

## 尿苷三磷酸对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的机制初探

田谋利<sup>a</sup>, 李铁军<sup>b</sup>, 刘虎<sup>a</sup>, 邹最<sup>a</sup>, 石学银<sup>a</sup> (第二军医大学, a. 长征医院麻醉科; b. 药学院药理教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 观察验证尿苷三磷酸 (UTP) 对在体大鼠脑缺血再灌注损伤是否具有保护作用。方法 线栓法制备大鼠中脑缺血再灌注 (MCAO) 损伤模型。UTP 试剂在大鼠大脑中动脉 (MCA) 缺血 30 min 后以微量输注泵通过大鼠尾静脉持续给药, 输注速度为 5 ml/(kg·min)。再灌注 24 h 后测量大鼠脑含水量以及神经损伤行为学评分 (NDS)。通过离体大鼠颈动脉环张力法测定 UTP 对去氧肾上腺素 (PE) 预收缩颈动脉环张力的影响。结果 比较 1Q 3Q 90  $\mu$ g/kg UTP 组, 发现 UTP 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用具有剂量依赖效应, 90  $\mu$ g/kg UTP 组的保护作用最明显。离体血管张力测定结果表明, UTP 可以显著降低 PE 诱发的血管张力。结论 UTP 对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 这种作用可能与梗塞部位的血管扩张有关。

**[关键词]** 尿苷三磷酸, 再灌注损伤, 脑

**[中图分类号]** R 973<sup>+</sup>. 2 R 965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006- 0111(2010) 03- 0181- 04

## Study on the protection mechanism of UTP against cerebral ischemia reperfusion injury in rats

TIAN Mouri<sup>a</sup>, LITIE Jun<sup>b</sup>, LIU Hu<sup>a</sup>, ZOU Zui<sup>a</sup>, SHIXUE Yin<sup>a</sup> (a. Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; b. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the protective effect of uridine 5'-triphosphate (UTP) on cerebral ischemia reperfusion (IR) injury in rats. **Methods** The injury model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by suture method. UTP were delivered through tail venous via microinfusion pump 30 min after the occlusion of MCA at a rate of 5 ml/(kg·min). Neurological deficit score (NDS) and brain water content were determined 24 h after reperfusion. The effect of UTP on the contraction of rat arteria carotis *in vitro* was examined. **Results** The protective effect of UTP on cerebral ischemia reperfusion showed a dose-dependent relationship. The 90  $\mu$ g/kg group of UTP had the best protective effect among the 3 groups. The effect of UTP on the contraction of rat arteria carotis *in vitro* showed that UTP can significantly reduce the blood vessel tension induced by PE. **Conclusion** UTP has a dose-dependent protective effect on cerebral IR, which may be related to the expansion of the blood vessels of the infarct area.

**[Keywords]** uridine 5'-triphosphate (UTP); reperfusion injury; brain

缺血再灌注损伤是临床上脑创伤和神经外科手术及麻醉中最常见的损伤之一。临床麻醉中控制性降压及心肺脑复苏病人都会引起脑供血不足, 血压恢复后再次灌注也会发生类似的缺血再灌注损伤。尽管针对脑血管疾病已开展了大量的临床和基础研究, 目前在全球范围内脑血管疾病仍然是人们面临的主要威胁之一。有研究证实重组组织型纤溶酶原激活剂 (rtPA) 对中风患者在中风发生的最初的 3 h 内是有效的, 并且在中风发生 6 h 后可能仍然有益<sup>[1]</sup>。然而, 由于患者使用 rtPA 后增加了颅内出血

的发生率, 因此总体上 rtPA 对中风患者的疗效仍达不到预期理想的效果<sup>[2]</sup>。有鉴于此, 其他的各种不同的方法目前被广泛的用于缺血再灌注的研究, 并且有些已被证实在缺血再灌注损伤中发挥重要的作用, 如炎症因子, 氧自由基等等。

尿苷三磷酸 (UTP) 是一种 P<sub>2</sub>Y 受体激动剂, 研究证实其在肺炎的动物模型中具有抗炎和保护作用<sup>[3]</sup>。P<sub>2</sub>嘌呤受体对心肌的缺血再灌注损伤也具有明显的保护作用<sup>[4,5]</sup>。UTP 可以通过减少线粒体内钙离子超负荷从而改善心肌再灌注损伤后大鼠的心肌梗死面积并可以改善心功能<sup>[6]</sup>。离体研究表明, UTP 的这种作用与 P<sub>2</sub>Y 受体有关<sup>[7,8]</sup>。Langendorff 离体灌注小鼠心脏在 20 min 的缺血以及再灌注 45 min 后, 较低浓度的 UTP 即可达到明显的心肌保护作用, 这种保护作用与在 P<sub>2</sub>Y 受体水平具有一

