

· 论 著 ·

经鼻靶向给降钙素基因相关肽对蛛网膜下腔出血后脑损伤的保护作用

迟淑梅 章晓英 张利 陈洁芳 郭莎 马晓燕 王舰

[摘要] **目的** 探讨经鼻靶向中枢导入降钙素基因相关肽(CGRP)对蛛网膜下腔出血(SAH)后大鼠脑损伤的保护作用。**方法** 采用枕大池2次注血法建立大鼠SAH模型,CGRP和NS经鼻腔给予。将Wistar大鼠随机分为经鼻CGRP+SAH组、经鼻NS+SAH组、SAH组、对照组(每组各6只)。于第2次注血后72 h,麻醉、灌注固定后断头取脑及脑干制备脑组织冠状冰冻切片,采用免疫荧光技术检测大脑皮层caspase-3的蛋白表达。**结果** 在SAH模型动物的蛛网膜下腔,均发现弥漫性分布的血液或血凝块,主要分布于后颅窝、前颅窝及蝶鞍处。免疫荧光技术检测到对照组大鼠脑组织caspase-3蛋白极少量表达;SAH组和经鼻NS+SAH组的大鼠脑组织中caspase-3蛋白阳性细胞数明显增多;经鼻CGRP+SAH组caspase-3蛋白表达比SAH组和经鼻NS+SAH组下降。与对照组比较,SAH组、经鼻NS+SAH组、经鼻CGRP+SAH组的脑组织皮层caspase-3荧光强度值均明显上升,差异有统计学意义(t 分别=13.21、13.27、11.32, P 均 <0.05);经鼻NS+SAH组的脑组织皮层caspase-3荧光强度值与SAH组比较,差异无统计学意义($t=0.06$, $P>0.05$);经鼻CGRP+SAH组的脑组织皮层caspase-3荧光强度值明显低于SAH组和经鼻NS+SAH组(t 分别=4.88、4.93, P 均 <0.05)。**结论** 经鼻靶向中枢导入CGRP对SAH后脑损伤具有保护作用。

[关键词] 蛛网膜下腔出血; 鼻腔给药; 降钙素基因相关肽; 脑损伤; 凋亡

Protective effect of intranasal targeting calcitonin gene related peptide on brain injury after subarachnoid hemorrhage CHI Shumei, ZHANG Xiaoying, ZHANG Li, et al. Department of Neurology, Hangzhou Seventh People's Hospital, Hangzhou 310000, China

[Abstract] **Objective** To explore the protective effect of intranasal targeting calcitonin gene related peptide (CGRP) on brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** SAH models were established by injecting twice of freshly autologous arterial blood from cisterna magna. CGRP and NS were given by intranasal perfusion. Totally 24 male Wistar rats were randomly divided into the CGRP+SAH group, NS+SAH group, SAH group and normal group. 72 hours after the SAH model established, the brain and brain stem were taken to prepare the frozen section of the brain tissue after anesthesia and perfusion fixation. Immunofluorescence technique was used to detect the expression of caspase-3 in cerebral cortex. **Results** The diffuse distribution of blood or blood clots were found in the subarachnoid space of SAH models, mainly distributed in the posterior cranial fossa, anterior cranial fossa and butterfly saddle. The expressions of caspase-3 in SAH group, NS+SAH group, and CGRP+SAH group were higher than normal control group ($t=13.21, 13.27, 11.32, P<0.05$). The difference in caspase-3 expression between NS+SAH group and SAH group was not statistically significant ($t=0.06, P>0.05$). In SAH+CGRP group, the expression of caspase-3 was lower than that of the SAH group and NS+SAH group ($t=4.88, 4.93, P<0.05$). **Conclusions** The intranasal targeting CGRP has protective effect on the brain injury after SAH.

