



论文

经脑间质途径的简单扩散给药治疗脑缺血

韩鸿宾^{①*}, 夏作理^{②*}, 陈翥^①, 侯超^①, 李玮博^③

① 北京大学第三医院放射科, 北京 100191;

② 泰山医学院附属医院神经内科, 泰安 271000;

③ Department of Medical Radiation Physics and Diagnostics, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health (GmbH), Neuherberg 85764, Germany

* 联系人, E-mail: hanhongbin@bjmu.edu.cn; xiazuoli@163.com

收稿日期: 2010-12-13; 接受日期: 2011-01-11

国家自然科学基金(批准号: 30972811 和 81071148)、教育部博士点基金和北京市自然科学基金(批准号: 7093137)资助项目

摘要 尽管脑间质给药被认为是避开血脑屏障阻碍, 实现中枢神经系统给药的一种有效途径, 但是经过 16 年的临床和基础研究后发现, 只有恶性胶质母细胞瘤经该途径给药有效. 本研究对经脑间质途径给予神经保护药治疗脑缺血进行了探索, 并首次提出了经脑间质的简单扩散给药技术. 结果发现, 对大脑中动脉永久栓塞的大鼠模型预先一次性给予胞二磷胆碱(0.0025 g/kg, 50 mmol/L), 栓塞 12 h 后显示, SDD 组的梗死体积仅是腹腔给药组的 1/6, 而 SDD 组胞二磷胆碱的用量却只有腹腔给药组的 1/800. 本研究表明, 选择合适的给药位点, 应用简单扩散可实现药物在靶区的分布, 并在较长时间内维持有效浓度.

关键词永久性大脑中动脉栓塞
动物模型
脑缺血
胞磷胆碱治疗
磁共振成像
神经保护

常规给药途径很难使药物有效进入中枢神经系统而发挥治疗作用^[1]. Edward Oldfield 及其同事提出了绕过血脑屏障的直接给药途径, 即对流增强输注法(convection enhanced delivery, CED)^[2]. CED 法是一种经一条或多条导管以恒定压力进行药物输注的方法. 他们研究了不同分子量大小、不同极性物质在脑内的扩散范围以及局部脑组织内的药物浓度分布. 在过去的 16 年里, 人们在中枢神经系统疾病上进行了一系列临床试验和基础研究^[3], 仅仅在胶质瘤的治疗中取得了一定的效果^[4]. 本研究开创了一种简单扩散给药(simple diffusion delivery, SSD)方式来治疗脑缺血.

SSD 是在先前实验^[5](基于磁共振成像示踪剂的脑

间质成像研究)基础上进行的. 研究发现, 小分子物质, 如钆喷酸葡胺(gadopentetate dimeglumine, Gd-DTPA), 经大鼠尾状核原位注射, 其在细胞外间隙(extracellular space, ECS)内扩散 2 h 后, 主要分布于大脑中动脉的供血区. 目前已知 Gd-DTPA 不仅是临床上常用的磁共振造影剂, 同时也是模拟小分子药物在脑间质内分布的有效示踪剂^[6]. 基于上述研究, 可以认为经脑间质预先注射神经保护剂对脑缺血的治疗效果将明显优于常规给药途径. 由于神经保护剂胞二磷胆碱(cytidine diphosphate choline, CDPC)在极性和分子量大小方面与 Gd-DTPA 十分类似, 因此被选择为本次研究药物^[7,8].

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验严格遵守国家动物实验指南的要求, 并且通过了北京大学医学部伦理审查(编号: No. LA2009-008). 实验选用适龄雄性 SD 大鼠, 体重在 250~280 g 之间.

