

丁基苯酞对蛛网膜下腔出血后脑血流的改善 及血脑屏障的保护作用

种兆忠 冯亦璞

(中国医学科学院,中国协和医科大学药物研究所,北京 100050)

摘要 侧脑室注入自体血液造成蛛网膜下腔出血模型,观察丁基苯酞(*dt*-NBP)对局部脑血流的改善作用及血脑屏障的保护作用。结果表明,*dt*-NBP 5~20 mg·kg⁻¹明显提高蛛网膜下腔出血后 3 h 内尾状核的血流量,但无明显的剂量效应关系。0.25 mg·kg⁻¹的尼莫地平亦明显提高脑血流。并发现 *dt*-NBP 10 mg·kg⁻¹及尼莫地平 0.25 mg·kg⁻¹(分别于蛛网膜下腔出血后 5 min 和 3 h ip)均能明显降低蛛网膜下腔出血 6 h 后皮层组织中伊文氏蓝的摄取量,提示对血脑屏障有明显的保护作用。

关键词 蛛网膜下腔出血;丁基苯酞;尼莫地平;脑血流;血脑屏障

丁基苯酞(*dt*-NBP)是我所研制的抗脑缺血新药,目前已进入 II 期临床试验。研究表明丁基苯酞可明显减少局灶性脑缺血后脑梗塞面积^[1]并减轻脑缺血后迟发性神经元损伤^[2]。最近的研究表明,*dt*-NBP 可选择性地激动原生型一氧化氮合成酶(cNOS),这可能是丁基苯酞增加局灶性脑缺血后脑血流的重要机理(待发表资料)。众所周知,脑血管痉挛及继发性脑血流减少为蛛网膜下腔出血(SAH)的病理生理基础。我们的实验资料提示 *dt*-NBP 可能对 SAH 有一定的治疗作用,本实验主要通过观察 SAH 后脑血流及血脑屏障(BBB)的变化研究 *dt*-NBP 对 SAH 有益治疗作用。

材料和方 法

药品 丁基苯酞(NBP)为本所化学合成室提供,纯度 >96%,用 Tween 80 制成混悬液,以生理盐水稀释。

蛛网膜下腔出血模型 ♂ Wistar 大鼠,体重 260~310 g,10%的水合氯醛麻醉(350

mg·kg⁻¹)。右侧股动脉插管连接压力换能器通过二道生理记录仪(LMS-2B 型,成都仪器厂)记录动脉血压。动物头部固定于脑立体定位仪上(江湾 IC)。头温用温度探针监测,以电热板和白炽灯(100 W)将头温保持在 37℃。在右侧皮层前囟后 2.4 mm,矢状缝右侧 5 mm 处用骨钻钻一小骨孔。自股动脉放血 0.4 ml 并将 0.35 ml 血液通过骨孔注入侧脑室(硬脑膜下 5 mm)。

脑血流的测定 局部脑血流用氢清除法测定。在前囟前 3 mm,矢状缝右侧 2.5 mm 处再钻一骨孔,将预先经 +600 mV 电压极化的 760 型针式电极在脑定位仪移动架的引导下插入尾状核(硬脑膜下 5 mm)。参考电极放于前额皮下。右侧鼻孔中插入 PE50 管供动物吸入氢气用。氢电流通过组织气体分析仪(Diamond General Corp, Michigan, USA)并记录于 3066 型笔式记录仪上(Yokosawa Hokushin Electric, Tokyo, Japan)。自氢清除曲线上读取清除半衰期 $T_{1/2}$,以公式 $CBF = 0.693 \div T_{1/2} \times 100$ (ml·100 g⁻¹·min⁻¹)计算尾状核的血流量。蛛网膜下腔出血后的脑血流用占出血前血流量的百分比来表示。