[Key words] subarachnoid hemorrhage; intranasal delivery; calcitonin gene related peptide; cerebral injury; apoptosis

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.03.007

作者单位:310000 浙江杭州,杭州市第七人民医院神经内科(迟淑梅、章晓英、张利、陈洁芳、郭莎、马晓燕);浙江大学医学院附属邵逸夫医院核医学科(王舰)

通讯作者:王舰,Email:wj_791216@163.com

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)、脑

血流减少等所致的脑损伤是导致SAH患者严重不良预后的重要原因^[1-3],最终促使细胞凋亡、坏死,故此患者常预后不良,有较高的病死率^[4]。降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide,CGRP)具有强大的扩张脑血管作用^[5,6]。研究发现,在SAH后大量的内源性CGRP被损耗与SAH后CVS及脑损伤的发生发展密切相关,但由于外源性CGRP为大分子物质难以透过血脑屏障而限制了其在SAH中的应用^[5,7]。有研究表明,很多大分子药物经鼻腔给药后可绕过血脑屏障进入脑脊液和脑组织而发挥治疗作用^[8],为中枢神经系统疾病的治疗提供了新的用药途径。本次实验利用大鼠SAH模型,观察经鼻应用CGRP对SAH后脑损伤的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料 CGRP 1mg(由美国Sigma公司生产)、0.01mol/L PBS粉剂(由北京中杉生物技术有限公司生产)、肝素钠注射液12500 U(由山东鲁抗辰欣药业有限公司生产)、优化切片温度包埋剂(由美国Sakura公司生产)、caspase-3多克隆抗体(由北京博奥森生物技术有限公司生产)、SABCFITC免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司生产)。

1.2 仪器 51600型脑立体定位仪(由美国Stoelting公司生产)、Mill-iQ Synthesis型超纯水制备系统(由法国Millipore公司生产)、320222 YHBA01型微量注射器(由无锡市东风玻璃仪器厂生产)、95-1型磁力加热搅拌器(由上海司乐仪器厂生产)、JA-31001型电子分析天平(由上海天平仪器厂生产)、DHL-A型电脑数显恒流泵(由上海泸西分析仪器厂生产)、BX51型光学显微镜(由日本Olympus公司生产)、3K30型高速低温离心机(由美国Sigma公司生产)、CM 1900型冰冻切片机(由德国Leica设备有限公司生产)、Radiance 2100型激光共聚焦显微镜(由美国Bio-Red公司生产)。

1.3 方 法

1.3.1 实验动物 本次实验于2017年2月至2017年6月进行。选取SPF级、健康、雄性Wistar大鼠24只,体重250~300 g,由山东鲁抗实验动物中心提供(动物许可证号SCXK鲁20050017)。将动物随机分为:经鼻CGRP+SAH组、经鼻生理盐水(NS)+SAH组、SAH组和对照组。对照组不给予任何处理因素;每组6只。

1.3.2 SAH动物模型的制备 采用枕大池新鲜自体动脉血二次注入法建立大鼠SAH模型。将大鼠

麻醉后,俯卧固定于操作台上,沿中线纵行剪开长约3 cm的顶部皮肤,上至枕外隆凸。向内钝性分离皮下软组织和肌层,暴露环枕膜。在左侧股部切开皮肤,逐层分离后暴露股动脉。用1 ml注射器配4号针头,抽取不抗凝的新鲜动脉血。行环枕膜穿刺,垂直进针约2.5 mm后稍回抽见有清亮脑脊液回流,缓慢将自体动脉血按1 ml/kg在5 min内缓慢注入枕大池。保持动物30°头低位30 min。48 h后以同样方法再次注血。

1.3.3 经鼻给药方法 在临用前新鲜配制CGRP溶液,将1 mg CGRP先用1 ml超纯水稀释,再用超纯水稀释至50 ml,每只给药总量为1 μg(50 μl)。大鼠在麻醉状态下,取仰卧位,并将头颈背用4 cm × 4 cm的纱布卷稍稍垫高,以有利于药物进入后鼻腔。即经鼻腔插入一根3.5 cm长的PE-50号硅胶管并与微量注射器相连,采用两侧鼻孔交替给药,当一侧鼻孔给药时,将大鼠的嘴及另一侧鼻孔封闭。每单次给药量为5 μl,间隔时间2 min,每只大鼠给10次,20 min内给总量为50 μl的药液。