1.2 实验分组

使用脑立体定位仪(美国 Stoelting 公司)经颅直接注射包二磷酸胆碱于大鼠的尾状核区(前囟前 1 mm, 旁开 3 mm, 深 4.5 mm). 动物随机分为 7 组: (i) 脑内微量注射 5 μ L 生理盐水后 2 h 永久性大脑中动脉栓塞(permanent middle cerebral arterial occlusion, pMACO) (对照组, $n=8$); (ii) 脑内微量注射 0.00125 g/kg 胞磷胆碱后 2 h pMACO(IC 1 组; $n=8$); (iii) 脑内微量注射 0.0025 g/kg 胞磷胆碱后 2 h pMACO(IC 2 组; $n=8$); (iv) 脑内微量注射 0.00375 g/kg 胞磷胆碱后 2 h pMACO(IC 3 组; $n=8$); (v) 脑内微量注射 0.005 g/kg 胞磷胆碱后 2 h pMACO(IC 4 组; $n=8$); (vi) 脑内微量注射 0.0125 g/kg 胞磷胆碱后 2 h pMACO (IC 5 组; $n=8$); (vii) 腹腔注射 2 g/kg 胞磷胆碱后 2 h pMACO (对照组; $n=8$). 药物注射时间的选择根据本实验室前期有关 Gd-DTPA 在脑细胞外间隙扩散的结果制定^[5].

1.3 大鼠永久性大脑中动脉栓塞模型制作

复合麻醉剂腹腔注射, 电热毯加热保持大鼠体温在(38 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C. 使用改良的 Longa 法制作大鼠永久性局灶性脑缺血模型^[6]. 实验结束后将大鼠归于笼中, 允许进食和饮水.

1.4 永久性脑缺血大鼠的磁共振成像

使用 3.0T 的磁共振成像设备(德国西门子公司 Magnetom Trio)来观察脑缺血的磁共振神经影像, 利用腕线圈得到 T1W 和 T2W 磁共振图像. 3D MP-RAGE T1WI 图像参数如下: TE 时间=3.7 ms; TR 时间=1500 ms; 翻转角 $\alpha=9^{\circ}$; TI 时间=900 ms; 视野(FOV)=267 mm; 体素=0.5 $\times$ 0.5 $\times$ 0.5 mm; 分辨率=512 $\times$ 512. TSE-T2WI 图像参数: TE 时间=92 ms; TR 时间=3620 ms; 翻转角 $\alpha=120^{\circ}$; 层厚=2 mm; FOV=80 mm; 分辨率=256 $\times$ 256. pMACO 图像采集时间设定为

缺血后 12 h.

1.5 神经功能缺损评价(Longa5 分评分)^[9]

Longa 评分标准为, 0 分: 无神经缺损症; 1 分: 提尾巴时对侧前肢内收, 不能完全伸直; 2 分: 爬行时向对侧旋转、划圈; 3 分: 站立时向对侧倾倒; 4 分: 无自主活动伴意识障碍; 5 分: 死亡.

1.6 2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)染色和梗死面积的测量^[10]

大鼠于 pMACO 后 12 h 麻醉取脑, 并置于脑切片模具(上海麦森医疗科技有限公司)中, 沿视交叉向后切片, 每片厚约 2 mm(切片前可在-20 $^{\circ}$ C 条件下对新鲜鼠脑进行速冻以增加其硬度), 用含 0.2% TTC(美国 Sigma 公司)的磷酸盐缓冲液于 37 $^{\circ}$ C 温箱中染色 15~30 min(染色期间不断翻动使染色均匀). 染色后使用数码相机(日本佳能公司)拍照, 用 Image-Pro-Plus 6.0 软件(美国 Media Cybernetics 公司)测量梗死体积比率(即梗死区面积占同侧大脑半球面积的百分比). 最后将 TTC 染色得到的梗死面积与磁共振图像进行比较.

1.7 统计学分析

经过计算得到数据的 $\bar{x}\pm$ SD, 使用 SPSS13.0 进行统计学分析. 采用单一因素方差分析进行统计, $P<0.05$ 示差异显著.

2 结果

2.1 通过脑间质提前注射 CDPC 可显著缩小脑梗死体积并延迟神经功能损伤

IC 2 组与对照组相比($n=8$, $P<0.01$, 表 1 和图 1, 2), 在病理水平(TTC 染色)和功能水平(Longa5 级评分)都显示出 CDPC 经脑间质给药途径后发挥出良好的神经保护效果. 在 IC 1, 3, 4, 5 组, 腹腔注射组与对照组之间没有明显差异($n=8$, $P>0.05$, 表 1 和图 1, 2). 另外, IC 2 组与腹腔给药组之间有明显的统计学差异($n=8$, $P<0.01$, 表 1 和图 1, 2). 已知神经功能损伤与皮质损伤的严重程度相关^[9]. 磁共振成像结果提示, 神经功能的改善可能是因为挽救了缺血半暗带(图 2).

