

具有显著性。造成这种现象的原因可能是标本的反复冻融所产生的机械剪切力对标本中的蛋白质分子产生破坏作用,从而引起检测的抵抗素和内脂素水平下降。同时本研究的结果还显示,尽管反复冻融后抵抗素和内脂素的测定水平有所降低,但不同的测定之间抵抗素和内脂素水平存在高度的相关性和一致性,也就是说,尽管反复冻融可以影响抵抗素和内脂素的绝对水平,但对人群中的相对水平可能影响有限。

需要指出的是,本研究中的标本是分两批进行测定,但由于研究中没有质控血清,因而无法对测定可能存在的批内、批间变异对研究结果的影响进行估计。然而,本研究中两批测定用的是同一个试剂盒,冻融4次和冻融6次是在同一批进行测定,其结果也显示冻融对血浆中抵抗素和内脂素的检测水平存在显著影响(两次检测结果的 P 均=0.000)。另外,本研究中是在短时间内对标本进行多次反复冻融以观察冻融对抵抗素和内脂素检测水平的影响,这与实验室的实际情况可能存在差异。

笔者的研究结果再次提示,在血标本贮存、测定和分析中要注意这一现象对抵抗素和内脂素研究结

果的影响,避免标本的反复冻融。

参考文献

- 1 Brey RL, Cote SA, McGlasson DL, *et al.* Effects of repeated freeze - thaw cycles on anticardiolipin antibody immunoreactivity [J]. *Am J Clin Pathol*, 1994, 102(5): 586 - 588
- 2 杨俊, 黄祖汉. 反复冻融对标本本的活性肽含量的影响[J]. 第一军医大学学报, 1993, 13(2): 139 - 140
- 3 张静霞, 周红超, 徐德忠, 等. 血清反复冻融对 HBsAg 和抗 HBs 抗体检测的影响[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22: 1084
- 4 董秀华, 李峰. 血清冻融次数对乙型肝炎 OD 值影响的观察[J]. 中国城乡企业卫生, 2008, 3: 40
- 5 高云朝, 顾建英, 陆汉魁, 等. 血清反复冻融对肿瘤标志物浓度的影响[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(1): 119 - 120
- 6 Rastawicki W, Smietańska K, Rokosz N, *et al.* Effect of multiple freeze - thaw cycles on detection of IgA, IgG and IgM antibodies to selected bacterial antigens [J]. *Med Dosw Mikrobiol*, 2012, 64(1): 79 - 85
- 7 Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, *et al.* The effect of storage time and freeze - thaw cycles on the stability of serum samples [J]. *Biochem Med; Zagreb*, 2013, 23(1): 70 - 77

(收稿日期:2016-01-29)

(修回日期:2016-02-05)

植入式胶囊渗透压泵在大鼠脑梗死模型 脑室给药中的应用

包新杰 施 浩 李雪元 左赋兴 关 健 窦万臣 王任直

摘 要 **目的** 探讨植入式胶囊渗透压泵对大鼠脑梗死模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)进行脑室内给药的可行性。**方法** 18只改良神经损伤严重程度评分(modified neurological severity scores, mNSS)在10~13分的SD雄性大鼠随机分成3组:渗透压泵给药组、常规给药组和对照组,每组各6只大鼠。模型前和模型后24h、3、7和14天分别行mNSS评分;模型后14天处死大鼠行2,3,5-三苯氯化四氮唑(TTC)染色并计算脑梗死体积。**结果** 模型后14天,渗透压泵给药组和常规给药组大鼠神经功能明显改善,mNSS评分均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);渗透压泵给药组大鼠神经功能的恢复程度优于常规给药组大鼠,差异有统计学意义($P<0.05$)。渗透压泵给药组大鼠的脑梗死体积为 $28.6\% \pm 5.8\%$,低于常规给药组($35.5\% \pm 7.6\%$)和对照组($38.2\% \pm 6.5\%$),和对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);常规给药组大鼠的脑梗死体积小于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 植入式胶囊渗透压泵应用于大鼠脑梗死模型的脑室给药是可行和有效的,这种缓释的给药方式显著优于单次脑室内给药方式。

