论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201501009

液态氟碳纳米粒对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的保护作用

张 桓,朱 继 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

[摘要] **目的** 探讨液态氟碳全氟辛基溴(perfluorooctyl-bromide, PFOB)纳米粒对大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后早期脑损伤(early brain injury ,EBI)的保护作用。**方法** 采用雄性健康SD大鼠共90只,分为假手术组(SHAM)30只、蛛血组(SAH)30只及PFOB干预组(SAH + PFOB)30只。使用经视交叉前池注血法制作SAH模型。术后24 h检测脑含水量,透射电镜观察大鼠海马形态学改变,TUNEL染色检测大鼠海马CA1区神经元凋亡,完成免疫组化染色。Western blot检测术后12、24、48、72 h Caspase-3蛋白表达情况。**结果** SAH + PFOB组同SAH组比较,脑含水量明显降低($P < 0.01$);电镜下见海马区神经元凋亡减少、胶质细胞肿胀减轻、血管周围水肿减轻。免疫组化染色结果显示,Caspase-3表达明显降低。TUNEL染色结果见海马CA1区细胞凋亡率明显降低($P < 0.01$)。Western blot检测结果显示,Caspase-3在SAH后12、24、48、72 h均可见明显降低($P < 0.01$)。**结论** 溶解高浓度氧的液态氟碳纳米粒能够减轻蛛网膜下腔出血后神经元的凋亡,改善脑水肿、改善脑缺氧,对早期脑损伤起到保护作用。

[关键词] 蛛网膜下腔出血;液态氟碳;早期脑损伤;神经保护;细胞凋亡
[中图法分类号] R651.15;R743.35;R969.4 [文献标志码] A

Perfluorooctyl-bromide nanoparticles protect early brain injury in rats after subarachnoid hemorrhage

Zhang Huan, Zhu Ji (Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the protective effects of perfluorooctyl-bromide (PFOB) nanoparticles on early brain injury (EBI) in rats following subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** Ninety male healthy SD rats were randomly divided into 3 groups, that is, sham-operation group ($n = 30$), SAH model group ($n = 30$) and SAH + PFOB group ($n = 30$). Rat SAH model was produced by injecting blood into the prechiasmatic cistern. PFOB nanoparticles as emulsifier with high concentrations of dissolved oxygen was injected to the rats of the treatment group *via* tail vein in 3 h after model establishment. Brain water content was measured in 24 h after surgery. Morphological changes in the rat hippocampal CA1 region were examined by transmission electron microscopy. The neuronal apoptosis in the region was determined by TUNEL assay, and immunohistochemical staining was performed for the expression of Caspase-3. Protein expression levels of Caspase-3 were detected by Western blot assay in 12, 24, 48 and 72 h postoperatively. **Results** Compared to the SAH group, the SAH + PFOB group had significantly lower brain water content ($P < 0.01$). Transmission electron microscopy revealed the reduction of neuronal apoptosis, alleviation of

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目(财社[2011]170号)
[通信作者] 朱 继,E-mail:a68690569@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150703.1449.012.html(2015-07-03)

glial cell swelling, and mitigation of perivascular edema in the hippocampal region. Immunohistochemical data showed that the expression of apoptosis-related factor Caspase-3 was significantly reduced. TUNEL staining showed that neuronal apoptosis was significantly reduced in the hippocampal CA1 region ($P<0.01$). Western blot assay indicated that the expression of Caspase-3 was significantly reduced at 12, 24, 48 and 72 h after SAH ($P<0.01$). **Conclusion** PFOB nanoparticles with high oxygen content could counteract ischemia and hypoxia, block neuronal apoptotic pathways, reduce neuronal apoptosis, and achieve neuroprotective effects in EBI following SAH.

