

W1302对大鼠急性缺血性脑卒中模型脑保护作用研究

徐少锋, 李江, 蔡杰, 冯楠, 张咪, 王玲, 王伟平, 黄海洪,
王琰, 王晓良*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 硝酸2-(4-甲基噻唑-5-基)乙酯盐酸盐(W1302)是含硝基的氯美噻唑衍生物,它是一种既有一氧化碳(carbon monoxide, NO)供体又具有弱 γ -氨基丁酸A型(γ -aminobutyric acid type A, GABA_A)受体的变构调节激动作用的新型脑保护剂。当前研究采用大脑中动脉缺血再灌注(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)脑损伤大鼠模型,评价W1302对缺血性脑卒中的治疗作用,并探索其潜在的作用机制。本实验经过中国医学科学院药物研究所实验动物管理和使用委员会的审查批准(伦理审查表号No. 620、632、5013)。研究结果显示:灌胃给予1、3、10 mg·kg⁻¹剂量的W1302,可显著减少缺血2 h再灌24 h大鼠脑梗死体积,且疗效优于200 mg·kg⁻¹丁基苯酚;显著增加血液和脑组织中NO水平,提高再灌后脑血流量和脑内三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)含量;明显抑制脑组织炎症因子包括肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的表达;抗脑缺血时间窗可达缺血后120~180 min。这些研究结果证明,W1302可通过增加NO释放,扩张血管、增加脑血流量,改善脑组织能量供应,升高ATP水平,抑制神经炎症,发挥其对tMCAO脑卒中模型大鼠的保护作用,从而为W1302治疗缺血性脑卒中的临床应用提供理论支持。

关键词: 脑卒中; 硝酸2-(4-甲基噻唑-5-基)乙酯盐酸盐; 一氧化氮供体; GABA_A受体激动剂; 神经炎症

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)09-2539-06

The neuroprotective effect of W1302 on acute ischemic stroke in rats

XU Shao-feng, LI Jiang, CAI Jie, FENG Nan, ZHANG Mi, WANG Ling, WANG Wei-ping,
HUANG Hai-hong, WANG Yan, WANG Xiao-liang*

(Institute of Material Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: 2-(4-Methylthiazol-5-yl) ethyl nitrate hydrochloride (W1302) is a nitro containing derivative of clomethiazole, which is a novel neuroprotective agent with both carbon monoxide (NO) donor and weak γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor allosteric regulatory excitatory effect. The current study used a rat model of transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) brain injury to evaluate the therapeutic effect of W1302 on ischemic stroke and explore its potential mechanisms of action. This experiment has been reviewed and approved by the Laboratory Animal Management and Use Committee of the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences (ethical review forms No. 620, 632, 5013). The results showed that gavage administration of 1, 3, and 10 mg·kg⁻¹ of W1302 can significantly reduce the volume of cerebral infarction in rats with ischemia for 2 h and reperfusion for 24 h, and the therapeutic effect was better than that of 200 mg·kg⁻¹ of *DL*-3*n*-butylphthalide. W1302 significantly increased NO levels in blood and brain tissue. It increased cerebral blood flow and brain adenosine triphosphate (ATP) content after reperfusion, as well as, inhibited the expressions of inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in brain tissue. The time

收稿日期: 2024-04-15; 修回日期: 2024-06-26.

基金项目: 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室(BZ0150).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165330, E-mail: wangxl@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0368

window of W1302 was between 120–180 min after ischemia. These research results demonstrated that W1302 could increase NO release, dilate blood vessels, and increase cerebral blood flow, improve energy supply to brain tissue and increase ATP levels, and inhibit neuro-inflammation, which playing the protective roles in tMCAO stroke model rats. This provides theoretical support for the clinical application of W1302 in the treatment of ischemic stroke.

