(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103356521 A
(43)申请公布日 2013.10.23

(21)申请号 201210094705.5

(22)申请日 2012.04.01

(71)申请人 石药集团恩必普药业有限公司
地址 052160 河北省石家庄市经济技术开发区扬子路88号
申请人 石药集团有限公司

(72)发明人 陈应柱 黄憝 曹菊林 常猇宇

(51)Int.Cl.
A61K 31/365(2006.01)
A61K 31/665(2006.01)
A61K 31/192(2006.01)
A61P 39/00(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图3页

(54)发明名称

丁苯酞或其衍生物在制备治疗或预防放射性脑损伤的药物中的应用

(57)摘要

本发明公开了丁苯酞或其衍生物在制备治疗或预防放射性脑损伤的药物中的应用，公开了丁苯酞治疗放射性脑损伤的作用机制为：丁苯酞能改善辐射损伤脑组织中氧自由基平衡，减轻氧自由基的损伤作用；能通过降低大鼠全脑照射后循环内皮细胞数，降低了放射性脑损伤大鼠血脑屏障的通透性，对放射性脑损伤有保护作用，也即丁苯酞的作用靶细胞主要是血管内皮细胞；能调节AQP4作用从而保护血脑屏障。

CN 103356521 A

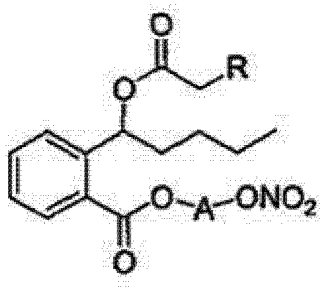
1. 丁苯酞或其衍生物在制备治疗或预防放射性脑损伤的药物中的应用。

2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述丁苯酞为消旋丁苯酞或左旋丁苯酞。

3. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述衍生物为消旋或左旋 3-（3’-羟基）-丁基苯酞，消旋或左旋 3-羟基 -3-丁基苯酞，消旋或左旋 2-（1-羟正戊基）苯甲酸。

4. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述衍生物为在体内代谢为消旋丁苯酞或左旋丁苯酞，消旋或左旋 3-（3’-羟基）-丁基苯酞，消旋或左旋 3-羟基 -3-丁基苯酞，消旋或左旋 2-（1-羟正戊基）苯甲酸的化合物。

5. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述衍生物结构式如式 I 所示：



I

其中 A 为 C_2-C_8 烷基、C_2-C_8 烯烃基、C_2-C_8 炔烃基、苯基或取代苯基、芳杂环或取代芳杂环；所述取代苯基被 1 个或多个选自于羟基、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、-CH=CHCOO（CH_2）$_n$，n=2-6 取代的苯基，各取代基可以相同或不同；所述芳杂环为 1 至 4 个杂原子的 5 至 7 元芳香环，所述杂原子独立的选自 O、S 或 N；所述取代芳杂环可任选被 1 个或多个选自于 C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基或卤素取代，各取代基可以相同或不同；

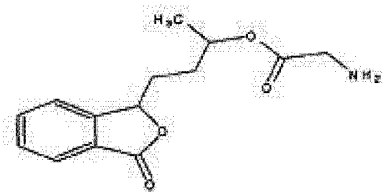
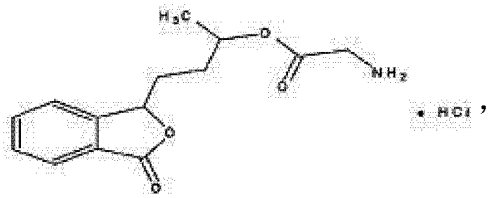
R 为二甲胺、二乙胺、吡咯、哌啶、吗啉、哌嗪、N-甲基哌嗪、N-乙基哌嗪、N-异丙基哌嗪、N-苯基哌嗪、N-苄基哌嗪或 N-叔丁氧羰基哌嗪。

6. 根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述衍生物包括［2-（1-吗啉基乙酰氧）正戊基］苯甲酸-｛ 2-甲氧基 -4-［2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］｝苯酯、［2-（1-哌啶基乙酰氧）正戊基］苯甲酸-｛ 2-甲氧基 -4-［2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］｝苯酯、［2-（1-二乙胺基乙酰氧）正戊基］苯甲酸-｛ 2-甲氧基 -4-［2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］｝苯酯、［2-（1-二乙胺基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -4-［2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］苯酯、［2-（1-吗啉基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -4-［2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］苯酯、［2-（1-二乙胺基乙酰氧）正戊基］苯甲酸-（4-硝氧）丁酯、［2-（1-吗啉基乙酰氧）正戊基］苯甲酸-（4-硝氧）丁酯、［2-（1-哌啶基乙酰氧）正戊基］苯甲酸-（4-硝氧）丁酯、［2-（1-二乙胺基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -［4-（2-硝氧乙基）］苯酯、［2-（1-哌啶基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -［4-（2-硝氧乙基）］苯酯、［2-（1-吗啉基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -［4-（2-硝氧乙基）］苯酯。

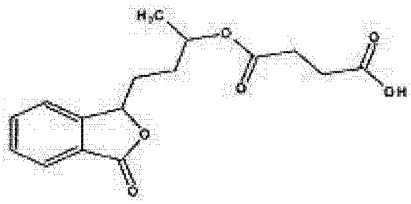
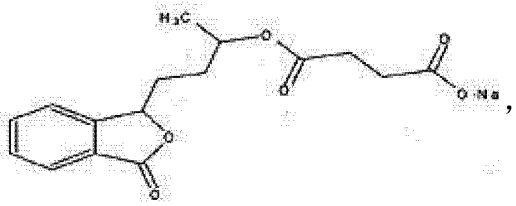
7. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述衍生物为 3-（3’-羟基）-丁基苯酞酯及盐。

8. 根据权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述衍生物为：

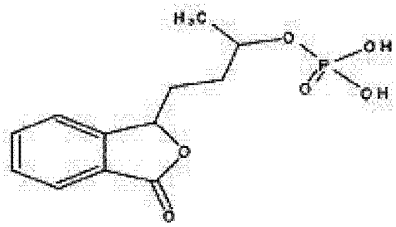
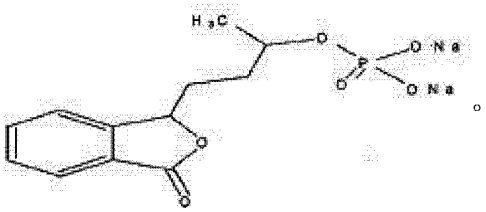
3-(3’-甘氨酸酯)-丁基苯酞及其盐酸盐：

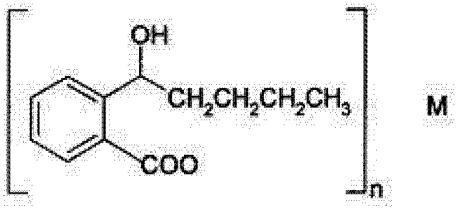
3-(3'-琥珀酸酯)-丁基苯酞及其钠盐：

3-(3'-磷酸)-丁基苯酞及其二钠盐：

9. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述衍生物结构式如式Ⅱ所示：



Ⅱ

其中，M 为一价金属离子或是二价金属离子，n=2 或 n=3。

10. 根据权利要求 9 所述的应用，其特征在于，所述 M 为钾离子、钠离子、锂离子、钙离子、镁离子或锌离子。

丁苯酞或其衍生物在制备治疗或预防放射性脑损伤的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药物用途领域，具体涉及丁苯酞或其衍生物在制备治疗或预防放射性脑损伤的药物中的应用。

背景技术

[0002] 放射性脑损伤是颅内肿瘤、脑血管畸形、头颈部恶性肿瘤治疗后产生的一种常见的并发症，可导致患者的生活质量下降。随着直线加速器、X 刀、γ 刀、光子刀、组织间近距离放疗等放射技术在临床工作中的广泛应用，放射性脑损伤的发病率也逐渐提高。本病在临床上容易被忽视、或者被误诊肿瘤转移或者复发，影响了本病的早期诊断与治疗。

