

## 注射用尤瑞克林对玻璃珠诱发兔脑栓塞微循环的影响

摘要: 通过注射玻璃珠进入兔颈内动脉建立脑微血管损伤模型, 利用活体显微镜检方法, 研究尤瑞克林对兔脑微循环的药理作用。结果显示静脉注射尤瑞克林可以扩张脑软膜动脉、增加大脑血红蛋白含量 (IHb)。尤瑞克林对血管的扩张作用具有选择性, 由强到弱依次为较小的细小动脉, 较大的细小动脉, 小动脉, 并且具有剂量选择性。尤瑞克林的扩张血管作用本质上不同于尼卡地平和 CDP-胆碱。血液学和生化检验结果也显示尤瑞克林能改善血小板和红细胞。

关键词: 尤瑞克林、玻璃珠、大脑微循环、实验性栓塞

我们先前报道过建立一种多灶性脑梗塞动物模型的方法, 此法将玻璃珠注射到兔颈内动脉, 在微血管中形成游走血栓<sup>(1)</sup>, 造成大脑循环障碍。

据推测激肽对损伤血管的血液循环有改善作用, 但是, 体内存在降解激肽的激肽酶 (其最适pH值为中性<sup>(3)</sup>), 因此, 静脉注射的激肽在到达局部缺血组织前, 在血液和肺部组织中就已经被大部分降解, 只能起到很小的药理学作用。而以同样的方法静脉注射激肽原酶, 可以看到在损伤血管中循环明显改善。这主要是激肽原酶能够不断的释放激肽, 比直接注射激肽效果好。

本研究所用的人尿激肽原酶是从人尿中提取和纯化, 消除了用于人体的抗原性。试验中将尤瑞克林静脉注射到脑梗塞兔模型体内, 研究其对微循环和血液的影响, 同时和其他几个扩血管药进行了比较。

### 材料和方法

试验动物: 2.6-3.5kg 的新西兰雌兔, 23℃饲养, 喂食固形食物和自来水。

新西兰雌兔用戊巴比妥钠 (25mg/kg, iv.) 麻醉, 插管进行人工通气, 调节潮气量和呼吸速率, 将动脉二氧化碳分压维持在正常范围内。静脉注射 2mg 潘库溴胺使肌肉放松 (适当补充潘库溴胺以维持肌肉放松)。将头部固定在立体定位器上, 颅骨切开 8 毫米直径的窗口, 使软膜微血管系统暴露并用玻璃纸覆盖。

#### 操作 1: 体内观察

将玻璃珠 (粒径 200-400 目, 15mg/只) 注射到兔右颈内动脉形成大脑动脉急性栓塞<sup>(1)</sup>。在颅骨切开窗口, 测量大脑血管内径, 用活体显微镜 (Nikon, Japan) 观察微循环。

将测量的软膜血管分成3类：小动脉（平均直径 $\geq 100\ \mu\text{m}$ ），较大的细小动脉（ $50\ \mu\text{m} \leq$ 平均直径 $< 100\ \mu\text{m}$ ）和较小的细小动脉（平均直径 $< 50\ \mu\text{m}$ ）。小动脉和较大的细小动脉的直径通过有显微标尺的显微镜测量，较小的细小动脉的整个动脉面积用影像分析器（微电脑影像装置，Canada, Imaging Research INC）计算。比较玻璃珠注射前和药物注射开始时的面积变化。

在同时进行的另外一个试验中，我们用反射式分光光度计（TS-2 Sumitomo Electric Industries, Japan）测量该颅骨窗口处的大脑血红蛋白含量（IHb）变化。

### 操作 2：体外观察

为测定血栓素 $A_2(TXA_2)$ 和前列环素 ( $PGI_2$ )，将导管穿过股动脉插入到降主动脉取循环血样。将循环血样 3000rpm 离心 10min 制备贫血小板血浆(Platelet-poor plasma, PPP)，并通过放免法测定 $TXB_2$  ( $TXA_2$ 的稳定代谢物)和 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ ( $PGI_2$ 的稳定代谢物)，结果用pg/ml 表示。

