

## 盐酸非那嗪奈对易卒中型自发性高血压大鼠的抗脑卒中作用

赵 婷<sup>1</sup>, 张 伟<sup>2</sup>, 沈甫明<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433
2. 解放军总后勤部第二门诊部药剂科, 北京 100071

**[摘要]** **目的** 探讨盐酸非那嗪奈 (fenazinel dihydrochloride, FD) 对易卒中型自发性高血压大鼠 (stroke-prone spontaneously hypertensive rat, SHRSP) 脑卒中的预防和治疗作用。**方法** 7周龄大小的 SHRSP, 令其每日摄入约 1 g 食盐以促进脑卒中的发生, 同时每日腹腔注射剂量为 1、3、10 mg/kg 的 FD。观察 SHRSP 脑卒中发生时间、存活时间和脑卒中后的神经症状的改变。**结果** FD 可延缓 SHRSP 的脑卒中发生时间, 延长动物脑卒中发生后的存活时间 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 低、中剂量还可减轻动物发生脑卒中后的神经症状 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论** FD 对 SHRSP 有一定的抗脑卒中作用。

**[关键词]** 盐酸非那嗪奈; 卒中; 易卒中型 SHR 大鼠

**[中图分类号]** R 743.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2011)12-1282-04

### Protective effects of fenazinel dihydrochloride against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats

ZHAO Ting<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>, SHEN Fu-ming<sup>1\*</sup>

1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pharmacy, The Second Out-patient Department, General Logistics Department of PLA, Beijing 100071, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective effect of fenazinel dihydrochloride (FD) against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). **Methods** Seven-week old male SHRSP were fed with NaCl 1 g/d to induce stroke. Meanwhile, FD was injected intraperitoneally at 1, 3, and 10 mg/(kg · d). The stroke onset time, survival period after stroke, and neuronal deficit score after stroke were observed. **Results** FD delayed the onset of stroke in SHRSP and prolonged the survival of the animals. Furthermore, low and medium doses FD also improved the neuronal deficit score after stroke. **Conclusion** Our data suggest that FD has protective effect in SHRSP.

**[Key words]** fenazinel dihydrochloride; stroke; stroke-prone SHR rats

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(12):1282-1285]

脑卒中 (stroke), 又称中风或脑血管意外 (cerebrovascular accident), 是当今世界上危及人类生命健康的最主要疾病之一, 具有较高的致残率和病死率。脑卒中是急性脑循环障碍迅速导致局限性或弥漫性脑功能缺损的临床事件。目前我国高血压患病率呈显著增长态势, 每 5 个成人中就有 1 人患高血压, 高血压患者多达 2.1 亿人<sup>[1]</sup>。脑卒中是高血压病最重要的并发症, 近些年脑卒中发生率呈持续上升趋势, 且日趋年轻化, 中国高血压患者脑卒中的发生率要远远高于欧美国家的高血压患者<sup>[2]</sup>。高血压是我国人群脑卒中和心脏病的主要危险因素, 我

国 70% 的脑卒中与高血压有关, 每年 300 万人死于心血管疾病, 其中一半以上是高血压<sup>[3]</sup>。据世界卫生组织报告, 全球每年新发脑卒中 1 500 万, 其中 500 万人死亡, 500 万人永久性残废<sup>[4]</sup>, 要使幸存者恢复功能耗时费力。因此, 预防和治疗脑卒中已经成为科学研究迫切需要解决的问题<sup>[5-6]</sup>。

盐酸非那嗪奈 (fenazinel dihydrochloride, FD) 是治疗脑缺血性卒中, 尤其是局灶性脑梗死临床急救用脑神经保护剂的一类新药<sup>[7]</sup>, 它是上海医药工业研究院化学部根据中枢神经系统有关的药物靶点 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartic

**[收稿日期]** 2011-09-06 **[接受日期]** 2011-11-22

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划, 2009CB521900). Supported by National Program on Key Basic Research Projects of China (“973 Program”, 2009CB521900).

