

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2013.02.005

降钙素基因相关肽经鼻靶向中枢给药的实验研究^{*}

孙树印 吴庆建 闫承军 焦 华

(济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272011)

摘要 目的 寻找无创、直接有效的靶向中枢给药方法,将降钙素基因相关肽(CGRP)避开血脑屏障(BBB)直接运送到中枢神经系统。**方法** 大鼠采取线栓法制作大脑中动脉闭塞模型(MCAO),在随机双盲状态下分组予以不同处理。利用酶联免疫吸附法(ELISA)测定经鼻腔和静脉注射 CGRP 后 30min 时,各脑区的 CGRP 浓度,研究 CGRP 经鼻给药的可行性。**结果** IN 组脑部各区域、颈髓和 CSF 中 CGRP 浓度较 IV 组显著增高($P<0.01$),以嗅球的 CGRP 浓度最高,其次为 CSF 和颈髓。**结论** 经鼻靶向中枢给药可以避开血脑屏障的阻碍,将 CGRP 递送至中枢神经系统,中枢神经系统的 CGRP 浓度显著提高。

关键词 降钙素基因相关肽;经鼻给药;脑缺血;中枢神经系统;神经保护药

中图分类号:R965 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2013)04-094-03

The experimental study of intranasal administration of calcitonin gene related peptide targeting in the central administration

SUN Shu-yin, WU Qing-jian, YAN Cheng-jun, et al

(Shandong Jining No. 1 People's Hospital & The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272011, China)

Abstract: Objective To develop a noninvasive method for delivering CGRP to the brain bypassing the blood-brain barrier (BBB) for the treatment of brain injury. **Methods** A blinded, vehicle-controlled study of IN CGRP and IV CGRP administration was performed by intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out after IN and IV injection of CGRP for 30min to measure CGRP concentration in different brain areas. The feasibility of intranasal administration CGRP were analysed. **Results** CGRP demonstrated a much higher delivery of IN than IV CGRP to the brain regions. The olfactory bulb was the highest region followed by CSF and spinal cord. **Conclusion** CGRP might be delivered to the brain directly from the nasal cavity following IN administration by passing the BBB.

Key words: Calcitonin gene related peptide; Intranasal; Brain ischemia; Administration; Neuroprotective agents

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是目前体内已知的最强的舒血管活性肽,分为 α 型和 β 型,由37个氨基酸残基组成,广泛分布于神经及心血管系统,参与机体许多功能的调节,与多种疾病有着密切关系。研究发现其对脑血管的发生和防治中有重要意义,如脑梗死、蛛网膜下腔出血等有着潜在的治疗作用。CGRP的分子量为3786.91kDa,其大分子特性使其经静脉给药无法透过血脑屏障到达中枢神经系统起到治疗作用。迄今为止临床缺乏一种合理有

效的靶向中枢的给药途径。近年来很多学者研究发现,经鼻给药是一种新的中枢神经系统给药途径,我们设计实验,将CGRP经鼻靶向中枢给药,采用酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定大鼠脑内各分区CGRP的浓度,研究CGRP经鼻靶向中枢给药的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物模型及分组 健康成年 Sprague-Dawley 大鼠,雄性,体重230~270 g,共24只,提供单位(山东鲁抗实验动物中心),将动物置于实验

^{*} [基金项目] 2010年济宁市科技局立项课题(编号:济科字[2010]85号—24)

动物房,室温(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,自由饮水进食。制作大鼠大脑中动脉闭塞(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)缺血模型,造模成功后,将模型随机分为对照组(不予任何干预)、静脉注射 CGRP 组(IV CGRP 组)50 μg /0.5ml、经鼻给予媒介液组、经鼻给予 CGRP(IN CGRP 组)50 μg /50 μl ,每组各 6 只 MCAO 大鼠,采用 ELISA 测定大鼠脑各分区中的 CGRP 浓度。

1.1.2 主要试剂和仪器 CGRP 购自美国 SIG-MA 公司,CGRP 浓度检测采用武汉中美科技有限公司 ELISA 试剂盒;美国 Bio-Rad 酶标;4-0 单股尼龙线购自强生公司。JA-31001 型电子分析天平(上海天平仪器厂),微量注射器(无锡东风玻璃仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 MCAO 模型 参照 Zea 等^[1]的 MCAO 栓线模型制作方法,部分加以改良。麻醉方法采取 10%水合氯醛(350mg/kg)腹腔注射,取颈前正中切口,依次暴露右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。在右颈总动脉与右侧颈内动脉起始部,插入 1 根 4-0 尼龙线(顶端用火烧圆的,避免刺破动脉,造成蛛网膜下腔出血),即可闭塞大脑中动脉,插入深度为 18mm 左右。

