

注射用脑蛋白水解物 (I) 对血管性痴呆大鼠的神经保护作用机制

景小龙¹, 马莉¹, 任雷鸣², 侯衍豹¹, 黄妍¹, 孙双勇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神经保护作用机制。**方法** 采用改良两血管阻断法制备血管性痴呆 (VaD) 大鼠模型, 假手术组仅分离颈总动脉不阻断血管。将大鼠随机分为假手术组、模型组、注射用脑蛋白水解物 (I) 低、中、高剂量 (5、10、20 mg/kg) 组和脑蛋白水解物注射液 (Cerebrolysin, 阳性药, 10 mg/kg) 组。尾 iv 给药, 每天 1 次, 连续给药 2 周; 假手术组和模型组给予等体积生理盐水。给药结束后, 腹主动脉采血分离血清, 分离大鼠皮层制备匀浆, ELISA 法检测 VaD 大鼠血清中神经生长因子 (NGF) 和胰岛素样生长因子 2 (IGF-2) 水平、皮层中 γ -氨基丁酸 (GABA) 水平, 比色法检测皮层中谷氨酸 (Glu) 水平。**结果** 与模型组比较, 注射用脑蛋白水解物 (I) 显著升高 VaD 大鼠血清中 NGF、IGF-2 水平、皮层中 GABA 水平, 显著降低 VaD 大鼠皮层中 Glu 水平; 其升高 IGF-2 和 GABA 水平的作用优于同剂量 Cerebrolysin。**结论** 注射用脑蛋白水解物 (I) 提高 VaD 大鼠学习记忆能力的作用机制, 可能与升高机体 NGF、IGF-2 水平, 调节兴奋性及抑制性氨基酸类神经递质平衡有关。

关键词: 注射用脑蛋白水解物 (I); 血管性痴呆; 神经生长因子 (NGF); 胰岛素样生长因子 2 (IGF-2); γ -氨基丁酸 (GABA); 谷氨酸 (Glu); 学习记忆

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)08-1078-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.08.007

Neuroprotective effects and mechanisms of Cerebroprotein Hydrolysate for Injection (I) on vascular dementia in rats

JING Xiao-long¹, MA Li¹, REN Lei-ming², HOU Yan-bao¹, HUANG Yan¹, SUN Shuang-yong¹, LIU Jing¹, SHEN Xiu-ping¹

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 neuroprotective mechanisms of Cerebroprotein Hydrolysate for Injection (I) on vascular dementia in rats. **Method** The rat vascular dementia model was prepared using an improved two-vessel occlusion method, and the common carotid artery was only isolated but not blocked in sham group. Rats were randomly divided into sham group, model group, Cerebroprotein Hydrolysate for Injection (I) groups with low, medium and high dose (5, 10, 20 mg/kg) and Cerebroprotein Hydrolysate Injection group (Cerebrolysin, Positive drug, 10 mg/kg). The drug was administered by iv injection of rat tail vein once a day for two weeks, while the same volume of saline was administered in sham and model group. At the end of administration, the plasma was collected through abdominal aorta to separate serum, and rat cortex was isolated to prepare homogenate. The levels of nerve growth factor (NGF) and insulin-like growth factor 2 (IGF-2) in serum and level of gamma-aminobutyric acid (GABA) in cortex were detected by ELISA. Level of glutamate (Glu) in cortex of VaD rats was detected by colorimetry. **Results** Compared with model group, levels of NGF and IGF-2 in the serum of VaD rats and level of GABA in cortex were significantly increased, while level of Glu in cortex was significantly decreased after administration of Cerebroprotein Hydrolysate for Injection (I). The increased IGF-2 and GABA levels by Cerebroprotein Hydrolysate for Injection (I) were significantly higher than that of Cerebrolysin at same dose. **Conclusion** The mechanisms underlying the increased learning and memory ability of VaD rats by Cerebroprotein

收稿日期: 2017-07-07

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

*通信作者 申秀萍 E-mail: shenxp@tjpr.com

刘静 E-mail: liuj@tjpr.com

Hydrolysate for Injection (I), are possibly related to the increased levels of NGF and IGF-2 in body and a regulation of the balance between excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters.

Key words: Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I); vascular dementia; Nerve growth factor (NGF); Insulin-like growth factor 2 (IGF-2); γ -aminobutyric acid (GABA); Glu; 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]。近年来, VaD 的发病率越来越高, 成为居于第 2 位的常见痴呆^[2]。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 的临床治疗获得肯定疗效^[3-4]。我国国家食品药品监督管理总局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^[3-4]。本课题组前期研究发现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胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 水平、促进脑损伤后的神经元修复和生长有关^[5]。本实验将进一步考察注射用脑蛋白水解物 (I) 对血管性痴呆大鼠的神经保护作用机制, 为其临床应用提供参考。

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 NeuroPharma GmbH, 规格 60 mg/10 mL/支, 批号 PB0947。