[**Key words**] subarachnoid hemorrhage; perfluorooctyl-bromide; early brain injury; neuroprotection; apoptosis

Supported by the National Clinical Key-discipline Construction Program (2011-170). Corresponding author: Zhu Ji, E-mail: a68690569@sina.com

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)具有发病急,致残、致死率高,早期救治困难等特点。对于SAH的研究,近年来有学者提出了SAH后早期脑损伤(early brain injury,EBI)[1-2]的概念,认为发生于SAH后72h内,主要包括全脑缺血、血脑屏障的破坏、脑水肿、免疫炎症和细胞凋亡等一系列的病理变化,对SAH患者的早期病死、病残负主要责任[3-4]。

液态氟碳全氟辛基溴(perfluorooctyl-bromide,PFOB)作为新一代的全氟碳化合物(perfluorocarbon,PFC),因其独特的不透射线、声学、磁学特性及安全、稳定等特点,被广泛用于超声、CT及MR造影剂的研究[5-6],同时PFOB具有极强的携氧能力、高度稳定性、良好的扩散性,低表面张力,低黏度,高密度以及高气体溶解度等特点[7-8],已广泛用于生物医学多个领域,但用于蛛网膜下腔出血方面尚未见报告。海马神经元对缺血缺氧具有高度选择敏感性,短暂性脑缺血缺氧发作即可导致该区域神经元细胞发生凋亡、坏死。所以海马成为缺血性脑损伤研究的一个典型脑区。因此,本实验选取海马组织为研究对象,给予SAH模型大鼠结合了高浓度氧的液态氟碳纳米粒干预,观察PFOB是否能对SAH后海马神经元起到保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

PFOB购自Alliance Pharmaceutical公司,于重庆医科大学超声影像学研究所制成粒径(90.2±8.3)nm乳化纳米粒;免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司;TUNEL试剂盒购自Roche公司,DAB显色剂购自DAKO公司。Caspase-3抗体购自Abcam公司,β-actin内参购自上海生工公司。其余试剂由重庆医科大学附属第一医院实验中心提供。

1.2 动物及分组

成年健康雄性SD大鼠90只,由重庆医科大学实验动物中心提供,体质量(300±5)g,分为3组,每组30只,分别为假手术组(SHAM)、蛛血组(SAH)及PFOB干预组(SAH+PFOB)。SAH组采用经视交叉前池注血法制作SAH模型,SHAM组同SAH组,但不注射动脉血液;PFOB干预组于造模成功后3 h通过尾静脉注射溶解高浓度氧的PFOB纳米乳化剂(5 g/kg)。造模后24 h,4%多聚甲醛心脏灌注取脑,完成海马CA1区透射电镜切片观察,免疫组化检测及TUNEL阳性细胞计数。其中SAH组及SAH+PFOB组又分为12、24、48、72 h 4个时相点,于各时相点提取海马组织,-80 ℃保存,提取蛋白行Western blot检测。

1.3 麻醉

使用10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉,术中使用保温台维持体温,观察呼吸及心率变化。

1.4 PFOB乳化纳米粒制作

经过前期工作积累,已经掌握稳定制备PFOB纳米粒方法。PFOB纳米粒外观为均匀乳液状,室温下静置1 h以上不发生分层现象。能够在4 ℃冰箱中保持稳定状态1个月以上,肉眼与显微镜观察,在此期间其外观和形态均无明显改变。PFOB纳米粒细小而密集,形态规则、呈球形分布,纳米粒间无明显聚现象。PFOB纳米粒径(90.2±8.3)nm,粒径分布窄(图1)。

1.5 SAH模型建立

使用经视交叉前池注血法制作SAH模型。大鼠麻醉并固定,额部备皮、消毒额部,正中开颅,牙科钻头颅骨钻孔,采用立体定向仪在前囟前7.5 mm,倾斜矢状面30°进针,10 mm左右达到颅底。股动脉抽取动脉血0.2 mL,自制带侧孔针头缓慢注射,注血时间2 min,注射结束后骨蜡封闭颅骨骨孔。缝合额部、股

