基础研究　文章编号:0253-3626(2010)05-0692-03

托吡酯对急性脑缺血后大鼠脑皮层氨基酸类神经递质含量的影响及神经保护作用

刘姜冰[1],石静萍[2],赵薛旭[2],李作汉[2]

(1.扬州市第一人民医院神经内科,扬州　225001;2.南京脑科医院神经内科,南京　210029)

【摘　要】目的:探讨托吡酯(Topiramate,TPM)对脑缺血后大鼠脑组织内 γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric,GABA)、氨酸(Glutamin acid,glu)含量及神经功能变化的影响。方法:采用线栓法建立大鼠大脑中动脉闭塞(Middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型,TPM 组动物分别于插线和再灌注时腹腔注射新鲜配置成的 TPM 混悬液(8mg/ml,80mg/kg)。进行神经功能评分,TTC 染色测梗死体积百分比,高效液相色谱分析仪测脑组织内 GABA、glu 的含量。结果:TPM 组的梗死体积较单纯缺血再灌注组减少 41.8%,;TPM 组神经功能评分与缺血再灌注组比有显著改善;TPM 组脑组织中 GABA 含量与单纯缺血再灌注组相比明显升高($P<0.05$),glu 明显降低($P<0.05$)。结论:托吡酯有一定的神经保护作用,其可能机制为干扰了脑缺血再灌注损伤中兴奋性氨基酸 glu 的代谢,减少了神经细胞兴奋性毒性损伤。提高了脑内 GABA 的含量,进一步平衡 glu 的兴奋性作用。

【关键词】大鼠大脑中动脉闭塞模型;γ-氨基丁酸;谷氨酸

【中国图书分类法分类号】R743.33　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2008-08-04

Influence of topiramate on amino acids neurotransmitter of cerebral cortex in rats with cerebral ischemia reperfusion injury and neuroprotective effect

LIU Jiang-bing, et al

(*Department of Neurology, the First people's Hospital of Yangzhou*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the neuroprotective effects of topiramate on the changes of the nerve function deficiency scores and the influence of it on the content of amino acids neurotransmitter of cerebral cortex of rats with cerebral ischemia. ***Methods***: Male SD rats were subjected to right middle cerebral artery occlusion for 2h and reperfusied for 24 h.Rats in the treatment group were injected with topiramate suspl (8mg/ml,80mg/kg)at the begining of the artery occlusion and the reperfusion. The nerve function deficiency scores were measured. The infarct volume was evaluated through TTC staining. The content of amino acids of cerebral cortex was estimated by the method of high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescent detection. ***Results*** :The infarct volume was significantly reduced by 41.8% in the TPM treated group compared with that in the control group. There were significant differences in the neurological impairment scores between the treatment group and the ischemia group.TPM significantly decreased the content of Glu ($P<0.05$) and increased the content of GABA ($P<0.05$).*Conclusion*: Topiramate maybe have some neuroprotective effect, which is probably related with its regulation on the relative equilibrium of Glu and GABA.

【Key words】Middle cerebral artery occlusion rats ; γ-aminobutyric acid; Glutamic acid

托吡酯(Topiramate,TPM)是一种新型的抗癫痫药物,具有良好的药代动力学特征和治疗效果[1]根据近年研究推测,TPM 可能对缺血性脑损伤也具有保护作用[2]。本研究通过观察 TPM 对短暂缺血再灌注大鼠模型脑梗死体积的变化,以及脑组织内 GABA、glu 的影响,探讨 TPM 对缺血性脑损伤的保护作用机制及其作用特点。

作者介绍:刘姜冰(1980-),女,主治医师,硕士,研究方向:脑血管病。

1　材料与方法

1.1　材料

成年 SD 雄性清洁级大鼠 30 只(由南京医科大学实验动物中心提供),质量在(300±20)g。随机分为假手术组、缺血再灌注组、TPM 干预组,每组各 10 只。

1.2　方法

大脑中动脉闭塞(Middle cerebral arteryocclusion,MCAO)模型的制作 采用改良的 Zea Longa 法制备 MCAO 模型[3,4]。线

栓采用 3-0 的单股尼龙外科线，火烧一端使之圆钝，酒精清洁后置于 12 500 肝素内浸泡备用。用 10%水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射麻醉，大鼠仰卧固定于手术台上，取颈正中切口 2 cm，分离右侧颈总(Common carotid artery，CCA)、颈内(Internal carotid artery，ICA)和颈外动脉(External carotid artery，ECA)，结扎 ECA 远端，CCA 近心端结扎打活结，在 ECA 中部剪一小口插入线栓深入 ICA，直到感觉阻力，此时完全阻断大脑中动脉的血供来源。栓线深度约为(20.0 ± 1.0) mm，在 ECA 近分叉处结扎固定线栓，缝合皮肤。缺血 2 h 后将线栓抽出，松开 CCA 上的活结造成再灌注模型。动物清醒后出现左前爪下垂，向左侧转圈，行动迟缓等表现为模型成功。模型动物清醒后提尾有左前肢屈曲内收者方可入组。假手术组不插线栓，其余步骤同上。