2.2 pMACO 后 12 h 的 MRI 结果

应用 MRI 监测所有实验组缺血损伤的病理进展. T1WI 可以很好地显示解剖结构, 而 T2WI 对于水含量的改变高度敏感. 脑梗死典型的 MRI 表现为: T1WI 低信号, T2WI 高信号^[9]; 信号改变区域和信号改变程度分别反映脑损伤部位和脑损伤严重程度(图 2).

3 讨论

本研究应用了一种新的简单扩散传输(simple diffusion delivery, SDD)技术, 用于在脑间质中更有

效、更微创地输送神经保护药物. 结果表明, 极少量的神经保护药物经 SDD 技术给药后, 即可达到对脑缺血的显著保护作用. SDD 以微剂量注射为特点, 其有效性同时取决于注射位点和神经保护药物的选择.

SDD 的设计基于以 Gd-DTPA 为示踪剂进行的脑间质示踪成像. 前期研究表明, 以尾状核作为注射位点, 微剂量 Gd-DTPA 在注射后, 可扩散至大脑中动脉的大部分供血区域, 其浓度在注射后 2~4 h 内可维持在较高水平, 且相对稳定^[5]. 由此设想, 与 Gd-DTPA 有着相似性质的神经保护药物, 其扩散模式也应与 Gd-DTPA 相同. 在众多神经保护药物中,

表 1 pMCAO 后 12 h 存活大鼠的神经学评分和梗死体积比

组别	对照组	IC 1 组	IC 2 组	IC 3 组	IC 4 组	IC 5 组	IP 组
神经学评分	2.9±0.8	2.9±0.8	1.6±0.9*	1.9±0.4	2±1.2	1.7±0.6	2.0±0.8
梗死体积比(%)	27.7±10.5	27.5±11.9	4.1±2.0*	24.0±12.9	23.5±11.7	30.3±18.8	24.0±10.4