部切口。术中维持肛温37 ℃。术后护理:麻醉未清醒前给予电热毯保暖,维持室温30 ℃。术后大鼠单笼饲养,注意保暖。假手术组除不注入动脉血外,余操作与SAH模型大鼠相同。

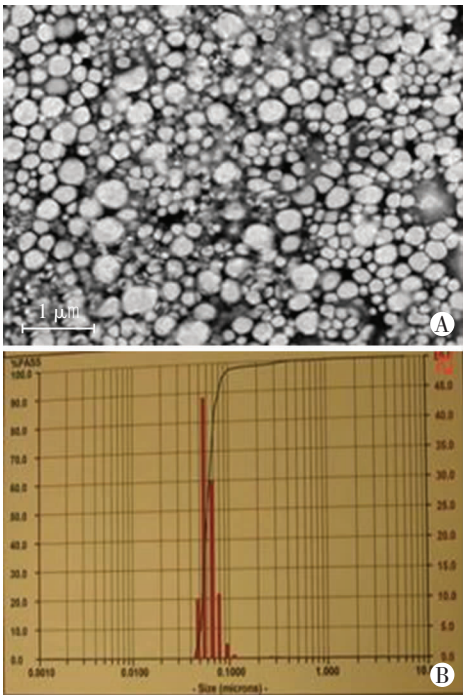


图1 扫描电镜下PFOB纳米粒(A)和PFOB纳米粒粒径分布(B)

1.6 脑水含量测定

每组各选取5只大鼠,于术后24 h断头取出脑组织迅速称质量(采用干湿质量法),置烤箱烤干至恒重,计算脑含水量:脑组织含水量(%)=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.7 透射电镜观察

4%戊二醛心脏灌注取脑,2.5%戊二醛固定、1%锇酸固定、丙酮梯度脱水、包埋、聚合、修复、切片、染色后透射电镜观察。

1.8 免疫组化

取大鼠脑组织石蜡切片,经脱蜡、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、一抗结合、二抗结合、DAB显色、复染、盐酸酒精分化、返蓝、脱水、中性树胶封片后分析。

1.9 原位细胞凋亡检测技术(TUNEL)

取大鼠脑组织石蜡切片,经脱蜡、抗原修复破膜、阻断内源性过氧化物酶活性、DAB显色、复染、盐酸酒精分化、返蓝、脱水、中性树胶封片后照相分析。细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,光镜下凋亡细胞呈棕黄色,于高倍镜(×400)下随机观察10个视野(来自不同切片),计数海马神经元凋亡细胞所占比值的平均数。

1.10 Western blot检测

每组随机取5只大鼠。取脑,置于细胞裂解液中,低温匀浆,静置10 min后加入90 μL 100 g/L NP-40,剧烈震荡30 s,4 ℃ 13 000 r/min离心15 min,取上清,分装-80 ℃保存备用。蛋白定量后加入4倍体积样本缓冲液,95 ℃变性5 min。取30 μg样品在10% SDS聚丙烯酰胺凝胶上电泳后,电转至硝酸纤维素膜,根据分子量大小切取条带,取相应条带分别加入兔抗Caspase-3多抗(1∶250),4 ℃过夜,TBST冲洗后,分别与生物素标记的羊抗兔IgG抗血清(1∶150)室温下震荡孵育1.5 h,TBST洗涤后,与卵白素-辣根过氧化物酶复合物室温下孵育2 h,DAB显色。将特异蛋白条带用扫描仪进行扫描,以β-actin为内参照,应用图像分析系统测定条带灰度值。

1.11 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件处理,采用单因素方差分析和相关分析。检验系数$\alpha=0.01$。

2 结果

2.1 造模及干预后24 h各组大鼠脑含水量测定

SAH较SHAM组脑含水量明显增加[(80.65±0.49) *vs* (76.32±0.52), $P<0.01$],SAH+PFOB组较SAH组比较,脑含水量明显降低[(78.40±0.72) *vs* (80.65±0.49), $P<0.01$]。

