

巴曲酶注射液对改进光化学法致栓塞性脑梗死家兔模型的改善研究

荆国晓^{1,2}, 郝春华¹, 赵专友^{1*}

1. 天津药物研究院 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300073

摘要: **目的** 研究巴曲酶注射液对改进光化学法致栓塞性脑梗死家兔模型的改善作用。**方法** 将家兔随机分为假手术组, 模型组, 巴曲酶注射液高、低(0.005、0.015 BU/kg)剂量组, 采用光化学法致家兔栓塞性性脑梗死模型, 并观察应用巴曲酶注射液对模型的改善效果。**结果** 改进光化学法造成脑梗死后, 各组动物均表现出脑血流量下降, 造模后 120 min 模型组, 巴曲酶注射液高、低剂量组较假手术组同期下降均超过 50%, 同时出现神经功能受损等脑梗死症状, 说明模型科学可靠。给予巴曲酶注射液 0.005、0.015 BU/kg 后可以不同程度地增加脑血流量, 减少神经功能损害程度, 缩小脑梗死范围。亦可使纤维蛋白原(FIB)含量明显降低, 组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)含量不同程度明显增加, 而且无明显脑出血不良反应。**结论** 建立一种改进的光化学法致栓塞性脑梗死家兔模型, 方法成功, 适用于溶栓药物评价研究, 同时, 巴曲酶注射液可以改善此模型受损的神经功能, 缩小脑梗死范围。

关键词: 巴曲酶注射液; 兔; 光化学; 脑梗死

中图分类号: R965; R972

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)03-0317-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.013

Improvement of Batroxobin Injection on photochemically-induced embolic cerebral infarction model in rabbits

JING Guo-xiao^{1,2}, HAO Chun-hua¹, ZHAO Zhuan-you¹

1. Tianjin Center for New Drug Safety Assessment and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the improvement of Batroxobin Injection on photochemically-induced embolic cerebral infarction model in rabbits. **Methods** Rabbits were randomly divided into Sham operation, model, high-, and low-dose Batroxobin Injection groups (0.005, 0.015 BU/kg). The embolic cerebral infarction model was induced by photochemical method, then the effect of Batroxobin Injection was observed. **Results** When the cerebral infarction was caused by improvd photochemical method, the cerebral blood flow reduced in each group. The cerebral blood flow in high- and low-dose Batroxobin Injection groups reduced over 50% at 120 min compared with the Sham group. Even more the damaged nerve function and cerebral infarction were observed, which proved that the model was scientific and reliable. After Batroxobin Injection administration at a dose of 0.005 and 0.015 BU/kg, the cerebral blood flow increased remarkably, and the nerve function and cerebral infarction were also reduced. As well, the research demonstrated that the fibrinogen (FIB) decreased and the tissue-type plasminogen activator (t-PA) increased. More over, there was no remarkable hemorrhage side reaction. **Conclusion** A model of rabbit focal cerebral infarction with the improvement is established by photochemical method, which is successful and may be reliable in the evaluation of antithrombotic drug research. Meanwhile, Batroxobin Injection could improve the damaged nerve function and narrow the cerebral infarction by this model.

Key words: Batroxobin Injection; rabbit; photochemistry; cerebral infarction

脑血管疾病是当今威胁人类健康和生存的三大主要疾病之一。在各类脑血管病中, 脑梗死所占比

例高达 85%, 而急性脑梗死的治疗尤为国内外学者所关注^[1]。近年来, 国内外对脑梗死的治疗进行了

收稿日期: 2013-03-14

作者简介: 荆国晓, 女, 硕士研究生, 研究方向为药理学。Tel: 13821026635 E-mail: jingguoxiao816@163.com

*通信作者 赵专友, 男, 研究员, 硕士生导师。Tel: (022)84845267 E-mail: zhaozy@tjipr.com

大量实验与临床研究, 虽然已经获得令人满意的疗效, 尤其是在溶栓、降纤、血小板聚集抑制等方面的药物临床研究, 但是目前对此类药物研发尚缺乏有针对性的实验模型。本实验通过建立一种改进的光化学法致栓塞性脑梗死家兔模型, 可用于多功能药物药效学评价, 并通过巴曲酶注射液验证了其应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 仪器、动物与试剂

