

巴曲酶注射液对大鼠血栓栓塞性脑卒中急性超早期损伤的保护作用

郝春华, 张蕊, 孙双勇, 王维亭*, 赵专友, 汤立达*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300310

摘要: 目的 研究巴曲酶注射液对大鼠血栓栓塞性脑卒中急性超早期的保护作用。方法 自体血凝块闭塞左侧大脑中动脉法制备大鼠血栓栓塞性脑卒中模型, 32只造模成功大鼠按神经缺陷程度随机分为4组: 模型组及巴曲酶注射液低、高剂量(0.3、1.0 BU/kg)组和阿替普酶(rt-PA, 9 mg/kg)组, 每组8只, 另设假手术组8只。造模1 h后尾iv给药, 给药后6 h行神经功能评分, 采用核磁共振(MIR)技术进行大鼠脑SE-T2WI序列扫描, 测量脑病变范围; 给药后24 h评分后取脑进行TTC染色, 测量脑梗死范围; 给药后6、24 h取血浆, 测纤维蛋白原(FIB)浓度。结果 与模型组比较, 巴曲酶注射液0.3 BU/kg治疗24 h ($P < 0.05$)、1 BU/kg治疗6、24 h ($P < 0.05$ 、0.01)显著改善大鼠神经功能评分; 给药后6 h MRI结果显示, 巴曲酶注射液0.3、1.0 BU/kg显著缩小病变范围 ($P < 0.05$ 、0.01); 给药后24 h TTC结果显示, 巴曲酶注射液0.3、1.0 BU/kg显著缩小梗死范围 ($P < 0.05$); 巴曲酶注射液0.3、1.0 BU/kg于药后6、24 h均可显著降低血浆FIB浓度 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结论 巴曲酶注射液能改善大鼠脑缺血急性期受损神经功能、缩小脑病变范围、降低血浆FIB浓度, 具脑保护作用。

关键词: 巴曲酶注射液; 大鼠; 血栓栓塞性脑缺血; 核磁共振; TTC染色

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)07-0911-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.07.005

Protection of Batroxobin Injection on super acute stage of thromboembolic cerebral stroke in rats

HAO Chun-hua, ZHANG Rui, SUN Shuang-yong, WANG Wei-ting, ZHAO Zhuan-you, TANG Li-da

Tianjin medicine research institute of new drug evaluation co., LTD, Tianjin 300310, China

Abstract: Objective To observe the effects of Batroxobin Injection on thromboembolic cerebral stroke by magnetic resonance imaging (MRI) and TTC staining. **Methods** Rat model of thromboembolic stroke was prepared after the left middle cerebral artery was occluded by autologous blood clots, and 32 rats with successful operation were divided into four groups according to the degree of neurological deficit: model group, Batroxobin Injection low and high dose (0.3, 1.0 BU/kg) group, and rt-PA (9 mg/kg) group, with eight rats in each group, and other eight rats in Sham group. Rats were administered 1 h after modeling by tail iv method. At 6 h after administration, neurological deficit score and MRI including SE-T2WI and DWI sequence scanning were measured. At 24 h after administration, the brain was cut for TTC staining to measure the infarct area, and blood FIB was measured. **Results** Compared with model group, Batroxobin Injection 0.3 BU/kg treatment for 24 h ($P < 0.05$), 1 BU/kg treatment for 6 and 24 h ($P < 0.05$, 0.01) could significantly improve the neurological function scores of rats. MRI results showed that Batroxobin Injection at dose of 0.3 and 1 BU/kg significantly reduced the lesion range ($P < 0.05$ and 0.01). Results of TTC stain showed that Batroxobin Injection at dose of 0.3 and 1 BU/kg significantly reduced the infarct size ($P < 0.05$). Batroxobin Injection at doses of 0.3 and 1 BU/kg can significantly lower plasma FIB concentration ($P < 0.05$, 0.01, 0.001) 6 and 24 h after administration. **Conclusion** Batroxobin Injection can improve the damaged neural function, reduce scope of lesions, decrease plasma fibrinogen, with protective effects for cerebral ischemia in rats.