关键词 脑梗死 渗透压泵 脑室给药

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.007

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81200916);国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2014AA020513,2013AA020106)

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院神经外科

通讯作者:窦万臣,电子信箱:wangrz@126.com

Application of Intraventricular Administration Using Osmotic Pumps for Middle Cerebral Artery Occlusion Models in Rats. Bao Xinjie, Shi Hao, Li Xueyuan, et al. Department of Neurosurgery, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Abstract Objective To investigate the feasibility of intraventricular administration using osmotic pumps for middle cerebral artery occlusion (MCAO) models in rats. **Methods** Eighteen rats with the modified neurological severity scores (mNSS) between 10 and 13 were randomly divided into three groups: (1) osmotic pump administration group ($n=6$); (2) regular administration group ($n=6$); (3) control group ($n=6$). The mNSS were tested before, 24h, 3days, 7days and 14days after MCAO. All rats were killed 24d after MCAO. The brains were removed and dissected into 6 pieces of 2 mm coronal sections. The fresh brain slices were stained by 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and relative infarct volume was measured. **Results** Fourteen days after MCAO, rats in osmotic pump administration group exhibited significant behavioral recovery compared with regular administration group and the control group ($P<0.05$). In addition, infarct volume of three groups was $28.6\% \pm 5.8\%$ in osmotic pump administration group, $35.5\% \pm 7.6\%$ in regular administration group, and $38.2\% \pm 6.5\%$ in the control group. There was significant difference between osmotic pump administration group and the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The application of intraventricular administration using osmotic pumps for MCAO models in rats is feasible and effective.

Key words Cerebral ischemia; Osmotic pump; Intraventricular administration

脑梗死是严重危害人类健康的疾病,目前除发病 4.5h 以内及时溶栓治疗外,尚无更为有效的方法^[1]。药物治疗是脑梗死患者的主要辅助治疗手段,临床上药物的用药途径以静脉和口服给药为主。因为血-脑脊液屏障的存在,实验室研究中脑室内、脑实质内和鞘内给药也是常用的几种给药方式,有利于药物在中枢神经系统富集,以达到较高的药物浓度。但是,这几种给药方式的创伤较大,在多次给药的情况下,反复的麻醉和有创操作均会对实验动物产生危害,伤口感染的概率增加,甚至直接导致实验动物的死亡。这些因素会对模型的稳定性产生影响,并对治疗效果产生偏倚。本实验就采用植入式胶囊渗透压泵对脑梗死大鼠脑室内缓释和持续给药进行研究。

材料与方 法

1. 实验动物及实验用品: (1) 实验动物: SPF 级 SD 雄性大鼠 25 只,体重 250~270g,由北京协和医院动物实验中心提供,实验动物许可证号: SCXK(京)2007-0001。模型制作后有 18 只大鼠纳入后续实验。(2) 实验药物: 血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) (美国 Sigma 公司); 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司), 生理盐水配成 10% 水合氯醛溶液; 2,3,5-三苯氯化四氮唑 (TTC, 北京化学试剂厂), 生理盐水配成 2% TTC 溶液。(3) 实验器材: 植入式胶囊渗透压泵 (Alzet Osmotic Pumps, 美国 Durect Corporation 公司); 微量注射器 (德国 Eppendorf 公司); 脑立体定向仪 (江湾 I 型); 手术显微镜; 自制大鼠固定板; 尼龙栓线 (型号: 2432, 北京沙东生物技术有限公司); 显微手术器械;

