

凯力康对大鼠脑栓塞的实验研究

中国医学科学院药物研究所

摘 要

用三氯化铁局部涂抹损伤血管形成大鼠大脑中动脉血栓模型，以脑梗塞范围、行为障碍、脑组织病理改变为观察指标，研究凯力康(kallidinogenase)对脑血栓所致局部脑缺血性损伤的保护作用。结果表明，凯力康 3.50×10^{-3} 、 8.75×10^{-3} 、 17.5×10^{-3} PNA U / kg 于术后 30min 静脉注射，能剂量依赖地明显缩小脑栓塞 24h 的脑梗塞范围，改善行为障碍。维脑路通 50mg / kg 的改善神经症状的作用与大剂量凯力康(17.5×10^{-3} PNA U / kg)的作用相当，而其缩小脑梗塞面积的作用与凯力康 8.75×10^{-3} PNA U / kg 的作用相当。脑组织病理检查显示，不同剂量的凯力康组动物大脑中动脉内血栓溶解、断裂，溶解后残留的血栓成空洞状、蜂窝状，脑组织缺血病变较轻。维脑路通 50mg/kg 能部分溶解、断裂大鼠大脑中动脉内血栓，残留的血栓成空洞状、蜂窝状，脑组织缺血病变较轻，其作用强度与凯力康中剂量的作用相当。以上结果提示，凯力康可能通过抑制脑血栓形成，从而减轻血栓形成所致的局部脑缺血性损伤。

一、试验目的

观察凯力康(Kallidinogenase)对大鼠大脑中动脉血栓所致局部脑缺血性损伤的保护作用。

二、试验材料

1. 动物

Wistar 雄性大鼠，体重 280~320 g，购自北京医科大学实验动物中心，京动管质字(1994)第 092 号。

2. 仪器

SXP-1B 手术显微镜为上海医用光学仪器厂产品，LMS-2B 型二道生理记录仪由成都仪器厂生产，SHZ-22 型恒温水浴购自江苏省太仓县医疗器械厂。

3. 药物及试剂

凯力康由广东天普生化医药股份有限公司提供，粉针剂、浓度为 0.15PNA U / 支(相当于 10,000 国际单位)，批号：970901(供试验用)。维脑路通注射液由青岛金峰制药有限公司生产，批号：971210。红四氮唑(TTC)由北京化工厂生产，化学纯，批号：810911。其余

试剂均为市售分析纯。

4. 被测药物配制方法

凯力康及维脑路通均用灭菌生理盐水稀释，配成所需浓度。

5. 被测药物剂量及给药途径

尿激肽原酶： 17.5×10^{-3} 、 8.75×10^{-3} 、 3.5×10^{-3} PNA U / kg，用药量为 1.0ml / kg，舌下静脉注射。

维脑路通：50mg / kg，用药量为 1.0ml / kg，舌下静脉注射。

6. 试验组的设置

取雄性Wistar大鼠，随机分为 6 组：假手术组，对照组(iv生理盐水)，凯力康组(分别iv凯力康 17.5×10^{-3} 、 8.75×10^{-3} 、 3.5×10^{-3} PNA U / kg)，维脑路通组(iv维脑路通 50mg / kg)。

7. 被测药物保存方法

临用时稀释，4℃冰箱保存，连续使用三天。

8. 被测药物的用药剂量设立根据

参考北京医科大学家兔凯力康试验剂量折算大鼠用药剂量。

三、试验方法

1. 大鼠大脑中动脉血栓模型

试验用雄性大鼠腹腔注射水合三氯乙醛 350mg / kg 麻醉，仰卧位固定在鼠板上，切开颈部皮肤、肌肉，分离颈总动脉：做动脉插管联接压力换能器、二导生理记录仪(测定给药前、给药中及给药后血压变化)。再将大鼠左侧位固定在鼠板上，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，暴露出右侧位于嗅束和大脑下静脉之间的一段大脑中动脉，置一小片塑料薄膜保护血管周围组织，将吸有 50%三氯化铁溶液(1 mol / L 盐酸)10 μ l 的小片定量滤纸(2×2mm)敷在此段大脑中动脉上，30min 后取下滤纸，用生理盐水冲洗局部组织，逐层缝合，回笼饲养。术中术后室温严格控制在 24~25℃。

