

## • 实验研究 Experimental research •

# $\omega$ -agatoxin-IVA 对猴脑缺血模型的神经保护作用

周智鹏, 邱维加, 邓燕贤, 庾俊雄, 周英琼, 张辉阳, 徐军红, 曾阳东

**【摘要】 目的** 探讨 P/Q 型钙离子通道拮抗剂  $\omega$ -agatoxin-IVA(蜘蛛毒提取物)在猴脑缺血模型中的神经保护作用。**方法** 成年广西猕猴 8 只,随机分成治疗组和对照组,每组 4 只。术前 CT 平扫和血管造影排除脑血管及颅内病变。各组动物经介入法插管至大脑中动脉,注入自体血栓造成大脑中动脉血栓栓塞,数字减影血管造影(DSA)证明栓塞成功,于术后 30 min 椎管内注射  $\omega$ -agatoxin-IVA 溶液,术后 60 min 行 CT 灌注扫描(CTP)观察梗死范围,术后 1、15 和 30 d 观察行为学表现,术后第 30 天行 MRI 扫描测量梗死体积,处死动物并取脑组织行 HE 染色,观察病理改变。**结果** 术后介入血管造影和 CTP 均证明栓塞成功,术后 60 min 两组动物脑缺血范围在 CTP 图像上差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。术后 15 和 30 d 行为学评分,治疗组分别为  $27.0 \pm 3.0$  和  $27.0 \pm 3.0$ ,明显高于对照组的  $16.5 \pm 4.7$  和  $17.5 \pm 4.1$ ,两组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。术后 30 d MRI 扫描测量的梗死范围,治疗组明显低于对照组,两组间差异有统计学意义( $64 \pm 38$  比  $193 \pm 24$ ,  $P < 0.05$ )。**结论**  $\omega$ -agatoxin-IVA 可以降低猴脑缺血后的梗死范围,减少神经功能损伤。

**【关键词】** 脑缺血; P/Q 型钙通道拮抗剂; 神经保护; 动物模型

中图分类号: R743 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2012)-08-0660-04

**The neuro-protective effect of  $\omega$ -agatoxin-IVA: an experimental study in monkey models of middle cerebral artery ischemia** ZHOU Zhi-peng, QIU Wei-jia, DENG Yan-xian, YU Jun-xiong, ZHOU Ying-qiong, ZHANG Hui-yang, XU Jun-hong, ZENG Yang-dong. Department of Radiology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi Province 541001, China

Corresponding author: QIU Wei-jia, E-mail: vega\_cn@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the neuro-protective effect of  $\omega$ -agatoxin-IVA in monkey models of middle cerebral artery ischemia. **Methods** A total of 8 adult monkeys were randomly and equally divided into treatment group ( $n = 4$ ) and control group ( $n = 4$ ). Before the experimental procedure, plain CT scanning and angiography were performed in all monkeys to exclude any cerebral vascular or intracranial disorders. Middle cerebral artery catheterization was completed in each animal, which was followed by the injection of monkey autologous blood clots to make the embolization, and subsequent DSA was employed to verify that the middle cerebral artery was really occluded. Intracanal injection of  $\omega$ -agatoxin-IVA solution was carried out 30 minutes after the embolization. Cerebral blood flow (CBF) was determined by CT perfusion (CTP) scanning performed 60 minutes after the embolization to observe the infarction extent. Behavioral test was studied at 1, 15 and 30 days separately after the procedure. Thirty days after the treatment, MRI scan was employed to measure the infarction volume. Then the animals were sacrificed, and the brain tissues were collected and sent for pathologic study by using H&E staining. **Results** Successful embolization of middle cerebral artery was achieved in all animals, which was confirmed by both DSA and CTP. At 60 minutes after the treatment, the difference in ischemic extent, that was estimated on CTP pictures, between the two groups

was not significant ( $P > 0.05$ ). The behavior test scores at 15 and 30 days in treatment group were  $27.0 \pm 3.0$  and  $27.0 \pm 3.0$  respectively, which were significantly higher than those in

基金项目: 国家自然科学基金(30860239, 81160147)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2012.08.011

作者单位: 541001 桂林医学院附属医院放射科(周智鹏、邱维加、邓燕贤、张辉阳、徐军红、曾阳东),麻醉科(庾俊雄),病理科(周英琼)