富血小板血浆(PRP)的制备是将循环血样通过 1000rpm 离心 10min 获得。在  $37^\circ\text{C}$  条件下，用血小板凝集计测定血小板凝集能力。通过加入  $10\ \mu\text{L}$  胶原蛋白(在 PRP 中 终浓度为  $10\ \mu\text{g/L}$ ) 促使血小板的凝集。

红细胞变形能力用 Millipore 过滤器测定。体外观察的血液取样操作见图 1。

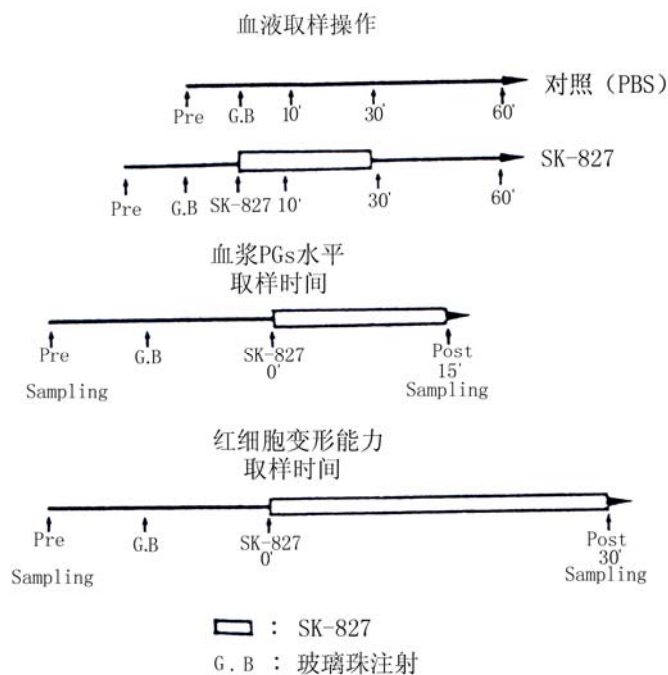


图 1 血液取样操作

**药品准备:**

尤瑞克林,  $5.0 \times 10^{-3}$  PNA U/kg(1.0 IU/kg), 0.11ml/min 静滴 30min。

尤瑞克林,  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg (2.5 IU/kg), 0.11ml/min 静滴 30min。

尼卡地平, 4.0  $\mu$ g/kg 静滴。

CDP-胆碱, 100 mg/kg, 0.11ml/min 静滴 30min。

对照 (磷酸盐缓冲液), 0.11ml/min 静滴 30min。

尤瑞克林和 CDP-胆碱用磷酸盐缓冲液稀释 (PBS: 0.05M, pH 7.0)。尼卡地平 (本实验室合成) 用生理盐水溶解。

用 Student 检验进行测定值的统计学分析, 差异有统计学意义的值在图中标示。

**结果****1、活体镜检结果。**

玻璃珠注射到颈内动脉后, 脑的小动脉和较大的细小动脉内径缩小了 20-30%, 1 小时后开始有所恢复。在玻璃珠注射后至给药前, 较小的细小动脉面积减少了 10-20%。

小动脉: 静脉给药后, 各组都有短暂的血管扩张。尤瑞克林  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg 组静脉给药 5min 后开始有血管扩张。尼卡地平组, 静脉给药 1min 后出现血管扩张。CDP-胆碱组, 静脉给药 10min 后出现血管扩张。尤瑞克林  $5.0 \times 10^{-3}$  PNA U/kg 组与对照组相比无显著差异 (图 2A)。