Keywords: Batroxobin Injection; rat; thromboembolic cerebral ischemia; magnetic resonance imaging; TTC staining

收稿日期: 2016-04-12

作者简介: 郝春华(1981-), 女, 硕士, 研究方向为药理学。E-mail: haoch@tjipr.com

*通信作者 王维亭, 研究员, 研究方向为心脑血管药理学。E-mail: wangwt@tjipr.com

汤立达, 研究员, 研究方向为心脑血管药理学。E-mail: Tangld@tjipr.com

脑缺血具有高发生率、高病死率、高致残率的特点, 现今正逐步成为人类疾病死亡的首要因素^[1]。对急性脑缺血发作的病人, 早期溶栓、降纤治疗, 恢复缺血区的血液供应、改善微循环、阻断脑梗死的病理过程, 仍是首选和最有效的治疗方案。溶栓治疗改善预后, 但亦存在导致早期死亡/严重残疾的出血并发症, 而且必须在症状出现 6 h 内开始治疗, 这给医生和患者带来极大的挑战^[2-3], 所以降纤治疗尤为重要。巴曲酶是从蛇毒中提取的一种高纯度类凝血酶样物质, 由 231 个氨基酸组成, 具有明显的降低纤维蛋白原和溶栓作用, 近年来已广泛用于治疗缺血性脑血管疾病, 对急性脑梗死的疗效肯定^[4]。本课题组前期研究表明^[5], 在兔微血栓栓塞性脑卒中模型上, 巴曲酶 0.5、1.0 BU/kg 可明显提高卒中急性超早期致半数卒中微栓子量值 (ES50), 其作用机制与分解纤维蛋白原, 降低血液凝固性, 抑制血栓形成, 以及能促进内源性 tPA 释放、溶解血栓有关。利用核磁共振 (MIR) 现代检测技术, 研究巴曲酶对大鼠脑卒中急性超早期脑损伤的作用尚未见相关报道。本研究建立大鼠血栓栓塞性脑卒中模型, 通过 6 h MRI 扫描和 24 h 时 TTC 染色技术, 检测脑病变和梗死范围变化, 探讨巴曲酶对大鼠脑卒中超急性期的保护作用。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

巴曲酶注射液, 北京托毕西药业有限公司, 批号 20100914, 规格 0.5 mL : 5 BU; 重组组织型纤溶酶原激活剂, 阿替普酶 (rt-PA), 德国勃林格殷格翰国际公司, 批号 206005, 规格 20 mg/瓶; 红四氮唑 (TTC, Solarbio, 批号 726B034, 规格 5 g/瓶)。

1.2 仪器

Signa HD-X3.0T 磁共振扫描仪 (美国 GE 公司); PK121R 低温冷冻离心机 (意大利 ALC 公司); TS100 显微镜成像系统 (日本 Nikon 公司); 病理图像采集与分析系统 (北京航空航天大学图象中心)。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 300 g 左右。动物生产许可证号 SCXK (京) 2011-00101, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

2 方法

2.1 手术过程

SD 大鼠, 异氟烷气体麻醉并维持, 仰卧位固定于手术台上, 颈正中线切开皮肤, 分离皮下筋膜,

游离左侧颈总动脉 (CCA)、颈内动脉 (ICA) 和颈外动脉 (ECA)。剥离与 ICA 伴行的迷走神经, 至鼓骨下缘可见 ICA 颅外分支翼额动脉, 采用动脉夹暂时夹闭该动脉。在颈动脉分叉远端 5~10 mm 处用丝线将 ECA 双线结扎并离断, 留取近心端线头下拉与 ICA 成一直线。用微动脉夹夹闭 ICA 及 CCA, 用丝线在 ECA 起始处打一松结, 在 ECA 上距颈动脉分叉 3 mm 处剪一小口, 将 PE50 导管热处理拉细的一端插入 ECA 内, 将丝线结扎紧, 去掉 ICA 上的微动脉夹。该导管用于引入栓子。

2.2 模型制备

参照文献方法^[6]制备栓塞性卒中模型。经大鼠眶静脉取血 0.5 mL, 立即吸入 PE50 管中, 室温放置 2 h 后, 4 °C 保存 22 h 进行老化。将血栓推出至 30 mL 生理盐水中, 洗涤 3 次, 每次 5 min。切取长度为 5 mm 栓子, 吸入 PE50 管中, 用 0.4 mL 生理盐水将血栓推入颅内, 小心抽出栓子导入插管, 结扎 ECA。栓子注入后 1 h 进行神经功能评分^[7], ≥ 1 分为造模成功标志, 进行药物治疗。

