

新型海洋硫酸多糖 DPS 对大鼠 脑缺血的保护作用*

耿美玉 辛现良 李 静 邓 岗 徐家敏 管华诗

(青岛海洋大学海洋药物与食品研究所 青岛 266003)

提要 采用开颅机械闭塞法阻断大鼠大脑中动脉(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)造成大鼠局灶性脑缺血模型,观察了 DPS(D-polysaccharide sulfate)对 MCAO 大鼠局灶性脑缺血的保护作用。结果发现,iv DPS 剂量分别为 20、40mg/kg 于术后 30min 静脉注射,能明显缩小 MCAO 24h 造成的脑梗塞范围,减少脑含水量,但对神经功能障碍无明显的改善效果,同时 DPS 具有抑制血小板聚集、减少血栓素(TXA₂)生成和提高 AT III(Antithrombin III)活性的作用。提示 DPS 可通过抗凝抗血小板聚集、减少 TXA₂ 释放来发挥其抗脑缺血的作用。

关键词 DPS, 局灶性脑缺血, 大鼠

中图分类号 R96

脑血管意外是一种常见疾病,具有高死亡率和高致残率的特点,脑缺血是脑血管病的最主要的病种,在我国死亡率占第一位或第二位。对脑缺血的防治以往大多集中在扩张脑血管、缩小脑梗塞范围或改善神经功能方面,但均未取得显著疗效或存在毒副作用大、服用途径不方便等缺点,限制其临床上广泛应用(赵全军,1996)。因此寻找新的能够有效防治脑血管意外的药物是当前医药界研究的一个重要课题。

多年的研究发现,硫酸多糖类药物具有明显的抗栓形成、抗炎、清除自由基、维持内皮细胞顺应性、抑制平滑肌细胞增生等作用(Yanaka, 1996; Green *et al*, 1994),提示该类药物可抑制脑缺血的发病过程,有可能发挥抗脑缺血的作用。DPS 是从海洋生物中提取并经降解、分级、纯化,再经化学修饰而制得的一种低分子量的硫酸多糖类药物。本文采用大脑中动脉闭塞脑缺血模型观察了 DPS 对大鼠局灶性脑缺血的保护作用,结果发现 DPS 能够明显保护脑组织免受缺血性损伤。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

受试药物: DPS 青岛海洋大学海洋药物研究所提供,批号: 980308,以生理盐水配成所需浓度。四氮唑蓝(TTC)由北京化工厂生产,批号: 960911。AT III试剂盒为法国Stago公司产品,批号: 980302。其余试剂均为市售分析纯。

* 国家“九五”攻关项目,96-C02-04-01号。耿美玉,女,出生于1964年8月,博士,教授,博士生导师, E-mail: ylshig@263.net

1.2 实验仪器

KW65- 3A 型高频电刀由北京万东医疗装备公司生产; SXP 型手术显微镜为上海医用光学仪器厂产品; P/ G2003- 培养/ 干燥箱由重庆试验设备厂生产。全自动凝血仪: ACL200, 美国实验仪器公司。

1.3 动物

Wistar 雄性老龄大鼠, 体重(320 ±20) g, 由青岛药品检验所实验动物中心提供, 合格证号: 鲁动质字 980101。

2 实验方法

2.1 大鼠局灶性脑缺血模型

大鼠经水合氯醛 350mg/ kg ip 麻醉后, 左侧卧位固定于鼠板上, 于手术显微镜下沿外耳道与眼眦连线中点切开皮肤, 暴露出颞弓, 用小牵张器将磷状骨和下颌骨间距撑开, 于颅骨底开一 2cm × 2cm 的骨窗, 撕开硬脑膜, 暴露出大脑中动脉, 用高频电刀电凝阻断一侧大脑中动脉造成局部脑缺血, 逐层缝合切口。术中、术后室温严格控制在(24 ±1) ℃ (Yanaka , 1996) 。

2.2 动物分组

取雄性 Wistar 大鼠 50 只, 随机分为 5 组: 假手术组, 模型组(iv 生理盐水), DPS (ivDPS 剂量分别为 10、20、40mg/ kg) 。除假手术组外, 其它各组均阻断一侧大脑中动脉。在阻断一侧大脑中动脉 30min 后由舌下静脉给药, 24h 后按参考文献方法(Tamura *et al* , 1981) 判断神经症状, 然后断头取脑, 测定脑梗塞面积。