假手术组除在大脑中动脉敷生理盐水外，其余同对照组。给药组在手术 30min 后由舌下静脉给药，24h 后参照文献方法判断神经症状，然后断头取脑，测定脑梗塞面积。

2. 大脑中动脉血栓及脑组织形态学观察

取栓塞侧大脑中动脉及脑组织，按常规固定、包埋、染色、切片，在光学显微镜下观察并摄片。

3. 神经症状的评分判断标准

a. 提起鼠尾，观察两前肢情况，正常动物两前肢向前伸直并且对称。手术后，脑缺血半球的对侧前肢内旋和内收，观察其程度不同分为 0~4 分。

b. 牵拉两肢，正常大鼠肌力对称，手术后脑缺血半球的对侧前肢肌无力，观察其程度不同评为 0~3 分。

c. 推两肩，正常大鼠双侧肩阻力对称，手术后脑缺血半球的对侧肩阻力下降，观察其程度不同评为 0~3 分。

根据以上标准，满分为 10 分，分数越高，说明脑功能障碍越严重，以此作为脑功能障碍的指标。

4. 脑梗塞面积的测定

动物经本次行为评分后，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，在冰上将脑沿冠状面切成厚度基本相同的 5 片，于 37℃ TTC 染料中温浴 30min，正常脑组织呈玫瑰红，梗塞区呈白色。然后将脑片置 10% 的甲醛中固定，将白色组织仔细挖下称重，以梗塞重量占总脑重量的百分比作为梗塞面积。

四、实验结果

1. 凯力康对行为缺陷程度的影响

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。凯力康 17.5×10^{-3} 、 8.75×10^{-3} 、 3.5×10^{-3} PNA U / kg 可剂量依赖地改善神经症状。维脑路通 50 mg / kg 的改善神经症状的作用与大剂量凯力康 (17.5×10^{-3} PNA U / kg) 的作用相比，二者无显著差异 ($P > 0.05$) (图 1)。

2. 凯力康对脑梗塞范围的影响

如图 2 示，凯力康 17.5×10^{-3} 、 8.75×10^{-3} 、 3.5×10^{-3} PNA U / kg 可剂量依赖地缩小大鼠脑梗塞 24h 后的脑梗塞面积，与对照组比较有显著差异。维脑路通 50 mg / kg 的缩小脑梗塞面积的作用与凯力康 8.75×10^{-3} PNA U / kg 的作用相比，二者无显著差异 ($P > 0.05$)。

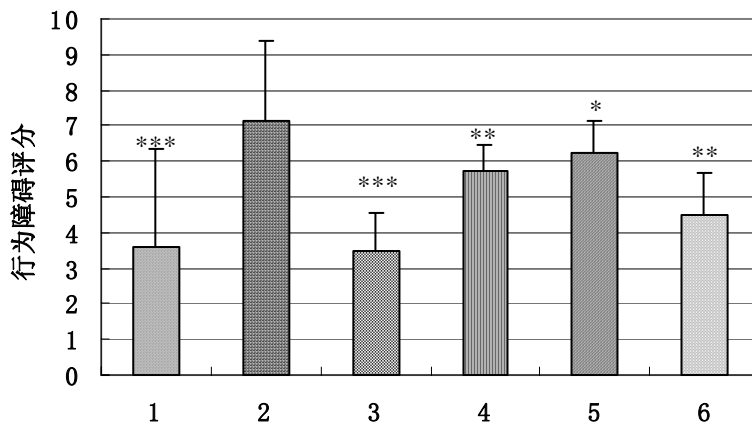


图 1.人尿激肽原酶对大鼠脑血栓 24h 后的神经功能障碍的影响

(n=10, $\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较

1: 假手术组; 2: 对照组; 3: 人尿激肽原酶 17.5×10^{-3} PNAu / kg 组;

4: 人尿激肽原酶 8.75×10^{-3} PNAu / kg 组;

5: 人尿激肽原酶 3.50×10^{-3} PNAu / kg 组;

6: 维脑路通 50mg / kg 组

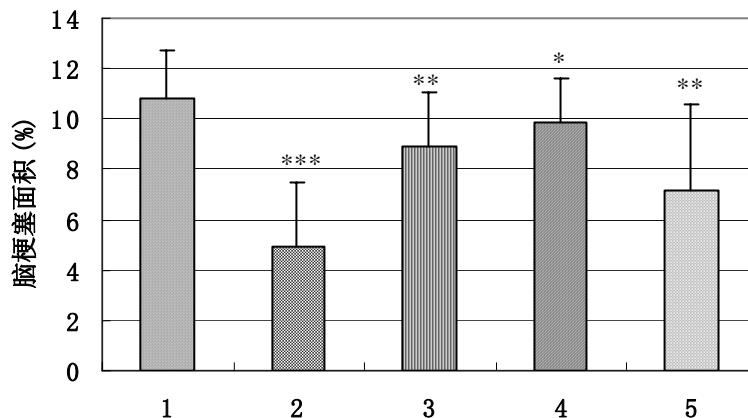


图 2.人尿激肽原酶对大鼠脑血栓 24h 后的脑梗塞面积的影响

(n=10, $\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较

1: 对照组; 2: 人尿激肽原酶 17.5×10^{-3} PNAU / kg 组;