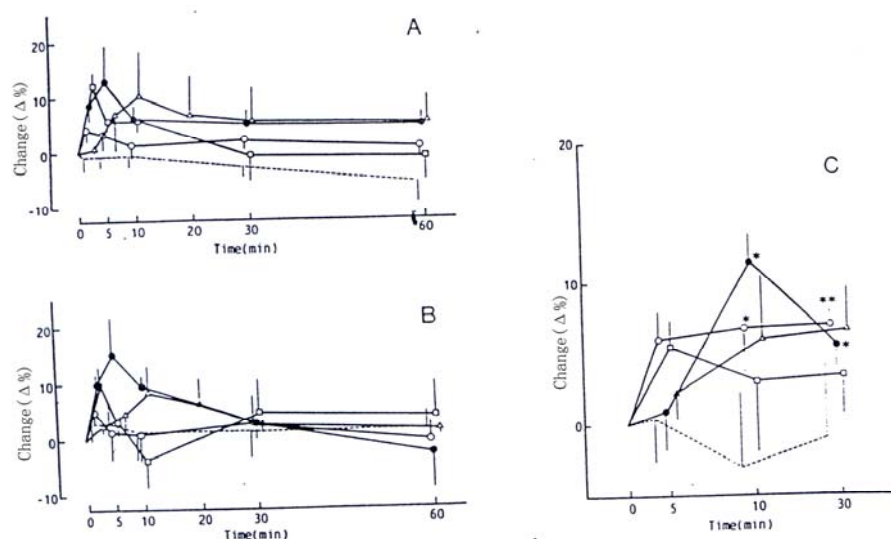


图 2 动脉血管大小随时间的变化

A) 小动脉 (平均直径  $\geq 100 \mu\text{m}$ ) 内径的变化: 在玻璃珠诱导的脑栓塞兔模型体内, 分别注射尤瑞克林 ( $5.0 \times 10^{-3}$ ,  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg 30min, iv.), CDP-胆碱 (100 mg/kg 30min, iv.), 尼卡地平 (4.0  $\mu$ g/kg, iv.) 后, 小动脉内径随时间的变化。...对照、○尤瑞克林  $5.0 \times 10^{-3}$  PNA U/kg、●尤瑞克林  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA

U/kg、□ 尼卡地平、△CDP-胆碱。每组 3—5 只动物，每点显示值为平均标准差±S.E。

- B) 较大细小动脉( $50\mu\text{m}\leq$ 平均直径 $<100\mu\text{m}$ )内径的变化: 在玻璃珠诱导的大脑栓塞兔子模型体内, 分别注射尤瑞克林 ( $5.0\times 10^{-3}$ ,  $1.25\times 10^{-2}$  PNA U/kg 30min, iv.), CDP-胆碱 (100 mg/kg 30min, iv.), 尼卡地平( $4.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$ , iv.) 后, 较大细小动脉内径随时间的变化。…对照、○尤瑞克林  $5.0\times 10^{-3}$  PNA U/kg、●尤瑞克林  $1.25\times 10^{-2}$  PNA U/kg、□尼卡地平、△CDP-胆碱。每组 3—5 只动物, 每点显示值为平均标准差±S.E。
- C) 较小细小动脉(平均直径 $<50\mu\text{m}$ )面积的变化: 在玻璃珠诱导的大脑栓塞兔子模型体内, 分别注射尤瑞克林 ( $5.0\times 10^{-3}$ ,  $1.25\times 10^{-2}$  PNA U/kg 30min, iv.), CDP-胆碱 (100 mg/kg 30min, iv.), 尼卡地平( $4.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$ , iv.) 后, 较小细小动脉面积随时间的变化。…对照、○尤瑞克林  $5.0\times 10^{-3}$  PNA U/kg、●尤瑞克林  $1.25\times 10^{-2}$  PNA U/kg、□尼卡地平、△CDP-胆碱。每组 2—3 只动物, 每点显示值为平均标准差±S.E。  
星号表示与对照相比存在显著差别(\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )

