

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

小分子肝素在小鼠腦缺血的影響

**The effect of low molecular heparin on experimental
cerebral ischemic in a rat model**

計劃編號：N S C 88-2314-B-002-131

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：廖漢文

執行機構及單位名稱：台大醫學院放射線科

一、 中文摘要：

長期以來，肝素被使用作為抗凝劑及治療血管栓塞。然由於一般傳統使用的肝素分子較大、其只能作用於血管腔內。但近年來有所謂小分子肝素的發明，其分子大小為原來的約三分之一。此一種肝素有被使用於治療腦中風缺血病人，並報告有較佳的預後結果。唯其機轉仍未明瞭。吾等設計使用小白鼠中腦動脈缺血模型作研究比較傳統肝素和小分子肝素對梗塞大小的影響及其預後結果。此實驗共分五組，分別為：對照組，栓塞一小時組，栓塞四小時組、後兩組分別再施以傳統肝素和小分子肝素治療。在治療一天後評估彼等組織學上梗塞範圍的大小差異。以瞭解彼等臨床差異的基本機轉。

結果：在以小分子肝素治療的一小時梗塞實驗組在從較上明顯的梗塞面減少（ $0.13\text{cc} \pm 0.07$ vs $0.27\text{cc} \pm 0.11$ ），但在以小分子肝素治療的四小時梗塞實驗組的差異並不明顯（ $0.24\text{cc} \pm 0.14$ vs $0.30\text{cc} \pm 0.05$ ）。

關鍵詞：腦缺血、梗塞、動物、肝素

二、英文摘要

Shortly after the ischemic attack (<6 hours), we can use different kinds of medicine, or instruments to re-build the cerebral circulation, and this possibly reduces the neurological deficit, and also the burden of the family and the society.

Heparin is a kind of anti-coagulant. It has been used for the treatment of vascular occlusion for a long time. However, since the molecules of conventional heparin (CH) is large, and they can be used only in intravascular route. Low molecular weight heparin (LMWH) has a molecular size as small as 1/3 of the CH. It has been used in the treatment of cerebral ischemic stroke, and has a better outcome though its mechanism is unclear. In this study, we plan to compare the effect of CH and LMWH in a cerebral ischemia rat model. The animal will be divided into the following groups: (1) sham-control; (2) ischemia for 1 hour then treated with CH, (3) ischemia for 1 hours then treated with LMWH, (4) Ischemia for 4 hours then treated with CH, (5) Ischemia for 4 hours then treated with LMWH. The animals will be sacrificed 1 day later after a neurlogical evaluation. We compared their histologic infarct volume with statistic methods.

Result: The different between the treatment with LMWH and conventional heparin in the groups with 1 hour ischemia is significant ($0.13\text{cc} \pm 0.07$ vs $0.27\text{cc} \pm 0.11$). However, the different in the groups with 4 hours ischemia is not significant ($0.24\text{cc} \pm 0.14$ vs $0.30\text{cc} \pm 0.05$).

KeyWords: Cerebral Ischemic, Infarct, animal, heparin

緣由與目的

腦血管患疾從 1963 年 1981 年，一直高居於我國十大死因之首位。到 1982 年以後，才僅次癌症，退居於第二位。而根據行政院衛生署的統計，在我國每年約有一萬五千入死於腦血管患疾，佔所有死亡人數的六分之一[1]。另外，腦血管患疾也是引發殘障的首位病因[2]因而造成了很大的社會負擔。在所有的腦血管患疾中，又可分為缺血性及出血性兩方面的問題。一般而言以缺血性的問題為多，在美國因栓塞或血栓而造成的腦梗塞，佔所有腦血管患疾的 75%[3]，而我國比率雖較低，但是也有 58%[4]。另外有些出血性的問題，如顱內動膜瘤破裂之病人，在出血後會引起腦血管的攣縮(vasospasm)，也會轉變成腦缺血的症狀。此類病人，約佔所有腦血管患疾的 6%左右[5]。至於在外科方面，有時須在開刀當中暫時的或永遠的將腦血管結紮，也會引起缺血的症狀。

論及有關腦缺血的治療，則要先考慮到腦缺血產生後，腦梗塞演化的病理。在缺血的初期，直接由受阻血管所灌流的腦組織細胞，會因灌流的不足，而很快的在幾分鐘內壞死，此為缺血中心核(ischemic core)。缺血性傷害是由於很多不同病理變化所合成，其最終結果乃由非血流變少再加上其他併發現象而加劇其新陳代謝的變化。目前所知其主要幾種機轉包括：