**[基金项目]** 上海市卫生局科研课题项目 (2009125)。

**[作者简介]** 田谋利 (1969-), 男, 主治医师, 硕士。E-mail: tianml1973@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** 石学银。Tel: (021) 81885821, E-mail: shixueyin1128@yahoo.com.cn

致性<sup>[9]</sup>。然而, UTP对在体脑缺血再灌注损伤是否具有保护作用目前尚无相关研究。本研究的目的是即检验单次剂量的 UTP对在体脑缺血再灌注损伤模型大鼠是否具有保护作用。

## 1 材料和方法

本研究经第二军医大学(中国上海)动物实验伦理委员会批准实施。

**1.1 局灶性脑缺血再灌注损伤模型的建立** 成年雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠, 体重 250~300 g 麻醉方法以 10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔内注射。以加热板使大鼠直肠温度维持在  $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 环境湿度控制在 50%  $\pm$  5%。以线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型<sup>[10]</sup>。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。以一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。50 只大鼠 ( $n=10$ ) 参考文献上的方法, 以 6 级评分法评定大鼠的神经功能缺损评分(NDS)<sup>[11]</sup>。

**1.2 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(Graseby 3500 Anaesthesia Pump)持续泵注 UTP 溶液, 给药速度为  $0.5 \text{ (ml} \cdot 100 \text{ g} \cdot \text{min)}$ 。不同剂量组分别给予不同浓度的 UTP 溶液, 总的药液容量相同, 均为 1 ml/kg 分别测量不同剂量组(10、30 和 90  $\mu\text{g/kg}$ )的大鼠脑含水量, 神经病学评分(NDS), 并通过 TTC 染色测定大鼠脑梗塞体积。通过核磁共振成像(MRI)及电子显微镜观察 90  $\mu\text{g/kg}$  组大鼠的脑梗塞体积及细胞凋亡情况。

**1.3 脑含水量测定** ( $n=8$ ) 通过干湿重法测量大鼠脑组织含水量<sup>[12-13]</sup>。神经病学评分完成以后, 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重(精确到 0.1 mg)。大脑半球经真空烘箱以  $1000^\circ\text{C}$  持续烘干后测量其干重, 并通过以下公式计算脑组织含水量: 脑组织含水量 (%) =  $(\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$ <sup>[12]</sup>。

**1.4 UTP 对大鼠离体颈动脉血管舒张作用影响** 大鼠颈动脉环制备参照文献方法<sup>[14]</sup>, 取健康雄性 SD 大鼠, 体重 500~530 g 用 10% 水合氯醛 3 ml/kg

腹腔内注射麻醉后, 迅速游离大鼠颈外动脉, 置于 Krebs-Henseleit 缓冲液 (mmol/L: NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, glucose 11.0, Na<sub>2</sub>-EDTA 0.5) 中, 剔除周围结缔组织, 剪成 2~3 mm 的血管环。将血管环悬挂于预置 10 ml Krebs-Henseleit 液的浴槽内, 一端固定, 一端通过张力换能器连接到 MPA 2000 生物信号采集系统, 记录张力变化。在 Krebs-Henseleit 缓冲液持续通 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的混合气体的状态下, 调节其基础张力至 2.0 g 并在  $37^\circ\text{C}$  下稳定 60 min, 期间每 10~15 min 换液一次。

平衡 60 min 左右, 待血管环重新平衡稳定后, 用  $1 \mu\text{mol/L}$  去氧肾上腺素 (phenylephrine PE) 收缩血管环达平台时, 加入  $1 \mu\text{mol/L}$  乙酰胆碱 (acetylcholine Ach) 检验血管内膜完整程度, 舒张达 80% 以上为血管内膜完整; 用  $1 \mu\text{mol/L}$  PE 收缩血管环达平台时, 加入 10 mmol/L 硝普钠检验血管平滑肌舒张功能, 如血管舒张达 95% 以上, 为血管平滑肌功能正常, 进行下一步实验。

