

· 实验研究 ·

经脑间质微穿刺注射胞磷胆碱治疗脑缺血的有效剂量范围研究^{*}

陈 翥 韩鸿宾^{**} 傅 瑜^{①**} 马长城^② 彭 芸^③ 岳云龙^④ 张学梅^⑤

(北京大学第三医院放射科 磁共振成像设备与技术北京市重点实验室, 北京 100191)

【摘要】 目的 探讨胞磷胆碱(cytidine 5'-diphosphocholine, CDPC)经脑间质途径预防性治疗脑缺血的有效剂量范围。**方法** 实验对象为 56 只成年雄性 SD 大鼠,随机分为 7 组,分别为对照组(尾状核中心注射生理盐水 5 μ l),腹腔组(腹腔注射 CDPC 2 g/kg),实验组 1~5(尾状核中心注射 CDPC 5 μ l,浓度分别为 25、40、50、60 和 75 mmol/L)。按上述分组预防性给药 2 h 后,采用永久性大脑中动脉栓塞(permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO)模型模拟脑缺血过程,并应用梗死体积比的测量比较各组间的治疗效果差异。**结果** 应用简单扩散给药(simple diffusion delivery, SDD)方式脑内直接微量注射 CDPC 的最佳有效保护浓度为 50 mmol/L(实验组 3,梗死体积比为 4.1% \pm 2.0%),实验组 2 与实验组 4 的梗死体积比分别为 8.1% \pm 4.1% 和 8.7% \pm 2.4%,以上 3 组与对照组 27.7% \pm 10.5% 相比均有统计学差异(P 均 = 0.000)。**结论** 经尾状核预防性微穿刺给药治疗脑缺血的有效浓度范围为 40~60 mmol/L。

【关键词】 微创治疗; 间质给药; 神经保护; 脑缺血

中图分类号:R-332

文献标识:A

文章编号:1009-6604(2012)09-0845-03

Effective Dose Range for Micropuncture Injection of Cytidine 5'-diphosphocholine via the Brain Interstitial Route for Cerebral Ischemia Chen He, Han Hongbin, Fu Yu, et al. Department of Radiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

【Abstract】 Objective To investigate the effective dose range of cytidine 5'-diphosphocholine (CDPC) for cerebral ischemia by micropuncture injection via the brain interstitial route. **Methods** Totally 56 adult male Sprague Dawley (SD) rats were enrolled in this study. The rats were randomly divided into 7 groups: control group (5 μ l saline was injected into the caudate nucleus), intraperitoneal group (2 g/kg CDPC was injected into the peritoneal cavity), and experimental groups 1-5 (5 μ l CDPC was injected into the caudate nucleus at a dosage of 25, 40, 50, 60 and 75 mmol/L, respectively). Two hours after the preventive administration, permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) was made to simulate the process of cerebral ischemia, and the infarct volume of each group was assessed. **Results** With simple diffusion delivery (SDD), the most effective protective concentration of CDPC was 50 mmol/L (experimental group 3, infarct volume ratio: 4.1% \pm 2.0%). The infarct volume ratio in the experimental groups 2 (8.1% \pm 4.1%), 3 and 4 (8.7% \pm 2.4%) was all significantly lower than that in the control (27.7% \pm 10.5%, all P = 0.000). **Conclusion** For cerebral ischemia, the effective dose range for micropuncture injection of CDPC via the brain interstitial route was 40-60 mmol/L.

【Key Words】 Minimally invasive treatment; Interstitial administration; Neuroprotection; Brain ischemia

为避开血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)对药物的阻挡作用,使药物和靶细胞有效接触,减小药物剂量,避免常规给药途径造成的毒副作用,学者们从 20 世纪末开始尝试经脑间质微穿刺给药,其中最成熟的例子就是对流增强给药方式(convection

enhanced delivery, CED)应用于治疗恶性胶质瘤^[1]。但自其发明至今已有 16 年的历史,其发展缓慢主要是由于给药过程缺乏有效的监测手段,并且由于 CED 采用加压给药的方式,有潜在导致脑间质水肿等并发症的可能。最近本课题组利用小分子药物在

* 国家自然科学基金(30972811、81071148、81171080);高等学校博士学科点专项基金(20090001110095)

