基础研究　文章编号：0253-3626(2010)05-0674-04

经鼻给予粒细胞集落刺激因子对蛛网膜下腔出血后抗自由基脑保护作用的实验研究

陈芬英[1]，孙保亮[2]，张　璇[3]，胡长林[1]

（1. 重庆医科大学附属第二医院神经内科，重庆　400010；2. 泰山医学院附属医院神经内科，泰安　271000；3. 济宁医学院附属济宁市第一人民医院神经内科，济宁　272000）

【摘　要】目的：建立蛛网膜下腔出血（Subarachnoid hemorrhage，SAH）模型，研究重组人粒细胞集落刺激因子（Recombinant human granulocyte colony stimulating factor，rhGCSF）经鼻腔给药对 SAH 后的抗自由基脑保护作用。方法：采用枕大池二次注血法复制大鼠 SAH 模型，将动物随机分为正常对照组，SAH 组，SAH 术后经鼻给 NS 组，SAH 术后经鼻给 rhGCSF 组。二次注血后 24 h 观察皮层和海马 CA1 区形态学变化，测定脑组织匀浆 SOD 活力和 MDA 含量。结果：①与正常对照组相比，SAH 组和 SAH+NS 组皮层和海马 CA1 区神经元数目显著减少、排列紊乱且形态异常。rhGCSF 治疗组皮层及海马损伤明显减轻。②与正常对照组相比，各组 SOD 活力显著降低、MDA 含量显著升高。SAH 组和 SAH+NS 组相比，差异无统计学意义；而与 SAH 组和 SAH+NS 组相比，术后经鼻给 rhGCSF 组 MDA 含量降低（$P<0.05$），SOD 活力显著升高（$P<0.01$）。结论：经鼻靶向中枢给予 rhGCSF 通过增强脑组织 SOD 活力，降低 MDA 含量，减轻氧自由基介导的脑损伤，对 SAH 早期脑损伤有明显保护作用。

【关键词】蛛网膜下腔出血；鼻腔给药；自由基；粒细胞集落刺激因子

【中国图书分类法分类号】R743.35　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2009-12-09

Experimental research on anti-free radicals protection of intranasal administration of granulocyte colony stimulating factor following experimental subarachnoid hemorrhage

CHEN Fen-ying, et al

（*Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*: To explore whether intranasal administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor can relieve free radicals injury following experimental subarachnoid hemorrhage. *Methods*: Rat SAH models was induced by double injection of autologous blood into the cisterna magna. The rats were randomizedly divided into normal control group, SAH group, SAH+NS group, and SAH+rhGCSF group. Coronal sections were made to observe the neuropathology of the cortex and the CA1 region of the hippocampus. Superoxide dismutase (SOD) activity and content of malondialkhyde (MDA) in the brain tissue homogenate were detected 24 hours after secondary cisternal injection. *Results*: ①Compared with normal control group, the number of neuronal cells in cortex and hippocampal CA1 region were significantly reduced, the structural arrangement was disordered and morphology was abnormal in SAH group and SAH + NS group, rhGCSF treatment could relieve this injury. ②SOD activity was significantly decreased and the content of MDA was significantly increased on 24 hours after SAH induction. There is no statistically significant difference between SAH group and SAH+NS group. The content of MDA was decreased ($P<0.05$) and SOD activity was increased ($P<0.01$) in SAH+rhGCSF group compared with SAH group and SAH+NS group. *Conclusion*: Intranasal administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor can relieve bain injury mediated by oxygenic free radicals and attenuate early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage.

【Key words】Subarachnoid hemorrhage; Intranasal administration; Free radicals; Granulocyte colony stimulating factor

蛛网膜下腔出血（Subarachnoid hemorrhage，SAH）发病率相对较低，但致死率高，幸存者大多存在不同程度神经功能障碍和认知障碍。大约 30%～40%SAH 病人在发病后 24 h 内死亡，尸检证实这些病人有广泛性脑损伤、脑缺血。自由基损伤参与 SAH 后血管痉挛、细胞凋亡、血脑屏障破坏、脑水

作者介绍：陈芬英（1984- ），女，硕士，
研究方向：脑血管病的基础与临床。
通讯作者：胡长林，男，教授，E-mail：hhccll2000@yahoo.com.cn。