以  $1 \mu\text{mol/L}$  PE 使血管收缩达平台后加入受试药物。UTP 以累积剂量法给药至最大剂量, 以水做溶剂对照, 在内皮完整的血管环上观察药物的作用, 以观察 UTP 是否对血管具有舒张作用。实验结果中药物浓度均为血管所在浴槽中营养液中药物的终浓度。经内皮检查后的血管环, 依用药顺序不同随机分为 4 组。加 PE 使终浓度为  $10^{-6} \text{ mol/L}$ , 达收缩平台后。采用累计加药法加入 UTP, 加药间隔为 15 min 记录血管张力变化曲线。

**1.5 统计学处理** 实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件统计处理, 以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多重比较采用重复测量方差分析, 组间比较采用配对  $t$  检验。  $P < 0.05$  视为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 神经功能缺损评分(NDS)结果显示** 给予 10、30 和 90  $\mu\text{g/kg}$  UTP (G10、G30 和 G90 组) 的大鼠的 NDS 评分明显高于对照组 (生理盐水组, NS 组)。(图 1)。

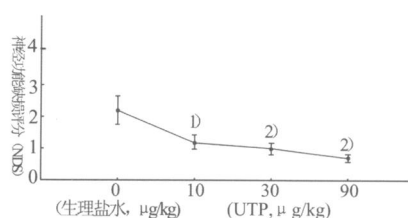


图 1 给予不同剂量 UTP 大鼠的神经功能缺损评分 ( $n=10$ )

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与生理盐水对照组相比。

**2.2 大脑半球含水量 (图 2)与生理盐水对照组相比, G1Q G30和 G90组的右侧大脑半球含水量明显减少。左右大脑半球之间比较显示, 生理盐水对照组含水量差值为 4.6%, 明显大于 G90组 (1.6%,  $P < 0.01$ )。从结果可以看出, 在 4 个剂量组中, 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  UTP 的脑缺血再灌注的保护作用最明显。**

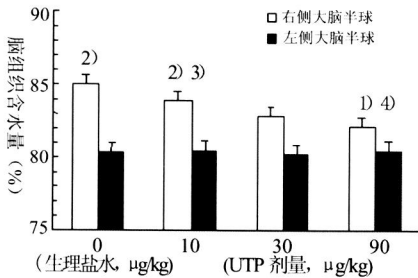


图 2 给予不同剂量 UTP 的大鼠的大脑半球含水量 ( $n = 8$ )

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  与左侧大脑半球相比;  
<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ , 与生理盐水对照组相比。

**2.3 UTP 对大鼠离体颈动脉血管舒张作用影响 (见表 1), 血管舒张作用记录为: (加入 UTP 前血管最大张力 / 加入 UTP 后血管最大张力) / 加入 UTP 前血管最大张力  $\times 100\%$ 。在一定的 UTP 浓度范围 ( $10^{-7}\text{M} \sim 10^{-4}\text{M}$ ) 内, 随着 UTP 浓度的增加, 其舒张血管的作用逐渐增强, 并且具有一定的剂量依赖关系。**

表 1 UTP 对大鼠颈动脉血管舒张作用的影响 ( $n = 4 \bar{x} \pm s$ )

UTP 浓度 (mol/L)	血管舒张 (%)
$10^{-7}$	$0.9 \pm 0.7^{1)2)}$
$10^{-6}$	$12.8 \pm 10.9$
$10^{-5}$	$31.3 \pm 18.6$
$10^{-4}$	$39.2 \pm 14.4$
$10^{-3}$	$31.0 \pm 16.91$

注: <sup>1)</sup>  $P < 0.01$  与 UTP 浓度范围  $10^{-4}\text{M}$  相比; <sup>2)</sup>  $P < 0.05$  与其他几个剂量组相比较。

### 3 讨论

脑缺血再灌注损伤是临床上常见的损伤之一。临床上严重脑中风后大多数的死亡发生在中风后第一、二周后, 主要原因是由于脑组织水肿的形成造成的<sup>[15]</sup>。目前在减轻脑水肿肿胀缺血造成的影响方面尚没有最佳的治疗措施。如甘露醇化合物常被用于重症患者, 以提供“渗透疗法”<sup>[13]</sup>。类似甘露醇之类的无机化合物可能导致脑水肿的症状恶化<sup>[16]</sup>。因此找到一种脑缺血再灌注损伤后可以减轻脑水肿的方法和措施具有重要的意义。本实验中, 我们通过尾静脉给予大鼠中动脉闭塞模型大鼠不同浓度的 UTP, 以观察 UTP 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作

