

· 基础研究 ·

对海风藤酮治疗实验性缺血再灌注脑损伤的磁共振波谱分析

王雪松 薛峥 刘买利 王伟

【摘要】目的 探讨血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)受体拮抗剂海风藤酮对活体实验性脑梗死大鼠脑组织氮-乙酰天门冬氨酸(NAA)及乳酸(Lactic Acid, Lac)等代谢产物的影响。**方法** 建立活体动物大脑中动脉栓塞再灌模型,采用磁共振波谱技术,分别对缺血再灌注组及海风藤酮、银杏苦内酯治疗组鼠脑组织 NAA 及 Lac 等代谢产物变化进行观察和比较。**结果** 在缺血 60 min 再灌注 1 h、3 h、6 h 海风藤酮均能有效减少脑缺血后 Lac/(PCr + Cr)比值的上升和 NAA/(PCr + Cr)比值的下降,与银杏苦内酯治疗组比较无差异。**结论** 海风藤酮与传统的 PAF 受体拮抗剂银杏苦内酯均具有显著的缺血后脑保护作用。

【关键词】 磁共振波谱; 海风藤酮; 脑缺血

¹H-MRS study of the neuroprotective effect of Kadsurenone on rat brain with cerebral ischemia WANG Xue-song*, XUE Zheng, LIU Mai-li, WANG Wei. *Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】Objective To observe the effect of Chinese traditional medicine Kadsurenone on the concentration of NAA and lactate after cerebral ischemia and reperfusion in rat. **Methods** Animal models of cerebral ischemia were established by middle cerebral artery occlusion (MCAO). Compared with ischemia/reperfusion and Ginkgolide-treated groups, we observed the changes of NAA and lactate in Kadsurenone-treated group by ¹H-MRS examination. **Results** Kadsurenone could decrease the concentration of lactate and prevent the decline of the concentration of NAA after cerebral ischemia/reperfusion. **Conclusion** As platelet-activating factor receptor antagonists, both Kadsurenone and Ginkgolides showed remarkable neuroprotective effect.

【Key words】 Magnetic resonance spectroscopy (MRS); Kadsurenone; Cerebral ischemia

磁共振质子波谱技术(¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹H-MRS)能真正无损伤地研究活体组织代谢物的相对或绝对含量以及动力学特性,近几年来在国、内外迅速发展。结合磁共振成像技术(Magnetic resonance imaging, MRI)对病理解剖图象的准确定位,利于明确机体正常或疾病状态下的各种生理、生化过程的信息,对疾病的诊治提供较准确的判断^[1]。而血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)是近年日益受到重视的一种与花生四烯酸代谢密切相关的内源性活性脂质介质,其受体拮抗剂被认为是现阶段最有希望能逆转缺血再灌注期脑损害的药物之一。研究表明中草药纯品海风藤酮不仅具有拮抗 PAF 的作用,而且还能明显抑制缺血再灌注期鼠脑组织磷脂酶 A₂(phospholipase A₂, PLA₂)活性和自由基的

生成,对实验性脑梗死有明显的治疗作用^[2]。目前有关海风藤酮对活体动物缺血脑组织脑保护作用的磁共振波谱研究尚未见报道,因此我们采用活体定域¹H-MRS 这一非损伤性的先进实验方法,连续动态观察研究海风藤酮对活体脑梗死动物缺血脑组织氮-乙酰天门冬氨酸(NAA)及乳酸(Lactic Acid, Lac)等代谢产物的影响,并与传统的 PAF 受体拮抗剂银杏苦内酯相对比,从分子水平上阐明海风藤酮对活体脑梗死动物的脑保护作用机制。

材料和方法

一、材料

海风藤酮(北京医科大学药学院),银杏苦内酯(德国舒培大药厂),Brucker 公司超导 4.7 T 磁共振波谱仪(Biospec47/30)(中国科学院武汉物理与数学研究所波谱与原子分子物理国家重点实验室)。

二、实验分组

Wistar 大鼠 24 只,雌、雄各 12 只,体重 220 ~ 260 g(由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),自然喂养,随机分为假手术组、缺血再灌注组、海风藤酮组、银杏苦内酯组,每组大鼠 6 只。海风藤酮组