肿等过程，过量自由基的产生在 SAH 早期脑损伤中起重要作用[1]。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase，SOD)是体内重要的自由基清除剂，其活性高低可反映机体清除自由基的能力。丙二醛(Malondialdehyde，MDA)是自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应形成脂质过氧化物的代谢产物，其含量的高低反映体内脂质过氧化程度。

粒细胞集落刺激因子(Granulocyte colony stimulating factor，GCSF)是调节骨髓粒系的主要细胞因子之一。近年来，GCSF 在中枢神经系统中的作用越来越受到重视[2,3]。本研究旨在观察 GCSF 经鼻给药对大鼠 SAH 后的抗自由基脑保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物来源及分组

SPF 级 wistar 大鼠，雌雄各半。月龄 8～12 周，体重250～350 g，由山东鲁抗实验动物中心提供(动物许可证号 SCXK 鲁 2008002)。

实验动物分组：将实验动物随机分 4 组，①正常对照组，不给予任何处理因素；②SAH 组；③SAH 后经鼻给生理盐水(Normal saline，NS)组即 SAH+NS 组；④SAH 后经鼻给重组人粒细胞集落刺激因子(Recombinant human granulocyte colony stimulating factor，rhGCSF)组即 SAH+rhGCSF 组。每组各 12 只，根据取材方式不同，每组又分为 2 个亚组，每个亚组各 6 只。

1.2 SAH 模型制作

采用枕大池 2 次注血法建立大鼠 SAH 模型。采用 10%水合氯醛 350 mg/kg 腹腔注射麻醉后，固定于脑立体定位仪上，保持 30° 头低位。备皮消毒后，于颅顶枕部中线行正中切口 2 cm，钝性分离肌肉、筋膜，充分暴露环枕膜。翻转并固定双下肢，左侧腹股沟处备皮、消毒，切开皮肤，钝性分离肌肉、筋膜，充分游离股动脉，用 1 ml 注射器抽取自体动脉血 0.4 ml(抽血前用 1%肝素盐水润管，否则，血液极易凝固)，立即卸下针头，换上 PE10 管制作的特殊针头，在环枕膜中心位置，与环枕膜垂直，刺入约 1.5 mm 进入小脑延髓池，回抽见清亮脑脊液流出，于 3 min 内缓慢注入新鲜自体股动脉血 0.1 ml/100g，注血完毕，用明胶海绵堵塞穿刺点，防止血液外渗，保证注血量。术后保持大鼠头低位 30° 持续 30 min，使血液到达脑底部。手术完毕后，单独清洁饲养，自由进食、进水。推注过程中见动物烦躁不安，呼吸加深加快，部分大鼠出现呼吸抑制，迅速回抽血液后恢复自主呼吸。24 h 后重复上述操作。

1.3 鼻腔给药方法

重组人粒细胞集落刺激因子为无色澄明液体，购自哈药集团生物工程有限公司，商品名：里亚金。规格为 150 μg/0.75 ml。

鼻腔给药方法：给药剂量按 50 μg/kg 计算。大鼠 2 次注血完 30 min 后，于麻醉状态下取仰卧位，将头颈部用 4 cm × 4 cm 的纱布卷垫高，以利于药物进入后鼻腔。经鼻腔插入 1 根 3.5 cm 长的 PE50 硅胶管并与微量注射器相连，采用两鼻孔交替给药，给药时间控制在 20 min 内。SAH+NS 组按 250 μl/kg 给予 NS。给药后将大鼠保持原位 30 min 以保证药液在鼻腔的滞留时间。

1.4 皮层及海马 CA1 区病理学观察

各组动物在实验终点，10%水合氯醛过量麻醉后，经左心室快速灌注 4℃的肝素生理盐水(20 万单位/升)200～300 ml，直至右心房流出的液体变清亮，继以 4℃4%多聚甲醛(0.01 mil/L PBS 配制，pH 7.2～7.4)灌流固定直至头颈部及上肢变僵硬，断头后在冰盘上取脑，去除脑干，在 4%多聚甲醛固定 6～8 h，于视交叉后 2 mm 切取冠状脑片厚约 3 mm。标本常规脱水、透明、浸蜡、包埋，行石蜡切片，厚度 5 μm。1%甲苯胺蓝行尼氏染色，观察皮层及海马 CA1 区神经元病理学变化。

1.5 脑含水量的测定

各组动物于实验终点断头取脑，取新鲜脑组织，去掉小脑和脑干，取一侧大脑半球用电子分析天平称重，得到其湿重后，置于 115℃干燥烤箱中 48 h 后立即称干重(避免在空气中受潮)。脑含水量%=(湿重－干重)/湿重 × 100%。