[0003] 放射性脑损伤的发病机制目前尚无统一的定论，主要有血管损伤、胶质细胞损伤、神经元损伤和自身免疫反应等学说。目前关注的焦点主要集中在前两种。Belka C,Budach W, Kortmann RD, et al. Radiation induced CNS toxicity -molecular and cellular mechanisms. Br J Cancer, 2001,85:1233-123 公开了，关于有血管损伤、神经干细胞、少突胶质细胞 -2 型星型胶质前体细胞 (O-2A 细胞) 与成熟少突胶质细胞数目减少和细胞因子表达异常等四个方面因素参与的观点已被普遍接受。Romero AA, Gross SR, Cheng KY, et al. An age-related increase in resistance to DNA damage-induced apoptotic cell death is associated with development of DNA repair mechanisms[J]. J Neurochem,2003,84(6): 1275 -1287 公开了，少突胶质细胞和血管内皮细胞是放射性脑损伤的重要靶细胞。

[0004] 放射性脑损伤分为三个阶段：急性放射损伤、早期迟发放射损伤、晚期放射损伤。急性放射损伤的表现，脑水肿、颅内压增高及一过性神经功能障碍等；早期迟发放射损伤的表现，嗜睡、神经功能障碍等；晚期放射损伤的表现，一侧肢体运动、感觉或神经反射障碍、失语、癫痫、意识障碍、神经异常、记忆力减退、注意力降低、痴呆等。

[0005] 关于放射性脑损伤的治疗主要有药物治疗、高压氧和手术三种方法。其中药物最初的治疗以皮质醇为主，其机制为抗炎、消水肿、减少细胞因子释放、抑制免疫反应。其有助于稳定毛细血管的完整性，但不能阻止放射性脑损伤的临床进程。在早期以脑水肿为主要表现时，激素治疗是有效的，通常疗程长，多超过 3 个月，故增加了一些并发症的风险，如感染、近端肌无力、骨质疏松等。还有研究报道用神经节苷酯 (GM1) 治疗放射性脑损伤的患者虽收到了较好的效果，但因其作用机制不明确，用药后的不良反应无法预知。

[0006] 高压氧，可提高组织氧分压，刺激内皮生长因子生成，激活细胞及血管修复机制。Feldmeier 等分析 74 例有关高压氧治疗放射性脑损伤的报道，其中 67 例报道有治疗或预防效果，未使用高压氧的病例常需外科治疗。因而认为，高压氧可作为放射性脑损伤的常规治疗，并与药物治疗同时进行。然而，如果不正确使用会存在一些不安全因素，如易燃、易爆、气压伤等并发症的发生。

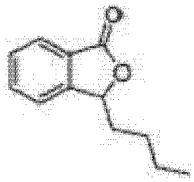
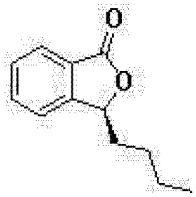
[0007] 手术治疗，放射性脑坏死患者如果出现进行性神经功能障碍，颅内压增高，长期依

赖激素治疗，影像学提示广泛性脑水肿和占位效应，可行手术治疗，切除坏死组织。当肿瘤复发与放射性脑坏死难以鉴别，而病灶占位效应又较明显时，也应积极手术切除病灶。但开颅手术相对风险高、成功率低、费用高。

[0008] 综上所述，现有技术中对于放射性脑损伤病的药物治疗方式缺少疗效好、作用机理明确、使用安全的药物，迫切需要扩充备选药物，以供临床选择。

发明内容

[0009] 丁苯酞（3- 正丁苯酞）又名芹菜甲素，是从芹菜籽中分离出来的一种有效成分，消旋丁苯酞和左旋丁苯酞已作为一种多靶点抗脑缺血药用于临床。

[0010]  ， 

丁 苯 酞 左 旋 丁 苯 酞

。

[0011] 另外，中国发明专利 CN1565441A 于 2005 年 1 月 9 日公开了左旋正丁基苯酞的预防和治疗痴呆的用途；中国专利发明 CN1863523A 于 2006 年 11 月 15 日公开了左旋丁苯酞在制备预防和治疗脑梗塞的药物中的应用；马轶涛、周远鹏，氨丁苯酞对血小板聚集功能的影响，中国药理学通报，2000（01），公开了丁苯酞的结构衍生物氨丁苯酞对血小板聚集功能的影响。

[0012] 发明人在研究中意外发现了丁苯酞或其衍生物在放射性脑损伤疾病的治疗中效果显著，并揭示了丁苯酞治疗或预防放射性脑损伤的作用机制为：丁苯酞能改善辐射损伤脑组织中氧自由基平衡，减轻氧自由基的损伤作用；丁苯酞通过降低大鼠全脑照射后循环内皮细胞数，降低了放射性脑损伤大鼠血脑屏障的通透性，对放射性脑损伤有保护作用，也即丁苯酞的作用靶细胞主要是血管内皮细胞；丁苯酞调节水通道蛋白 4（AQP4）作用从而保护血脑屏障，丁苯酞或其衍生物可用于制备治疗或预防放射性脑损伤的药物。

[0013] 因此，本发明的主要目的在于揭示丁苯酞或其衍生物对放射性脑损伤的治疗作用。

[0014] 本发明的另一目的在于克服现有技术中没有预防放射性脑损伤患病的可选药物，相对于治疗该病，预防的意义远大于治疗。

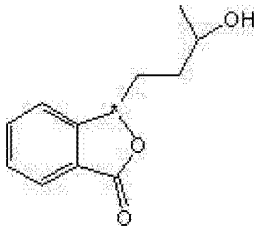
[0015] 本发明上述目的通过以下技术方案予以实现：

丁苯酞或其衍生物在制备治疗或预防放射性脑损伤的药物中的应用。

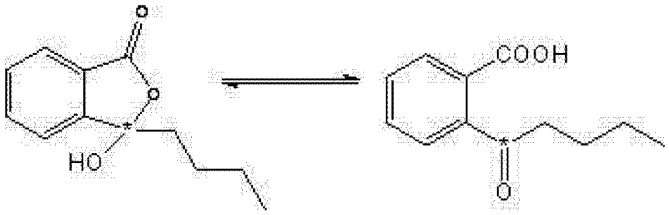
[0016] 进一步地，所述丁苯酞为消旋丁苯酞或左旋丁苯酞。

[0017] 进一步地，所述丁苯酞衍生物为消旋丁苯酞或左旋丁苯酞的代谢产物，即消旋或左旋 3-（3’- 羟基）- 丁基苯酞和消旋或左旋 3- 羟基 -3- 丁基苯酞；丁苯酞的开环产物即消旋或左旋 2-（1- 羟正戊基）苯甲酸。

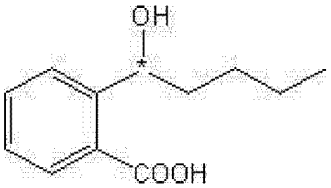
[0018] 消旋或左旋 3-（3’- 羟基）- 丁基苯酞



消旋或左旋 3- 羟基 -3- 丁基苯酞



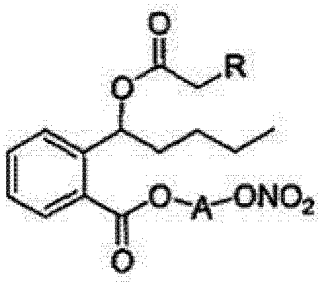
消旋或左旋 2-（1- 羟正戊基）苯甲酸



。

[0019] 进一步地，所述丁苯酞衍生物为在体内代谢为消旋丁苯酞或左旋丁苯酞；在体内代谢为消旋丁苯酞或左旋丁苯酞的代谢产物即消旋或左旋 3-（3’- 羟基）- 丁基苯酞和消旋或左旋 3- 羟基 -3- 丁基苯酞；及在体内代谢为丁苯酞的开环产物消旋或左旋 2-（1- 羟正戊基）苯甲酸的化合物。

[0020] 中国发明专利 CN101337891A 于 2009 年 1 月 7 日公开了根据前药原理，结构式如式Ⅰ的化合物在体内能释放 NO 和丁苯酞，所述化合物结构式如下：

