

注射用脑蛋白水解物 (I) 对血管性痴呆大鼠的保护作用

景小龙¹, 侯衍豹¹, 任雷鸣², 马莉¹, 黄妍¹, 刘静^{1*}, 申秀萍^{1*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 河北医科大学中西医结合研究所, 河北 石家庄 050017

摘要: **目的** 研究注射用脑蛋白水解物 (I) 对血管性痴呆大鼠的保护作用。**方法** 采用改良两血管阻断法制备血管性痴呆 (VaD) 大鼠模型, 假手术组分离颈总动脉后缝合切口。模型大鼠随机分为模型组, 脑蛋白水解物注射液 (Cerebrolysin, 阳性药, 10 mg/kg) 组, 注射用脑蛋白水解物 (I) 高、中、低剂量 (20、10、5 mg/kg) 组, 尾 iv 给药, 每天 1 次, 连续给药 2 周; 假手术组给予等体积生理盐水。采用 Y 迷宫和避暗实验法评价大鼠学习记忆能力; ELISA 法检测 VaD 大鼠血清中胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 水平。**结果** 与模型组比较, 注射用脑蛋白水解物 (I) 显著增加 VaD 大鼠在 Y 迷宫实验的正确次数, 显著降低在避暗实验的潜伏期时间, 并显著提高 VaD 大鼠血清 IGF-1 水平; 上述作用与同剂量 Cerebrolysin 比较无显著差异。**结论** 注射用脑蛋白水解物 (I) 能提高 VaD 大鼠学习记忆能力, 其机制可能与提高机体 IGF-1 水平, 促进脑损伤后的神经元修复和生长有关。

关键词: 注射用脑蛋白水解物 (I); 血管性痴呆; 胰岛素样生长因子 1 (IGF-1); 学习记忆

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)07-0922-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.07.007

Protective effects of Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) on vascular dementia in rats

JING Xiao-long, HOU Yan-bao, REN Lei-ming, MA Li, HUANG Yan, LIU Jing, SHEN Xiu-ping

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Drug Safety Assessment Co., Ltd., Tianjin 300301, China

2. Institute of Chinese Integrative Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) on vascular dementia (VaD) in rats. **Method** The permanent bilateral common carotid artery ligation method was used to prepare a VaD rat model. Suture of rats was performed after separation of the common carotid artery in Sham group. The model rats were randomly divided into model group, Cerebroprotein Hydrolysate Injection (Cerebrolysin, 10 mg/kg, positive drug group), Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) high, medium and low dose (20, 10 and 5 mg/kg) groups. Rats were treated with relative drug by tail iv injection once daily for two weeks, and rats in Sham group were given equal volume of saline. The learning and memory abilities were evaluated by Y maze and step-through tests. Besides, the levels of insulin-like growth factor-I (IGF-1) in VaD rat serum were determined by ELISA method. **Results** Compared with model group, Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) significantly increased the correct number in Y maze test, reduced the step-through latency time, and elevated serum IGF-1 level in VaD rats. The protective effects of Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) in VaD rats were equivalent to the same dose of Cerebrolysin. **Conclusion** Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) could significantly improve the learning and memory abilities of VaD rats, presumably through a mechanism of elevating IGF-1 level, which promotes the repairment and growth of neurons.

Key words: Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I); vascular dementia; IGF-1; learning and memory

血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 是发生在脑血管病基础上的以高级神经认知功能障碍为主, 伴有语言、视觉空间技能及情感或人格障碍的获得性智能持续性损害^[1]。VaD 的发病率越来越高,

收稿日期: 2017-06-05

作者简介: 景小龙 (1987-), 男, 助理研究员。Tel: (022)84845247 E-mail: jingxl@tjipr.com

*通信作者 申秀萍 E-mail: shenxp@tjipr.com

刘静 E-mail: liuj@tjipr.com

是居于第2位的最常见痴呆^[2]。近年来,随着人口老龄化和脑血管病发病率的升高,我国VaD患者逐年增加,给家庭和社会造成严重的负担^[3]。脑蛋白水解物注射制剂是一类含有多种神经生长因子和其他肽类物质的混合多肽制剂,其中国外产品脑活素(脑蛋白水解物, Cerebrolysin)对阿尔茨海默病和VaD的临床治疗作用获得肯定疗效^[4-5]。我国CFDA根据产品工艺和质量标准,将该类产品分为注射用脑蛋白水解物(I)、注射用脑蛋白水解物(II)和注射用脑蛋白水解物(III)。其中注射用脑蛋白水解物(I)采用全提取工艺,质量标准与Cerebrolysin一致。痴呆症的新药研发在全球陷入困境,脑蛋白水解物注射制剂的研究重新被寄予期望^[4-5]。近年来研究发现,脑蛋白水解物可通过多种方式作用于中枢神经,为神经元的修复提供必需原料并改善其代谢,促进神经元的分化,有助于神经的修复及再生。目前注射用脑蛋白水解物对VaD的治疗作用未见报道,本实验进行初步考察,为注射用脑蛋白水解物(I)的临床应用提供理论基础。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