1.2.2 给药方法 1)经鼻给药(IN 给药):大鼠处于麻醉状态,固定四肢,取仰卧位,并将头颈背稍稍垫高,以利于药物进入后鼻腔。两侧鼻孔交替给药,经鼻给予 50 μl CGRP 或媒介液,间隔时间为

5min,单次给药剂量为 10 μl ,共需 25 min 左右。2)经静脉给药:经大鼠尾静脉注射 0.5ml CGRP 或媒介液。

1.2.3 ELISA 检测 给药结束后 30 min,过量麻醉处死大鼠后,取完脑脊液后,断头取脑,分别取嗅球、皮质、海马、桥脑、颈髓,电子天平称重,置于 -85°C 低温冰箱中备用。按 $w:v(\text{g}:\text{ml})=1:20$ 的比例加入匀浆液进行组织匀浆,将匀浆液 15 000 r/min 离心 30 min,完毕后取上清液。ELISA 测定方法严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法

实验结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(两两比较比较采用 LSD 法), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

IV 和 IN 给予 CGRP 后在大鼠脑部各分区的浓度变化。由表 1 可知,IV 给药组脑部 CGRP 浓度最高处为嗅球处(836.3 pg/g),其次为脑脊液(810.5 pg/g)。IN 给药组 CGRP 浓度最高的部位为嗅球(3536.3 pg/g),其次为脑脊液(2895.6 pg/g)。对 4 组大鼠脑部 CGRP 进行方差分析发现,IN CGRP 组中 CGRP 在大鼠脑部各分区的浓度均明显高于其他各组,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组、IV CGRP 组和 IN NS 组 CGRP 在各脑部分区均无统计学意义。

表 1 不同途径给予 CGRP 后各脑区 CGRP 浓度变化($\bar{x}\pm s$,pg/g)

分组	嗅球	皮质	海马	桥脑	颈髓	脑脊液
对照组	537.9 $\pm$ 64.5	463.4 $\pm$ 50.9	500.5 $\pm$ 36.9	495.3 $\pm$ 42.9	469.3 $\pm$ 36.9	525.6 $\pm$ 46.8
IV CGRP 组	836.3 $\pm$ 126.4	657.8 $\pm$ 126.7	689.6 $\pm$ 89.7	756.6 $\pm$ 96.9	698.6 $\pm$ 115.8	810.5 $\pm$ 110.9
IN NS 组	495.6 $\pm$ 64.5	457.6 $\pm$ 62.9	510.3 $\pm$ 45.8	479.6 $\pm$ 42.9	482.3 $\pm$ 40.9	530.4 $\pm$ 53.3
IN CGRP 组	3536.3 $\pm$ 637.5 ^{abc}	2108.4 $\pm$ 365.9 ^{abc}	2600.4 $\pm$ 425.9 ^{abc}	1897.5 $\pm$ 300.7 ^{abc}	2346.7 $\pm$ 369.8 ^{abc}	2895.6 $\pm$ 425.7 ^{abc}
F 值	119.494	97.305	129.575	104.811	128.155	158.331
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a:表示与对照组比较, $P<0.05$;b:表示与 CGRP 组比较, $P<0.05$;c:表示与 IN NS 组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

CGRP 是一种与降钙素基因同源的生物活性多肽,1983 年 Rosenfeld 等采用 DNA 基因重组和分子生物技术研究发现,组成结构为 2800 个碱基对,分子量 3786.91。人和鼠的 CGRP 具有相近

似的生物活性,含 α 和 β 两种基因,分别表达两种分子异构肽,分别由 11 号染色体上两个相互独立的基因编码^[2],在第 3、22、25 位氨基酸组成有所不同。CGRP 是目前研究发现效果最强的舒血管活性肽,作为神经递质广泛存在于中枢和周围神经系统内,特别是感觉神经元的胞体和末梢内^[3]。