2.3 分组与给药

造模成功的动物按神经缺陷程度随机分为 4 组, 每组 8 只, 另设假手术组 (不注入栓子) 8 只。假手术组和模型组给予生理盐水; 受试药给予巴曲酶注射液, 剂量为 0.3、1.0 (临床等效) BU/kg。阳性药给予 rt-PA, 剂量 9 mg/kg (临床等效), 尾 iv 给药, 2 mL/只。

2.4 神经缺陷评分

给药后 6、24 h, 采用盲法观察动物行为障碍程度并进行 Zea Longa 6 级评分法评分^[7]。评分标准如下: 0=无神经缺陷症状; 1=右侧前肢屈曲; 2=爬行时向右侧转圈; 3=向右侧倾倒; 4=意识不清、不能自发行走; 5=死亡。

2.5 MIR 成像检测

给药后 6 h, 采用 GE Signa HD-X3.0T 磁共振扫描仪及动物相控阵线圈, 对所有受试老鼠进行横轴位 T2WI 像扫描, 成像范围覆盖全脑。

横轴位 T2WI 像扫描参数: 重复时间 (TR) / 回波时间 (TE) = 3 000/88 ms; 视野 (FOV): 80 mm × 40 mm; 矩阵: 256 × 256; 层面激励次数 (NEX) = 3; 层厚: 1 mm; 间隔: 0.5 mm。采集层数为 12 层, 获得图像 12 幅。病变判断标准: 肉眼可分辨的 T2WI 上高信号区。采用 MRICron 图像分析软件测定双侧大脑半球体积及病变体积, 并

计算病变体积占双侧大脑半球体积的百分比。

2.6 脑梗死体积测定

给药后 24 h, 动物评分结束后, 断头取前脑, 将脑组织置于 -20 °C 冰箱内快速冷冻 15 min 后, 由前向后进行切片, 每片厚度为 2 mm。间隔取上述一半脑片置 2% 红四氮唑 (TTC) 溶液中, 37 °C 孵育 30 min, 梗死组织呈白色, 非梗死组织为红色。采用 COOLPIX955 数码相机及病理图像采集与分析系统进行脑梗死面积测定, 并计算梗死体积占全脑半球体积的百分比。

2.7 纤维蛋白原 (FIB) 浓度测定

分别于给药前及给药后 6、24 h 眶静脉取血, 以 1/10 体积的 0.109 mol/L 枸橼酸钠抗凝, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 取血浆, 凝固法测 FIB。

2.8 统计学处理

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析比较组间差异性, 两组间比较用 LSD 法。

3 结果

3.1 对行为障碍的影响

与对照组比较, 模型组动物出现明显行为障碍 ($P < 0.001$); 静脉输注巴曲酶注射液后行为障碍得到明显改善, 0.3 BU/kg 组给药后 6、24 h 分别改善了 16.0%、29.6%, 24 h 差异显著 ($P < 0.05$); 1 BU/kg 组给药后 6、24 h 分别改善了 31.5%、41.3%, 均差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01); 阳性对照药 rt-PA 给药后行为障碍也得到不同程度改善, 给药后 6 h 和 24 h 分别改善了 26.5%、35.2%, 24 h 差异显著 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 巴曲酶注射液对血栓性脑卒中大鼠行为障碍的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of Batroxobin Injection on behavioral disorders in rats with thrombotic stroke ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	行为障碍评分/分		
		给药前	给药后 6 h	给药后 24 h
假手术	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	2.50±0.93 ^{###}	2.38±0.92 ^{###}	2.13±0.64 ^{###}
巴曲酶注射液	0.3 BU·kg ⁻¹	2.38±0.92	2.00±0.76	1.50±0.53 [*]
	1.0 BU·kg ⁻¹	2.50±0.93	1.63±0.74 [*]	1.25±0.46 ^{**}
rt-PA	9 mg·kg ⁻¹	2.63±0.52	1.75±0.46	1.38±0.52 ^{**}