HH—4 数显恒温水浴锅 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); COOLPIX955 数码相机 (日本尼康公司产品); 病理图像采集与分析系统 (北京航空航天大学图象中心产品); MP-150 数据采集系统 (美国 BIOPAC 公司产品); PK121R 低温冷冻离心机 (意大利 ALC 公司产品); Stong90 微电动钻 (韩国 Saeshin Precision Ind 公司); UPSF—500 冷光源激光发射器 (航天八三五八所)。

日本大耳白兔, 体质量 (1.81~2.68) kg 北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号: SCXK(京)2010-0002。

巴曲酶注射液, 北京托毕西药业有限公司生产, 批号 20100914, 规格 0.5 mL : 5 BU; 临用前以生理盐水稀释至所需浓度供静脉输注给药用; 四氯四碘荧光素二钠 (虎红), 上海试剂三厂产品, 批号 20021030, 规格 10 g/瓶; 用生理盐水配置终浓度 20 mg/mL, 用孔径为 0.22 μm 的滤器滤过后供静脉注射用。组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 含量测定试剂盒由上海太阳生物技术公司生产, 批号为 41110。

1.2 模型制备

雄性家兔, 体质量 (2.31 $\pm$ 0.19) kg, 饲养一周以适应环境, 参照文献方法报道^[2]制备栓塞性脑梗死模型。耳缘 iv 20%乌拉坦 (1 g/kg) 麻醉后, 结扎右侧眼球下组织后将眼球摘除, 用明胶海绵压迫止血。显微镜下用微电动钻于眶上缘及顶骨区开 6 mm 直径的椭圆形骨窗, 在不破坏硬脑膜情况下看到大脑中动脉 (MCA) 主干。切开颅骨顶部皮肤暴露颅骨, 于前囟前方 1.0 mm、外侧 3.5 mm 处用微电动钻钻开约 2 mm 直径孔, 用一片大小约 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的薄膜贴于颅骨上。将家兔俯卧位固定于立体定位仪上, 探针置于打孔处距硬脑膜表面上方 0.5 mm 处监测血流量基础值。当获得稳定的血流量基线后, 耳缘静脉注入虎红 20 mg/kg, 直径 3 mm 光纤的绿色光源直接置于接近嗅束的 MCA 区段照射 15 min (绿光源为氩

灯, 波长 520~620 nm, 具有吸热滤色片和绿色滤光器)。监测照射后、直到给药结束后 120 min 时血流量 (PU) 值。监测结束后局部滴加青霉素防止感染, 逐层缝合, 回笼饲养。

1.3 分组及给药

照射 30 min 后, 血流量较基础值下降 30%即为造型成功, 进行随机分组并开始静脉给药。实验设为假手术组, 模型组, 巴曲酶注射液高、低剂量 (0.005、0.015 BU/kg) 组, 每组 8 只。假手术组在造模时仅暴露 MCA 主干, 未注射虎红及照射。假手术组和模型组给予生理盐水, 2 个受试药组按照给药剂量, 采用微量输液泵恒速耳缘静脉输注给予巴曲酶注射液进行药物治疗, 给药体积为 1 mL/kg, 连续给药时间为 10 min。

1.4 测定指标

1.4.1 脑血流量 检测方法见“1.2”。

1.4.2 神经功能损害评分 于给药后 24 h 进行神经功能损害程度评分。0 为无神经缺陷症状; 1 为对侧前肢肌张力降低, 回缩反射减弱; 2 为向对侧转圈; 3 为向对侧倾倒; 4 为不能自发行走并伴意识障碍; 5 为死亡^[3-4]。

将脑片放入 2% TTC 染液中, 避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 温孵 5 min 进行染色后, 采用 COOLPIX 955 数码相机成像系统将数字影像存储于计算机中, 染色前后均要拍照并用病理图像采集与分析系统 v4.0 软件测量。计算脑梗死率。

$$V_{\text{直接}} (\text{mm}^3) = \text{测量梗死面积平均值} \times 2 \text{ mm}$$

$$V_{\text{间接}} (\text{mm}^3) = V_{\text{直接}} \times (1 - (V_{\text{手术同侧半球}} - V_{\text{手术对侧半球}}) / V_{\text{手术对侧半球}})$$

$$\text{脑梗死率} = (V_{\text{间接}} / V_{\text{手术对侧半球}}) \times 100\%$$

1.4.3 测 FIB 和 t-PA 给药后 24 h 经心脏取血 2 mL, 测纤维蛋白原 (FIB) 浓度。

造模前及给药后 24 h, 经心脏取血 2 mL, 以 1/10 体积的 0.109 mol/L 枸橼酸钠抗凝, 3 000 r/min 转速 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用酶联免疫吸附双抗体夹心法, 用酶标仪在 490 nm 波长处测定光吸收度, 计算 t-PA 含量。

