

必存[®]（依达拉奉） 临床研究及进展

目 录

必存 依达拉奉在神经内科的应用

一、脑梗死

1、基础研究

自由基清除剂依达拉奉—基础和临床	01
从实验及临床研究方面来看自由基清除剂(Free radical scavenger)	06
抗氧化剂在急性脑损伤中的治疗作用	08
通过抑制短暂性脑缺血时羟自由基的增加阻止迟发性神经元死亡	12
自由基清除剂——依达拉奉的药理学和临床研究	15
阿加曲班和依达拉奉联用对沙鼠 15 分钟前脑缺血有相加的神经保护作用	21
小鼠脑片 Formazan 定量测量方法评价缺血性损伤及神经保护作用	25
神经保护药和抗炎药对小鼠脑片缺氧缺糖 / 再灌注损伤作用	30

2、临床研究

急性缺血性脑卒中的治疗进展	35
依达拉奉治疗急性脑梗塞的随机、叠加、对照、多中心临床试验总结报告	42
必存抢救脑梗死一例报告	45
依达拉奉注射液治疗急性脑梗死的临床疗效评价	46
依达拉奉治疗急性脑梗死者的有效性分析	50
依达拉奉治疗急性脑梗死的疗效观察	52
神经保护的研究进展	55
依达拉奉的临床研究进展	59
自由基清除剂依达拉奉对脑缺血的治疗作用	62
治疗缺血性脑卒中新药—依达拉奉	65
加用依达拉奉治疗急性脑梗死的疗效观察	68
依达拉奉治疗急性脑梗死的临床观察	70
必存	74
脑梗死治疗药—依达拉奉注射液	76
治疗急性脑梗死的新型脑保护药依达拉奉	78
一种改善脑卒中病残性药物—依达拉奉	82
日本三期: Original Paper	84
新型自由基清除剂依达拉奉对急性脑梗塞的治疗作用多中心、随机、安慰剂对照、双盲研究	93
关于新药依达拉奉	98
自由基清除剂 3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮 (MCI-186) 和脑中风急性期治疗药物间相互作用的研究	101
自由基清除剂对脑梗塞的治疗	110

急性期脑梗死者依达拉奉治疗的有效性—与既往的治疗方法比较—	112
脑梗塞治疗的新选择脑保护剂(自由基清除剂)依达拉奉的使用经验	116
新药的开发动向—脑梗塞(脑血栓、脑栓塞)急性期新的脑保护剂—	
依达拉奉 edaravone 的有用性	118
临床医生对新药的评价脑保护药(自由基消除剂)依达拉奉edaravone	124
影响急性脑梗塞患者局部脑血流量的MCI-186的治疗效果	127

二、脑出血

依达拉奉对急性脑出血的疗效评价	135
-----------------	-----

三、神经内科其他应用

对肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)患者使用自由基消除剂—依达拉奉的临床试验	138
---------------------------------------	-----

四、必存 依达拉奉在神经外科的应用

氧自由基与神经系统疾病	144
自由基反应与依达拉奉对实验性脑损伤的影响	157
采用自由基清除剂Edaravone预防颈动脉内膜剥离手术后的脑过度灌注综合征	163
减少颈动脉内膜切除术(CEA)的术中合并症的方法	176
颅内动脉瘤手术时的脑保护疗法	180

五、必存 依达拉奉在心血管科的应用

氧自由基与心血管疾病	185
关于新的自由基清除剂MCI-186的心肌保护效果的实验研究	190
心肌保护：最近的话题	197

六、必存 依达拉奉在肾内科的应用

依达拉奉对维持血液透析患者在脑梗塞急性期的治疗	202
-------------------------	-----

七、必存 依达拉奉在麻醉科的应用

低体温疗法及自由基清除剂对手术中发生的脑缺血发挥作用的病例	208
-------------------------------	-----

八、必存 依达拉奉在儿科的应用

氧自由基与新生儿疾病	210
对发生脑梗塞的新生儿使用依达拉奉(拉基卡头)的经验	213
新生儿的氧化应激反应(第一报)—把血浆中的抗氧化物质和游离脂肪酸作为氧化应激反应的标志物进行研究—	214

九、必存 依达拉奉其他循证医学的证据

临床指南摘要：	
脑梗塞急性期脑保护治疗原则	215

MENDLINE相关文章·····	216
-------------------	-----

十、必存 在日本的相关研究

急性脑梗死病例应用Edaravone治疗后缓和时间的变化·····	219
缺血再灌注损伤时羟基(OH)的影响有关OH清除剂(MIC-186)的效果·····	219
自由基清除剂Edaravone在亚低温合并治疗观察增强脑保护作用·····	220
自由基清除剂的血管保护作用·····	220
自由基清除剂MCI-186心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究·····	221
本院对Edaravone的使用经验·····	221
本院对Edaravone的使用经验·····	222
本院对Edaravone使用的第二轮报导·····	222
自由基清除剂Edaravone对血小板聚集的影响·····	222
有关Edaravone对心源性脑梗塞的作用研究·····	223
自由基清除剂Edaravone对新生鼠低氧性缺血性脑损伤在脑内产生 脂质过氧化和氮氧化合物的影响·····	223
自由基清除剂Edaravone对新生鼠低氧性 缺血性脑损伤和学习行动的改善效果·····	224

十一、自由基与临床

氧自由基与消化系统疾病·····	225
氧自由基与泌尿系统疾病·····	230
氧自由基与呼吸系统疾病·····	237
氧自由基与代谢内分泌疾病·····	239
氧自由基与血液系统疾病·····	243
氧自由基与多脏器功能失常综合征·····	248
氧自由基与外科疾病·····	251
氧自由基与妇产科疾病·····	253
氧自由基与五官科疾病·····	255

自由基清除剂依达拉奉—基础和临床

松本昌泰

【摘要】 大脑中的氧代谢是非常活跃的，把大脑称为是经常暴露于氧化应激反应下的脏器一点也不为过。因此，作为代偿机制的自由基清除系统在大脑中也是非常发达的，一旦缺血应激在允许范围之外，发生再灌注时，那么超过了代偿能力范围的氧化应激反应就能引起各种组织损害。事实上，通过多数的实验研究证明，氧化应激反应在脑缺血，以及缺血再灌注时，在缺血周边领域（半影带领域）发生的由凋亡引起的神经细胞坏死的机制中，起着极其重要的作用。

谈到对脑梗塞急性期的治疗的进步，必须提到的是以改善血流为目的的血栓溶解疗法和脑保护药物的开发，在世界上也展开了对其开发的竞争。在这其中，自由基清除剂能阻止脑缺血的级联反应中的几个步骤，在我国开发的依达拉奉 (edaravone) 作为世界上最初的脑保护药物，已经被应用到了临床上，依布硒 (ebselen) 等其它药物也已经在临床试验中。今后，进一步经过欧美等国家的临床试验的验证，这些自由基清除剂有望作为国际上的脑保护药物而得到发展。

前言

到目前为止，在脑缺血动物模型中已经证明，氧化应激反应对脑缺血以及脑缺血再灌注情况下发生神经细胞坏死的分子机制中，起到了极其重要的作用。即便如此，众多的脑保护药物的候补药由于在临床试验中没能证明它们的有效性，开发被迫中止，在这种情况下，能够阻止脑缺血级联反应中的几个步骤的自由基清除剂，作为世界上最初的脑保护药物，在我国开始临床使用，其意义的重大是显而易见的。但是，推测自由基清除剂对脑缺血后的再灌注会更有效，因此，对脑梗塞的超急性期，和血栓溶解疗法的合用有望成为理想的治疗方法。