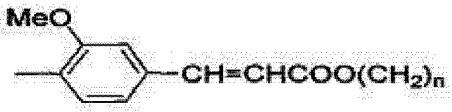


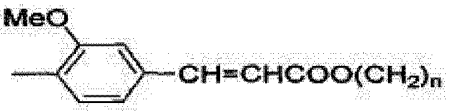
Ⅰ

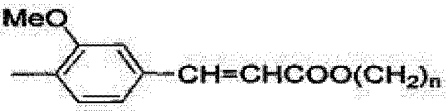
其中 A 为 C_2~C_8 烷基、C_2~C_8 烯烃基、C_2~C_8 炔烃基、苯基或取代苯基、芳杂环或取代芳杂环；所述取代苯基被 1 个或多个选自于羟基、C_1~C_6 烷基、C_1~C_6 烷氧基、-CH=CHCOO（CH_2）$_n$，n=2~6 取代的苯基，各取代基可以相同或不同；所述芳杂环为 1 至 4 个杂原子的 5 至 7 元芳香环，所述杂原子独立的选自 O、S 或 N；所述取代芳杂环可任选被 1 个或多个选自于 C_1~C_6 烷基、C_1~C_6 烷氧基或卤素取代，各取代基可以相同或不同；

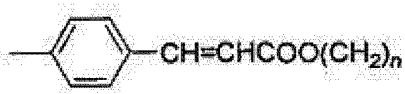
R 为二甲胺、二乙胺、吡咯、哌啶、吗啉、哌嗪、N- 甲基哌嗪、N- 乙基哌嗪、N- 异丙基哌嗪、N- 苯基哌嗪、N- 苄基哌嗪或 N- 叔丁氧羰基哌嗪。

[0021] 因此，所述化合物在体内代谢为丁苯酞，也必然具有治疗或预防放射性脑损伤的作用。

[0022] 作为优选，R 为吗啉基；A 为  ，n=3，所述衍生物为 [2-（1-吗啉基乙酰氧）正戊基］苯甲酸－｛ 2-甲氧基-4-[2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］｝苯酯。

[0023] 作为优选，R 为哌啶基；A 为  ，n=3，所述衍生物为 [2-（1-哌啶基乙酰氧）正戊基］苯甲酸－｛ 2-甲氧基-4-[2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］｝苯酯。

[0024] 作为优选，R 为二乙胺基；A 为  ，n=3，所述衍生物为 [2-（1-二乙胺基乙酰氧)正戊基］苯甲酸－｛ 2-甲氧基-4-[2-（4-硝氧丁氧羰基)乙烯基］｝苯酯。

[0025] 作为优选，R 为二乙胺基；A 为  ，n=3，所述衍生物为 [2-（1-二乙胺基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -4-[2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］苯酯。

[0026] 作为优选，R 为吗啉基；A 为 ，n=3，所述衍生物为 [2-（1-吗啉基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -4-[2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］苯酯。

[0027] 作为优选，R 为二乙胺基；A 为 C_4 烷基，所述衍生物为 [2-（1-二乙胺基乙酰氧)正戊基］苯甲酸－（4-硝氧）丁酯。

[0028] 作为优选，R 为吗啉基；A 为 C_4 烷基，所述衍生物为 [2-（1-吗啉基乙酰氧）正戊基］苯甲酸－（4-硝氧）丁酯。

[0029] 作为优选，R 为哌啶基；A 为 C_4 烷基时，所述衍生物为 [2-（1-哌啶基乙酰氧)正戊基］苯甲酸－（4-硝氧）丁酯。

[0030] 作为优选，R 为二乙胺基；A 为苯环上间位取代基为 C_2 烷基时，所述衍生物为 [2-（1-二乙胺基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -[4-（2-硝氧乙基）］苯酯。

[0031] 作为优选，R 为哌啶基；A 为苯环上间位取代基为 C_2 烷基时，所述衍生物即为 [2-（1-哌啶基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -[4-（2-硝氧乙基）］苯酯。

[0032] 作为优选，R 为吗啉基；A 为苯环上间位取代基为 C_2 烷基，所述衍生物即为 [2-（1-吗啉基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -[4-（2-硝氧乙基）］苯酯。

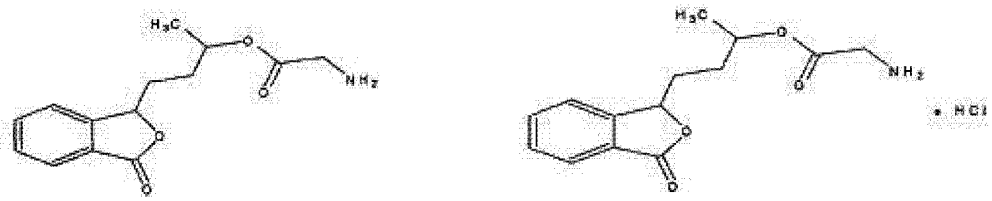
[0033] 作为优选，所述衍生物包括 [2-（1-吗啉基乙酰氧）正戊基］苯甲酸－｛ 2-甲氧基-4-[2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］｝苯酯、[2-（1-哌啶基乙酰氧）正戊基］苯甲酸－｛ 2-甲氧基-4-[2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］｝苯酯、[2-（1-二乙胺基乙酰氧）正戊基］苯甲酸－｛ 2-甲氧基-4-[2-（4-硝氧丁氧羰基)乙烯基］｝苯酯、[2-（1-二乙胺基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -4-[2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］苯酯、[2-（1-吗啉基乙酰氧）正戊基］苯甲酸 -4-[2-（4-硝氧丁氧羰基）乙烯基］苯酯、[2-（1-二乙胺基乙

酰氧)正戊基]苯甲酸-(4-硝氧)丁酯、[2-(1-吗啉基乙酰氧)正戊基]苯甲酸-(4-硝氧)丁酯、[2-(1-哌啶基乙酰氧)正戊基]苯甲酸-(4-硝氧)丁酯、[2-(1-二乙胺基乙酰氧)正戊基]苯甲酸-[4-(2-硝氧乙基)]苯酯、[2-(1-哌啶基乙酰氧)正戊基]苯甲酸-[4-(2-硝氧乙基)]苯酯、[2-(1-吗啉基乙酰氧)正戊基]苯甲酸-[4-(2-硝氧乙基)]苯酯。

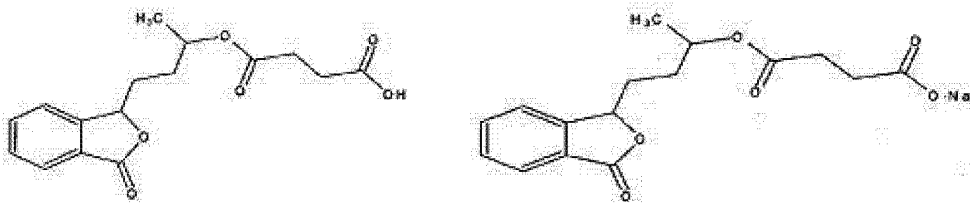
[0034] 中国发明专利CN101289438A于2008年10月22日公开了水溶性好的3-(3'-羟基)-丁基苯酞酯及盐。3-(3'-羟基)-丁基苯酞酯及盐在体内代谢为3-(3'-羟基)-丁基苯酞(结构式见上文),即:3-(3'-羟基)-丁基苯酞酯及盐为3-(3'-羟基)-丁基苯酞的前药。3-(3'-羟基)-丁基苯酞为丁苯酞在体内的主要代谢产物之一,文献报道(王春华等:丁基苯酞在大鼠中代谢产物的研究,药学学报,1997,32(9):641-646),丁苯酞在脑中的代谢产物只有3-(3'-羟基)-丁基苯酞。因此,鉴于丁苯酞具有治疗或预防放射性脑损伤的作用,本领域人员可以合理预期,其代谢产物3-(3'-羟基)-丁基苯酞及其前药也必然具有治疗或预防放射性脑损伤的作用。

[0035] 所述3-(3'-羟基)-丁基苯酞酯及盐优选为:

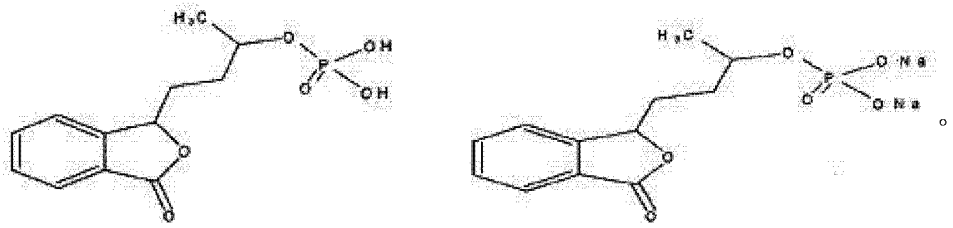
3-(3'-甘氨酸酯)-丁基苯酞及其盐酸盐:



3-(3'-琥珀酸酯)-丁基苯酞及其钠盐:



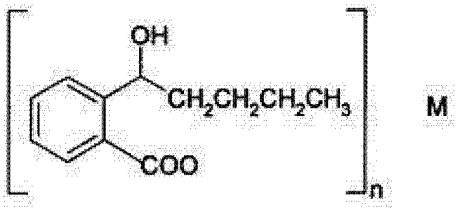
3-(3'-磷酸)-丁基苯酞及其二钠盐



[0036] 李江、王晓良等公开了消旋2-(a-羟基戊基)苯甲酸钾盐在体内具有与消旋丁苯酞一致的组织分部与代谢特征(参见dl-PHPB的体内外转化及药代动力学研究,中国药理通讯2007年第二十四卷第三期,50-51)。中国发明专利CN1382682A于2002年12月4日公开了2-(a-羟基戊基)苯甲酸盐在防治心脑血管疾病方面具有与丁苯酞相似的药理作用,根据化药药物代谢动力学,本领域人员可以合理预期,结构式如式II所示的2-(a-羟基戊基)苯甲酸盐在体内均可离解为丁苯酞的开环产物2-(1-羟正戊基)苯甲酸。2-(1-羟正戊基)苯甲酸是丁苯酞的开环产物,具有和丁苯酞相似的药理活性(ACTA. Pharmacol. Sin. 1998, 19, 49-57; Drug Development Research. 2004, 63,174-180.)因此,丁苯酞

的开环产物 2-（1-羟正戊基）苯甲酸的化合物以及在体内能代谢为 2-（1-羟正戊基）苯甲酸的化合物也必然具有治疗或预防放射性脑损伤的作用。

[0037] 更优选地，所述衍生物为 2-(a-羟基戊基）苯甲酸盐，结构式如式Ⅱ所示：



Ⅱ

其中，M 为一价金属离子或是二价金属离子，n=2 或 n=3。

[0038] 作为优选，2-(a-羟基戊基）苯甲酸盐中所述 M 为钾离子、钠离子、锂离子、钙离子、镁离子或锌离子。

[0039] 与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

本发明丁苯酞或其衍生物可用于制备治疗或预防放射性脑损伤的药物，是丁苯酞继脑缺血适应症外的又一新的适应症。

附图说明

[0040] 图 1 免疫组织化学染色（×200）：A 假照射组海马 Bcl-2 蛋白表达、B 照射组海马 Bcl-2 蛋白表达、C 丁苯酞组海马 Bcl-2 蛋白表达、D 假照射组海马 Bax 蛋白表达、E 照射组海马 Bax 蛋白表达、F 丁苯酞组海马 Bax 蛋白表达。

[0041] 图 2 透射电镜下组织学超微结构（×8000）：A 假照射组、B 照射组、C 丁苯酞组。

[0042] 图 3 免疫组化染色（×200）： 1 假照射组脑组织； 2 10Gy 照射后 1d 组； 3 丁苯酞 3.0mg/kg 组。

[0043] 图 4 免疫组化染色（×200）： 1 空白对照组皮质； 2 10Gy 照射后 1d 组皮质； 3 丁苯酞联合 10Gy 照射 1 周组皮质。

具体实施方式

[0044] 以下通过实施例来进一步阐述本发明，但实施例不对本发明做任何限定。

[0045] 实施例 1 丁苯酞对大鼠脑组织放射性损伤的保护作用

（一）材料与方法

1. 动物及分组：成年 SD 大鼠（苏州大学实验动物中心提供）共 120 只，质量 200~250g，随机分为假照射组、照射组、丁苯酞组，丁苯酞按剂量分为 0.3、1.0、3.0mg/kg 组，观察时间为照射后 1d、1 周和 1 月，共 15 个组别，每组 8 只大鼠。

[0046] 2. 动物模型制备及处理：采用飞利浦 SL18 型加速器产生的 4MeV 电子线对大鼠进行单次全脑照射，照射和剂量测量方法见：田野，包仕尧，殷蔚伯．大鼠半脑照射后早期脑内血流量和含水量变化的研究．中华放射肿瘤学杂志，1999,8:43-46.，吸收剂量率 210~220cGy/min，吸收剂量为 10Gy。丁苯酞组大鼠照射后即刻分别按剂量 0.3、1.0、3.0mg/kg 丁苯酞腹腔注射，1 次 /d，直至观察时间点；假照射组和照射组大鼠将等量生理盐水腹腔照

射。

[0047] 3. 脑组织超氧化物歧化酶(SOD,下同)活力和丙二醛(MDA,下同)含量的测定:按MDA试剂盒操作说明配制试剂、加量;漩涡混匀器混匀,试管口用保护膜扎紧,用针头刺一小孔,95℃水浴40min;取出后流水冷却,然后3500r/min,离心10min;取上清,于1cm光径、520nm处,蒸馏水调零,采用721紫外-可见光光度计测各管吸光度值;按血清中MDA含量计算公式计算各管MDA值。按SOD试剂盒操作说明配制试剂、加量;于波长550nm处,1cm光径比色杯,蒸馏水调零,采用721紫外-可见光光度计测各管吸光度值;按血清总SOD活力计算公式计算各管SOD值。

[0048] 4. 免疫组化染色检测促凋亡基因Bax、抑凋亡基因Bcl-2蛋白表达:大鼠在规定时间点3.6%水合氯醛作腹腔麻醉后用4%多聚甲醛经左心室常规灌注固定后断头取脑,由前向后做冠状切片,取包括海马、皮质及胼胝体的脑组织1块,10%中型福尔马林固定,常规脱水、浸蜡、石蜡包埋;免疫组化染色采用SP法。石蜡切片经脱蜡处理后入水;0.3%H2O2室温反应10min;10%羊血清室温封闭10min;小鼠抗大鼠一抗Bax、Bcl-2(1:100) 4℃过夜;生物素化二抗37℃反应15min;辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素37℃反应15min;DAB显色5~10min;苏木素复染2min;水洗后梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。采用Motic Med 6.0图像分析系统进行图像分析,每只大鼠脑组织切片上任选10个视野,计算平均光密度(OD值)。

[0049] 5. 透射电镜下观察组织学超微结构:假照射组、照射组和丁苯酞组大鼠于第7d后麻醉、开颅取左侧海马组织制备石蜡组织块(方法同上)。取制备好的石蜡组织块(1mm×1mm×1mm)染色、电镜观察。步骤如下:二甲苯脱蜡;无水酒精30 min,清洗2次,酒精梯度脱水,在0.01 mol·L^{-1}PBS浸泡30 min;4%戊二醛固定24 h(4℃);0·01 mol·L^{-1}PBS清洗15min,3次;1%锇酸固定1~2h;0·01mol·L^{-1}PBS清洗15 min,3次;常规脱水、Epon812浸泡、环氧丙烷浸透、包埋和聚合;LKBV型超薄切片机切片;枸橼酸铅染色;透射电镜(PhiliPCM-120型)观察。

[0050] 6. 统计学处理:数据以均数±标准差($\bar{X}\pm S$)表示,应用SPSS11.5统计软件对资料进行分析。组间比较采用one way ANOVA,进行Student-Newman-Keuls检验。