用。我们发现, 分别给予 0 1Q 30 及 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  UTP, 再灌注 24 h 后, UTP 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用具有剂量依赖作用。在本研究的 4 组剂量中, 最大剂量 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  UTP 组大鼠的脑水肿程度最轻。

在神经损伤评分及脑梗塞体积的观察中也可以得到同样的结果。笔者使用 Adhoni 等<sup>[13]</sup>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 组大鼠的神经损伤评分明显低于生理盐水对照组。脑缺血再灌注损伤后严重的脑水肿通常在 6 h 至 7 d 均有发生<sup>[17]</sup>。定量分析表明, 生理盐水组的脑水肿的程度是最严重的。通过对相关文献的简要回顾, UTP 对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的作用机理可能有下面几种可能。有研究发现, UTP 可以增加冠状动脉血流, 并且这种作用具有剂量依赖性<sup>[4]</sup>。Yitzhak 等发现 UTP 对体内和体外大鼠心肌缺血模型具有有益作用, 这种作用主要是通过抑制线粒体钙超载和激活  $P_2Y$  受体而发生的<sup>[6, 7]</sup>。 $P_2$  嘌呤受体分为  $P_2X$  和  $P_2Y$  两种亚型, 都可以被核苷酸激活。 $P_2X$  受体属于离子通道受体,  $P_2Y$  受体属于 G 蛋白偶联受体。UTP 可以激活  $P_2Y$  受体的两种亚型,  $P_2Y_2$  和  $P_2Y_4$ <sup>[18, 19]</sup>。UTP 是一种重要的  $P_2Y$  受体, 在缺血组织中可以发现 UTP 的浓度增高<sup>[20]</sup>。除了心肌的缺血再灌注损伤, 腺苷还可以通过激活  $P_2Y$  受体对肾脏和肝脏的损伤具有保护作用<sup>[21-23]</sup>。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  $P_2Y$  受体而产生的。

本研究中发现 UTP 可以舒张去氧肾上腺素预收缩的离体大鼠颈动脉, 且这种舒张作用具有剂量依赖效应。本研究中通过脑含水量测定观察到 UTP 可以减轻大鼠脑缺血再灌注损伤后的脑水肿程度, 这种效应可能由于在脑缺血 30 min 后静脉给予 UTP 后, 引起缺血组织血管舒张, 血流增加而产生的。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的保护作用的机制之一。

综上所述, UTP 对脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用, 这为临床上脑中风的的治疗提供了新的思路与依据。然而 UTP 对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制, 尤其是其具体的受体水平的作用机制仍然需要进一步的研究。

### 【参考文献】

[1] Schellinger PD, Jansen O, Fiebach JB *et al* Monitoring intravenous recombinant tissue plasmin activator thrombolysis for acute ischemic stroke with diffusion and perfusion MRI [J]. Stroke: a journal of cerebral circulation, 2000, 31 (6): 1318

(下转第 234 页)

教育应当关注研究生的个人发展需求和社会需求, 改变研究生教育观念, 注重对教育质量的干预和评估。唯有如此, 才能实现学科与学生的和谐发展, 履行教育使命。

【参考文献】

[1] 李中华. 中国 CRO 的现状及其面临的挑战 [J]. 中国医药技术经济与管理. 2008; 2(1): 43.  
 [2] Triggler DJ, Miller KW. Commission on the future of graduate education in the pharmaceutical sciences[R]. <http://www.aacp.org/resources/historicaldocuments/Documents/CommissionReport.pdf> [2002-02-20], [2002-05-26].

[3] 彭司勋. 中国药学年鉴. 2006[M]. 上海: 第二军医大学出版社. 2006: 268.  
 [4] 彭司勋. 中国药学年鉴. 2007[M]. 上海: 第二军医大学出版社. 2007: 227.  
 [5] 彭司勋. 中国药学年鉴. 2008[M]. 上海: 第二军医大学出版社. 2009: 219.  
 [6] 教育部. 普通高等学校基本办学条件指标(试行)(教发[2004]2号)[S]. 2004-02-06.

