

# 丁基苯酞对局灶性脑缺血大鼠软脑膜微循环障碍的影响

徐皓亮, 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** 目的:观察消旋、左旋及右旋丁基苯酞(*d*l-, *l*-, *d*-3-*n*-butylphthalide, *d*l-, *l*-, *d*-NBP)对局灶性脑缺血大鼠软脑膜微循环障碍的影响。方法:用插线法造成大鼠局灶性脑缺血模型,并用体外显微摄像技术及微循环图象处理系统观察大鼠软脑膜微动脉管径及红细胞流速的变化。结果:*d*l-, *l*-和 *d*-NBP对正常大鼠脑微动脉管径无明显影响, MCAO术前1 h预防给药, *d*l-, *l*-NBP和尼莫地平可明显增加局灶性脑缺血大鼠软脑膜微动脉管径及血流速度, 而 *d*-NBP则加重软脑膜微循环障碍。MCAO术后20 min治疗给药, *d*l-和 *l*-NBP仍可明显逆转局灶性脑缺血大鼠软脑膜微循环障碍, 而 *d*-NBP及尼莫地平作用不明显。结论:改善脑微循环状态是 *d*l-和 *l*-NBP发挥抗脑缺血作用的重要药理机制之一。

**关键词** 丁基苯酞; 尼莫地平; 局灶性脑缺血; 软脑膜微动脉; 微循环

经多年研究表明,本室研制开发的一类新型抗脑缺血药物丁基苯酞(NBP),有调节脑缺血状态下脑能量代谢<sup>[1]</sup>、增加缺血区脑血流量<sup>[2]</sup>、缩小脑梗塞面积、减轻脑水肿<sup>[3]</sup>、改善脑缺血后神经功能缺损症状的作用。由于急性脑缺血时,首先出现脑微循环障碍,脑血流量降低,并继发脑能量代谢失调,导致脑组织坏死,神经功能缺损及缺血后炎症的发生,所以,研究NBP对脑微循环及脑组织血流状况的影响有十分重要的意义。最近,本研究组用氢清除法研究了NBP对局灶性脑缺血大鼠纹状体血流量的影响,发现*d*l-NBP对治疗和预防MCAO引起的脑缺血区血流量下降有良好的改善作用,且作用持续时间比尼莫地平长。由于氢清除法测定脑血流量是对局部脑组织循环状态的间接反映,故本实验通过监测NBP对MCAO后大鼠软脑膜微血管管径及血流速度的影响,用较直观的方法,研究其对脑微循环障碍的作用,并对NBP的各种旋光异构体分别进行分析评价。在脑缺血时,脑微循环障碍是导致神经细胞损伤的主要病理基础之一,所以本研究通过观测NBP对MCAO后软脑膜微循环的影响,进一步分析其抗脑缺血的药理作用机制。

## 材 料 与 方 法

**药品和仪器** 消旋、左旋、右旋丁基苯酞(*d*l-, *l*-, *d*-NBP)由中国医学科学院协和药厂提供,纯度>96%, *d*l-, *l*-和 *d*-NBP旋光度依次为0, -69.73和+64.08度,临用前分别用0.5% Tween-80配制所需浓度;尼莫通(Nim,含nimodipine 2 mg·ml<sup>-1</sup>)购自拜耳公司(德国)。显微摄像系统及微循环处理软件(微循环显微镜、监视器、摄像头、录像机、自动计时器、图像处理板及MCIP软件)由国营江南光学仪器厂提供。

**动物** 体重230~260 g ♀ Sprague-Dawley大鼠,由江苏省实验动物中心提供。

**软脑膜微循环的观测**<sup>[3]</sup> 实验时,室温控制在20~25℃。用乌拉坦(1.0 g·kg<sup>-1</sup> ip)麻醉大鼠,沿颅骨正中线和耳上方连线做一“T”形切口,暴露左侧颅骨,在离矢状窦约2~3 mm处,用手术刀刮薄并去除骨质,形成一直径为0.6 cm的卵圆形窗口,小心剥离硬脑膜、蛛网膜,暴露软脑膜,以39℃的人工脑脊液(mmol·L<sup>-1</sup>: NaCl 124.0, KCl 3.3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 26.0, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.4, D-葡萄糖 10.0)保持软脑膜湿润,并用白炽灯维持其颅温于37℃。通过监视器选取管径40~70 μm的微动脉进行观察摄像,并用MCIP软件测定其红细胞流速(blood flow velocity, BFV)及管径(arteriole diameter, AD)的变化。

