

• 基础研究 •

米力农对兔蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的作用及其机制研究

王立君 邵正凯 牟青春 梁绍栋 王闯 李金库

摘要: 目的 探讨米力农对兔蛛网膜下腔出血(SAH)后脑血管痉挛的作用及其机制。方法 取3个月龄日本大耳白兔32只,随机分为SAH组、对照组、米力农组及米力农+N-硝基-L-左旋精氨酸甲酯(L-NAME)组,共4组,每组8只。采用枕大池二次注入自体血建立SAH模型。向对照组兔枕大池内注入等渗盐水替代自体血,其他操作同SAH组。在SAH造模后30min,对米力农组兔由耳源静脉注射米力农溶液5ml(30 μ g/kg);米力农+L-NAME组,先经耳源静脉注射米力农溶液(30 μ g/kg),再注射L-NAME(30mg/kg),共5ml;对照组、SAH组注射等渗盐水5ml。对4组兔均连续给药3d,1次/d。术后第3天应用CT血管造影(CTA)和经颅多普勒超声(TCD)观察各组兔基底动脉的管径和血流速度。结果 TCD检查显示,对照组、SAH组、米力农组、米力农+L-NAME组基底动脉的平均血流速度分别为(19.4 \pm 1.8)、(32.7 \pm 4.2)、(17.8 \pm 1.8)及(33.2 \pm 7.2)cm/s;收缩期峰值流速分别为(27 \pm 5)、(45 \pm 4)、(29 \pm 3)及(44 \pm 4)cm/s。CTA检查显示,4组基底动脉管径分别为(1127 \pm 140)、(772 \pm 116)、(1113 \pm 101)及(802 \pm 91) μ m。上述指标各组间比较,差异均有统计学意义(P <0.01)。结论 米力农对SAH后脑血管痉挛有缓解作用,其扩血管作用可能与L-NAME抑制一氧化氮合酶活性有关。

关键词: 蛛网膜下腔出血;脑血管痉挛;一氧化氮合酶;兔;米力农

doi: 10.3969/j.issn.1672-5921.2013.07.010

Effect of milrinone on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits and its pathogenesis study WANG Li-jun, SHAO Zheng-kai, MOU Qing-chun, LIANG Shao-dong, WANG Chuang, LI Jin-ku. Department of Neurosurgery, Red Flag Hospital, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of milrinone on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rabbits and its pathogenesis. **Methods** A total of 32 3-month-old Japanese white rabbits were selected and randomly allocated into SAH, control, milrinone, and milrinone + N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) groups ($n=8$ in each group). A SAH model was induced by double injection of autologous blood into the cisterna magna. Isotonic saline was injected into the cisterna magna instead of autoblood in the control group. The others were the same as the SAH model group. At 30 minutes after SAH modeling, milrinone solution 5 mL (30 μ g/kg) were injected via ear vein in the milrinone group; and milrinone solution 5 mL (30 μ g/kg) were injected first, then L-NAME 5 mL (30 μ g/kg) were injected in the milrinone + L-NAME group; 5 mL isotonic saline were injected in the control and SAH groups. The 4 groups were administered continuously for 3 days, once a day. CT angiography (CTA) and transcranial Doppler (TCD) were used to observe basilar artery diameter and blood flow velocity of the animals in each group at day 3 after procedure. **Results** TCD examination showed that the mean flow velocities of the basilar arteries in the control, SAH, milrinone, milrinone + L-NAME groups were 19.4 \pm 1.8, 32.7 \pm 4.2, 17.8 \pm 1.8, and 33.2 \pm 7.2 cm/s, respectively; the peak systolic velocities were 27 \pm 5, 45 \pm

基金项目:黑龙江省卫生厅科研课题(2011-294)

作者单位:157011 牡丹江医学院红旗医院神经外科(王立君、牟青春、梁绍栋、王闯、李金库);哈尔滨医科大学第四临床医学院神经外科(邵正凯)

4, 29 ± 3, and 44 ± 4 cm/s, respectively. CTA examination showed that the diameters of basilar arteries were 1127 ± 140, 772 ± 116, 1113 ± 101, and 802 ± 91 μm, respectively. In comparison with the above indicators among each group, the differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Milrinone has a mitigative effect on cerebral vasospasm after SAH, and its vasodilator effect may be associated with L-NAME inhibit the activities of carbon monoxide synthase.