注射用脑蛋白水解物(I),购于河北智同生物制药股份有限公司,规格30 mg/支,批号0161001; Cerebrolysin,购于奥地利EVER Neuro Pharma GmbH,规格60 mg/10 mL/支,批号PB0947。

生理盐水(石家庄四药有限公司,批号1601183102);戊巴比妥钠(德国默克,批号160606);注射用青霉素钠(山东圣旺药业股份有限公司,批号20161001);注射用硝普钠(武汉人福药业有限责任公司,批号21016010-1);IGF-1 ELSIA试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);无水乙醇(天津市化学试剂供销公司,批号161110)。

1.2 实验动物

SPF级Wistar大鼠,雄性,体质量180~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号SCXK(京)2016-0011。

1.3 主要仪器

ZH-DSX型Y迷宫(安徽正华生物仪器设备有限公司);RD1114-PT大鼠穿梭避暗仪(上海移数信息科技有限公司);Micro 17R型台式冷冻离心机、Varioskan Flash型酶标仪(美国Thermo);E3000-0.5型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂)。

2 方法

2.1 VaD模型的制备

大鼠先经Y迷宫训练,淘汰学习能力差或对电刺激特别敏感的大鼠。随机挑选20只大鼠作为假手术组,其余大鼠采用改良两血管阻断法制作VaD大鼠模型。方法如下:大鼠术前12 h禁食,ip 1%戊巴比妥钠(5 mL/kg)麻醉,大鼠仰卧固定,备皮,消毒,颈部正中切口,钝性分离双侧颈总动脉(CCA),套1号丝线扣备用。拉紧丝扣,在夹闭双侧CCA之前,ip硝普钠(2.5 mg/kg),随即夹闭双侧CCA,20 min后,再通10 min,连续3次后,1号线结扎其远、近心端,并从中间剪断,缝合切口,放回笼中保温饲养,术后及次日ip 1%青霉素钠4 mL/kg(剂量为6.4万U/kg)。假手术组大鼠分离颈总动脉后缝合切口。

2.2 动物分组及给药

手术后1周,Y迷宫测试所有存活的手术组大鼠学习记忆能力,并根据其正确次数进行随机区组,分为模型组、Cerebrolysin(阳性药,10 mg/kg)组、注射用脑蛋白水解物(I)高、中、低剂量(20、10、5 mg/kg,相当于临床等效剂量的2.0、1.0、0.5倍)组,每组20只,其中每组10只进行Y迷宫检测,另外10只进行避暗检测。分组完毕即开始尾iv给药,每天1次,连续给药2周,假手术组给予等体积的生理盐水。

2.3 Y迷宫实验

实验前先将大鼠放入迷宫,让其自由活动,适应5 min,训练日大鼠在起步区予以电击致其逃至安全区,灯光持续10 s,然后熄灯休息5 s,开始下一次操作,一共测试20次。次日为测试日,同训练日操作,记录20次测试中正确反应次数进行统计分析。实验在黑暗、安静环境下进行。规定大鼠受电击后从起步区直接逃至安全区的反应称为“正确反应”,否则为“错误反应”。将训练日的成绩作为学习成绩,测试日的成绩作为记忆成绩。

2.4 避暗实验

训练日将大鼠放入在明箱中,适应3 min,打开小门,大鼠从明箱进入暗箱后,关闭小门并对大鼠持续6 s电击,再次打开小门,大鼠随即逃出暗箱,大鼠自暗箱至第1次逃入明箱所需的时间为潜伏期,记录潜伏期,将训练日的成绩作为学习成绩;次日为测试日,大鼠放入暗箱不电击,记录潜伏期,测试日的成绩作为记忆成绩。

2.5 血清胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 水平检测

Y 迷宫检测结束后, 大鼠 ip 1% 戊巴比妥钠 (5 mL/kg) 麻醉, 腹主动脉取血。3 000 r/min 离心 10 min, 然后取血清, 分装后置于 -20 °C 冰箱保存。采用 ELISA 法进行 IGF-1 水平检测。