Key words: stroke; 2-(4-methylthiazol-5-yl) ethyl nitrate hydrochloride; nitric oxide donor; γ -aminobutyric acid type A receptors agonist; neuro-inflammation

脑血管病是危害人类生命和健康的常见疾病, 具有高致死率和高致残率的特点^[1]。在我国, 脑血管病患者死亡率占总死亡率的 22.45%, 已跃居死因顺位之首^[2]。近年来, 脑血管病死亡率随着我国人口老龄化程度的不断加深, 呈现较快的增长趋势。缺血性脑卒中通常是由大脑中动脉或前动脉阻塞引起神经损伤的严重脑血管疾病^[3]。大脑中动脉栓塞致缺血再灌注脑损伤大鼠模型能高度模拟人类脑卒中发病机制, 被广泛用于评价缺血性脑卒中神经保护药物^[4,5]。

一氧化碳 (carbon monoxide, NO) 供体以及神经炎症抑制剂在治疗脑血管疾病和神经退行性疾病中的作用已被广泛报道。近年来, γ -氨基丁酸 A 型 (γ -aminobutyric acid type A, GABA_A) 受体激动剂作为一种新的治疗策略, 在脑保护方面也逐渐被认识^[6]。GABA_A 受体激动剂通过抑制过度的兴奋性氨基酸毒性, 重建神经递质传递系统的平衡发挥脑保护作用^[7,8]。氯美噻唑 (clomethiazole, CMZ) 为 GABA_A 受体激动剂, 已在临床中应用, 具有镇静、催眠、抗惊厥作用。此外, CMZ 被证明也具有神经保护作用, 发挥抗氧化应激、炎症抑制、改善线粒体功能障碍和抑制兴奋性等作用^[6]。前期的研究证实, CMZ 在大鼠局灶性脑缺血模型和非人灵长类局灶性脑缺血动物中均表现出明显的神经保护作用^[9]。然而, 在 III 期临床研究中, CMZ 未表现出脑卒中的明显改善作用而终止试验^[10]。

硝酸 2-(4-甲基噻唑-5-基) 乙酯盐酸盐 (W1302) 是 CMZ 的衍生物, 由本研究团队对 CMZ 进行结构改造获得的新化合物, 其药理作用在保留 CMZ 原有药理活性的基础上, 引入 NO 供体扩张脑血管, 改善缺血部位的脑血流量不足, 并保留了 GABA_A 受体的变构调节作用, 成为具有 NO 释放、神经炎症抑制、抑制过度兴奋的新型脑保护候选药物。W1302 已获得治疗血管性痴呆的临床试验许可, 正在开展 I 期临床试验。

本实验采用大脑中动脉线栓法诱导暂时性局灶性脑缺血再灌注损伤模型 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO), 评价 W1302 治疗急性脑缺血的作用, 并探讨了 W1302 对脑卒中保护的作用机制, 为 W1302 临床试验提供理论支持。

材料与方法

实验动物 本实验所用动物及相关处置符合动物福利的要求, 经过中国医学科学院药物研究所实验动物管理和使用委员会 (IACUC) 的审查批准 (伦理审查表号 620、632、5013)。

W1302 灌胃给药的药效学研究使用 SD 大鼠, 体重 260~300 g, SPF 级, 由维通利华实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001 和 SCXK (京) 2016-0011。实验动物饲养于中国医学科学院药物研究所动物屏障环境设施, 室温 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%。最小换气次数每小时 15 次, 光照明: 暗=12 h: 12 h。整个饲养过程中保持动物饮食活动自由。手术前后单独饲养, 室温保持 23~25 °C, 自由进食和饮水。

主要药品、试剂 W1302 由中国医学科学院药物研究所合成室提供, 纯度大于 99%, 批号 DP-0561-20160602, 临用前配制。丁基苯酞 (*DL*-NBP, 批号: 11110651, 石药集团), 溶解于植物油, 临用前配制。氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 购自 Sigma 公司。异氟烷购自河北一品制药有限公司, 常温保存。

一氧化碳检测试剂盒 (NO, 货号: S0024) 和三磷酸腺苷检测试剂盒 (adenosine triphosphate, ATP, 货号: S0027) 购于上海碧云天生物科技有限公司。大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 酶联免疫试剂盒 (G11031062)、大鼠诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 酶联免疫试剂盒 (H160310633)、大鼠白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 酶联免疫试剂盒 (G25031064) 购于 CUSABIO 武汉华美公司。蛋白质定量试剂盒 (bicinchoninic acid, BCA 法, 货号 P1511) 购于北京普利莱基因技术有限公司。