另取大鼠 50 只, 分组及给药同前, 在阻断一侧大脑中动脉后 24h, 断头取脑测定脑含水量。

2.3 神经症状的评分

MCAO 手术后 24h 每只动物进行评分, 根据其症状严重程度分 3 级 10 分, 具体方法见表 1。

表 1 神经症状的评分
Tab. 1 Scores of Neurological Symptom

方 法	症 状	分级	分数
(1) + (2) + (3)	(1) (2) (3) 项测试阴性	0	0
(1) 提起大鼠尾部, 大鼠离地一尺左右, 正常大鼠前肢对称向下伸	损伤后对侧前肢内旋, 内收	1	1
(2) 置动物于光滑平面, 用手分别挤压体侧	损伤后对侧肌力降低, 向对侧倒	2	1+ 2
(3) 置动物于地面上, 观察其行走	动物向一侧转圈	3	1+ 2+ 3

2.4 脑梗塞面积及脑水含量的测定

动物经末次行为评分后, 断头取脑, 剔除嗅脑、低位脑干及小脑, 剩余部分立即称取湿重, 脑组织先在- 80℃下放置 5min 后, 将脑沿冠状面切成厚度基本相同(2mm) 的数片, 于 37℃2% TTC 染料中温浴 30min, 正常脑组织呈玫瑰红, 梗塞区因线粒体破坏呈白色。然后将脑片置 10% 的甲醛中固定, 将白色组织仔细挖下称重, 以梗塞组织重量占总脑重

量的百分比作为梗塞面积(Lundy *et al*, 1986)。

用干湿法测定脑含水量(Young *et al*, 1987) 动物处死后, 取出全脑, 去除嗅脑、低位脑干及小脑, 取阻断侧大脑半球立即称取脑湿重, 置 120℃的烤箱中烘烤约 18h 后称取干重。脑含水量按下列公式计算:

$$\text{脑含水量}(\%) = (\text{脑湿重} - \text{脑干重}) / \text{脑湿重} \times 100$$

2.5 血浆抗凝血酶 II活性的测定

取大鼠随机分组: 空白对照组(iv 等容量生理盐水), DPS 两给药组(ivDPS 剂量分别为 20 和 40mg/ kg)。ip20% 乌拉坦(0. 6ml/ 100g) 麻醉, 股静脉给药(0. 1ml/ 100g), 药后 30min, 由腹主动脉取血, 3. 8% 枸橼酸钠抗凝, 制备血浆测定 AT II活性(发色底物法)。

2.6 血小板聚集的评价

将大鼠随机分组: 第 1 组为对照组(iv 等容量生理盐水), 第 2—4 组为 DPS, ivDPS 剂量分别为 10、20 和 40mg/ kg, 第 5 组为阳性对照组(iv 阿斯匹林 30mg/ kg)。大鼠用戊巴比妥钠麻醉, 暴露腹主动脉, 于药后 30min 由腹主动脉取血, 3. 8% 枸橼酸钠抗凝, 制备贫血小板血浆(Platelet poor plasma, PPP) 和富血小板血浆(Platelet rich plasma, PRP), 以胶原、二磷酸腺苷(Adenosine diphosphate, ADP) 和花生四烯酸(Arachidonic acid, AA) 为诱导剂, 加入诱导剂后吸光度增加的最大值即为血小板最大聚集率, 观察药物对血小板聚集的影响。

2.7 大鼠血小板血栓素 A₂(Throboxane A₂, TXA₂) 释放产物的测定

将大鼠随机分为 5 组: 第 1 组为对照组(iv 等容量生理盐水), 第 2—4 组为 DPS, ivDPS 剂量分别为 10、20 和 40mg/ kg, 第 5 组为阳性药物对照组(iv 阿斯匹林 30mg/ kg)。将大鼠用戊巴比妥钠麻醉, 暴露腹主动脉, 股静脉给药后 30min 由腹主动脉取血, 3. 8% 枸橼酸钠抗凝, 制备 PRP, 以花生四烯酸为诱导剂, 诱导血小板聚集。用冷无水乙醇终止反应, 经石油醚和重蒸乙酸乙酯抽提, N₂ 吹干, 磷酸盐缓冲液复溶后放免法测定 TXA₂ 的代谢产物血栓素 TXB₂。