因此，本文在整理脑缺血再灌注病理和氧化应激反应的关系的同时，对作为脑保护药的自由基清除剂的临床意义也试着做了一下总结。

脑缺血·再灌注和氧化应激反应

作为脑主要的机能细胞的神经细胞的能量代谢，对不断被供给的血液中的葡萄糖和氧气存在着很大的依赖性，线粒体的氧化磷酸化几乎是唯一的能量供给源。线粒体在正常的生理条件下，能够生成一定量的活性氧（约占电子传递链的2~5%），而对这个过程进行适当的控制，对维持正常的神经细胞的机能来说

是必不可少的。

$O_2^{\cdot-}$	:superoxide radical
H_2O_2	:hydrogen peroxide
$\cdot OH$	:hydroxyl radical
1O_2	:singlet oxygen
ROOM	:hydroperoxide
$ROO^{\cdot}$	:peroxyl radical
$RO^{\cdot}$	:alkoxyl radical(R=lipid)
NO	:nitric oxide
$ONOO^{\cdot}$	:peroxynitrite

表1 活性氧的种类

通常，神经细胞中产生的活性氧的种类(表1)总称为 reactive oxygen species (ROS)，在这之中，超氧自由基和羟自由基等的细胞毒性是特别强的。图1用图示表示了在神经细胞中 ROS 的产生系统和清除系统。超氧自由基由超氧化物歧化酶(SOD)催化，生成过氧化氢，进一步由过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶(GPO)的作用下，最终生成水和氧气。但是在脑内，过氧化氢酶的含量很少，故而产生的大部分

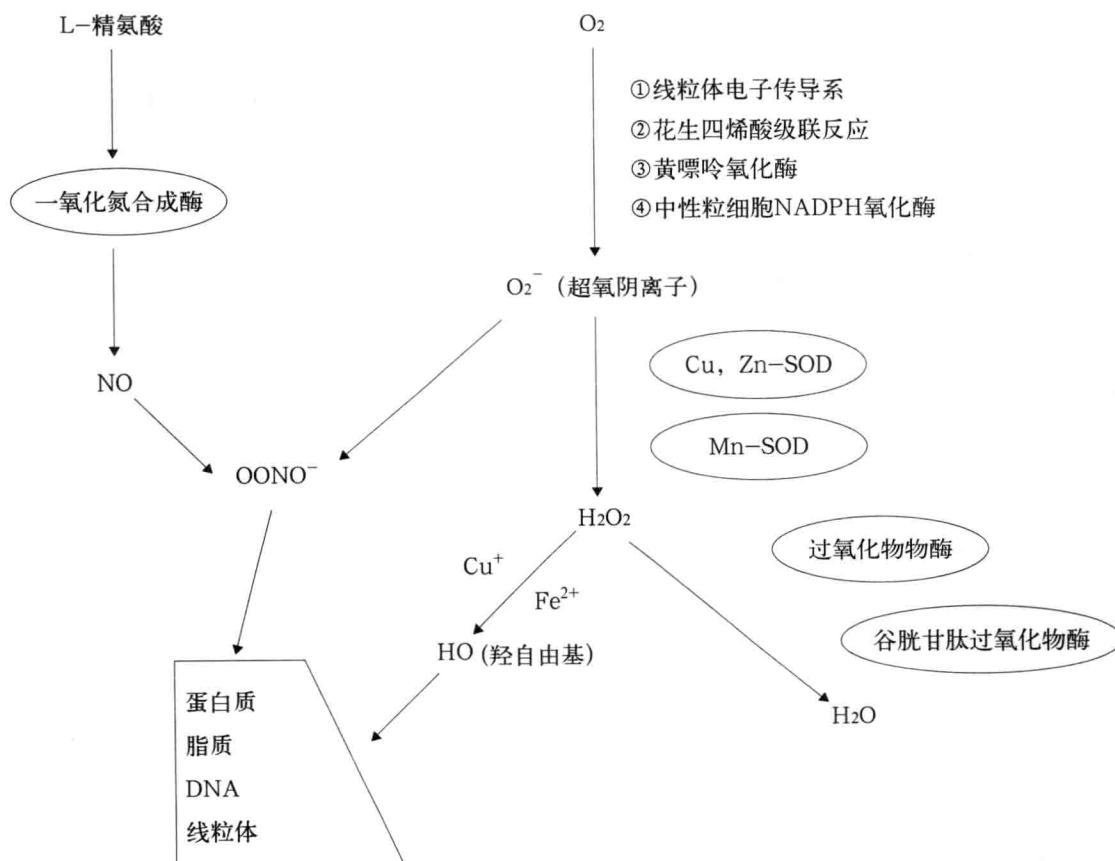


图1 自由基的产后系统和清除系统^[1]

的过氧化氢由谷胱甘肽过氧化物酶催化后代谢成水和氧气。

在神经细胞中的SOD,有存在于细胞质中的Cu, Zn-SOD (SOD1),有存在于线粒体中的 Mn-SOD

(SOD2)。另外,在细胞间质中还存在 ECSOD (SOD3),它在脑中的含量要比在其它的脏器内的含量要低。还有,在神经细胞内的NO合成酶(nNOS或者是NOS1)的作用下,生成的NO和超氧化物结合,生成反应性极高的OONO⁻。

在脑缺血时,特别是缺血再灌注时,生成了大量的自由基,这是已经被各种方法证明了的。发生在大脑皮质领域的脑梗塞在超急性期时,存在着缺血中心部位(重度的缺血部位)和其周边的半影带地区(可逆的轻~中度的缺血领域)(图2),在表2中列举了在脑缺血状态下,由相关的存在各种细胞内的酶催化生成ROS的情况。

在通常情况下,在缺血中心部位,伴随着线粒体的电子传递链的障碍,磷脂酶A₂的活性化,产生了花生四烯酸的蓄积,黄嘌呤脱氢酶向黄嘌呤氧化酶转换等等变化,这样就形成了ROS产生的基础。另外,在半影带地区的血流残余区域的氧气向缺血中心部位溶出,这样也能够持续地产生ROS。另一方面,从血管内由于缺血而被活性化的中性粒细胞中的NADPH

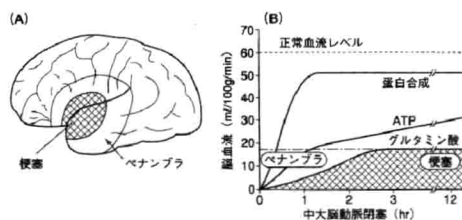


图2 大脑中动脉闭塞后引起的脑梗塞缺血中心部和周边部的半影带地区(A)

引起蛋白质合成损害、电子传导系ATP产生障碍,谷氨酸释出亢进,脑梗塞的脑血流阈值和闭塞时间(B)^[2]

中大 用) 闭塞=大脑中动脉闭塞

ペナンプラ=半影带地区

グルタミン酸=谷氨酸

正常血流レベル=正常血流水平

表2 脑缺血时活性氧产生酶的种类、发现形式及细胞内的存在位置[3]

