

脑脉通对栓塞性脑缺血大鼠动脉溶栓治疗时间窗的影响

李建生¹ 王冬² 刘敬霞³ 郭晓燕¹ 孙捷¹ 李宁¹ 苏静¹

(1. 河南中医学院老年医学研究所, 郑州市金水路 1 号, 450003;
2. 河南省洛阳市妇女儿童保健中心儿童医院; 3. 北京中医药大学)

[摘要] **目的** 观察脑脉通对血栓栓塞性脑缺血大鼠的保护作用及对溶栓治疗时间窗的影响。**方法** 大鼠随机分为假手术组、模型组、尿激酶溶栓组(溶栓组)、脑脉通组、脑脉通联合尿激酶组(联合组)。自体血栓结合线栓阻塞大鼠大脑中动脉制备血栓栓塞性脑缺血动物模型。大鼠分别于缺血后 3 小时、6 小时、9 小时经导管进行区域动脉溶栓。动脉溶栓后 24 小时, 观察大鼠脑组织病理损伤及神经症状, 测定脑组织含水量和脑梗死面积变化。**结果** 模型组大鼠均较假手术组神经症状评分增高, 脑含水量增加, 脑梗死面积增大, 脑病理损伤明显; 溶栓组大鼠神经症状评分降低、脑含水量减少、脑梗死面积减小、脑病理损伤减轻; 6 小时内溶栓的上述指标改善尤为明显; 联合组各指标均较相应时间点溶栓组和脑脉通组的改善明显。**结论** 不同时间窗经动脉溶栓治疗对大鼠脑缺血损伤均有保护作用, 但缺血后 3 小时和 6 小时溶栓效果优于 9 小时; 脑脉通可增强不同时间窗溶栓治疗的效果, 具有延长溶栓治疗时间窗的作用。

[关键词] 脑缺血; 大鼠; 脑脉通; 溶栓; 时间窗

Effect of Naomaitong on the Time Window of Thrombolysis through Artery for the Cerebral Ischemic Rats with Thrombo-Embolism

LI Jian-sheng¹, WANG Dong², LIU Jing-xia³, et al.

(1. Geriatrics Institute of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003; 2. Women and Children Care Centre of Luoyang City; 3. Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the protective effect and influence of Naomaitong (Remove obstruction of cerebral vessels) on the time window of thrombolysis for the cerebral ischemic rats with thrombo-embolism. **Methods** The rats were randomized into sham-operated group, model group, urokinase (UK) thrombolysis group, Naomaitong group, and UK plus Naomaitong group (associated group). The cerebral ischemic rat models with thrombo-embolism were made by blocking sylvian artery. The rats were administrated local thrombolysis with duct to artery at the time-point of 3, 6, and 9h after cerebral ischemia. At 24h of administration through artery, the pathologic changes of brain and the symptoms of nerve system were observed to determine the brain water ratio (BWR) and the change of cerebral infarction area (CIA). **Results** Compared with the sham-operated group, in all model groups, the score of nerve system symptoms increased, the BWR and CIA increased, and the brain pathological changes became worse; in all thrombolysis groups, the score of nerve system symptoms decreased, the BWR and CIA decreased, and the brain pathological changes became relieved; within 6 hours, the improvement of above-mentioned thrombolysis indices was especially remarkable; in the associated group, all indices at the corresponding time-point were improved significantly than those of the thrombolysis group and Naomaitong group. **Conclusion** Thrombolysis through artery given at different time is protective for the ischemic tissues, but the effect of treatment given at 3 and 6h after ischemia is better than that of 9h. Naomaitong enhances the protection, functioning to prolong the time window of thrombolysis.