1.3.4 组织固定和标本制作 于第2次枕大池注血后3 d,将动物麻醉后仰卧固定,经心快速灌注4 ℃肝素(20万单位/L)0.9%氯化钠注射液200~300 ml,继以4 ℃、4%多聚甲醛溶液灌注固定脑组织。断头后在冰盘上取脑,置入4%多聚甲醛溶液中固定12 h,再依次放入20%和30%的蔗糖溶液脱水。优化切片温度包埋剂包埋,液氮速冻后于-80 ℃冰箱冻存。取固定的脑组织标本,行冰冻切片,厚度8 μm。

1.3.5 caspase-3蛋白表达检测 取出固定的脑组织标本,室温复温一下后,立即冻在冰冻头上,置于温度为-20 ℃冰冻切片机恒冷箱内平衡20 min左右,进行修整切片,厚度8 μm,用涂有多聚赖氨酸的洁净载玻片贴片;室温干燥30 min,4 ℃丙酮固定10 min后风干,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗3次,每次5 min;0.1% triton-100室温20 min, PBS洗3次,每次5 min;每片滴加10%正常山羊封闭血清50 μl,室温30 min,弃封闭液,不洗;每片滴加50 μl caspase-3一抗(兔抗大鼠多克隆抗体,稀释比例为1:50),置于湿盒中4 ℃过夜;取出切片,室温下放置30 min后, PBS洗3次,每次5 min;加50 μl FITC标记的山羊抗兔IgG二抗(稀释比例为1:100),37 ℃孵育30 min,避光操作, PBS洗3次,每次5 min;50%甘油PBS溶液封片。对照组用PBS代替一抗,每片滴其余操作步骤不变。采用Bio-Red Radiance2100型

激光共聚焦显微镜操作系统的Ar单通道激光系统,扫描FITC标记的阳性反应物。激发光波长为488 nm,观测光为515±30 nm,物镜为60倍,扫描方式为点扫描,Zoom为(1.0)。经Lasersharp 2000软件(4.5.3)摄像,每只动物分别随机观察并计数大脑皮层8个不同视野的荧光密度,并计算平均值。

1.4 统计学方法 应用SPSS 13.0统计软件包。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较选用LSD-*t*或Dunnett-*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察和模型证实 在脑池注入动脉血过程中和注入后,大鼠均出现烦躁、呼吸和心率加快,部分出现肢体抽动。动物麻醉苏醒后精神萎靡、嗜睡,饮水、活动及进食减少。个别动物出现痫样肢体抽搐,但均未出现肢体瘫痪等局灶性神经功能缺损表现。将动物于处死后行颅脑解剖学观察,在SAH模型动物的蛛网膜下腔,均发现弥漫性分布的血液或血凝块,主要分布于后颅窝、前颅窝及蝶鞍处,包绕脑底部的主要血管。所有动物均未发现脑实质内出血或机械性损伤。

2.2 caspase-3蛋白表达见封二图2、表1

由封二图2可见,对照组大鼠脑组织中caspase-3蛋白极少量表达;SAH组和经鼻NS+SAH组的大鼠脑组织中caspase-3蛋白阳性细胞数明显增多,经鼻CGRP+SAH组的caspase-3蛋白表达比SAH组和经鼻NS+SAH组下降。

表1 各组大鼠脑组织皮层caspase-3荧光强度

组别	脑组织皮层 caspase-3 荧光强度
经鼻 CGRP+SAH组	21.95 ± 3.82* [△]
经鼻 NS+SAH组	30.51 ± 4.59*
SAH组	30.42 ± 4.39*
对照组	7.49 ± 1.00