Key words: Subarachnoid hemorrhage; Cerebral vasospasm; Nitric oxide synthase; Rabbits; Milrinone

30% ~ 70% 的动脉瘤性蛛网膜下腔出血 (aSAH) 患者在出血后会发​​生脑血管痉挛^[1]。极易造成脑组织缺血、缺氧,甚至引起脑梗死等严重并发症。而其引起的延迟性缺血性神经功能障碍多发生于出血后 72 h,甚至可长达 40 d^[2]。目前,预防及治疗 aSAH 是临床研究的热点。米力农 (milrinone, 别名甲氰吡酮,米力酮) 是人工合成的第 2 代磷酸二酯酶抑制剂,兼具有正性肌力作用和血管扩张作用 (动脉和静脉)。已有研究报道,米力农有预防和治疗脑血管痉挛的作用^[3-4],但其扩张脑血管的机制不明。本研究以兔 SAH 模型为基础,研究米力农对 SAH 后脑血管的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

取健康普通级不分雌雄 3 个月龄日本大耳白兔 32 只 (购自哈尔滨医科大学第一临床医学院实验动物中心),体质量 2.3 ~ 2.6 kg。随机分为 SAH 组、对照组、米力农组及米力农 + N-硝基-L-左旋精氨酸甲酯 (L-NAME) 组,每组 8 只。

1.2 兔模型的建立

采用枕大池二次注入自体血建立 SAH 模型^[5-6]。从耳源静脉注射 3% 戊巴比妥钠 (30 μg/mg) 行全身麻醉。取枕后正中直切口,充分暴露环枕筋膜。以 25 G 穿刺针穿刺枕大池,缓慢抽出无色透明脑脊液 1 ml 后,由助手自一侧耳中央动脉按 1 ml/kg 体质量抽吸自体动脉血,以 1 ml/min 的速度缓慢注入枕大池。期间严密监测呼吸、心率等生理指标。注血完毕,以明胶海绵压迫局部片刻防止血液溢出,用庆大霉素冲洗切口,彻底止血后逐层缝合。注血兔保持头低位 30° 约 30 min,使血液均匀分布于枕大池。手术期间,由保温毯维持兔体温在正常范围。首次注血后第 2 天重复上述步骤。对照组枕大池内注入等量等渗盐水,其他操作同模型组。SAH 兔在枕

大池注血后出现不同程度的萎靡、少动、被毛污秽,但正常进食和运动未受影响。

枕大池二次注血后 30 min,对 SAH 组兔由耳源静脉注射等渗盐水 5 ml。米力农组:耳源静脉注射米力农溶液 (鲁南制药集团 5 mg/5 ml) 30 μg/kg,等渗盐水稀释至 5 ml。米力农 + L-NAME 组,先经耳源静脉注射米力农溶液 (30 μg/kg),再注射 L-NAME (30 mg/kg,美国 Sigma 公司),共 5 ml (等渗盐水稀释)。4 组均连续给药 3 d,1 次/d。

1.3 SAH 模型及米力农药效评价

1.3.1 经颅多普勒超声 (TCD) 检测基底动脉血流速度:于 SAH 后第 3 天处死兔前,采用德国 Ueberlingen 公司 TCD 仪行脑血流评价。以氯胺酮 (50 mg/kg) 肌内注射麻醉。将兔取俯卧位固定于检查台。采用 4-MHz 脉冲探头沿后颈部中线指向口鼻方向,反复调整倾斜角度并调节增益条件,探寻基底动脉血流信号。记录基底动脉的平均血流速度 (mean flow velocity, MFV) 和收缩期峰值流速 (peak systolic velocity, PSV)。

1.3.2 CT 血管造影 (CTA) 测量基底动脉管径:将兔俯卧位固定于影像检查台。取非注药侧耳行耳源静脉穿刺,连接高压注射器。注入非离子型对比剂碘海醇 (0.5 ml/s, 碘含量 300 mg/ml)。扫描参数:电压 120 kV, 电流 80 mA, 层厚 2 mm, 像素 512 × 512, 延时 18 s。扫描结束后,静脉注射等渗盐水 10 ml (促进对比剂排出),待一般状态稳定后送回动物室。采用最大密度投照技术 (maximum intensity projection, MIP) 重建脑血管图像。分别测量基底动脉上段 (基底动脉末端分叉处)、中段 (上、下段之间中点) 和下段 (左、右椎动脉汇合成基底动脉处) 三处血管直径,取三点的平均值作为基底动脉管径。采用盲法由专业影像学医师对影像结果进行评价。

1.4 统计学分析

采用 SAS 6.0 统计软件包处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验兔在手术操作及注药后均存活,兔在枕大池注血后出现不同程度的萎靡、少动,无神经功能缺损。4 只兔在注血过程中发生呼吸骤停,经紧急心肺复苏后恢复良好,未遗留神经系统并发症。另有 2 只兔在 CTA 注药过程中出现耳廓血肿。

2.2 基底动脉血流速度变化

术后第 3 天,TCD 检测显示,SAH 组基底动脉平均 MFV 和 PSV 均高于对照组和米力农组,差异均有统计学意义;对照组与米力农组比较,MFV 和 PSV 差异均无统计学意义。而米力农 + L-NAME 组 MFV 和 PSV 明显高于对照组和米力农组,接近于 SAH 组。见表 1 图 1。

