

# 吡拉格雷钠对脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经功能的改善作用及机制研究<sup>Δ</sup>

孙翔\*,李庆林<sup>#</sup>(安徽中医药大学科研实验中心/新安医学教育部重点实验室,合肥 230038)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)07-0889-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.07.07

**摘要** 目的:研究吡拉格雷钠对脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经功能的改善作用及相关机制。方法:将72只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组(地佐环平 0.8 mg/kg)和吡拉格雷钠低、中、高剂量组(20、30、45 mg/kg),每组12只。除假手术组大鼠行假手术外,其余各组大鼠均采用大脑中动脉结扎诱导脑缺血再灌注损伤模型。术后2 h尾静脉注射相应药物,假手术组和模型组大鼠注射等量生理盐水,连续给药6 d,给药间隔均为24 h。再灌注24 h和末次给药后,评估大鼠的神经功能缺陷评分和姿势反射评分,采用微正电子发射断层扫描评估脑损伤情况(包括全脑、岛状皮层、壳核、纹状体、体细胞皮层、杏仁核、运动皮层)。然后处死大鼠,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色后观察脑梗死情况并计算脑梗死体积,酶联免疫吸附试验检测其脑组织中Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性和谷氨酸(Glu)含量。结果:与假手术组比较,模型组大鼠缺血再灌注后24 h和末次给药后的神经功能缺陷评分、姿势反射评分均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),脑缺血再灌注24 h与末次给药后脑组织的SUV、全脑及各不同脑区的右左脑SUV比值均明显降低( $P<0.01$ );末次给药后脑梗死体积百分数明显升高( $P<0.01$ ),脑组织中Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶和Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性明显降低( $P<0.01$ ),Glu含量明显升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,吡拉格雷钠低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠上述指标均明显改善( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:吡拉格雷钠对大鼠脑缺血再灌注损伤和神经功能有改善作用,这可能与上调脑组织中Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶和Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性和下调Glu含量有关。

**关键词** 吡拉格雷钠;脑缺血再灌注损伤;神经功能;大鼠;机制

## Improvement Effects and Mechanism Study of Pyragrel Sodium on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

SUN Xiang, LI Qinglin (Research Laboratory Center, Anhui University of TCM/Key Lab of Xin'an Medical Medicine, Ministry of Education, Hefei 230038, China)

- [3] 孙宇扬.双参宁心胶囊干预心肌缺血的分子机制研究[D].北京:中国中医科学院,2006.
- [4] 于震,刘建勋,李欣志,等.双参宁心胶囊对小型猪介入性心肌缺血的保护作用[J].中国中药杂志,2007,32(16):1695-1699.
- [5] 孙宇扬,刘建勋,吴晓洋,等.双参宁心方血清药物化学和抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的实验研究[J].中国中医药信息杂志,2006,13(5):36-37.
- [6] 刘建勋,于震,李欣志,等.双参宁心胶囊对心导管介入血栓法制备小型猪心肌缺血模型的影响[J].中国中西医结合杂志,2006,26(8):728-731.
- [7] 尹音,王峰,徐向阳.丹酚酸B研究进展[J].中国药师,2007,10(10):1034-1037.
- [8] 唐逸丰.延胡索化学成分与药理作用研究概况[J].中医临床研究,2018,10(23):144-146.
- [9] 徐婷,金昔陆,曹惠明.延胡索乙素药理作用的研究进展[J].中国临床药学杂志,2001,10(1):58-60.
- [10] 贺凯,高建莉,赵光树.延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J].中草药,2007,38(12):1909-1912.
- [11] 王海岭,张艳萍,王传升,等. HPLC法同时测定舒眠胶囊中酸枣仁皂苷A和槲皮苷的含量[J].中国药房,2013,24(8):739-741.
- [12] 戴金明,林徐剑,施晓萍,等.丹参药材用不同水温超声提取后丹酚酸B的含量测定[J].药学研究,2016,35(8):460-462.
- [13] 王红,田明,王一,等.高效液相色谱法测定延胡索总生物碱滴丸中巴马汀碱和脱氢紫堇碱含量[J].中医药学报,2013,41(1):63-64.
- [14] 姜晓燕,张琳,窦志华,等.反相高效液相色谱法同时测定丹参中5种成分含量[J].医药导报,2016,35(9):997-1000.
- [15] 侯晓琳,刘芳馨,鲍慧玮,等.延冰片中脱氢紫堇碱的含量测定[J].中国民族民间医药,2015,24(18):17-19.
- [16] 姚建标,叶伟峰,王如伟.延胡索中脱氢延胡索碱的含量测定方法研究[J].中国药业,2008,17(24):18.
- [17] 赵静宜,陆洋,杜守颖,等.双波长HPLC同时测定延胡索中3种生物碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):107-110.