注:*与对照组比较, $P<0.05$;^{*}与SAH组比较, $P<0.05$;[△]与经鼻NS+SAH组比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,四组大鼠脑组织中caspase-3荧光强度比较,差异有统计学意义($F=67.19, P<0.05$)。与对照组比较,SAH组、经鼻NS+SAH组、经鼻CGRP+SAH组的脑组织皮层caspase-3荧光强度值均明显上升,差异有统计学意义(t 分别=13.21、13.27、11.32, P 均 <0.05);经鼻NS+SAH组的脑组织皮层caspase-3荧光强度值与SAH组比较,无明显

差异($t=0.06, P>0.05$),经鼻CGRP+SAH组的脑组织皮层caspase-3荧光强度值明显低于SAH组和经鼻NS+SAH组(t 分别=4.88、4.93, P 均 <0.05)。

3 讨论

SAH后缩血管物质和扩血管物质之间的比例失衡在CVS的发生和发展中起到了至关重要的作用,为维持脑组织必需的血流量,大量CGRP被耗损^[6,9]。研究发现,SAH后内源性CGRP活性下降与CVS和继发性脑缺血损伤的发生密切相关,脑血管对外源性CGRP的反应性明显增强,提示补充CGRP可能有益于SAH后脑血管痉挛及继发性脑缺血损伤的防治,阻断CGRP活性可使CVS程度明显加重^[10]。上述发现表明,CGRP耗竭在SAH后CVS的发生和发展中起着十分重要的作用,但CGRP是由37个氨基酸组成的大分子多肽,限制了CGRP从血液循环中有效透过血脑屏障进入脑组织和脑脊液,因此常规的给药途径难以奏效^[5]。目前已发现很多细胞因子具有神经保护和改善脑血流的作用。由于大分子物质难以有效透过血脑屏障而在脑内或脑脊液中达到有效治疗浓度,因此血脑屏障的存在成为限制肽类和蛋白质等大分子药物应用的瓶颈。近年来,围绕如何使肽类和蛋白质药物克服血脑屏障而有效进入中枢进行了大量的研究。其中,经鼻腔绕过血脑屏障给药途径的有效性得到了很多研究的证实。经鼻靶向中枢给药被认为是一种安全、便捷、无创的给药方法,肽类和蛋白质等大分子药物可以快速在脑部达到有效浓度且可避免全身用药可能带来副作用的风险^[11,12]。

本实验发现对照组大鼠脑组织中caspase-3蛋白见少量表达;SAH组和经鼻给NS+SAH组的大鼠脑组织中caspase-3蛋白阳性细胞数明显增多与对照组比较有明显差异($P<0.05$),SAH组与经鼻NS+SAH组比较无明显差异($P>0.05$);经鼻CGRP+SAH治疗组caspase-3蛋白表达比SAH组和经鼻NS+SAH组明显下降($P<0.05$)。本次研究发现在正常情况下细胞凋亡极少,当受到一定刺激之后细胞大量凋亡,因而促凋亡基因caspase-3就要大量表达,当经鼻腔予CGRP治疗之后caspase-3表达比SAH组明显减少,从而对脑细胞起到保护作用。而CGRP具有多种生物学活性,可通过直接作用或通过激活血管平滑肌细胞上ATP敏感的钾通道开放、提高一氧化氮合酶活性、增加一氧化氮产生等而扩张痉挛的脑血管;抑制血管平滑肌细胞增殖和血管

重构;保护血管内皮细胞并促进其增殖,促进内皮细胞向受损的血管壁迁移,促进血管修复和血管新生;抑制死亡受体信号转导途径而发挥神经保护作用等^[13-15]。因此,经鼻应用CGRP对SAH后脑损伤的保护作用可能涉及到多个不同的环节,其详细机制有待进一步的研究来阐明。