较大的细小动脉: 静脉给药后, 各组都有短暂的血管扩张。尤瑞克林,  $1.25\times 10^{-2}$  PNA U/kg 组静脉给药 5min后开始有血管扩张。尼卡地平组, 静脉给药 1min后出现血管扩张。CDP-胆碱组, 静脉给药 10min后出现血管扩张。尤瑞克林  $5.0\times 10^{-3}$  PNA U/kg组与对照组相比无显著差异 (图 2B)。

较小的细小动脉: 玻璃珠注射到颈动脉后, 较小的细小动脉的面积倾向减少。尤瑞克林  $1.25\times 10^{-2}$  PNA U/kg 组, 静脉给药 10min后较小的细小动脉面积显著增加。尤瑞克林  $5.0\times 10^{-3}$  PNA U/kg组, 静脉给药 30min后, 较小的细小动脉的面积十分显著的增加。尼卡地平组, 静脉给药 5min后, 较小的细小动脉的面积有些微增加, 继而效果不明显。CDP-胆碱组, 静脉给药 10min至 30min间, 较小的细小动脉面积增加不明显。玻璃珠注射到颈动脉后, 在活体镜检下可以看到所谓的游走血栓从在一些血管系统集合地从较小的细小动脉流到小静脉中。这种反射体在尤瑞克林给药组和对照组都可看见。

## 2、IHb:

玻璃珠注射入颈内动脉后, 大脑 IHb 降低了 20-30%, 随之又部分恢复。

对照组, IHb始终维持在静脉给药前的较低水平。尤瑞克林  $5.0\times 10^{-3}$  PNA U/kg给药组, 静脉注射 20min后, IHb显著增加。尤瑞克林,  $1.25\times 10^{-2}$  PNA U/kg 给药组, 静脉注射 5min后, IHb显著增加并维持在一个较高水平。尼卡地平给药组, 也是静脉注射 5min后, IHb显著增加。CDP-胆碱给药组, 静脉注射 20min后IHb开始增加, 45min后开始显著变化。(图 3)

## 3、血液学和生物化学结果:

玻璃珠注射入颈内动脉后, 血小板凝聚速率和血浆中TXB<sub>2</sub>和 6-keto-PGF<sub>1a</sub>水平显著增加。在尤瑞克林  $1.25\times 10^{-2}$  PNA U/kg给药组中, 血小板凝集能力被抑制 (图 4A)。在对照组和给药组中, 6-keto-PGF<sub>1a</sub>都相似地增加, 但是在尤瑞克林组中, TXB<sub>2</sub>被抑制 (图 4B)。