1.3 实验动物处理

缺血再灌注组：分别在插线和再灌注时腹腔注射生理盐水 10 ml/kg；TPM 干预组：分别于插线和再灌注时腹腔注射新鲜配置成的 TPM 混悬液(8 mg/ml、80 mg/kg)。假手术组：不给予任何处理。

1.4 TTC 染色测定脑梗死体积

TTC(2,3,5—氯化三苯基四氮唑)是脂溶性光敏感复合物，它是呼吸链中吡啶—核苷结构酶系统的质子受体，与正常组织中的脱氢酶反应而呈红色，而缺血组织内脱氢酶活性下降，不能反应，故不会产生变化呈苍白色。动物深度过量麻醉(600 mg/kg 10%水合氯醛)以后，心内灌注(生理盐水)100 ml，断头快速取脑，置 -20℃冰箱固定 15 min 后，自前向后切成 6 片 2 mm 厚的冠状切片，切片置于含 2%TTC 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)中，37℃避光孵育 30 min 后，在 10%的中性福尔马林溶液中固定过夜。数码相机拍摄后由不知实验详情的技术人员在图像分析仪下计算梗死面积的体积百分比[5]。因为脑水肿可能会影响到测量的精确性，应当用校正公式计算：校正的梗死体积＝左半球梗死体积 -(右半球梗死体积－测量梗死体积)[6]，梗死体积百分比＝校正后梗死体积 / 右半球体积。

1.5 神经功能评分按 Zausinger6 分法[7]进行神经功能评分。

0 分：不能自发行走；1 分：自由走动状态下向病变对侧旋转；2 分：抓住鼠尾，大鼠向病变对侧旋转；3 分：对于施向病变对侧的侧压力抵抗力下降者；4 分：不能伸直病变对侧前爪，甚至全身向对侧屈曲；5 分：无神经功能缺损。观察期为大鼠清醒状态下再灌注 2 ~ 24 h。动物在观察期内死亡为 0 分。

1.6 GABA 和 glu 的测定

大鼠再灌注 24 h 后快速断头取脑，于冰盘上分离右侧额顶叶皮层组织，再于预冷的含 0.1 mmol/L 的 EDTA(二乙胺四乙酸) 0.1 mol/L 的高氯酸(100)中超声匀浆，匀浆物 12 000 r/min 离心 20 min(4℃，冷冻离心机)。上清液 -7℃冰箱保存，备用。用高效液相色谱荧光分析仪(HPLC)测定 Glu 和 GABA 的含量。

1.7 统计学方法

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，应用 SPSS11.5 软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 托吡酯对 MCAO 大鼠脑梗死体积的影响

单纯缺血再灌注 2 h 组相对梗死体积为 37.4% ± 7.4%，托吡酯干预组为 20.2% ± 6.2%。与单纯 1 缺血再灌注组相比较托吡酯干预组梗死体积减少 41.8%($P<0.05$)，有统计学差异。

2.2 神经功能评分结果

实验过程中假手术组无 1 例死亡，活动自如，无神经功能缺失表现。缺血再灌注组在再灌注后 12 h 死亡 1 只大鼠，在缺血再灌注 2 h 死亡 1 只。TPM 干预组在再灌注 2 h 死亡1只。缺血再灌注组神经功能评分为 1.00 ± 0.89；TPM 干预组评分为 2.40 ± 1.14，2 组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。表明 TPM 能明显减轻脑缺血再灌注损伤后所致的神经功能缺损。

托吡酯对 MCAO 大鼠脑组织 GABA 和 glu 含量的影响(见表 1)。

3 讨 论

缺血性脑梗死是严重危害人类生命健康的常见病，为准确的评价药物对脑缺血的疗效，建立一种与临床患者脑梗死程度相似，且稳定性与重复性好的动物模型，对实验研究具有重大意义和价值。本实验采用线栓法制作大鼠 MCAO 模型，拔出栓线即可实现再灌注。较好模拟了临床缺血性脑血管病的病理过程。

兴奋性氨基酸神经递质广泛存在于哺乳动物中枢神经系统中，脑缺血可引起多种氨基酸的释放[8,9]，细胞外液中的

表 1 托吡酯对 MCAO 大鼠脑组织 GABA 和 glu 含量的影响

组别	glu(μmol/L)	GABA(μmol/L)	Gaba/glu
假手数组	85.26 ± 5.68	5.53 ± 0.76	0.065
单纯缺血再灌注组	106.02 ± 21.30*	8.35 ± 1.47*	0.079
TPM 干预组	72.35 ± 10.08	11.74 ± 2.29	0.162