Enzyme	Gene/protein	Oxidant	Ca ²⁺ activation	Expression	Cell
Neuronal nitric oxide synthase	NOS 1	NO	+	Constitutive	Neuron
Inducible nitric oxide synthase	NOS 2	NO	-	Inducible	L, M, A, E
Endothelial nitric oxide synthase	NOS 3	NO	+	Constitutive	Endothelium
Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase	XDH/XO	O ₂ ⁻	+	Constitutive	Endothelium
Cyclooxygenase-1	COX-1	O ₂ ⁻	-	Constitutive	N, A, M, E
Cyclooxygenase-2	COX-2	O ₂ ⁻	-	Inducible	N, A, M, E
NAD(P)H oxidase	NADPHO	O ₂ ⁻	-	Constitutive	Leukocyte
Myeloperoxidase	MPO	HOCl	-	Constitutive	M
Monamine oxidase	MAO	H ₂ O ₂	-	Constitutive	N, A, E

NOS: nitric oxide synthase, NO: nitric oxide radical, +: Ca²⁺-dependent, -: Ca²⁺-independent, L: leukocyte, M: microglia/macrophage, A: astrocyte, E: endothelium, O₂⁻: superoxide anion, N: neuron, HOCl: hypochlorous acid, H₂O₂: hydrogen peroxide

氧化酶产生了超氧化物,损伤了血管内皮细胞,从而造成抗凝活性的下降和血管通透性的亢进,进一步引起了脑的二次损伤。

再灌注时,处于上述的这种产生ROS的准备状态的神经细胞,被给予了大量的氧后,ROS爆发性地产生,这样就给线粒体,细胞质,细胞膜等中的各种蛋白质,膜脂质以及核酸带来直接的损伤。另外,在缺血性神经细胞损害中,兴奋性氨基酸谷氨酸的游离,以及随之而来的细胞内钙离子的上升也起到了中心的作用「谷氨酸-Ca假说」,这个钙离子的超负荷又通过线粒体, nNOS来诱导ROS的产生,反过来活性氧又增强了谷氨酸的毒性,就这样,进入了一个恶性循环(图3)。

另外,活性氧是一种细胞内的情报传递物质,对凋亡促进物质Bax和凋亡抑制物质Bcl2等的相互作用,以及对从线粒体游离出的细胞色素C对凋亡的诱导现象(图4),DNA修复酶,转录因子等介导的各种细胞应答现象的控制,都有很密切的关系,关于这一点,已经在转基因动物中得到了证明(图5)。还有,在脑的微小循环系中,活性氧能够诱导各种各样的细胞粘附因子(ICAM-1, P-, E-selectin等),细胞因子(IL-1, -6, -8, TNF-α等)的产生,引起微小血栓的形成,活性化白细胞的聚集浸润。

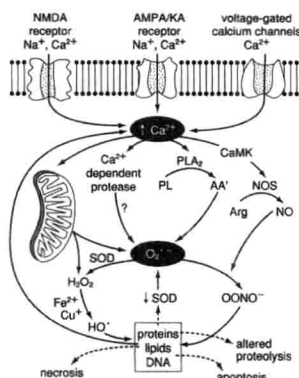


图3 缺血性神经细胞死亡的分子机制和「谷氨酸-Ca假说」,以及它同活性氧之间的关系

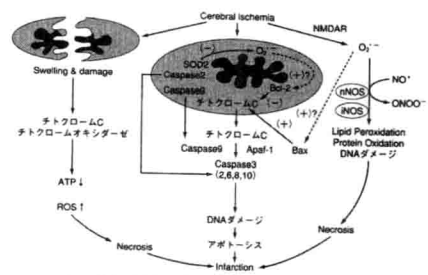


图4 脑缺血时作为氧化应激反应信号传导的细胞色素C

脑缺血再灌注时,引起线粒体内ROS的产生,进而引起和Bcl₂、Bax等的转位机制有关的细胞色素C的释出。一旦游离的细胞色素C和Araf-1结合,形成caspase 9复合物,就会使caspase 3及其它的caspase (2, 6, 8, 10) 活性化。另外, caspase 3分解了DNA修复酶,缺乏了核DNA修复机制,核DNA的损伤容易蓄积,引起凋亡(中央经路)。还有, NMDA受体(NMDAR)的活性化,就能通过活性酶及nNOS产生NO,不仅能直接促使细胞色素C从线粒体中游离出来,还能持续产生ONOO⁻,进一步通过羟自由基的生成,直接引起脂质,蛋白质, DNA等的损伤,导致细胞坏死(右侧经路)。缺血中心部处于严重缺血的时候,线粒体直接膨胀,受到损害,使ATP的产生受阻,ROS的产生亢进,最后,引起细胞的坏死(左侧经路)。

チトクロムC = 细胞色素C

チトクロムオキシダゼ = 细胞色素氧化酶

DNAダメージ = DNA 损害

アポトシス = 凋亡

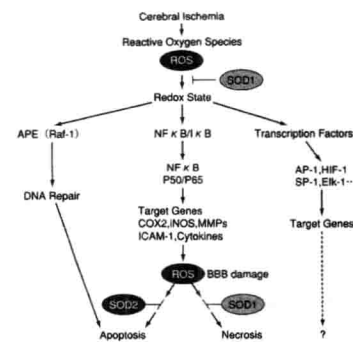


图5 由DNA修复系统和转录因子介导的氧化应激反应的信号传导[3]

缺血再灌注时,一旦产生了ROS,细胞的氧化还原状态发生变化,DNA修复酶APE/Raf-1和DNA修复机制的活性降低,引起凋亡(左侧经路)。另外,ROS通过转录因子NF-κB的活性化,诱导聚集了和

它有结合领域的各种细胞因子,如cyclooxygenase-2 (COX₂), inducible nitric oxide synthase (iNOS), matrix metalloproteinases (MMPs), intercellular adhesion molecules (ICAM-1) 等等,它们进一步产生ROS,通过损伤血脑屏障,引起凋亡或者坏死(中央经路)。还有,其他转录因子 AP-1, HIF-1 等通过未知的经路对缺血状态也起到一定的作用(右侧经路)。

作为脑保护药的自由基清除剂

在缺血性脑卒中的急性期的治疗中,在脑组织不可逆的损害之前,血栓溶解疗法等能够除去缺血本身

的治疗是最重要的。另一方面,由缺血所带来的脑组织损害的过程中,如上所述,我们已经详细解析了它的分子水平的过程,因此,也开发了有望能够阻止上述各个环节的脑神经细胞保护药。使用这些药物进行治疗被统称为脑保护疗法,和改善脑血流为目的的治疗相辅相成,我们期待着它能够把缺血性脑卒中的急性期治疗推上一个新的台阶。

其中,作为引起缺血性神经细胞坏死的中心机制,「谷氨酸-Ca假说」是最引起人们注意的,因此也开发了各种谷氨酸受体拮抗剂,以供临床试验用。但是,到目前为止,还没有被临床试验证明有效的谷氨酸受体拮抗剂(表3)。

表3 临床试验对各种脑保护剂的评价和结果[4]