2.6 统计学分析

结果采用 SPSS 16.0 统计学软件包分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 *t* 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 Y 迷宫实验结果

与假手术组比较, 模型组大鼠 Y 迷宫学习和记忆成绩的正确次数显著下降 ($P < 0.001$), 表明学习、记忆能力发生障碍, VaD 模型制备成功。与模型组比较, 给药 2 周, 注射用脑蛋白水解物 (I) 的高、中剂量组均可显著提高 Y 迷宫学习和记忆成绩的正确次数 ($P < 0.001, 0.05$)。注射用脑蛋白水解物 (I) 中剂量组的结果与等剂量阳性药 Cerebrolysin 无显著差异。见表 1。

表 1 注射用脑蛋白水解物 (I) 对 VaD 大鼠 Y 迷宫实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) on Y maze test in VaD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	正确次数/次	
		学习成绩	记忆成绩
假手术	—	18.0±1.9	19.1±0.9
模型	—	10.5±2.8***	12.7±3.0***
Cerebrolysin	10	14.5±3.7 [#]	15.7±2.6 [#]
注射用脑蛋	20	16.8±2.4 ^{###}	16.3±2.6 [#]
白水解物 (I)	10	15.7±2.6 ^{###}	16.1±2.3 [#]
	5	13.0±3.1	14.6±2.1

与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$
^{***} $P < 0.001$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group

3.2 避暗实验结果

与假手术组比较, 模型组大鼠避暗学习和记忆成绩的潜伏期时间显著延长 ($P < 0.01, 0.001$), 表明学习、记忆能力发生障碍, VaD 模型制备成功。与模型组比较, 给药 2 周, 注射用脑蛋白水解物 (I) 的高、中、低剂量组均可显著缩短避暗学习和记忆成绩的潜伏期时间 ($P < 0.01, 0.05$)。注射用脑蛋白水解物 (I) 中剂量组的结果与等剂量阳性药 Cerebrolysin 无显著差异。见表 2。

3.3 VaD 大鼠血清 IGF-1 水平检测

与假手术组比较, 模型组大鼠血清中的 IGF-1

水平显著下降 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 给药 2 周, 注射用脑蛋白水解物 (I) 的高、中剂量组均可显著提高 VaD 大鼠血清中的 IGF-1 水平 ($P < 0.01, 0.001$)。注射用脑蛋白水解物 (I) 中剂量组的结果与等剂量阳性药 Cerebrolysin 无显著差异。见表 3。

表 2 注射用脑蛋白水解物 (I) 对 VaD 大鼠避暗实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) on step-through test in VaD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	学习成绩/s	记忆成绩/s
假手术	—	1.5±2.0	4.9±6.5
模型	—	39.4±25.5**	43.5±23.9***
Cerebrolysin	10	14.7±17.6 [#]	8.2±9.7 ^{##}
注射用脑蛋白	20	13.5±17.4 [#]	10.7±17.8 ^{##}
水解物 (I)	10	15.1±17.3 [#]	13.0±17.3 ^{##}
	5	12.2±17.4 [#]	13.9±16.7 ^{##}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

表 3 注射用脑蛋白水解物 (I) 对 VaD 大鼠血清中 IGF-1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) on IGF-1 content in serum of VaD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IGF-1/(ng·mL ⁻¹)
假手术	—	433.4±129.0
模型	—	170.3±55.8***
Cerebrolysin	10	267.2±99.5 [#]
注射用脑蛋白	20	331.0±130.0 ^{##}
水解物 (I)	10	330.7±80.7 ^{###}
	5	231.5±94.2

与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group

4 讨论

VaD 主要表现为高级神经活动的智能障碍, 特别是认知功能障碍, 包括学习、记忆、思维等障碍, 严重影响患者的生活质量。VaD 是迄今为止唯一可以预防的痴呆, 早期治疗具有很好的治疗作用^[6]。近年常采用脑缺血再灌注的方法建立脑缺血模型, 模拟 VaD, 包括四血管全脑缺血模型、大脑中动脉阻塞模型和两血管阻断模型。本实验对常规两血管阻断模型进行了改良, 并通过 Y 迷宫和避暗实验对