2.2 透射电镜观察

造模及PFOB干预后24 h,4%戊二醛灌注取脑,海马CA1区制成电镜超薄切片,透射电镜下观察。SAH组可见神经元皱缩、核浓缩深染、胞质深染;染色质边聚、核肿胀;毛细血管周围水肿明显。胶质细胞肿胀,溶解。SAH+PFOB组未见凋亡神经元及上述形态学改变,仅可见轻微神经元内质网扩张及线粒体轻微肿胀。SHAM组形态正常,未见上述改变(图2)。

2.3 免疫组化检测海马CA1区神经元Caspase-3表达

造模及PFOB干预后24 h,4%多聚甲醛灌注取脑,组织切片,400倍光镜观察。SHAM组未见Caspase-3蛋白表达,SAH组较SHAM组Caspase-3表达增加。SAH+PFOB组Caspase-3蛋白表达较SAH组显著减少(图3)。

2.4 TUNEL染色检测海马CA1区神经元凋亡

400倍光镜下观察海马CA1区神经元,每组5只。

SHAM 组见少量 TUNEL 阳性细胞表达，SAH 组 TUNEL 阳性细胞率明显增加[(43.23 ± 2.67) *vs* (6.33 ± 0.72)，$P < 0.01$]，SAH + PFOB 组 TUNEL 阳性细胞表达较 SAH 组显著减少[(27.48 ± 1.53) *vs* (43.23 ± 2.67)，$P < 0.01$，图 4]。

2.5 Western blot 检测海马组织 Caspase-3 蛋白表达

分别于造模及药物干预成功后按时间点提取各组大鼠海马蛋白，Western blot 检测结果显示，SAH + PFOB 组较 SAH 组 Caspase-3 蛋白表达在 12、24、48、72 h 各时间点均可见明显降低($P < 0.01$，图 5)。

