

局灶性脑缺血大鼠脑保护作用中阿司匹林预处理及其最佳剂量选择*

王 倩, 孙晓晶, 季占胜, 闵连秋

王 倩, 孙晓晶, 季占胜, 闵连秋, 锦州医学院附属第一医院神经内科, 辽宁省锦州市 121001

王 倩★, 女, 1972年生, 辽宁省锦州市人, 汉族, 锦州医学院在读硕士生, 主治医师, 主要从事神经药理学的研究。 fenweizhu@163.com
电话: +86-416-4168849-2261中图分类号 R743 文献标识码 A 文章编号 1671-5926(2005)01-0108-02
收稿日期 2004-10-08 修回日期 2004-11-01 (17/SX/YJ)**Pretreatment of aspirin and selection of optimal dosage in cerebral protection of rats with focal cerebral ischemia** Wang Qian, Sun Xiao-jing, Ji Zhan-sheng, Min Lian-qiu

Wang Qian, Sun Xiao-jing, Ji Zhan-sheng, Min Lian-qiu, Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Wang Qian★, Female, Han Nationality, Born in 1972 in Jinzhou City, Liaoning Province, China, Studying in Jinzhou Medical College for master degree, Attending physician. Research direction: neuropharmacology. fenweizhu@163.com

Telephone: +86-416-4168849 Ext. 2261

Received: 2004-10-08 Accepted: 2004-11-01

Abstract**AIM:** To investigate the pretreatment of aspirin on the protective mechanism and the optimal dosage of ischemic cerebral injury.**METHODS:** The experiment was completed in the Laboratory of Pharmacology, Jinzhou Medical College from June to July in 2004. The healthy male SD rats were randomly divided into sham-operation group, ischemic control group and aspirin pretreatment group. Then the aspirin pretreatment group was also divided into 4 subgroups, including 5 mg/kg group, 15 mg/kg group, 45 mg/kg group and 150 mg/kg group. The ischemic model was established with line embolism to block the middle cerebral artery. After 24 hours, the neurologic score was performed, and the activity of induced nitric oxide synthase (iNOS) was assayed after the establishment of tissues homogenate with decapitation and brain extraction.**RESULTS:** The neurological scores were (0.67 ± 0.39) scores in 5 mg/kg aspirin group, (0.83 ± 0.75) scores in 15 mg/kg aspirin group and (1.50 ± 0.24) scores in 45 mg/kg aspirin group, and that in ischemic control group was (2.50 ± 1.05) scores ($P < 0.01$). The activity of iNOS was (0.84 ± 0.54) u, (0.91 ± 0.43) u and (1.06 ± 0.27) u respectively, and that in ischemic control group was (1.54 ± 0.56) u, ($P < 0.01$). In 150 mg/kg aspirin group, the neurological score and the activity of iNOS were (2.17 ± 1.17) scores and (1.56 ± 0.75) u, respectively, which was no significant difference compared with those of ischemic control group ($P > 0.05$).