- 1.free radical – mediated membrane injury[6,7]
- 2.uncoupling of oxidative respiration [8,9]
- 3.inflammatory reactions [10]
- 4.perifocal depolarizations [11,12]
- 5.induction of suicidal genomic responses [13,14]

雖然上述各種機轉均涉及相當複雜及連鎖性反應，但目前被公認最早的變化應在 receptors 與 ion channels 的活化或不活化作用。因此目前的治療研究均集中於這些的調整 receptors 的靈敏度或 ion 的傳導。在眾多的機轉中，有關鈣流 (calcium fluxes)或鈣 channel 有關的研究有相當重大意義。目前也知有許多 calcium blocker 藥物有可經由此機轉而影響腦缺血的治療。傳統肝素 (CH)被使用作為治療或預防血管栓塞已多年。其分子量為 12,000，不能通過 BBB，故通常只有在血管內注射用，而其對腦缺血的效果並不如想像中理想。近年來有小分子的肝素 (LMWH)的發現，只截其有效功能一段，分子量只有 4,500。根據臨床上的報告，LMWH 對不同的部位缺血均有較佳之療效。對腦缺血疾病者，甚至有報告使用 LMWH 者有更好的預後。但其機轉或理論仍未十分明瞭。但有研究指出對腦缺血的療效可能來自其對 IP3 (inositol-1,4,5-triphosphate) receptors 的阻斷，而使 glutamate- induced calcium 的釋放不會發生。本研究的目的是經由動物模型研究比較 CH 與 LMWH 兩者在臨床預後與組織學上梗塞大小與位置的關係。

Methods and Materials

以體重在 200-250 gm 間之雄性 Spontaneous hypertensive rats 50 隻作為研究之對象。老鼠於購入後，經飼養至 20 週大或體重達到要求者時方進行實驗。實驗擬分四組，包括對照組一組及實驗組五組，每組 10 隻。

對照組: 接受手術但不給予中大腦動脈阻塞。

實驗組: 共分為四小組，其中兩組接受手術及給予中大腦動脈阻塞 1 小時，另一組為 4 小時後，予以肝素治療。彼等分別各有給予 CH 和 LMWH 治療。CH 的給予乃使靜脈注射(400IU/kg body weight per day for 1 days)，而 LMWH 乃使用皮下注射(2000Axa ICU/kg)。

所有動物於實驗時皆以 50 gm/kg i.p. Ketamin 及 10 mg/kg i.m. Xylazine 作麻醉，麻醉後於頸部進行氣管切開，並以 14 號靜脈內導管作氣管插管，並連接小動物呼吸器，以控制其呼吸，使其動脈血二氧化碳分壓維持在 35-40 mmHg 之間。實驗中動物置於電毯之上，保持其體溫於 37.5 C。其後於右側股動脈與股靜脈各插入一條 PE-50 導管，以作為監測血壓，注射藥物及抽血用。動物之動脈導管連接接於多頻導記錄儀(Gould polygraphy)，於實驗中連續記錄其心跳及血壓，並記錄其血糖，血酸鹼度，及血球容積率。

三. 中大腦動脈阻塞

1. 麻醉: Ketamin 50gm/kg I.P. 仰躺固定，從中線切開
2. 分開 diaphragm, sternomastoid 和 omohyoid muscles, expose the fibrous sheath of common carotid artery
3. 把 external carotid artery ligation 於 0.5cm 處
4. 以 3 條縫線繫住 proximal external carotid, proximal internal carotid, and common carotid artery
5. 把微細線 (diameter:0.009inc, 0.22mm, nitinol alloy)從 external carotid artery 切開處送入至 common carotid, 再轉入 internal carotid artery, 並繼續送至約 3.2 - 3.5 公分或有阻力為止。
6. 並以 X 光確認之。

四. 臨床評估

使用所採的鼠神經評估系統。主要分為四級：

- 1、 正常為 grade 0

- 2、 中等障礙為 grade 1，表現為前肢彎曲
- 3、 重度障礙 grade 2 時不能在側推時站穩，
- 4、 重度障礙 grade 3 時為行走時繞著無力側轉圈。

五 組織染色與體積計算

在 2 4 小時後把在動物犧牲，其下腦部，取冠切面並每半公分切開。組織染色使用一般的 2% TTC(2,3,5- triphenyltetrazolium chloride)，在 37. C 時溫熱三十分鐘後取出。有梗塞處沒有染色，但正常部份會被染成深紅色。使用 M G D S 系統 (中睿科技)，可直接在切面上計算梗塞部份面積及推算體積。