Key Words Cerebral ischemia; Rat; Naomaitong (Remove obstruction of cerebral vessels); Thrombolysis; Time window

脑梗死主要是由血栓栓子或者脑血管局部血栓形成, 引起脑动脉阻塞所致。迅速溶解血栓, 恢复血流是其最基本的治疗方法^[1~4]。但溶栓治疗的效果受诸多因素影响, 其中时间窗被认为是关键因素; 不同的用药途径也影响脑梗死的溶栓效果, 有研究认为动脉溶栓疗效尤为明显^[5]。但目前针对不同时间窗经动脉溶栓

对脑缺血损伤保护作用的比较研究不多, 中医药对溶栓时间窗的影响研究更为少见。故该研究通过比较不同时间窗经动脉溶栓治疗对大鼠脑缺血损伤的保护作用, 并探讨中药复方脑脉通对溶栓治疗时间窗的影响, 从而为其临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

青年 SD 大鼠 190 只, 清洁级, 3~4 月龄, 雌雄各半, 体重(300±50)g, 由河南省实验动物中心提供(合

格证号:410117);聚乙烯导管(武进市政平乳胶制品厂,型号:F2×70,外径0.7mm);尼龙线(日本大东阳公司,型号:2.5,直径0.285mm);凝血酶(济南军区生物制品药物研究所,批号:H41023661,规格500U/支);尿激酶(山东新华制药股份有限公司,批号:05401236,规格1万U/支);脑脉通颗粒(河南中医学院药物分析学科提供,组成:大黄9g,人参9g,川芎6g,葛根6g,用60%乙醇提取,出膏率15%;动物剂量按临床人的用量,结合提取率,根据人与大鼠体表面积等效剂量比换算)。

1.2 分组与处理

大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、尿激酶溶栓组(溶栓组)、脑脉通组、脑脉通联合尿激酶组(联合组),其中假手术组动物10只,余各组根据脑缺血后干预时间点的不同分为3小时、6小时、9小时,每个时间点15只大鼠。各组大鼠均于造模前4天灌胃(每日1次),脑脉通组和联合组用脑脉通灌胃(用量0.081mg/g),其余均灌以等体积的生理盐水。

1.3 造模及取材

参考改良的Zhang法制备血栓栓塞性脑缺血动物模型^[6,7]。用大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉制备大脑中动脉阻塞模型:将改良的、内置套线的聚乙烯导管进行标记;大鼠用6%水合氯醛(0.4ml/100g)进行腹腔注射麻醉,背位固定,颈部正中用2%碘酒和75%酒精消毒,颈部正中切口,分离左侧颈总动脉,穿线备用;同时分离右侧颈总动脉,穿线备用;分离左侧颈内外动脉,离断颈外动脉,结扎翼额动脉,于颈外动脉近动脉分叉处剪口,导管穿入颈内动脉,缓慢推进适当深度;根据标记长度适当退出套线,使血液流入导管内自凝,缓慢推入凝血酶20U,使血液凝固,血栓形成;再次插入套线,用力均匀和缓地向前推进套线至标记位置,使形成的血栓阻塞大脑中动脉入颅处;留置导管,缝合皮肤,单笼饲养。假手术组不插入栓线和形成血栓。实验过程中保持大鼠肛温(37.0±0.5)℃,室温(26±1)℃。分别于脑缺血后不同时间点经导管进行区域动脉溶栓,模型组用生理盐水,溶栓组与联合组用尿激酶5U/g。区域动脉给药后24小时观察大鼠神经症状,冰盘上取脑,制备标本,待行指标测定。实验中大鼠死亡率较高,主要原因由动脉用药时二次麻醉和溶栓后颅内出血引起,纳入统计时剔除死亡和取材不合格动物。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 神经症状评分 取材前半小时进行评分,依8

分标准记录分值^[8]。

1.4.2 脑组织含水量测定 切取的脑组织迅速用电子天平称取湿重(精确度为0.1mg)后放入干燥箱中干燥(100±2)℃,24小时后称取干重。计算公式:脑组织含水量=(脑湿重-脑干重)/脑湿重×100%。

1.4.3 脑梗死面积测定 切取的脑组织放入2%四氮唑溶液,37℃水浴锅温孵30分钟后放入10%甲醛溶液,15分钟后取出脑组织,数码相机对脑片(额侧)进行拍照,应用计算机软件测定脑片梗死面积与相应侧总面积,计算面积比值。计算公式:面积比值=梗死面积/总面积×100%。

1.4.4 脑组织病理观察 切取的脑组织用4%的多聚甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色,光镜下观察脑组织病理形态改变,根据受损程度由轻到重进行分级^[9]:Ⅰ级0~25%,Ⅱ级26~50%,Ⅲ级51~75%,Ⅳ级>75%(镜下见出血者均为Ⅳ级),计算鼠数;电镜组织制成超薄切片,经铅-铀染色,Hitachi-7500透射电子显微镜观察脑组织超微结构改变。

