

· 药 理 ·

3,4 - 二氯苯丙烯酰另丁胺对大鼠脑缺血 - 再灌注损伤的影响 *

王 迪 李晓东¹ 孙光春² 陶 成³ 赵艳杰(锦州 121001 锦州医学院药理教研室;¹ 锦州 121001 锦州市中心医院麻醉科;² 贵阳 550000 贵阳医学院药理教研室;³ 北京 100083 北京医科大学基础医学院药理学系)

摘要 目的:研究新的桂皮酰胺类衍生物 3,4 - 二氯苯丙烯酰另丁胺(AED₈₈₀₁)对大鼠脑缺血/再灌注损伤的影响。方法:采用 Pulsinelli 四血管阻断大鼠脑缺血/再灌注模型,观察了 AED₈₈₀₁对脑组织中水含量、氨基酸含量、6 - keto - PGF_{1α}和 TXB₂含量,以及二者之比值的影 响。结果:一 AED₈₈₀₁能够降低脑缺血/再灌注大鼠所引起的脑水含量增加。二采用氨基酸自动分析仪进行检测,发现脑缺血/再灌注可致大鼠脑组织中谷氨酸(Glu)含量增加,AED₈₈₀₁可以使其降低,150 mg/kg 作用非常显著($P < 0.01$)。对所测其它氨基酸含量虽有所影响,但均无统计学意义。三 AED₈₈₀₁可增加脑缺血/再灌注大鼠脑中 6 - keto - PGF_{1α}含量,减少 TXB₂含量;因而增加二者之比值。结论:AED₈₈₀₁对脑缺血/再灌注具有保护作用,这种作用可能与其降低脑中 Glu 含量,增加脑中 PGI₂含量和减少 TXA₂含量,并提高二者之比值有关。

关键词 3,4 - 二氯苯丙烯酰另丁胺;脑缺血/再灌注;谷氨酸;前列环素;血栓烷素

Protective effect of 3,4 - dichlorophenyl - propenoyl - sec. - butylamine on cerebral ischemia/reperfusion in rats

Wang Di(Wang D), Li Xiaodong(Li XD), Sun Guangchun(Sun GC), et al(Department of Pharmacology, Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the protective effect of 3,4 - dichlorophenyl - propenoyl - sec. - butylamine (AED₈₈₀₁) on cerebral ischemia/reperfusion in rats and to study its protective mechanisms. **METHOD:** The model of cerebral ischemia/reperfusion in rats was established by the occlusion of four - vessel to study the protective effect of AED₈₈₀₁. The brain liquid content, the level of some amino acids and the levels of 6 - keto - PGF_{1α} and TXB₂ were measured. **RESULTS:** AED₈₈₀₁ 50, 100 and 150 mg/kg ip can decrease the brain liquid content, AED₈₈₀₁ 150 mg/kg has very significant effect($P < 0.01$). AED₈₈₀₁ 50, 100 and 150 mg/kg ip can reduce the level of Glu in brain tissue. AED₈₈₀₁ can increase the level of 6 - keto - PGF_{1α} ($P < 0.01$) while decrease the level of TXB₂ ($P < 0.05$) in brain tissue, corresponding elevate the ratio of 6 - keto - PGF_{1α}/TXB₂ ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** AED₈₈₀₁ can antagonize the experimental cerebral ischemia effectively. The protective effect may be due to decreasing Glu content in whole brain, increasing PGI₂ content while decreasing TXA₂ content in whole brain, and raising the ratio of PGI₂/TXA₂.