**CONCLUSION:** The pretreatment of micro-dosage aspirin can protect the subsequent ischemic cerebral injury. Its mechanism is the inhibition of iNOS activity, and the optimal dosage is 5 mg/kg.Wang Q, Sun XJ, Ji ZS, Min LQ. Pretreatment of aspirin and selection of optimal dosage in cerebral protection of rats with focal cerebral ischemia. *Zhongguo Linchuang Kangfu* 2005; 9(1): 108-9 (China)王倩, 孙晓晶, 季占胜, 闵连秋. 局灶性脑缺血大鼠脑保护作用中阿司匹林预处理及其最佳剂量选择[J]. 中国临床康复 2005, 9(1): 108-9
[www.zgckf.com]**摘要****目的:** 探讨阿司匹林预处理对缺血性脑损伤的保护机制及其最佳剂量。**方法:** 实验于2004-06/07在锦州医学院药理学实验室完成。选用健康雄性SD大鼠, 随机分为假手术组、缺血对照组、阿司匹林预处理组。阿司匹林预处理组又分为5、15、45、150 mg/kg 4个剂量组。以线栓法阻塞大鼠中动脉制作脑缺血模型。24 h后进行神经功能评分并断头取脑制备组织匀浆测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性。**结果:** 阿司匹林5 mg/kg组、15 mg/kg组和45 mg/kg组的神经功能评分分别为(0.67 ± 0.39), (0.83 ± 0.75), (1.50 ± 0.24)分, 缺血对照组为(2.50 ± 1.05)分 ($P < 0.01$), iNOS活性分别为(0.84 ± 0.54), (0.91 ± 0.43), (1.06 ± 0.27) U/mg, 缺血对照组为(1.54 ± 0.56) U/mg ($P < 0.01$)。阿司匹林150 mg/kg组在神经功能评分及iNOS活性方面分别为(2.17 ± 1.17)分, (1.56 ± 0.75) U/mg, 与缺血对照组差别无显著性意义 ($P > 0.05$)。**结论:** 小剂量阿司匹林预处理对随后的缺血性脑损伤具有保护作用, 其机制可能是抑制iNOS活性, 最佳剂量为5 mg/kg。**关键词:** 阿司匹林, 缺血预处理, 脑损伤, 一氧化氮合酶**0 引言**缺血预处理是近年来的热门话题, 但是由于在临床的不可行性, 药物预处理越来越受到人们的关注。阿司匹林是一种有广泛药理作用及多个作用位点的非类固醇抗炎药, 广泛应用于解热、镇痛、抗炎、抗风湿和抗血栓形成治疗。近年来发现阿司匹林除了抗血栓形成作用外还有直接的脑保护作用^[1-3], 但国内外学者对阿司匹林的脑保护作用机制及应用剂量尚有争议, 本文对此进行了深入研究^[4-6]。**1 材料和方法****设计:** 以实验动物为对象 随机对照的验证性研究。**单位:** 一所大学医院的神经内科。**材料:** 实验于2004-06/07在锦州医学院药理学实验室完成。健康雄性SD大鼠36只, 体质量200~250 g, 锦州医学院动物实验中心提供。许可证号 SCXK (辽) 2003-0007。实验动物级别: 普通级。实验动物饲养环境: 普通环境。将36只大鼠随机分为6组, 每组6只。分别为假手术组、缺血对照组、阿司匹林预处理5 mg/kg组、15 mg/kg组、45 mg/kg组、150 mg/kg组。**药品及试剂:** 阿司匹林粉剂由山东新华制药股份有限公司提供, 批号: 0402258; 诱导型一氧化氮合酶(iNOS)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。**仪器:** JY92-II 超声波细胞粉碎机, 上海新芝生物技术研究所以 TGLL-18 g 台式高速冷冻离心机 太仓市医疗器械厂。**设计、实施、评估者:** 研究设计者为第一和第四作者, 资料收集和干预实施者为本文所有作者, 均接受过培训。**干预措施:** 给药方法: 阿司匹林粉剂用蒸馏水配制成悬浮液。阿司匹林预处理大鼠术前5 d灌胃, 2次/d。术前1 h再灌胃1次。**大鼠局灶性脑缺血模型的制备:** 以线栓法制作MCAO模型^[5]。100 g/L的水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后(3 mL/g), 分离右颈总动脉并剪一小口, 将头端烧成光滑杆状的国产尼龙线(直径0.205 mm, 长6 cm)插入, 以颈总动脉分叉处计算进线深度为(18.0 ± 0.5) mm, 至大脑中动脉起始部以完全阻断血供。模型成功的标志是大鼠即刻出现右侧 horner 征。假手术组除不插入线栓外, 其他操作步骤同上。**脑组织匀浆 iNOS 活性测定:** 术后24 h在200 g/L乌拉坦麻醉下(5 μL/g), 快速断头取脑, 去除低位脑干及嗅束。并用冰生理盐水冲洗脑表面血液, 滤纸吸干表面水分, 剥除软脑膜, 取右侧大脑半球, 以质量(g)/体积(mL)比1:9加入的冰生理盐