[0051] (二)实验结果

1. 丁苯酞干预前后脑组织SOD活性和MDA含量表达的比较:见表1。与假照射组比较,照射组大鼠在照射后脑组织SOD活性降低、MDA含量增高,差异有统计学意义(P<0.01或0.05);与照射组比较,丁苯酞组大鼠在照射后1d、1周、1月时脑组织SOD活性增高、MDA含量降低,差异有统计学意义(P<0.01或0.05)。

[0052] 表1 丁苯酞干预前后脑组织SOD和MDA表达的比较($\bar{X}\pm S$, n=8)

组 别	SOD 活性(U/mL)			MDA 含量(nmol/mL)		
	1d	1 周	1 月	1d	1 周	1 月
假照射组	108.3±14.1	114.0±13.2	112.4±13.0	12.36±1.40	13.61±2.1	13.45±1.81
照射组	65.8±11.2**	68.0±11.8**	67.2±12.8**	19.87±2.32**	19.92±2.41**	18.86±2.36**
丁苯酞 0.3mg/kg 组	84.0±10.6▲	89.8±11.1▲	86.1±11.3▲	15.29±2.11▲	16.30±2.21▲	15.23±2.01▲
丁苯酞 1.0mg/kg 组	95.7±12.3**	97.8±12.9**	95.6±11.9**	14.16±2.04▲	15.09±2.05▲	14.38±2.16▲
丁苯酞 3.0mg/kg 组	104.1±13.6**	103.9±12.6**	105.3±13.1**	13.98±1.86**	14.07±1.68**	14.06±1.89**

与假照射组比较，*P<0.05，**P<0.01；与照射组比较，▲P<0.05，▲▲P<0.01

2. 丁苯酞干预前后脑组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达的比较：见图 1、表 2。与假照射组比较，照射组大鼠在照射后脑组织促凋亡基因 Bax 蛋白表达显著增加、抑制凋亡基因 Bcl-2 蛋白表达明显降低，差异有统计学意义（P<0.01 或 0.05）；与照射组比较，丁苯酞组大鼠在照射后抑制凋亡基因 Bcl-2 蛋白表达显著增加、促凋亡基因 Bax 蛋白表达明显降低（P<0.01 或 0.05）。

[0053] 表 2 丁苯酞干预前后脑组织细胞凋亡的比较（$\bar{X}\pm S$，n=8）

组 别	Bcl-2 蛋白表达			Bax 蛋白表达		
	1d	1 周	1 月	1d	1 周	1 月
假照射组	19.3±3.4	19.6±4.1	19.4±3.8	14.3±4.1	14.0±3.2	14.4±3.0
照射组	12.0±4.1**	12.6±3.0**	13.2±3.5**	26.8±3.2**	26.0±3.8**	27.0±2.8**
丁苯酞 0.3mg/kg 组	16.8±4.8▲	16.5±4.0▲	16.1±3.6▲	19.0±2.6▲	19.8±3.1▲	19.1±3.0▲
丁苯酞 1.0mg/kg 组	17.5±3.3▲	17.3±4.0▲	17.9±4.6▲	18.2±3.3▲	18.8±2.9▲	18.6±2.9▲
丁苯酞 3.0mg/kg 组	18.0±4.6**	18.2±4.3**	18.5±4.3**	16.1±3.6**	15.9±2.6**	15.8±3.1**

与假照射组比较，*P<0.05，**P<0.01；与照射组比较，▲P<0.05，▲▲P<0.01

3. 丁苯酞干预前后组织学超微结构的比较：见图 2。照射组海马组织呈明显的凋亡超微结构形态，而丁苯酞组脑组织细胞结构损伤明显轻于照射组，胞质内空泡样变较少，染色质基本均匀，无明显聚集现象，核膜相对完整。

[0054] 综上所述，本试验中照射组大鼠脑组织中 MDA 升高，而 SOD 活力明显下降，说明在放射性损伤大鼠中存在过量的活性自由基及脂质过氧化代谢产物，符合辐射损伤氧自由基损伤学说。丁苯酞组大鼠脑组织中 MDA 含量较照射组降低、SOD 活力升高，提示丁苯酞能改善辐射损伤脑组织中氧自由基平衡，减轻氧自由基的损伤作用。

[0055] 通常认为，海马结构神经细胞对辐射高度敏感，故可作为评价放射性脑损伤的可

靠指标。实验发现，照射组海马组织呈明显的凋亡超微结构形态，而丁苯酞组细胞结构损伤明显轻于照射组，胞质内空泡样变较少，染色质基本均匀，无明显聚集现象，核膜相对完整；进一步证实全脑照射后大鼠脑组织出现超微结构等脑损伤改变，丁苯酞干预后大鼠脑组织超微结构损伤明显轻于照射组，说明丁苯酞干预能有效减轻放射性脑损伤。

[0056] 实施例 2 丁苯酞对放射性脑损伤大鼠血脑屏障的影响

（一）材料与方法

1. 动物及分组：成年 SD 大鼠（苏州大学实验动物中心提供）共 144 只，体重 200~250g，随机分为空白对照组、单纯照射组（10Gy）、单纯丁苯酞组（1.0mg/kg）、0.3mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组、1.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组、3.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组，观察时间为照射后 1d、1 周和 1 月，共 18 个组别，每组 8 只大鼠。

[0057] 2. 动物模型制备及处理：采用飞利浦 SL18 型加速器产生的 4MeV 电子线对大鼠进行单次全脑照射，照射和剂量测量方法见文献：田野，包仕尧，殷蔚伯．大鼠半脑照射后早期脑内血流量和含水量变化的研究 [J]. 中华放射肿瘤学杂志，1999,8:43-46，吸收剂量率 210~220 cGy/min，吸收剂量为 10Gy。丁苯酞组大鼠照射后即刻分别按剂量 0.3mg/kg、1.0mg/kg、3.0mg/kg 丁苯酞腹腔注射，1 次 /d，直至观察时间点；空白对照组、单纯照射组大鼠将等量生理盐水腹腔照射。

[0058] 3. 脑组织依文思蓝（EB）含量的测定：每组分别于观察时间点经股静脉注射 2%EB3mL/kg，31h 后左心室灌注 0.9% 生理盐水，断头取脑，用 722 型分光光度计测定脑组织中 EB 的含量。

[0059] 4. 脑组织血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的测定：VEGF(C-1)、PV9000 二步法免疫组化的检测试剂均购白北京申山生物技术有限公司。在各观察时点将大鼠麻醉，左心室灌注 0.9% 生理盐水后，断头取脑，自前囟向尾侧 3mm 按冠状位切取约 5mm 厚的脑组织，常规石蜡包埋切片，进行免疫组织化学染色。VEGF 染色阳性细胞以胞浆中出现棕黄色颗粒为准，于每张切片中随机选取 10 个大脑皮层下白质部位进行观察，通过显微摄像系统将选取的视野输入计算机，采用彩色图像分析系统（北京航空航天大学）对视野内 VEGF 染色阳性细胞进行计数。

[0060] 5. 循环内皮细胞的检测：磁共振成像结束后，开胸行右心室抽血 3mL，与 0.3 mL3.8% 枸橼酸钠液充分混合后立即进行分离，采血和分离器具均硅化。循环内皮细胞的分离按照 Hladove 建立的方法加以改进。将血液标本 1000r/min 离心 20 min，收集上清液 1mL；将 0.1%ADP 液 0.21mL 加入上清液中；3000r/min 离心 20 min；再取上清液以 3000r/min 离心 20min，弃去上清液，加入 0.1mL 生理盐水，震荡 10min 使沉淀物重悬后备检。计数时，使混悬液充分混匀后，取 0.01mL 滴入细胞计数池内，在光学显微镜下计数全部 9 个大方格中的 CECs 数。同一标本计数 4 次，取其平均值，以细胞数 10^6 个 /L 表示。CECs 的鉴定采用Ⅷ R：Ag 间接免疫荧光检测，呈现较强的黄绿色荧光着色。