**[作者简介]** 赵 婷, 硕士生. E-mail: zhaoting1003@sina.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871276, E-mail: fumingshen@126.com

acid receptor, NMDAR) NR1/NR2B 亚单位定向设计合成的数百个新化合物中, 在进行体内外抗脑卒中药理初复筛研究的基础上, 筛选出的具有抗局灶性脑卒中作用和对受损脑神经元有保护功能的新化合物<sup>[8-9]</sup>。本研究探讨 FD 对易卒中型自发性高血压大鼠 (stroke-prone spontaneously hypertensive rat, SHRSP) 脑卒中的神经保护作用。

## 1 材料和方法

1.1 试剂 FD (批号: 040107, 纯度: 99.65%) 由上海医药工业研究院提供; 尼莫地平注射液 (批号: H09950302, 山东新华制药股份有限公司); 0.9% 氯化钠注射液 (normal saline, NS; 上海长征富民药业有限公司, 批号: H10022497); 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动物与分组 SHRSP 由本实验室从日本引进后自行繁殖。雄性 SHRSP 随机分成 5 组 (每组 10 只), 即对照组 (NS 组)、阳性药物组 (尼莫地平 1 mg/kg)、FD 1 mg/kg、FD 3 mg/kg、FD 10 mg/kg 组。尼莫地平配制成 0.05% 的浓度, FD 浓度分别为 0.05%、0.15% 和 0.50%; 以 4 ml/kg 的容量腹腔注射给药, NS 组给予等容量生理盐水。

1.3 实验流程 取 7 周龄大小的雄性 SHRSP, 称取体质量后先用尾套法测定动物清醒尾动脉收缩压 (systolic blood pressure, SBP), SBP > 140 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 者即纳入本实验。令其每日食用含食盐 9% (质量分数) 的饲料 (根据大鼠的饲料摄入量推算, 每只动物每日从饲料中摄入食盐约 1 g) 以促进脑卒中的发生, 自由饮用自来水。

自第 8 周龄的第一天开始, 按分组进行腹腔给药。进行以下观察: 每周测定动物体质量和清醒尾动脉收缩压一次; 每日仔细观察动物的活动情况, 当动物发生卒中后, 记录其卒中发生日龄, 并按以下评分标准对各动物发生脑卒中后的神经症状进行评分<sup>[10-11]</sup>: 0 分, 正常; 1 分, 少动或轻度激惹; 2 分, 一侧前肢或头抽动或钻笼角不动, 或激惹性亢进 (跳或窜); 3 分, 单侧前、后肢或单侧前肢瘫痪, 身躯歪斜, 行走困难; 4 分, 腹部贴地, 不能站立, 四肢瘫痪, 全身细小震颤 (如动物在发生卒中后即死亡者亦评为 4 分)。动物卒中发生后仍继续给药, 最后记录其死亡日期。

1.4 统计学处理 每周动物的死亡率用百分率表示, 其余各指标均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 13.0 统计

软件进行统计学分析, 各组间均数比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水平 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 动物的一般情况 所有动物在食用加盐饲料后, 均见饮水量及排尿量明显增加。由图 1 可见, 随着动物日龄的增长, 各组动物体质量均有增长, 各组间差异无统计学意义。动物在发生卒中后, 其体质量开始下降, 毛发失去光泽, 易于沾水。由图 2 可见, NS 组动物卒中发生后均表现为四肢瘫痪, 症状较其他给药组重, 部分动物在卒中发生后即死亡。FD 1, 3 mg/kg 剂量组动物卒中发生后的表现主要为活动减少或激惹, 神经症状评分低于 NS 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。但 FD 10 mg/kg 组及尼莫地平组神经症状评分与 NS 组之间比较差异无统计学意义。