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); 无水乙醇 (天津市化学试剂供销公司, 批号 161110); 神经生长因子 (NGF)、胰岛素样生长因子-2 (IGF-2) ELSIA 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司); γ -氨基丁酸 (GABA) ELSIA 试剂盒、谷氨酸 (Glu) 测定试剂盒 (南京建成科技有限公司)。

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); SHHW21/600A II 型三用电热恒温水箱 (天津市泰斯特仪器有限公司); XW-80A 型微型漩涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司); ML104/02 型电子天平 (梅特勒托利多仪器 (上海) 有限公司); E3000-0.5 型电子天平 (常熟市双杰测试仪器厂); DY89-1 型电动匀浆机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 VaD 模型的制备^[5]

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 10 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, 与假手术组比较, 模型大鼠 Y 迷宫学习和记忆成绩的正确次数显著下降, 表明学习、记忆能力发生障碍, VaD 模型制备成功; 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 10 只。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 VaD 大鼠血清 NGF、IGF-2 水平检测

给药结束后, 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, 取血清, 分装后置于一 20 °C 冰箱保存。采用 ELISA 法进行 NGF、IGF-2 水平检测。

2.4 VaD 大鼠皮层 GABA、Glu 水平检测

大鼠腹主动脉取血后, 快速断头取脑, 在冰盘上去除脑膜和血管, 分离皮层称质量, 加 9 倍生理盐水, 在冰浴中匀浆, 5 000 r/min 离心 5 min, 然后取上清, 分装后置于一 20 °C 冰箱保存。采用 ELISA 法进行 GABA 水平检测、比色法进行 Glu 水平检测。

2.5 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 Dunnett Multiple test (血清) 及 Bonferroni Multiple test (脑组织) 进行组间比较。

3 结果

3.1 VaD 大鼠血清 NGF、IGF-2 水平检测

如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中的 NGF、IGF-2 水平显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给药 2 周, 注射用脑蛋白水解物 (I) 的高剂量组可显著提高 VaD 大鼠血清中的 NGF 水平 ($P < 0.05$), 高、中剂量组均可显著提高 IGF-2 水平 ($P < 0.01$); 中剂量组与等剂量阳性药 Cerebrolysin 具有升高 NGF 水平的趋势, Cerebrolysin 具有升高 IGF-2 水平的趋势, 但差异不显著。

表 1 注射用脑蛋白水解物 (I) 对 VaD 大鼠血清中 NGF、IGF-2 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effects of Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) on NGF and IGF-2 content in serum of VaD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	NGF/ (pg·mL ⁻¹)	IGF-2/ (ng·mL ⁻¹)
假手术	—	1754.3±556.7	119.9±44.1
模型	—	886.2±161.8**	72.4±21.8**
Cerebrolysin	10	1175.0±548.4	101.5±43.5
注射用脑蛋白	20	1511.9±658.9 [#]	113.0±27.7 ^{###}
水解物 (I)	10	1158.2±261.8	110.4±27.7 ^{###}
	5	974.1±229.3	82.4±15.4

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

3.2 VaD 大鼠皮层 GABA、Glu 水平检测

与假手术组比较, 模型组大鼠皮层中的 GABA、水平略微提高, Glu 水平显著提高 ($P < 0.001$)。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 大鼠皮层中的 GABA 水平 ($P < 0.001$), 阳性药 Cerebrolysin 组大鼠皮层中的 GABA 水平略微提高; 与等剂量阳性药 Cerebrolysin 比较, 注射用脑蛋白水解物 (I) 中剂量组 GABA 水平显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 给药 2 周, 阳性药 Cerebrolysin、注射用脑蛋白水解物 (I) 的高、中剂量组均可显著降低 VaD 大鼠皮层中的 Glu 水平 ($P < 0.001$ 、0.01、0.05)。结果见表 2。

表 2 注射用脑蛋白水解物 (I) 对 VaD 大鼠皮层中 GABA、Glu 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effects of Cerebroprotein Hydrolysate for injection (I) on GABA and Glu content in rat cerebral cortex ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	GABA/ (ng·mL ⁻¹)	Glu/ (umol·L ⁻¹)
假手术	—	780.9±181.2	709.9±90.2
模型	—	833.1±169.5	953.1±97.6***
Cerebrolysin	10	864.2±227.8	698.5±142.7 ^{###}
注射用脑蛋白	20	1611.2±297.7 ^{###}	776.6±78.8 ^{##}
水解物 (I)	10	1413.9±335.5 ^{###SSS}	815.9±92.9 [#]
	5	1096.8±285.9	848.6±63.1

与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$
^{###} $P < 0.001$; 与 Cerebrolysin 组比较: ^{SSS} $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group; ^{SSS} $P < 0.001$ vs Cerebrolysin group