Δ 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项(No.2012ZX09102-101-005)

\* 硕士。研究方向:神经药理学。电话:0551-65169371。E-mail:1728720024@qq.com

# 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:分子药理学。电话:0551-65169371。E-mail:qinglin\_lee@hotmail.com

(收稿日期:2018-11-07 修回日期:2019-01-01)

(编辑:刘萍)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the improvement effect and related mechanism of pyragrel sodium on nerve function of cerebral ischemia-reperfusion injury model rats. METHODS: Totally 72 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, positive control group (dizocilpine 0.8 mg/kg), pyragrel sodium low-dose, medium-dose and high-dose groups (20, 30, 45 mg/kg), with 12 rats in each group. Except sham operation group received sham operation, rats in the other groups were treated with middle cerebral artery ligation to induce cerebral ischemia-reperfusion injury model. The rats in the sham operation group and the model group were injected with the constant volume of normal saline, for consecutive 6 d, and the interval of administration was 24 hours. After 24 h reperfusion and last medication, neurological deficit score and postural reflex score in rats were evaluated. The situation of cerebral injury (including whole brain, insular cortex, putamen, striatum, somatic cortex, amygdala, motor cortex) was evaluated by using micropositron emission tomography. The rats were sacrificed, and the situation of cerebral infarction was observed by TTC and cerebral infarction volume was calculated.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ,  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  activity and Glu content were detected by ELISA. RESULTS: Compared with sham operation group, neurological deficit score and postural reflex score increased significantly in model group 24 h after ischemia-reperfusion and after last medication ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). After 24 hours of cerebral ischemia-reperfusion and the last medication, SUV of brain tissue, SUV ratio of right left brain of different cerebral areas were decreased significantly ( $P<0.01$ ). After last medication, the percentage of cerebral infarction volume was increased significantly ( $P<0.01$ ); the activities of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  were decreased significantly ( $P<0.01$ ), while Glu content was increased significantly ( $P<0.01$ ). Compared with model group, above indexes of pyragrel sodium low-dose, medium-dose and high-dose group, positive control group were all improved significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). CONCLUSIONS: Pyragrel sodium can improve cerebral ischemia-reperfusion injury and nerve function, which is related to the activity up-regulation of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ , the down-regulation of Glu content.

**KEYWORDS** Pyragrel sodium; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Nerve function; Rats; Mechanism

脑卒中是一种急性脑血管疾病,是脑血管破裂或血管阻塞导致血液无法流入大脑引起的脑部损伤。在脑卒中的两个主要亚型中,缺血性脑卒中的发生率高于出血性脑卒中<sup>[1]</sup>。缺血性脑卒中具有发病率高、病死率高、致残率高的特点,已经是成年人致残的主要原因之一。尤其是脑卒中缺血后的再灌注损伤,是导致脑部损伤的主要原因,其中神经损伤最为严重。目前,缺血性脑卒中的治疗主要包括手术治疗和药物治疗,药物治疗又分为溶栓治疗、抗血小板治疗、早期抗凝治疗和应用神经保护剂等<sup>[2]</sup>,其中,应用神经保护剂是急性缺血性脑卒中特异性治疗的主要方法。

吡拉格雷钠(Pyragrel sodium)是一种以中药活性成分川芎嗪和阿魏酸为基本骨架设计合成的新型化合物<sup>[3]</sup>。前期研究表明,吡拉格雷钠可以扩张血管、抑制血小板聚集、防止血栓形成、增强组织抗氧化作用,并具有显著的抗脑缺血作用,此外,吡拉格雷钠还具有促进微循环血流、改善内皮损伤和神经功能的作用<sup>[4-5]</sup>。但是吡拉格雷钠对于脑缺血再灌注损伤和神经功能是否也有保护作用尚不清楚。为了给临床试验提供参考,本研究通过神经学评分、微正电子发射断层扫描(Micro-PET)和2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色评估吡拉格雷钠对脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经功能的改善作用,以证实吡拉格雷钠的神经保护作用。同时,对吡拉格雷钠的神经保护机制进行初步探索。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HH-2 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);FSH-

2A 可调高速匀浆机(金坛市大盛实验仪器有限公司);80-2 台式低速离心机[上海医疗器械(基团)有限公司手术器械厂];JA3003 电子天平(上海精科天平仪器厂);Infinite M 200 PRO 全波长酶标仪(瑞士 Tecan 公司);Atomlab™ 500 活度计(美国 Biodex 公司);Inveon Micro-PET 仪(美国西门子公司);VIP 3000 麻醉机(美国 MatrX 公司)。

### 1.2 药品与试剂

吡拉格雷钠原料药(合肥医工医药有限公司,批号:20170616,纯度:99.3%);地佐环平原料药(批号:080M4610V,纯度:99.5%)、TTC 均购自美国 Sigma 公司;生理盐水(山东科瑞药业有限公司,批号:20170125);PET 扫描显像剂氟化脱氧葡萄糖(<sup>18</sup>F-FDG)[米度(南京)生物技术有限公司];谷氨酸(Glu)检测试剂盒、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 酶酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(上海宝曼生物科技有限公司)。

### 1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠 72 只,♂,8 周龄,体质量 200~250 g,购自浙江省实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2017-0001。

## 2 方法

### 2.1 缺血再灌注损伤模型的复制

采用大脑中动脉结扎复制大鼠脑缺血再灌注损伤模型<sup>[6]</sup>。通过腹膜注射 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉大鼠,暴露左颈总动脉(CCA)和颈外动脉(ECA),然后将尼龙缝合线从 CCA 插入颈内动脉(ICA)并向前移动,以封闭左大脑中动脉(MCA)的根部直至出现轻微阻