1.6 MDA 含量与 SOD 活力检测

各组大鼠于实验终点即二次注血后 24 h 取新鲜脑组织，制备 10%和 1%脑组织匀浆。采用 BCA100 蛋白含量测定法测定 1%脑组织匀浆中蛋白含量。(1)MDA 含量测定：应用硫代巴比妥酸法，按照试剂盒说明书配制检测试剂，于 532nm 波长处测定吸光光度值。(2)SOD 活性检测：应用黄嘌呤氧化酶法，按照试剂盒说明书配制检测试剂，于 550nm 波长处测定吸光光度值。

1.7 统计学分析

实验数据均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，应用SPSS13.0 进行统计学分析，脑组织含水量指标采用多个独立样本比较的秩和检验(Kruskal-Wallis 秩和检验)，$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义；组间多重比较采用两独立样本比较的秩和检验，对检验水准进行校正 $\alpha' = 2\alpha / n \times (n-1) = 0.0083$，$P < 0.0083$ 为差异有统计学意义。SOD、MDA 指标采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)，组间多重比较采用 LSD(Least significant difference)检验，$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物的行为学观察及 SAH 模型的证实

在蛛网膜下腔注入动脉血过程中和注入后，大鼠出现烦躁、呼吸心率加快，部分动物出现呼吸暂停。SAH 模型诱导后，大鼠即出现精神萎靡、嗜睡、头低垂、毛杂乱，进食饮水显著减少，体重下降，部分大鼠出现抽搐、惊厥现象。均未出现肢体瘫痪等局灶性神经功能缺失的表现，以注血后 24 h 内最为明显。经鼻给 NS 组状况与 SAH 模型组相似，经鼻给 rhGCSF 组大鼠精神状态较模型组明显好转，上述症状持续时间短，程度较轻，均未出现抽搐、痉挛。

2 次注血后 90 min，将动物处死后行颅脑解剖学观察，在

SAH 模型的蛛网膜下腔，发现弥漫性分布的动脉血凝块，主要分布在前后颅窝和蝶鞍处，包括脑底部的主要血管如 willis 环、大脑前动脉、大脑中动脉和基底动脉(图 1-A)。而正常对照组大鼠颅脑解剖学观察，脑底部未见血凝块沉积(图 1-B)。

2.2 皮层和海马 CA1 区病理学变化

尼氏染色结果显示，正常对照组大鼠皮层及海马 CA1 区神经元排列整齐，核仁清楚、居中，细胞浆中尼氏小体丰富，清晰可见(图 2-A)。SAH 组和 SAH+NS 组皮层及海马 CA1 区神经元数目显著减少、排列紊乱，细胞间隙增大，许多细胞胞浆中尼氏体减少或消失、可见细胞空泡变性、核固缩深染(图 2-B、2-C)。rhGCSF 治疗组皮层及海马神经元排列较整齐，胞浆中可见较多的尼氏小体，可见少量核固缩细胞(图 2-D)。

2.3 脑组织含水量的变化

与正常对照组比较，SAH 组和 SAH+NS 组脑组织含水量显著升高 $P<0.0083$，而 SAH+rhGCSF 组与正常对照组比较，脑组织含水量升高不明显，$P>0.0083$，差异无统计学意义(表 1)。

表 1 各组大鼠脑组织含水量比较($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

组别	含水量%
正常对照组	79.21 ± 0.20
SAH 组	80.12 ± 0.15*
SAH+NS 组	80.08 ± 0.33*
SAH+rhGCSF 组	79.77 ± 0.56

注：* 与正常对照组比较，$P<0.008\ 3$

2.4 各组大鼠脑组织匀浆 MDA 含量和 SOD 活力变化

2.4.1 各组大鼠脑组织匀浆 MDA 含量 测定结果见表 2。与正常对照组比较，各组 MDA 含量显著升高，$P<0.01$；而 SAH+rhGCSF 组 MDA 含量低于 SAH 组和 SAH+NS 组，$P<0.05$；SAH 组与 SAH+NS 组比较差异无统计学意义，$P>0.05$。