** 通讯作者, E-mail: hanhongbin@bjmu.edu.cn(韩鸿宾); lilac_fu@yahoo.cn(傅瑜)

① (北京大学第三医院神经内科, 北京 100191)

② (北京大学第三医院神经外科, 北京 100191)

③ (首都医科大学附属北京儿童医院放射科, 北京 100049)

④ (首都医科大学附属北京世纪坛医院放射科, 北京 100038)

⑤ (大连大学医学院药理教研室, 大连 116622)

脑间质内扩散的规律,建立了微穿刺经脑间质简单扩散给药 (simple diffusion delivery, SDD) 的方式。尽管已证实经脑间质途径给予 5 μl 浓度为 50 mmol/L 的胞磷胆碱 (cytidine 5'-diphosphocholine, CDPC) 可有效保护梗死区域^[2],但药物发挥作用的有效剂量范围及作用机制都尚不清楚。为解决上述问题,本研究拟对 50 mmol/L 周围的浓度进行试验来进一步明确经脑间质途径应用微量 CDPC 治疗脑缺血的有效剂量范围,为经脑间质途径的微创给药治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

56 只普通级成年雄性 SD 大鼠购自北京大学医学部实验动物科学部 [SYXK (京) 2011 - 0039], 体重 260 ~ 320 g。动物实验设计经北京大学医学部伦理委员会审批通过 (LA2009 - 008)。

1.2 分组

56 只雄性 SD 大鼠随机分成 7 组,各 8 只:对照组,尾状核中心注射生理盐水 5 μl ;腹腔组,腹腔注射 CDPC 2 g/kg^[3];实验组 1 ~ 5,尾状核中心注射 CDPC 5 μl ,浓度分别为 25、40、50、60 和 75 mmol/L。7 组均于注射后 2 h 行永久性大脑中动脉栓塞 (permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO) 模型。

1.3 经脑间质途径给药

实验组 1 ~ 5:CDPC 注射液 (山东齐鲁药业) 用生理盐水稀释至用药浓度后备用。大鼠经复合麻醉剂 (3 ml/kg) 腹腔注射麻醉后,俯卧位固定于大鼠脑立体定位仪。切开头皮,分离骨膜,暴露前囟,使用微量注射器将 5 μl 不同浓度的 CDPC 溶液以 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度均匀手推注入大鼠脑内尾状核区 (前囟前 1 mm,旁开 3 mm,深 4.5 mm)。注射完毕后留针 5 min,再缓慢移出针头。对照组注射方法相同,注射药物改为生理盐水 5 μl 。腹腔组为腹腔注射 CDPC 2 g/kg。

1.4 pMCAO 模型制作^[4]

注射 CDPC 或生理盐水后 2 h,复合麻醉剂 (3 ml/kg) 腹腔麻醉后取仰卧位固定。润滑液润湿后备皮,做颈部前正中切口。沿气管一侧向下钝性分离肌肉筋膜组织,保持术野清晰干净,两侧皮肤与皮下组织用小拉钩固定于手术台,剪断二腹肌,用电凝器分离下端筋膜,分离暴露右侧颈总动脉。向上于颌下腺下方找到颈总动脉分叉,距分叉下 1 cm 处用微动脉夹夹闭颈总动脉,双线结扎颈外动脉,距根部约 0.5 cm,两线间保证一定距离,剪断。用电凝器夹闭颈外动脉小分支,查看颈内动脉各分支,辨认翼腭动脉,夹闭颈内动脉主干。在颈外动脉上剪一小口,将线栓经小口插入颈外动脉,松开经内动脉处的动脉夹,将栓子送入颈内动脉,插入深度 (距颈总动

脉分叉处) 约为 18 ~ 22 mm,有抵抗感时停止。栓子送入后,用手术缝线固定线栓,松开颈总动脉处的动脉夹,清理手术视野后,缝合颈部皮肤。术中用电热毯使大鼠保持恒定体温,术野覆盖湿纱布。