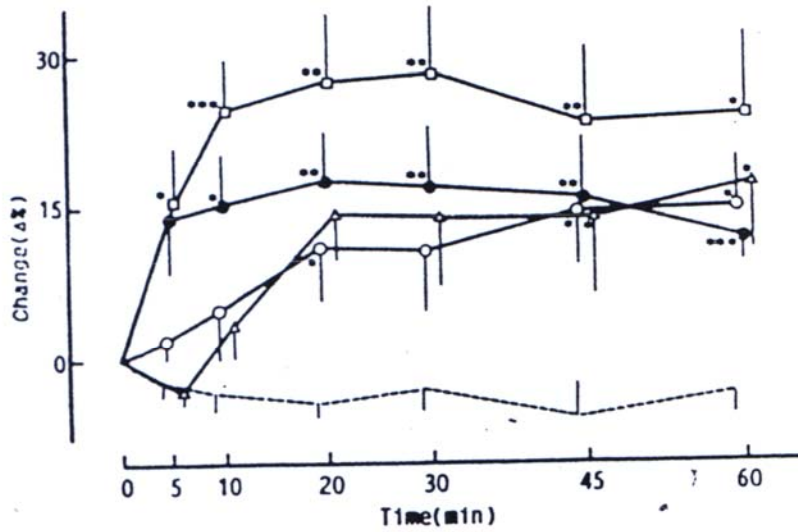


图3 IHB变化

D) IHB的变化: 在玻璃珠诱导的大脑栓塞兔子模型体内, 分别注射尤瑞克林 ( $5.0 \times 10^{-3}$ ,  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg 30min, IV), CDP-胆碱 (100 mg/kg 30min, iv.), 尼卡地平(4.0  $\mu$ g/kg, iv.)后, IHB随着时间的变化。... 对照、○尤瑞克林  $5.0 \times 10^{-3}$  PNA U/kg、●尤瑞克林  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg、□尼卡地平、△CDP-胆碱。每组 6-7 只动物, 每点显示值为平均标准差 $\pm$ S.E 星号表示与对照相比存在显著差别(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

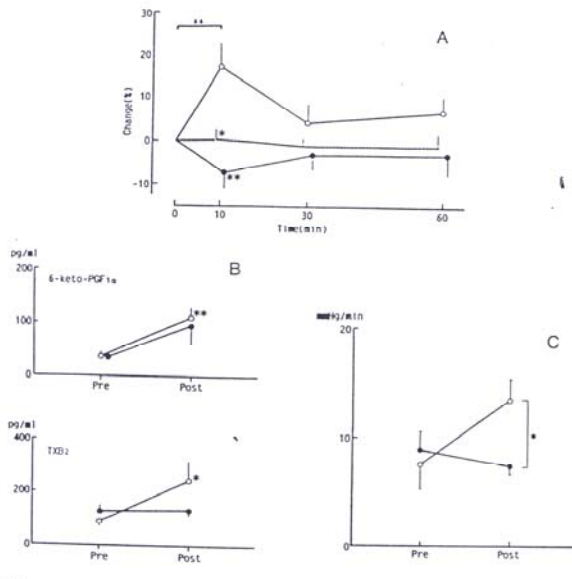


图4 尤瑞克林对血液参数的影响

A) 在玻璃珠诱导的大脑栓塞兔模型中, 尤瑞克林( $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg 30min, iv.)对弹性蛋白诱发的血小板凝集力的影响。...假手术组 ◆对照 ●尤瑞克林  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg。每组 5-8 只动物, 每点显示值为平均标准差 $\pm$ S.E。星号表示与对照相比存在显著差别(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ), +表示与注射前的比较存在显著差别(++ $P < 0.01$ )。

B) 在玻璃珠诱导的大脑栓塞兔子模型中, 尤瑞克林( $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg 30min, iv.)对血浆PG(6-keto-PGF<sub>1a</sub>, TXA<sub>2</sub>)水平的影响。◆对照 ●尤瑞克林  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg。每组 5-8 只动物, 每点显示值为平均标准差 $\pm$ S.E 星号表示与对照相比存在显著差别(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

- C) 在玻璃珠诱导的大脑栓塞兔子模型中, 尤瑞克林( $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg 30min, iv.)对红细胞变形能力的影响。◆对照 ●尤瑞克林  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg。每组 5—8 只动物, 每点显示值为平均标准差 $\pm$ S.E星号表示与对照相比存在显著差别(\* $P < 0.05$ )

玻璃珠注射到颈内动脉后, 红细胞变形能力显著降低。在尤瑞克林  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg 给药组中, 静脉注射 30min后, 红细胞变形能力显著恢复。

### 讨论:

很少报道用脑血管损伤模型在体研究激肽原酶的作用。因此本研究试图通过注射玻璃珠到兔颈内动脉产生大脑损伤模型, 研究尤瑞克林的作用<sup>(1)</sup>。由于兔的脑循环和灵长目动物的很相似, 没有怪网 (rete mirabile), 因此选择兔为研究对象。