孵育箱 (Series II, Thermo Forma 公司); 体重测量仪。

2. 动物模型制作方法: 大鼠 MCAO 模型在北京协和医院动物实验中心 [实验动物许可证号: SYXK(京)2005-0008] 完成制作^[2]。手术前动物禁饮食 4h 并称重,按外科无菌手术操作。栓线上在距离头端 1.8cm 处用记号笔做标记。大鼠 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,剂量为 0.35ml/100g,仰卧位固定,手术显微镜下操作。剪掉颈部毛发,碘伏消毒皮肤; 颈部正中切口 1.5cm; 剪开阔筋膜后显露右侧胸锁乳突肌,在胸锁乳突肌和颈前肌之间向深部分离后显露颈动脉鞘,游离右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉; 用 6-0 丝线分别结扎颈外动脉根部和颈总动脉离分叉 8mm 处,压闭阻断颈内动脉血流后于颈总动脉离分叉约 5mm 处剪一小口,置入尼龙栓线,左手拿显微镊子夹住颈总动脉,右手用镊子辅助栓线沿颈内动脉方向插入,插入深度为 1.8cm 左右时,有轻微阻力,提示模型制作成功^[2]; 双结扎紧颈总动脉,剪断血管外部栓线,清理术野,缝合颈部切口。大鼠放置在保温垫上,清醒后放回鼠笼,自由饮食。

3. 实验动物分组及植入胶囊渗透压泵: 25 只大鼠在模型制作后 24h 行改良神经损伤严重程度评分 (modified neurological severity scores, mNSS)^[3], 有 18 只大鼠 mNSS 评分在 10~13 分,被随机分成 3 组: 渗透压泵给药组、常规给药组 and 对照组,每组各 6 只大鼠。渗透压泵给药组大鼠 MCAO 模型后 3 天,用胶水连接渗透压泵、流量调节器及 kit2 装置后,向泵内注射 100 μ l VEGF 溶液,VEGF 含量为 4 μ g,缓释速度 15 μ l/d,总时长 7 天。大鼠麻醉满意后固定在立体定

向仪上,头部皮肤矢状位正中切口 1.5cm,脑室内注射位点参照大鼠脑图谱:前囟后 1mm,右侧旁开 2.0mm,硬脑膜下 3.5mm。直径 1mm 磨钻颅骨钻孔,植入渗透压微型泵(1007D)/kit 2 缓释装置后用胶水固定,微型泵埋于两侧肩胛骨之间的背部皮下。头皮及背部皮肤行全层缝合。常规给药组大鼠在立体定向仪下使用微量注射器脑室内给药,20 μ l VEGF 溶液,VEGF 含量为 4 μ g,给药速度 4 μ l/min,位点同渗透压泵给药组。对照组大鼠在立体定向仪下使用微量注射器脑室内注射 20 μ l 生理盐水,速度 4 μ l/min。

4. 行为学评分:模型前和模型后 24h、3、7 和 14 天分别进行 mNSS 评分。评分共有运动、感觉、平衡和反射 4 部分,总分 18 分,正常大鼠得分 0 分,得分越高提示症状越重^[3]。

5. TTC 染色:MCAO 后 14 天,深度麻醉大鼠后开颅取脑,切掉大脑额极和枕极后冠状位切成 2mm 厚的脑块共 6 块,放入 2% TTC 溶液中避光 37℃ 孵育 30min。10 倍显微镜下拍照,在 Image Pro Plus 软件中分析并计算梗死体积。间接梗死面积 = 正常侧脑组织面积 - 梗死侧正常脑组织面积。相对梗死体积 = 累积间接梗死面积/累积正常侧脑组织面积 $\times$ 100%^[4]。

6. 统计学方法:采用 SPSS 15.0 分析软件,测量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间 mNSS 评分和相对梗死体积比较,使用独立样本 t 检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 行为学比较:模型制作前 3 组大鼠 mNSS 评分均为 0 分。模型后 24h,3 组大鼠 mNSS 评分稳定在 10~13 分,出现典型偏瘫症状,表现为站立不稳,向左侧跌倒或转圈,提起鼠尾可见左前肢屈曲,头向患侧抬起。模型后 3 天,3 组大鼠进行不同的干预。模型后 7 天,渗透压泵给药组大鼠的 mNSS 评分显著低于对照组 ($P < 0.05$);常规给药组大鼠的 mNSS 评分低于对照组,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型后 14 天,渗透压泵给药组和常规给药组大鼠神经功能明显改善,mNSS 评分均低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);渗透压泵给药组大鼠神经功能的恢复程度优于常规给药组大鼠,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 1)。

