

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00608

尿苷三磷酸对大鼠局灶性缺血再灌注损伤脑组织的保护作用

田谋利¹△, 孙海静¹△, 高欣², 宁慧杰¹, 石学银^{1*}

1. 第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003
2. 第二军医大学长征医院影像科, 上海 200003

[摘要] **目的** 采用磁共振成像(MRI)法连续观察尿苷三磷酸(UTP)对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的作用。**方法** 线栓法制备大鼠中脑缺血再灌注(MCAO)损伤模型, 大脑中动脉缺血 30 min 后以微量输注泵采用大鼠尾静脉持续给予不同剂量的 UTP, 输注速度为 $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。再灌注 24 h 后测量大鼠脑含水量及神经损伤行为学评分(NDS), 并采用 TTC 染色法观察大鼠脑梗死体积。采用 MRI 连续观察缺血再灌注后 6、30、54 h 大鼠脑梗死情况。**结果** 10、30、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP 组大鼠 NDS 评分明显低于生理盐水对照组 ($P < 0.01$), 大鼠右侧大脑半球含水量明显少于生理盐水对照组 ($P < 0.01$)。随着 UTP 剂量的增加, 梗死区域逐渐缩小, 10、30、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP 组梗死体积占整个脑半球体积的百分比均较生理盐水对照组明显减少 ($P < 0.01$)。与生理盐水对照组相比, 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP 组再灌注后 6、30、54 h 梗死区域明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** UTP 对大鼠局灶性缺血再灌注损伤脑组织具有保护作用, 可显著减少脑梗死体积。

[关键词] 尿苷三磷酸; 再灌注损伤; 脑缺血; 脑梗死

[中图分类号] R 743.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0608-04

Protective effect of uridine 5'-triphosphate on brain tissue after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

TIAN Mou-li¹△, SUN Hai-jing¹△, GAO Xin², NING Hui-jie¹, SHI Xue-yin^{1*}

1. Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Department of Radiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To use MRI method for continuous observation of the protective effect of uridine 5'-triphosphate (UTP) against cerebral ischemia-reperfusion (IR) injury in rats. **Methods** The cerebral ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. UTP solution was delivered through an indwelling tail venous catheter *via* microinfusion pump 30 min after MCAO at a rate of $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Neurological deficit score (NDS) and brain water content were determined 24 h after reperfusion. The infarction volume was determined by 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) staining and MRI at 6, 30, and 54 h after reperfusion. **Results** The NDS scores in 10, 30, and 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP groups were significantly lower than that in the saline control group ($P < 0.01$); the water contents in the right cerebral hemisphere of 10, 30, and 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP groups were significantly less than that in the normal saline group ($P < 0.01$). The cerebral infarction volume was gradually decreased with the increase of UTP dose, and the proportions of infarction volumes in 10, 30, and 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP groups were significantly decreased compared with the saline control group ($P < 0.01$). The infarction volumes at 6, 30, and 54 h after reperfusion in 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP group were significantly lower than those in the saline control group ($P < 0.01$). **Conclusion** UTP has a protective effect on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats; it can greatly reduce the volume of cerebral infarction.

[Key words] uridine triphosphate; reperfusion injury; brain ischemia; brain infarction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(6):608-611]

脑血管疾病是目前威胁人类健康的主要原因之一。卒中发生后 3 h 内应用重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)可有效降低死亡率,改善预后,6 h 内使

用也能取得一定的效益^[1]。rt-PA 的应用虽然有效再通了血管,但无法解决再灌注损伤,且会增加颅内出血的发生率,大大降低了其临床应用效果。因此,

[收稿日期] 2010-01-04 **[接受日期]** 2010-05-25

[基金项目] 上海市卫生局科研基金(2009125)。Supported by Research Projects of Shanghai Health Bureau (2009125)。

[作者简介] 田谋利, 硕士, 主治医师。E-mail: tianml1973@yahoo.com.cn; 孙海静, 硕士。E-mail: haijing4200@hotmail.com

△共同第一作者(Co-first authors)。

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81885821, E-mail: shixueyin1128@yahoo.com.cn