用水超声波细胞粉碎机制成匀浆,冷冻离心 15 min (1 006.2 g),取上清液 0.05 mL 按分光光度法测定 iNOS 活性。脑组织蛋白含量用 Folin-酚法测定^[7]。每毫克组织蛋白每分钟生成的 1 nmol 的 NO 为一个活性单位(U/mg)。

评估标准:参照文献[8]对大鼠神经功能评分。0分:无明显神经功能缺损症状;1分:不能伸展左侧前肢;2分:行走时向左侧旋转;3分:行走时向左侧倾倒;4分:不能自主行走,意识丧失。

主要观察指标:采用不同剂量阿司匹林预处理后,局灶性脑缺血大鼠神经功能及 iNOS 活性的变化。

统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计软件包由第一作者进行统计分析,实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析检验,两组间比较采用 LSD-*t* 检验。 $P \leq 0.05$ 认为差异有显著性意义; $P \leq 0.01$ 认为差异有非常显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入大鼠 36 只,分 6 组,每组各 6 只,进入结果分析的有 36 只,无因各种原因脱失者。

2.2 不同剂量阿司匹林预处理对局灶性脑缺血大鼠神经功能的影响 各组比较见表 1。阿司匹林 5 mg/kg、15 mg/kg 和 45 mg/kg 预处理组的神经功能评分与缺血对照组比较差异均有非常显著性意义($t=3.841, 2.988, 2.236, P < 0.01$)。上述 3 个阿司匹林预处理组之间神经功能评分差异无显著性意义($P > 0.05$);阿司匹林 150 mg/kg 预处理组的神经功能评分与缺血对照组比较差异无显著性意义($t=0.395, P > 0.05$)。

阿司匹林 5 mg/kg、15 mg/kg 和 45 mg/kg 预处理组的 iNOS 活性与缺血对照组比较分别降低 45%、41% 及 31%,差异有非常显著性意义($t=9.338, 8.334, 8.334, P < 0.01$)。3 组间 5 mg/kg 组与 45 mg/kg 组 iNOS 活性比较差异有显著性意义($t=0.700, P=0.05$);阿司匹林 150 mg/kg 预处理组的 iNOS 活性与缺血对照组比较差异不显著($t=0.219, P > 0.05$)。

表 1 不同剂量阿司匹林预处理对局灶性脑缺血大鼠神经功能及脑诱导型一氧化氮合酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	神经功能评分(分)	诱导型一氧化氮合酶活性(U/mg)
假手术组		0.96 ± 0.36
缺血对照组	2.50 ± 1.05	1.54 ± 0.56
阿司匹林预处理		
5 mg/kg 组	0.67 ± 0.39*	0.84 ± 0.54*
15 mg/kg 组	0.83 ± 0.75*	0.91 ± 0.43*
45 mg/kg 组	1.50 ± 0.24*	1.06 ± 0.27*
150 mg/kg 组	2.17 ± 1.17	1.56 ± 0.75

与缺血对照组比较,* $P < 0.01$

3 讨论

3.1 一氧化氮(NO)的双重作用 研究表明,NO 犹如一把双刃剑^[9]。由于 NO 浓度不同、产生部位、作用部位、产生时间的不同在脑缺血损伤中具有双重作用。体内 NO 水平的高低由一氧化氮合酶(NOS)来控制,NOS 有 3 种亚型,神经元型 NOS(nNOS)、诱导型 NOS(iNOS)和内皮型 NOS(eNOS)。在脑缺血后 5~10 min,NO 突然持续增高。30 min 后达到高峰,但以后又缓慢下降至正常水平。在脑缺血后期又持续大量地增高^[10,11]。缺血急性期 NO 来源于 eNOS 和 nNOS,表现出保护作用:使血管平滑肌处于舒张状态,还参与脑局部血流的调节,刺激外周神经可引起脑内局部区域血流量增加。缺血晚期 NO 来源于 iNOS,则表现为细胞毒性作用:产生超氧自由基,抑制线粒体呼吸,使蛋白质结构和功能改变,导致迅速的能量耗竭。