1.5 梗死灶体积定量^[5]

pMCAO 术后 12 h 断头取脑。在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下对新鲜鼠脑进行速冻以增加硬度,将鼠脑置于脑切片模具中,沿视交叉向后切片,每片厚约 2 mm。将脑片置于 0.2% 的 2,3,5 - 氯化三苯基四氮唑 (2,3,5 - triphenyl - tetrazolium chloride, TTC) 染色液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中染色 15 ~ 30 min (染色期间不断翻动使染色均匀)。染色后的脑片经 4% 多聚甲醛固定并摄片。用 Image - Pro - Plus 6.0 软件测量梗死灶的体积百分比,计算公式如下:

$$V_{\text{梗死灶}}(\%) = \frac{[V_{\text{梗死对侧半球}} - (V_{\text{梗死侧半球}} - V_{\text{梗死灶}})]}{V_{\text{全脑}}} \times 100\%$$

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析 (One way ANOVA),两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果

见图 1,梗死灶体积百分比在 pMCAO 大鼠模型不同处理组间差异显著 ($F = 11.164$, $P = 0.000$)。实验组 2、3 和 4 三组大鼠的平均梗死体积百分比明显小于对照组 (P 均 = 0.000)。虽然实验组 1、5 和腹腔组大鼠的平均梗死体积百分比与对照组相比有下降趋势,差异无显著性 (P 分别为 0.419, 0.965, 0.423)。故认为经脑间质途径应用 CDPC 治疗脑梗死的有效浓度范围是 40 ~ 60 mmol/L。

3 讨论

本研究证实,经脑间质途径应用 SDD 微穿刺给予微剂量 CDPC 可成功避开 BBB 的阻挡,有效预防缺血性脑损伤,其有效浓度范围是 40 ~ 60 mmol/L,仅为常规腹腔给药剂量的 1/800,而神经保护效率却极大提升,达到了微创治疗的目的。尽管目前无法在脑缺血发生前对人体实施经脑间质途径的预防性给药,但是对于冠状动脉旁路移植术后卒中的预防^[6],或许这是一个潜在有效的替代措施。

脑间质自 20 世纪 60 年代发现以来,被认为是神经细胞与血液之间最重要的物质交换通道之一。正常脑组织中间质的平均容积分数超过 20%^[7],远远高于脑微血管占全脑容积的比例 (< 3%),为药物在脑内的扩散与分布提供了解剖结构基础。经脑间质给药治疗最早由 Bobo 等于 1994 年提出,其核心理念为 CED,即通过施加一个正向液压梯度向脑内持续注射药物,该方法被认为是未来治疗神经系统疾病的有效途径^[8]。CED 的优势在于大分子药

物在脑间质内扩散受限,应用持续加压给药可以使药物到达靶区。由于 CED 采用持续加压给药,因此容易引起脑水肿等并发症,有效性及稳定性仍待提高^[9]。然而,对于小分子物质,如 CDPC,可以不借

助任何外加压力,只依赖局部浓度梯度所致的自由扩散运动就可到达靶区,这就使得非外加压力性的微创、微剂量给药(SDD)成为可能,并可有效避免 CED 因持续加压注射引起的脑水肿等并发症。