六. 結果分析統計

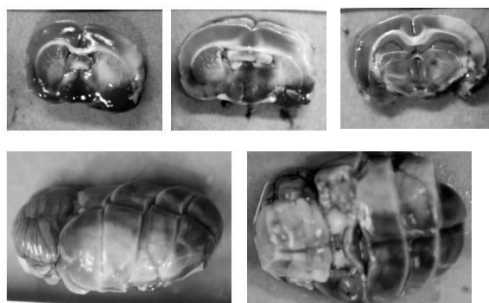
針對不同時間的缺血-治療，計算出其相關梗塞體積大小作比較。統計分析使用 Student's t test 比較彼等 means，以 paired t tests 來分析 longitudinal changes。

Results

全部四十隻動物中成功完成實驗為三十一隻，九隻死於實驗腦中風過程中或麻醉。

三十一隻動物中十八隻乃梗塞一小時後給藥者，十三隻乃梗塞四小時者。其分佈如下：

	梗塞一小時	梗塞四小時
一般肝素	九隻	八隻
小分子肝素	九隻	五隻

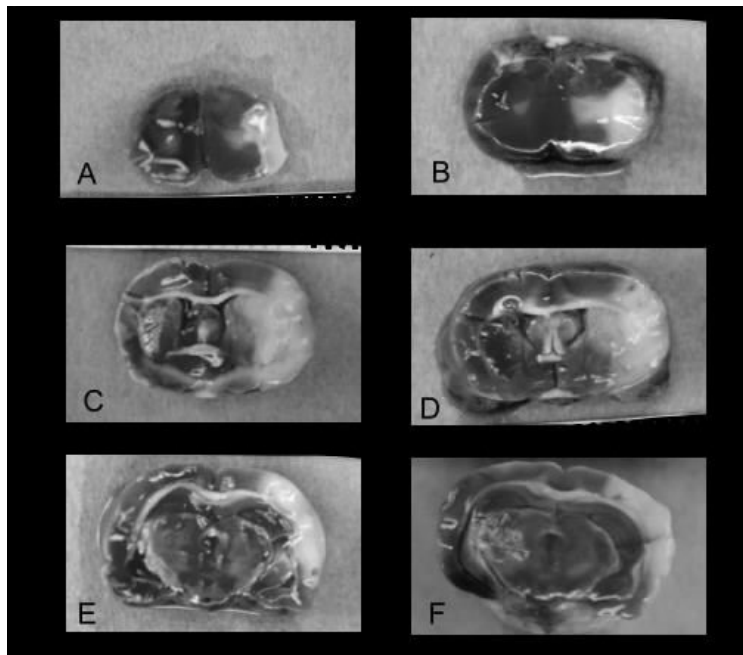


圖一：標準栓塞一小時後只給予一般肝素廿四小時後的圖樣，較灰暗部份乃 T C 不能染色者代表梗塞區。此和梗塞四小時相若。

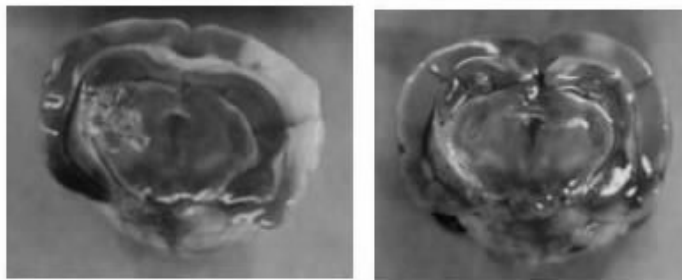
梗塞面積計算使用在 caudoputamen 位置大小的差異為

梗塞一小時,	梗塞一小時,	梗塞四小時,	梗塞四小時,
--------	--------	--------	--------

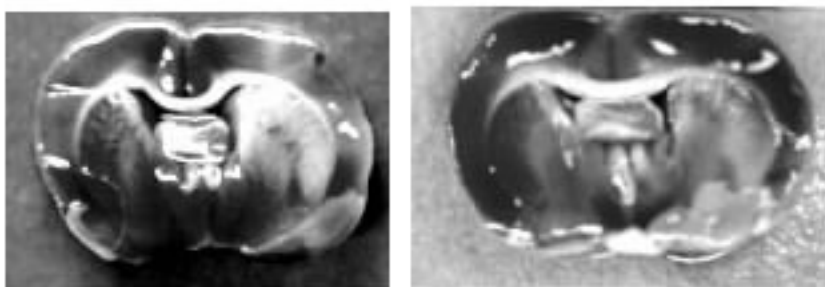
一般肝素	小分子肝素	一般肝素	小分子肝素
0.27cc ± 0.11	0.13cc ± 0.07	0.30cc ± 0.05	0.24cc ± 0.14