力。在缺血2 h后,除去尼龙缝合线以恢复血流(再灌注)持续24 h。假手术组大鼠接受相同的手术,但未插入尼龙缝合线。在整个过程中保持大鼠体温在(37.0±0.5)℃。

## 2.2 分组

将大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组和吡拉格雷钠低、中、高剂量组,每组12只,其中6只用于脑组织TTC染色进行脑梗死体积检测,剩余6只用于检测脑组织匀浆中Glu含量和ATP酶活性。

## 2.3 给药方法

吡拉格雷钠低、中、高剂量组大鼠按“2.1”项下方法复制脑缺血再灌注损伤模型后尾静脉注射吡拉格雷钠,给药剂量依据前期实验研究结果设定为20、30、45 mg/kg,每日1次;阳性对照组大鼠按“2.1”项下方法复制脑缺血再灌注损伤模型后尾静脉注射地佐环平,给药剂量为0.8 mg/kg<sup>[7]</sup>,每日1次;模型组大鼠按“2.1”项下方法复制脑缺血再灌注损伤模型后每日注射1次生理盐水;假手术组大鼠行假手术后每日尾静脉注射1次生理盐水。首次给药时间均为缺血后2 h,连续用药6 d,给药间隔均为24 h。

## 2.4 神经学评分

缺血再灌注后24 h和末次给药后,使用改良的Longa五点量表评分系统<sup>[6]</sup>分别对各组大鼠进行神经功能缺陷评分和姿势反射评分。神经功能缺陷评分标准:无神经缺陷为0分;左肢体不能完全伸展为1分;行走时向右侧转圈为2分;行走时向右侧倾倒是3分;不能自发行走为4分;死亡为5分。姿势反射评分标准:两前肢完全伸展为0分(正常);左前肢贴在胸部,右前肢伸展为1分(轻度异常);左前肢贴在胸前,上半身卷曲为2分(严重异常)。

## 2.5 脑损伤扫描

通过Micro-PET确定各组大鼠脑摄取<sup>18</sup>F-FDG的情况评价脑损伤情况。缺血再灌注后24 h和末次给药后,分别对所有大鼠进行Micro-PET,在Micro-PET之前,大鼠禁食12 h以增强脑<sup>18</sup>F-FDG摄取,然后尾静脉注射<sup>18</sup>F-FDG(1.5 mCi/kg),1 h后将大鼠固定在扫描床上,进行扫描,扫描时间10 min,记录整个大脑的扫描图及整个大脑和不同脑区(岛状皮层、壳核、纹状体、体细胞皮层、杏仁核、运动皮层)的标准化摄取值(SUV)。SUV值越低,脑损伤越严重。计算右左脑SUV比值=右侧分区SUV/左侧分区SUV。

## 2.6 脑梗死体积的测量

Micro-PET扫描后,麻醉下处死大鼠,每组取6只大鼠的脑组织切成2.0 mm切片并浸入2% TTC中30 min,然后在4%多聚甲醛中于4℃下固定过夜,然后使用Image-Pro Plus 6.0软件计算脑梗死体积,取平均值。正常脑组织呈红色,梗死组织呈浅灰色。

## 2.7 脑组织中Glu含量和Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性的检测

将每组剩余的6只大鼠,在冰浴中取下全脑,制备成10%的组织匀浆,按试剂盒操作,检测脑组织中Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性和Glu含量。

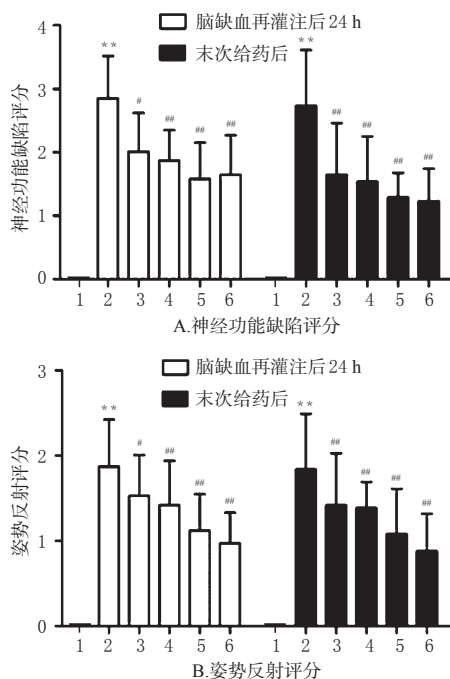
## 2.8 统计学方法

使用SPSS 17.0软件进行统计分析。通过单因素方差分析分析多组之间的差异,t检验评估两组之间的差异。*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 神经功能缺陷评分和姿势反射评分

假手术组大鼠神经功能缺陷评分和姿势反射评分均为0,模型组大鼠神经功能缺陷评分和姿势反射评分明显高于假手术组(*P*<0.01)。与模型组比较,吡拉格雷钠低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠缺血再灌注后24 h和末次给药后的神经功能缺陷评分、姿势反射评分均明显降低(*P*<0.05或*P*<0.01)。说明吡拉格雷钠可以显著改善缺血再灌注的神经功能,且具有剂量依赖性。5组大鼠不同时间点的神经功能缺陷评分、姿势反射评分结果见图1。