**MCAO模型制备** 大鼠仰卧位固定,沿颈正中线切开,分离颈外动脉、颈内动脉,将直径为0.26 mm的尼龙线自颈外动脉,经颈内动脉插入颅内,沿

收稿日期:1998-06-16

基金项目:国家科委1035工程重大项目基金(94-ZD-01)及国家自然科学基金(299790120)

\*联系人 Tel:(010)63165173, Fax:(010)63017757,

E-mail:fengYP@public.gb.com.cn

颅内动脉进入约 2 cm, 此时线头已达大脑中动脉起始部, 造成 MCAO 脑缺血模型。

**实验动物分组** 大鼠随机分为假手术组(尼龙线自颈外动脉插入约 1.0 cm), 溶剂对照组(ip 0.5% Tween-80 1 ml·kg<sup>-1</sup>), Nim 给药组(ip Nim 0.3 mg·kg<sup>-1</sup>), *dl*-NBP, *l*-NBP 及 *d*-NBP 给药组(分别 ip *dl*-NBP, *l*-NBP, *d*-NBP 12.5, 25 mg·kg<sup>-1</sup>)。所有动物根据给药时间分为: 预防给药组(MCAO 术前 1 h 给药) 和治疗给药组(MCAO 术后 20 min 给药)。

**统计学分析** 所有实验结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 并以组间 *t* 检验, 分析其差异显著性。

## 结 果

### 1 *dl*, *d*, *l*-NBP 及 Nim 治疗给药对软脑膜微动脉 BFV 的影响

MCAO 术后 20 min, 软脑膜微动脉 BFV 显著

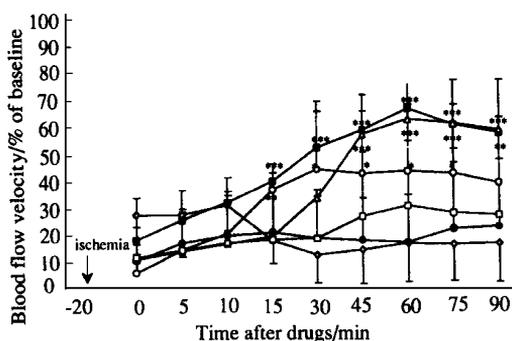


Fig 1 Effects of NBP and Nim given 20 min after ischemia on cerebral blood flow velocity in MCAO rats. Values are  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with the vehicle group.  $\diamond - \diamond$  Vehicle;  $\square - \square$  Nim;  $\circ - \circ$  *dl*-NBP 12.5 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\blacksquare - \blacksquare$  *dl*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\triangle - \triangle$  *l*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\bullet - \bullet$  *d*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>.

### 3 *dl*, *d*, *l*-NBP 及 Nim 预防给药对软脑膜微动脉 BFV 的影响

MCAO 术后, 溶剂对照组大鼠软脑膜微动脉 BFV 显著降低, 约为正常的 16%, 且持续维持于较低的水平。预先 ip *dl*, *l*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup> 能明显增加 MCAO 后的 BFV, 且作用持续至术后 1.5 h。预先 ip *l*-NBP 的作用略强于 *dl*-NBP。而同剂量的 *d*-NBP 使 MCAO 后的 BFV 明显下降, 仅为正常的 0%~5%, 较溶剂对照组低, 结果有显著性差异 ( $P$

降低, 约为术前的 6%~27%, 溶剂对照组, BFV 持续波动于正常水平的 15% 左右。 *dl*-NBP 12.5 及 25 mg·kg<sup>-1</sup> 可剂量依赖性地增加 BFV, 且于给药后 15 min 即有明显的效果, 45~60 min 时, 效果最为显著, 于给药后 90 min 仍保持较高水平, *l*-NBP (25 mg·kg<sup>-1</sup>) 作用强度与同剂量的 *dl*-NBP 相似。 *d*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup> 或 Nim 0.3 mg·kg<sup>-1</sup> 对 MCAO 后软脑膜微动脉 BFV 无明显作用(图 1)。