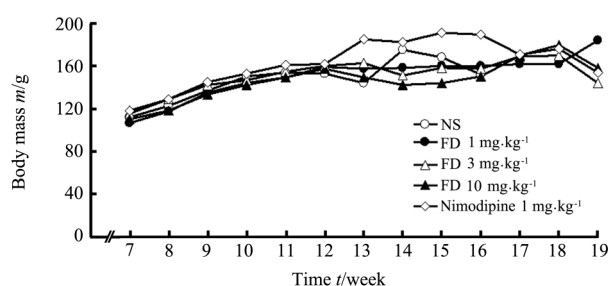


图 1 各组动物体质量变化情况

Fig 1 Changes of body mass during experiment in each group

NS: Normal saline; FD: Fenazine dihydrochloride

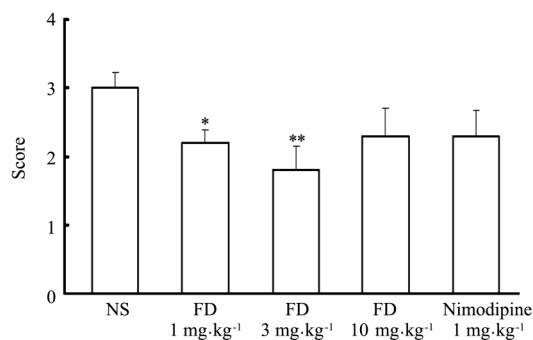


图 2 各组动物卒中发生后神经症状得分

Fig 2 Changes of neurologic deficit score after stroke

NS: Normal saline; FD: Fenazine dihydrochloride. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs NS.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 动物血压变化 在 7 周龄时, 全部动物清醒尾动脉收缩压均在 140 mmHg 以上, 各组间差异无统计学意义。此后随日龄增长, 各组动物 SBP 均有上

升,动物在发生卒中后,其 SBP 仍继续上升,在观察期间,各组间 SBP 差异无统计学意义,表明受试药并无降压作用(图 3)。

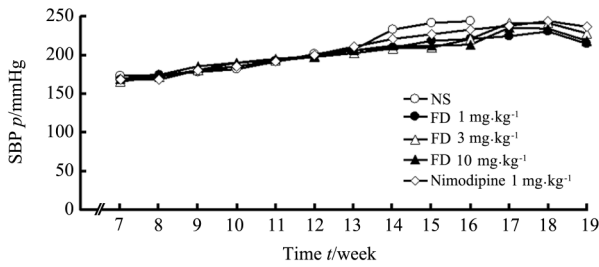


图 3 各组动物尾动脉 SBP 变化情况

Fig 3 Changes of systolic blood pressure during experiment in each group

1 mmHg=0.133 kPa. NS: Normal saline; FD: Fenazine dihydrochloride; SBP: Systolic blood pressure

2.3 动物脑卒中的发生时间及卒中后存活时间 卒中发生时,NS 组的日龄为(93±9.4) d,FD 1、3、10 mg/kg 剂量给药组分别为(104±10.3)、(106±10.9)、(109±16.2) d,平均比 NS 组延长 11、13 和 16 d (P<0.05, P<0.01),尼莫地平组为(107±18.9)d,比 NS 组延长 14 d. 卒中发生后,NS 组动物的存活天数仅为(3±2.8) d;FD 1 mg/kg、FD 3 mg/kg 和尼莫地平组动物的存活时间为(16±14.5)、(9±8.2)、(8±6.2) d,比 NS 组高 4.33、2 和 1.67 倍(P<0.05);FD 10 mg/kg 组动物的存活时间(4 d)与 NS 组之间比较差异无统计学意义。

2.4 动物生存时间 自第 10 周龄开始,即有动物在脑卒中发生后死亡,其中 NS 组动物在第 18 周龄时即已全部死亡,其余各组动物均在 20 周龄时全部死亡(图 4)。结果显示 FD 1 mg/kg、FD 3 mg/kg 和尼莫地平组与 NS 组比较差异有统计学意义(P<0.05)。