有效解决再灌注导致的脑组织损伤是目前神经外科及麻醉科医生共同关注的问题。

尿苷三磷酸(UTP)是一种 P2Y 受体(P2 嘌呤受体亚型)激动剂,在肺炎动物模型中具有抗炎和组织保护作用^[2],对心肌缺血再灌注损伤也有明确的对抗作用^[3-4]。UTP 可通过减少线粒体内钙离子超负荷减少大鼠心肌再灌注损伤后梗死面积,并显著改善心功能^[5]。离体研究证实,UTP 主要通过 P2Y 受体发挥心肌保护作用^[6-8],但目前缺乏在体研究的证据。因此,本研究采用磁共振成像(MRI)法连续观察 UTP 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 UTP 试剂及 2% 氯化 2,3,5-三苯基四氮唑(2% 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride, TTC)由 Sigma 公司提供,计算机辅助影像分析软件 HPIAS-2000 由华海医疗信息技术有限公司提供,MRI 设备为美国通用电气公司产品,微量泵型号为 Graseby 3500 Anaesthesia Pump 由第二军医大学长征医院提供。

1.2 动物来源及分组 本研究经第二军医大学动物实验伦理委员会批准实施。成年雄性 SD 大鼠(第二军医大学实验动物中心提供) 112 只,体质量 250~300 g。其中 50 只 SD 大鼠均分为 5 组($n=10$),分别为假手术组,生理盐水对照组,10、30、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP 组,以 6 级评分法评定大鼠的神经功能缺损评分(neurological deficit score, NDS)^[9],然后测大脑半球含水量;另取 50 只 SD 大鼠均分为 5 组($n=10$),分别为假手术组,生理盐水对照组,10、30、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP 组,通过 TTC 染色观察测量脑梗死体积;剩余 12 只 SD 大鼠均分为 2 组($n=6$),分别为生理盐水对照组、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP 组,通过 MRI 检查观察再灌注后 6、30、54 h 的脑梗死体积。

1.3 局灶性脑缺血再灌注损伤模型的建立 大鼠经 10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射麻醉。以加热板使大鼠直肠温度维持在(37±0.5)°C,环境湿度控制在(50±5)%。以线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型^[10]。大鼠麻醉后仰卧位固定于显微外科手术台上,行腹侧正中切口分离右侧颈外动脉(ECA),并以 6-0 丝线结扎其远端及其分支甲状腺上动脉和枕动脉。在颈内动脉分叉处结扎翼腭动脉,游离颈外动脉作为插线途径。以临时微血管夹暂时夹住颈总动脉,在颈外动脉剪一小口,将 4-0 尼龙线经颈外动脉插入颈内动脉约 20~21 mm,直至颈动脉分叉,阻断大脑中动脉血流。缺血 120 min 后将尼龙线拨回至颈外动脉残腔实现再灌注 24 h。

1.4 UTP 给药方法及剂量 大鼠大脑中动脉阻塞后 30 min 通过尾静脉以微量泵持续泵注 UTP 溶液,给药速度为 5 ml·kg⁻¹·min⁻¹。不同剂量(10、30、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$)组分别给予不同浓度 UTP 溶液,总药液容量相同,均为 1 ml/kg。

1.5 观察指标 测量各组大鼠 NDS 脑含水量,采用 TTC 染色测定大鼠脑梗死体积,MRI 连续观察再灌注后 6、30、54 h 大鼠脑梗死体积。

1.5.1 脑含水量测定 NDS 评分完成后,通过干湿质量法测量大鼠脑组织含水量^[11-12]。40 只 SD 大鼠($n=8$)水合氯醛麻醉后通过颈椎脱臼法处死,并立即断头取脑。在增湿房内分离左右大脑半球,以吸水纸轻轻吸干标本表面的脑脊液,然后立即测量大脑半球的湿质量(精确到 0.1 mg)。大脑半球经真空烘箱以 1 000°C 持续烘干后测量其干质量,并通过公式计算脑组织含水量:脑组织含水量(%)=(湿质量-干质量)/湿质量×100%^[12]。

1.5.2 TTC 染色 缺血 2 h/再灌注 24 h 后,大鼠经水合氯醛麻醉后断头取脑,置于-80°C 快速冰冻,将左右大脑半球分别切成 1~1.5 mm 厚的切片,每个大脑半球切成 7 片,解冻后置于含 2% TTC 的 37°C 磷酸缓冲液中 20 min。梗死部分脑组织被染成白色,非缺血区被染成红色。由对实验方法及过程不了解的观察者观察梗死情况,并通过计算机辅助影像分析软件 HPIAS-2000 分析脑梗死体积。