3: 人尿激肽原酶 8.75×10^{-3} PNAU / kg 组;

4: 人尿激肽原酶 3.50×10^{-3} PNAU / kg 组;

5: 维脑路通 50mg / kg 组

3. 凯力康对大鼠脑组织形态学变化的影响

对照组大鼠中脑动脉血栓形成 24 小时后, 病灶侧大脑中动脉皮层供血区苍白、无光、软化, 脑表面血管较对侧充血, 受损段大脑中动脉颜色变暗, 光镜下观察此段血管切片, 其内有血栓形成。血栓成分主要是血小板、红细胞、白细胞和纤维蛋白, 呈混合血栓特性, 且形成的血栓坚实、致密, 血管壁及周围有大量白细胞浸润。凯力康 17.5×10^{-3} 、 8.75×10^{-3} PNAU / kg 组经大脑中动脉血栓形成 24h 后, 病灶侧脑表面未见明显的苍白、无光, 肉眼可见受

损段大脑中动脉较对照组明显红润，光镜下观察，此段血管及周围汇聚大量的白细胞，表明血管表面受化学物质的损伤，血管内血栓溶解、断裂，溶解后残留的血栓成空洞状、蜂窝状，白色血栓及纤维蛋白成分明显减少。维脑路通 50mg / kg能部分溶解、断裂大鼠大脑中动脉内血栓，残留的血栓成空洞状、蜂窝状，脑组织缺血病变较轻，其作用强度与凯力康中剂量的作用相当。(图 5)

光镜下观察脑组织切片，对照组大脑皮层大片浅染，神经细胞崩溃解体，神经细胞变稀疏，出现大片软化灶。凯力康 17.5×10^{-3} 、 8.75×10^{-3} PNA U / kg组未出现明显的大脑皮层大片浅染，软化灶明显变小，表明脑缺血程度明显轻于对照组。(图 6)

4. 凯力康对麻醉大鼠血压的影响

大鼠颈总动脉插管，凯力康 17.5×10^{-3} PNA U / kg于 40~50 秒内从舌下静脉给予，测定给药前、给药中及给药后(观察 10min)血压的变化。结果显示，大鼠给药前、给药中及给药后的血压分别为 104 ± 22 、 101 ± 26 及 102 ± 20 mmHg(n=7)。这表明，凯力康 17.5×10^{-3} PNA U / kg于 40~50 秒内从舌下静脉给予，对麻醉大鼠血压无明显影响。

五、试验结论

1. 本实验用三氯化铁局部涂抹损伤血管，从脑梗塞范围、行为障碍、脑组织病理改变为观察指标判断，形成了大鼠大脑中动脉血栓模型。

2. 凯力康 17.5×10^{-3} 、 8.75×10^{-3} PNA U / kg于术后 30min静脉注射，能明显缩小脑梗塞 24h的脑梗塞范围，改善行为障碍。脑组织病理检查显示，大脑中动脉内血栓溶解、断裂，溶解后残留的血栓成空洞状、蜂窝状，白色血栓及纤维蛋白成分明显减少，脑组织缺血病变较轻。维脑路通 50 mg / kg能部分溶解、断裂大鼠大脑中动脉内血栓，残留的血栓成空洞状、蜂窝状，脑组织缺血病变较轻，其作用强度与凯力康中剂量的作用相当。

3. 凯力康可能通过抑制脑血栓形成，从而减轻血栓形成所致的局部脑缺血性损伤。

参考文献：

1. Tamura A, Kirino T, Sano K, et al. Focal cerebral ischemia in therat: 1.Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab, 1981;1(1): 53-60
2. Lundy EF, et al. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils. J Pharmacological Methods, 1986; 16: 201-204
3. 刘小光, 徐理纳. 一种能评价溶栓和抗栓药的大鼠大脑中动脉血栓模型. 药学学报, 1995; 30: 662