手术组(SHAM 组)、大脑动脉阻塞(MCAO)模型组及甲磺酸桂哌齐特 20、40、80 mg/kg 3 个剂量组,马来酸桂哌齐特 40 mg/kg 组。静脉给药,连续 3 d。各组在 MCAO 阻断后静脉给药 1 次,再灌注 8 h 时再给药 1 次

#### 1.1.2 试剂和仪器

甲磺酸桂哌齐特注射液,由安徽恒星药物研究所提供,批号:20111112,临用前用生理盐水配制成所需浓度;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,中国医药集团上海化学试剂公司产品);水合氯醛(上海白鹤化工厂产品,批号:110106)。鱼线,直径 0.235 mm (PATU 公司,日本)。体外血栓形成血小板粘附两用仪(北京宏润达科技发展有限公司)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 MCAO 缺血再灌注模型制备

参考改进的 Longa 等<sup>[6]</sup>方法,10%的水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉,分离右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉,置 4-0 号线,结扎颈总动脉和颈外动脉。在距颈总动脉分叉处约 5 mm 处剪一小口,插入制备好的鱼线栓。以颈动脉分叉处起,推进 18~20 mm 时感到阻力,到达较细的大脑前动脉内,阻断了大脑中动脉(MCA)的血供。用缝线结扎固定鱼线。MCAO 2 h 后,拔出鱼线,恢复血供。术后出现左侧 Horner 氏征(左前肢屈曲,行走时向左侧转圈——追尾现象)即视为造模成功。实验过程中,因麻醉意外、造模不成功及 24 h 内死亡的均弃去不用。造模前后保温常规饲养。

#### 1.2.2 MCAO 再灌注大鼠梗死体积测定

大鼠缺血再灌注 24 h 后,麻醉固定,自腹主动脉放血处死大鼠,快速断头取脑。将脑置于 2~3℃生理盐水中,去除嗅球、小脑和低位脑干,用滤纸吸取水分。然后将脑组织放入-20℃冰箱冷冻 10 min 后冠状切成 5 片,迅速置于含 1%TTC 的磷酸盐缓冲液中,37℃避光温孵 20 min。经染色后,正常脑组织呈红色,缺血区呈白色,且界限分明。10%福尔马林固定后拍照,Image J 分析梗死体积,计算梗死百分

比:梗死百分比(%)=梗死区体积/(梗死区 + 非梗死区体积)×100%。

#### 1.2.3 MCAO 再灌注后血栓和血小板聚集率的测定

大鼠缺血再灌注 24 h 后,麻醉固定,自腹主动脉取血,部分(1.8 ml)即刻放入硅胶管中,并将其放入恒温 37℃的体外血栓形成仪中转动 15 min,取出血栓,测量其长度,称其湿重,然后将血栓室温下放置 24 h,称血栓干重<sup>[7]</sup>。另取血 1 ml,分别加入两支装有 2 ml EDTA-福尔马林溶液(A 液)和 EDTA(B 液)溶液的试管中,每管 0.5 ml,混匀,室温下放置 15 min,800 r/min 离心 10 min,分离富血小板血浆(PRP),分别计数血小板,计算两者比值和血小板聚集率<sup>[8]</sup>:血小板聚集率(%)=(1-A 液中血小板数/B 液中血小板数)×100%;聚集抑制百分率(%)=(模型组血小板聚集率-用药组血小板聚集率)/模型组血小板聚集率×100%。

#### 1.2.4 MCAO 再灌注大鼠脑组织形态学观察

大鼠缺血再灌注 24 h 后断头处死大鼠,取出右脑于 10%福尔马林溶液中固定。标本作 HE 染色,对大脑皮质进行病理组织学检查。

### 1.3 统 计 学 方 法

实验数据用统计软件 SPSS18.0 进行处理,所有数据均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间多样本均数比较用单因素方差分析,两两均数比较用 SNK-*q* 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注大鼠梗死体积的影响

甲磺酸桂哌齐特 40、80 mg/kg 能够降低缺血再灌注大鼠的脑梗死体积( $P < 0.05$ ),但与 40 mg/kg 马来酸桂哌齐特组比较无显著差异( $P > 0.05$ ,表 1)。

### 2.2 甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注大鼠血栓形成的影响

表 1 甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注大鼠脑梗死体积的影响  
Table 1 The effect of CMI on infarct area in ischemia/reperfusion rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组 别	梗死百分比(%)
MCAO 组	15.67 ± 5.21
甲磺酸桂哌齐特 20 mg/kg 组	12.45 ± 4.25
甲磺酸桂哌齐特 40 mg/kg 组	9.92 ± 3.19*
甲磺酸桂哌齐特 80 mg/kg 组	10.68 ± 3.69*
马来酸桂哌齐特 40 mg/kg 组	10.28 ± 3.96*

与 MCAO 组比较, \* $P < 0.05$ 。

如表2所示,与假手术组相比,缺血24 h后,血栓长度、湿重和干重均增加,40 mg/kg 马来酸桂哌齐特能使血栓长度、湿重和干重降低( $P < 0.05$ ),而甲磺酸桂哌齐特40、80 mg/kg 两个剂量均降低了缺血再灌注大鼠的体外血栓形成长度、血栓湿重和血栓干重( $P < 0.05$ )。