注:与假手术组比较,\*\**P*<0.01;与模型组比较,#*P*<0.05,##*P*<0.01;1.假手术组;2.模型组;3.吡拉格雷钠低剂量组;4.吡拉格雷钠中剂量组;5.吡拉格雷钠高剂量组;6.阳性对照组

Note: vs. sham operation group, \*\**P*<0.01; vs. model group, #*P*<0.05, ##*P*<0.01; 1. sham operation group; 2. model group; 3. pyragrel sodium low-dose group; 4. pyragrel sodium medium-dose group; 5. pyragrel sodium high-dose group; 6. positive control group

图1 各组大鼠不同时间点的神经功能缺陷评分、姿势反射评分结果(*n*=12)

Fig 1 Neurological deficit score and postural reflex score at different time points of rats in each group(*n*=12)

### 3.2 Micro-PET扫描

3.2.1 各组大鼠脑部SUV比较 假手术组大鼠呈现出完整的脑区,未观察到脑缺血损伤;其余各组大鼠缺血再灌注后24 h均呈现出脑缺血损伤。与假手术组比较,模型组大鼠脑缺血再灌注后24 h与末次给药后脑组织

的SUV明显降低。与模型组比较,吡拉格雷钠低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠脑缺血再灌注24 h与末次给药后脑组织的SUV明显增加。各组大鼠脑组织的Micro-PET扫描图见图2。

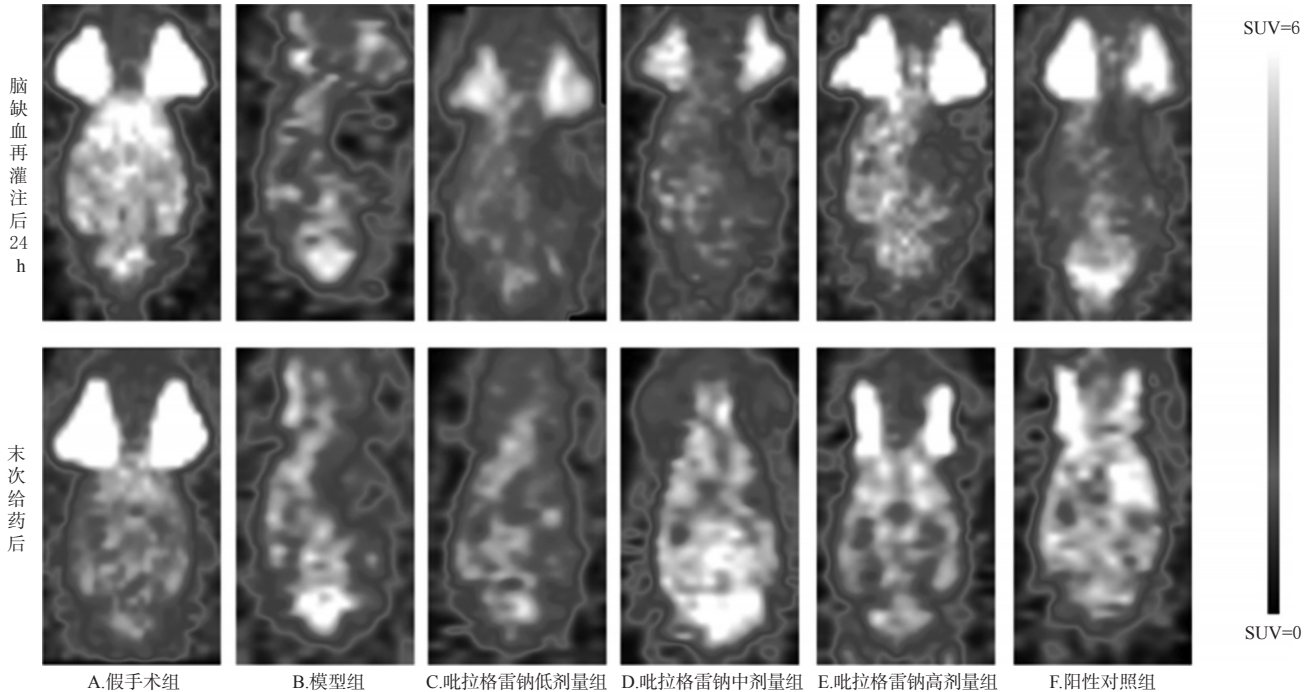


图2 各组大鼠脑组织的Micro-PET扫描图

Fig 2 Micro-PET scanning of cerebral tissue of rats in each group

3.2.2 各组大鼠右左脑SUV比值 假手术组大鼠呈现出完整的脑区,右左脑SUV比值为“1”。与假手术组比较,模型组大鼠脑缺血再灌注后24 h与末次给药后右左脑SUV比值明显降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,吡拉格雷钠低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠脑缺血再灌注后24 h右左脑SUV比值明显升高( $P < 0.01$ ),吡拉格雷钠低、中剂量组和阳性对照组大鼠末次给药后右左脑SUV比值明显升高( $P < 0.01$ ),更接近“1”,说明吡拉格雷钠具有改善脑缺血再灌注损伤的作用。各组大鼠的右左脑SUV比值结果见图3。