药物的分类	药物名称	作用机制	临床试验结果
钠离子通道拮抗剂	Fosphenytoin	抑制兴奋性谷氨酸的释出	无效
钙离子通道拮抗剂	Nimodipine Flunarizine	抑制钙离子的内流	无效
谷氨酸拮抗剂 NMDA拮抗剂	Selfotel(CGS 19755)	竞争性抑制有害	有害
	Aptiganel (Cerestat)	离子通道拮抗剂	有害
	Dextrorphan	离子通道拮抗剂	停止开发
	Remacemide	离子通道拮抗剂	对若干的CP旁路有效
	Licostinel(ACEA 1021)	阻害甘氨酸结合位点	停止开发
	Gavestinel(GV 150526)	阻害甘氨酸结合位点	无效
	Eliprodil	阻害聚胺结合位点	停止开发
AMPA拮抗剂	MPQX (ZK-200775)		停止开发
作用于GABAA受体的药物	Clomethiazole	抑制自由基的损害	无效(事后分层次分析有一部分抑制)
自由基清除剂	Tirilazad	抑制兴奋性谷氨酸的释出	无效
	Ebselen (DR-3305)	抑制自由基的损害	有效
	Edaravone (MCI-186)	抑制自由基的损害	有效
	Nicaraven (AVS)	抑制自由基的损害	有效
NO抑制剂	Lubeluzole	抑制NO对细胞的损害	无效,停止开发(QT延长)
细胞膜作用剂	GMI-ganglioside	修复神经细胞膜?	无效
	Citicholine(CDP-choline)	修复神经细胞膜?	无效(一部分有效)
	Piracetam	修复神经及血液细胞的细胞膜?	无效(事后分层次分析对一部分有效)
抗炎症药	Enlimomab	抗ICAM抗体	有害(体温上升等)

在这种状态下,推测能够对脑缺血的级联反应和再灌注时的分子病理机制中的几个步骤发挥作用的自由基清除剂引起了人们的注意,事实上,目前的临床试验也已经证明了ebselen, edaravone, nicaraven等自由基清除剂确实有效。在这其中,具有抑制脂质过氧化和脂氧化酶活性的依达拉奉(edaravone)已经在2001年被认可,现在,作为脑梗塞急性期的世界上最初的脑保护剂被广泛使用着。另外,具有捕捉羟自由基作用的nicaraven虽然最早完成了第Ⅲ期临床试验,但现在还没有被认可,显示出谷胱甘肽过氧化物酶样强有力的抗氧化作用的ebselen也在进行第二次的Ⅲ期临床试验。随着国际上对自由基清除剂的兴趣越来越深,对它的开发也正在进行^[5, 6],今后有

望它能够得到更大的发展。

结束语

具有极度氧活性的大脑,是对血液循环的依赖性很高的脏器,同时又是富含容易受到ROS攻击的脂质的脏器。因此,可以推定脑的循环障碍和氧化应激反应是有极密切的关系的。但由于ROS是很难捕捉到的,再加上脑缺血病理的复杂性,实际的状况到目前为止还是一个谜。但是,随着各种ROS检出方法的进步,和研究中转基因动物的使用等,关于缺血的病理的实际情况也逐步明朗起来,自由基清除剂作为脑保护剂的临床意义也更加明确了。

文 献

- 1) 松本昌泰, 柳原武彦: カルシウム・フリーラジカルによる神経細胞死の機序. 神経細胞死制御, 医歯薬出版, 東京, 1998, pp 102-109
- 2) 大槻俊輔, 松本昌泰: 虚血性神経細胞死の機序. 医学のあゆみ 191: 639-645, 1999
- 3) Chan PH: Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. J Cereb Blood Flow Metab 21: 2-14, 2001
- 4) 松本昌泰, 堀 正二: 脳卒中急性期の治療の進歩: 脳保護療法の行方. Medico 31: 471-474, 2000

从实验及临床研究方面来看 自由基清除剂(Free radical scavenger)

池田幸穗 中岛·智 原岡襄

定义

所谓的自由基就是具有不成对电子的原子或分子,它的性质极其不稳定,很容易从其他物质处得到电子而发生反应。另外,即使不带有不成对的电子,也很容易变成自由基,或者说可以把容易产生自由基的物质都统称为活性氧类。最近人们逐渐认识到,自由基和头部外伤,脊髓损伤,脑缺血,脑血管痉挛等众多的神经疾患的病理有密切关系。从治疗的观点出发,需要把在基础研究中已被证明了的能够消除自由基的自由基清除剂的有效性,还原到临床应用中来。本文,将以蛛网膜下腔出血后产生的脑血管痉挛为中心阐述自由基清除剂的有效性和使用可能性。

自由基清除剂对脑血管痉挛的抑制效果

一在实验上的讨论

有报道称,氧合血红蛋白参与了蛛网膜下腔出血后的脑血管痉挛的产生。淤积在蛛网膜下腔中的血肿发生溶血后,即可产生氧合血红蛋白,氧合血红蛋白转化为高铁血红蛋白的同时,放出超氧化物,从而引起了以脂质过氧化为代表的自由基反应,继而引起了血管内皮细胞的损害,而这个血管内皮细胞的损害能够抑制脑血管平滑肌的舒张,由此导致了收缩能力的增强,形成脑血管痉挛。

依赖于铁离子限速产生的,能够抑制羟自由基生成的铁螯合剂(Fe^{2+} 螯合剂—去铁胺 deferoxamine, Fe^{3+} 螯合剂—2, 2'-联吡啶 2, 2'-dipyridyl), 氨基甾类 aminosteroid(甲磺酸替拉扎特 tirilazad mesylate), 对蛛网膜下腔出血模型中脑血管的痉挛的抑制是有意义的。另外, 对羟自由基清除剂 AVS (nicaraven) 对脑血管痉挛的作用效果进行了探讨。给予 AVS (nicaraven) 后, 能够抑制蛛网膜下腔出

血 48 小时后的脑底动脉的收缩,同时也显示出了对脑水肿的保护作用。值得指出的是,由于消除了羟自由基,进而可以防止脑血管痉挛,改善脑血流和脑代谢,抑制了自由基引发的炎症反应,最终达到脑保护的作用。在由羟自由基引发的一系列过程中,产生了单原子氧 (singlet oxygen), 而作为单原子氧清除剂的组氨酸 (histidine), 也会处处可见它对脑血管有抑制作用的使我们非常感兴趣的报道。

通过对遗传基因的分析,可以发现在小鼠的体内 CuZn-SOD (superoxide dismutase) 过剩,它对蛛网膜下腔出血后的脑血管痉挛的抑制作用很有意义,从而揭示了自由基参与本病的发生,而自由基清除剂对本病的治疗的有效性和可能性。

自由基清除剂对脑血管痉挛的抑制效果

一在临床上的讨论

MCI-186 (依达拉奉 edaravone)

作为在我国开发的,世界上最初的自由基清除剂,依达拉奉已经开始在临床上使用。目前,报道说它能改善脑梗塞急性期伴随的神经症状,日常生活活动障碍及机能障碍。从基础方面讨论,它具有抗脂质过氧化作用,脑水肿的抑制作用,以及迟发性神经细胞坏死的抑制作用,另外,它还对蛛网膜下腔出血模型中出现的脑血管痉挛具有抑制作用。因而,我们期待着依达拉奉的适应症能扩大到对蛛网膜下腔出血和头部外伤等的治疗。值得指出的是,最近发现它对高龄患者的肾脏具有损害作用。

AVS (nicaraven)