注：与假手术组和 TPM 干预组相比 *$P<0.05$

glu、GABA 均有不同程度的升高。脑缺血后兴奋性氨基酸的释放可产生神经毒性作用，加速神经元的坏死，其机制可能与以下因素有关：(1)兴奋性氨基酸的增高激活了 N- 甲基-D 门冬氨酸受体，或非 N- 甲基 -D 门冬氨酸受体，引起 Na^+、Cl^-、H_2O 进入细胞内，造成神经元水肿；(2)促进 Ca^{2+} 内流，引起细胞内 Ca^{2+} 超载，激活磷脂酶 A2、磷脂酶 C 以及中性蛋白酶引起迟发性的神经细胞的损害。而抑制性氨基酸可以抑制神经元兴奋，减少由于兴奋性毒性造成的神经细胞损伤。

本研究结果显示，单纯缺血再灌注组大鼠脑组织中不仅兴奋性氨基酸 Glu 明显增高，而且抑制性氨基酸 GABA 亦明显升高。脑缺血期间 GABA 的升高可能是由于其合成增加或(和)降解减少。由于 GABA 在中枢神经系统中起抑制性神经递质的作用，所以缺血期间 GABA 水平的增高对介导缺血性脑损伤的兴奋性毒性作用可能会有一定的拮抗效果[10,11]。与单纯缺血再灌注组相比，TPM 干预组可显著降低细胞外兴奋性氨基酸 glu 的含量($P<0.05$)，显著性升高缺血时细胞外抑制性氨基酸 GABA 的含量。

Yang 等报道[12]TPM 无论是单独还是与溶栓药物联合应用均能明显减少大鼠大脑中动脉阻塞后的脑梗死面积，并且与剂量呈正相关。本实验在脑梗死体积测定中可见托吡酯能显著的减少 MCAO 大鼠的脑梗死体积，神经功能评分结果示 TPM 干预组较单纯缺血再灌注组间有显著性改善。

上述实验结果提示托吡酯有一定的神经保护作用，其可能机制为干扰了脑缺血再灌注损伤中兴奋性氨基酸 glu 的代谢，从而抑制钙内流及氧自由基的产生，减少了由于兴奋性氨基酸造成的神经细胞兴奋性毒性损伤。提高了脑内 GABA 的含量，进一步平衡 glu 的兴奋性作用。这一结果将对托吡酯今后有可能作为神经保护剂运用于临床提供一定的理论依据。

参 考 文 献

[1] 肖 农，王 俐.妥泰治疗多发性抽动症临床研究[J].重庆医科大学学报，2004，29(4)：531.

[2] 陈春富.托吡酯神经保护作用研究进展[J].国际神经病学神经外科学杂志，2006，33(2)：149-152.

[3] Zea Longa E，Weinstein P R，Carlson S，et al. Reversible middle cerebral artery occlousion without cranieclomy in rats[J].Stroke，1989，20：84.

[4] 孙国兵，许 康，柯贤军，等.两种局灶性脑缺血再灌注模型的比较[J].卒中与神经疾病，2006，13(6)：6.

[5] Yin W，Badr AE，Mychaskiw G，et al.Downregulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model[J].Brain Res，2002，926(1-2)：165-171.

[6] Yang Y，Shuaib A，Li Q，et al. Neuroprotection by delayed administration of topiramate in a middle artery embolization[J]. Brain Res，1998，804：169.

[7] Zausinger S，Hungerhuber E，Baermanna，et al. Neurological impairment in rats after transient minddle cerebral artery occlursion：a comparative study under various treatment paradigms [J].Brain Res，2000，863(1-2)：94.

[8] 颜建云，吴伟康.脑缺血损伤的分子机制研究进展[J].中国病理生理杂志，2003，19(3)：423-426.

[9] Dimagl U，Iadecoal C，Moskonitz M A.Pathobiology of ischemic stroke：an integrated view[J].Trends Nuerosci，1999，22(9)：391-397.

[10] Wang X，Shimizu S M，Moskowitz M A，et al. Profiles of glutamate and GABA efflux in core versus peripheral zones of focal cerebral ischemia in mice[J].Neurosci Lett，2001，313(3)：121-124.

[11] Centonze D，Saulle E，Pisani A，et al.Adenosine-mediated inhibition of striatal GABA ergic synaptic transmission during in vitro ischaemia [J].Brain，2001，124(9)：1855-1865.

[12] Yang Y，Li Q，Shuaib A，et al.Enhanced neuroprotection and reduced hemorrhagic incidence in focal cerebral ischemica of rat by low dose combination theraphy of urokinase and topiramate[J]. Neuropharmacology，2000，92：841.

(责任编辑：冉明会)

欢迎投稿，欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

网址：cyxb.cqmu.edu.cn 邮发代号 78-132