主要仪器 照相机 (日本佳能 EOS 550D 型); 全波长酶标仪 (美国 μ Quant MQX200 型); 超声波细胞粉碎机 (国产宁波 JY92-2D 型); 恒温振荡器 (国产江苏 THZ-C 型); 恒温冷冻离心机 (美国 SIGMA 公司 3-30K 型); 激光多普勒血流仪 (瑞士派瑞德公司 Laser Doppler Flowmeter, LDF) 系统 (包括: PeriFlux 5001 main Unit, PF5010 LDPM Unit 检测器, LD Probe 407-1

检测探头); 小动物气体麻醉机 (美国 Matrx VIP3000 型); 大鼠脑立体定位仪 (国产瑞沃德公司 68001 型); 牙科手钻 (韩国 Saeshin 公司产 #93-15 型); 血管阻断用线 (北京西浓科技有限公司 2636-A1 型); 国产恒温加热垫。

tMCAO 模型制备及动物分组 按照 Longa 等^[11]方法制备大鼠 tMCAO 模型。大鼠用气体麻醉机麻醉 (1.5%~2.5% 异氟烷), 体温维持在 (37 ± 0.5) °C, 仰卧位固定于手术台上。沿颈正中纵向切开皮肤, 仔细分离右侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA)、颈外动脉 (external carotid artery, ECA)、颈内动脉 (internal carotid artery, ICA)。将 ECA 结扎剪断, 拉直与 ICA 成一直线。在 ECA 上剪一小口, 将一根长 4.0 cm、直径 0.26 mm 的圆头硅化尼龙线 (用 0.1% 多聚赖氨酸包被) 由此开口插入 ICA 约 1.85~2.00 cm 至大鼠大脑前动脉起始处, 阻断大脑中动脉的血流供应, 监测脑血流。缺血 2 h 后小心抽出尼龙线, 结扎 ECA 开口并缝合手术切口, 动物放回笼子中再灌 24 h。全部过程中室温保持在 24~25 °C。

动物 tMCAO 术后随机分为 5 组: 模型对照组 (口服蒸馏水+tMCAO)、阳性对照组 (口服 DL-NBP 200 mg·kg⁻¹+tMCAO)、W1302 口服 1、3、10 mg·kg⁻¹ (口服相应剂量+tMCAO) 剂量组。动物于 tMCAO 缺血手术后 5 min 内口服给予各组受试药物, 给药体积为 1 mL·kg⁻¹, 缺血手术后 120 min 进行再灌注。再灌注 24 h 后进行行为学评价和 TTC 染色, 分析统计脑梗死体积及脑组织炎症因子生化测定。

tMCAO 神经行为学评分 大鼠缺血再灌注 24 h 后进行动物的行为学观察。参照 Bederson 等^[12]和 Belayev 等^[13]的方法。采用四级评分法 (0~4 分): ① 行为完全正常为 0 分; ② 提起鼠尾离开地面, 手术对侧前肢内旋、内收者, 为 1 分; ③ 大鼠放至地面, 用手挤压两侧检查其抗力, 手术对侧抗力下降者, 为 2 分; ④ 大鼠放至地面, 观察其行走, 围绕手术对侧转圈者, 为 3 分; ⑤ 损伤极其严重, 已无法自主活动者, 为 4 分。分数越高, 说明其神经行为损伤越严重。

tMCAO 脑梗塞体积的测定 参照 Belayev 等^[13]的方法, 大鼠缺血再灌注 24 h 后, 即刻断头取脑, 去除嗅束、小脑和低位脑干, 将其冠状切成 6 片 (第 1~5 片每片厚 2 mm, 第 6 片厚 4 mm), 迅速置于 5 mL 含有 4% TTC (1.5 mL) 及 1 mol·L⁻¹ K₂HPO₄ (0.1 mL) 的溶液中染色 (37 °C, 避光) 20~30 min, 其间每隔 5 min 翻动 1 次。经 TTC 染色后, 正常组织染色呈深红色, 梗死组织呈白色。将每组脑片排列整齐, 拍照保存。应用图象分析系统软件 (Photoshop7.0) 处理并统计, 求算每片的梗塞面积, 并最终叠加换算成梗塞体积。梗塞体积