1.4.4 判断脑出血类型 取全脑, 检查表面大体出血情况, 去除软脑膜血管, 再将大脑切成 2 mm 厚的冠状切片, 观察切片两面的出血类型。出血类型按下列标准分为 3 类^[5], 出血性梗死 (HI): 在松软的梗死组织中出现红色斑点; 点状出血 (PT): 在脑组织内出现散在的小红斑; 实质性大脑内出血 (ICH): 组织内有大量的血液。

1.5 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 Origin 7.0 软件采用配对 t 检验比较给药前后均数差异显著性, 非配对 t 检验比较不同组间均数差异显著性; 计数资料采用精确 Fisher 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 各组脑血流量的变化

各组数据以基础值为 100% 进行标化, 以排除误差观察药物对脑梗死治疗的真实有效性。假手术

组在整个实验过程中流量较为稳定, 模型组在注入虎红激光照射造成脑梗死后, 各组动物均表现出脑血流量下降, 较假手术组同期下降 45.9% ($P < 0.001$); 给予生理盐水后, 脑血流量随时间延长进一步降低, 120 min 时较假手术组下降 54.3% ($P < 0.001$)。与模型组同期比较, 静脉给予巴曲酶注射液 0.005 BU/kg, 120 min 时增幅 47.6% ($P < 0.001$); 0.015 BU/kg 120min 最大增加 46.3% ($P < 0.001$)。结果见表 1。

表 1 各组脑血流量变化
Table 1 Cerebral blood flow change in each group

组 别	剂量/ (BU·kg ⁻¹)	造模前		给药前		给药 120 min	
		血流量	标化/%	血流量	标化/%	血流量	标化/%
假手术	—	326±67	100	320±69	98.2	322±65	98.8
模型	—	315±50	100	173±32 ^{***}	54.9	147±26 ^{***}	46.7
巴曲酶注射液	0.005	309±37	100	169±22	54.7	217±33 ^{▲▲▲}	70.2
	0.015	326±45	100	175±21	53.7	215±24 ^{▲▲▲}	66.0

与假手术组比较: *** $P < 0.001$ 与模型组比较: ▲▲▲ $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs Sham group ▲▲▲ $P < 0.001$ vs model group

2.2 对神经功能及脑梗死范围的影响

模型组造模后出现了明显的神经功能受损症状。静脉给予巴曲酶注射液 0.005、0.015 BU/kg 能不同程度恢复受损的神经功能, 并有一定的剂量相关性。给药 24 h 后, 其神经功能损害程度评分分别减少了 24.2% ($P < 0.05$)、36.4% ($P < 0.05$)。模型组可见明显的脑梗死。静脉给予巴曲酶注射液能剂量相关性缩小脑梗死范围, 与模型组比较, 巴曲酶注射液 0.005、0.015 BU/kg 组脑梗死范围分别减小了 29.5% ($P < 0.05$)、37.7% ($P < 0.01$), 见表 2。

2.3 对 FIB 及 t-PA 的影响

模型组与假手术组比较 FIB 含量无明显变化。

表 2 各组神经功能损害评分及脑梗死范围

Table 2 Neurological impairment scores and cerebral infarction range in each group

组 别	剂量/ (BU·kg ⁻¹)	神经功能 损害评分	脑梗死率/%
假手术	—	0.0±0.0	0.0±0.0
模型	—	3.3±1.0 ^{***}	22.0±7.5 ^{***}
巴曲酶注射液	0.005	2.5±0.9 [▲]	15.5±4 [▲]
	0.015	2.1±0.6 [▲]	13.7±2.9 ^{▲▲}