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

3.2 对 MRI 检测脑病变的影响

给药后 6 h 后进行 MIR 检测, T2WI 上右脑顶叶、颞叶和外侧尾壳核出现高信号强度区, 与周围正常组织对比明显, 提示存在缺血损伤病灶, 假手术组均未发现病变。静脉输注巴曲酶注射液使高信号强度区信号较模型组强度显著减弱、范围缩小 ($P < 0.05$ 、0.01), 0.3、1.0 BU/kg 组使病变范围分别缩小 31.4%、37.6%; rt-PA 9 mg/kg 使病变范围缩小 34.6% ($P < 0.05$)。巴曲酶注射液 1 BU/kg 组与 rt-PA 9 mg/kg 作用相似, 差异不显著。结果见图 1、表 2。

3.3 对染色法测定梗死范围的影响

溶栓治疗 24 h 后 TTC 染色结果表明, 假手术组未见梗死组织; 模型组出现明显的脑梗死区域。与模型组比较, 静脉输注巴曲酶注射液使梗死范围显著缩小 ($P < 0.05$), 0.3、1.0 BU/kg 组使梗死范围分别缩小 26.4%、31.7%; rt-PA 9 mg/kg 使梗死范

围缩小 30.4% ($P < 0.05$)。巴曲酶注射液 1 BU/kg 与 rt-PA 9 mg/kg 作用相似, 差异不显著。结果见图 2、表 3。

3.4 对 FIB 质量浓度的影响

与模型组比较, 静脉输注巴曲酶注射液显著能降低血浆 FIB 质量浓度 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 0.3 BU/kg 组于药后 6、24 h 分别降低 24.3%、21.5%, 1 BU/kg 组于药后 6、24 h 分别降低 33.9%、25.5%; rt-PA 9 mg/kg 于给药后 6、24 h 使血浆纤维蛋白原浓度降低分别降低 19.9%、20.0%, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 4。

4 讨论

临床上常见的脑缺血病因多为血栓栓塞, 本实验使用了大鼠血栓作为栓塞物来复制脑缺血模型, 更接近临床脑缺血的病理生理改变, 有利于溶栓、降纤药物动物实验研究^[8]。自大鼠颈内动脉注入血栓造成大脑中动脉栓塞后, 利用 MRI 来监测脑缺血