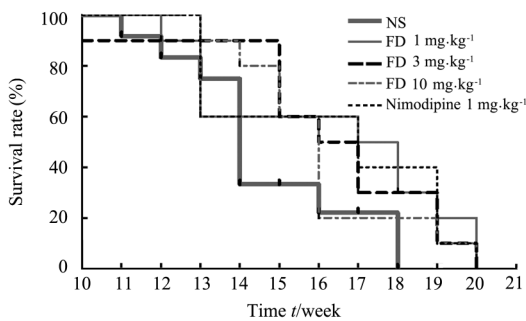


图 4 各组动物不同周龄死亡率曲线

Fig 4 Survival period of SHRSP during experiment in each group

NS: Normal saline; FD: Fenazine dihydrochloride. P=0.015 FD 1 mg/kg vs NS, P=0.028 FD 3 mg/kg vs NS, P=0.045 nimodipine vs NS. n=10,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

脑卒中发病率和病死率均很高,存活者往往残留肢体瘫痪和失语等症状,给患者、家庭和社会造成沉重的负担<sup>[12]</sup>,因而在发病早期控制脑损伤的程度具有重大的经济和社会效益。脑卒中发生后关键要进行神经元保护、阻止缺血引起的病理生理学改变、干扰缺血瀑布反应的各个环节。因此,研发神经元保护药物具有重要的临床意义。近年来研究证实,神经保护剂的干预可阻断脑缺血瀑布反应的不同环节,从而起到神经保护作用<sup>[13]</sup>。

临床上用于脑卒中的神经保护药物种类繁多,有兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAA)受体拮抗剂、钙离子通道拮抗剂、自由基清除剂和抗氧化剂、抗炎治疗药物、抑制性神经递质  $\gamma$ -氨基丁酸受体激动剂等。脑缺血损伤是多途径参与的复杂病理生理过程,涉及多种学说。EAA 损伤学说指出:缺血早期局部神经元去极化导致 EAA,如谷氨酸(Glu),大量释放,激活 NMDAR 致神经元损害<sup>[15]</sup>。Glu 是中枢神经系统最重要的 EAA 之一。脑缺血时 ATP 迅速耗竭,导致神经元去极化,引起 Glu 释放增多和摄取减少,细胞外 Glu 积累致 NMDAR 激活,进而导致 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 经其受体门控通道大量内流;Ca<sup>2+</sup> 超载触发一系列 Ca<sup>2+</sup> 依赖性反应,造成神经元损伤<sup>[16]</sup>。可见,NMDAR 过度激活在神经元损伤过程起关键作用,能够调节 NMDAR 功能的药物具有潜在的脑卒中保护作用。FD 属于芳烷酮哌嗪类衍生物,是根据 NMDA 受体 NR1/NR2B 亚单位选择性拮抗剂的结构特征设计和衍生的新化合物,具有调节 NMDAR 功能的作用。我们课题组前期实验证明不同剂量的 FD 可以明显降低细胞死亡率,并且缓解细胞内氧化应激程度,提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,同时也能减少乳酸堆积,减轻酸中毒程度,从而起到脑保护作用<sup>[7]</sup>。

本实验主要观察 FD 对 SHRSP 的抗脑卒中作用。SHRSP 是研究人类原发性高血压及其所致脑卒中的良好模型。它是从自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)里筛选出来、定向培育的亚种,具有自发性脑卒中倾向;换言之,并非所有的 SHR 都会发生脑卒中,SHR 与 SHRSP 同为高血压动物,但 SHRSP 更易发生脑卒中,该模型对盐敏感,研究时常以含盐 1% 的饮水或饲料加速高

血压的形成和脑卒中的发生<sup>[14]</sup>。在实验中,我们发现雄性 SHRSP 从 7 周龄开始 1% 盐负荷, 未经治疗组的生存时间为 93 d(从盐负荷后计约为 43 d), 这和文献报道<sup>[17]</sup>一致。此外 FD 对大鼠血压并无显著影响, 说明 FD 对 SHRSP 保护作用不是通过降压来实现的。与生理盐水处理组比较, FD 以每天 1、3 和 10 mg/kg 剂量均能够显著延迟卒中的发生时间; 1、3 mg/kg 剂量 FD 能够延长卒中发生后的生存时间和降低卒中发生后的神经功能损害, 但是 10 mg/kg 剂量 FD 并无这些作用, 可能的原因是高剂量组卒中发生较晚; 各治疗剂量组总的生存时间显著延长。这些结果表明: 盐酸非那嗪对 SHRSP 的脑卒中有一定的保护作用。