[0061] 6. 磁共振成像 MRI 的研究：每组大鼠分别于观察时间点进行 MRI 研究。腹腔内注射 3.6% 水合氯醛 1mL/100g，麻醉后俯卧位，置于专用腕关节相控阵表面线圈内，采用 ESAOTE 型四肢关节磁共振成像仪（Esaote 公司，意大利）分别行 T1 加权与 T2 加权扫描。腹腔注射 0.25mmol/kg 轧喷酸葡胺注射液（北京北陆药业股份有限公司）后再次行增强扫描。选取包括两侧侧脑室的扫描层面为检测层面，将整个大脑横截面作为感兴趣区进行信号强

度以及信号强度增强率的计算。

[0062] 7. 统计学处理：数据以均数 ± 标准差（$\bar{X}\pm S$）表示，应用 SPSS11.5 统计软件对资料进行分析。组间比较采用 one way ANOVA，进行 Student-Newman-Keuls 检验。

[0063] （二）实验结果

1. 丁苯酞干预前后脑组织 EB 含量的比较：见表 3。与空白对照组比较，单纯照射组大鼠脑组织 EB 含量在照射后 1d、1 周、1 月时升高（$P<0.01$）。与单纯照射组比较，丁苯酞组大鼠脑组织 EB 含量在照射后 1d、1 周、1 月时降低（$P<0.01$）。

[0064] 2. 丁苯酞干预前后脑组织 VEGF 表达的比较：见表 3、图 3。与空白对照组比较，单纯照射组海马 VEGF 表达在照射后 1 d 升高（$P<0.01$），1 周、1 月时差异无统计学意义。与单纯照射组比较，丁苯酞组大鼠海马 VEGF 表达在照射后 1d 时降低（$P<0.01$），但仍然高于单纯丁苯酞组。单纯丁苯酞组脑组织，VEGF 阳性细胞较少；10Gy 照射后 1d 组，见较多 VEGF 阳性细胞；丁苯酞 3.0mg/kg 组，VEGF 阳性细胞较照射组减少。

[0065] 表 3 各组脑组织 EB 含量、VEGF 表达的比较的比较（$\bar{X}\pm S$，n=8）

组 别	脑组织 EB 含量			脑组织 VEGF 表达		
	1d	1 周	1 月	1d	1 周	1 月
空白对照组	0.58±0.11	0.69±0.32	0.64±0.06	20.02±4.01	20.69±2.32	20.64±2.46
单纯照射组	1.74±0.21**	1.62±0.18**	1.50±0.18**	43.74±1.21**	23.62±1.98	25.50±2.18
单纯丁苯酞组（1.0mg/kg）	0.59±0.13	0.66±0.22	0.62±0.16	20.22±3.98	20.46±2.23	20.18±2.34
0.3mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组	1.08±0.06**	0.81±0.19**	0.81±0.36**	28.08±2.06*	26.02±1.92	24.50±1.78
1.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组	0.87±0.13**	0.80±0.19**	0.76±0.20**	26.87±2.13**	23.42±1.76	25.45±2.03
3.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组	0.71±0.16**	0.79±0.17**	0.73±0.21**	25.61±0.16**	22.81±1.69	21.23±1.96

与单纯丁苯酞组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与照射组比较，▲$P<0.05$，▲▲$P<0.01$

3. 丁苯酞干预前后循环内皮细胞数的比较：见表 4。与空白对照组比较，单纯照射组大鼠血中循环内皮细胞数量增加，在照射后 1 周、1 月细胞数量明显升高（$P<0.05$）；与单纯照射组比较，丁苯酞组大鼠血中循环内皮细胞数有不同程度降低（$P<0.01$），尤其在大剂量组为甚，呈现剂量依赖性。

[0066] 表 4 各组血中循环内皮细胞数（$\bar{X}\pm S$ n=8）

组 别	循环内皮细胞数		
	1d	1周	1月
空白对照组	0.88±0.58	1.36±0.45	1.14±0.44
单纯照射组	3.56±0.88**	9.25±3.24**	5.75±1.32**
单纯丁苯酞组（1.0mg/kg）	0.90±0.53	1.32±0.41	1.17±0.43
0.3mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组	1.76±0.80*	4.79±1.09**	3.28±1.06**
1.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组	1.69±0.71*	3.83±1.22**	2.73±1.11**
3.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组	1.68±5.6**	2.99±1.16**	1.96±1.08**

与单纯丁苯酞组比较，*P<0.05，**P<0.01；与照射组比较，▲P<0.05，▲▲P<0.01

4. 丁苯酞干预前后 T1、T2 加权信号强度以及信号强度增强率的比较：见表 5。与空白对照组比较，单纯照射组大鼠在照射后 1d、1 周、1 月时 T1 加权信号强度减弱，照射后 1 月时 T2 加权信号强度增强，照射后 1d ～ 1 月时信号强度的增强率升高（P<0.01 或 0.05）；与单纯照射组比较，丁苯酞组大鼠在照射后 1d、1 周、1 月时 T1 加权信号强度增强，照射后 1 月时 T2 加权信号强度减弱，照射后 1d ～ 1 月信号强度的增强率降低（P<0.01 或 0.05）。

[0067] 表 5 丁苯酞干预前后 T1、T2 加权信号强度以及信号强度增强率的比较（$\bar{X}\pm S$，n=8）

组别	T1 加权信号强度			T2 加权信号强度			信号强度增强率		
	1d	1 周	1 月	1d	1 周	1 月	1d	1 周	1 月
空白对照组	27.2±1.7	26.2±2.2	26.9±2.0	8.63±0.41	8.61±0.32	8.67±0.28	102.4±2.6	104.6±3.2	102.2±2.5
单纯照射组	23.1±1.2*	20.8±1.8**	18.9±1.6**	8.52±0.48	8.90±0.44	9.70±0.13**	107.2±2.1*	112.8±1.8*	117.7±1.5**
单纯丁苯酞组（1.0mg/kg）	27.0±1.6	26.7±2.1	26.5±1.9	8.66±0.42	8.63±0.31	8.65±0.29	102.9±2.5	104.1±3.0	102.8±21
0.3mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组	23.8±2.6	22.8±1.9▲	22.1±2.0▲	8.73±0.40	8.79±0.24	8.92±0.36▲	104.6±2.4▲	106.1±2.2▲	107.5±2.9▲
1.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组	25.7±3.3▲▲	25.8±2.9▲▲	25.6±2.9▲▲	8.69±0.34	8.73±0.32	8.75±0.31▲	103.8±2.3▲	105.5±2.0▲▲	106.8±2.6▲▲
3.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组	26.1±3.6▲▲	26.9±2.6▲▲	26.3±3.1▲▲	8.68±0.36	8.77±0.46	8.56±3.8▲▲	103.4±2.6▲▲	104.8±2.3▲▲	104.2±2.5▲▲

与单纯丁苯酞组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与照射组比较，▲$P<0.05$，▲▲$P<0.01$

综上所述，MRI 是一种敏感的检测放射性脑损伤血脑屏障改变的方法。放射性损伤后脑组织中自由水含量增加，使损伤组织的 T1、T2 弛豫时间延长，即 T1 加权成像呈低信号、T2 加权成像呈高信号；此外，MRI 增强造影剂钆喷酸葡胺不能通过正常脑组织的血脑屏障，信号增强就表明血脑屏障通透性增加。单纯照射组大鼠在照射后 1d、1 周、1 月时 T1 加权信号强度减弱，照射后 1 月时 T2 加权信号强度增强，照射后 1d~1 月时信号强度的增强率升高，而 0.3mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组、1.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组和 3.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组大鼠在照射后 1d、1 周、1 月时 T1 加权信号强度增强，照射后 1 月时 T2 加权信号强度减弱，照射后 1d~1 月信号强度的增强率降低，进一步证实在照射后使用丁苯酞可降低血脑屏障通透性的升高，对放射性脑损伤有一定的保护作用。

[0068] 本实验结果进一步证明丁苯酞通过降低大鼠全脑照射后循环内皮细胞数，降低了放射性脑损伤大鼠血脑屏障的通透性，对放射性脑损伤有保护作用，也即丁苯酞的作用靶细胞主要是血管内皮细胞。