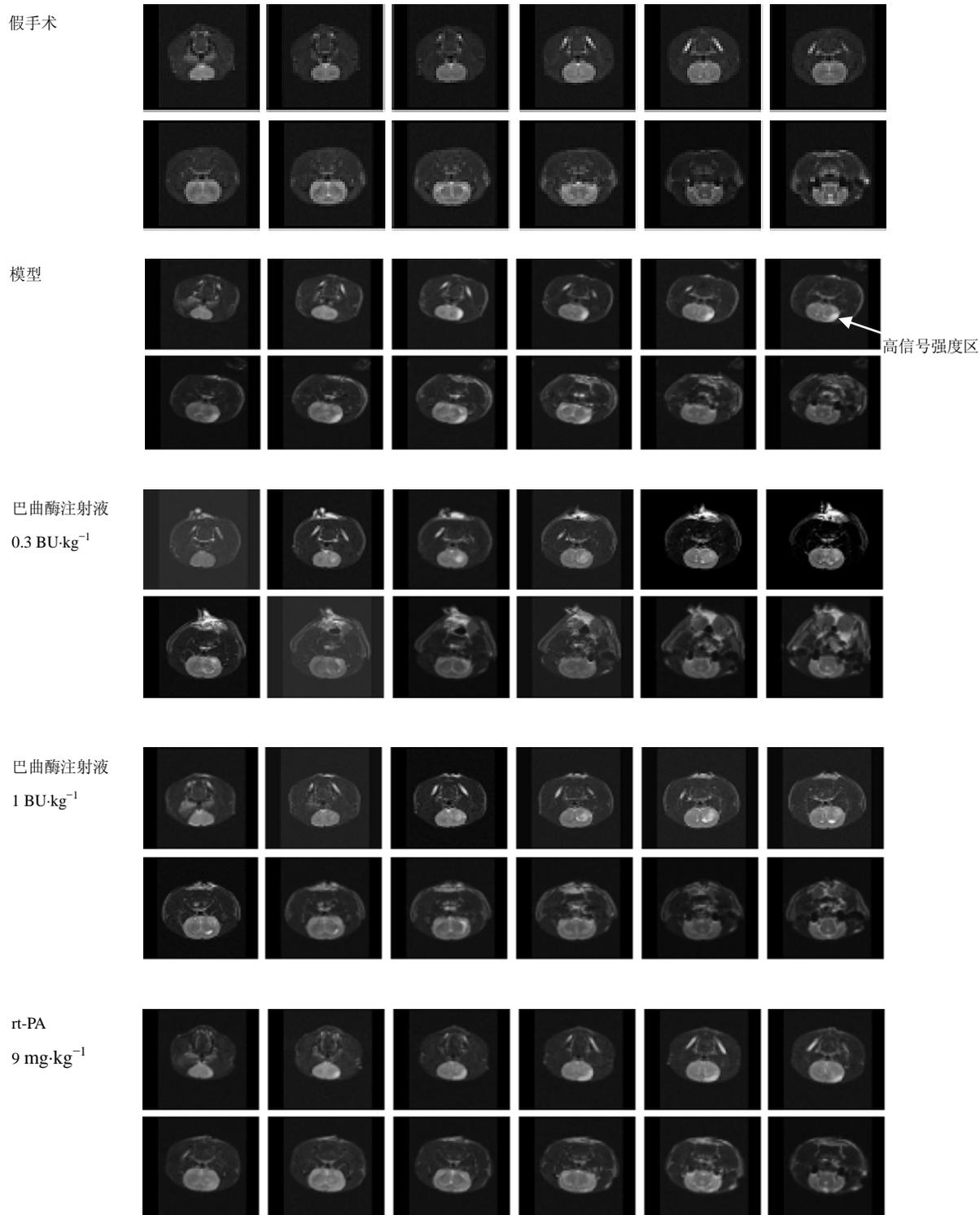


图 1 巴曲酶注射液对血栓性脑卒中大鼠病变范围的影响

Fig. 1 Effects of Batroxobin Injection on lesion volum in rats with thrombotic stroke

的发生和范围，可定位脑缺血后病变发生的部位、组织损害程度，并可以评价药物早期的治疗效果。有研究发现，在大脑中动脉阻塞 4 h 后，T2WI 上在中动脉供应区域有高信号强度区，即可监测到明显

病变范围，随缺血时间延长范围逐渐扩大，24 h 时见到明显缺血梗死灶^[9]。所以本研究采用给药后 6 h 核磁和 24 h TTC 染色观察大鼠脑缺血后病变及药物早期治疗效果。

表 2 巴曲酶注射液对血栓性脑卒中大鼠病变范围的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of Batroxobin Injection on lesion volume in rats with thrombotic stroke ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	病变范围/%
假手术	—	0.00±0.00
模型	—	7.57±2.11 ^{###}
巴曲酶注射液	0.3 BU·kg ⁻¹	5.19±1.77*
	1.0 BU·kg ⁻¹	4.72±1.90**
rt-PA	9 mg·kg ⁻¹	4.95±2.04*

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

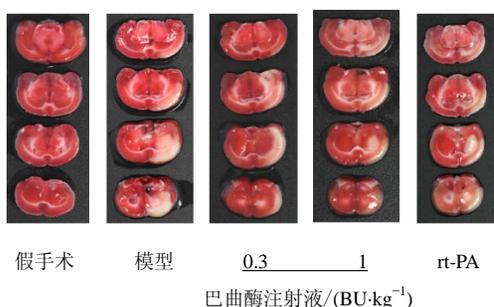


图 2 巴曲酶注射液血栓性脑卒中大鼠脑梗死范围的影响
 Fig. 2 Effects of Batroxobin Injection on infarct volume in rats with thrombotic stroke

表 4 巴曲酶对血栓性脑卒中大鼠血浆 FIB 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effects of Batroxobin Injection on FIB content in rats with thrombotic stroke ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	FIB/ (g·L ⁻¹)		
		给药前	给药后6 h	给药后24 h
假手术	—	3.62±0.58	3.66±0.55	2.97±0.64
模型	—	3.71±0.53	3.87±0.52	3.25±0.64
巴曲酶注射液	0.3 BU·kg ⁻¹	3.75±0.63	2.93±0.61**	2.55±0.52*
	1.0 BU·kg ⁻¹	3.64±0.51	2.56±0.52***	2.42±0.70*
rt-PA	9 mg·kg ⁻¹	3.85±0.53	3.10±0.46**	2.60±0.62*