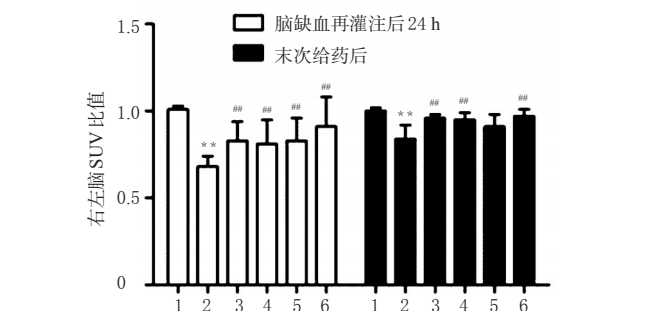


图3 各组大鼠的右左脑SUV比值结果( $n=6$ )

注:与假手术组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, # $P < 0.01$ ; 1.假手术组; 2.模型组; 3.吡拉格雷钠低剂量组; 4.吡拉格雷钠中剂量组; 5.吡拉格雷钠高剂量组; 6.阳性对照组

Note: vs. sham operation group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, # $P < 0.01$ ; 1. sham operation group; 2. model group; 3. pyragrel sodium low-dose group; 4. pyragrel sodium medium-dose group; 5. pyragrel sodium high-dose group; 6. positive control group

3.2.3 不同脑区右左脑SUV比值 与假手术组比较,模型组大鼠的岛状皮层、壳核、纹状体、体细胞皮层、杏仁核、运动皮层脑区的右左脑SUV比值明显降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,吡拉格雷钠低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠的岛状皮层、壳核、纹状体、体细胞皮层、杏仁核、运动皮层脑区的右左脑SUV比值明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),更接近“1”。各组大鼠不同脑区右左脑SUV比值测定结果见图4。

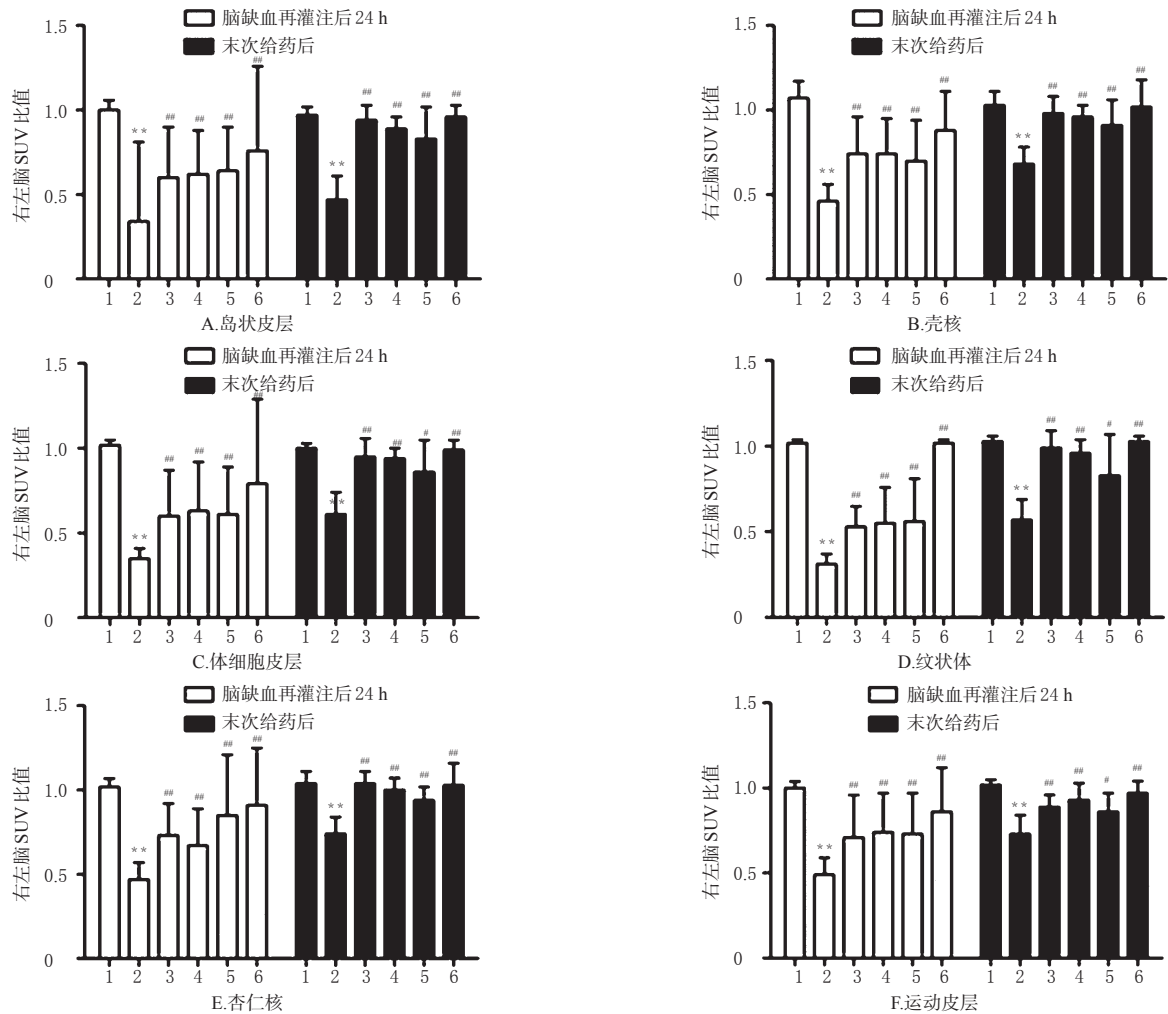
### 3.3 脑梗死体积

与假手术组比较,模型组大鼠的脑梗死体积明显增加( $P < 0.01$ )。与模型组比较,吡拉格雷钠低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠的脑梗死体积明显减小( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),且与吡拉格雷钠呈现剂量依赖性。各