KEY WORDS 3,4 - dichlorophenyl - propenoyl - sec. - butylamine, cerebral ischemia/reperfusion, Glu, PGI₂, TXA₂

3,4 - 二氯苯丙烯酰另丁胺(3,4 - Dichlorophenyl - propenoyl - sec. - butylamine, AED₈₈₀₁)是北京医科大学药化教研室合成的一个新的桂皮酰胺类衍生物。前文报道^[1,2]它对多种实验性癫痫有效,并可降低正常及癫痫病鼠脑中兴奋性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)的含量。鉴于脑中兴奋性氨基酸水平升高,在缺血性脑损伤的发病机理中起重要作用。癫痫发作时和发作后病理生

理变化在一些方面与脑缺血后的改变相似。某些常用的抗癫痫药物如苯妥英钠、安定和卡马西平等对缺血性脑损伤均有一定的保护作用^[3]。提示 AED₈₈₀₁可能有抗脑缺血作用。为此,本研究采用常用的脑缺血模型——大鼠四血管阻断脑缺血/再灌注模型探讨了

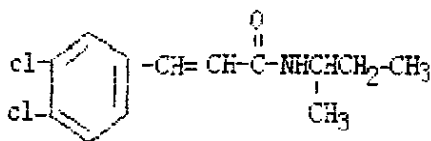
* 国家自然科学基金资助项目 No.39370785

AED₈₈₀₁对脑缺血的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

药品:AED₈₈₀₁(北京医科大学药学院药化教研室合成)。其结构式为:



本品为白色针状结晶,易溶于氯仿、乙醇等有机溶剂,难溶于水,熔点为 98 ~ 99 °C,因其难溶于水,故用 2 % Tween - 80 溶液配成不同浓度的混悬液,供实验用。尼卡地平(Nicardipine, Nic)(德州制药厂)。乌拉坦(上海曹杨第二中学化工厂)。

动物:Wistar 雄性大鼠,(260 ± 30)g(北京医科大学实验动物部),分笼饲养,食水自由。

试剂:前列腺素试剂盒(中国医学科学院协和医科大学基础所药理室),2,5 - 二苯基恶唑(PPO)(瑞士 FLUKA 公司),1,4 - 双 - 2' - (5' - 苯基恶唑)苯(POPOP)(美国 SEKVA 公司),其它试剂均为市售国产分析纯。

仪器:LS - 8000 型液体闪烁计数器(美国 BECKMAN 公司),RC - 5C 型低温高速离心机(美国 DUPONT 公司),835 - 50 型氨基酸自动分析仪(日本 HITACHI 公司),YQ - 3 型电动匀浆机(江苏江阴周庄科研器械厂),DT - 100A 型电子天平(北京光密仪器厂)。

1.2 方法

分组:Wistar 大鼠 40 只,随机分为假手术组、缺血/再灌注、缺血/再灌注给 AED₈₈₀₁ 50、100 和 150 mg/kg 3 个剂量组,Nic 5 mg/kg 阳性对照组。

给药方法:AED₈₈₀₁ 给药 3 次,分别于电凝椎动脉前 1h,电凝后 6h,结扎双颈总动脉前 1h。Nic 给药 3 次,分别于电凝椎动脉前 30 min,电凝后 6h,结扎双颈总动脉前 30 min ip。

大鼠四血管阻断脑缺血/再灌注模型的制备^[4]:大鼠 20 % 乌拉坦 1g/kg ip 麻醉,分离暴露双侧颈总动脉和第一颈椎左右横突孔,电凝双侧椎动脉以阻断血流;24h 后在动物清醒情况下用线结扎双侧颈总动脉,这样供应脑循环的四条动脉血管全部被阻断,产生全脑性脑缺血。缺血 40 min 后,剪断双侧颈总动脉的结扎线,即可形成缺血/再灌注模型。再灌注 60 min 后立即断头取脑。实验过程中大鼠肛温控制在(37.5 ± 0.5) °C 范围内。假手术组暴露分离血管,但不电凝及结扎。

脑水含量的测定:参照 Hiroshi 等^[5]方法,取脑组织,吸干表面水分后,精确称其湿重,放入干燥箱内,以 160 °C 烤至恒重,按下式计算脑水含量(%) = (湿重 - 干重)/湿重 × 100 %。

脑组织中血栓素 B₂(TXB₂)和 6 - 酮 - 前列腺素 F_{1α}(6 - keto - PGF_{1α})含量的测定——放免分析法^[6]:取 30 ~ 50 mg 脑组织,精确称重,置于乙醇 - 生理盐水(0.2 ml 无水乙醇,0.8 ml 生理盐水)中匀浆(加 0.1 mol/L HCl 100 μl 酸化,pH 4),低温离心 3000r/min,4 °C 15 min 后取上清液 0.5 ml,加 5 倍重蒸馏的乙酸乙酯提取 2 次,合并提取液于室温下吹干,干渣重溶于磷酸缓冲液中,按 TXB₂ 和 6 - keto - PGF_{1α} 放射免疫分析测定盒的操作程序进行测定。