给狗静脉注射激肽 (如缓激肽) 后, 大部分的激肽被血液和肺的激肽酶消除, 在动脉中几乎很难发现激肽<sup>(8)</sup>。然而, 当静脉注射胰激肽原酶时, 激肽在循环中可较长时间维持在稳定水平。在局部缺血组织, 由于无氧代谢使乳酸增加导致酸毒症。而激肽原酶最适pH为中性, 因此在局部缺血组织, 激肽消除缓慢、半衰期延长, 随之药理作用也增加。据此, 本研究中, 在玻璃珠注射到颈内动脉后, 静脉给予各种药物到动物模型中, 5min后检测药物对软膜动脉的作用。

尤瑞克林  $5.0 \times 10^{-3}$  PNA U/kg静脉给药组, 小动脉和较大的细小动脉扩张效果不明显(图 2A,2B)。尤瑞克林  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg静脉给药组, 三种类型的血管都有扩张 (图 2C)。从这些结果看, 尤瑞克林对小血管的扩张作用同参照药物的扩张作用基本相同。

玻璃珠注射到颈内动脉后, 各组 IHb 下降 (图 3)。在活体镜检下观察到 IHb 的变化和微动脉的收缩变化相应(图 2C)。在两个尤瑞克林给药组、尼卡地平给药组和 CDP-胆碱给药组中, IHb 均显著的增加。这样看来, 尤瑞克林对微血管扩张作用和其他药物相似。

我们前面提到的注射到兔颈内动脉的玻璃珠, 不仅会产生栓塞阻碍脑血管, 而且会引起血管内皮细胞受损 (由于玻璃珠的不规则形状引起), 进而激活血小板。因此活体镜检时, 在血管内观察的反射体可被认为是血小板凝集块<sup>(1)</sup>。我们也证明了血小板凝集被加速<sup>(1)</sup>。临床上, 脑血管损伤病人的血小板凝集增加, 红细胞变形能力下降。<sup>(9)</sup> 本研究中, 尽管活体镜检下尤瑞克林给药组中有反射体, 但体外实验结果显示血小板凝集速率降低(图 4A), 揭示尤瑞克林能抑制血小板的凝集。而且尤瑞克林还能使红细胞变形能力恢复。(图 4C)

玻璃珠静脉注射到颈内动脉后, 体内 6-keto-PGF<sub>1a</sub>和TXB<sub>2</sub>显著增加 (图 4B)。尤瑞克林,  $1.25 \times 10^{-2}$  PNA U/kg给药组中, 尽管 6-keto-PGF<sub>1</sub>没有受到影响, 但和对照组比, TXB<sub>2</sub>显

著的被抑制。TXA<sub>2</sub>能恶化局部缺血的微循环、增加大脑局部缺血和水肿<sup>(10)</sup>。本实验显示 尤瑞克林能部分抑制TXB<sub>2</sub>增加，从而揭示尤瑞克林可改善大脑微循环。

分析认为尤瑞克林扩张血管的作用本质上不同于尼卡地平和 CDP-胆碱。

钙拮抗剂具有扩张脑血管<sup>(11)</sup>和增加大脑血流量的作用<sup>(12)</sup>。临床上，这类药物用于阻止蛛网膜下腔出血引起的血管痉挛和缓解大脑局部缺血症状，广泛用于增加脑栓塞急性期的血流。

本研究中，尼卡地平对小动脉有些微的扩张作用和显著的增加血流的作用（图 2A.3）。但对细小动脉没有明显影响（图 2C），因此尼卡地平扩张血管的作用只限上面提到的小动脉。

对缺血小鼠，CDP-胆碱能改善其神经紊乱和脑电图的变化<sup>(14)</sup>。注射CDP-胆碱能改善猫的硬膜外压<sup>(15)</sup>。本研究根据临床剂量，给兔静脉注射 10mg/kg CDP-胆碱，对三种软膜血管都没有作用（数据略）。静脉注射 100mg/kg CDP-胆碱，10min后小动脉和较大的细小动脉都出现扩张，并伴有大脑血流增加。（图 2，3）

CDP-胆碱可影响膜的结构、改变线粒体中的代谢和减轻缺血损伤<sup>(16)</sup>。CDP-胆碱对血管活性作用主要由代谢机制介导，这也可从本研究中脑血管扩张作用的延迟现象反映出来。