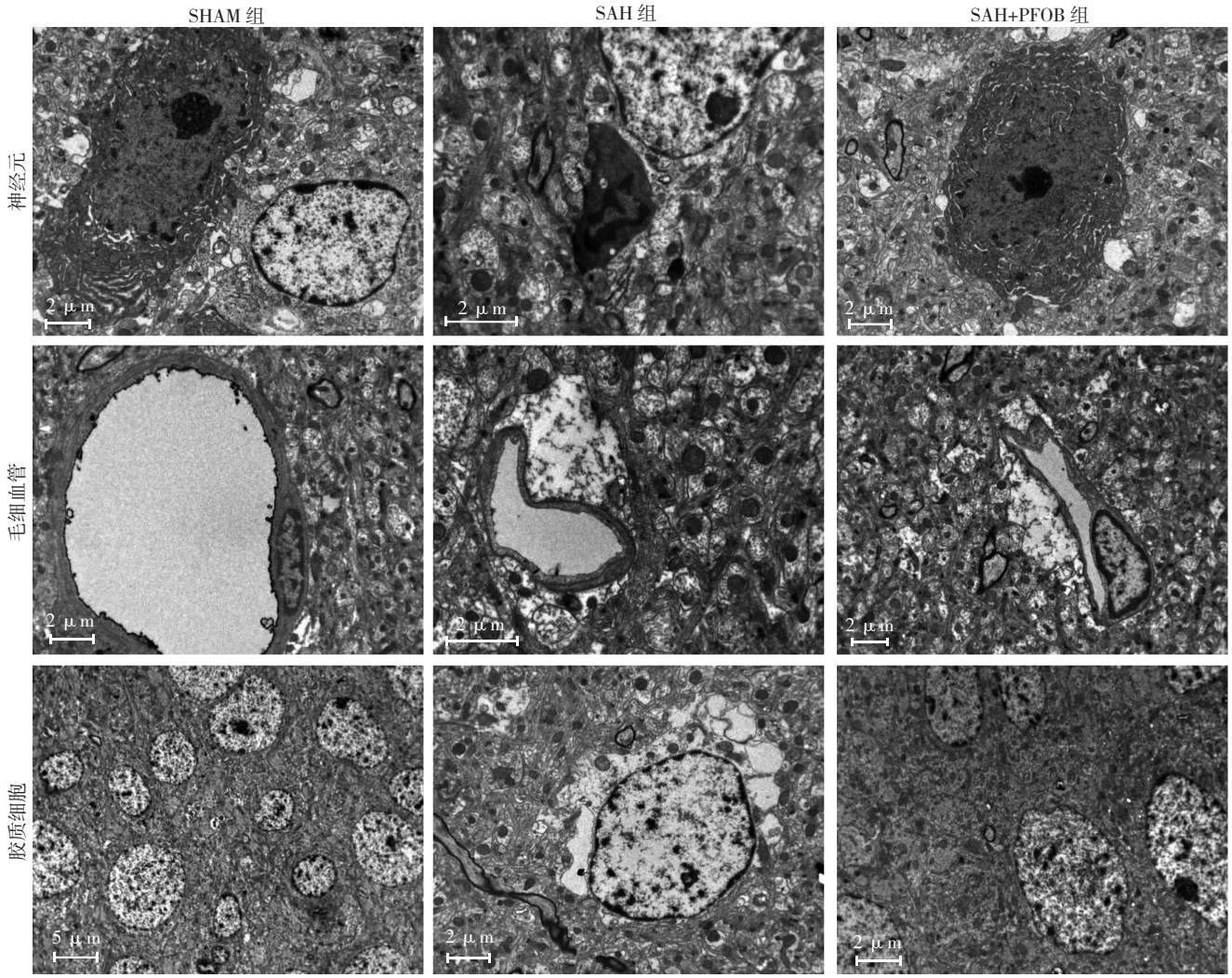


图 2　透射电镜观察各组大鼠海马 CA1 区形态学变化

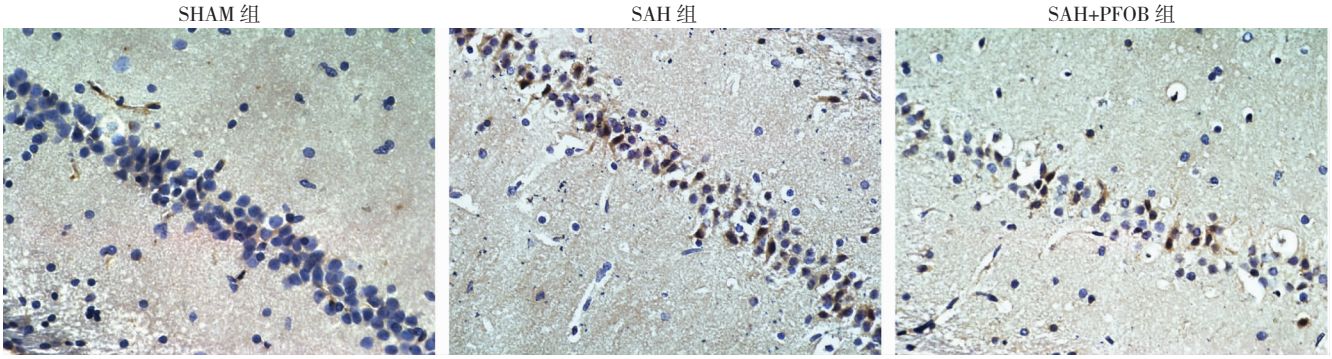
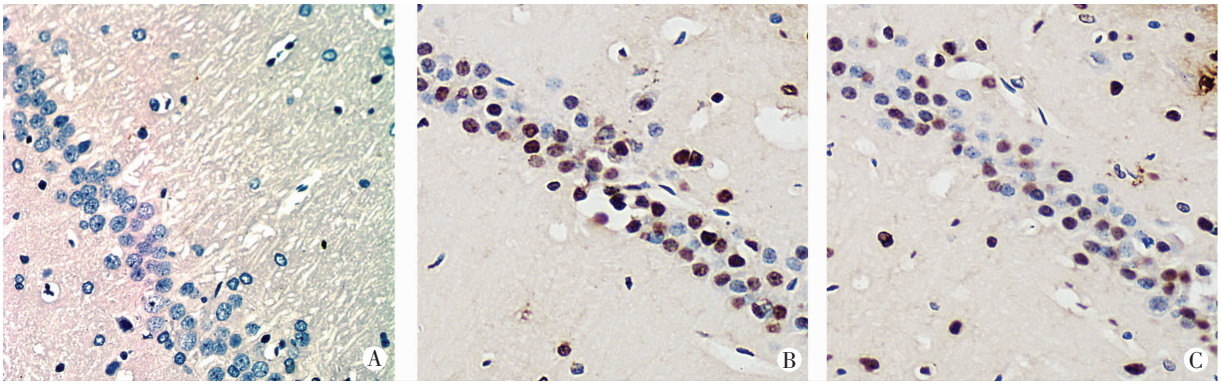
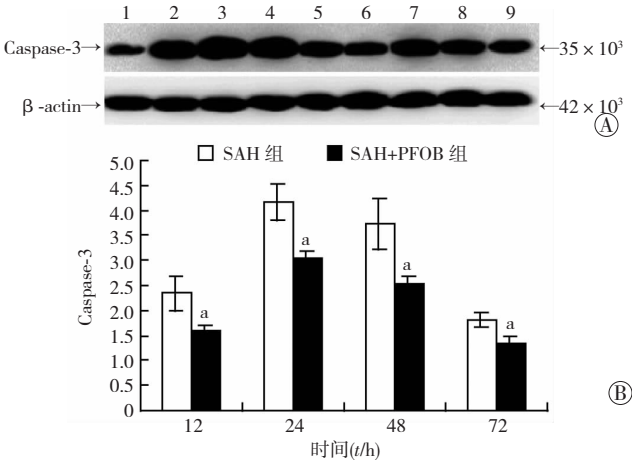


图 3　免疫组化检测各组大鼠海马 CA1 区神经元 Caspase-3 表达　(×400)



A：SHAM 组；B：SAH 组；C：SAH + PFOB 组

图 4　TUNEL 染色检测各组大鼠海马 CA1 区神经元凋亡　（×400）



A：Western blot 检测结果　1：SHAM 组；2～5：SAH 组 12、24、48、72 h；6～9：SAH + PFOB 组 12、24、48、72 h；B：半定量分析结果　a：$P<0.01$，与 SAH 组各对应时间点比较

图 5　Western blot 检测各组大鼠海马 Caspase-3 蛋白的表达

3　讨论