脑组织中氨基酸含量的测定:取实验组和对照组脑组织,精确称重后加 1 ml 10 % 磺基水杨酸制成匀浆,4 °C 离心 3000r/min,20 min,取出上清液,再次在 4 °C 下离心,1000r/min,15 min,取上清液稀释成一定的倍数,用 835 - 50 型日立氨基酸自动分析仪测定脑组织氨基酸含量。

测定条件:柱体积 2.6 × 150,树脂 # 2619,分析时间 72 min,缓冲液流速 0.225 ml/min,茚三酮流速 0.3 ml/min,柱压力 100 kg/cm²,茚三酮压力 25 kg/cm²,柱温 53 °C,标准 3 nmol/50 μl, N₂ 压力 0.28 kg/cm² 计算公式:脑组织氨基酸含量(μmol/g 湿重) = 测定值 ÷ 50 × 稀释倍数 × 1000 ÷ 脑组织重量(mg)。

统计学处理:文中结果以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示者,进行两两比较时用 *t* 检验。

2 结果

2.1 AED₈₈₀₁对缺血/再灌注大鼠脑水含量的影响

按前述给药,缺血/再灌注模型制备和脑水含量的测定方法进行实验。所得结果如表 1 所示。由表 1 可见,缺血/再灌注组脑水含量明显增加,与假手术组比较具有非常显著性($P < 0.01$),说明大鼠四血管阻断脑缺血模型的建立能引起明显的脑水肿。AED₈₈₀₁ 50、100 和 150 mg/kg 3 个剂量均可降低增加的脑水含量,尤以 150 mg/kg 作用明显,经统计学处理具有非常显著性($P < 0.01$)。而 50 和 100 mg/kg 只有降低的趋势,无统计学上的意义;Nic 5 mg/kg 作用明显($P < 0.01$)。AED₈₈₀₁ 能够降低缺血/再灌注引起的脑水含量增加,说明对脑缺血/再灌注具有一定的保护作用。

2.2 AED₈₈₀₁对缺血/再灌注大鼠脑组织中氨基酸含量的影响

利用氨基酸自动分析仪对脑组织中谷氨酸(Glu)、牛磺酸、天冬氨酸(Asp)、甘氨酸及 γ - 氨基丁酸

表 1 3,4 - 二氯苯丙烯酰另丁胺(AED₈₈₀₁) 对缺血/再灌注大鼠脑水含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量(mg/ kg)	例数	脑水含量(%)
假手术组		7	79.0 $\pm$ 0.5
缺血/再灌注		7	80.6 $\pm$ 0.6 ^{*1}
AED ₈₈₀₁	50	6	80.4 $\pm$ 0.7
	100	6	79.7 $\pm$ 1.1
	150	7	78.7 $\pm$ 1.4 ^{*2}
Nic	5	7	79.4 $\pm$ 0.7 ^{*2}

注:与假手术组比较,^{*1} $P < 0.01$;与缺血/再灌注组比较,^{*2} $P < 0.01$

(GABA) 进行检测。结果见表 2。

表 2 3,4 - 二氯苯丙烯酰另丁胺(AED₈₈₀₁) 对缺血/再灌注大鼠脑组织中氨基酸含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/ kg)	动物数	谷氨酸 ($\mu\text{mol/g wet tissue}^{-1}$)
假手术组		5	3.00 $\pm$ 0.41
缺血/再灌注		4	5.01 $\pm$ 0.67 ^{*1}
AED ₈₈₀₁	50	3	4.40 $\pm$ 0.30
	100	4	3.93 $\pm$ 0.63
	150	5	3.39 $\pm$ 0.24 ^{*2}
Nic	5	3	4.88 $\pm$ 0.44