### 2 *dl*, *d*, *l*-NBP 及 Nim 治疗给药对软脑膜微动脉 AD 的影响

假手术组软脑膜微动脉 AD 无明显变化。MCAO 术后, 溶剂对照组 AD 明显下降, 且持续波动于正常 AD 水平的 46%~59% 之间。ip *dl*-NBP 12.5, 25 mg·kg<sup>-1</sup> 后 30 min, AD 呈剂量依赖性地明显增加, 且作用持续较长时间。 *l*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup> 亦能明显扩张微动脉, 其作用于给药后 45~60 min 达峰值, 与同剂量的 *dl*-NBP 相似。 *d*-NBP 及 Nim 则对 MCAO 后 AD 无明显作用(图 2)。

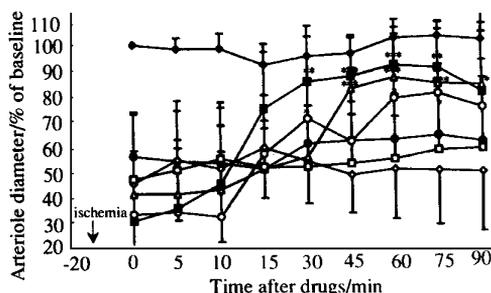


Fig 2 Effects of NBP and Nim given 20 min after ischemia on pial arteriole diameter in MCAO rats. Values are  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with the vehicle group.  $\bullet - \bullet$  Sham;  $\diamond - \diamond$  Vehicle;  $\square - \square$  Nim;  $\circ - \circ$  *dl*-NBP 12.5 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\blacksquare - \blacksquare$  *dl*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\triangle - \triangle$  *l*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\bullet - \bullet$  *d*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>.

<0.05)。Nim 0.3 mg·kg<sup>-1</sup> 亦能迅速升高 MCAO 后 BFV 的水平, 作用持续至术后 75 min 开始减弱(图 3)。

### 4 *dl*, *d*, *l*-NBP 及 Nim 预防给药对软脑膜微动脉 AD 的影响

结果表明, *dl*, *d*, *l*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup> 对正常麻醉状态大鼠软脑膜微动脉 AD 均无明显影响(*dl*-NBP 在 30 min 时使 AD 一过性上升), 而 Nim 0.3 mg·kg<sup>-1</sup> 可使正常大鼠脑微血管 AD 增加约 5%~

16% ( $P < 0.01$ )。MCAO 术后, 各组大鼠软脑膜微动脉 AD 均明显下降。溶剂对照组 AD 至术后 90 min 仍维持较低水平, 而预先 ip *dt*-, *t*-NBP, Ni<sub>m</sub>, 可使 MCAO 术后软脑膜微动脉 AD 值迅速上升。Ni<sub>m</sub> 给药组于术后 75 min, 作用明显下降, *dt*-, *t*-NBP 组作用持续时间较长。*dt*-NBP 组 AD 值明显低于溶剂对照组(图 4)。

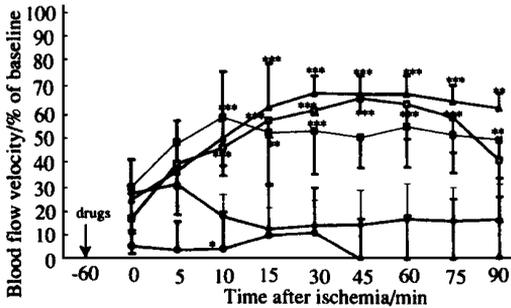


Fig 3 Effects of NBP and Ni<sub>m</sub> given 1 h before ischemia on cerebral blood flow velocity in MCAO rats. Values are  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with the vehicle group.  $\diamond - \diamond$  Vehicle;  $\square - \square$  Ni<sub>m</sub>;  $\blacksquare - \blacksquare$  *dt*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\blacktriangle - \blacktriangle$  *t*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\bullet - \bullet$  *dt*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>.

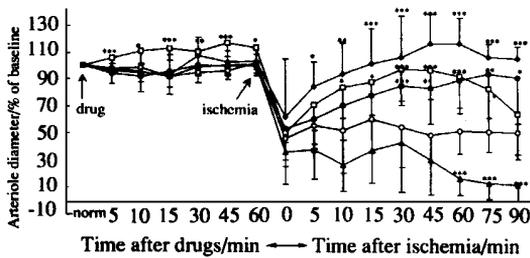


Fig 4 Effects of NBP and Ni<sub>m</sub> given 1 h before ischemia on pial arteriole diameter in MCAO rats. Values are  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with the vehicle group.  $\diamond - \diamond$  Vehicle;  $\square - \square$  Ni<sub>m</sub>;  $\blacksquare - \blacksquare$  *dt*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\blacktriangle - \blacktriangle$  *t*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\bullet - \bullet$  *dt*-NBP 25 mg·kg<sup>-1</sup>.