2.3 基底动脉管径变化

术后第 3 天,CTA 检测结果显示,SAH 组基底动脉平均管径明显细于对照组和米力农组,差异均有统计学意义 $P < 0.01$,而且呈串珠样血管痉挛改变。对照组与米力农组比较,血管管径差异无统计学意义。而米力农 + L-NAME 组基底动脉管径明显细于对照组和米力农组,接近于 SAH 组, $P < 0.01$,见表 1 图 2。

表 1 大白兔术后第 3 天基底动脉血流速度及管径的比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 兔数 (只) | MFV (cm/s) | PSV (cm/s) | 基底动脉管径 (μm) |
|----------------|--------|--------------------|--------------------|--------------------------|
| 对照组 | 8 | 19.4 ± 1.8 | 27 ± 5 | 1127 ± 140 |
| SAH 组 | 8 | 32.7 ± 4.2 | 45 ± 4 | 772 ± 116 |
| 米力农组 | 8 | 17.8 ± 1.8 | 29 ± 3 | 1113 ± 101 |
| 米力农 + L-NAME 组 | 8 | 33.2 ± 7.2 | 44 ± 4 | 802 ± 91 |
| F 值 | | 39.42 ^a | 26.04 ^a | 19.41 ^a |

注: ^a $P < 0.01$

3 讨论

目前,米力农广泛应用于治疗急性心力衰竭(充血性心衰)患者^[7]。有关米力农正性肌力作用主要是通过抑制磷酸二酯酶^[8],使心肌细胞内环磷酸腺苷浓度增高,激活多种蛋白激酶,使肌浆网上的电压依赖性钙通道开放,钙离子大量释放到胞浆,从而使收缩期心肌细胞胞质内的钙离子浓度增加,提高心肌收缩力,增加心排血量。与心肌细胞相反,血管平滑肌细胞中的环磷酸腺苷水平增高后,激活蛋白激酶使钙离子外流,钙离子内流受阻,收缩期血管平滑肌细胞内钙离子浓度下降,平滑肌兴奋收缩偶联过程

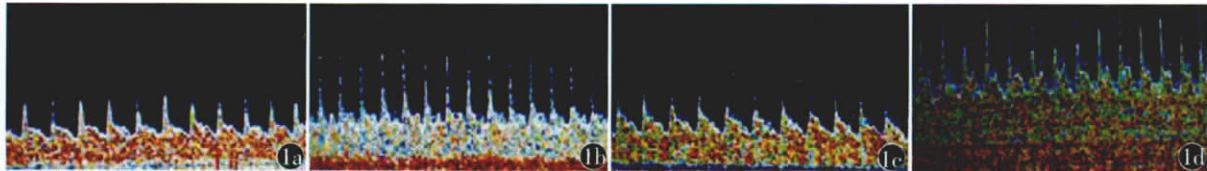


图 1 TCD 检测兔基底动脉血流速度结果 1a~1b 分别为对照组、SAH 组、米力农组、米力农+L-NAME 组,SAH 组兔血流速度高于对照组和米力农组,米力农+L-NAME 组的 MFV 和 PSV 较米力农组明显增高,接近 SAH 组

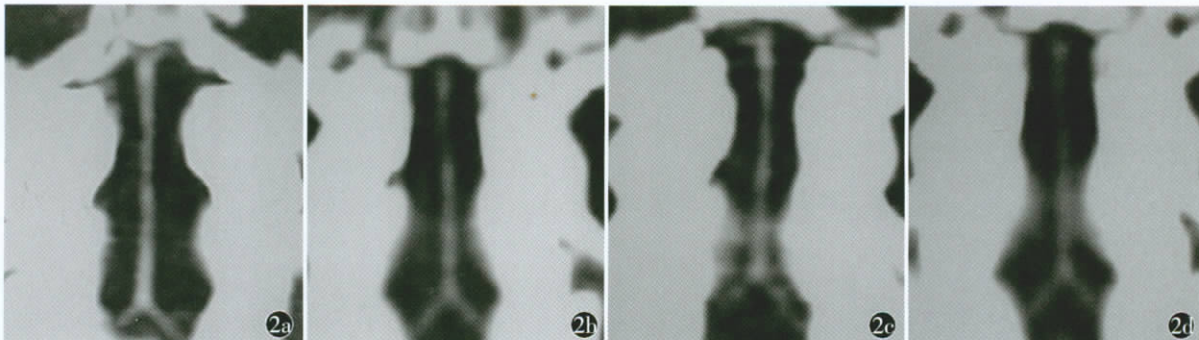


图 2 CTA 检测兔基底动脉管径结果 2a~2b 分别为对照组、SAH 组、米力农组、米力农+L-NAME 组,SAH 组管径比对照组和米力农组变细,痉挛血管呈串珠样改变。米力农 + L-NAME 组管径较米力农组变细