通信作者: 邱维加 E-mail: vega\_cn@163.com

control group ( $16.5 \pm 4.7$  and  $17.5 \pm 4.1$  respectively) with  $P < 0.05$ . MRI scanning performed at 30 days after the treatment showed that the infarction extent in the treatment group was  $64 \pm 38$ , which was significantly lower than that in the control group ( $193 \pm 24$ ) with  $P < 0.05$ . **Conclusion** Intracanal injection of  $\omega$ -agatoxin-IVA solution employed soon after the cerebral infarction can reduce the infarction size and relieve neurological deficit in monkey models of middle cerebral artery ischemia. (J Intervent Radiol, 2012, 21: 660-663)

**[Key words]** brain ischemia; P/Q type calcium channel antagonist; neuro-protection; animal model

脑缺血严重威胁人类健康,由于其高发生率、高死亡率、高致残率的特点,已逐步成为人类疾病死亡的重要因素之一<sup>[1]</sup>。 $\omega$ -agatoxin-IVA 是一种蜘蛛毒提取物,是特异性的 P/Q 型钙通道拮抗剂,其对脑缺血的保护作用在啮齿类动物研究中已有报道。本研究以灵长类动物猴作为研究对象,研究  $\omega$ -agatoxin-IVA 在猴脑缺血模型中的神经功能保护作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和分组

雄性广西猕猴 8 只(桂林永福动物实验养殖基地),体重 6 ~ 8 kg,年龄 4 ~ 8 岁。按数字随机法分成治疗组 and 对照组,每组 4 只。

### 1.2 实验方法

1.2.1 术前准备 术前 24 h 禁食,适量饮水。复合麻醉剂(氯胺酮 1 ml + 地西洋 1 ml + 东莨菪碱 1 ml)肌肉注射,麻醉成功后,手术前行 CT 平扫,排除颅内病变。

1.2.2 血栓制作 动物麻醉后取自身静脉血 2 ml,肝素抗凝,高速离心后,取上层血清加入血浆凝固酶,注入直径 1 mm 的硬膜外麻醉管(河南新乡市驼人医疗器械公司),制成自体血栓备用。

1.2.3 大脑中动脉栓塞 动物麻醉后鼻饲给氧,在常规心电监护仪系统下进行心电、呼吸和血压监护。微量泵静脉注射异丙酚等维持麻醉状态。皮肤切开后行 Seldinger 技术将 1.4 F 微导管插管至大脑中动脉起始部(M1 段),行大脑中动脉正侧位造影,对比剂总量 1.8 ml,速度 0.8 ml/s,了解右侧大脑中动脉血流状态(所有导丝导管均为 Cordis 公司产品)。插管技术和方法见参考文献<sup>[2-3]</sup>。

1.2.4 大脑中动脉部分栓塞 自微导管注入制备好的血栓 20 cm,再次行大脑中动脉正侧位造影确认栓塞成功。

1.2.5 药物治疗 栓塞术后 30 min 椎管内注射 2 ml 浓度为 6 pmol/L 的  $\omega$ -agatoxin-IVA (西格玛奥德里奇上海贸易有限公司)的小牛血清溶液,对照组椎管内注射相同总量的小牛血清溶液。

1.2.6 CT 灌注扫描 于栓塞后 60 min 行 CT 灌注(CTP)扫描,扫描条件 120 kV,80 mA,对比剂总量 10 ml,速度 0.3 ml/s。将扫描得到的数据导入 GE AW4.4 工作站经 Perfusion 软件处理得到脑血流量(CBF)、脑血流容积(CBV)和平均通过时间(MTT)等数据。

1.2.7 术后行为学表现 监测动物术后 1、15 和 30 d 的行为学表现。测量方法:用木杆连续 10 次刺激动物一侧上肢,刺激侧有抓杆动作为 3 分,双侧协调抓杆为 2 分,对侧上肢抓杆为 1 分,无反应为 0 分,所得分数和次数的乘积相加为最后所得的分数<sup>[2-3]</sup>。

1.2.8 术后 MRI 扫描 术后 30 d 测量 T<sub>2</sub>WI 图像异常信号范围,扫描参数 TR:4 100 ms,TE:100 ms,矩阵:13 cm × 13 cm,层厚 3 mm,层距 3 mm。

1.2.9 病理学检查 术后 30 d 处死动物,取脑组织行常规 HE 染色观察病理改变。

### 1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 18 软件包进行分析。所有数据符合方差齐检验,均采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 栓塞前后生理指标

监测栓塞前、后动物血压、心率、体温和动脉血气分析。栓塞后,对照组和治疗组的收缩压和动脉血氧分压均较栓塞前降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但两组其他生理指标间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 脑缺血和梗死范围