本文于 1997 年 5 月 16 日收到。

本课题得到国家科委 1035 工程重大项目基金资助

实验共分 9 组: (1) 假手术(Sham)组 手术过程同上,但脑室内不注血, 不给任何药物; (2) 生理盐水(Saline)组 脑室内注入 0.35 ml 的生理盐水; (3) 溶剂对照(Vehicle)组 脑室内注血后 5 min ip 生理盐水 0.1 ml·100 g⁻¹; (4) *dl*-NBP 5 mg·kg⁻¹; (5) *dl*-NBP 10 mg·kg⁻¹; (6) *dl*-NBP 20 mg·kg⁻¹; (7) nimodipine(Nim) 0.25 mg·kg⁻¹。所有药物皆于 SAH 后 5 min ip。

血脑屏障的通透性测定 参照文献方法^[3]并略加修改。动物分别于 SAH 后 5 min 和 3 h ip 药物或生理盐水, SAH 出血后 5 h 通过舌下 iv 25 mg·ml⁻¹ 的伊文氏蓝 0.2 ml·100 g⁻¹。1 h 后,剪破右心房并自左心室灌注生理盐水 60 ml。开颅取出右侧半球去除软脑膜,然后放入盛有 3 ml 甲酸胺的小烧杯中,室温提取 72 h。荧光分光光度法测定提取液中伊文氏

蓝的含量 (HITACHI MPF-4 fluorescence spectrophotometer, E_x = 625, E_m = 675, slit = 18)。脑组织于 100 °C 下烘烤 3 d,称干重。脑组织中染料含量以 ng·mg⁻¹干重组织表示。

统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。

结 果

1 NBP 对蛛网膜下腔出血 (SAH) 后血压的影响

侧脑室内注入自体动脉血或生理盐水后 15 min,平均动脉血压有所升高,但和注血前比较无明显差异。不同剂量的 *dl*-NBP 和尼莫地平 0.25 mg·kg⁻¹ 对动物平均动脉压均无明显影响(表 1)。

Tab 1 Changes of mean arterial blood pressure (MAP) of rats subjected to subarachnoid hemorrhage(SAH), and treated with *dl*-3-*n* butylphthalide(*dl*-NBP, ip) or nimodipine(Nim, ip)

| Group | Time (min) after SAH | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| | Before | 15 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 |
| Sham | 100.0 ± 9.9 | 104.5 ± 11.6 | 103.5 ± 12.9 | 103.9 ± 11.9 | 102.8 ± 10.6 | 102.5 ± 9.2 | 101.9 ± 8.5 | 102.4 ± 10.3 |
| Saline(icv) | 89.6 ± 8.2 | 100.8 ± 12.6 | 99.5 ± 12.1 | 103.8 ± 14.9 | 97.0 ± 8.8 | 96.6 ± 10.1 | 93.3 ± 13.4 | 92.1 ± 14.3 |
| Vehicle | 88.1 ± 9.3 | 94.1 ± 12.8 | 97.9 ± 13.9 | 97.1 ± 17.5 | 91.3 ± 14.2 | 96.6 ± 15.7 | 97.7 ± 12.8 | 87.6 ± 11.3 |
| <i>dl</i> -NBP(mg·kg ⁻¹) | | | | | | | | |
| 5 | 88.5 ± 13.3 | 96.4 ± 11.9 | 102.8 ± 17.1 | 101.2 ± 15.9 | 97.1 ± 16.2 | 93.9 ± 17.6 | 93.9 ± 17.3 | 94.2 ± 15.2 |
| 10 | 90.7 ± 15.5 | 100.5 ± 15.7 | 98.6 ± 13.9 | 100.7 ± 14.9 | 99.7 ± 14.1 | 101.4 ± 13.9 | 96.1 ± 12.9 | 93.8 ± 16.3 |
| 20 | 89.1 ± 7.1 | 96.4 ± 7.8 | 95.4 ± 5.6 | 93.6 ± 5.4 | 91.2 ± 5.9 | 87.0 ± 8.2 | 84.4 ± 6.1 | 80.4 ± 7.7 |
| Nim(mg·kg ⁻¹) | | | | | | | | |
| 0.25 | 91.3 ± 13.6 | 101.9 ± 20.5 | 96.8 ± 24.2 | 99.9 ± 22.9 | 101.5 ± 23.1 | 98.1 ± 23.2 | 98.9 ± 23.9 | 90.1 ± 26.6 |

$\bar{x} \pm s$, *n* = 6 ~ 8. The values of MAP were expressed as mmHg.