与假手术组比较: *** $P < 0.001$ 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$

*** $P < 0.001$ vs Sham group ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs model group

静脉给予巴曲酶注射液能剂量相关性降低血浆 FIB 浓度。巴曲酶注射液 0.005、0.015 BU/kg 分别降低了 32.5% ($P < 0.05$)、35% ($P < 0.01$)。模型组 t-PA 含量在给药前及给药后基本保持稳定; 给予巴曲酶 0.005、0.015 BU/Kg, 24 h 后可使 t-PA 含量明显增加, 较模型组分别增加 16.9% ($P > 0.05$)、43.9% ($P < 0.05$)。结果见表 3。

2.4 各组出血类型结果

模型组有 2 只动物脑内出现出血性梗死, 均是点状出血, 巴曲酶注射液低高剂量组均有 3 只动物脑内出血, 给予不同剂量巴曲酶出血有不同程度增加, 但与模型组无显著差异。巴曲酶注射液 0.005、0.015 BU/kg 的作用相当, 无统计学差异。见表 4。

表 3 各组 FIB 和 t-PA 含量

Table 3 Contents of FIB and t-PA in each group

组 别	剂量/ (BU·kg ⁻¹)	FIB/(g·L ⁻¹)	t-PA/(ng·mL ⁻¹)	
			基础值	给药后 24 h
假手术	—	4.1±0.5	2.36±0.62	2.27±0.55
模型	—	4.0±0.9	2.41±0.58	2.37±0.39
巴曲酶注射液	0.005	2.7±0.9 [▲]	2.53±0.44	2.77±0.41
	0.015	2.6±0.7 ^{▲▲}	2.54±0.59	3.41±0.61 [▲]

与模型组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$

▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs model group

表 4 巴曲酶注射液对各组脑梗塞家兔脑出血类型的影响

Table 4 Effect of Batroxobin Injection on type of cerebral hemorrhage in cerebral infarction rabbits in each group

组 别	剂量/(BU·kg ⁻¹)	出血总数/只	出血类型			
			未见出血	出血性梗死	点状出血	实质性大脑内出血
假手术	—	0	8	0	0	0
模型	—	2	6	0	2	0
巴曲酶注射液	0.005	3	5	2	3	0
	0.015	3	5	3	3	0

3 讨论

建立和完善脑梗死模型是研究脑梗死疾病的前提。自 Watson 等^[6]1985 年应用光化学法在大鼠上制作出了局灶性皮层脑梗死以来,光化学法的应用不断扩展和完善,国内外应用此法在鼠类及兔类都建立起了脑梗死模型^[7-9]。家兔相较于大鼠不但性情温顺、易于饲养、便于操作,同时颅内外血管之间无网状吻合,采血操作方便、血量较多,可满足各项指标测定及动态观察的需要,更适合临床研究。因此,兔脑梗死模型的研究和应用越来越受到研究者关注。光化学法凭借操作简单、重复性好、可控性强等优点,一直被广泛应用于这一领域。静脉注射光敏剂随血液循环分布全身,选择要梗塞的部位,采用特定波长光照射,荧光剂受到光照后产生自由基物质,导致血管内皮细胞损伤,管腔通透性增大,血小板黏附于血管内皮表面并发生释放反应,激发血管内凝血,导致血栓形成,进而由缺血水肿引起炎症改变甚至坏死^[10]。该模型的梗死过程与人类微血管病变导致的血栓形成过程相似,其血栓成分病理学证实与产生于人体的血栓类似,是一种较为理想的进行脑微血管血栓病理生理及防治的动物研究模型^[11]。传统的光化学法所建立的兔脑皮层梗死模型要求开颅照射^[12],损伤较大,开放了颅内环境,脑梗死水肿后产生的颅内压增高等作用将减小。本研究从眶后打小孔暴露大脑中动脉,这样不仅保留了原光化学诱导兔大脑皮层梗死模型的优点,而且具有损伤小,感染机率低;不破坏硬脑膜,维持了颅腔内环境稳定的特点,更加符合生理病理的实际情况。

巴曲酶是从蛇毒中提取的一种高纯度丝氨酸蛋白酶,又称为类凝血酶,由 231 个氨基酸组成,能直接降低血液中纤维蛋白原浓度,使纤维蛋白多聚体降解为纤维蛋白单体,因此具有降纤、溶栓、抗凝等作用。早期使用巴曲酶能增加脑梗死患者血浆