### 2.3 甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注大鼠血小板聚

集的影响

与假手术组相比,缺血24 h后血小板的聚集度显著增加( $P < 0.01$ ),甲磺酸桂哌齐特20、40、80 mg/kg 能抑制血小板聚集,使血小板聚集率分别减少15.39%、21.50%和23.43%,其中40、80 mg/kg 剂量组与MCAO组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表3)。

表2 甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注大鼠血栓形成的影响

Table 2 The effect of CMI on thrombosis in ischemia/reperfusion rats

( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	血栓长度(cm)	血栓湿重(g)	血栓干重(g)
SHAM组	8.05 ± 1.62	0.365 ± 0.092	0.122 ± 0.037
MCAO组	11.45 ± 1.54 <sup>#</sup>	0.510 ± 0.139 <sup>#</sup>	0.161 ± 0.040 <sup>#</sup>
甲磺酸桂哌齐特20 mg/kg组	9.72 ± 1.97	0.427 ± 0.063	0.138 ± 0.031
甲磺酸桂哌齐特40 mg/kg组	9.10 ± 2.96 <sup>*</sup>	0.410 ± 0.048 <sup>*</sup>	0.129 ± 0.019 <sup>*</sup>
甲磺酸桂哌齐特80 mg/kg组	8.90 ± 2.13 <sup>**</sup>	0.405 ± 0.059 <sup>*</sup>	0.124 ± 0.026 <sup>*</sup>
马来酸桂哌齐特40 mg/kg组	9.21 ± 1.05 <sup>*</sup>	0.399 ± 0.067 <sup>*</sup>	0.126 ± 0.028 <sup>*</sup>

与SHAM组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>#</sup> $P < 0.01$ ;与MCAO组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

表3 甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注大鼠血小板聚集的影响

Table 3 The effect of CMI on platelet aggregation in ischemia/reperfusion rats

( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	血小板聚集率(%)	聚集抑制百分率(%)
SHAM组	38.24 ± 13.67	-
MCAO组	59.96 ± 10.57 <sup>#</sup>	-
甲磺酸桂哌齐特20 mg/kg组	50.73 ± 11.30	15.39
甲磺酸桂哌齐特40 mg/kg组	47.07 ± 10.22 <sup>*</sup>	21.50
甲磺酸桂哌齐特80 mg/kg组	45.91 ± 14.71 <sup>*</sup>	23.43
马来酸桂哌齐特40 mg/kg组	44.77 ± 15.87 <sup>*</sup>	25.33

与SHAM组比较,<sup>#</sup> $P < 0.01$ ;与MCAO组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.4 甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注大鼠脑组织病理变化的影响

大鼠缺血再灌注24 h后,取大脑皮质进行病理组织学检查发现:假手术组脑组织神经元及神经胶质细胞结构正常,核膜清楚,核仁明显,未见神经细胞变性坏死及炎细胞浸润等明显病理变化。缺血模型组脑组织神经元结构模糊、胞体肿胀、尼氏体减少或消失,出现不同程度的核深染、核固缩、核溶解、核体不规则,并形成软化灶及炎细胞浸润。甲磺酸桂哌齐特处理后可见脑组织神经元核固缩、核溶解、细胞肿胀较模型组有不同程度的减轻,神经元病理变化较轻,软化灶缩小、减少(图1)。

## 3 讨论

脑缺血易引起缺血性脑卒中,是近年来人类的第二大致死原因且发病率仍呈上升趋势<sup>[9]</sup>。脑缺血

发生时,脑血流量减少和血流速度减慢不仅加剧血小板聚集和血栓的形成,且缺血区脑组织神经元及神经胶质细胞变性坏死、炎症反应也加剧<sup>[10]</sup>。目前防治缺血性脑卒中的药物主要是溶栓药、血管扩张药及神经保护剂。

桂哌齐特是具有内源性腺苷增效、弱钙离子拮抗双重作用的新药,在欧洲、日本等发达国家应用广泛,并已成为治疗心脑血管疾病的一线药物,桂哌齐特通过阻滞细胞对腺苷重吸收及抑制腺苷脱氨酶活性,阻滞腺苷失活过程,延缓腺苷的代谢过程,从而提高病变局部内源性腺苷的浓度,同时桂哌齐特具有弱钙离子阻滞作用,可拮抗钙离子超载,从而对冠状动脉、脑血管及外周血管有良好的扩张作用,改善血供。桂哌齐特还可抑制血小板凝集,减少氧自由基产生,减轻中性粒细胞对血管内皮细胞的趋化作用。桂哌齐特对缺血性心脑血管疾病的疗效已经十分确切,目前临床制剂均为马来酸桂哌齐特。本课题组前期的研究曾表明甲磺酸桂哌齐特能不同程度降低缺血再灌注损伤大鼠的脑含水量和脑指数,减轻脑水肿,也能降低神经功能缺损评分,提高缺血再灌注损伤脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)的活力,降低丙二醛(MDA)、乳酸(LD)含量及一氧化氮合酶(NOS)活性<sup>[11]</sup>。本研究证明,甲磺酸桂哌齐特可不同程度降低缺血再灌注大鼠的体外血栓形成长度、血栓湿重干重、血小板聚集率及梗死区体积;组织学检查也表明甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注大鼠脑组织损伤有一定的保护作用,且作用与