SAH 后 72 h 内早期脑损伤所引起全脑缺血、脑水肿、氧化应激反应和免疫炎性反应等会导致广泛性的细胞凋亡。而减轻细胞凋亡可在很大程度上减轻早期脑损伤[9]。Caspase-3 是细胞凋亡过程中主要的效应因子之一，是由多种凋亡刺激信号传递过程的会聚点，已经作为研究凋亡的常用指标之一[10]。PFOB 属于第 3 代的 PFC，相比于 1、2 代 PFOB 具有更高的稳定性及携氧能力，粒径更小，分布均匀且不易变性。数据显示常温一个大气压下，每 100 毫升 PFOB 最多溶解氧气约 66 mL[11]，溶解二氧化碳约 166 mL；同样条件下，每 100 mL 血液只能溶解氧气约 0.3 mL，血红蛋白结合的氧气约 18.7 mL，远远超过血液携带的氧气。PFOB 中的氧分子不必跨越红细胞膜，这就提高了细胞的浓度梯度，并使氧分子在靶灶处扩散更为容易。前期工作中通过改进微液化技术，成功制备了平均直径 90 nm 左右的纳米级液态氟碳乳化剂。此纳米级的 PFOB 乳化剂微粒排列更接近毛细血管壁，更易通过血管壁及脑组织，也大大缩短了氧分子转运的路程。因此，PFOB 纳米粒具有生物体内安全、稳定，极高携氧能力、良好穿透能力以及多模态显像能力，静脉注射快速作用于病灶等优良特性。