AVS 同 MCI-186 一样,是低分子水溶性的羟自由基清除剂。最近进行的针对于蛛网膜下腔出血后的

脑血管痉挛的第三期双盲的临床试验中,它使由脑血管痉挛引起的神经症状的发生率减少了大约35%,而对于发生神经症状的人群,在一个月后,机能改善良好的大幅增加。没有发生严重的副作用。现在,该药正在申请进行中。

DR-3305 (ebselen)

DR-3305 (ebselen) 是含有硒的脂溶性很高的自由基消除剂,具有谷胱甘肽过氧化物酶样作用,脂氧化酶阻碍作用, NADPH 氧化酶的阻碍作用,白细胞的凝集、粘附作用,还有对自由基的生成的抑制作用及消除作用。对蛛网膜下腔出血发生的迟发性神经脱落症状进行了临床试验。研究了 Hunt & Hess grade II ~ IV, 且在出血 96 小时以内有开始给药可能的 286 例病例。虽然迟发性神经脱落症状的发现率没有差异,但症状有所减轻,而且,关于一个月以后的 GOS, 给药人群有了明显改善。

Aminosteroid (U 74006 F)

Aminosteroid (U 74006 F) 和 DR-3305 (ebselen) 一样,是脂溶性的抗氧化剂,能消除生物膜以及细胞质中的自由基。本药只对男性有良好的脑血管痉挛预防效果。因为在构造上具有类固醇骨架,所以在疗效上可能会产生性别差异。

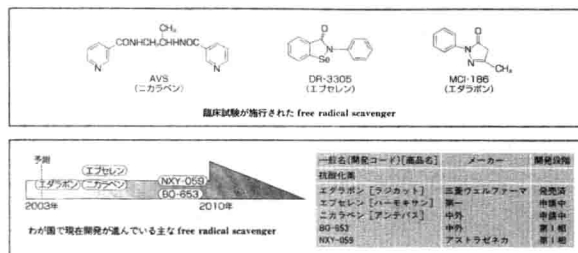
エダラボン[ラジカット]=MCI-186(edaravone 依达拉奉)

エダラボン[ラジカット]=MCI-186(edaravone 依达拉奉)

エブセレン[ハーモキサン]= DR-3305 (ebselen)

ニカラベン[アンテバス]= AVS (nicaraven)

メーカー=生産商



現在和将来

虽然说对蛛网膜下腔出血后引起的脑血管痉挛的各种治疗方法,可以使由脑血管痉挛引起的迟发性神经脱落症状的发生频率减少,这一点在临床上也是深有感触的,但左右预后的因子不变。对脑梗塞而言,自由基消除剂在临床上的具体使用意义极大。但是,目前,还没有适用于蛛网膜下腔出血后的脑血管痉挛。今后,数年以内,自由基消除剂有望相继登场(图)。我们期待着以自由基引起的蛛网膜下腔出血,脑血管痉挛的病理为目标的自由基消除剂疗法的出现,希望它能够突破现有的治疗法及治疗药物的界限,成为新的潜在的治疗药物。

文 献

- Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 1990; 27: 1-11.
- 浅野孝雄. 特集/脳血管障害の病態と治療. 3. 薬物による治療. *脳神経* 2000; 52: 473-85.
- 池田幸徳, 松本 清. 特集/脳保護療法. フリーラジカルスカベンジャー. *分子脳血管病* 2002; 1: 133-40.
- Asano T, Takakura K, Sano K, et al. Effects of a hydroxyl radical scavenger on delayed ischemic neurological deficits following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a multicenter, placebo-controlled double-blind trial. *J Neurosurg* 1996; 84: 792-803.
- Salto I, Asano T, Sano K, et al. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 1998; 42: 269-77.

抗氧化剂在急性脑损伤中的治疗作用

Yossi Gilgun-Sherki, Ziv Rosenbaum

Eldad Melamed, Daniel Offen

【摘要】 自由基的产生和清除失衡会导致氧化应激，其在急性脑损伤的发生中占有重要地位。急性脑血管疾病和脑外伤后，自由基的生成显著增加，并通过细胞内不同的分子机制导致神经元的损伤。自由基能破坏脂质、蛋白质、核酸，引起继发性坏死或凋亡，伴发的组织抗氧化能力减弱可加重组织损伤。此外，急性脑损伤后兴奋性氨基酸（如谷氨酸）水平的升高也能导致氧化应激，破坏脑实质结构。因此，使用抗氧化剂治疗能阻止组织损伤的扩散，提高存活率，改善预后。已有一些相关药物用于急性脑损伤的研究，在动物实验和部分小型临床试验中显示了一定的疗效，但尚未进行大规模的临床试验。进一步了解急性脑损伤的病理生理学机制，有助于明确药物干预的最佳靶点。目前，对抗氧化剂的研究主要集中在改进其特异性，增加其血脑屏障通透性，寻求最佳剂量及给药“时间窗”，针对不同损伤靶点药物的联合应用等方面。

第一部分 简介

1、急性中枢神经系统损伤的机制

卒中是由于脑内血液循环异常导致的急性脑功能障碍。急性卒中分为缺血性卒中（占80%，分为颅内血栓形成和脑栓塞）和出血性卒中（占20%，分为颅内出血和蛛网膜下腔出血SAH）。

卒中是欧美国家第三大死因，也是中老年人中的常见病、多发病。其损伤主要是缺血缺氧所致，造成中心的缺血区和缺血周边的半暗带。在缺血半暗带，神经细胞和胶质细胞的功能已有异常。由于神经元的代谢依赖于葡萄糖的氧化作用，因此对缺氧非常敏感。急性神经系统损伤的病理生理机制极为复杂，包括血脑屏障通透性异常、能量障碍、内环境失衡、酸中毒、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸毒性和自由基介导的毒性，不仅可以导致缺血区的细胞坏死，也可引起细胞凋亡。

2、活性氧的产生和氧化应激

自由基是指具有一个未配对电子的原子或原子团的总称。最常见的细胞内自由基是超氧阴离子（ O_2^- ），大量的 O_2^- 又可生成过氧化氢（ H_2O_2 ）和羟自由基

（ $OH\cdot$ ），它们都属于活性氧簇（ROS），能在细胞内发生氧化反应。细胞膜由多不饱和脂肪酸构成，很容易受到自由基的攻击。自由基也能破坏蛋白质和核酸，引起细胞坏死或凋亡。正常情况下，细胞有一系列防止自由基损伤的机制，若自由基大量产生超过其清除能力或机体清除自由基的能力受损，就会出现自由基超载。这种自由基产生和清除能力的失衡称作氧化应激（OS），是引起神经元损伤的主要机制之一。

2.1 氧化应激介导的脑损伤

在急性脑损伤的发病机制中，氧自由基的产生与疾病的进展互为因果。 H_2O_2 是脑内一些酶促反应的产物。这些反应能引起花生四烯酸的释放，后者在脂肪加氧化物酶和环氧化物酶的作用下生成二十烷二酸，该过程中会生成 O 。一些内源性物质（如维生素C、儿茶酚胺类）的自动氧化也会产生大量的 H_2O_2 。因此，ROS是目前脑损伤发病机制中研究的一个热点，而且可能会成为治疗脑损伤的靶点之一。

自由基在缺血再灌注损伤的发病机制中占有非常重要的地位。再灌注阶段，自由基能与 $NO\cdot$ 反应生成过氧亚硝酸盐，表明自由基及其相关的氧化应激在TIA和缺血半暗带的病变中有重要作用。研究发现在