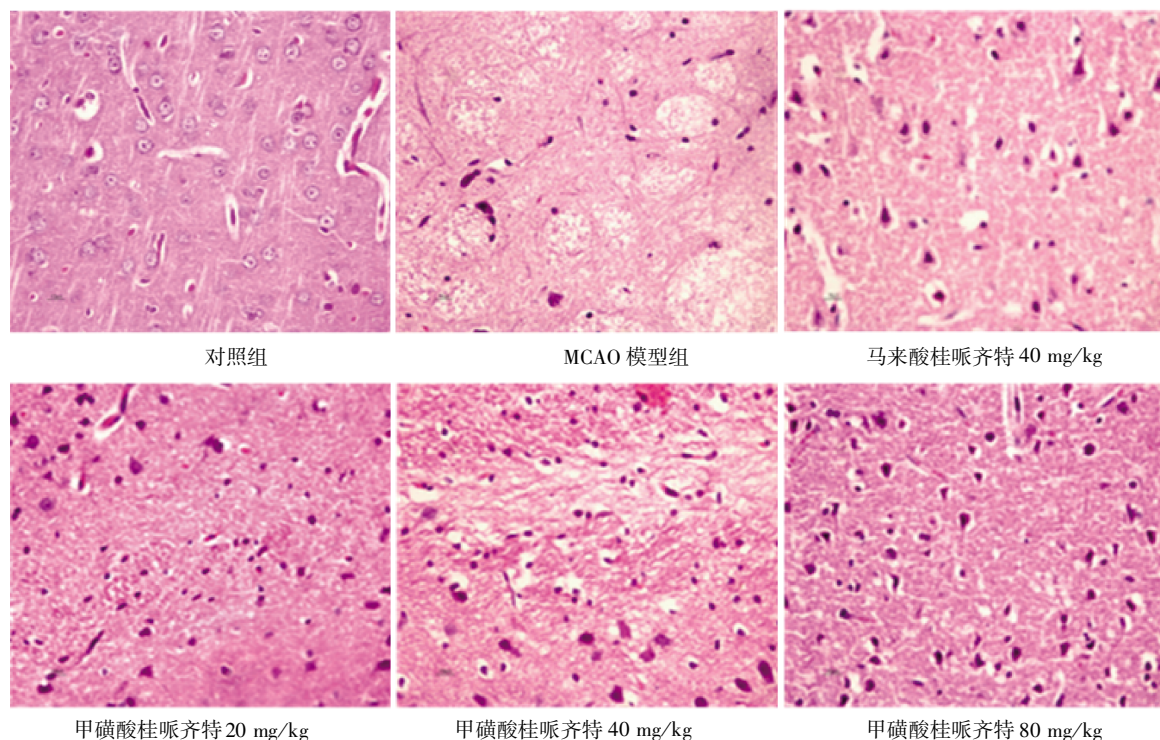


图 1 甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注大鼠脑组织形态学的影响(HE,×400)

Figure 1 The effect of CMI on pathology in ischemia/reperfusion rats(HE,×400)

马来酸桂哌齐特相比无明显差异。

今后将开展甲磺酸桂哌齐特的生物等效性研究。期待甲磺酸桂哌齐特可以作为稳定性更高的新型桂哌齐特类药物用于缺血性心脑血管疾病的治疗。

#### [参考文献]

- [1] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组缺血性脑卒中二级预防指南撰写组. 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(2): 154-160
- [2] 杨跃杰, 梁彦玲, 马国俊. 桂哌齐特注射液治疗急性脑梗死 66 例 [J]. 中国新药与临床杂志, 2006, 25(3): 206-208
- [3] 林珊珊. 马来酸桂哌齐特治疗脑梗死临床观察 [J]. 中国医药指南, 2011, 2(9): 88-89
- [4] 邹浩军, 孙 达, 姚 雯. 甲磺酸桂哌齐特对家兔脑血流量及脑血管阻力的影响[J]. 中国基层医药, 2012, 19(17): 2660-2661
- [5] 陈景生, 都 健, 孟庆伟. 马来酸桂哌齐特冻干制剂制备及质量稳定性研究 [J]. 化学与生物工程, 2009, 6(26): 48-50
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91
- [7] 陈 奇. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 112-120, 493-514
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1282-1283
- [9] World Health Organization. World health statistics 2008 [R]. World Health Organization, Geneva, 2008
- [10] Bright R, Mochly-Rosen D. The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury [J]. Stroke, 2005, 36(12): 2781-2790
- [11] 邹浩军, 林莉莉, 魏 伟. 甲磺酸桂哌齐特对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用及其机制的研究 [J]. 江苏医药, 2013, 39(10): 1144-1146

[收稿日期] 2012-12-12