3.2 阿司匹林的神经保护作用 阿司匹林 5、15 及 45 mg/kg

预处理组的神经损伤较缺血对照组明显减轻($P < 0.01$),其 iNOS 活性与缺血对照组比较亦明显降低($P < 0.01$)。且阿司匹林 5 mg/kg 组降低 iNOS 活性比 45 mg/kg 显著($P=0.05$)。而阿司匹林 150 mg/kg 预处理组与缺血对照组在神经损伤评分及 iNOS 活性方面比较没有显著差异($P > 0.05$)。表明小剂量阿司匹林(5 mg/kg)预处理对缺血性脑损伤具有神经保护作用,不支持 De La Cruz 等^[12]大剂量阿司匹林才具有降低 iNOS 活性作用的研究,而与 Moro 等^[6]研究的结果一致。此差异产生的原因目前还不清楚,尚需进一步的实验探讨。

结论:本文推测小剂量阿司匹林(5 mg/kg)预处理对缺血性脑损伤的神经保护机制可能是通过降低 iNOS 活性、减少 NO 的大量持续释放,从而抑制细胞毒性作用来实现的,本研究为临床应用阿司匹林预防缺血性脑损伤提供了理论依据。但阿司匹林是通过何种途径来抑制 iNOS 的活性尚需进一步的分子水平研究。

4 参考文献

- 1 Grilli M, Pizzi M, Memo M, et al. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation. *Science* 1996; 274(5291): 1383-5
- 2 范卫明,周晓生,许春胜,等. 短暂性脑缺血发作的预防:复方丹参滴丸与阿司匹林的作用比较[J]. 中国临床康复,2004, 8(4): 612-3
- 3 徐光燕,邓志宽. 阿司匹林对脑梗死患者血清 C 反应蛋白含量的影响及意义[J]. 中国临床康复,2003, 7(28): 3814-5
- 4 Daya S, Walker RB, Anoopkumar-Dukie S. Cyanide-induced free radical production and lipid peroxidation in rat brain homogenate is reduced by aspirin. *Metab Brain Dis* 2000; 15(3): 203-10
- 5 Asanuma M, Nishibayashi-Asanuma S, Miyazaki L, et al. Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *J Neurochem* 2001; 76(6): 1895-904
- 6 Moro MA, De-Alba J, Cardenas A, et al. Mechanisms of the neuroprotective effect of aspirin after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacology* 2000; 39(7): 1309-18
- 7 Lowry OH, Rosebrough N J, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Bio Chem* 1951; 193(1): 265-75
- 8 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20(1): 84-91
- 9 Ladekola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997; 20(3): 132-9
- 10 Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, et al. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13(3): 355-8
- 11 Tominaga T, Sato S, Ohnishi T, et al. Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 1993; 614(1-2): 342-6
- 12 De La Cruz JP, Guerrero A, Gonzalez-Correa JA, et al. Antioxidant effect of acetylsalicylic and salicylic acid in rat brain slices subjected to hypoxia. *Neurosci Res* 2004; 75(2): 280-90

2005 年“继教园地”通知

本刊 2005 年“继教园地”栏目为中华医学会继续教育备案项目。

学习时间:每期自学 6 学时,每一学习单元 12 期,需自学 72 学时。

学分授予方法:答题并经审考卷评分及格者,可授予中华医学会继续医学教育 II 类学分,每期 1 分,12 期 12 分为一单元。

发证时间 2005 年 5 月 2005 年 10 月

咨询 13998342818 +86-24-22838105-25 陈老师

更多学习资料及答题卡可登陆

www.zglckf.com 查询继教园地窗口。