### 讨 论

局灶性脑缺血损伤的主要原因是脑微循环障碍及脑能量代谢衰竭, 改善脑微循环障碍是治疗缺血性脑血管疾病的一个重要环节。脑组织的主要血供来自双侧颈内动脉和椎动脉, 它们在软脑膜上形成细动脉及微动脉, 并穿入脑实质, 构成脑实质微循环系统。本研究主要选择直径为 40 ~ 70 μm 的软脑膜微动脉进行监测, 对其管径及红细胞流速进行了动态观察, 可以直接反映局灶性脑缺血时脑微循环

障碍情况及 NBP 干预的影响, 这对深入评价 NBP 对脑微循环的改善作用及其抗脑缺血机制具有很大的意义。微循环的状态与机体的血压、血气及外周温度等因素有密切关系, 由于本室研究发现 NBP 对动物血压无明显影响<sup>[5]</sup>, 故实验过程中未对血压进行监测。在实验时维持恒定的颅温, 可以减少温度变化对微循环的影响。P<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> 也是影响脑血流的一个重要因素, 由于条件限制, 本实验未能对血气进行监测, 只能行气管切开术以改善动物呼吸。由于大鼠大脑中动脉存在一定的个体差异, 故插线后大鼠均置于监视器下观察, 并将软脑膜微循环明显障碍(微动脉管及血流速度明显下降)作为脑缺血模型成功的标准。

本研究结果表明, *dt*-, *t*-NBP 预防及治疗给药均可增加 MCAO 后脑微动脉管径和血流速度, 从而改善软脑膜微循环。NBP 预防给药对正常脑微动脉管径没有明显影响, ni modipine 预防给药可轻度增加正常麻醉大鼠及 MCAO 后脑微血管直径, 而治疗给药则未见明显影响。Dirnagl U 等<sup>[7]</sup>亦发现 ni modipine 治疗给药对 MCAO 后脑膜微循环障碍无逆转作用, 与本研究结果相符。预防给药组, *dt*-, *t*-NBP 对微循环的改善作用于给药后 45 ~ 60 min 时达峰值, 药效可持续 2.5 h 以上, 较 ni modipine 持久, 与阎超华等研究结果<sup>[2]</sup>一致。由此可见, NBP 改善脑微循环作用优于 ni modipine。药代动力学研究发现<sup>[6]</sup>, NBP po 40 min 后, 在大鼠体内血药浓度达高峰, 随之即迅速下降, 1 h 后, 脑内出现两种主要的活性代谢产物 I, II, 其中产物 I 可能是活性成分。可见, 活性代谢产物的产生可能是 NBP 效果持久的重要原因。

另外, *dt*-NBP 对 MCAO 后脑血流无明显作用, 且预防给药 1 h, 加重 MCAO 所致的脑微循环障碍。可见, *t*-NBP 和 *dt*-NBP 具有完全不同的药理作用。由于生物体内药物与受体蛋白或酶的结合具有明显的立体选择性, 不同旋光性的 NBP 因其分子的不对称性, 通过手性匹配产生分子识别的结果必然有一定的差异, 这可能是本实验中 *t*-, *dt*-NBP 药理作用迥然不同的原因。由于 NBP 中 *t*和 *dt*-NBP 的量相等, 在相同剂量下, *t*-NBP 的作用应强于 *dt*-NBP, 而本研究结果显示, *t*-NBP 作用接近于 *dt*-NBP, 而 *dt*-NBP 不抵消 *t*-NBP 的作用, 其原因尚不清楚, 具体机制有待进一步探讨。

NBP 作为一种抗脑缺血新型药物, 本研究组对其药理作用机制已进行了广泛深入的研究。结果证

明,它可通过调节 NOS-NO-cGMP 系统的活性,促进 NO 释放,增加脑血流,起神经保护作用。另外,它还可明显改善脑损伤后花生四烯酸代谢,提高 PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 比值<sup>[8]</sup>。PGI<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 是重要的血管活性物质,在缺血性脑血管疾病中,其比值下降是继发产生脑血管痉挛及脑缺血的重要诱因之一。由此可见,NO,PGI<sub>2</sub> 可能是 NBP 改善微循环的主要途径。综上所述,d $\ell$ -, $\ell$ -NBP 可通过增快微循环血流速度,扩张微血管口径,改善脑微循环,发挥抗脑缺血作用。