总之, 本研究证明了 FD 对 SHRSP 有一定的保护作用, 包括减轻卒中发生后的神经损伤, 延迟卒中发生时间和延长卒中发生后的生存时间。结果提示 FD 是潜在的可能具有神经保护作用的抗脑卒中药物。

#### [参 考 文 献]

- [1] He J, Gu D, Wu X, Reynolds K, Duan X, Yao C, et al. Major causes of death among men and women in China[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353:124-134.
- [2] Sen K, Bonita R. Global health status: two steps forward, one step back[J]. *Lancet*, 2000, 356:577-582.
- [3] Roger V L, Go A S, Lloyd-Jones D M, Adams R J, Berry J D, Brown T M, et al. Heart disease and stroke statistics-2011 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2011, 123:e18-e209.
- [4] Lloyd-Jones D, Adams R J, Brown T M, Carnethon M, Dai S, Simone G D, et al. Heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2010, 121:e46-e215.
- [5] Peters R, Beckett N, Forette F, Tuomilehto J, Clarke R, Ritchie C, et al. Incident dementia and blood pressure lowering in the Hypertension in the Very Elderly Trial cognitive function assessment (HYVET-COG): a double-blind, placebo controlled trial[J]. *Lancet Neurol*, 2008, 7:683-689.
- [6] Moorhouse P, Rockwood K. Vascular cognitive impairment: current concepts and clinical developments[J]. *Lancet Neurol*, 2008, 7:246-255.
- [7] 李冬洁, 李建其, 黄丽瑛, 苏定冯, 沈甫明, 奚 涛. 盐酸非那嗪对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25:716-720.
- [8] 李建其, 黄丽瑛, 夏玉叶, 翁志浩, 闵 畅, 张椿年. 芳甲酰烷基哌嗪类化合物的合成及抗脑缺氧缺血活性[J]. *中国药物化学杂志*, 2006, 16:6-14.
- [9] 李建其, 黄丽瑛, 闵 畅, 翁志浩, 张椿年. 芳烷甲酰烷基哌嗪衍生物及其作为脑神经保护剂的应用: 中国, 1381448[P]. 2002-11-27. (CA2004, 140:375185)
- [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] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. *Stroke*, 1989, 20:1037-1043.
- [12] Li Y, Zhou L, Coulter D, Gao E, Sun Z, Liu Y, et al. Prospective Cohort Study of the association between use of low-dose oral contraceptives and stroke in Chinese women[J]. *Pharmacoepidemiol Drug Safety*, 2006, 15:726-734.
- [13] Kemmeren J M, Tunis B C, van den Bosch M A, Bollen E, Helmerhorst F M, van den Graaf Y, et al. Risk of Arterial Thrombosis in Relation to Oral Contraceptives (RATIO) study: oral contraceptives and the risk of ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2002, 33:1202-1208.
- [14] Ogawa H, Yamamoto K, Kamisako T, Meguro T. Phytosterol additives increase blood pressure and promote stroke onset in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, 30:919-924.
- [15] Zhou J L, Zhu H F, Wang D, Xu X, Chen Y, Chen H, et al. Evaluation of "Grasping test box" on the forelimb function of focal cerebral ischemic rats[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2008, 24:1531-1533.
- [16] Chen Q, He S, Hu X, Yu J, Zhou Y, Zheng J, et al. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis[J]. *Neuroscience*, 2007, 27:542-555.
- [17] Blezer E L, Nicolay K, Goldschmeding R, Jansen G H, Koomans H A, Rabelink T J, et al. Early-onset but not late-onset endothelin-A-receptor blockade can modulate hypertension, cerebral edema, and proteinuria in stroke-prone hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 1999, 33:137-144.

[本文编辑] 尹 茶