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

质, 能增加纤溶酶原激活剂的释放, 主要为降低血液中 FIB 水平、降低血黏度、降低外周血管阻力, 近年来广泛用于治疗缺血性脑血管疾病, 治疗急性脑梗死的疗效肯定。本研究于巴曲酶注射液治疗后 6 和 24 h 眶静脉取血浆进行 FIB 水平监测, 确定药物作用机制。

结果显示, 模型组给予生理盐水 6 h 后, T2WI 检测到缺血损伤, 24 h 出现明显梗死病灶。巴曲酶注射液 0.3、1 BU/kg 组治疗 6 h T2WI 高信号强度区的信号减弱、体积减小, 24 h TTC 染色脑梗死范

表 3 巴曲酶注射液对血栓性脑卒中大鼠脑梗死范围的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of Batroxobin Injection on infarct volume in rats with thrombotic stroke ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	梗死范围/%
假手术	—	0.00±0.00
模型	—	10.22±2.89 ^{###}
巴曲酶注射液	0.3 BU·kg ⁻¹	7.52±2.13*
	1.0 BU·kg ⁻¹	6.98±2.45*
rt-PA	9 mg·kg ⁻¹	7.11±2.00*

与假手术组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$
^{###} $P < 0.001$ vs sham group; * $P < 0.05$ vs model group

脑缺血卒中分为急性期和恢复期, 急性期 (1 个月内) 又分三个阶段: 第一阶段 (48 h 内): ①3~6 h 超早期, 可考虑溶栓 (尿激酶、tPA 等) 治疗; ②超过 6 h, 不适合溶栓可酌情给予降纤 (克栓酶、降纤酶), 抗凝 (低分子肝素), 抗血小板治疗; 第二阶段 (3~14 d): 主要以降低颅内压, 用改善微循环及营养代谢的脑保护剂治疗; 第三阶段 (15~30 d): 以改善脑循环及营养代谢为主, 若无颅高压可停用脱水药, 可酌情加用中药、针灸等治疗^[10]。巴曲酶是从蛇毒中提取的一种高纯度类凝血酶样物

围较模型缩小, 神经功能改善, 与武小玲^[11]等报道的降纤酶缩小光化学法诱导的脑缺血大鼠血栓体积, 缩小梗死灶的影响一致。以上结果提示, 巴曲酶注射液降低血液中 FIB 水平, 减轻缺血损害, 有助于脑组织的神经再塑和功能改善。阳性药 rt-PA 是被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准应用于临床的溶栓剂, 对血栓内纤溶酶原亲和力强, 具有特异性局部溶栓作用, 而对血循环中的纤溶酶原亲和力小, 全身纤溶作用不明显, 是患者经济条件许可下首选的溶栓用药, rt-PA 其治疗时间窗为发病后

3 h 之内,用于超早期的急性脑卒中治疗。本研究显示巴曲酶注射液(1 BU/kg, 临床等效)与 rt-PA (9 mg/kg, 临床等效)作用相当,亦可用于超早期的急性脑卒中治疗,有很大的应用价值。

参考文献

- [1] Li H L, Zhang N N, Lin H Y, et al. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice [J]. *Neuroscience*, 2014, 15: 58.
- [2] Flynn D, Nesbitt D J, Ford G A, et al. Development of a computerised decision aid for thrombolysis in acute stroke care [J]. *BMC Med Inform Decis Mak*, 2015, 15(1): 127.
- [3] Turc G, Isable C, Calvet D. Intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke [J]. *Diagn Interv Imaging*, 2014, 95(12): 1129-1133.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Zhang Z G, Zhang R L, Jiang Q, et al. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(2): 123-135.
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carison S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] 周智鹏, 邱维加, 张辉阳, 等. 磁共振扩散加权成像在大鼠自体血栓栓塞脑缺血和 t-PA 溶栓治疗模型中的作用 [J]. *华夏医学*, 2010, 23(5): 475-478.
- [9] 廖维靖, 杨运煌, 范明, 等. 灯盏花制剂对大鼠缺血性脑损伤再灌注早期脑成像及神经代谢物的作用 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(2): 163-166.
- [10] 郝春华, 李亚丽, 孙双勇, 等. 缺血性脑中风急性期溶栓药物研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(23): 2687-2689.
- [11] 武小玲, 王振金, 尹岭, 等. 降纤酶对血栓形成和光化学诱导大鼠脑缺血的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2003, 12(11): 909-912.