对正常动物，大多数扩血管药物可以增加大脑血流，但是在病理生理条件下，它们的作用发生变化。它们甚至通过扩张正常血管来减少受伤组织的血流<sup>(17)</sup>。相反，本研究通过活体镜检观察，证明尤瑞克林在大脑的受伤部位通过选择扩张细小动脉来增加血流（图 2）。IHb值的升高也显示微动脉面积的增加不是由于血流的凝滞（图 3）。在注射了玻璃珠的循环血中，尤瑞克林抑制血小板凝集能力的增加和红细胞变形能力的降低（图 4A,4C）。同时，尤瑞克林抑制血液中TXA<sub>2</sub>的升高。在我们的大脑栓塞动物模型中，尤瑞克林的这些作用都有益于大脑微循环的改进。

#### 参考文献：

1. Nagano H. Suzuki T. Hayashi M. and Asano M: Cerebral microcirculatory changes after cerebral embolization induced by glass bead injection in rabbits. *Angiology*(in press).
2. Chand N: Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cells. *Science* 213:1376-1379,1981.
3. Ondetti Ma and Cushman DW: Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annu Rev Biochem* 51:283-308, 1982
4. Sekiya A. Nakashima M and Meada K: Studies on the vascular action of bradykinin. *Japan J Pharmacol.* 21:8 7-95,1971.

5. Kamitani T, Marcia HL and Earl FE: Effect of leukotrienes, 12-HETE, histamine, bradykinin, and 5-hydroxytryptamine on in vivo rabbit cerebral arteriolar diameter. *J Cereb Blood Flow Metab.* 554-559. 1985
6. Wahl M, Young AR and Edcinson L: Effects of bradykinin on pial arteries and arterioles in vitro and in situ. *J Cereb Blood Flow Metab.* Jun;3(2):231-237. 1983
7. Abbound FM: Special characteristics of the cerebral circulation. *Fed Proc* 40:2296-2230.
8. Katori M: Roles and characteristics of endogenous.....
9. Reid HL: Impaired red cell deformability in peripheral vascular disease. *Lancet*: 666-667. 1976.
10. Katayama Y, Suzuki S and Shimizu J: Effect of bilateral common carotid artery ligation on prostaglandin levels (TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) in spontaneously hypertensive rats (SHRSP, SHRSR) and normotensive rats (WKY). *Brain and Nerve (Tokyo)*; 38(6):571-578 1986
11. Pial arterial vasodilation by intravenous nimodipine in cats. *Arzneimittel Forschung.* 30:1423-1425, 1981.
12. Roy MV, Dempsy RJ and Meyer KL: Effects of verapamil and diltiazem on acute stroke in cats. *J Neurosurg* 63:929-936, 1985.
13. Auer LM: Acute surgery of cerebral aneurysms and prevention of symptomatic vasospasm. *Acta Neurochir* 69:273-281, 1983.
14. Nagalka A: Effects of CDP-choline (Nicholin) on neurological deficits in stroke-prone spontaneously hypertensive rats with experimental cerebral ischemia. *Jpn Pharmacol Ther* 13:5031-5041, 1985.
15. Algate DR, Beard DJ and Sacristan A: Study of the effects of oral administration of CDP-choline in EEG changes and lethality induced by epidural compression in the anesthetized cat. *Arzneim Forsch/Drug Res* 33:1013-1016. 1983.
16. Fukuda N, Ikeda K and Saji Y: Effect of CDP-choline (Nicholin) on the neurological deficits in the rats with experimental cerebral ischemia. *Jpn Pharmacol Ther* 13:219-227, 1985.
17. Hoedt-Rasmussen K, Shinbo JE and Paulson O: Regional cerebral blood flow in acute apoplexy: The <luxury perfusion syndrome> of brain tissue. *Arch Neurol* 17:271-281, 1967.