注:与假手术组比较,^{*1} $P < 0.01$;与缺血/再灌注组比较,^{*2} $P < 0.01$

表 3 3,4 - 氯苯丙烯酰另丁胺(AED₈₈₀₁) 对缺血/再灌注大鼠脑组织 6 - 酮 - 前列腺素 F_{1 α} (6 - keto - PGF_{1 α}) 和血栓素 B₂(TXB₂) 含量及二者之比值的影晌($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量(mg/ kg)	6 - keto - PGF _{1α} (ng $\cdot$ g brain w/ w)	TXB ₂ (ng/ g brain w/ w)	6 - keto - PGF _{1α} / TXB ₂ 比值
假手术组		504.40 $\pm$ 32.93(5)	250.47 $\pm$ 59.73(7)	2.11 $\pm$ 0.29(5)
缺血/再灌注组		430.67 $\pm$ 41.26 ^{*1} (5)	392.67 $\pm$ 115.00 ^{*1} (5)	1.16 $\pm$ 0.30 ^{*2}
AED ₈₈₀₁	50	496.60 $\pm$ 34.05(5)	389.33 $\pm$ 91.27(5)	1.25 $\pm$ 0.28
	100	484.67 $\pm$ 26.63 ^{*3} (5)	356.67 $\pm$ 71.13(5)	1.41 $\pm$ 0.35
	150	517.62 $\pm$ 14.23 ^{*4} (7)	266.19 $\pm$ 50.93 ^{*3} (7)	2.03 $\pm$ 0.51 ^{*4}
Nic	5	465.47 $\pm$ 59.90(5)	298.33 $\pm$ 66.4(6)	1.70 $\pm$ 0.23 ^{*3} (5)

注:与假手术组比较,^{*1} $P < 0.05$,^{*2} $P < 0.01$;与缺血/再灌注组比较,^{*3} $P < 0.05$,^{*4} $P < 0.01$,括号内代表动物数

脑缺血/再灌注可使局部血液循环发生障碍,造成血管性水肿^[7]。因此可使脑组织中含水量增加。AED₈₈₀₁能够降低脑水含量,具有脑保护作用。

前文报道^[1]AED₈₈₀₁能够降低正常和癫痫动物脑内兴奋性氨基酸(excitatory amino acid, EAA) —— Glu 和 Asp 的含量。为探讨该化合物对缺血/再灌注大鼠脑中氨基酸的影响,采用氨基酸自动分析仪的方法检测了两种 EAA(Glu 和 Asp) 和 3 种抑制性氨基酸(GABA, Gly 和 Tau)。发现缺血/再灌注可使大鼠脑中 Glu 含量增

表 2 显示脑缺血/再灌注可致脑组织中 Glu 含量增加($P < 0.01$)。AED₈₈₀₁ 50, 100 和 150mg/ kg 均可降低缺血/再灌注大鼠脑中 Glu 含量,以 150mg/ kg 作用明显($P < 0.01$)。对所测的其它几种氨基酸和谷氨酸 + 天冬氨酸/ γ - 氨基丁酸(Glu + Asp/ GABA) 比值虽有增减,但均无统计学意义。Nic 对缺血/再灌注大鼠脑组织中氨基酸含量无明显的影响。

2.3 AED₈₈₀₁ 对缺血/再灌注大鼠脑组织中 6 - keto - PGF_{1 α} 和 TXB₂ 含量及其比值的影响

采用 6 - keto - PGF_{1 α} 和 TXB₂ 试剂盒,测得结果见表 3。缺血/再灌注组 6 - keto - PGF_{1 α} 显著降低($P < 0.05$),而 TXB₂ 显著升高($P < 0.05$),二者之比值降低($P < 0.05$);AED₈₈₀₁ 50, 100 和 150mg/ kg 均可使 6 - keto - PGF_{1 α} 增高,尤以 100 和 150mg/ kg 作用显著($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);对于 TXB₂, 3 个剂量均可使其降低,但 50 和 100mg/ kg 虽有降低的趋势,无统计学上的意义,150mg/ kg 作用明显($P < 0.01$);二者之比值均呈上升的趋势,以 150mg/ kg 上升非常明显($P < 0.01$)。Nic 可使 6 - keto - PGF_{1 α} 升高, TXB₂ 降低,二者之比值升高,但仅比值具有统计学上的显著性($P < 0.05$)。