[收稿日期] 2010-05-06

[修回日期] 2010-05-16

(上接第 183 页)

[2] The NINDS tPA Stroke Study Group. Intracerebral hemorrhage after intravenous tPA therapy for ischemic stroke [J]. Stroke a journal of cerebral circulation, 1997, 28 (11): 2109.  
 [3] Evaldsson C, Ryden I, Uppugunduri S. Anti-inflammatory effects of exogenous uridine in an animal model of lung inflammation [J]. International immunopharmacology, 2007, 7 (8): 1025.  
 [4] Ninomiya H, Otani Lu K, et al. Enhanced IPC by activation of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G protein-coupled purinoreceptors [J]. American journal of physiology, 2002, 282 (5): H1933  
 [5] Vassort G. Adenosine 5'-triphosphate a P2<sup>u</sup> purinergic agonist in the myocardium [J]. Physiological reviews, 2001, 81 (2): 767.  
 [6] Yitzhaki S, Shaiberg A, Chepurko Y, et al. Uridine-5'-triphosphate (UTP) reduces infarct size and improves rat heart function after myocardial infarct [J]. Biochemical pharmacology, 2006, 72 (8): 949.  
 [7] Yitzhaki S, Hochhauser E, Porat E, et al. Uridine-5'-triphosphate (UTP) maintains cardiac mitochondrial function following chemical and hypoxic stress [J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2007, 43 (5): 653  
 [8] Yitzhaki S, Shneyvays V, Jacobson KA, et al. Involvement of uracil nucleotides in protection of cardiomyocytes from hypoxic stress [J]. Biochemical pharmacology, 2005, 69 (8): 1215.  
 [9] Wee S, Peart N, Headrick JP. P2 purinoreceptor-mediated cardioprotection in ischemic reperfused mouse heart [J]. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2007, 323 (3): 861  
 [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, a journal of cerebral circulation, 1989, 20 (1): 84  
 [11] Adhami F, Liao G, Morozov YM, et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy [J]. The American journal of pathology, 2006, 169 (2): 566  
 [12] Lin TN, He YY, Wu G, et al. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats [J]. Stroke, a journal of cerebral circulation, 1993, 24 (1): 117  
 [13] Paczynski RP, He YY, Diringer MN, et al. Multiple dose mannitol reduces brain water content in a rat model of cortical infarction [J]. Stroke, a journal of cerebral circulation, 1997, 28 (7): 1437.

[14] Kubota YK, Tanaka NK, Umegaki K, et al. Ginkgo biloba extract-induced relaxation of rat aorta is associated with increase in endothelium intracellular calcium level [J]. Life Sci, 2001, 69 (20): 2327  
 [15] Bounds JV, Wiebers DO, Whisnant JP, et al. Mechanisms and timing of deaths from cerebral infarction [J]. Stroke, a journal of cerebral circulation, 1981, 12 (4): 474  
 [16] Kaufmann AM, Cardoso ER. Aggravation of vasogenic cerebral edema by multiple dose mannitol [J]. Journal of neurosurgery, 1992, 77 (4): 584  
 [17] Hsu CY, Liu TH, Xu J, et al. A rachidonic acid and its metabolites in cerebral ischemia [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1989, 559 (A rachidonic): 282  
 [18] Communi D, Janssens R, Suarez-Huerta N, et al. Advances in signalling by extracellular nucleotides: the role and transduction mechanisms of P2Y receptors [J]. Cellular signaling, 2000, 12 (6): 351.  
 [19] Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M. Purine and pyrimidine (P<sub>2</sub>) receptors as drug targets [J]. Journal of medicinal chemistry, 2002, 45 (19): 4057.  
 [20] Erlinge D, Hamek J, Van Housden G, et al. Uridine triphosphate (UTP) is released during cardiac ischemia [J]. International journal of cardiology, 2005, 100 (3): 427.  
 [21] Carini R, Alchem E, De Cesaris MG, et al. Purinergic P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia [J]. Journal of hepatology, 2006, 45 (2): 236.  
 [22] Lee YJ, Han HJ. Effect of adenosine triphosphate in renal ischemic injury: involvement of NF- $\kappa$ B [J]. Journal of cellular physiology, 2005, 204 (3): 792  
 [23] Lee YJ, Park SH, Jeung TO, et al. Effect of adenosine triphosphate on phosphate uptake in renal proximal tubule cells: involvement of PKC and p38 MAPK [J]. Journal of cellular physiology, 2005, 205 (1): 68

[收稿日期] 2010-01-04

[修回日期] 2010-03-07