2 NBP 对 SAH 后局部脑血流的影响

表 2 列出了 SAH 后 3 h 内尾核脑血流的变化及 *dl*-NBP 的影响。脑室内注血后,脑血流即大幅度降低,15 min 时降至注血前的 52.9%,而且 3 h 内脑血流基本上维持在注血前的 50%左右。脑室内注入生理盐水可引起脑血流短暂小幅度的下降,60 min 后即恢复至

注射生理盐水前的水平。

SAH 后 5 min ip *dl*-NBP 5, 10 和 20 mg·kg⁻¹皆可提高尾核的血流量,SAH 后 30 min 至 3 h 脑血流明显高于溶剂对照组。但未见明显的剂量效应差异。动物经过尼莫地平 0.25 mg·kg⁻¹ 治疗后亦可见 SAH 后尾状核的血流量明显提高。

Tab2 Effects of *d*-NBP and Nim given ip on regional cerebral blood flow(rCBF) in caudate nucleus of rats subjected to subarachnoid hemorrhage(SAH)

| Group | rCBF (percentage of pre-SAH values) after SAH | | | | | | |
|--------------------------------------|---|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | 15 min | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 150 min | 180 min |
| Sham | 104.1 ± 10.2 | 101.2 ± 8.4 | 96.1 ± 12.6 | 97.2 ± 12.5 | 96.0 ± 5.6 | 103.1 ± 6.1 | 100 ± 1.1 |
| Saline(icv) | 88.9 ± 12.3 | 86.7 ± 10.4 | 94.5 ± 13.3 | 103.4 ± 8.7 | 100.2 ± 10.6 | 106.6 ± 9.2 | 95.7 ± 9.2 |
| Vehicle | 52.9 ± 7.9 | 47.9 ± 6.8 | 53.3 ± 6.8 | 52.5 ± 0.5 | 50.7 ± 7.0 | 52.5 ± 8.6 | 51.8 ± 7.7 |
| <i>d</i> -NBP (mg·kg ⁻¹) | | | | | | | |
| 5 | 58.2 ± 17.1 | 63.2 ± 13.5* | 65.6 ± 14.2 | 74.7 ± 12.4* | 69.4 ± 12.5* | 71.1 ± 13.2** | 72.1 ± 12.1** |
| 10 | 62.1 ± 6.6 | 63.0 ± 10.2* | 69.2 ± 16.4* | 76.1 ± 11.2* | 84.1 ± 18.2** | 73.1 ± 13.3** | 77.1 ± 17.2** |
| 20 | 53.2 ± 6.5 | 60.3 ± 10.8* | 66.3 ± 17.4 | 65.0 ± 17.1 | 68.7 ± 14.5* | 69.5 ± 14.5* | 67.9 ± 15.3* |
| Nim 0.25 mg·kg ⁻¹ | 59.2 ± 4.4 | 66.2 ± 13.2* | 67.1 ± 19.2* | 72.4 ± 8.6* | 68.5 ± 11.7* | 73.3 ± 13.5** | 76.7 ± 16.2** |

$\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs corresponding vehicles.