2.4.2 各组大鼠脑组织匀浆 SOD 活力 测定结果见表 2。与正常对照组比较，各组 SOD 活力显著降低，$P<0.01$；而 SAH+rhGCSF 组 SOD 活力显著高于 SAH 组和 SAH+NS 组，$P<0.01$；SAH 组与 SAH+NS 组比较差异无统计学意义，$P>0.05$。

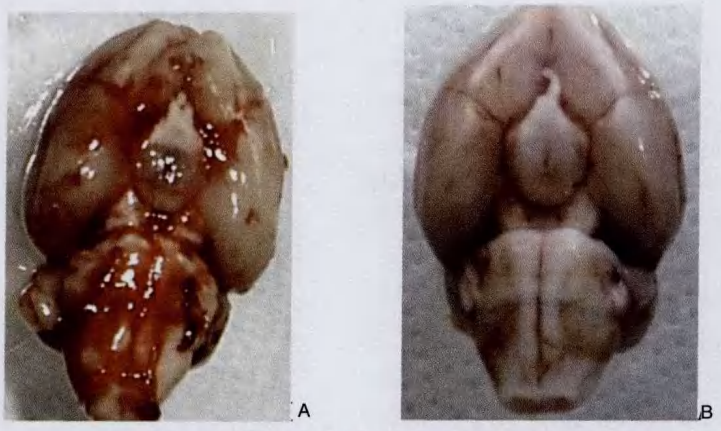
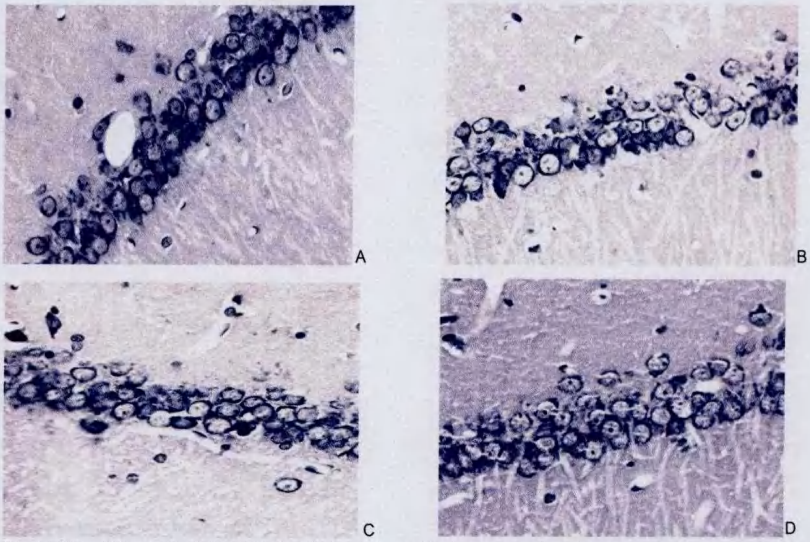


图 1 正常对照组与 SAH 模型组脑底大体观察比较



A. 正常对照组，神经元细胞排列整齐，核仁居中，胞浆中尼氏小体丰富；B. SAH 组，神经元数目减少，排列紊乱，细胞间隙增大，胞浆中尼氏小体明显减少，核固缩、深染；C. SAH+NS 组，与 SAH 组相似；D. SAH+rhGCSF 组，神经元排列较整齐，胞浆中可见较多的尼氏小体，可见少量核固缩细胞

图 2 各组大鼠海马 CA1 区病理学变化(尼氏染色 × 400)

表 2 各组大鼠脑组织 MDA 含量和 SOD 活力比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	MDA(nmol/mgprot)	SOD(U/mgprot)
正常对照组	2.36 ± 0.21	174.16 ± 12.61
SAH 组	3.89 ± 0.58*#	120.86 ± 8.82*△
SAH+NS 组	3.90 ± 0.43*#	118.93 ± 11.21*△
SAH+rhGCSF 组	3.29 ± 0.46*	140.30 ± 12.62*

注:* 与正常对照组比较,$P<0.01$;# 与 SAH+rhGCSF 组比较,$P<0.05$;△与 SAH+rhGCSF 组比较,$P<0.01$

3 讨 论

GCSF 是分子量为 19.6 kD 的糖蛋白,分子量较大,不易通过血脑屏障到达中枢神经系统。本研究采用一种全新的给药方式—经鼻腔脑靶向给药。鼻腔给药具有生物利用度高,吸收迅速,起效快,无创伤性,使用方便,不良反应少等特点。经鼻腔给药可以通过嗅神经通路和三叉神经通路到达中枢神经系统[4]。药物鼻腔给药不是经轴突运输到达中枢神经系统的,其可能机制包括在神经细胞外间隙,血管周隙即 Virchow-Robin 间隙的扩散以及经淋巴系统的直接运输。众多研究表明,经鼻腔给药可以有效的避开血脑屏障,直接到达中枢神经系统[5,6]。