1.5 统计学方法

数据用SPSS 11.0统计软件处理。等级序值资料用秩和检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以单因素方差分析进行统计。

2 结果

2.1 神经症状评分

表1示,模型组各时间点大鼠均较假手术组增高($P<0.01$);与模型组同时时间点比较,用药组神经症状评分均降低($P<0.01$);联合3小时和9小时均较溶栓组和脑脉通组显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);各组9小时均较其3小时的神经症状评分增高,溶栓组和脑脉通组9小时组分别较6小时组增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

2.2 脑组织含水量

表1示,模型组各时间点大鼠均较假手术组增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);溶栓组和联合组各时间点大鼠的脑组织含水量均较同时时间点模型组降低($P<0.01$);联合组6小时和9小时较溶栓组和脑脉通组降低其3小时组较脑脉通组降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$);各组6小时和9小时组均较3小时时增高($P<0.01$ 或 $P<0.05$),用药组9小时均较6小时增高($P<0.05$)。

2.3 脑梗死面积

表1示,模型组各时间点大鼠均较假手术组增大($P<0.01$);与模型组同时时间点比较,用药组大鼠均显

表 1 各组大鼠的神经症状评分和脑组织含水量及脑梗死面积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间(小时)	鼠数	神经评分(分)	脑组织含水量(%)	脑梗死面积(%)
假手术组 模型组		10	0	74.10±1.85	0
	3	10	4.63±1.06▲▲	80.32±2.14▲	32.86±0.48▲▲
	6	10	5.25±1.03▲▲	84.93±1.42* * ▲▲	34.99±1.04* * ▲▲
	9	10	6.00±0.53* * ▲▲	87.72±2.09* * △△▲▲	38.95±2.35* * △△▲▲
溶栓组	3	10	2.50±0.75☆	78.32±1.64☆	24.18±1.13☆★
	6	10	3.00±0.75☆	81.09±1.42* * ☆★	28.93±0.47* * ☆★
	9	10	4.38±0.51* * △△☆★	83.47±2.05* * △△☆★	30.98±1.63* * △△☆★
	3	10	3.50±1.06☆★	80.12±2.14☆★	27.94±1.64☆★
脑脉通组	6	10	3.87±0.83☆★	83.30±1.94☆★*	30.54±1.05☆★* *
	9	10	4.25±0.46* △☆★	86.76±2.78* * △☆★	33.64±1.47* * △△☆★
	3	10	1.75±0.46☆	76.34±1.62☆	22.01±0.91☆
	6	10	2.87±0.64* * ☆	78.34±1.31☆*	25.44±1.07* * ☆
联合组	9	10	3.00±0.53* * ☆	80.12±1.78* * △☆	27.79±1.27* * △☆

与本组 3 小时比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$; 与本组 6 小时比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与假手术组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; 与模型组同时时间点比较, $\star P < 0.01$; 与联合组同时时间点比较, $\star\blacktriangle P < 0.05$, $\star\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

著减小($P < 0.01$); 联合用药 6 小时和 9 小时组较同时时间点溶栓组和脑脉通组显著减小($P < 0.01$); 各组 6 小时、9 小时组均较 3 小时组增加、9 小时较 6 小时增高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2.4 脑组织病理改变

2.4.1 光镜下病理损伤程度变化 表 2 示, 模型组各时间点大鼠脑组织病理损伤均较假手术组明显($P < 0.01$); 各用药组大鼠均较同时时间点模型组减轻($P < 0.01$); 联合组 9 小时较同时时间点溶栓组和脑脉通组病理损伤减轻($P < 0.05$); 各组 9 小时组病理损伤均较 3 小时组明显($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠脑组织病理损伤分级比较(只)

组别	时间 (小时)	病理分级				合计	秩和
		I	II	III	IV		
假手术组		7	2	1	0	10	226.5
模型组	3	1	2	6	1	10	554.5▲
	6	1	2	5	2	10	579.5▲
	9	1	2	4	3	10	604.5▲*
	3	2	5	2	1	10	429☆
溶栓组	6	2	3	4	1	10	479☆
	9	2	3	3	2	10	529☆★*
	3	2	4	3	1	10	454☆
	6	1	5	3	1	10	479.5☆
脑脉通组	9	1	4	3	2	10	529.5☆★*
	3	4	3	2	1	10	378☆
	6	3	3	3	1	10	428.5☆
	9	3	2	4	1	10	453.5☆*