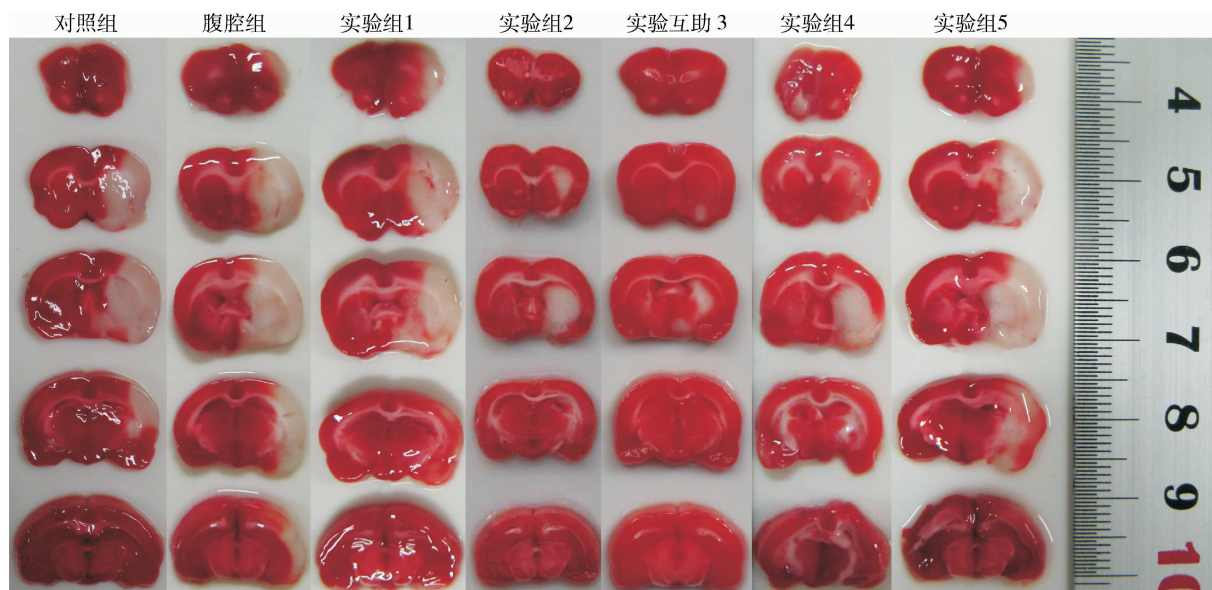


图 1 pMCAO 大鼠模型不同处理组梗死灶的 TTC 染色结果(白色为梗死区,梗死体积百分比:对照组,27.7% ± 10.5%;腹腔组,24.0% ± 10.4%;实验组 1,27.5% ± 11.9%;实验组 2,8.1% ± 4.1%;实验组 3,4.1% ± 2.0%;实验组 4,8.7% ± 2.4%;实验组 5,24.0% ± 12.9%)

决定 CDPC 神经保护效率的关键因素是到达靶组织的药物局部浓度。根据扩散方程,脑 ECS 中的药物浓度不仅依赖于扩散,还依赖于清除。既往关于脑脊液(cerebro-spinal fluid, CSF)脑内引流的研究表明,实验所用放射性示踪剂可在尾状核内长时间滞留,2 h 后仅有 10% ~ 15% 的示踪剂进入 CSF 团流^[10],这一结论为本研究结果提供了佐证。而 CDPC 对侧脑室旁组织和丘脑区的“乏保护”,则是清除速率过快的结果,推测与该区域 BBB 结构不完整有关^[11]。此外,药物清除还受到脑间质容积分数和迂曲度的影响,由脑缺血引起的细胞水肿,将会缩小脑间质的容积分数^[12],增加迂曲度,从而降低药物的清除速率,这可能也是 CDPC 药效得以充分发挥的重要原因。

总之,本研究确定了经脑间质微穿刺注射 CDPC 治疗脑缺血的有效药物剂量范围,为经脑间质途径的微创给药治疗提供了有价值的参考依据。

参考文献

- 1 Debinski W, Tatter SB. Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother*, 2009, 9 (10): 1519 - 1527.
- 2 Han HB, Xia ZL, Chen H, et al. Simple diffusion delivery via brain interstitial route for the treatment of cerebral ischemia. *Sci China C Life Sci*, 2011, 54: 235 - 239.

- 3 Hurtado O, Moro MA, Cardenas A, et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis*, 2005, 18 (2): 336 - 345.
- 4 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84 - 91.
- 5 Joshi CN, Jain SK, Murthy PS. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2004, 13 (1): 11 - 17.
- 6 Hirsch WS, Ledley GS, Kotler MN. Acute ischemic syndromes following coronary artery bypass graft surgery. *Clin Cardiol*, 1998, 21 (9): 625 - 632.
- 7 Sykova E, Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev*, 2008, 88 (4): 1277 - 1340.
- 8 Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, et al. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91 (6): 2076 - 2080.
- 9 Bidros DS, Vogelbaum MA. Novel drug delivery strategies in neuro-oncology. *Neurotherapeutics*, 2009, 6 (3): 539 - 546.
- 10 Szentistvanyi I, Patlak CS, Ellis RA, et al. Drainage of interstitial fluid from different regions of rat brain. *Am J Physiol*, 1984, 246 (6 Pt 2): F835 - F844.
- 11 Norstain E, Gomuc B, Meister B. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J Chem Neuroanat*, 2008, 36 (2): 107 - 121.
- 12 Sykova E, Mazel T, Vargova L, et al. Extracellular space diffusion and pathological states. *Prog Brain Res*, 2000, 125: 155 - 178.

(收稿日期:2012-04-05)

(修回日期:2012-07-20)

(责任编辑:王惠群)