以所占大脑半球的百分率来表示, 以消除脑水肿的影响。脑梗塞体积比 (%) = (手术对侧半球的体积-手术侧半球未梗塞部分的体积)/手术对侧半球的体积×100%。

局部脑血流 (rCBF) 的测定 大鼠用异氟烷气体麻醉机 (2%~2.5%) 麻醉, 体温维持在 37 ± 0.5 °C。大鼠俯卧位固定于立体定位仪上, 开颅窗并用 3% 双氧水清理手术视野, 以前囟为坐标原点, 选取前囟后 2 mm、右侧 3 mm 为测定点, 用牙科钻打薄直径约 2~3 mm 区域 (不时以生理盐水冷却), 保持硬脑膜的完整并避开较大的血管, 定位并固定好探头座。

动物仰卧位于手术台上, 记录初始正常稳定期 5 min 内血流均值为 0 时血流量。进行 tMCAO 手术, 记录术后 5 min 脑血流量为术后血流量, 随后灌胃 W1302 10 mg·kg⁻¹ (模型对照组给予等体积的纯水), 缺血手术后 120 min 再灌注。期间记录缺血后 30、60、90、120 min 时间点的 5 min 内稳定血流均值, 及再灌注后 3、30、60 min 时间点的 5 min 内稳定血流均值。计算并统计缺血血流变化率和再灌注血流变化率。各组数据计算均值及标准误, 测算每个时间点缺血百分比。公式如下: 缺血百分比 (%) = (缺血时血流量均值-基础血流量均值)/基础血流量均值×100%。

脑缺血损伤后不同时间点灌胃 W1302 药效时间窗测定 SD 大鼠分别于 tMCAO 缺血后 30、60、90、120、180 min 灌胃给予 W1302 (10 mg·kg⁻¹), 缺血 2 h 后再灌注。tMCAO 术后 24 h 进行行为学评分, 断头取脑切片 TTC 染色进行脑梗塞体积评价。

脑缺血损伤后不同时间点血样及脑组织生化测定 血样和脑组织生化含量时间曲线测定采用 SD 大鼠雌雄各半, 每个时间点 n = 12。血浆测定是以未缺血手术动物眼眶静脉取血设为 0 min 并作为基准值 (blank), tMCAO 后大鼠灌胃给予 10 mg·kg⁻¹ W1302 后, 给药后 10、30、60、120、240 min 和 12、26 h 眼眶静脉取血, 并以肝素抗凝, 4 °C 离心, 分离血浆, -80 °C 保存, 待测。脑组织取材是以未缺血手术动物脑组织设为 0 min 并作为基准值 (blank), tMCAO 后在给药 10、30、60、120、240 min 和 12、26 h, 用生理盐水进行心脏灌流, 冲洗干净脑内残留血液后, 断头取损伤侧半脑, -80 °C 保存, 待测。按照 NO 试剂盒和 ATP 试剂盒说明书操作, 进行血浆和脑组织生化指标测定。

脑组织炎症因子等生化组织测定 tMCAO 术后 24 h, 将大鼠断头取损伤侧半脑, 用滤纸吸干后称重, 按重量体积比 1:9 加入 4 °C 预冷的生理盐水, 用内切式匀浆机制备 10% 的组织匀浆, 然后低温低速离心 10 min, 取上清。按照 TNF-α、IL-β、iNOS 试剂盒及蛋白定量试剂盒说明书操作, 进行脑组织测定。

统计学处理 所有数据均用均数 (\bar{x}) \pm 标准误 (SEM) 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果