致谢 本研究得到了南京医科大学药理教研室微循环组潘鑫鑫教授、许逸老师的热情帮助和悉心指导。

### 参 考 文 献

- 1 冯亦璞,胡盾,张丽英. 丁基苯酞对小鼠全脑缺血的保护作用. 药学报,1995,30: 741
- 2 Yan CH, Feng YP, Zhang JT. Effects of d $\ell$ -3- $\alpha$ -butylphthalide

- butylphthalide on regional cerebral blood flow in middle cerebral artery occlusion rats. Acta Pharmacol Sin, 1998, 19: 117
- 3 Deng WB, Feng YP. Effect of d $\ell$ -butylphthalide on brain edema in rats subjected to focal cerebral ischemia. Chin Med Sci J, 1997, 12: 102
- 4 Ricardo Prado, Brant Watson, John Kuluz, et al. Endothelium-derived nitric oxide synthase inhibition: effects on cerebral blood flow, pial artery diameter, and vascular morphology in rats. Stroke, 1992, 23: 1118
- 5 阎超华,冯亦璞,张均田,等. 丁基苯酞对正常大鼠纹状体脑血流的增加作用. 中国动脉粥样硬化杂志, 1995, 3: 155
- 6 王春华,冯亦璞,吴元鏊. 丁基苯酞在大鼠中代谢产物的研究. 药学报, 1997, 32: 641
- 7 Dirnagl U, et al. Nimodipine posttreatment does not increase blood flow in rats with focal cortical ischemia. Stroke, 1990, 21: 1357
- 8 Chong ZZ, Feng YP. Effects of d $\ell$ -3- $\alpha$ -butylphthalide on production of TXB<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  in rat brain during focal cerebral ischemia and reperfusion. Acta Pharmacol Sin, 1997, 18: 505

## EFFECTS OF 3- $\alpha$ -BUTYLPHTHALIDE ON PIAL ARTERIOLES IN FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA RATS

Xu Haoliang( Xu HL) and Feng Yipu( Feng YP)

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

**ABSTRACT** **AIM:** To study the effects of d $\ell$ -,  $\ell$ - and d $\ell$ -3- $\alpha$ -butylphthalide( NBP) on pial arteriole diameter( AD) and blood flow velocity( BFV) in focal ischemia rats. **METHODS:** Urethane-anesthetized rats were instrumented for monitoring pial AD and BFV in the cranial window preparation. The effects of d $\ell$ -,  $\ell$ -, d $\ell$ -NBP on AD and BFV were investigated in these left middle cerebral artery occluded( L-MCAO) rats by using the method of acute cranial window technique under *in vitro* videomicroscope. d $\ell$ -, d $\ell$ -,  $\ell$ -NBP(25 mg•kg<sup>-1</sup> ip) and nimodipine(0.3 mg•kg<sup>-1</sup>) were administrated systemically 20 min after MCAO or 1 h before MCAO. **RESULTS:** In the vehicle group, MCAO induced a significant decrease in BFV and AD, the levels of BFV and AD were reduced to 18.3% and 52% compared with the preischemia baseline values. In the pretreatment groups, no change in pial AD was found after d $\ell$ -,  $\ell$ -, d $\ell$ -NBP administration in normal animals, and a rapid and marked decrease in BFV and AD of the selected pial artery was observed within 5 minutes after MCAO. The decreased level of AD and BFV recovered quickly after MCAO in the d $\ell$ -,  $\ell$ -NBP and nimodipine groups, while the dysfunction of microcirculation was exacerbated by d $\ell$ -NBP. In the post-treatment groups, d $\ell$ -NBP(12.5, 25 mg•kg<sup>-1</sup> ip) induced dilation of the pial arterioles and the increase in BFV was in dose-dependent manner. The pial arteriolar response to MCAO was not affected by d $\ell$ -NBP and nimodipine. **CONCLUSION:** These data suggest that the improving effects of d $\ell$ - and  $\ell$ -NBP on microcirculation dysfunction during ischemia may play an important role in their protective effects against focal cerebral ischemia injury.  $\ell$ - and d $\ell$ -NBP showed counteractive effects on pial AD and BFV in MCAO rats indicating that NBP has stereoselective character on its protective action against cerebral ischemia injury.

**KEY WORDS** 3- $\alpha$ -butylphthalide; nimodipine; focal cerebral ischemia; pial arteriole; microcirculation