1.5.3 MRI 检查 MRI 设备为 1.5T Signa EX-CITE HD 系统。大鼠仰卧位,头部置于 3 inch 线圈上方,大鼠脑血流再灌注后 6、30、54 h 后分别以 T₂ 加权成像显示其脑梗死图像。成像参数:中轴影像矩阵为 256×160,视野范围 3 mm×4 mm,重复时间(TR)3 s,回波时间 110 ms,冠状切片数目为 8,切片厚度 2.5 mm,切片间隔 0 mm。以功能工具软件包(FuncTool software package,GE Advanced Workstation Version 4.2, HP Workstation xw8000)计算切片面积,乘以厚度 2.5 mm 即为每片梗死体积,各片体积之和即为脑梗死体积。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多重比较采用重复测量方差分析,组间比较采用单因素方差分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分及大脑半球含水量 结果(表 1)表明:10、30、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP 组大鼠 NDS 评分明显低于生理盐水对照组($P<0.01$)。与生理盐水对照组相比,10、30、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ UTP 组大鼠右侧大脑半球含水量明显减少。左右大脑半球间比较显示,

生理盐水对照组含水量差值为 4.9% (85.0% - 80.1%), 明显大于 90 μg/kg UTP 组 [1.6% (82.1% - 80.5%), $P < 0.01$], 90 μg/kg UTP 脑保护作用最明显。

表 1 神经功能缺损评分、梗死体积占脑组织百分比、脑组织含水量测定结果

Tab 1 Neurological deficit score, proportion of infarction volume to total brain volume, and water content in brain tissue

Group	Neurological deficit score (n=10)	Infarction volume (%, n=10)	Water content(%, n=8)	
			Left cerebral hemisphere	Right cerebral hemisphere
Sham	0	0	80.5 ± 0.89	80.6 ± 1.09
Saline control	2.2 ± 0.63	30.5 ± 4.41	80.4 ± 0.47	85.0 ± 1.03 ^{△△}
UTP 10 μg/kg	1.7 ± 0.63**	23.5 ± 4.19**	80.5 ± 0.62	83.9 ± 1.04** ^{△△}
UTP 30 μg/kg	1.5 ± 0.47**	20.9 ± 3.94**	80.2 ± 0.61	82.8 ± 0.82** ^{△△}
UTP 90 μg/kg	1.4 ± 0.48**	18.9 ± 4.20**	80.5 ± 0.49	82.1 ± 0.71** ^{△△}

** $P < 0.01$ vs saline control group; ^{△△} $P < 0.01$ vs left cerebral hemisphere

2.2 TTC 染色结果 TTC 染色(图 1)发现:梗死区域组织被染成白色,非缺血区被染成红色;随着 UTP 剂量的增加,梗死区域逐渐缩小。生理盐水对照组梗死体积占整个脑半球体积的 (30.5 ± 4.41)%, 10、30、90 μg/kg UTP 组梗死体积占整个大脑半球体积的百分比均较生理盐水对照组明显减少 ($P < 0.01$, 表 1)。

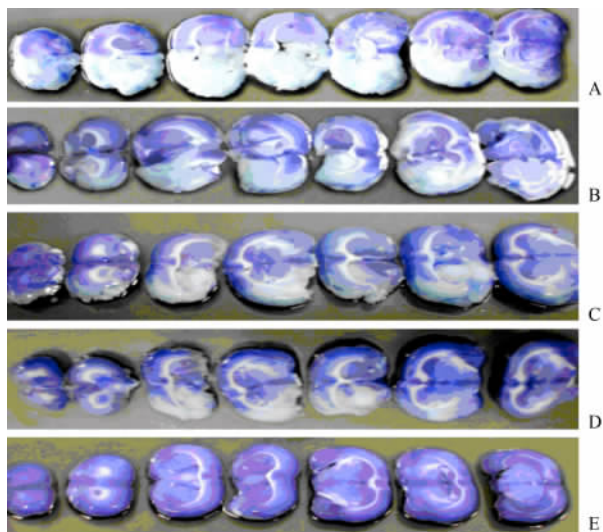


图 1 TTC 染色观察脑梗死体积

Fig 1 Cerebral infarction volumes by TTC staining

A: Saline control group; B: 10 μg/kg UTP group; C: 30 μg/kg UTP group; D: 90 μg/kg UTP group; E: Sham operation group