CGRP 可能是神经系统对损伤反应的一种重要的保护性因素,当缺氧、缺血等因素引起神经元损伤时,CGRP 在神经元的分布和表达的量发生改变。Wang S 等^[4]研究提示 CGRP 可能通过上调 Bcl-2 的表达对减轻脑缺血一再灌注脑组织的损伤有显著作用。张璐等^[5]制作大鼠全脑缺血再灌注模型,经颈动脉直接注入 CGRP,采用脑组织切片染色的方法观察 CGRP 对脑组织神经细胞缺血性损伤的影响,研究发现 CGRP 对缺血后海马 CA1 的锥体细胞产生保护作用。由于血脑屏障的阻隔,加之 CGRP 大分子特性,外周给药时很难通过血脑屏障到达中枢神经系统。直接注射到侧脑室及大脑实质,由于手术具有创伤性、术后并发症以及费用偏高等多种原因,临床不能广泛应用。因此,外源性的 CGRP 如何能有效地递送至中枢神经系统,目前尚处于探索阶段。

经鼻给药作为新发现的靶向中枢神经系统给药途径,已引起神经病学研究领域众多学者的关注。鼻是呼吸器官又是嗅觉器官,根据功能及组织结构的不同可分为 3 个区域:鼻前庭、嗅区和呼吸区。鼻前庭几乎无吸收功能,呼吸区黏膜富含毛细血管,血流丰富,药物由此吸收进入体循环;嗅区位于上鼻甲,面积约 10cm²,紧贴筛板之下,药物可由此吸收进入脑脊液,从而进入中枢神经系统。当 IN 给药后,药物通过嗅区吸收,则可以避开 BBB 阻碍,进而广泛分布于 CNS 内。虽然众多的实验研究^[6-9]结果表明,蛋白多肽类药物经鼻靶向给药可以到达中枢神经系统,但经鼻靶向中枢给药的具体机制仍然不是很清楚,目前认为可能存在两种途径:1)嗅神经通路^[10-11];2)细胞外途径^[12-13]。本实验采取 ELISA 检测大鼠脑组织中 CGRP 浓度,操作方法简单方便,具有很高的灵敏度及特异性。实验结果表明,IN 靶向中枢给予 CGRP 后,于静脉给药组和对照组相比,脑各分区的浓 CGRP 度显著升高,证实了 IN 靶向中枢给予 CGRP 的途径可避开血脑屏障的阻碍,且优于 IV 途径。

经鼻靶向中枢递送 CGRP 的方法具有中枢靶向性强、方便、无创伤性的特点,药物可以迅速到达 CNS,起到治疗作用的同时避免了全身用药可能带来的副作用。因此,经鼻靶向中枢递送 CGRP 的

方法可能为一条有效的治疗脑缺血损伤或其他 CNS 疾病的新途径,至于 CGRP 经鼻给药避开血脑屏障直接进入 CNS 的确切转运机制尚有待进一步阐明。

参考文献:

- [1] Zea LE, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91.
- [2] Conner AC, Simms J, Barwell J, et al. Ligand binding and activation of the CGRP receptor [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(4): 729-732.
- [3] Durham PL, Masterson CG. Two mechanisms involved in trigeminal CGRP release: implications for migraine treatment [J]. *Headache*, 2013, 53(1): 67-80.
- [4] Wang S, Yang D, Lippman ME. Targeting Bcl-2 and Bcl-xl with nonpeptide small molecule antagonists [J]. *Semin Oncol*, 2003, 30 (5 suppl 16): 133-142.
- [5] 张璐,沈霞,崔桂云,等.降钙素基因相关肽对大鼠全脑缺血再灌注后海马 CA1 区活化蛋白-1 DNA 结合活性的影响 [J]. *徐州医学院学报*, 2003, 23(1): 13-16.
- [6] Lin S, Fan LW, Rhodes PG, et al. Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. *Exp Neurol*, 2009, 217(2): 361-370.
- [7] De Rosa R, Garcia AA, Braschi C, et al. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(10): 3811-3816.
- [8] Kumbale R, Frey WH, Wilson S, et al. GM1 delivery to the CSF via the olfactory pathway [J]. *Drug Del*, 1999, 6: 23-30.
- [9] Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, et al. Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis [J]. *Arthritis Rheuma*, 2005, 52(3): 818-825.
- [10] Thorne RG, Emory CR, Ala TA, et al. Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain [J]. *Brain Res*, 1995, 692(1/2): 278-282.
- [11] Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH 2nd. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99(4): 1654-1673.
- [12] Illum L. Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions [J]. *J Controlled Release*, 2003, 87(1-3): 187-198.
- [13] Mathison S, Nagilla R, Kompella UB. Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: fact or fiction? [J]. *J Drug Target*, 1998, 5(6): 415-441.

(收稿日期 2013-02-25)