组大鼠的脑梗死体积图片见图5,测定结果见表1。

### 3.4 $Na^+-K^+-ATP$ 酶活性

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 $Na^+-K^+-ATP$ 酶和 $Ca^{2+}-ATP$ 酶活性明显降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,吡拉格雷钠低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠脑组织中 $Na^+-K^+-ATP$ 酶和 $Ca^{2+}-ATP$ 酶活性明显升高( $P <$



注:与假手术组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; 1.假手术组; 2.模型组; 3.吡拉格雷钠低剂量组; 4.吡拉格雷钠中剂量组; 5.吡拉格雷钠高剂量组; 6.阳性对照组

Note: vs. sham operation group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; 1. sham operation group; 2. model group; 3. pyragrel sodium low-dose group; 4. pyragrel sodium medium-dose group; 5. pyragrel sodium high-dose group; 6. positive control group

图4 各组大鼠不同脑区右左脑SUV比值测定结果( $n=6$ )

Fig 4 SUV ratio of right left brain in different brain areas of rats in each group( $n=6$ )

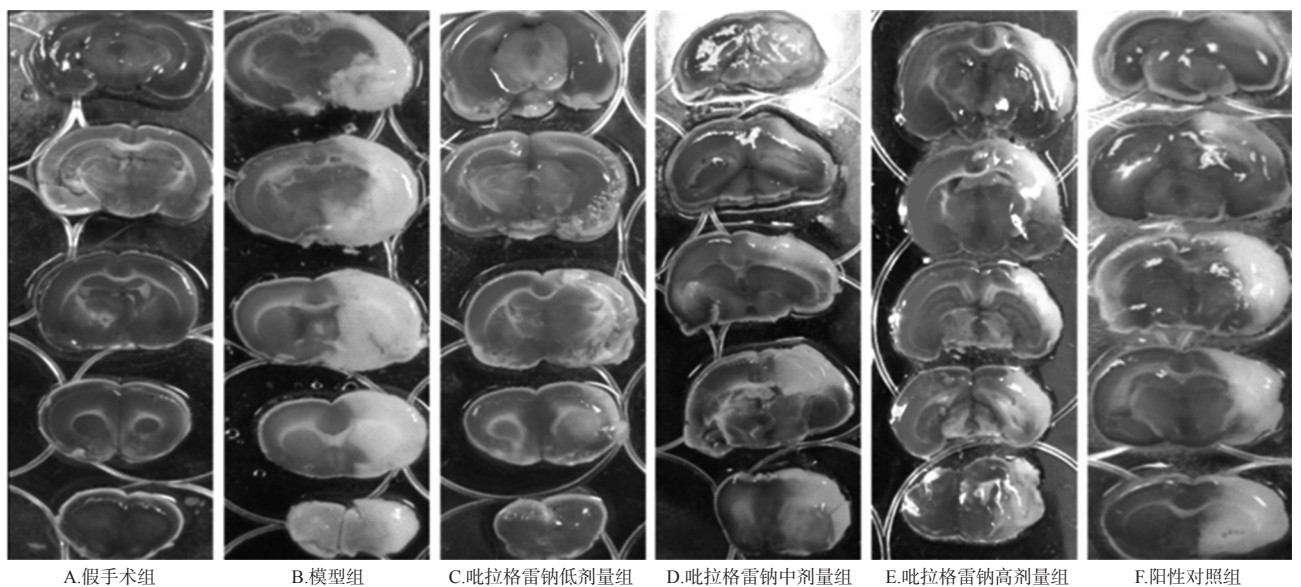


图5 各组大鼠的脑梗死体积图片

Fig 5 Pictures of cerebral infarction volume of rats in each group

0.05 或  $P < 0.01$ )。表明吡拉格雷钠可以增强缺血再灌注后脑组织中 ATP 酶活性。各组大鼠脑组织中  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶和  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$  酶活性测定结果见图 6。

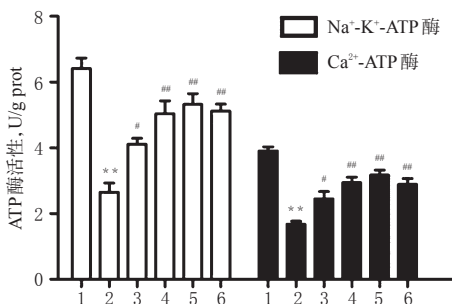
表 1 各组大鼠的脑梗死体积测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Measurement of cerebral infarction volume of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	脑梗死体积, %
假手术组	0
模型组	$38.77 \pm 0.06^{**}$
阳性对照组	$9.00 \pm 0.06^{##}$
吡拉格雷钠低剂量组	$26.58 \pm 0.13^{\#}$
吡拉格雷钠中剂量组	$17.31 \pm 0.14^{\#}$
吡拉格雷钠高剂量组	$12.13 \pm 0.04^{##}$