2.3 MRI 连续观察结果 MRI 观察结果(图 2)显示:与生理盐水对照组相比,90 μg/kg UTP 组再灌注后 6、30、54 h 梗死区域明显减少;量化分析结果(图 3)也显示:90 μg/kg UTP 组再灌注后 6、30、54 h 梗死区域明显少于生理盐水对照组,差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

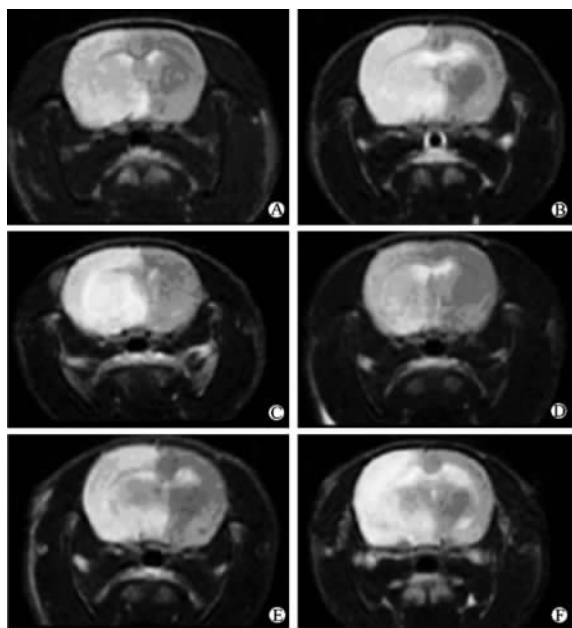


图 2 再灌注 6、30、54 h 时的 MRI 影像图

Fig 2 Representative MRI at 6, 30, and 54 h after reperfusion

A: Saline control group(6 h); B: Saline control group(30 h); C: Saline control group(54 h); D: 90 μg/kg UTP group(6 h); E: 90 μg/kg UTP group(30 h); F: 90 μg/kg UTP group(54 h)

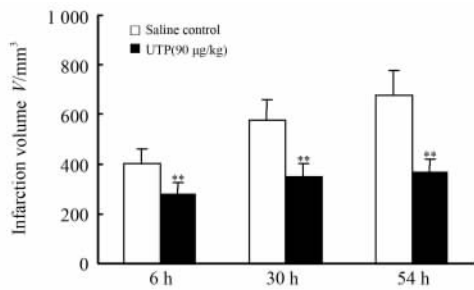


图 3 再灌注 6、30、54 h 的脑梗死体积的比较

Fig 3 Cerebral infarction volume by MRI at 6, 30, and 54 h after reperfusion

** $P < 0.01$ vs saline control group; n=6, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究采用 Longa 等^[10]提出的 6 级评分法对大鼠神经损伤后的行为学进行评分,各 UTP 组大鼠 NDS 明显低于生理盐水对照组;进一步采用 TTC 染色和 MRI 对脑梗死体积进行定量分析,发现 UTP 组大鼠脑梗死体积明显低于生理盐水对照组。采用 MRI 观察大鼠脑梗死情况与处死后测量的大鼠脑梗死体积相比,其最大优点是可以连续观察并将梗死体积与行为学评分相联系,且观察结果更客观,可以避免较大的人为误差,也更贴近临床。

UTP 可以增加冠状动脉血流,并且这种作用具有剂量依赖性^[3]。心肌缺血组织中可以发现 UTP 的浓度增高^[13]。Yitzhaki 等^[5-6]发现 UTP 对体内和体外大鼠心肌缺血模型具有改善作用,这种作用主要是通过抑制线粒体钙超载和激活 P2Y 受体而产生的。UTP 可以激活 P2Y 受体的两种亚型, P2Y₂和 P2Y₄^[14-15]。除了心肌缺血再灌注损伤,腺苷还可以通过激活 P2Y 受体对损伤的肾脏和肝脏发挥保护作用^[16-17]。因此,UTP 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用可能也是通过作用于线粒体及 P2Y 受体而产生的。UTP 还可以通过作用于特别的 P2Y 受体而引起血管舒张反应,主要是由于 UTP 引起 EDRF(内皮衍生舒张因子)/NO 的释放从而使大鼠大脑中动脉血管舒张^[18]。脑缺血再灌注损伤大鼠模型,在缺血 2 h/再灌注 24 h 后,内皮衍生超极化因子(EDHF)的增量调节也可以引起血管舒张反应^[19]。因此,UTP 在缺血后对动脉血管的舒张作用可能是其对脑缺血再灌注损伤组织的保护作用机制之一。