3 实验结果

3.1 DPS 对 MCAO 大鼠神经症状的影响

对照组大鼠麻醉清醒后即有偏瘫样症状出现。主要表现为手术对侧前肢内收、肩内旋、前肢肌张力下降, 向手术对侧推动时抵抗阻力下降。DPS 各剂量能使部分动物神经功能障碍有所改善, 但整组与对照组之间比较无统计学差异(表 2)。

表 2 DPS 对 MCAO 大鼠神经症状的影响(n= 10, x ± S)

Tab. 2 The effects of DPS on neurological symptom of MCAO-modeled rats(n= 10, x ± S)

组别	剂量(mg/kg)	神经症状分析
假手术组	—	0
对照组	—	3. 8±1. 94* ** (1)
DPS 组	10	3. 3±2. 0* ** (2)
	20	3. 7±2. 1* ** (2)
	40	3. 2±2. 09* ** (2)

*** (1) P< 0. 001vs 假手术组; *** (2) < 0. 001vs 对照组
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://

3.2 DPS 对 MCAO 大鼠脑梗塞面积的影响

如表 3 所示, 在阻断一侧大脑中动脉 30min 后由舌下静脉给药, DPS 剂量 20、40mg/kg 与对照组比较可明显降低大鼠 MCAO 24h 后的脑梗塞面积。

表 3 DPS 对 MCAO 大鼠脑梗塞面积的影响($n = 10, x \pm s$)

Tab 3 The effects of DPS on cerebral infarcted areas of MCAO rats($n = 10, x \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	脑梗塞百分率(%)
假手术组	—	0
对照组	—	$8.55 \pm 1.36^{***}$
DPS 组	10	$7.10 \pm 1.06^*$
	20	$6.56 \pm 1.66^{**}$
	40	$6.03 \pm 1.21^{**}$

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs 对照组; *** $P < 0.001$ vs 假手术组

3.3 DPS 对 MCAO 大鼠脑含水量的影响

如表 4 所示, 阻断大鼠一侧大脑中动脉 24h 后, 对照组的脑含水量为 $81.3\% \pm 0.99\%$, 而假手术组的脑含水量为 $76.5\% \pm 1.32\%$, 二者相比较统计学处理具有显著差别, 提示阻断一侧大脑中动脉 24h 后阻断侧脑半球形成了严重水肿。阻断 30min 后舌下静脉给药, DPS 剂量 20、40mg/kg 可明显减轻缺血性脑水肿。

表 4 DPS 对 MCAO 大鼠脑含水量的影响($n = 10, x \pm s$)

Tab. 4 The effects of DPS on water contents of brain tissue of MCAO rats($n = 10, x \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	脑含水量(%)
假手术组	—	76.45 ± 1.32
对照组	—	$81.32 \pm 0.99^{***}$
DPS 组	10	81.20 ± 0.74
	20	$80.19 \pm 1.21^*$
	40	$80.19 \pm 0.83^*$

** $P < 0.05$ vs 对照组; *** $P < 0.001$ vs 假手术组

3.4 DPS 对大鼠血浆 AT III 活性的影响

如表 5 所示, DPS 剂量 20、40mg/kg 都能够明显地提高大鼠血浆 AT III 活性。

表 5 DPS 对大鼠血浆 AT III 活性的影响($n = 8, x \pm s$)

Tab. 5 The effects of DPS on plasma AT III activity of rats($n = 8, x \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	AT III(%)
对照组	等容量	99.6 ± 3.30
DPS	20	$108.3 \pm 4.90^*$
	40	$115.7 \pm 5.32^{**}$

** $P < 0.01$ vs 对照组

3.5 DPS 对大鼠血小板聚集的影响

如表 6 所示, DPS 能明显抑制由胶原和 AA 诱导的血小板聚集, 但对 ADP 诱导的血小板聚集无明显的抑制作用。

表 6 DPS 对胶原、ADP 和 AA 诱导血小板聚集的影响($n = 10, x \pm S$)

Tab. 6 The effects of DPS on platelet aggregation in rat($n = 10, x \pm S$)

组 别	剂 量 (mg/ kg)	聚 集 率 (%)		
		ADP	胶原	AA
对照组	—	61. 8±10. 5	57. 2±19. 1	65. 9±13. 5
DPS	10	63. 5±9. 7	37. 0±8. 1* *	45. 2±18. 8*
	20	60. 5±11. 0	35. 9±16. 0*	41. 8±14. 3* *
	40	68. 0±9. 2	29. 3±21. 6* *	47. 8±20. 2*
阿斯匹林	30	54. 1±9. 6	14. 6±13. 8* * *	1. 9±2. 9* * *