受抑制,动、静脉血管扩张。相关研究显示,米力农的血管扩张作用是直接作用于小动脉,可以直接缓解血管的痉挛状态。与尼莫地平的舒张血管相比,其作用更强,在改善心脏功能及增加血流灌注的同时,对心率和平均动脉压没有明显的影响^[9]。

目前,国内将米力农用于治疗脑血管痉挛的动物和临床研究均较少。国外 Khajavi 等^[10]应用犬制作 SAH 后慢性脑血管痉挛模型,通过静脉内注射米力农,连续应用 8 d。脑血管造影显示,血管管径及血流动力学均明显改变。该研究认为,米力农能有效预防犬 SAH 后慢性脑血管痉挛,这种作用不依赖于整体血流动力学的改变,但具体机制不明。以后陆续有研究者将米力农应用到临床研究。Fraticeili 等^[3]选择 22 例经造影证实的 aSAH 后脑血管痉挛(狭窄率 >40%) 的患者,先动脉注射米力农到脑血管痉挛区域,然后连续静脉注射该药 14 d。结果显示,动脉注射米力农后,可使痉挛血管管径扩张(53±37)%。尽管引起轻度心率加快,但整体的动脉血压没有改变。Shankar 等^[11]连续纳入 15 例造影证实的 SAH 后脑血管痉挛患者,动脉内给予米力农治疗,造影观察前循环动脉痉挛的改善情况。结果显示给予米力农后,大脑中动脉 M1 段及大脑前动脉 A1、A2 管径均改善。但上述研究均未对米力农改善 SAH 后脑血管痉挛的作用机制进行研究。

本研究采用兔枕大池二次注血法制备 SAH 后脑血管痉挛模型,采用 CTA 和 TCD 客观指标评价米力农对基底动脉管径及血流动力学的影响,并观察一氧化氮合酶抑制——L-NAME 对米力农扩血管作用的影响。结果显示,应用米力农后,对 SAH 兔脑血管痉挛无论是血管管径、血流速度均有所改善,提示米力农确实有改善脑血管痉挛的作用。在米力农基础上,继续给予一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 后,血管管径变细、血流速度变慢,提示 L-NAME 可能通过抑制一氧化氮合酶的活性抑制米力农的扩血管作用。

本研究仅就米力农对 SAH 后脑血管痉挛改善作用的机制作了初步研究,进一步的研究仍在进行中。

参考文献

[1] Kassell NF, Torner JC, Haley EC Jr, et al. The Interna-

tional Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: overall management results [J]. J Neurosurg, 1990, 73(1): 18-36.

- [2] Pluta RM. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment [J]. Pharmacol Ther 2005, 105(1): 23-56.
- [3] Fraticelli AT, Cholley BP, Losser MR, et al. Milrinone for the treatment of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke, 2008, 39(3): 893-898.
- [4] Romero CM, Morales D, Reccius A, et al. Milrinone as a rescue therapy for symptomatic refractory cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Neurocrit Care 2009, 11(2): 165-171.
- [5] Pluta RM, Jung CS, Harvey-White J, et al. In vitro and in vivo effects of probucol on hydrolysis of asymmetric dimethyl L-arginine and vasospasm in primates [J]. J Neurosurg 2005, 103(4): 731-738.
- [6] Zhou ML, Shi JX, Zhu JQ, et al. Comparison between one- and two-hemorrhage models of cerebral vasospasm in rabbits [J]. Neurosci Methods 2007, 159(2): 318-324.
- [7] Bayram M, De Luca L, Massie MB, et al. Reassessment of dobutamine, dopamine, and milrinone in the management of acute heart failure syndromes [J]. Am J Cardiol 2005, 96(6A): 47-58.
- [8] Honerjäger P. Pharmacology of bipyridine phosphodiesterase III inhibitors [J]. Am Heart J, 1991, 121(6 Pt 2): 1939-1944.
- [9] Harris AL, Grant AM, Silver PJ, et al. Differential vasorelaxant effects of milrinone and amrinone on contractile responses of canine coronary, cerebral, and renal arteries [J]. J Cardiovasc Pharmacol 1989, 13(2): 238-244.
- [10] Khajavi K, Ayzman I, Shearer D, et al. Prevention of chronic cerebral vasospasm in dogs with milrinone [J]. Neurosurgery, 1997, 40(2): 354-362.
- [11] Shankar JJ, dos Santos MP, Deus-Silva L, et al. Angiographic evaluation of the effect of intra-arterial milrinone therapy in patients with vasospasm from aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Neuroradiology, 2011, 53(2): 123-128.

(收稿日期: 2013-01-06)

(本文编辑: 张学锋)