基金项目:卫生部重点装备基金项目(No. 20012433),国家自然科学基金资助项目(No. 39870260),波谱与原子分子物理国家重点实验室资助项目(No. T152208)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科(王雪松、刘买利、王伟);中国科学院武汉物理与数学研究所波谱与原子分析物理国家重点实验室(王雪松、薛峥)

于缺血前、后经腹腔注射海风藤酮各 1 次,每次 20 mg/kg 体重;银杏苦内酯组于缺血前、后同样经腹腔注射银杏苦内酯各 1 次,每次 20 mg/kg 体重。

三、方法

(一)模型的制作

建立大鼠大脑中动脉栓塞/再灌注模型,参照 Longa 等^[3]报道方法略加改进,具体方法如下:用 10% 乌拉坦(1 ml/100 g 体重)麻醉大鼠后,仰卧固定取颈前正中切口,分离右侧颈总、颈外及颈内动脉,结扎颈外动脉。在距颈总动脉分叉 2 mm 处剪一小口,尼龙线栓由此进入颈内动脉,造成大脑中动脉缺血。栓子插入深度为 18~22 mm,留 10 mm 栓子于皮外,缝合皮肤。术后肌注青霉素 20 000 U,栓子为直径 0.22 mm 市售尼龙鱼线,长度 40 mm,前端 5 mm 用聚胺脂包被,直径 0.24~0.26 mm。假手术组栓子插入仅 10 mm,不足以栓塞大脑中动脉。缺血模型动物清醒后具备同侧 Horner 氏征阳性,提尾时左前肢屈曲内收者方列为研究对象。采用¹H-MRS 方法研究海风藤酮治疗组缺血 60 min 后再灌注 1 h、3 h、6 h 鼠脑内、外侧尾壳核等兴趣区(regions of interest, ROIs)的 NAA、Lac 等代谢物的变化规律,并与缺血再灌注、银杏苦内酯治疗组相比较。

(二)¹H-MRS 检测

采用 Bruker 公司超导 4.7 T 磁共振波谱仪(Bio-spec47/30),孔径 30 cm,最大梯度强度约 100 mT/m。体线圈有效孔径 10 cm,受检动物俯卧位,取标准轴位固定。常规扩散加权象($b = 120\ 000\ \text{s/cm}^2$)病理定位,在 MRI 轴面图象上选取前囟前 0.2 mm,耳间线前 8.6 mm 层面进行取样。兴趣区选取内、外侧尾壳核,固定容积为 $1 \times 1 \times 1\ \text{mm}^3$;序列选择点解析波谱(point resolved spectroscopy, PRESS)采集波谱,TR = 1.0 s,TE = 136 ms,波宽 1 500 Hz;采集点数 2 048,采样累加的平均次数 1 024 次;采集时间约 17.07 min。采集的波谱对各代谢物进行基线校正后,计算谱峰下积分面积。

(三)分析指标与统计学分析

正常鼠脑¹H-MRS 的三个主要波峰:NAA 峰,化学位移位于 2.0 ppm 处,主要物质为氮-乙酰天门冬氨酸;磷酸肌酸和肌酸(phosphocreatine + Creatine, PCr + Cr)峰位于 3.0 ppm 处,Cho 峰位于 3.2 ppm 处,主要

含磷酸胆碱和磷脂酰胆碱。正常情况下脑内观测不到 Lac 峰,而在脑组织缺血或者脑细胞无氧代谢糖酵解增多时,才出现 Lac 的堆积,其化学位移在 1.3 ppm 处。用积分方法测各峰下面积并分别计算 NAA/(PCr + Cr)、Cho/(PCr + Cr)、Lac/(PCr + Cr)的相对比值,进行相对含量分析。将所得计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验。

结 果

缺血再灌注组于缺血 60 min 后再灌注 1 h、3 h、6 h 均出现明显的 NAA 峰下降,并伴有倒置的 Lac 峰,提示脑内无氧代谢增加、神经元受损。海风藤酮治疗组在相同时间点能有效减少脑缺血后 Lac/(PCr + Cr)比值的上升和 NAA/(PCr + Cr)比值的下降,与银杏苦内酯治疗组比较差异无显著性意义($P > 0.05$),与缺血再灌注组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)(表 1)。