大鼠进行行为学测试,结果显示,与假手术比较,模型组大鼠学习和记忆能力显著下降,提示模型组大鼠出现学习与记忆功能障碍,说明本实验建立的大鼠 VaD 模型是成功的。

IGF-1 作为一种在大脑内广泛分布的神经营养因子,其介导的 PI3K/Akt 信号通路是重要的促神经生长和存活的通路,在脑缺血和脊髓损伤模型以及多种其他形式的神经元损伤中均证实了其在促神经元存活中所起的重要作用^[7-10]。有研究证实,将 IGF-1 注入大脑中动脉阻塞大鼠的脑内,可使损伤区神经元缺失显著减少^[11]。Trejo 等^[12]的研究发现,血清低表达 IGF-1 的转基因小鼠,在 Morris 水迷宫的测试中表现出空间学习记忆能力的障碍,同时呈现海马神经再生功能的下降,而外源性给予后均显著改善。此外, Kooijman 等^[13]的研究表明,外源性 IGF-1 可以刺激神经细胞再生,进一步证实了 IGF-1 的神经保护作用。上述研究均表明 IGF-1 对神经元损伤的修复和生长起着重要的作用。但是,脑蛋白水解物注射制剂是否升高 VaD 大鼠血中 IGF-1 水平,国内外尚未见文献报道。

注射用脑蛋白水解物 (I) 是一种大脑所特有的肽能神经营养药物,能以多种方式作用于中枢神经,并进一步保护神经细胞免受各种缺血和神经毒素的损伤;可通过血脑屏障,促进脑内蛋白质的合成,改善脑内能量代谢;提供神经递质、肽类激素及辅酶前体^[14]。相关药物研究表明, Cerebrolysin 可用于神经系统疾病特别是阿尔茨海默病以及 VaD 的临床治疗,能明显改善痴呆症状,延缓痴呆病变的加重^[4-5]。

本实验结果表明,注射用脑蛋白水解物 (I) 能显著增加 VaD 大鼠 Y 迷宫的正确次数和降低 VaD 大鼠避暗的潜伏期时间,并显著提高 VaD 大鼠血清中 IGF-1 水平,说明注射用脑蛋白水解物 (I) 能提高 VaD 大鼠学习记忆能力,其机制可能与提高机体 IGF-1 水平,从而促进 VaD 大鼠脑损伤后的神经元修复和生长,改善脑损伤后的学习记忆过程有关。

参考文献

[1] Desmond D W, Moroney J T, Paik M C, et al. Frequency and clinical determinants of dementia after ischemic stroke [J]. *Neurology*, 2000, 54(5): 1124-1131.
[2] 魏 瑞, 何明大, 刘石梅. 步长脑心通对改善 VaD 模型大鼠学习记忆行为的作用 [J]. *医学临床研究*. 2007, 24(1): 17-18.

[3] 马 卓, 陈 月, 冯婉玉. 多奈哌齐治疗 VaD 临床疗效的系统评价 [J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(5): 569-576.
[4] Gauthier S, Proaño J V, Jia J, et al. Cerebrolysin in mild-to-moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2015, 39(5-6): 332-347.
[5] Chen N, Mi Yang M, Guo J, et al. Cerebrolysin for vascular dementia [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, (1): CD008900. doi: 10.1002/14651858.
[6] Martínez-Vila E, Murie-Fernández M, Gállego Pérez-Larraya J, et al. Neuroprotection in vascular dementia [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2006, 21(2): 106-171.
[7] Aberg N D, Brywe K G, Isgaard J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain [J]. *Scientific World Journal*, 2006, 6: 53-80.
[8] Brywe K G, Mallard C, Gustavsson M, et al. IGF-1 neuroprotection in the Immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and Gsk3 beta [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(6): 1489-1502.
[9] Hung K S, Tsai S H, lee T C, et al. Gene transfer of insulin-like growth factor-1 providing neuroprotection after spinal cord injury in rats [J]. *J Neurosurg Spine*, 2007, 6(1): 35-46.
[10] Leininger G M, Backus C, Uhler M D, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt effectors mediate insulin-like growth factor-1 neuroprotection in dorsal root ganglia neurons [J]. *FASEB J*, 2004, 18(13): 1544-1546.
[11] Wang J M, Hayashi T, Zhang W R, et al. Reduction of ischemic brain injury by topical application of insulin-like growth factor-1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Brain Res*, 2000, 859(2): 381-385.
[12] Trejo J L, Llorens-Martin M V, Torres-Aleman I. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-1-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2008, 37(2): 402-411.
[13] Kooijman R, Sarre S, Michotte Y, et al. Insulin-like growth factor-1: A potential neuroprotective compound for the treatment of acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2009, 40(4): 83-88.
[14] Rockenstein E, Ubhi K, Pham E, et al. Beneficial effects of a neurotrophic peptidergic mixture persist for a prolonged period following treatment interruption in a transgenic model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(11): 1812-1821.