急性单侧缺血性卒中的患者中,红细胞内丙二醛的水平在第1~7天显著高于对照组;超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶的活性明显低于对照组,并且与脑梗塞的直径、卒中严重程度以及近期不良预后相关。故给予自由基清除剂和抗氧化剂是一种可行的治疗卒中和CNS创伤的方案。

2.2 兴奋性毒性

急性脑损伤的另一个重要机制为细胞外谷氨酸的堆积。谷氨酸是CNS内的兴奋性氨基酸,通过其亲离子受体发生作用。这些受体有不同的药理学和电生理学特点:2-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑-丙酸,红藻氨酸,和N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体。受体激活引起去极化,使神经的兴奋性增高。如果受体过度兴奋,或反应时间延长,将导致靶神经元的损伤和死亡。缺血后细胞外谷氨酸水平升高,再灌注后水平减低。细胞外谷氨酸水平的升高是谷氨酸外流增加和再摄取减少的结果。另外,由于大脑不合成也不储存任何能量物质,所以脑血流的改变能导致迅速且不可逆的能量衰竭和ATP水平的降低,从而导致细胞外谷氨酸水平升高。但是,目前并没有证据表明谷氨酸的释放和神经元的损伤有直接关系。动物和临床药理学试验的研究表明,在缺血和创伤发生后,细胞外谷氨酸水平能升高至引起神经元损伤的水平。另外,NMDA阻断剂在加入神经元培养基后,能减轻谷氨酸受体激动剂对神经元的毒性作用。通过阻断突触前谷氨酸的释放和阻断突触后膜的兴奋,都能起到神经保护作用。所以,电压敏感性钙通道和谷氨酸受体是治疗急性脑损伤的靶点之一。

2.3 氧化应激和兴奋性毒性

众所周知,EAA和神经递质是脑内代谢产生氧化应激的物质。ROS(主要是 O_2 和 $NO\cdot$)和EAA(谷氨酸)在神经损伤的发生中有协同作用。但其具体环节尚不清楚,兴奋性的提高会刺激产生ROS,而ROS的产生又能促进EAA的释放,提示这是一个双向的连锁关系。短暂的缺血后脑内EAA和羟自由基水平都升高。急性脑损伤后引起的低氧会导致能量供应减少,这会使谷氨酸再摄取系统出现异常。细胞外谷氨酸水平升高,神经元过度兴奋,导致轴突膜电位降低,钙内流介导的神经递质释放增加。再灌注后神经元的葡萄糖和氧水平快速回升,破坏了线粒体的功能,导致ROS生成增多。细胞内钙水平增高后,激活磷脂酶,导致ROS进一步增多,形成恶性循环。这

就是ROS清除剂和钙离子通道阻滞剂保护缺血后神经元损伤的机制。 NO 在缺血缺氧后神经元损伤中的作用尚不清楚。钙离子内流会激活 NO 合成酶,使细胞内 NO 含量增多。 NO 能与过氧化物等自由基作用,形成活性更强的硝自由基,有很强的细胞毒性作用。但是,有些研究结果与此相反,认为 NO 有神经保护作用,能减少过氧化氢引起的细胞毒性。 NO 的作用依赖于组织内特定的ROS类型。综上所述,减轻细胞的兴奋性毒性,既可通过EAA拮抗剂实现,又可通过抑制ROS的产生(如 O_2 和 $NO\cdot$)达到。因此,抑制ROS产生的酶(如 NO 合成酶、黄嘌呤氧化酶)和ROS清除剂均有治疗作用。

2.4 氧化应激后基因表达异常

ROS能影响基因的表达,在神经元的死亡中有重要作用。全脑缺血时,氧化反应转录因子,核因子- kB (NF- kB)被持续激活,但是在不同的细胞内其作用不同。神经元中NF- kB 的激活能诱导抗凋亡基因和蛋白质的产生,调节突触的可塑性,延长卒中后的生存时间。胶质细胞中NF- kB 的活化会产生炎症细胞因子、神经毒性ROS,加速缺血性神经元的退行性变。NF- kB 与核受体结合后,能激活许多可诱导基因,这些基因的表达会促进ROS的形成,血脑屏障的破坏,导致细胞坏死和/或凋亡。除了NF- kB ,还有许多转录因子(如AP-1, HIF-1, SP-1,和EIK-1)是氧化还原敏感蛋白,OS也能调节这些蛋白的基因表达。

3、血脑屏障完整性

血脑屏障能将脑的微环境和血液隔离,保证复杂的神经功能不受外环境的影响。超微结构研究发现,与外周内皮细胞的结构相比,脑内皮细胞有两个明显特点:(1)胞饮囊泡很少,减少了经细胞的物质流动;(2)细胞间连接紧密,有拉链样结构,减少了经细胞间隙物质的流动。正常情况下,血脑屏障的紧密连接允许小分子水溶性物质经水通道进入,而细胞膜表面允许脂溶性物质通过。在闭合性脑外伤和SAH后,血脑屏障的通透性发生改变,药物穿透力增强。但在脑缺血时,血脑屏障完整性较好,药物进入脑内比较困难,但是如果给予渗透性高的药物(甘露醇、阿卡波糖等)可以使血脑屏障短暂性开放。

第二部分 抗氧化剂对急性脑损伤的治疗作用

1、抗氧化剂

抗氧化剂是通过清除ROS的前体抑制ROS的生成,或与金属离子(金属离子为催化ROS生成所必需)结合等发挥抗氧化作用。可分为两类:(1)酶类:包括SOD、过氧化氢酶、过氧化物酶和其它酶类。(2)低分子抗氧化剂(LMWA)类:又分为直接和间接作用的抗氧化剂,前者包括自由基清除剂和阻断反应链的抗氧化剂,在拮抗OS中有重要作用,主要是从食物中提取得到;后者包括金属螯合剂,神经细胞自身能合成少量,如谷胱甘肽和NADPH。抗氧化剂在体内的分布较有特点,如水溶性较好的VitC在脑内浓度较高,而VitE在脑内的分布与其它组织接近,过氧化氢酶在脑内的含量低于其它组织。

2、急性脑损伤治疗的基础和临床研究

为了保证疗效,药物必须要有良好的通透性,并且能在有效的治疗“时间窗”内给予。在大鼠和猫的缺血模型中,3~4小时内给药,能显著减小梗塞面积;在灵长类动物中为6~8小时。动物实验证明,局灶性脑缺血后数分钟内即可发生不可逆的脑损伤,在6小时内达到高峰。一些前期临床试验结果表明,只有卒中后在4~6小时内给予神经保护剂,才能减少神经细胞的损伤。