讨 论

¹H-MRS 是近年来发展较快的一种新的 MR 技术。它是利用核磁共振现象和化学位移作用,对活体病变部位代谢、生化状态进行无损性研究。

急性缺血性脑血管病的发生、发展包括一系列复杂的病理生理及生物化学改变。其病理发展过程、转归与脑内各种代谢物质水平的变化密切相关。而 PAF 是一种内源性活性脂质介质,为缺血性尤其是缺血再灌注性脑组织病理损害过程中重要的活性介质和第二信使物质,直接介导并参与了脑梗死后脑组织的缺血性损害^[4]。因此是否能在脑梗死过程中减少 PAF 介导的病理性损害,直接关系到缺血性脑损伤的发展和转归。大量研究证实 PAF 受体拮抗剂对脑梗死继发缺血或再灌注期脑损害有明显的治疗作用,PAF 受体拮抗剂被认为是现阶段最有希望能逆转缺血再灌注期脑损害的药物之一。海风藤酮(Kadsurenone)为一天然植物类特异性 PAF 受体拮抗剂海风藤[Piper Kadsura(choisy) Ohwi]的单一成分,具有极强的拮抗 PAF 活性的作用。但迄今为止,对中药海风藤酮脑保护作用机制的研究均局限在脑组织匀浆、脑组织切片等断头动物标本,采用的多是组织病理学、免疫组织化学、分子生物学等实验研究方法,只能离体、间断的、不连

表 1 各实验组脑代谢相对数值表($\bar{x} \pm s$)

组 别	再灌注 1 h		再灌注 3 h		再灌注 6 h	
	NAA	Lac	NAA	Lac	NAA	Lac
假手术组	1.68 ± 0.32	0.03 ± 0.04	1.57 ± 0.12	0.03 ± 0.13	1.58 ± 0.13	0.02 ± 0.11
缺血再灌注组	0.55 ± 0.23	1.09 ± 0.34	0.57 ± 0.12	0.99 ± 0.37	0.58 ± 0.13	1.16 ± 0.27
海风藤酮组	1.07 ± 0.26 *	0.08 ± 0.09 *	0.74 ± 0.15 *	0.11 ± 0.13 *	0.78 ± 0.27 *	0.12 ± 0.11 *
银杏苦内酯组	0.82 ± 0.21 *	0.15 ± 0.17 *	0.93 ± 0.21 *	0.11 ± 0.09 *	0.86 ± 0.16 *	0.15 ± 0.09 *

注:与缺血再灌注组比较,* $P < 0.01$

贯的观察研究药物对脑梗死实验动物的影响。而活体¹H-MRS 突破传统的生化分析局限性,能够在接近正常生理状态下,对活体动物的器官、组织的物质和能量代谢直接进行动态跟踪观测与研究^[5]。为此,本研究根据前期工作基础,针对以上环节,采用¹H-MRS 等非损伤性先进实验方法,连续动态观察研究海风藤酮对活体脑梗死动物缺血脑组织 NAA 及 Lac、胆碱等磷代谢产物等方面的影响。本实验结果显示在缺血再灌各个时间点海风藤酮能有效减少 Lac 的生成和 NAA 的含量,与银杏苦内酯治疗组比较差异无显著性意义,与单纯缺血再灌组比较差异有显著性意义。

¹H-MRS 为近年来发展较快的新技术,根据各化合物的化学位移不同,应用¹H-MRS 技术可检测出生物体特定区域的化合物。NAA 主要存在于神经细胞内,被称为神经元的内标志物,其含量多少反映神经元的功能状况^[6]。NAA 含量的下降提示神经元受损。正常脑组织中细胞能量代谢以有氧呼吸为主,一般情况下不能检测出 Lac。但在脑组织缺血缺氧时,无氧糖酵解增加 Lac 大量产生。Lac 虽然可作为供能物质参与脑组织的生化代谢过程,但 Lac 本身对神经细胞具有直接的损伤作用,并加剧细胞毒性脑水肿。本实验中海风藤酮能有效减少脑缺血后 Lac 的生成和 NAA 含量的下降,表明海风藤酮对缺血神经元具有直接的保护作用,并通过抑制 Lac 的生成来间接减轻 Lac 所导致的神经元细胞毒性脑水肿,具有显著的神经元保护与防治细胞毒性作用。海风藤酮如何发挥直接的神经元保护作用及通过何种途径减少缺血区 Lac 的生成?推测可能与以下几个方面有关:①直接拮抗 PAF 引起的血小板聚集、血栓形成和脑血管舒缩功能障碍导致的脑血流量下降;②拮抗 PAF 对神经细胞的直接毒性作用;③通过抑制脑缺血/再灌注期 PLA₂ 的活化,降低 PLA₂ 活性,减少 PAF 与血栓烷 A₂ 等磷脂代谢产物的生成、释放,而这些脂质介质与脑缺血/再灌注期继发的病理损害过程有密切的关系^[2];④通过拮抗 PAF 激活的白细胞和黄嘌呤氧化酶系统,抑制超氧阴离子及