与本组 3 小时比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, $\blacktriangle P < 0.01$; 与模型组同时时间点比较, $\star P < 0.01$; 与联合组同时时间点比较, $\star\blacktriangle P < 0.05$

2.4.2 神经细胞超微结构变化 假手术组细胞器形态结构未见异常; 线粒体结构清晰, 无肿胀、断裂; 粗面内质网结构正常; 胞浆可见数十个吞饮小泡。缺血 3 小时出现胞质和线粒体水肿, 线粒体嵴和膜结构破坏, 粗面内质网脱颗粒, 核膜破坏, 染色质浓缩及边缘聚集, 损伤随缺血时间延长而加重, 缺血 9 小时胞质和线粒

体高度水肿, 线粒体嵴和膜大多消失, 粗面内质网脱颗粒严重, 细胞器减少, 核膜部分溶解或消失, 细胞核水肿; 各药物组神经细胞超微结构破坏分别较相应时间模型组损伤减轻, 以联合组的减轻尤为明显。

3 讨论

溶栓治疗可使急性脑梗死闭塞的血管再通, 是恢复脑血流、挽救缺血脑组织的最佳方案^[3]。溶栓治疗的时间窗是影响其疗效的关键因素, 若超过时间窗, 半暗带区的脑组织难以恢复, 甚至导致再灌注损伤。临床进行溶栓治疗的基本时间依据是缺血后 4~8 小时(平均 6 小时) 半暗带区神经细胞仍有存活, 发病后 6 小时内的治疗效果优于 6 小时以上^[10,11]; 此外, 与静脉给药相比, 理论上局部动脉内溶栓采用较少剂量的溶栓药就可使阻塞血管快速、完全的再通, 且动静脉溶栓的时机也存在差异, 在脑梗死发病 3 小时以内, 多采用静脉溶栓, 而在 3~6 小时之间, 则宜采用动脉内溶栓^[12]。目前大多数学者同意将溶栓治疗的时间窗定为 6 小时, 但治疗时间窗并非一成不变, 而是个体化的、动态的、多因素的过程, 许多情况都会改变时间窗; 超过 6 小时时间窗的治疗也可使部分急性脑梗死患者得到功能恢复^[13]。因此, 延长脑缺血溶栓治疗的时间窗无疑具有重要意义, 早期脑保护剂的应用能阻断脑缺血病理过程的恶性循环, 可使治疗的时间窗扩大^[14]。尿激酶(UK) 是临床急性脑梗死常用溶栓药物, 发病后 6 小时内经动脉内尿激酶溶栓是目前公认的有效治疗手段。中医认为, 瘀血阻络是脑梗死的病机关键, 溶栓药对瘀血有强烈干预作用, 但其在化瘀同时可引起出血、倦怠等副反应, 表明溶栓药尚有“破血之品”的耗气伤血之弊。因此, 益气活血化瘀应是脑梗死溶栓治疗补偏救弊、祛除余邪的重要方法^[13]。中药复方脑脉通对脑

缺血再灌注损伤具有明显的保护作用^[15]。该研究比较了脑缺血大鼠不同时间溶栓治疗对脑组织的保护作用,并进一步探讨了脑脉通对溶栓治疗时间窗的影响。研究发现,缺血后不同时间窗溶栓治疗均具有脑保护作用,但溶栓效果存在差异,3 小时、6 小时溶栓较 9 小时能明显改善神经功能、减轻脑水肿、减小梗死灶、减轻脑组织病理损伤和超微结构改变;脑脉通可明显增强溶栓治疗效果,进一步扩大溶栓治疗的时间窗,从而为急性脑梗死的临床应用提供依据。

参考文献

[1]Ibayashi S, Tokano K, Ooboshi H, et al. Effect of selective brain hypothermia on regional cerebral blood flow and tissue metabolism using brain thermo-regulator in spontaneously hypertensive rats. *Neurochem Res*, 2000, 25(3) : 369~375.