1 W1302 对 tMCAO 模型大鼠脑梗塞体积和行为学评分的影响

在线栓法 tMCAO (缺血 2 h 再灌 24 h) 所致大鼠急性脑缺血再灌注损伤模型中 (表 1): 模型对照组脑梗塞体积比和行为学评分分别为 $45.1\% \pm 4.0\%$ 和 2.3 ± 0.2 , 提示模型动物存在明显的脑缺血损伤。阳性对照药 DL-NBP ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 处理后, 能明显减少脑梗塞体积至 $33.0\% \pm 3.7\%$ ($P < 0.05$), 但行为学无明显差异 (1.9 ± 0.2 , $P > 0.05$); W1302 灌胃给药呈剂量依赖性地减少模型大鼠的脑梗塞体积, 在 1、3 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下分别为 $31.3\% \pm 5.5\%$ ($P < 0.05$)、 $27.8\% \pm 3.5\%$ ($P < 0.01$) 和 $25.7\% \pm 4.7\%$ ($P < 0.01$), 行为学评分均为 1.5~1.8 之间, 其中 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组有显著差异 (1.5 ± 0.3 , $P < 0.05$)。

Table 1 Effects of a nitro containing derivative of clomethiazole (W1302) administration by gavage 5 minutes after ischemia on neurological score and cerebral infarction volume ratio in transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) model rats. Mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group. DL-NBP: DL-3n-Butylphthalide

Group	$p.o./\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	Neurological score	Cerebral infarction volume ratio/%
Model	—	16	2.3 ± 0.2	45.1 ± 4.0
DL-NBP	200	14	1.9 ± 0.2	$33.0 \pm 3.7^*$
W1302	1	13	$1.5 \pm 0.3^*$	$31.3 \pm 5.5^*$
	3	19	1.8 ± 0.2	$27.8 \pm 3.5^{**}$
	10	14	1.6 ± 0.3	$25.7 \pm 4.7^{**}$

2 W1302 对 tMCAO 模型大鼠治疗时间窗研究

W1302 对 tMCAO 大鼠治疗时间窗研究中, 模型大鼠缺血 2 h 再灌 24 h 后脑梗塞体积和行为学评分分别为 $38.1\% \pm 2.4\%$ 和 2.0 ± 0.1 。在缺血 30、60、90、120 min (再灌) 灌胃给予 W1302 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 能显著减少再灌 24 h 的脑梗塞体积, 分别为 $29.9\% \pm 3.0\%$ ($P < 0.05$)、 $31.2\% \pm 3.5\%$ ($P > 0.05$)、 $29.5\% \pm 3.8\%$ ($P < 0.05$) 和 $29.7\% \pm 2.7\%$ ($P < 0.05$); 但对行为学评分无显著性差异。此外, 在缺血 180 min (再灌后 60 min) 灌胃给予 W1302, 对脑梗塞体积 ($39.3\% \pm 3.1\%$, $P > 0.05$) 和神经行为学评分 (2.1 ± 0.1 , $P > 0.05$) 均未见明显影响。

结果表明, W1302 在缺血后 120 min 内给药对脑缺血再灌注损伤具有明显的改善作用; 缺血后 60 min 给

药虽然未见统计学差异, 这可能与动物个体差异有关, 但与模型对照组相比较仍然具有较为明显的降低脑梗塞体积的作用。因此, 综合评价 W1302 对大鼠脑缺血再灌注损伤的治疗时间窗为缺血后至 120~180 min 之间 (表 2)。

Table 2 Effect of W1302 administration by intragastric administration of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ on the treatment time window of tMCAO model rats. Mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs model group

Group	Time of administration after ischemia/min	n	Neurological score	Cerebral infarction volume ratio/%
Model	—	27	2.0 ± 0.1	38.1 ± 2.4
W1302	30	22	1.9 ± 0.1	$29.9 \pm 3.0^*$
	60	24	1.8 ± 0.2	31.2 ± 3.5
	90	21	1.8 ± 0.2	$29.5 \pm 3.8^*$
	120	22	2.1 ± 0.1	$29.7 \pm 2.7^*$
	180	20	2.1 ± 0.1	39.3 ± 3.1