栓塞后血管造影显示大脑中动脉部分分支栓塞(图 1),栓塞后 60 min CTP 扫描显示 CBF 异常范围(图 2a)两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。栓塞后 30 d, MRI 平扫 T<sub>2</sub>WI 信号异常范围(图 2 b)治疗组小于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

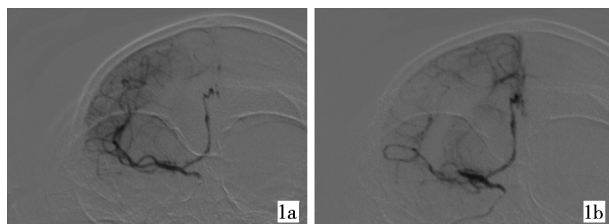
### 2.3 术后行为学表现

动物术后 1 d 行为学表现得分治疗组与对照组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。术后 15 和 30 d 行

表 1 两组栓塞前、后生理指标变化

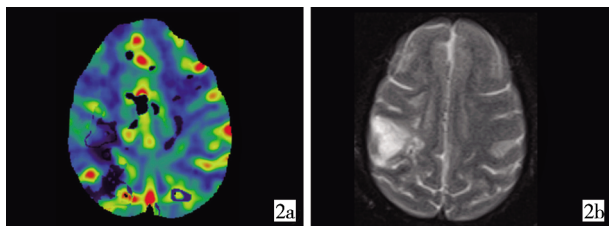
( $\bar{x} \pm s$ )

参数	治疗组(4 只)				对照组(4 只)			
	栓塞前	栓塞后	<i>T</i> 值	<i>P</i> 值	栓塞前	栓塞后	<i>T</i> 值	<i>P</i> 值
收缩血压(mmHg)	93.5±4.2	130.5±20.7	-3.507	0.014	91.3±7.6	114.7±7.6	-3.774	0.020
舒张血压(mmHg)	40.3±4.6	54.0±17.6	-0.891	0.108	45.7±4.5	59.3±4.9	-3.542	0.024
心率(次/min)	128.5±25.4	126.5±36.6	0.112	0.914	131.3±21.4	133.0±22.5	-0.93	0.930
体温(℃)	37.9±0.2	38.1±0.6	-0.671	0.527	38.0±0.3	37.9±0.3	0.438	0.684
动脉血 pH 值	7.4±0.1	7.4±0.1	0.380	0.717	7.3±0.0	7.3±0.0	0.636	0.559
动脉血氧分压(mmHg)	501.5±56.1	359.1±98.6	2.511	0.046	558.2±97.4	324.9±67.1	3.418	0.027
动脉血二氧化碳分压(mmHg)	39.9±3.8	38.5±5.8	0.396	0.706	42.0±3.0	42.4±2.9	-0.139	0.896



1a 栓塞前造影大脑中动脉和分支显示清楚,对比剂反流导致部分分支消失,大脑前动脉反流增加  
1b 栓塞后大脑中动脉部分小分支消失,大脑前动脉反流增加

图 1 栓塞前、后大脑中动脉造影所见



2a 栓塞后 60 min CBF 深蓝色  
2b 栓塞后 30 d T<sub>2</sub>WI 高信号区的区域显示脑梗死区

图 2 栓塞后不同时间脑血流异常范围

表 2 两组脑缺血梗死范围比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

参数	治疗组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
60 min CBF(mm <sup>3</sup> )	137 ± 70	150 ± 74	0.054	0.826
30 d MRI(mm <sup>3</sup> )	64 ± 38	193 ± 24	17.697	0.025

为学表现得分治疗组明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 两组行为学表现得分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	行为学表现得分		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	治疗组	对照组		
1 d	10.0 ± 9.2	8.1 ± 5.5	0.101	0.764
15 d	27.0 ± 3.0	16.5 ± 4.7	11.386	0.02
30 d	27.0 ± 3.0	17.5 ± 4.1	11.211	0.02

## 2.4 病理学结果

栓塞后 30 d HE 染色,治疗组和对照组均可见境界清楚的梗死区,梗死灶内细胞液化,坏死如筛网状,细胞核碎裂和溶解。在梗死边缘区可见小动脉管壁增厚,管腔狭窄(图 3)。