*: 示 $P<0.05$

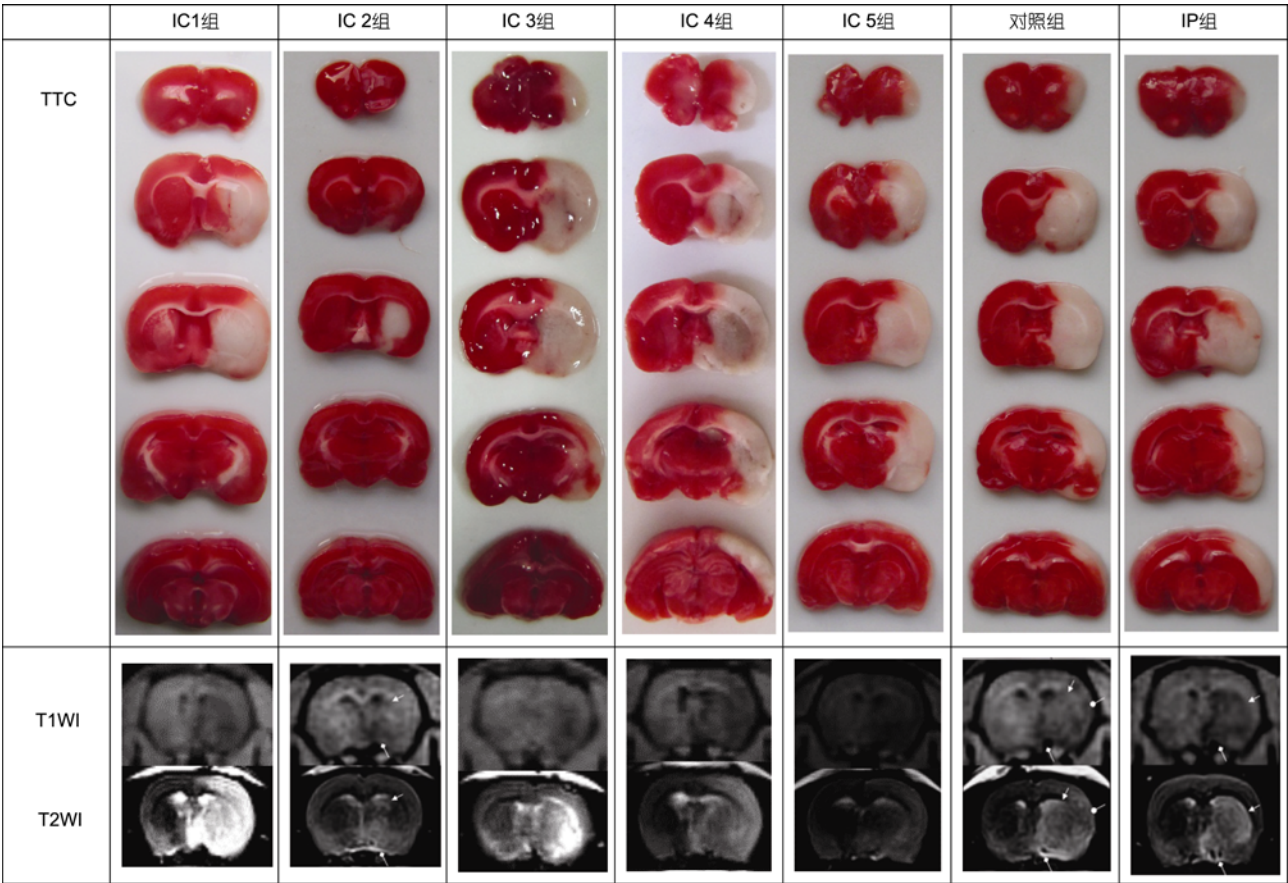


图 1 TTC 染色和 6 组的 MRI 结果
TTC 染色和 MRI 显示 7 组缺血部位的不同分布. 梗死区域呈 T1WI 低信号、T2WI 高信号

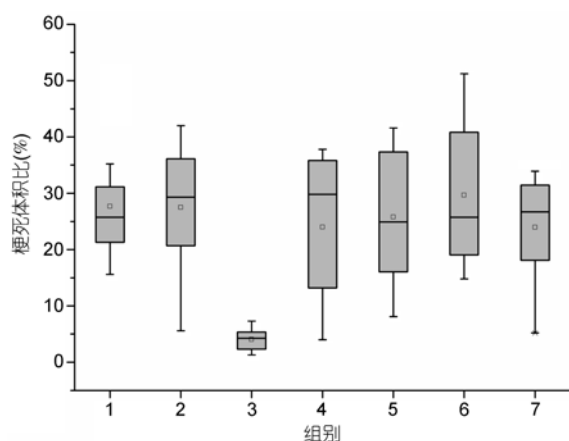


图 2 7 组的梗死体积比

(1) 脑内微量注射 5 μ L 生理盐水 2 h 后永久性大脑中动脉栓塞 (pMACO) (对照组, $n=8$); (2) 脑内微量注射 0.00125 g/kg CDPC 2 h 后 pMACO (IC 1 组; $n=8$); (3) 脑内微量注射 0.0025 g/kg CDPC 2 h 后 pMACO (IC 2 组; $n=8$); (4) 脑内微量注射 0.00375 g/kg CDPC 2 h 后 pMACO (IC 3 组; $n=8$); (5) 脑内微量注射 0.005 g/kg CDPC 2 h 后 pMACO (IC 4 组; $n=8$); (6) 脑内微量注射 0.0125 g/kg CDPC 2 h 后 pMACO (IC 5 组; $n=8$); (7) 腹腔注射 2 g/kg CDPC 2 h 后 pMACO (对照组; $n=8$)