* $P < 0. 05$; ** $P < 0. 01$; * * * $P < 0. 001$ vs 对照组

3.6 DPS 对大鼠血小板血栓素 A₂(Throboxane A₂, TXA₂) 释放产物的影响

如表 7 所示, DPS 能非常明显地减少血小板血栓素 A₂ 代谢产物血栓素 B₂ 的释放, 剂量和作用强度均优于阿斯匹林用药组。

表 7 DPS 对大鼠血小板 TXA₂ 释放产物的影响($n = 10, x \pm S$)

Tab. 7 The effect of DPS on release of TXA₂ platelets of rat($n = 10, x \pm S$)

组别	剂量(mg/kg)	TXB ₂ 含量(pg/ ml)
对 照	—	508. 5±206. 0
DPS	10	160. 3±7. 8* * *
	20	146. 9±8. 4* * *
	40	78. 5±8. 6* * *
阿斯匹林	30	89. 8±36. 4* * *

* * * $P < 0. 001$ vs 对照组

4 讨论

本实验以阻断大鼠一侧大脑中动脉(MCAO) 造成大鼠局灶性脑缺血模型, 观察 DPS 对缺血性脑组织的保护作用。这种开颅机械闭塞法制造的大脑中动脉区局灶性脑缺血模型在一定程度上模拟了人类单侧大脑半球缺血性梗死的病理过程, 该模型对全身影响较小, 动物存活时间较长, 适于评价脑缺血后神经功能的缺损。DPS 剂量为 20、40mg/ kg 于术后 30min 静脉注射, 能缩小 MCAO 24h 造成的脑梗塞范围, 减少脑含水量, 但对神经功能障碍无明显改善作用。

彭湘闵(1997) 的研究表明, 抗凝药物能够干扰血栓形成过程, 从而为重要侧枝循环的建立及减慢脑缺血过程争取了时间。因此抗凝治疗作为缺血性脑血管疾病的治疗措施已日益受到关注。DPS 能够明显地升高 AT II 的活性, 从而增加其抗栓抗凝作用。此外, 血小板聚集及 TXA₂ 的大量释放在脑缺血的发生发展中起着重要作用, 抑制血小板聚集或减少 TXA₂ 生成的药物均在一定程度上保护缺血性脑损伤。DPS 能明显的抑制血小板的聚集并减少 TXA₂ 的生成, 其抑制 TXA₂ 合成的作用优于阿斯匹林。由此可见, DPS 可能通过其抗凝作用、抑制血小板聚集和减少 TXA₂ 的生成来发挥其治疗脑缺血的作用, 其详细机理有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- 赵全军, 1996. 尼莫地平治疗急性缺血性脑卒中. 国外医学脑血管疾病分册, 4: 346
- 彭湘闵, 1997. 缺血性脑血管病的抗凝治疗. 国外医学脑血管疾病分册, 5: 355
- Green D, Chen J, Matsuyama T *et al*, 1994. Low molecular weight heparin: a critical analysis of clinical trials. *Pharmacol Rev*, 46: 89
- Lundy E F, Hibbert C J, Hutton L A, 1986. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils. *J Pharmacol Methods*, 16: 201
- Tamura A, Der S D, 1981. Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1(1): 53
- Yanaka K, 1996. Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *J Neurosurg*, 85: 1102
- Young W, Linnik M D, 1987. Regional brain sodium, potassium and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia. *Stroke*, 18: 751

PROTECTIVE EFFECTS OF DPS ON MCAO RATS

GENG Mei-Yu, XIN Xian-Liang, LI Jing, DENG Gang, XU Jia-Min, GUAN Hua-Shi

(*Marine Drugs and Food Institute, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003*)

Abstract Effects of DPS, a marine heparinoids, against cerebral ischemia induced by occlusion of middle cerebral artery are studied. The results showed that DPS at concentration of 20 and 40mg/kg significantly decreased cerebral infarcted area, reduced water contents of brain tissue. Moreover, DPS significantly enhanced AT III activity and exerted inhibitory effects on platelet aggregation characterized by the blockade of release TXA_2 . These findings indicated that DPS could protect ischemic brain tissue induced by MCAO, chiefly through promoting AT III activity, inhibiting platelet aggregation, and down-regulation of TXA_2 formation.

Key words DPS, Cerebral ischemia, Rat