[2]王春华,赵永刚,丁颖,等.溶栓合剂治疗急性脑梗死的临床疗效观察. *中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11(2) : 118~119.

[3]王文静,孙一兵,汪银洲,等.急性脑梗死尿激酶介入溶栓治疗临床观察. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(1) : 12~14.

[4]王左生,连亚军,赵莘瑜,等.脑梗死患者溶栓治疗前后经颅多普勒检测及其临床意义. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(11) : 699.

[5]卢宪伟,韦继政,吕小亮,等.尿激酶颈动脉注射与静脉滴注治疗急性脑梗死的临床疗效对比. *海南医学*, 2006, 17(3) : 21~23.

[6]Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, et al. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(2) : 123~135.

[7]李建生,刘敬霞,于海滨,等.大鼠自体血栓结合线栓阻塞大

脑中动脉制备脑缺血模型的建立与评价. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(5) : 272~274.

[8]吴俊芳.小檗碱对小鼠和大鼠脑缺血的保护作用. *中国药理学与毒理学杂志*, 1995, 9(2) : 156~158.

[9]李建生,赵晶,高爱社,等.补肾活血和泻下及开窍活血方药对脑缺血再灌注肺损伤老龄大鼠 ATP 酶和自由基代谢的影响. *中国中医急症*, 2001, 10(6) : 345~348.

[9]曹勇军,程彦斌.线栓法建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的改进与探讨. *中国应用生理学杂志*, 2001, 17(2) : 198~200.

[10]方凯.急性大脑中动脉闭塞的动脉内接触性溶栓治疗. *脑与神经疾病杂志*, 2006, 14(2) : 146~148.

[11]Eckert B, Kucinski T, Pfeiffer G, et al. Endovascular therapy of acute vertebrobasilar occlusion: early treatment onset as the most important factor. *Cerebrovasc Dis*, 2002, 14(1) : 42~50.

[12]Albers GW, Amarenco P, Easton JD, et al. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, 2004, 126(Suppl 3) : 483~512.

[13]付于,黄燕,黄培新,等.急性缺血性脑血管病的中药溶栓治疗与代谢组学的研究趋势. *辽宁中医杂志*, 2006, 33(6) : 662~664.

[14]杨瑞民,张铭秋,赵东菊,等.急性脑梗死溶栓治疗的时间窗及其影响因素分析. *介入放射学杂志*, 2005, 14(5) : 465~467.

[15]任小巧,李建生,封银曼,等.脑脉通对老龄大鼠脑缺血/再灌注损伤脑保护作用的研究. *中国中药杂志*, 2004, 29(1) : 66~70.

(收稿日期:2006-08-11;修回日期:2007-01-11)

[编辑:李长今]

(上接第 162 页)

修复,在缺血性疾病中有较好的临床应用前景。黄芪促进外周血 EPCs 增殖的确切机制可能与通过信号转导途径的调节有关,尚待进一步研究。

参考文献

[1]石富胜,杨正国,狄桂萍,等.黄芪皂甙对烧伤患者血管内皮细胞及其功能的影响. *中国中西医结合杂志*, 2001, 21(10) : 750~751.

[2]Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003, 348(7) : 593~600.

[3]Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 2002, 106(22) : 2781~2786.

[4]Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation

of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7) : 3422~3427.

[5]刘泽灏,雷闽湘,王爱民,等.成人外周血内皮祖细胞分离和诱导分化. *中南大学学报(医学版)*, 2005, 30(5) : 566~569.

[6]王爱民,雷闽湘,刘泽灏,等.2 型糖尿病外周血内皮祖细胞的诱导分化及影响因素的研究. *中国糖尿病杂志*, 2006, 14(3) : 188~191.

[7]雷燕,高倩,李悦山,等.黄芪、当归及其组方促血管内皮细胞增殖作用的研究. *中国中西医结合杂志*, 2003, 23(10) : 753~756.

[8]翁玲,刘学英,刘彦,等.黄芪多糖对小鼠骨髓及外周血造血干细胞的增殖及动员作用. *基础医学与临床*, 2003, 23(3) : 306~309.

(收稿日期:2006-12-01;修回日期:2007-03-16)

[编辑:叶晨]