[0069] 实施例 3 丁苯酞对大鼠全脑照射后早期大脑皮质水通道蛋白 4 表达的影响

(一) 材料与方法

1. 动物及分组：成年 SD 大鼠（苏州大学实验动物中心提供）共 96 只，体重 200 ～

250g，随机分为空白对照组、单纯照射组、单纯丁苯酞组、丁苯酞联合照射组，观察时间为照射后 1d、1 周和 1 月，共 8 个组别，每组 12 只大鼠。

[0070] 2. 动物模型制备及处理：采用飞利浦 SL18 型加速器产生的 4MeV 电子线对大鼠进行单次全脑照射，照射和剂量测量方法见文献：田野，包仕尧，殷蔚伯．大鼠半脑照射后早期脑内血流量和含水量变化的研究 [J]．中华放射肿瘤学杂志，1999，8：43-46，吸收剂量率 210 ～ 220 cGy/min，吸收剂量为 10Gy。丁苯酞组大鼠照射后即刻分别按剂量 3.0mg/kg 丁苯酞腹腔注射，1 次 /d，直至观察时间点；空白对照组、单纯照射组大鼠将等量生理盐水腹腔照射。

[0071] 3. 脑组织依文思蓝（EB）含量的测定：每组分别于观察时间点经股静脉注射 2%EB3mL/kg，31h 后左心室灌注 0.9% 生理盐水，断头取脑，用 722 型分光光度计测定脑组织中 EB 的含量。

[0072] 4. 免疫组化染色：采用 SP 法。在各观察时点将大鼠麻醉，左心室灌注 0.9% 生理盐水后，断头取脑，自前囟向尾侧 3mm 按冠状位切取约 5mm 厚的脑组织，常规石蜡包埋切片，进行免疫组织化学染色。石蜡切片经脱蜡处理后入水；0.3%H_2O_2 室温反应 10min；10% 羊血清室温封闭 10min；小鼠抗大鼠一抗 AQP4（1:100） 4℃过夜；生物素化二抗 37℃反应 15min；辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素 37℃反应 15min；DAB 显色 5 ～ 10min；苏木素复染 2min；水洗后梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，显微镜下观察。采用 Motic Med 6.0 图像分析系统进行图像分析，每只大鼠脑组织切片上任选 10 个视野，计算平均光密度（OD 值）。

[0073] 5. 脑含水量测定：于各时间点在各组大鼠相同部位取 3 mm 厚的脑组织切片，放在电子天平中称重，然后用铝箔包裹放入恒温电烤箱中 100℃烘烤 >24h，电子天平上称取脑组织干重，按 Elliot 公式计算脑组织含水量：脑组织含水量 (%)=（湿重 - 干重）/ 湿重 *100%。

[0074] 6. 统计学处理：数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，应用 SPSS11.5 统计软件对资料进行分析。组间比较采用 one way ANOVA。

[0075] （二）实验结果

1. 各组大鼠脑组织 AQP4 表达的比较 见表 6、图 4。空白对照组大鼠可见皮质 AQP4 的表达，主要位于星形胶质细胞终足包绕毛细血管形成的一层胶质界膜上。与空白对照组比较，10Gy 照射后 1d 皮质 AQP4 表达迅速降低，照射后 1 周达最低点 ($P<0.01$)，照射后 1 月表达水平又明显高于假照射组 ($P<0.05$)。单纯丁苯酞组大鼠皮质 AQP4 的表达与空白对照组无显著差异。与单纯照射组比较，丁苯酞联合照射组大鼠照射后 1d 和 1 周时 AQP4 表达有明显升高 ($P<0.01$ 或 <0.05)，而照射后 1 月则有下降 ($P<0.01$)。

[0076] 2. 丁苯酞干预前后脑组织 EB 含量的比较 见表 6。与空白对照组比较，单纯照射组大鼠脑组织 EB 含量在照射后 1d、1 周、1 月时升高 ($P<0.01$)。与单纯照射组比较，丁苯酞组大鼠脑组织 EB 含量在照射后 1d、1 周、1 月时降低 ($P<0.01$)。

[0077] 3. 各组大鼠脑含水量的比较 见表 6。与空白对照组比较，单纯照射组大鼠受照后 1d 脑含水量即增加，但无显著性差异（均 $P>0.05$），受照后 1 周明显增加 ($P<0.05$)，受照后 1 月达到高峰 ($P<0.01$)；单纯丁苯酞组大鼠脑含水量与空白对照组无显著差异（均 $P>0.05$）。与单纯照射组比较，丁苯酞联合照射组大鼠照射后脑含水量有不同程度降低

(P<0.05 或 0.01)。

[0078] 表 6 各组大鼠不同时间点皮质 AQP4 表达、脑组织 EB 含量、脑含水量的比较($\bar{X}\pm S$, n=12)

组 别	AQP4(OD 值)	脑组织 EB 含量	脑含水量 (%)
空白对照组	4.00±0.32	0.58±0.11	77.82±0.48
单纯丁苯酞组	3.95±0.31	0.59±0.12	77.85±0.52
单纯照射组 10Gy 1d	3.40±0.43*	1.74±0.21**	79.86±2.32
单纯照射组 10Gy 1 周	1.67±0.63**	1.62±0.18**	82.01±1.39*
单纯照射组 10Gy 1 月	5.57±0.72*	1.50±0.18**	84.07±0.88**
3.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组 1d	3.85±0.54▲	0.71±0.16▲▲	78.62±0.83
3.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组 1 周	3.57±0.62▲▲	0.79±0.17▲▲	78.61±0.87▲
3.0mg/kg 丁苯酞联合 10Gy 照射组 1 月	4.38±0.78▲▲	0.73±0.21▲▲	79.70±1.32▲▲

与空白对照组比较,* $P<0.05$ ** $P<0.01$;与单纯照射组比较,▲P<0.05 ▲▲P<0.01

综上所述,本实验用丁苯酞对全脑照射大鼠进行干预,结果显示,丁苯酞联合照射组大鼠照射后 1d 和 1 周时 AQP4 表达明显升高,而照射后 1 月则有下降;提示丁苯酞对大鼠全脑照射后 AQP4 表达有调节作用。同时丁苯酞干预后脑组织 EB 含量、脑含水量均有不同程度改善,提示丁苯酞有神经保护作用。