本研究表明，PFOB 对蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的保护作用明显，主要表现在：SAH + PFOB 组较之 SAH 组，脑含水量明显降低，海马 CA1 区透射电镜观察结果示蛛血后的神经元凋亡、胶质细胞肿胀、毛细血管周围水肿等现象有所减轻。提示 PFOB 能改善大脑缺血缺氧状况，在细胞及亚细胞层面对神经元起到保护作用。Western blot 检测结果显示：促凋亡因子 Caspase-3 在 SAH 早期各时间亚组均可见明显降低，同时通过凋亡最明显的 SAH 后 24 h 时相点的 TUNEL 法测凋亡细胞阳性率及免疫组化也可得到相同的结果，说明 PFOB 在分子层面实现了对神经元的保护作用。这初步说明了在大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中，溶解高浓度氧的液态氟碳纳米粒，可以减轻神经元凋亡，保护神经元，在多个层面实现对蛛网膜下腔出血后早起脑损伤的保护。PFOB 其发挥作用的具体机制尚不清楚，考虑可能从以下几个方面产生保护作用：氟碳对氧摄取-释放速率极快，颗粒小，氧分子浓度梯度大，能迅速给脑组织提供充足的氧；能迅速带走微循环中高浓度 CO_2，减轻酸中毒，缓解血管痉挛氟碳粘度低，能稀释红细胞及纤维蛋白原，降低血液粘度，改善脑血流；氟碳本身不含有血液有形成分，能减少氧自由基的产生及释放。

自 Clark 等[12]开创了 PFC 作为呼吸气体载体的生物医学研究以来，PFC 已经用于血液替代品[13]，液体通气治疗呼吸系统疾病[14]，心血管系统方面的心肌梗死、冠脉成形术，CO 中毒急救，靶向药物载体[15]，新型造影剂[16]等多个领域。在神经外科领域，PFC 具有

增加脑血流,清除自由基[17]、预防出血性梗死、减少出血性脑梗死面积[18],动物脑卒中后的保护作用[19]、颅脑外伤后的意识恢复[20]、脊髓外伤后神经元的保护作用[21]等多个方面作用。但在蛛网膜下腔出血方面的作用还未见相关报道。目前对蛛网膜下腔出血的干预性研究中,主要通过脑室注药、腹腔注射、胃内灌注药物等方式实行干预,因受药物动力学及血脑屏障等的影响,其干预效果不稳定。本实验将氟碳化合物用于蛛网膜下腔出血的研究,通过尾静脉注射 PFOB 纳米乳化剂,利用其极高的携氧能力、良好的穿透能力、良好的扩散性,低表面张力、低黏度,高密度以及高气体溶解度等独特的物理特性,经血液循环到达目的区域。同时下一步实验中可能利用其多模显像能力在治疗 SAH 的同时对病情实时监控,应用前景较大。本项目所获实验数据,可推动 PFOB 纳米粒尽快应用于临床,为进一步治疗蛛网膜下腔出血提供新的思路。

参考文献:

[1] Broderick J P, Brott T G, Duldner J E, *et al*. Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 1994, 25(7): 1342 – 1347.

[2] Cahill J, Zhang J H. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? [J]. Stroke, 2009, 40(3 Suppl): S86 – S87.