3 NBP对SAH后血脑屏障的保护作用

伊文氏蓝进入血液主要和血浆蛋白结合,脑组织中伊文氏蓝的量的多少可反应血脑屏障对血浆蛋白的通透性。SAH后,脑组织中伊文氏蓝含量明显增加,SAH后6h伊文氏蓝可较假手术组显著增加($P < 0.01$)。*d*-NBP 10 mg·kg⁻¹及尼莫地平 0.25 mg·kg⁻¹组治疗后,脑组织中伊文氏蓝的含量分别下降45.3%和46.9%。虽然5 mg·kg⁻¹ *d*-NBP可使伊文思蓝含量下降17.1%,但无统计学差异(表3)。

Tab3 Attenuating effects of *d*-NBP and Nim on damage of blood brain barrier (extravasation of protein bound Evans blue dye) induced by 6 hours of subarachnoid hemorrhage

| Group | Dosage (mg·kg ⁻¹) | <i>n</i> | Evans blue (ng·mg ⁻¹ dry tissue) |
|---------------|-------------------------------|----------|---|
| Sham | | 6 | 8.0 ± 3.6 |
| Vehicle | | 8 | 37.1 ± 12.5 ^{##} |
| <i>d</i> -NBP | 5 | 6 | 30.7 ± 7.6 |
| | 10 | 6 | 20.3 ± 8.4* |
| Nim | 0.25 | 6 | 19.7 ± 8.1* |

$\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs sham group; * $P < 0.05$ vs vehicle group.

讨 论

本实验结果显示 *d*-NBP对SAH有明显的治疗作用,而且还观察到 *d*-NBP增加SAH后尾核血流量的同时,对平均动脉压无明显影

响,提示药物可能选择性地扩张脑微血管。

我们以前的工作表明, *d*-NBP可增加局灶性脑缺血后缺血区脑血流^[4]。这一作用的可能机理有:(1)抑制细胞内钙的释放。*d*-NBP能竞争性抑制去甲肾上腺素引起的大鼠尾动脉收缩,而且对去甲肾上腺素的内源性钙收缩有抑制作用,对去甲肾上腺素的外源性钙收缩无效^[5]。表明 *d*-NBP对血管平滑肌细胞内钙动员有一定的抑制作用。但在脑微血管中是否具有相似的作用尚需进一步实验证实。(2)激动一氧化氮合酶。我们最近的实验结果表明, *d*-NBP可选择性地激活原生型一氧化氮合成酶(cNOS),使一氧化氮产生增加,可能与增加局部脑血流有关; *t*-NBP则可降低cNOS的活性(待发表资料)。而由等量的 *d*-NBP和 *t*-NBP组成的 *d*-NBP仍表现增加脑血流的作用。这些现象可能的解释是: *d*-NBP和 *t*-NBP可能存在不同的代谢途径,它们在脑内的分布,代谢产物,代谢速度及其代谢产物的作用的不同皆可影响其作用的发挥。另外,除作用于cNOS外, NBP亦可能存在其它作用机理。众所周知,SAH后氧合血红蛋白可以通过和一氧化氮(NO)结合等作用在SAH引起的脑血管痉挛中发挥重要作用^[6]。*d*-NBP增加SAH后尾状核脑血流的作用可能和上述因素有关。

血脑屏障在保护脑组织免受血液中毒性物质及电解质大幅度变化的影响方面起重要作用。*d*-NBP和尼莫地平皆可明显降低SAH后

血脑屏障的通透性,保护血脑屏障可能为其减轻 SAH 后脑损伤的重要作用之一,因自由基为损害血脑屏障的因素之一。我们以前的工作表明, *dl*-NBP 可降低全脑缺血后纹状体细胞外液中次黄嘌呤和黄嘌呤的含量^[7],在脑缺血重灌时二者可在黄嘌呤氧化酶的作用下形成黄嘌呤和尿酸并释放出超氧阴离子。因此 *dl*-NBP 可能会减少脑缺血重灌后超氧自由基的形成。另外,脑缺血时可引起膜磷质分解和花生四稀酸(AA)的大量释放^[8,9],AA 经环氧酶代谢时,在由 PGG₂ 转变为 PGH₂ 的过程中,亦可产生超氧阴离子自由基^[10]。*dl*-NBP 可抑制脑缺血重灌后脑组织中 AA 代谢产物 TXB₂ 与 6-keto-PGF_{1α} 的产生^[11],但其作用环节是在磷脂酶还是环氧酶或二者的合成酶,目前尚不明了。因此药物能否通过此环节,减少超氧阴离子的形成还难以定论。在 SAH 后, *dl*-NBP 对血脑屏障的保护作用可能与其对抗自由基的作用有关。