4 讨论

NGF 是由神经元自身所支配的靶组织产生的特异蛋白质分子, 通过神经元轴突逆行运输到神经细胞体, 与特异受体结合激活细胞代谢、调节细胞生长^[6], 国外研究结果表明 NGF 能使神经元前体细胞增殖, 对胆碱能神经元、单胺类神经元、肽类神经元、交感神经元、 γ -氨基丁酸能神经元具有促存活作用; 增加神经递质合成并阻止神经元细胞凋亡^[7]。近年研究发现, 阿尔茨海默病以及 VaD 的发病与缺乏 NGF 有关^[8-9]。NGF 能稳定细胞内游离 Ca^{2+} 水平来抵御缺血损伤。而在脑缺血早期, 神经元可能存在 NGF 蛋白表达障碍; 尤其在易于受到损伤的海马 CA1 区神经元, NGF 的基因表达逐渐恶化并伴有不可逆性的蛋白质合成障碍, 这可能导致迟发性神经元坏死的发生^[10-13]。因此, 促进 NGF 基因的蛋白质表达, 增加神经系统有关部位 NGF 的量, 是降低脑缺血后神经系统损伤、防治 VaD 的有效手段。

Glu 是人和哺乳动物脑内含量最高的兴奋性氨

氨酸,参与中枢神经系统的信息传递,在学习记忆、突触可塑性、神经元发育和退化等方面亦有重要的作用。但过量的 Glu 对神经元有明显的损伤作用,因此已被认为是内源性兴奋性毒素^[14]。据文献报道,其兴奋毒性作用在急性脑缺血诱发的细胞凋亡、再灌注损伤和迟发性神经元死亡中起重要作用。GABA 被认为是重要的抑制性神经递质,具有降低兴奋性与神经保护作用。因此,缺血再灌注后, Glu 升高的同时如能出现 GABA 的释放增高,则意味着可能建立对抗兴奋性氨基酸过量的保护机制^[15]。

IGF-2 是目前所知功能最复杂多样的生长因子,至少在啮齿类动物中是促进有丝分裂的主要生长因子。IGF-2 在刺激个体生长方面的作用比 IGF-1 弱,但在成人胰岛素样生长因子中起主导作用的是 IGF-2^[16]。此外,IGF-2 在中枢神经系统中表达量较大,说明它作为神经营养性蛋白与大脑生长和智力发育关系密切^[17]。

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缺血和各种神经毒素的损伤;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^[18]。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^[3-4]。本课题组前期研究发现,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。

本实验结果表明,注射用脑蛋白水解物(I)能显著提高 VaD 大鼠血清中 NGF、IGF-2 水平,显著提高 VaD 大鼠皮层中 GABA 水平,并显著降低 VaD 大鼠皮层中 Glu 水平。说明注射用脑蛋白水解物(I)改善 VaD 大鼠学习记忆能力的机制可能与提高机体 NGF、IGF-2 水平、调节兴奋性及抑制性氨基酸类神经递质的平衡有关。特别是注射用脑蛋白水解物(I)升高 VaD 大鼠 IGF-2 和 GABA 的效果优于同剂量 Cerebrolysin。

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] 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.
- [4] 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.
- [5] 景小龙,侯衍豹,任雷鸣,等. 注射用脑蛋白水解物(I)对血管性痴呆大鼠的保护作用 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(7): 922-925.
- [6] Levi Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later [J]. *Science*, 1987, 237:1154-1162.
- [7] Knusel B, Winslow J W, Rosenthal A, et al. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by BDNF but not NT-3 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 961-965.
- [8] Kordower J H. *In vivo* gene delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor for Parkinson disease [J]. *Ann Neurol*, 2003, 53(3): S120-132.
- [9] Hunter C L, Isacson O, Nelson M, et al. Regional alterations in amyloid precursor protein and nerve growth factor across age in a mouse model of vascular dementia [J]. *Neurosci Res*, 2003, 45(4): 437-445.
- [10] Lee T H, Kato H, Tsong S, et al. Expressions of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *stroke*, 1998, 29(9): 1687-1697.
- [11] Shashoua V E, Adams D S, Boyer-Boiteau A, et al. Neuroprotective effects of a new synthetic peptide, CMX-9236, *in vitro* and *in vivo* models of cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 2003, 963(1-2): 214-223.
- [12] Lad S P, Peterson D A, Bradshaw R A, et al. Individual and combined effects of TrkA and P75NTR nerve growth factor (NGF) receptors: a role for the high affinity receptor site [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(3): 208-220.
- [13] Raiteri L, Giovedi S, Benfenati F, et al. Cellular mechanisms of the acute increase of glutamate release induced by nerve growth factor in rat cerebral cortex [J]. *Neuropharmacology*, 2003, 44(3): 390-402.
- [14] 邓文斌,张均田. 脑缺血时谷氨酸兴奋性毒性及毒理学对抗策略 [J]. *国外医学:脑血管疾病分册*, 1996, (4): 12.
- [15] Gromdahl T O, Berg Johnsen J, Langmoen I A, et al. Chloride influx during cerebral energy deprivation [J]. *Neurosci Res*, 1998, 20(2): 131-136.
- [16] 王丁科,阎 萍,梁春华,等. 胰岛素生长因子 2 研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2008, 29(7): 67-70.
- [17] Dikkes P, Jaffe D B, Guo W H, et al. IGF2 knockout mice are resistant to kainic acid-induced seizures and neurodegeneration [J]. *Brain Res*, 2007, 1175: 85-95.
- [18] 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.