3 讨 论

脑缺血/再灌注导致缺氧,缺氧继而导致能量衰竭,从而 Na⁺/ K⁺泵功能障碍,以致细胞内 Na⁺不能运出,细胞外 K⁺不能运入,钠水潴留造成细胞性水肿。

加,与假手术大鼠比较,差异非常显著($P < 0.01$)。AED₈₈₀₁ 50, 100 和 150mg/ kg ip 能够使之降低,以 150mg/ kg 作用为显,与缺血/再灌注大鼠比较 $P < 0.01$ 。缺血/再灌注可使大鼠脑中 Glu 含量增加,大量 Glu 作用于 EAA 受体,使 Na⁺和 Ca²⁺内流,造成神经细胞内外离子平衡紊乱,进而引起神经元肿胀和坏死^[8]。AED₈₈₀₁可以降低缺血/再灌注大鼠脑中增高的 Glu 水平,这可能是其脑保护作用的环节之一。

本文探讨了 AED₈₈₀₁ 对前列腺素系统的影响。脑组织细胞膜上丰富的不饱和脂肪酸在磷脂酶 A₂ 和磷脂酶 C 的作用下,分解为游离的花生四烯酸(FAA),FAA 在再灌注后需氧条件下由环氧化酶催化形成内过氧化物 PGG₂, PGG₂ 在血管内皮或平滑肌 PGI₂ 合成酶和组织细胞微粒体 TXA₂ 合成酶作用下,分别形成 PGI₂ 和 TXA₂。它们二者的化学性质极不稳定。因此测定它们的代谢产物 6 - keto - PGF_{1α} 和 TXB₂ 可反映它们的变化情况。正常生理情况下,二者之间存在着一定的动态平衡关系,一旦失衡,即可出现病理变化如脑缺血/再灌注后期神经细胞不可逆性损伤^[9]。我们的实验结果表明,缺血/再灌注脑组织中 6 - keto - PGF_{1α} 含量降低, TXA₂ 含量增加($P < 0.05$), AED₈₈₀₁ 50, 100 和 150 mg/kg 均可增加 6 - keto - PGF_{1α} 含量, 150 mg/kg 作用明显($P < 0.01$); TXB₂ 在 50 和 100 mg/kg 呈降低趋势,但无显著性差异, 150 mg/kg 降低作用明显($P < 0.05$), 6 - keto - PGF_{1α}/TXB₂ 比值呈增高趋势。说明 AED₈₈₀₁ 的脑保护作用还与其影响 PG 系统有关。

参考文献

1 王年生,陶成.3,4 - 二氯苯丙烯酰另丁胺抗实验性癫痫作

用的机制分析.第五届全国神经药理学术会议论文集, 1992: 152.

- 2 刘福君,陶成.3,4 - 二氯苯丙烯酰另丁胺对卡因酸致惊作用的影响.中国药理学与毒理学杂志,1994,8(4): 305.
- 3 Multiple Authors.EAA pharmacology.Tips,1990,11: 25.
- 4 Pulsinelli WA.The four - vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation.Stroke,1988,19: 913.
- 5 Hiroshi U,Shigeki I,Takashi Y,*et al*.Correlation among lipid peroxidation, brain energy metabolism and brain oedema in cerebral ischemia.Neurol Res,1988,10: 194.
- 6 徐淑云,卞如濂,陈修主编.药理实验方法学.第二版.北京:人民卫生出版社,1991: 402.
- 7 Fishman RA.Brain edema In:stroke Vol 1 Henry JM.ed.New York.Churchill Livingstone,1986: 119.
- 8 Hossmann KA.Glutamate - mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxic hypothesis revised.Brain Pathol, 1994,4(1): 23.
- 9 张天锡,赵卫国.脑缺血脑水肿的实验研究——脑组织 6 - keto - PGF_{1α} 和 TXB₂ 与脑水肿的关系.中国神经外科杂志, 1990,6(3): 161.

收稿日期:1998 - 04 - 13