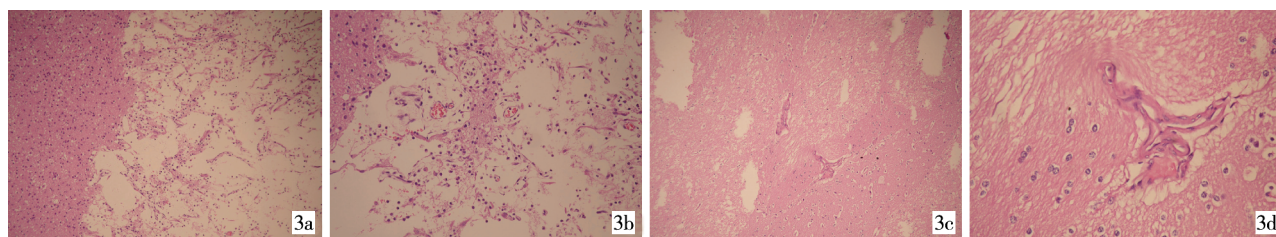
## 3 讨论

脑缺血和脑梗死严重威胁人类健康,急性缺血

性脑血管病占脑卒中患者的 50% ~ 80%。脑缺血后神经细胞能量物质缺乏、产生细胞毒性物质和凋亡等因素导致缺血区域神经细胞功能下降和坏死,产生严重的临床症状甚至死亡。目前临床治疗原则是尽早恢复血供,使脑组织得到糖和氧等营养物质,减少缺血再灌注损伤和凋亡的发生。

$\omega$ -agatoxin IVA 是一种肽类毒素,可以选择性抑制 P/Q 型钙通道电流,阻止钙离子内流,扩张血管,增加血流量。现有大量研究表明,钙离子除在兴奋收缩耦联中起重要作用外,还参与物质代谢、突触传递、细胞周期调控与细胞间通讯、基因表达等活动,钙信号失常会导致一系列病理生理过程<sup>[4-6]</sup>。钙通道在中枢神经系统内的神经元兴奋性调节、神经递质合成与释放、神经元营养和发育等多方面起着重要作用。在神经系统,电压依赖性钙通道在不同部位的分布表达与他们的特定功能直接相关,研究表明大部分 N 型和 P 型电压依赖性钙通道存在于神经元中,钙离子通过 N 型和 P 型通道的开放内流入神经元,调控神经递质的释放<sup>[7-9]</sup>。自从 20 世纪 60 年代发现钙通道拮抗剂以来,主要用于治疗心血管系统疾病,它可选择性地阻断电压依赖的钙通道,用于扩张冠状动脉以治疗心绞痛,之后也用于治疗高血压、缺血性心脏病及心律失常等其他心血管疾病。越来越多的研究也证明其对于脑缺血有神经保护作用<sup>[7-9]</sup>。

灵长目动物猴在直立位、行为、运动、感觉、额皮质的比例、脑血管的构筑、非骨性脑膜和右手优势等方面与人类相似。脑血栓栓塞模型可以很好的模拟脑缺血的发病过程<sup>[10]</sup>,周智鹏等<sup>[2-3]</sup>利用介入插管方法,通过猴自体血栓栓塞大脑中动脉成功复制了大脑中动脉缺血模型,术后通过 CTP 扫描观察脑血流量的改变,通过术后行为学表现观察神经功能保护效果。本研究利用相同的动物模型,在动物猴身上研究  $\omega$ -agatoxin IVA 的神经保护作用。脑缺血后 DSA 脑血管造影可以显示血管栓塞情况<sup>[11]</sup>,CTP 扫描检查可以提供最早最直接的脑血流灌注



3a 脑实质内见片状的梗死灶, 3b 梗死灶内脑组织液化、坏死, 梗死区边界清楚 (HE,  $\times 100$ )  
如筛网状, 细胞核碎裂和溶解 (HE,  $\times 200$ )  
3c 脑梗死灶边缘区小动脉显示 (HE,  $\times 100$ )  
3d 高倍镜下显示梗死边缘区小动脉管壁增厚, 管腔狭窄 (HE,  $\times 400$ )