3 W1302 对 tMCAO 模型大鼠脑血流量的影响

研究结果显示 (图 1), 以缺血术前脑血流量为基准, 模型大鼠 tMCAO 后脑血流量显著降低, 达 60% 以上, 再灌后脑血流恢复至术前血流量的 $-13.9\% \pm 8.2\% \sim -5.9\% \pm 6.5\%$ 。W1302 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 在缺血后 5 min 灌胃给药, 对缺血期间 (缺血 2 h 内) 的脑血流量未见明显的改善作用; 但明显增加再灌后脑血流量, 再灌 3、30、和 60 min 后的数值分别比术前血流量高 $7.0\% \pm 6.0\%$ ($P < 0.05$)、 $20.9\% \pm 7.0\%$ ($P < 0.05$) 和 $17.5\% \pm 9.5\%$ ($P = 0.0501$)。

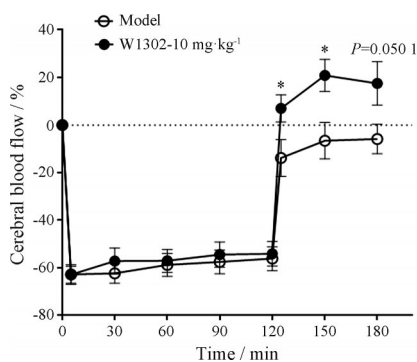


Figure 1 Percentage of changes in cerebral blood flow of tMCAO model of rats after W1302 intragastric administration. $n = 10-11$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs model group

4 W1302 对 tMCAO 模型大鼠血浆和脑组织 NO 水平-时间曲线的影响

tMCAO 模型大鼠各缺血时间点血浆或脑组织 NO 水平未见明显的改变, 在给予 W1302 后血浆中 NO 的水平明显升高, 在缺血后 2 h 达到峰值, 随后 NO 水平逐渐降低。而在给予 W1302 后, 脑组织中 NO 水平也明显升高, 也在给药后大约 2 h 达到峰值 (图 2)。

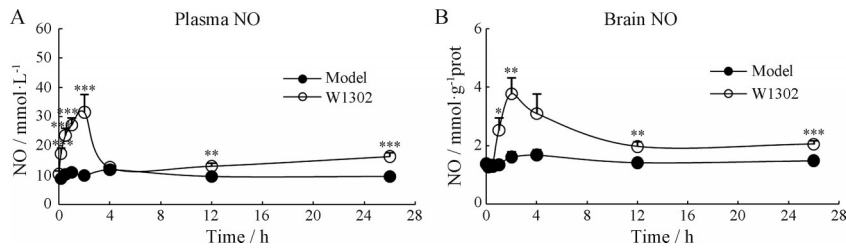


Figure 2 Time curve of carbon monoxide (NO) level in plasma (A) and brain tissue on the injured side (B) of W1302 after acute cerebral ischemia in tMCAO model rats. $n = 12$ (half male and half female), means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model group

5 W1302对tMCAO模型大鼠血浆和脑组织ATP水平-时间曲线的影响

ATP是体内组织细胞一切生命活动所需能量的直接来源,其含量反映了组织细胞的活力。tMCAO模型大鼠血浆ATP水平在缺血后明显降低;而给予W1302后,血浆ATP水平明显升高且在缺血后0.5 h达到峰值,持续24 h以上。而模型对照组的脑组织中ATP的水平在缺血后存在瞬时降低。给予W1302后脑组织中ATP水平也明显升高,持续时间较长。这个结果与脑血流量变化有关,再灌后明显升高(图3)。

6 W1302对tMCAO模型大鼠脑炎症因子的影响

炎症因子的改变与缺血性脑卒中有着密切的联系。大鼠行大脑中动脉手术后,各组与模型对照组比较,阳性药DL-NBP能够显著降低损伤侧脑组织TNF- α ($P < 0.01$)和IL-1 β ($P < 0.05$)水平,对iNOS的表达也有减少趋势。W1302各剂量组能剂量依赖性降低大鼠TNF- α ($P < 0.01$)和IL-1 β ($P < 0.05$)水平;对iNOS的表达水平也分别下降了24%、17%和22%。以上结果提示,W1302对大鼠模型缺血再灌注损伤的治疗改善作用可能与其抑制炎症因子的表达和抑制iNOS水平相关(表3)。