综上所述,UTP 对缺血再灌注损伤脑组织具有保护作用。这为临床上脑卒中的治疗提供了新思路与依据,但具体机制仍有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] Schellinger P D, Jansen O, Fiebich J B, Heiland S, Steiner T, Schwab S, et al. Monitoring intravenous recombinant tissue plasminogen activator thrombolysis for acute ischemic stroke with diffusion and perfusion MRI[J]. *Stroke*, 2000, 31: 1318-1328.

[2] Evaldsson C, Rydén I, Uppugunduri S. Anti-inflammatory effects of exogenous uridine in an animal model of lung inflammation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7: 1025-1032.

[3] Ninomiya H, Otani H, Lu K, Uchiyama T, Kido M, Imamura H. Enhanced IPC by activation of pertussis toxin-sensitive and insensitive G protein-coupled purinoceptors[J]. *Am J Physiol*,

2002, 282: H1933-H1943.

[4] Vassort G. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purineric agonist in the myocardium[J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 767-806.

[5] Yitzhaki S, Shainberg A, Cheporko Y, Vidne B A, Sagie A, Jacobson K A, et al. Uridine-5'-triphosphate (UTP) reduces infarct size and improves rat heart function after myocardial infarct[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72: 949-955.

[6] Yitzhaki S, Hochhauser E, Porat E, Shainberg A. Uridine-5'-triphosphate (UTP) maintains cardiac mitochondrial function following chemical and hypoxic stress[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43: 653-662.

[7] Yitzhaki S, Shneyvays V, Jacobson K A, Shainberg A. Involvement of uracil nucleotides in protection of cardiomyocytes from hypoxic stress[J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69: 1215-1223.

[8] Wee S, Peart J N, Headrick J P. P2 purinoceptor-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 323: 861-867.

[9] Adhami F, Liao G, Morozov Y M, Schloemer A, Schmithorst V J, Lorenz J N, et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169: 566-583.

[10] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.

[11] Lin T N, He Y Y, Wu G, Khan M, Hsu C Y. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats[J]. *Stroke*, 1993, 24: 117-121.

[12] Paczynski R P, He Y Y, Diring M N, Hsu C Y. Multiple-dose mannitol reduces brain water content in a rat model of cortical infarction[J]. *Stroke*, 1997, 28: 1437-1443.

[13] Erlinge D, Harnek J, van Heusden C, Olivecrona G, Jern S, Lazarowski E. Uridine triphosphate (UTP) is released during cardiac ischemia[J]. *Int J Cardiol*, 2005, 100: 427-433.

[14] Communi D, Janssens R, Suarez-Huerta N, Robaye B, Boeynaems J M. Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors[J]. *Cell Signal*, 2000, 12: 351-360.

[15] Jacobson K A, Jarvis M F, Williams M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets[J]. *J Med Chem*, 2002, 45: 4057-4093.

[16] Carini R, Alchera E, De Cesaris M G, Splendore R, Piranda D, Baldanzi G, et al. Purineric P2Y2 receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia[J]. *J Hepatol*, 2006, 45: 236-245.

[17] Lee Y J, Han H J. Effect of adenosine triphosphate in renal ischemic injury: involvement of NF-kappaB[J]. *J Cell Physiol*, 2005, 204: 792-799.

[18] You J, Johnson T D, Marrelli S P, Mombouli J V, Bryan R M Jr. P2u receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor from cerebrovascular endothelium in rats[J]. *Stroke*, 1999, 30: 1125-1133.

[19] Marrelli S P, Khorovets A, Johnson T D, Childres W F, Bryan R M Jr. P2 purinoceptor-mediated dilations in the rat middle cerebral artery after ischemia-reperfusion[J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(1 Pt 2): H33-H41.