羟自由基的大量释放,并能增加超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 的活性,使自由基清除量增加;⑤通过拮抗 PAF 激活的缺血脑组织细胞损害的“第二信使”物质如二酰基甘油所导致的神经细胞内钙离子增加,降低缺血后神经细胞内的钙超载;⑥白细胞与内皮细胞相互作用可使血管通透性增加,血浆外渗,形成血管源性脑水肿。海风藤酮通过抑制脑缺血时 PAF 对白细胞、内皮细胞的活化及白细胞与内皮细胞间的粘附,减轻脑缺血后的炎性病理损害^[7];⑦兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAAs) 是引起缺血性脑损伤的重要因素之一,EAAs 的大量释放引起神经元细胞膜表面的钙通道开放,导致钙离子的过度内流,加重缺血神经元的损害。研究表明海风藤酮能显著降低缺血后脑组织内 EAAs 的含量及释放,减轻脑缺血后兴奋性神经递质的神经毒性作用^[8]。

参 考 文 献

- 1 Franke C, Brinker G, Pillekamp F, et al. Probability of metabolic tissue recovery after thrombolytic treatment of experimental stroke: a magnetic resonance spectroscopic imaging study in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 583-591.
 - 2 王伟, 董为伟. 海风藤酮对缺血鼠脑 PLA₂、IP₃ 及自由基形成的影响. *中华神经科杂志*, 1997, 29: 325-328.
 - 3 Longa EZ, Weinstein PR, Carlsons S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
 - 4 Feuerstein G, Yue TL, Lysko PG. Platelet-activating factor. A putative mediator in central nervous system injury? *Stroke*, 1990, 21: 90-94.
 - 5 Henriksen O. MR spectroscopy in clinical research. *Acta Radiol*, 1994, 35: 96-116.
 - 6 Urenjak J, Williams SR, Gadian GD, et al. Specific expression of N-acetyl aspartate in neurons, oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitors and immature oligodendrocytes in vitro. *Neurochemistry*, 1992, 59: 55-61.
 - 7 王伟, 王雪松, 阮旭中. 海风藤新木脂素类成分对鼠脑缺血后细胞间粘附分子-1 及其 mRNA 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 133-136.
 - 8 邓志宽, 王东武, 何英. 海风藤对犬脑干缺血兴奋性氨基酸含量的影响及其缺血损伤的保护作用. *中国药理学杂志*, 1997, 32: 276-278.
- (收稿日期: 2004-02-23)
(本文编辑: 阮仕衡)

· 消息 ·

中华医学会新增两大医学期刊系列

根据卫生部办公厅(卫办新发[2003]93号)文件精神,卫生部主管的 22 种国外医学系列杂志和新批准创刊的国外医学移植与血液净化分册,共 23 种杂志划归中华医学会主办。同时划归中华医学会主办的还有 7 种“中国”字头的医学杂志和《小儿急救医学》和《医师进修杂志》共 9 种杂志。为了方便管理,这 32 种杂志改由中华医学会主办后,分别称为“中华医学会国外医学系列杂志”和“中华医学会中国医学系列杂志”。其中,新加盟的国外医学系列杂志以综述国外医学学术新进展为主体,中国医学系列杂志以广大基层医务工作人员为读者对象。

中华医学会是新加盟的 32 种杂志的第一主办单位,杂志原承办单位为第二主办单位。为了加强对新增两大系列期刊的管理,学会成立了中华医学会国外医学和中国医学系列杂志管理办公室和中华医学会杂志工作指导委员会。中华医学会将从抓杂志质量入手,深化改革,为尽早实现集团化和产业化的经营管理体制,为打造中华医学会精品期刊系列而继续努力。