2. 脑梗死体积比较:模型后 14 天,处死 3 组大鼠,取脑行 TTC 染色。结果显示,渗透压泵给药组大鼠的脑梗死体积为 $28.6\% \pm 5.8\%$,低于常规给药组

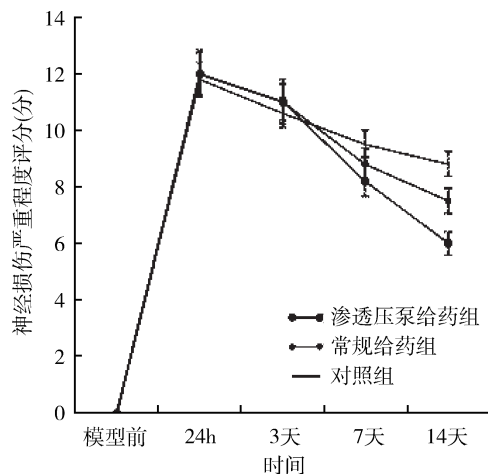


图 1 3 组大鼠的 mNSS 评分变化

模型前及模型后 3 天,各组大鼠的 mNSS 评分大致相同;模型后 7 天,与对照组比较,另两组 VEGF 给药组大鼠的神经功能部分改善,渗透压泵给药组大鼠与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但常规给药组大鼠与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);模型后 14 天,渗透压泵给药组和常规给药组大鼠的神经功能进一步改善,mNSS 评分均低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),渗透压泵给药组大鼠神经功能的恢复程度优于常规给药组大鼠,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)

($35.5\% \pm 7.6\%$) 和对照组 ($38.2\% \pm 6.5\%$),和对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);常规给药组大鼠的脑梗死体积小于对照组,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 2)。

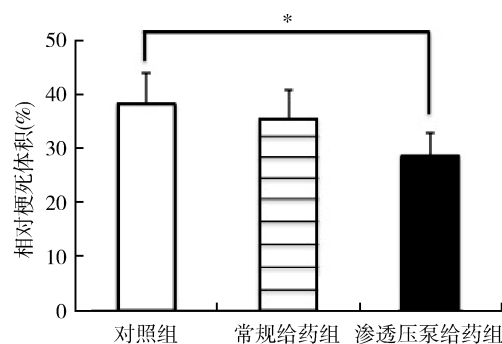


图 2 3 组大鼠模型后 14 天脑梗死体积比较

* $P < 0.05$

讨 论

本实验研究结果显示,给大鼠植入胶囊渗透压泵完成脑室内缓释给药是安全、可行和有效的。根据提前设置好的药物缓释速度,某一剂量的药物可以缓慢和持续地进入实验动物的脑内,从而避免了以往多次给药时反复的麻醉和有创操作对实验动物产生的危害,如伤口感染、脑内出血、麻醉猝死等,同时给研究

人员带来了便利。另外,笔者研究发现,同样剂量的药物在缓释给药的情况下治疗效果要显著优于一次性给药的方式。本实验中,渗透压泵给药组和常规给药组大鼠脑梗死后使用的 VEGF 总剂量均是 $4\mu\text{g}$,不同的是渗透压泵给药组是采用缓释给药的方式,匀速给药($0.6\mu\text{g}/\text{d}$),给药时间大约持续 7 天,而常规给药组是一次性将 $4\mu\text{g}$ 的 VEGF 溶液注入大鼠脑室内;研究结果显示,和生理盐水对照组比较,渗透压泵给药组和常规给药组大鼠均有一定程度神经系统功能的恢复和脑梗死体积的缩小,但渗透压泵给药组的治疗效果要显著优于常规给药组。这和药物的半衰期密切相关,包括 VEGF 在内的所有药物都有各自的半衰期,这就是临床上绝大部分药物治疗需要间隔一段时间重复、多次给药的内在原因,以期达到最佳的药物浓度和治疗效果。