注:与假手术组比较,  $**P < 0.01$ ;与模型组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$

Note: vs. sham operation group,  $**P < 0.01$ ; vs. model group,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$



注:与假手术组比较,  $**P < 0.01$ ;与模型组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ ;1.假手术组;2.模型组;3.吡拉格雷钠低剂量组;4.吡拉格雷钠中剂量组;5.吡拉格雷钠高剂量组;6.阳性对照组

Note: vs. sham operation group,  $**P < 0.01$ ; vs. model group,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ ; 1. sham operation group; 2. model group; 3. pyragrel sodium low-dose group; 4. pyragrel sodium medium-dose group; 5. pyragrel sodium high-dose group; 6. positive control group

图 6 各组大鼠脑组织中  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶和  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$  酶活性测定结果 ( $n=6$ )

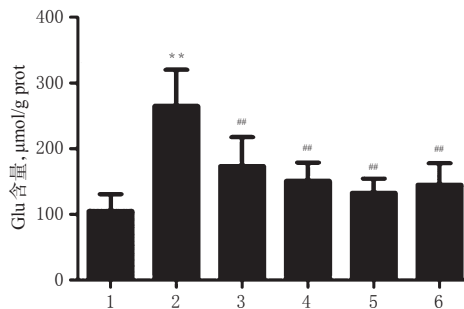
Fig 6 Activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  in cerebral tissue of rats in each group ( $n=6$ )

### 3.5 Glu 含量

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 Glu 含量明显升高 ( $P < 0.01$ ),说明脑缺血再灌注后脑组织 Glu 水平上升。与模型组比较,吡拉格雷钠低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠脑组织中 Glu 含量均明显降低 ( $P < 0.01$ ),说明吡拉格雷钠可能会降低脑缺血再灌注后 Glu 诱导的兴奋性毒性。各组大鼠脑组织中 Glu 含量的测定结果见图 7。

## 4 讨论

由脑动脉闭塞诱导的缺血性中风会显著降低局部脑血流量,并诱导细胞死亡,使脑萎缩和功能缺陷<sup>[8-9]</sup>。缺血性脑组织中局部血液灌注的恢复在组织修复和功能恢复中起关键作用<sup>[10]</sup>。地佐环平可以特异性地拮抗



注:与假手术组比较,  $**P < 0.01$ ;与模型组比较,  $^{##}P < 0.01$ ;1.假手术组;2.模型组;3.吡拉格雷钠低剂量组;4.吡拉格雷钠中剂量组;5.吡拉格雷钠高剂量组;6.阳性对照组

Note: vs. sham operation group,  $**P < 0.01$ ; vs. model group,  $^{##}P < 0.01$ ; 1. sham operation group; 2. model group; 3. pyragrel sodium low-dose group; 4. pyragrel sodium medium-dose group; 5. pyragrel sodium high-dose group; 6. positive control group

图 7 各组大鼠脑组织中 Glu 含量的测定结果 ( $n=6$ )

Fig 7 Glu content in cerebral tissue of rats in each group ( $n=6$ )

*N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体并降低 Glu 的毒性,是实验中常用的神经保护剂,因此本研究以其为阳性对照药<sup>[7]</sup>。ATP 酶活性与 Glu 转运蛋白活性密切相关,而谷氨酸转运蛋白对于维持突触间隙中 Glu 浓度的稳定性非常重要。

在脑缺血再灌注的药物研究中,神经功能评分是一个重要指标<sup>[11-12]</sup>,其与后期生存率密切相关。吡拉格雷钠低、中、高剂量组的神经功能评分和姿势反射评分显著低于模型组。表明吡拉格雷钠可以改善脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经功能。此外,吡拉格雷钠减少了模型大鼠的脑梗死体积。

Micro-PET 是一种成像技术,可以对大脑中的各种分子水平进行无创的体内测量。<sup>18</sup>F-PDG 是 Micro-PET 成像中最常用的正电子成像剂。作为葡萄糖类似物,<sup>18</sup>F-PDG 与葡萄糖竞争性地结合细胞膜上的葡萄糖转运蛋白(GLUT)并进入细胞。然后,<sup>18</sup>F-FDG 在己糖激酶的作用下产生 6-磷酸-<sup>18</sup>F-FDG。6-磷酸-<sup>18</sup>F-FDG 不能进入细胞中参与糖酵解而停留在体内<sup>[13]</sup>。因此,<sup>18</sup>F-FDG 可以反映组织吸收葡萄糖和葡萄糖代谢活动的的能力,此外,<sup>18</sup>F-FDG 的摄取也与组织血液供应密切相关,正常情况下,大脑右左脑区对 <sup>18</sup>F-FDG 的摄取值 SUV 值比率为 1<sup>[14]</sup>。Micro-PET 图像显示,假手术组在 24 h 均呈现出完整的脑区,未观察到脑缺血再灌注;从 24 h 图像可观察到各手术组 SD 大鼠呈现出脑缺血再灌注,主要出现在壳核、杏仁核、纹状体、听觉皮层、内嗅皮层、顶叶、躯体感觉皮层、下丘脑、嗅觉球等脑区分区,缺血再灌注后各手术组上述左右脑区分区的 SUV 比率降低;小脑灰质、小脑白质区域 SUV 比值基本无化,提示该部位无脑缺血再灌注;吡拉格雷钠和阳性药物可不同程度地改善