[3] Chen J, Chen G, Li J, *et al*. Melatonin attenuates inflammatory response-induced brain edema in early brain injury following a subarachnoid hemorrhage: a possible role for the regulation of pro-inflammatory cytokines[J]. J Pineal Res, 2014, 57(3): 340 – 347.

[4] Sehba F A, Hou J, Pluta R M, *et al*. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Prog Neurobiol, 2012, 97(1): 14 – 37.

[5] 李奥, 王志刚. 液态氟碳纳米粒——一种多功能影像学造影剂[J]. 临床超声医学杂志, 2008, 10(12): 830 – 832.

[6] 沈红霞, 郑元义, 王志刚. 包裹液态氟碳的高分子超声造影剂的研究进展[J]. 中国介入影像与治疗学, 2010, 7(6): 684 – 687.

[7] Lacatusu D, Baican M, Crivoi F. Effects of perfluorocarbon emulsion in rheology[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2014, 118(1): 232 – 238.

[8] Vasquez D M, Ortiz D, Alvarez O A, *et al*. Hemorheological implications of perfluorocarbon based oxygen carrier interaction with colloid plasma expanders and blood [J]. Biotechnol Prog, 2013, 29(3): 796 – 807.

[9] Yuksel S, Tosun Y B, Cahill J, *et al*. Early brain injury following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: emphasis on cellular apoptosis[J]. Turk Neurosurg, 2012, 22(5): 529 – 533.

[10] Edebali N, Tekin I O, Acikgoz B, *et al*. Apoptosis and necrosis in the circumventricular organs after experimental subarachnoid hemorrhage as detected with annexin V and caspase 3 immunostaining[J]. Neurol Res, 2014, 36(12): 1114 – 1120.

[11] Riess J G. Perfluorocarbon-based oxygen delivery[J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2006, 34(6): 567 – 580.

[12] Clark L C Jr, Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure[J]. Science, 1966, 152(3730): 1755 – 1756.

[13] Remy B, Deby-Dupont G, Lamy M. Red blood cell substitutes: fluorocarbon emulsions and haemoglobin solutions[J]. Br Med Bull, 1999, 55(1): 277 – 298.

[14] Spitzer A R, Lipsky C L. Partial 1iquid ventilation with perflubron in premature infants with severe respiratory distress syndrome[J]. Clin Pediatr (Phila), 1997, 36(3): 181 – 182.

[15] Lin C Y, Javadi M, Belnap D M, *et al*. Ultrasound sensitive eLiposomes containing doxorubicin for drug targeting therapy [J]. Nanomedicine, 2014, 10(1): 67 – 76.

[16] Yu Y B. Fluorinated dendrimers as imaging agents for ^{19}F MRI[J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2013, 5(6): 646 – 661.

[17] Rosenblum W I. Fluorocarbon emulsions and cerebral microcirculation[J]. Fed Proc, 1975, 34(6): 1493 – 1498.

[18] Yokota C, Kaji T, Kuge Y, *et al*. Temporal and topographic profiles of cyclooxygenase-2 expression during 24 h of focal brain ishemia in rats[J]. Neurosci Lett, 2004, 357(3): 219 – 222.

[19] Woods S D, Skinner R D, Ricca A M, *et al*. Progress in dodecafluoropentane emulsion as a neuroprotective agent in a rabbit stroke model[J]. Mol Neurobiol, 2013, 48(2): 363 – 367.

[20] Zhou Z, Sun D, Levasseur J E, *et al*. Perfluorocarbon emulsions improve cognitive recovery after lateral fluid percussion brain injury in rats[J]. Neurosurgery, 2008, 63(4): 799 – 806.

[21] Yacoub A, Hajec M C, Stanger R, *et al*. Neuroprotective effects of perflurocarbon (oxycyte) after contusive spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2014, 31(3): 256 – 267.

(**收稿**:2015-01-03;**修回**:2015-03-18)

(编辑 王小寒)