图 3 栓塞后 30 d 病理学所见

信息,判断脑梗死的范围和程度,为进一步的治疗和预后提供有效信息。其中 CBF 对脑缺血区域具有较高的敏感性,可以很好的反映脑缺血后脑内血流的分布及变化<sup>[12-13]</sup>。MRI 扫描的 T<sub>2</sub>WI 序列成像,可以反应脑梗死情况,并用于测量脑梗死体积<sup>[14]</sup>。本研究中,治疗组和对照组在注入相同量自体血栓后行血管造影和 CTP 确认栓塞成功,栓塞前后动脉血氧分压和血压改变差异有统计学意义,间接证明栓塞成功。本文两组动物在脑缺血后 60 min CTP 扫描得到的 CBF 异常范围间的差异无统计学意义,虽然有文献报道在鼠脑缺血模型的研究中发现  $\omega$ -agatoxin IVA 治疗能增加脑血流量<sup>[8]</sup>,但本实验在药物注射后 30 min (缺血后 60 min) CTP 扫描,治疗组并未见到明显的脑血流增加,可能小鼠与猴的生理结构不同,也可能与本实验样本量较少有关,相关问题有待进一步研究。治疗组在术后 15 和 30 d 行为学表现得明显高于对照组,表明经过  $\omega$ -agatoxin IVA 治疗后行为学缺陷改善,治疗组在术后 30 min 的 MRI 显示,脑梗死体积也小于对照组,表明  $\omega$ -agatoxin IVA 治疗后能减少脑梗死体积。栓塞 30 min 后两组动物脑组织 HE 染色均显示脑实质内见片状梗死灶,梗死灶内脑组织液化、坏死,细胞核碎裂和溶解,脑梗死灶边缘区可见小动脉管壁增厚,管腔狭窄等改变。本实验结果表明, $\omega$ -agatoxin IVA 能减少猴脑缺血后的梗死范围,改善脑缺血后近中期的神经功能缺陷。

#### 参考文献

[1] Smith WS, Sung G, Starkman S, et al. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial[J]. Stroke, 2005, 36: 1432 - 1438.  
[2] 周智鹏, 邓燕贤, 邱维加, 等. 不同程度猴脑缺血模型的 CT

灌注和脑血管造影评价 [J]. 临床放射学杂志, 2008, 27: 1585 - 1588.  
[3] 周智鹏, 邱维加, 邓燕贤, 等. 猴局部脑缺血模型的建立及 t-PA 溶栓效果的评价 [J]. 临床放射学杂志, 2007, 26: 500 - 503.  
[4] Dolphin AC. A short history of voltage-gated Calcium channels [J]. Br J Pharmacol, 2006, 147 (Suppl 1): S56 - S62.  
[5] Zhu G, Okada M, Yoshida S, et al. Both 3,4 - dihydroxyphenylalanine and dopamine releases are regulated by Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> releasing system in rat striatum [J]. Neurosci Lett, 2004, 362: 244 - 248.  
[6] Tringham EW, Payne CE, Dupere JR, et al. Maturation of rat cerebellar Purkinje cells reveals an atypical Ca<sup>2+</sup> Channel current that is inhibited by omega-agatoxin IVA and the dihydropyridine (-)-(S)-Bay K8644[J]. J Physiol, 2007, 578: 693 - 714.  
[7] Bucurenciu I, Bischofberger J, Jonas P. A small number of open Ca<sup>2+</sup> channels trigger transmitter release at a central GABAergic synapse[J]. Nat Neurosci, 2010, 13: 19 - 21.  
[8] Wang X, Wang Q, Engisch KL, et al. Activity-dependent regulation of the binomial parameters p and n at the mouse neuromuscular junction in vivo[J]. J Neurophysiol, 2010, 104: 2352 - 2358.  
[9] Lopachin RM, Gaughan CL, Lehning EJ, et al. Effects of ion Channel blockade on the distribution of Na, K, Ca and other elements in oxygen-glucose deprived CA1 hippocampal neurons [J]. Neuroscience, 2001, 103: 971 - 983.  
[10] 李永东, 赵俊功, 李明华, 等. 急性血栓性大脑中动脉栓塞缺血模型的建立[J]. 介入放射学杂志, 2008, 17: 122 - 128.  
[11] 陈军, 黄清海, 刘建民, 等. 缺血性脑血管病 304 例血管造影分析[J]. 介入放射学杂志, 2009, 18: 248 - 251.  
[12] González RG. Imaging-guided acute ischemic stroke therapy: From "time is brain" to "physiology is brain" [J]. Am J Neuroradiol, 2006, 27: 728 - 735.  
[13] 邱维加, 何卓凯, 刘光俊, 等. CT 灌注成像对脑缺血半暗带的评估研究[J]. 实用放射学杂志, 2006, 22: 13 - 16.  
[14] 曹燕翔, 卢洁, 李坤成, 等. 皮层下脑梗死体积演变及其与临床预后关系的 MRI 研究 [J]. 医学影像学杂志, 2010, 20: 1251 - 1255.

(收稿日期: 2011-12-29)

(本文编辑: 侯虹鲁)