中 t-PA 的释放,降低纤维蛋白原浓度、降低血黏度、促进血栓溶解,改善微循环、保护神经元等^[13-14]。本研究发现巴曲酶注射液 0.005、0.015 BU/kg 给药后可使 FIB 含量明显降低,t-PA 含量增加,与以往研究结果一致^[14],即巴曲酶有溶解血栓作用,缺血超早期应用能有效缩小梗死灶体积^[15]。本实验结果也表明,巴曲酶注射液 0.005、0.015 BU/kg 不仅能缩小脑梗死范围,并且能提高脑血流量,恢复受损的神经功能。同时,巴曲酶注射液并未造成症状性颅内出血不良反应,这与早期应用巴曲酶不增加出血率的报道相一致^[13,16-17]。以上结果均表明,巴曲酶注射液主要通过增加 t-PA 的释放,降低血浆纤维蛋白原浓度,增加脑血流量,从而达到改善脑梗死症状的目的。同时也证明,该模型科学、稳定、损伤小,在评价脑梗死的溶栓、降纤等药物方面具有很好的应用价值。

参考文献

- [1] 周鸿雁,毛海峰,王一蓉,等.脑缺血损伤的研究进展[J].湖南文理学院学报:自然科学版,2005,17(2):72-75.
- [2] Suzuki Y, Takagi Y, Kawano K, *et al.* A novel guinea pig model with cyclic flow reductions following thrombotic cerebral ischemia [J]. *Brain Res Proto*, 2002, 10(2): 55-59.
- [3] 邵义祥,朱顺星,丁 莉,等.光化学法诱导兔脑梗塞模型[J].上海实验动物科学,2004,24(2):91-93.
- [4] Bederson J B, Pitts L H, 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.
- [5] Chapman D F, Lyden P, Lapchak P A, *et al.* Comparison of TNK with wild-type tissue plasminogen activator in a rabbit embolic stroke model [J]. *Stroke*, 2001, 32(3): 748-752.
- [6] Watson B D, Dietrich W D, Busto R, *et al.* Induction of

- reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis [J]. *Ann Neurol*, 1985, 17(5): 497-504.
- [7] Kharlamov E A, Kharlamov A, Kelly K M. Changes in neuropeptide Y protein expression following photothrombotic brain infarction and epileptogenesis [J]. *Brain Res*, 2007, 1127(1): 151-162.
- [8] Sugimori H, Yao H, Ooboshi H, *et al*. Krypton laser induced photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion without craniectomy in mice [J]. *Brain Res Protoc*, 2004, 13(3): 189-196.
- [9] Zhao B Q, Suzuki Y, Kondo K, *et al*. Cerebral hemorrhage due to heparin limits its neuroprotective effects: studies in a rabbit model of photothrombotic middle cerebral artery occlusion [J]. *Brain Res*, 2001, 902(1): 30-39.
- [10] Hoff E I, Eqbrink M G, Heijnen V V, *et al*. *In vivo* visualization of vascular leakage in photochemically induced cortical infarction [J]. *J Neurosci Methods*, 2005, 141(1): 135-141.
- [11] Nishimura N, Schaffer C B, Friedman B, *et al*. Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104(1): 365-370.
- [12] 王少学, 郭龄昌. 巴曲酶联合依达拉奉治疗急性脑梗死疗效及安全性 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2012, 15(18): 30-32.
- [13] Xu G, Liu X, Zhu W, *et al*. Feasibility of treating hyperfibrinogenemia with intermittently administered batroxobin in patients with ischemic stroke transient ischemic attack for secondary prevention [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007, 18 (2): 193-197.
- [14] 王维亭, 于冰, 赵专友, 等. 家兔微血栓栓塞中风模型的建立及应用 [J]. 中国药业, 2010, 19(5): 15-17.
- [15] 吴建新. 依达拉奉联合东菱迪芙治疗急性脑梗死 49 例疗效观察 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 25(1): 108-109.
- [16] 于司源. 巴曲酶治疗急性期脑梗死临床观察 [J]. 黑龙江医学, 2012, 36(8): 590-592.
- [17] 钟志耕, 李又佳, 黄燕, 等. 巴曲酶治疗脑梗死血浆纤维蛋白原动态变化一项前瞻性随机对照研究 [J]. 实用医学杂志, 2012, 28(11): 1793-1795.