以往的研究表明,GCSF 在脑卒中急性期,可以减轻氧自由基的损伤,减轻炎性反应和细胞凋亡,减轻脑水肿和神经元、神经胶质细胞的死亡。本研究表明 GCSF 对 SAH 后氧自由基的损伤有明显的改善作用,其作用机制可能与其在脑卒中急性期的神经保护作用机制相似。氧化应激反应在 SAH 后早期脑损伤和血管痉挛的形成中起重要作用,是影响 SAH 后血管痉挛的一个重要因素。SAH 后,脑脊液内超氧负离子水平增高被认为与血管痉挛相关,自由基清除剂以及抑制自由基产生的酶可以减轻 SAH 后的血管痉挛[7]。SAH 后氧自由基过度产生的原因[1]包括:线粒体呼吸链的断裂、细胞外氧合血红蛋白的聚集、产生氧自由基的酶的上调以及内源性抗氧化系统的失调如超氧化物歧化酶 SOD,谷胱甘肽过氧化物酶即(Glutathion peroxidase,GSH-Px)活性降低。SOD 是体内重要的自由基清除剂,其活性高低可反映机体清除自由基的能力。MDA 是氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应形成脂质过氧化物的代谢产物,可交联蛋白质和磷脂上的氨基,生成 Schiff 碱,降低膜流动性,导致细胞变形,功能受损。因此,组织中 MDA 含量的高低反映体内脂质过氧化程度,间接反映了机体细胞受氧自由基攻击的严重程度。

本实验采用小脑延髓池二次注血法建立 SAH 模型,二次注血后 24 h,脑组织含水量显著升高,皮层和海马神经元损伤严重、尼氏体消失。SAH 后经鼻给 NS 不能减轻损伤,而经鼻给 rhGCSF 可显著缓解神经元的损伤,减轻脑水肿。二次注血后 24 h,各模型组大鼠 SOD 活力显著低于正常对照组,MDA 含量显著高于正常对照组,说明 SAH 可导致 SOD 活力降低、MDA 含量升高,SAH 可产生严重的自由基损伤,这与以往的研究结果一致。同时,研究发现经鼻腔给予 rhGCSF 可使 SAH 组大鼠脑组织 SOD 活力显著升高,MDA 含量减低;而经鼻腔给予生理盐水则对 SAH 后 MDA 含量和 SOD 活力无影响。提示,经鼻腔给予 rhGCSF 可显著抑制 SAH 后自由基损伤,对 SAH 早期脑损伤有明显保护作用。其可能机制包括:GCSF 与其受体结合,激活 JAK-STAT 信号转导通路[8],调节自由基的代谢;抑制细胞色素 C 从线粒体呼吸链的释放,抑制自由基的产生,从而减轻脑组织的过氧化损伤。

参 考 文 献

[1] Ayer R E, Zhang J H. Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm[J]. Acta Neurochir Suppl, 2008, 104: 33-41.

[2] Solaroglu I, Cahill J, Jadhav V, et al. A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor[J]. Stroke, 2006, 37(4): 1123-1128.

[3] Lu C Z, Xiao B G. G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischemia[J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(6): 1327-1333.

[4] Thorne R G, Pronk G J, Padmanabhan V, et al. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration[J]. Neuroscience, 2004, 127: 481-496.

[5] Brasnjevic I, Steinbusch H W, Schmitz C, et al. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier[J]. Prog Neurobiol, 2009, 87(4): 212-251.

[6] Ross T M, Martinez P M, Frey W H, et al. Intranasal administration of interferon beta bypasses the blood-brain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: a non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis[J]. J Neuroimmunol, 2004, 151(1-2): 66-77.

[7] Pyne-Geithman G J, Caudell D N, Prakash P, et al. Glutathione peroxidase and subarachnoid hemorrhage: implications for the role of oxidative stress in cerebral vasospasm[J]. Neurological Research, 2009, 31(2): 195-199.

[8] Schneider A, Krüger C, Steigleder T, et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(8): 2083-2098.

(责任编辑:冉明会)