选择 CDPC 是因为它在分子量(Gd-DTPA 938.02 Da, CDPC 510.31 Da)和极性(均为亲水性)上都与 Gd-DTPA

类似。此外, CDPC 又是脑组织的必需营养物胆碱的衍生物, 因此较其他外源性药物更安全, 更适用于经脑间质给药途径^[12]。

CDPC 是目前公认的急性缺血性卒中治疗最有希望的神经保护药物之一^[13-15]。它具有促进磷脂合成、抑制游离脂肪酸释放、稳定细胞膜和减少自由基生成的作用^[17]。但是, 临床试验的 Meta 分析显示, CDPC 的神经保护作用具有浓度依赖性。常规途径给药后, 脑对 CDPC 的摄取率极低, 这是影响其疗效的重要因素^[18]。更重要的是, 脑内微血管仅占全脑容积的 3%^[19], 加之缺血后血管再通前呈现的低灌注状态, 将使得 CDPC 更难到达梗死部位。而脑 ECS 约占全脑容积的 20%, 大大高于脑内微血管所占比例, 利用 SDD 技术, CDPC 可成功避开血脑屏障, 并有效到达梗死部位, 从而克服因低灌注导致的药物转运难题。

本实验提出了一种新的治疗中枢神经系统疾病的给药途径 SDD。与 CED 法相比, SDD 更有效、副作用更小、给药剂量更少。由于药物在脑间质中扩散和清除特征是决定应用 SDD 技术治疗效果的关键所在, 因此建立一种可靠的定量测量方法, 将会推动 SDD 技术在未来中枢神经系统疾病治疗中的应用。

致谢 感谢北京天坛医院神经放射研究所戴建平教授、大连医科大学附属第二医院放射科刘兴第教授对本文的建议。

参考文献

- 1 Fisher M, Feuerstein G, Howells D W, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*, 2009, 40: 2244-2250
- 2 Bobo R H, Laske D W, Akbasak A, et al. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 2076-2080
- 3 Debinski W, Tatter S B. Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother*, 2009, 9: 1519-1527
- 4 Gallia G L, Brem S, Brem H. Local treatment of malignant brain tumors using implantable chemotherapeutic polymers. *J Natl Compr Cancer Netw*, 2005, 3: 721-728
- 5 He Q, Han H, Xu F, et al. Imaging and quantitative measurement of brain extracellular space using MRI Gd-DTPA tracer method. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2010, 42: 188-191
- 6 Krauze M T, Forsayeth J, Park J W, et al. Real-time imaging and quantification of brain delivery of liposomes. *Pharm Res*, 2006, 23: 2493-2504
- 7 Fresta M, Puglisi G, Di Giacomo C, et al. Liposomes as *in vivo* carriers for citicoline: effects on rat cerebral post-ischaemic reperfusion. *J Pharm Pharmacol*, 1994, 46: 974-981
- 8 Caravan P, Ellison J J, McMurry T J, et al. Gadolinium(iii) chelates as mri contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev*, 1999, 99: 2293-2352

- 9 Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84–91
- 10 Joshi C N, Jain S K, Murthy P S. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2004, 13: 11–17
- 11 Moseley M E, Cohen Y, Mintorovitch J, et al. Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy. *Magn Reson Med*, 1990, 14: 330–346
- 12 Overgaard K, Meden P. Citicoline--the first effective neuroprotectant to be combined with thrombolysis in acute ischemic stroke? *J Neurol Sci*, 2006, 247: 119–120
- 13 Minnerup J, Schabitz W R. Multifunctional actions of approved and candidate stroke drugs. *Neurotherapeutics*, 2009, 6: 43–52
- 14 Cho H J, Kim Y J. Efficacy and safety of oral citicoline in acute ischemic stroke: drug surveillance study in 4,191 cases. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2009, 31: 171–176
- 15 Clark W M, Wechsler L R, Sabounjian L A, et al. A randomized efficacy trial of citicoline in patients with acute ischemic stroke. *Stroke*, 1999, 30: 2592–2597
- 16 Clark W M, Wechsler L R, Sabounjian L A, et al. A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients. *Neurology*, 2001, 57: 1595–1602
- 17 Clark W M. Efficacy of citicoline as an acute stroke treatment. *Expert Opin Pharmacother*, 2009, 10: 839–846
- 18 Adibhatla R M, Hatcher J F. Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia. *J Neurosci Res*, 2002, 70: 133–139
- 19 Sykova E, Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev*, 2008, 88: 1277–1340