大鼠脑缺血再灌注损伤。

作为主要的兴奋性神经递质之一, Glu在大脑的正常生理状态中起重要作用。然而,在脑缺血再灌注和其他病理状况中,大脑中大量 Glu 释放可引起兴奋性毒性并成为缺血性神经元损伤的主要诱发因素。Glu 的兴奋毒性主要由与神经细胞膜受体的结合引起,并导致细胞内  $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的增加<sup>[15]</sup>。细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的增加可诱导线粒体功能异常、蛋白酶活化、活性氧(ROS)的产生和 NO 的释放,从而导致神经元死亡。细胞内  $\text{Na}^+$  的增加可导致过量的水进入细胞,从而导致神经毒性水肿和细胞死亡。一方面,当缺血和缺氧发生时,细胞内 ATP 产生减少会导致 ATP 酶功能障碍,进而影响 Glu 转运蛋白的转运,进而导致 Glu 过量。Glu 在突触间隙中的积累和 Glu 受体的激活,最终导致兴奋性毒性。另一方面,大量的 Glu 将与神经元细胞膜受体结合并抑制  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$  酶和  $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$  酶的活性。进而导致  $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  内流并进一步引发神经元细胞死亡的级联<sup>[16]</sup>。吡拉格雷钠可通过增加 ATP 酶活性,增强 Glu 转运蛋白的转运能力,然后去除突触间隙中 Glu 的积累来降低兴奋性毒性,从而保护神经系统。

总之,吡拉格雷钠能显著改善神经功能缺损评分、降低术后脑梗死体积、改善脑缺血再灌注后脑部葡萄糖的摄取量、改善脑部血流,还能增强缺血再灌注脑组织中的 ATP 酶活性、降低 Glu 含量。提示吡拉格雷钠对脑缺血再灌注损伤和神经功能均有保护作用,这可能与 ATP 酶-Glu 转运蛋白-Glu 信号通路有关。

## 参考文献

[1] LI Z, CHEN H, LV J, et al. The application and neuroprotective mechanisms of cerebral ischemic post-conditioning: a review[J]. *Brain Res Bull*, 2017. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2017.03.002.

[2] LANCELOT S, ZIMMER L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology[J]. *Trends Pharmacol*, 2010, 31(9): 411-417.

[3] ZHAO X, JIANG J, YANG G, et al. Profiling and preparation of metabolites from pyragrel in human urine by online solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry followed by a macroporous resin-based purification approach [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): E494.

[4] 王蕾, 吴玉林. 吡拉格雷钠对局灶性脑缺血再灌注大鼠微循环和内皮功能的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(6): 1-2.

[5] 赵炎, 张凤云, 吴玉林. MC-002 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织及血清中 NO 及 NOS 的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(11): 1-2.

[6] BEDERSON JB, PITTS LH, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.

[7] QIAN Y, TANG X, GUAN T, et al. Neuroprotection by combined administration with maslinic acid, a natural product from *olea europaea*, and MK-801 in the cerebral ischemia model[J]. *Molecules*, 2016, 21(8): E1093.

[8] LIU Y, TANG G, ZHANG Z, et al. Metformin promotes focal angiogenesis and neurogenesis in mice following middle cerebral artery occlusion[J]. *Neurosci Lett*, 2014. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.07.006.

[9] ZHANG RL, CHOPP M, ROBERTS C, et al. Stroke increases neural stem cells and angiogenesis in the neurogenic niche of the adult mouse[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e113972.

[10] CHE W, DONG H, JIANG X, et al. Subclavian artery stenting for coronary subclavian steal syndrome[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2017, 89(S1): 601-608.

[11] HUANG SS, CHENG H, TANG CM, et al. Antioxidative, anti-apoptotic, and pro-angiogenic effects mediate functional improvement by sonic hedgehog against focal cerebral ischemia in rats[J]. *Exp Neurol*, 2013. DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.03.004.

[12] GURKAS E, AKPINAR CK, AYTAC E. Advance: an effective and feasible technique in acute stroke treatment [J]. *Interv Neuroradiol*, 2017, 23(2): 166-172.

[13] CASTEELS C, VERMAELEN P, NUYTS J, et al. Construction and evaluation of multitracer small animal PET probabilistic atlases for voxel-based functional mapping of the rat brain[J]. *J Nucl Med*, 2006, 47(11): 1858-1866.

[14] HAN L, LI J, CHEN Y, et al. Human urinary kallidinogenase promotes angiogenesis and cerebral perfusion in experimental stroke[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0134543.

[15] ZOU J, WANG YX, DOU FF, et al. Glutamine synthetase downregulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons[J]. *Neurochem Int*, 2010, 56(4): 577-584.

[16] 胡捷先, 陈献华. 脑缺血再灌注后谷氨酸通路及其调控的研究进展[J]. 复旦大学学报, 2016, 43(6): 725-727.

(收稿日期: 2018-12-11 修回日期: 2019-02-18)

(编辑: 邹丽娟)