讨论

缺血性脑血管疾病是目前严重威胁人类生命的重要疾病之一。脑组织对缺血缺氧极为敏感,脑部出现缺血缺氧损伤是一个复杂的病理过程^[14]。

W1302是硝酸酯类化合物,其硝酸根能释放NO,可显著扩张血管,改善脑血流;此外,NO可激活脑中可

Table 3 Effects of W1302 on brain tissue inflammatory factors in SD rat tMCAO model, including tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

Group	<i>p.o./</i> <i>mg·kg⁻¹</i>	<i>n</i>	TNF- α / <i>pg·μg⁻¹ prot</i>	IL-1 β / <i>pg·μg⁻¹ prot</i>	iNOS/ <i>U·μg⁻¹ prot</i>
Model	—	13	23.10 \pm 2.23	614.44 \pm 27.75	2.20 \pm 0.25
DL-NBP	200	11	15.29 \pm 0.85**	518.06 \pm 27.55*	2.03 \pm 0.43
W1302	1	9	14.34 \pm 1.68**	509.84 \pm 37.54*	1.68 \pm 0.18
	3	9	12.89 \pm 0.77**	500.47 \pm 41.57*	1.83 \pm 0.30
	10	9	9.82 \pm 2.12**	405.89 \pm 46.37**	1.72 \pm 0.23

溶性鸟苷酸环化酶,产生cGMP,激活相关通路,起到神经保护作用。在当前研究中,W1302在1~10 mg·kg⁻¹剂量时可明显改善tMCAO大鼠术后24 h行为学评分,减少脑梗死体积,且随剂量增加呈剂量效应关系;显著增加血液和脑组织中NO含量,恢复tMCAO大鼠局部脑血流。这些研究结果说明,W1302可通过释放NO、扩张血管、增加脑血流量、改善脑能量供应(ATP)发挥脑保护作用。

GABA是哺乳动物中枢神经系统中主要的抑制性神经递质,在降低神经元兴奋性中起重要作用,激活GABA_A受体,可产生抑制神经炎症和神经保护作用。W1302是CMZ的衍生物,本实验室前期的电生理学研究发现W1302具有弱变构激活GABA_A受体的作用,其对GABA_A受体的激动作用较CMZ明显降低,仅为CMZ的1/10 (EC_{50} =996 μ mol·L⁻¹),其结合位点与依托咪酯相同,与GABA_A受体 β 亚基结合^[15]。说明W1302可增强内源性GABA的神经保护作用,而自身激活GABA受体作用较弱,减少了此类药物的嗜睡作用。

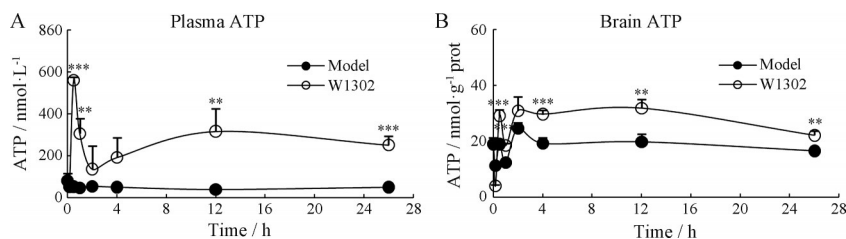


Figure 3 Effect of W1302 on adenosine triphosphate (ATP) time curve of plasma (A) and injured brain tissue (B) after acute cerebral ischemia in tMCAO model rats. $n = 12$ (half male and half female), means \pm SEM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model group

神经炎症是存在于缺血性脑卒中患者脑内的病理改变之一。在当前研究中, W1302对tMCAO模型大鼠神经炎症具有明显的抑制作用,能剂量依赖性降低大鼠TNF- α ($P < 0.01$)和IL-1 β ($P < 0.05$)水平;因而, TNF- α 为该药的潜在药效生物标志物。在生理条件下,体内iNOS水平较低,小胶质细胞和星形胶质细胞在炎症、创伤和免疫反应后可诱导iNOS表达增加^[16]。iNOS基因敲除的AD转基因小鼠或iNOS抑制剂对A β 诱导的神经毒性具有明显保护作用^[17]。脑缺血脑组织中的iNOS受到NO的负反馈调节^[18]。本实验显示, W1302给药后脑组织中iNOS含量略有下降,其原因可能与W1302缓解了脑缺血亚急性期脑组织产生的炎症浸润,从而减少了损伤后iNOS的激活^[19]。