本实验主要关注于胶囊渗透压泵对脑梗死大鼠脑室内给药的可行性,采用的 VEGF 是目前公认的大鼠脑梗死后有效的治疗药物。VEGF 的作用机制和其促进脑梗死周边缺血半暗带中新生血管形成、改善脑组织的供血,促进内源性神经再生、直接的神经营养和神经保护等多种机制有关^[5]。在很多物种,包括人类和大鼠,内源性神经干/前体细胞(neural stem/progenitor cells, NSPCs)的增殖、迁移、分化等过程,对于神经系统的发育和功能修复极为重要^[6]。NSPCs 主要位于室管膜下区(subventricular zone, SVZ)和海马颗粒层下区(subgranular zone, SGZ)^[7]。NSPCs 在正常成年动物基本保持静息状态,脑梗死可以激活内源性神经再生,发生在脑梗死后 2~14 天,增殖的 NSPCs 从 SVZ 区和 SGZ 区迁移到梗死周边,分化为神经元和胶质细胞,重建受损的神经网络^[8]。但是很多增殖的 NSPCs(约 80%)在迁移到梗死周边后数天内凋亡,在脑梗死后 14 天达到高峰,可能与梗死周边缺乏营养及恶劣的微环境有关。最终,神经再生仅能修复约 0.2% 的受损神经细胞,对脑梗死后神经系统功能恢复作用很有限^[9]。最新研究表明,VEGF 可以直接激活 SVZ 区 NSPCs 的增殖和分化^[10]。另外,血管微环境对 NSPCs 的存活和发挥作用至关重要^[6, 11, 12]。VEGF 可以显著促进血管新生,改善梗死周边的血管微环境,为提高 NSPCs 的存活比例及 NSPCs 修复受损神经网络提供一个良好微环境。

由此可见,将植入式胶囊渗透压泵应用于大鼠脑梗死模型的脑室给药是可行和有效的,这种缓释的给药方式显著优于单次脑室内给药方式,并有效克服了多次脑室内给药方式带来的不便和不良反应。

参考文献

- 1 Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, *et al.* Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(13): 1317-1329
- 2 包新杰,王任直,赵浩,等.线栓法插线深度对大鼠脑梗死模型制备的影响[J].*中国实验动物学报*,2011,19(3):68-71
- 3 Bao XJ, Wei JJ, Feng M, *et al.* Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2011, 1367: 103-113
- 4 Bao XJ, Feng M, Wei JJ, *et al.* Transplantation of Flk-1 + human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats [J]. *Euro J Neurosci*, 2011, 34(1): 87-98
- 5 Beck H, Plate KH. Angiogenesis after cerebral ischemia [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 117(5): 481-496
- 6 Shen Q, Wang Y, Kokovay E, *et al.* Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: A quantitative analysis of niche cell-cell interactions [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(3): 289-300
- 7 Liu YP, Lang BT, Baskaya MK, *et al.* The potential of neural stem cells to repair stroke-induced brain damage [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 117(5): 469-480
- 8 Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A, *et al.* Single-cell transcriptomics reveals a population of dormant neural stem cells that become activated upon brain injury [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(3): 329-340
- 9 Arvidsson A, Collin T, Kirik D, *et al.* Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke [J]. *Nat Med*, 2002, 8(9): 963-970
- 10 Luo YP, Coskun V, Liang A, *et al.* Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cell [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1175-1186
- 11 Nakano-Doi A, Nakagomi T, Fujikawa M, *et al.* Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(7): 1292-1302
- 12 Dore-Duffy P, Katychew A, Wang X, *et al.* CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(5): 613-624

(收稿日期:2016-01-25)

(修回日期:2016-02-11)