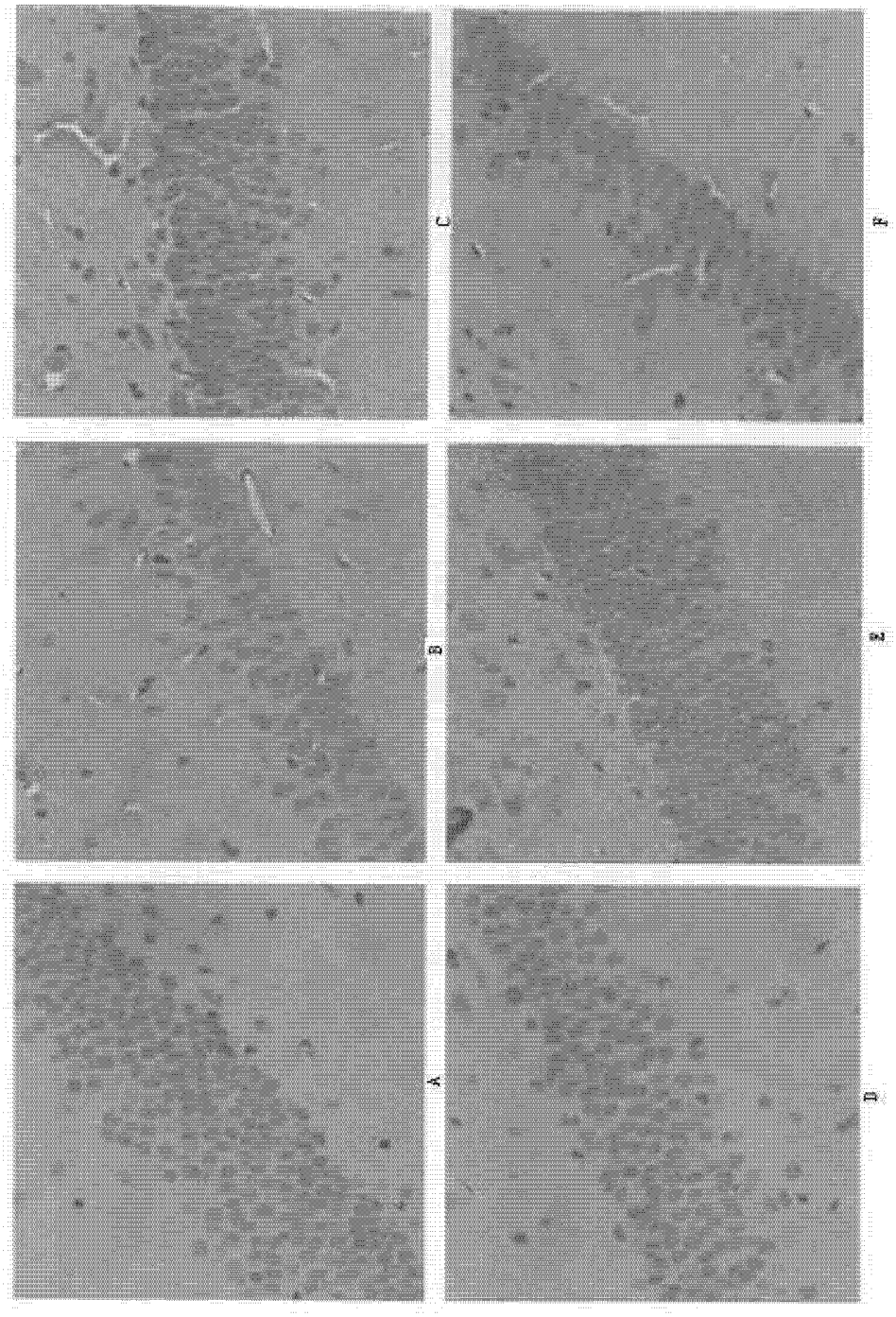


图 1

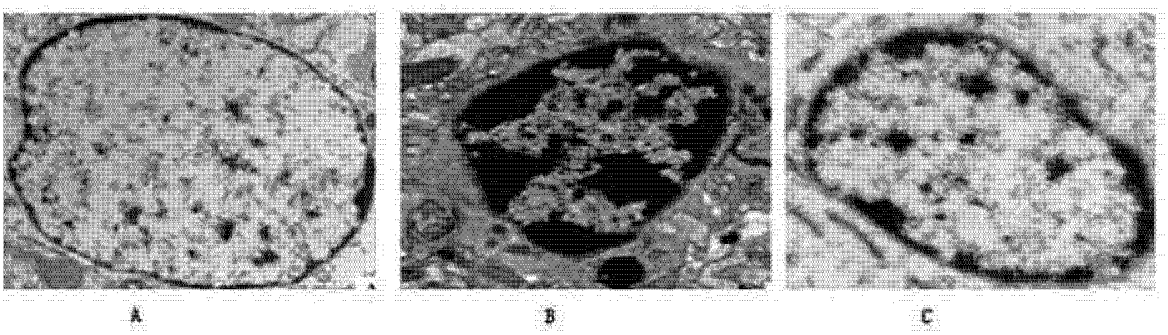


图 2

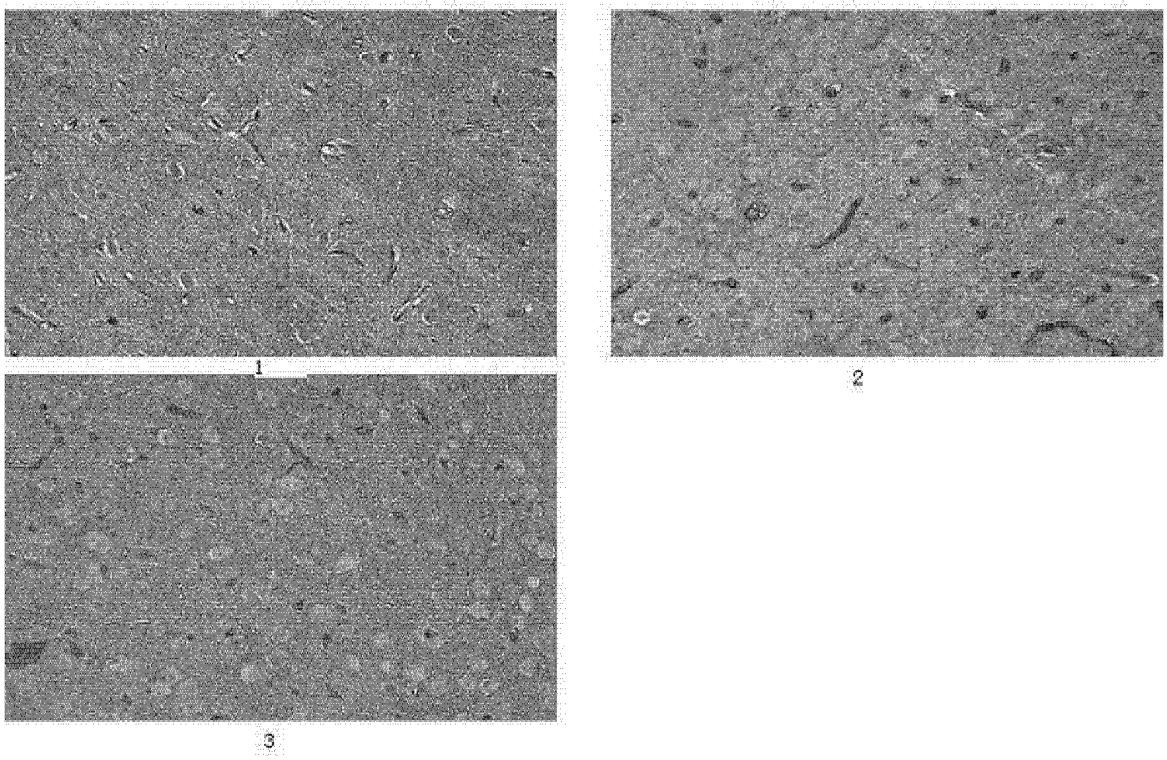
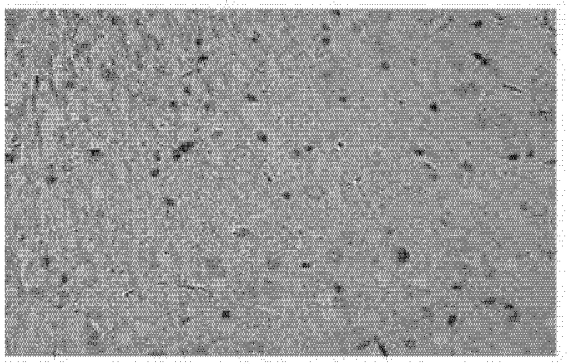
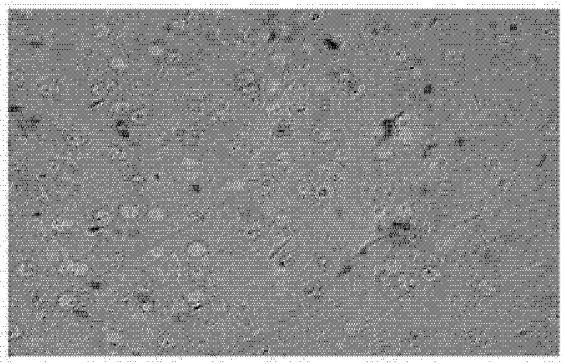


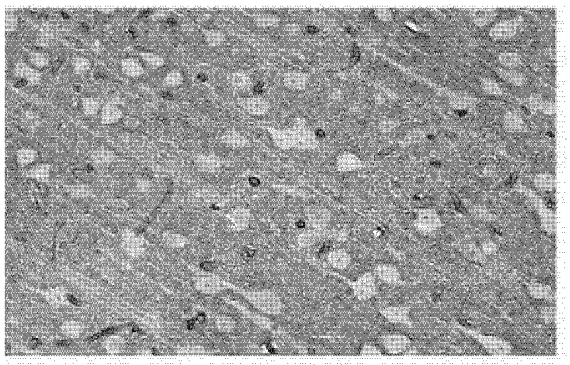
图 3



1



2



3

图 4