常见的抗氧化剂: (1) **维生素类:** 流行病学调查发现食用蔬菜和水果能显著降低脑缺血的发生。其机制不明,已知VitC, VitE和 β -胡萝卜素是自由基清除剂,能降低卒中的发生。目前尚缺乏维生素治疗急性卒中的临床资料。我们认为,只有在特定的时间窗给予特定剂量的维生素,才能减少卒中的并发症。(2) **辅酶 Q₁₀(泛醌):** 位于线粒体内膜脂质双层的疏水核团中,是可移动的脂溶性复合物,在电子转移链中有重要作用。辅酶Q₁₀也是脂膜重要的抗氧化剂,直接或通过生成VitE发挥作用。(3) **褪黑激素:** 是由松果体分泌的吲哚胺2,3-双加氧酶,结构近似5-羟色胺,有多种生物学作用。亲脂性好,易通过血脑屏障。动物实验表明褪黑激素对与老化和年龄相关的疾病有影响,这与它作为一种自由基清除剂有关。(4) **2-硫辛酸:** 是从食物中摄取的一种低分子抗氧化剂,能通过血脑屏障,清除羟自由基,单线态氧和NO,另外,能螯合一些金属离子,参与其它抗氧化剂的循环(如VitC、VitE),增加细胞内谷胱甘肽的水平,调节转录因子(特别是NF-kB)的活性。(5) **依布罗啉:** 谷胱甘肽过氧化物酶是脑内的过氧化氢和

其它过氧化物的主要代谢酶,分为硒依赖型和非硒依赖型。依布罗啉属于前者。(6) **SOD或SOD样分子:** 能氧化过氧化氢,是抗氧化的重要物质。在人体共有三种异构体: Cu/Zn SOD-1, 位于胞浆中; Mn SOD-2, 位于线粒体; Cu/Zn SOD-3, 位于细胞外间质。(7) **旋转型自由基清除剂:** 能捕捉高反应性的不稳定自由基,过去常用于电子磁性的研究,通常包含有硝基。病理学研究发现,它与梗塞后再灌注引起的损伤、物理创伤和年龄引起的脑损伤有关。(8) **N-乙酰半胱氨酸(NAC):** 是含有巯醇基的化合物,能有效的清除自由基,但是不能在体内合成;而外源性的NAC难以穿透血脑屏障。这些特点限制了NAC治疗的效果。(9) **谷胱甘肽:** 体内分布广泛,由三种氨基酸(谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸)在两种ATP依赖酶作用下合成,也能由NAC通过代谢合成。细胞内抗氧化作用主要与其巯基有关。巯基是谷胱甘肽过氧化物酶和转移酶与过氧化物、电子毒物作用的底物。(10) **金属离子螯合物:** 游离的金属离子与各种神经退行性疾病的发生有关,因此能与金属离子结合的蛋白质就具有抗氧化作用。这些蛋白包括: 转铁蛋白、铜蓝蛋白、血红素结合蛋白。(11) **尿酸:** 尿酸是黄嘌呤氧化酶的代谢产物,在体内分布广泛。在正常人,尿酸盐占血浆抗氧化物的60%。它能与10%~15%的羟自由基反应,有效的清除过氧基和单线态氧,还能与铁离子结合,并间接的稳定血浆中的VitC。但是Benzie和Strain认为高浓度的尿酸是促氧化剂,高尿酸血症能诱发与氧化应激相关的功能异常。(12) **肌酸:** 是内源性的三肽,由甘氨酸、蛋氨酸、精氨酸在肝脏、肾脏和胰代谢产生,在脑组织和肌肉组织中均有。最近的研究发现,肌酸能减轻缺血和氧化应激引起的神经毒性。(13) **拉扎碱类:** 源于糖皮质类固醇的21-氨基类固醇,但无糖皮质激素和盐皮质激素活性。它能清除脂质过氧化自由基,抑制离子依赖性的脂质过氧化。(14) **Nicaraven:** 在大鼠SAH模型中, nicaraven作为自由基清除剂,能防止血管痉挛,保护神经细胞,改善脑血流和大脑对糖的利用。(15) **其它抗氧化剂:** MCI-186是一种新型自由基清除剂,能抑制非酶作用的脂质过氧化和氧化作用。MCI-186(3mg/kg, 静脉滴注)能显著减轻大脑中动脉闭塞和再灌注引起的缺血性和缺血后的脑水肿。

第三部分 结论和展望

越来越多的研究表明:氧化应激在急性脑损伤中占有极为重要地位。环境和基因的共同作用使得内源性抗氧化剂防御系统功能减弱。因此,开发有效的抗氧化剂已成为治疗急性脑损伤的重要方向之一。现在已开发出许多化学药物试图用于临床治疗(表1)。尽管一些抗氧化剂在动物模型中有效,但在临床试验中疗效有限。时间窗也是治疗中的一个重要问题,抗氧化剂必需在卒中发生后,神经元发生不可逆坏死前给予,其疗效与ROS的类型、合成的部位及病变部位有关,并且要有良好的血脑屏障穿透力,能在脑内达到治疗水平。部分抗氧化剂在临床试验中的失败可能

归因于对“时间窗”的把握不及时、药物剂量偏低、靶点药物水平偏低或药物作用机制和病理机制不吻合(表2)。抗氧化剂通过不同的机制保护核酸、蛋白质和脂质免受自由基的损伤,一些复合物在体内有特定的位点。因此,联合使用抗氧化剂及与其它药物(如钙离子拮抗剂、谷氨酸拮抗剂或抗凋亡药物)联用将会收到更好的疗效。进一步研究急性脑损伤的发病机制,改进抗氧化剂药物的分子结构,将会使其有更为广阔的应用前景。

表1 目前用于急性脑损伤的抗氧化剂和自由基清除剂

1. 内源性酶(如SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶样分子(依布硒林)
2. 内源性抗氧化剂(从食物中也可得到)如: VitE、VitC、 β -胡萝卜素
3. 其它内源性抗氧化剂如尿酸、谷胱甘肽、谷胱甘肽前体NAC、褪黑素、肌酸
4. 内源性抗氧化辅因子: 辅酶Q10
5. 金属离子螯合剂: 如去铁胺、甲磺酸去铁胺; 自由基清除剂: 如PBN和脂肪酸
6. 植物源性药物: 如黄烷类
7. 合成的自由基清除剂: Iazaroids 和 pyrrolopyrimidines
8. 其它复合物: MCI-186(依达拉奉)、聚胺

表2 抗氧化剂临床疗效不佳的可能原因

1. 目前研究药物治疗缺血后脑损伤机制的模型不恰当
2. 动物实验模型与人类疾病的发生有所不同
3. 在动物模型中有神经保护作用的药物对于人类的治疗无效
4. 能作用于某一通路的神经保护药物并不能阻断导致神经损伤的其它通路
5. 神经损伤包括多条通路, 单一药物的使用可能会错过最佳的治疗“时间窗”
6. 抗氧化剂的治疗剂量很窄, 过量后可能成为氧化自由基的前体, 对神经元产生毒性
7. 循环不足, 不能将药物送到靶部位, 并达到治疗水平
8. 穿透力欠佳, 不能通过完整的血脑屏障, 使缺血区血药浓度低于治疗水平
9. 在不同的临床试验中受试者的种族、年龄、环境、饮食背景有所不同
10. 药物的来源影响试验结果
11. 卒中后病灶大小的差异, 不同的神经功能缺损, 使结果难以统计

通过抑制短暂性脑缺血时羟自由基的增加阻止迟发性神经元死亡

Toshihiro Yamamoto, Satoshi Yuki, Toshiaki Watanabe,
Masayuki Mitsuka, Ken-Ichi Saito, Kyuya Kogure.