圖二：由 A 至 F 代表連續六個切面的梗塞大小。說明如圖一。



圖三：左圖使用一般肝素，右圖為使用小分子肝素者，梗塞面積相差達百分之八十。



圖四：梗塞四小時二例使用小分子肝素者，左圖之梗塞範圍較多，而右圖者只有 putamen 及下外皮質部份。

討論

小分子肝素在急性腦缺血時降低腦梗塞範圍及功能障礙。但必須在早期給予。否則無效。又一般肝素並無此效果。可能小分子肝素也有所謂 neuroprotection 的功效。此有待其作用機轉的研究。其是作用於 ischemic necrosis 或 apoptosis , 抑兩者均有影響。

References:

1. 洪祖培: 行政院衛生署腦管患查疾調查報告 , 1987.
2. Wolf PA, Kannel WB: Current status of risk factors for stroke, in Barnett HJM (ed): Neurologic Clinicas, Philadelphia, Saunders Co. pp313-343, 1983.
3. Harrison MJ, Kyken ML: Cerebral vascular disease. Butterworths, London. pp 27-44, 1987.
4. Hung TP: Hypertensive intracerebral hemorrhage in Taiwan: Update on Management, in Mizukami M (ed) Hypertensive intracerebral hemorrhage, Raven Press, pp 115-122, 1983.
5. Heros RC, Zervas NT: Cerebral vasospasm, an update. Ann Neurol 14: 599-608, 1983.
6. Siesjo BK, Agardh C-D, Bengtsson F. Free radicals and brain damage. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1:165-211,1989.
7. Cchmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. Stroke 21:1086-1090,1990
8. Katsura K, Kristian T, Siesjo BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. Biochem Coc Trans 22:991-996,1994
9. Abe K, Aoki M, Kawagoe J, Yoshida T, Hattori A, Kogure K, Itoyama Y. Ischemic delayed neuronal death-a mitochondrial hypothesis. Stroke 26:1478-1489,1995.
10. Shiga Y, Onodera H, Kogure K, Yamasaki Y, Yashiima Y, Syozuhara H, Sendo F . Neutrophil as a mediator of ischemic edema formation in the brain. Neurosci Lett 125:110-112,1995
11. Iijima T, Mies G, Hossmann K-A . Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury. Jcereb Blood Flow Metab 12:727-733,1992
12. Nedergaard M, Hansen AJ . Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 13:568-574,1993
13. Charriaut-Marlangue C, Margaille I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. J Cereb Blood Flow Metab 16:186-194,1996
14. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW. Very delayed infarction after

- mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* 16:195-201, 1996
15. Caplan LR. To heparinize or not: an unsettled issue. *Stroke* 20:173-174,1989
 16. Prandoni P, Lensing AWA, Buller HR, et al. Comparison of subcutaneous low-molecular-weight heparin with intravenous standard heparin in proximal deep-vein thrombosis. *Lancet* 339:441-445,1992
 17. Kakkar VV, Cohen TC, Edmonson RA, et al. Low molecular weight versus standard heparin for prevention of venous thrombembolism after major abdominal surgery. *Lancet* 341:259-265,1993
 18. Leizorovic A, Simonneau G, Decousus H, Boissel JP. Comparison of efficacy and safety of low molecular weight heparins and unfractionated heparin in initial treatment of deep venous thrombosis: a meta-analysis. *BMJ* 309:299-304,1994

 19. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummings R: Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91, 1989.
 20. Memezawa H, Minamizawa H, Smith ML, Seijo BK: Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in rat. *Exp Brain Res* 89: 67-78, 1992.
 21. Nagasawa H, Hogure K: Correlation between cerebral blood flow and histological changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 20: 1037-1043, 1989.
 22. Bose B, Osterholm JL, Berry R: A reproducible experimental model of focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 311: 385-391, 1984.
 23. Dejana E, Villa S, de Gaetano. Bleeding times in rats: a comparison of different experiental conditions. *Thromb. Haemost*;48:108,1982.
 24. Jonas S, Surgimore M, Llinas R. Is low molecular weight heparin a neuroprotectant. *AA N Y Acad Sci* 825: 389-393.1997.