参 考 文 献

- 1 刘小光,冯亦璞. 丁基苯酞对局部脑缺血大鼠形为和病理改变的保护作用. 药学报, 1995, 30: 896
- 2 林建峰,冯亦璞. 丁基苯酞对局部脑缺血大鼠神经元迟发性损伤及细胞内钙的影响. 药学报,

- 1996, 31: 166
- 3 Smith SL, Scherch HM, Hall E. Protective effects of tirilazad mesylate and metabolite U-89678 against blood-brain barrier damage after subarachnoid hemorrhage and lipid peroxidative neuronal injury. *J Neurosurg*, 1996, 84: 229
- 4 阎超华,张均田,冯亦璞. 丁基苯酞对正常及局部脑缺血大鼠纹状体脑血流的影响. 中国药理学与毒理学杂志, 1997, 11: in press
- 5 刘小光,冯亦璞. 丁基苯酞对氯化钾和去甲肾上腺素引起的离体大鼠尾动脉环收缩的影响作用. 中国药理学与毒理学杂志, 1996, 10: 113
- 6 Martin W, Villani GM, Jothianandan D, et al. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985, 232: 708
- 7 胡盾,黄新祥,冯亦璞. 丁基苯酞对全脑缺血大鼠的纹状体细胞外液嘌呤类代谢物含量的影响. 药学报, 1996, 31: 13
- 8 Umemura A, Mabe H, Nagai H, et al. Action of phospholipase A₂ and C on free fatty acid release during complete ischemia in rat neocortex. *J Neurosurg*, 1992, 76: 648
- 9 Zhang JP, Sun GY. Free fatty acids, neutral glycerides, and phosphoglycerides in transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, 1995, 64: 1688
- 10 Samuelsson B, Hammarstrom S, Bogeat P. Pathway of arachidonic acid metabolism. *Adv Inflam Res*, 1979, 1: 405
- 11 Chong ZZ, Feng YP. Effects of *dl*-3-*n*-butylphthalide on production of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} in rat brain during focal cerebral ischemia and reperfusion. *Acta Pharmacol Sin*, 1997, 18: 505

PROTECTIVE EFFECTS OF DL-3- N-BUTYLPHTHALIDE ON CHANGES OF REGIONAL CEREBRAL BLOOD FLOW AND BLOOD BRAIN BARRIER AFTER SUBARACHNOID HEMORRHAGE

Chong Zhaozhong(Chong ZZ) and Feng Yipu(Feng YP)

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

ABSTRACT Effects of *dl*-3-*n*-butylphthalide(*dl*-NBP) on changes of regional cerebral blood flow (rCBF) and blood-brain barrier of rats subjected to subarachnoid hemorrhage (SAH) were investigated. Regional CBF was determined by hydrogen clearance method at 15 min before, 15 and

30 min thereafter once every 30 min up to 180 min after the beginning of SAH. The results showed that SAH produced a significant decrease in rCBF in caudate nucleus and blood brain barrier damage which displayed increased extravasation of Evans blue to brain tissue. Both *dl*-NBP ($5 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ given intraperitoneally 5 min after the onset of SAH) and nimodipine ($0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) were shown to increase rCBF in caudate nucleus through 3 h of SAH. Moreover, *dl*-NBP $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and nimodipine $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, given 5 min and 3 h, respectively, after SAH, significantly reduced the brain extravasation of Evans blue 6 h after SAH, indicating that both *dl*-NBP and nimodipine has protective effects on blood brain barrier. These results suggest that *dl*-NBP has therapeutic effects on SAH.

KEY WORDS Subarachnoid hemorrhage; *dl*-3-*n*-Butylphthalide; Nimodipine; Regional cerebral blood flow; Blood brain barrier