参考文献

- Zhang H, Wang X, Li X, et al. Reversible cerebral vasoconstriction syndrome and subarachnoid hemorrhage, which occurs first[J]. Intern Med, 2012(1): 135-137.
- Diringer MN. Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Crit Care Med, 2009, 37(2): 432-440.
- Helbok R, Ko SB, Schmidt JM, et al. Global cerebral edema and brain metabolism after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2011, 42(6): 1534-1539.
- Bian LH, Liu YF, Nichols LT, et al. Epidemiology of subarachnoid hemorrhage, patterns of management, and outcomes in china: a hospital-based multicenter prospective study[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(11): 895-902.
- Omeis I, Neil JA, Mural IR, et al. Treatment of cerebral vasospasm with biocompatible controlled-release systems for intracranial drug delivery[J]. Neurosurgery, 2008, 63(6): 1011-1021.
- Shin HK, Hong KW. Importance of calcitonin in gene-related peptide, adenosine and reactive oxygen species in cerebral auto regulation under normal and diseased conditions [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004, 31(1-2): 1-7.
- Chu Y, Miller JD, Heistad DD. Gene therapy for stroke: 2006 overview[J]. Curr Hypertens Rep, 2007, 9(1): 19-24.
- Brasnjevic I, Steinbusch HW, Schmitz C, et al. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier[J]. Prog Neurobiol, 2009, 87(4): 212-251.
- Sun BL, Xia ZL, Zhang SM, et al. Studies on effects of L-arginine antagonism on endothelin in plasma and brain tissue in rats [J]. Chin Pharm J, 2003, 38(12): 919-921.
- Locatelli IM. The importance of substance P and calcitonin in gene related peptide as vasodilator neuropeptide during acute phase of experimental post hemorrhagic vasospasm [J]. J Neurosurg, 2000, 44(4): 186-191.
- Brasnjevic I, Steinbusch HW, Schmitz ZC, et al. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier[J]. Prog Neurobiol, 2009, 87(4): 212-251.
- Pathan SA, Iqbal Z, Zaidi SM, et al. CNS drug delivery systems: novel approaches[J]. Recet Pat Drug Deliv Formul, 2009, 3(1): 71-89.
- Yin MH, Xu XH, Li YJ. Protective effects of brevis caprine on cell apoptosis induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice[J]. Chin Pharm J, 2008, 43(3): 184-188.
- Liu P, Wang JY, Liu WQ, et al. Protective effects of sodium ferulate on focal brain ischemia/reperfusion in rats by regulating ET /CGRP of brain tissue in rats [J]. Chin Pharm J, 2007, 42(24): 1859-1863.
- Recober A, Russo AF. Calcitonin in gene-related peptide: an update on the biology[J]. Curr Opin Neurol, 2009, 22(3): 241-246.

(收稿日期 2017-12-18)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第262页)

- Baumann T, Bergmann S, Schmidt-Rose T, et al. Glutathione-conjugated sulfanylalkanols are substrates for ABCC11 and γ -glutamyl transferase 1: a potential new pathway for the formation of odorant precursors in the apocrine sweat gland [J]. Exp Dermatol, 2014, 23(4): 247-252.
- Ishikawa T, Toyoda Y, Yoshiura K, et al. Pharmacogenetics of human ABC transporter ABCC11: new insights into apocrine gland growth and metabolite secretion[J]. Front Genet, 2013, 2(3): 306.
- Sosonkina N, Nakashima M, Ohta T, et al. Down-regulation of ABCC11 protein (MRP8) in human breast cancer [J]. Exp Oncol, 2011, 33(1): 42-46.
- Natsch A, Gfeller H, Gygax P, et al. A specific bacterial aminoacylase cleaves odorant precursors secreted in the human axilla[J]. J Biol Chem, 2003, 278(8): 5718-5727.
- Jonathan B, Sharon E, XQ Chen, et al. No evidence for an association between the earwax-associated polymorphism in ABCC11 and breast cancer risk in Caucasian women[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 126(1): 235-239.

(收稿日期 2018-03-08)

(本文编辑 蔡华波)