综上所述, W1302具有明显的改善缺血性脑卒中的作用,可通过增加脑血流量、改善脑组织能量供应、激活GABA_A受体抑制兴奋性氨基酸损伤、抑制神经炎症等作用发挥脑保护效应。W1302药理作用强,脑保护作用的有效剂量在大鼠中为1~10 mg·kg⁻¹,持续作用时间长,一次口服给药可持续影响NO和ATP水平达24 h以上。W1302于2023年被CFDA批准临床试验许可用于治疗血管性痴呆,目前处于临床I期研究,本研究结果提示, W1302也有望开发成为新型的治疗缺血性脑卒中药物。

作者贡献: 徐少锋负责部分实验设计、数据分析和撰写论文;李江、蔡杰、冯楠和张咪负责动物实验;王玲和王伟平负责数据分析;黄海洪和王琰负责实验设计;王晓良负责指导实验设计和论文的修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, et al. Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association [J]. *Circ Heart Fail*, 2013, 6: 606-619.
- [2] Kiage JN, Merrill PD, Judd SE, et al. Intake of trans fat and incidence of stroke in the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke (REGARDS) cohort [J]. *Am J Clin Nutr*, 2014, 99: 1071-1076.
- [3] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2013, 127: 134-152.
- [4] Schreiber S, Bueche CZ, Garz C, et al. Blood brain barrier breakdown as the starting point of cerebral small vessel disease? New insights from a rat model [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2013, 5: 4.
- [5] Wu C, Wang J, Li C, et al. Effect of electroacupuncture on cell apoptosis and ERK signal pathway in the hippocampus of adult rats with cerebral ischemia reperfusion [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 414965.
- [6] Frølund B, Ebert B, Kristiansen U, et al. GABA_A receptor ligands and their therapeutic potentials [J]. *Curr Top Med Chem*, 2002, 2: 817-832.
- [7] Ghumatkar PJ, Patil SP, Jain PD, et al. Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effect of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 135: 182-191.
- [8] Chen J, Buchanan JB, Sparkman NL, et al. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system [J]. *Brain Behav Immun*, 2008, 22: 301-311.
- [9] Hutchinson PJ, O'Connell MT, Coles JP, et al. Investigation of the effect of chlormethiazole on cerebral chemistry in neurosurgical patients: a combined study of microdialysis and a neuroprotective agent [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2002, 53: 275-283.
- [10] Zingmark PH, Ekblom M, Odergren T, et al. Population pharmacokinetics of clomethiazole and its effect on the natural course of sedation in acute stroke patients [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2003, 56: 173-183.
- [11] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [12] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17: 472-476.
- [13] Belayev L, Alonso OF, Busto R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model [J]. *Stroke*, 1996, 27: 1616-1622.
- [14] Qi Z, Yuan S, Liu KJ, et al. Normobaric hyperoxia plays a neuroprotective role after cerebral ischemia by maintaining the redox homeostasis and the level of connexin43 in astrocytes [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28: 1509-1518.
- [15] Jiang XM, Wang WP, Wang XL, et al. 2-(4-Methyl-thiazol-5-yl) ethyl nitrate maleate-potentiated GABA_A receptor response in hippocampal neurons [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24: 1231-1240.
- [16] Adachi N, Lei B, Soutani M, et al. Different roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases on ischemic nitric oxide production in gerbil striatum [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 288: 151-154.
- [17] Nathan C, Calingasan N, Nezezon J, et al. Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase [J]. *J Exp Med*, 2005, 202: 1163-1169.
- [18] Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia [J]. *Stroke*, 1997, 28: 1283-1288.
- [19] Claus F, Marc F, Andreas R, et al. Subacute but not acute generation of nitric oxide in focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2000, 31: 2208-2211.