【摘要】采用水杨酸盐捕捉法测定稳态加合物二羟基苯甲酸(DHBA),观察羟自由基的变化。脑缺血十分钟后的再灌注导致大鼠海马区灌注液中 DHBA 的增加;使用自由基清除剂 MCI-186(3-甲基-1-苯基-2-吡啶-5-酮,依达拉奉)对脑缺血再灌注进行治疗后,可明显抑制海马 CA1 区 DHBA 的增加,阻止迟发性神经元的死亡。

【关键词】脑缺血;迟发性神经元死亡;羟自由基;MCI-186;自由基清除剂;大鼠海马

已有研究证实,自由基清除剂和超氧化物歧化酶对包括迟发性神经元死亡在内的脑缺血损伤有神经保护作用,这表明氧自由基在缺血/再灌注诱导的脑损伤中起着一定的作用。

随着近些年来电子自旋捕捉、电子自旋共振技术和大脑微透析技术的发展,已明确了体内自由基在大脑细胞外液中的存在形式。此外,利用带电化学检测器的 HPLC 对水杨酸盐的非酶促羟基化进行检测,证实了体内高毒性羟自由基的生成。这些研究结果表明,由氧衍生的自由基在再灌注时诱导的迟发性神经元死亡中可能起着关键性的作用。

MCI-186 是一种新型的自由基清除剂,能够直接捕捉各种自由基,具有强力的自由基猝灭作用。为了评价其在大鼠海马缺血/再灌注损伤中是否具有减少羟自由基生成、降低迟发性神经元死亡的作用而进行了本研究。

选用成年 Wistar 大鼠,雄性,体重 270-310 克,采用 Pulsinelli 和 Brierley 的四血管闭塞法制作全脑缺血模型。第一天,戊巴比妥钠(55-60mg/kg,腹腔注射)麻醉下,分离两侧颈总动脉,用丝线宽松缠绕,将动物的头部放入立体定位架上,将 CMA/12 型微透析探针(针尖长 2mm,直径 500 μ m)植入左侧海马,定位标志为前囟前(AP)-3.3mm,中线旁开(ML)+2.0mm,自颅骨表面的深度(DV)为-3.

4mm。两根电极置于额顶部皮层,连接脑电图记录仪。第二天,三氟溴氯乙烷麻醉下,用电烙术阻断双侧椎动脉。第三天,三氟溴氯乙烷麻醉下,一侧股静脉留置导管注射药物。动脉瘤夹夹闭双侧颈动脉形成脑缺血,脑电图轨迹迅速平坦则证明脑缺血诱导成功。维持缺血状态 10 分钟,松开动脉瘤夹,通畅颈动脉血流,恢复脑血循环。MCI-186(1 或 3mg/kg,溶于生理盐水)或生理盐水在再灌注后立即静注。实验过程中,加热灯维持大鼠直肠温度于 36.5-37.5 $^{\circ}$ C。

脑缺血开始前 70min 启动微透析,流速 2.1 μ l/min,透析液由水杨酸钠溶液和林格氏液组成(pH7.4;含 147mM NaCl,4mM KCl,2.3mM CaCl_2),CMA/100 型微量注射泵输入。前 30min 灌注液样本弃用,收集缺血开始前 40min 到再灌注发生后 120min 的灌注液,每 20 分钟一次,缺血期间为每 10 分钟一次。收集好后立即用液氮保存至 -80 $^{\circ}$ C。直到 HPLC 分析时再溶解加载。水杨酸转化为 2,3-邻苯二酚-苯甲酸(2,3-DHBA)的非酶促羟化反应中,2,3-DHBA 是羟自由基侵袭力的可靠指标,可以通过 HPLC 定量测定(该 HPLC 带有两个电化学检测器,频道 1 为 200mV,频道 2 为 680mV)。将缺血开始前所测的两组灌注液中 2,3-DHBA 浓度的均值作为基础值。

病理学组织检查中,第三天微透析探针和电极的

植入、股静脉插管和三氟溴氯乙烷麻醉等步骤均被省略。对有害刺激无反应和正常生理反应消失等脑缺血的症状是用肉眼观察得到，而非脑电图记录仪。再灌注3天后，肝素化生理盐水经心脏对大脑进行灌注，然后在戊巴比妥麻醉下，用甲醛/乙酸/甲醇(1: 1: 8)对鼠脑进行灌注固定；取材，脱水，石蜡包埋；大

脑切片，厚5mm，苏木精和伊红染色。光学显微镜下计数海马CA1区锥体细胞层中每1mm长度中的神经元数量（神经元浓度）。采用单因素方差分析(ANOVA)及Dunnett's检验进行统计学分析。

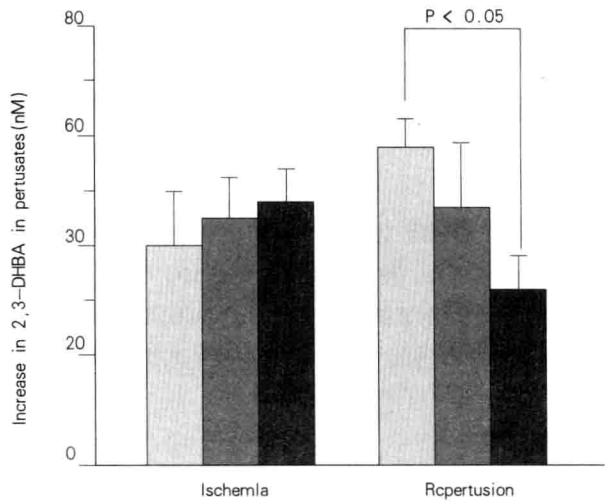


图.1 大鼠海马灌注液中2,3-二羟苯甲酸在10分钟缺血期(左)和20分钟缺血再灌注后(右)的改变。生理盐水(对照，空白柱)，1mg/kg剂量MCI-186(阴影线柱)或3mg/kg剂量MCI-186(黑色柱)均在缺血再灌注后立即予以静注。较2,3-二羟苯甲酸浓度基值增加的数值表示成6只动物的均值±标准差的形式。

表1 MCI-186对经过10分钟缺血和3天缺血再灌注的大鼠的海马CA1区神经元死亡的抑制作用

治疗	剂量 (mg/kg, 静注)	n	神经元密度 (数目/mm)
伪手术组		7	164 ± 20 ^a
对照组		7	46 ± 20
MCI-186	1	8	77 ± 17
MCI-186	3	8	117 ± 25 ^a

MCI-186或生理盐水（对照）在再灌注后立即予以静注。数值表示伪均值±标准差形式。

^a 与对照组相比P<0.05

我们研究了MCI-186对大脑缺血所诱导的羟自由基的影响。缺血前，2,3-DHBA的基值在对照组、MCI-186剂量为1mg/kg组和3mg/kg组中分别为41.9 ± 7.3nM，32.1 ± 15.8nM和37.4 ± 9.6nM，无差异性差异。图1显示了2,3-DHBA的浓度在缺血期和再灌注后较基础值增加的部分。在对照组中，2,3-DHBA的浓度在缺血期较基础值增加了93%；

在缺血再灌注后的第一个20min则达到134%(P<0.05)；而在再灌注40min后，其浓度迅速恢复到与基础值相当的水平(数据未在图中表示)。三组间，缺血期2,3-DHBA的浓度增加并无显著性的差异(图1左)；缺血再灌注后给予3mg/kg的MCI-186可使缺血再灌注期的第一个20min内2,3-DHBA浓度较对照组下降44%(图1右，P<0.05)；缺血再灌注40分