

口服 PTD-SOD 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

叶南慧, 林艳云, 刘树滔, 饶平凡^{*} (福州大学生物工程与科学学院, 福州 350002)

摘要: 目的 探讨口服灌胃 PTD-SOD 对大鼠局灶性脑缺血再灌注(cerebral ischemia-reperfusion, CIR)引起的脑损伤的保护作用及机制。方法 采用线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞再灌注模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO), 缺血 2 h, 再灌注 24 h。于缺血前一周开始灌胃给予 PTD-SOD 10, 20, 40 mg·kg⁻¹, 2 次·d⁻¹。对术后 MCAO 大鼠进行神经行为学特性观察并评分; TTC 染色法测量大鼠脑梗死面积; 生化法检测大鼠脑组织匀浆中 SOD、GSH-Px、CAT 的活力和 MDA、NO 的含量。HE 染色观察大鼠脑组织病理改变。结果 PTD-SOD 可明显改善大鼠神经行为, 减少脑梗死面积, 提高脑内 SOD、GSH-Px、CAT 的活性, 降低脑组织中 MDA 及 NO 含量, 减轻脑组织病理改变($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 PTD-SOD 可减轻 CIR 神经细胞损伤, 其机制可能与其能抗自由基损伤, 减轻 NO 神经毒性有关。

关键词: 蛋白转导域; 超氧化物歧化酶; 缺血再灌注; 自由基; 保护机制

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)07-0602-05

Protection of Fusion Protein PTD-SOD by Oral on Rats of Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury

YE Nanhui, LIN Yanyun, LIU Shutao, RAO Pingfan^{*} (Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT: **OBJECTIVE** To investigate the protection mechanism of fusion protein PTD-SOD on damaged cerebral tissues by studying the effect of PTD-SOD on cerebral ischemia-reperfusion(CIR) of rats. **METHODS** To establish middle cerebral artery occlusion models with middle cerebral artery thread embolism method for two-hour ischemia and twenty-four-hour reperfusion, to observe variations of areas of cerebral infarction by TTC staining method, to measure changes/variations of indices of anti-oxidative system and oxidative levels of cerebral homogenate of rats, and the damage situation of cerebral cells were tested by paraffin sections and HE staining. **RESULTS** Compared with model groups, the areas of cerebral infarction of administration groups were much smaller, the levels of antioxidative indices of cerebral tissue, such as SOD, GSH-PX and CAT, were significantly increased, while the level of MDA was significantly decreased. At the same time, HE staining showed the damage situation of cerebral cells of administration groups were less than cerebral cells of model groups. **CONCLUSION** Oral administration of PTD-SOD is able to improve levels of anti free radical effect on cerebral tissue, as well as lessen cerebral infarction and decrease the damage situation of cerebral cells of ischemia reperfusion rats.

KEY WORDS: protein transduction domain; superoxide dismutase; cerebral ischemia/reperfusion; free radical; protection mechanism

缺血性脑卒中是指由于脑部血液供应障碍, 缺血缺氧引起的局限性脑组织的缺血性坏死。它是目前严重危害中老年人身体健康和生命的主要疾病之一, 具有发病率高、死亡率高、致残率高、复发率高、合并症多、治愈率低等特点。随着我国人口的老龄化, 缺血性脑卒中的发病率逐年升高, 因而治疗脑卒中面临着严峻的挑战。在不断深入研究的过程中人们认识到自由基在缺血性脑卒中的发病机制中占有重要的地位, 由自由基诱导的脂质过氧化在许多中枢神经系统的病理生理中起着重要的作用, 它可能是脑梗死核心病理环节之一^[1]。因此, 寻找有效的自由基清除剂, 保护脑内神经元免受进

一步损害及促进病变恢复是实施脑保护治疗、改善缺血性脑损伤预后的重要措施之一。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是生物体中一种重要的细胞保卫酶, 能够清除人体中的超氧阴离子自由基, 保护体内脂质免受自由基的攻击^[2]。由于细胞膜通透性的限制, 阻碍了外源性生物活性物质在细胞内发挥治疗作用。随着蛋白质转导域(protein transduction domain, PTD)介导的蛋白转导技术的应用, 解决了这一难题^[3]。PTD 能转导自身及与其融合的多肽、蛋白及 DNA 分子进入几乎所有组织和细胞, 甚至血脑脊液屏障, 转导效率高且对细胞无明显的损伤^[4-5]。PTD 的穿膜特性为脑中神经

基金项目: 福州大学科技发展基金资助项目(2008-XY-17)

作者简介: 叶南慧, 女, 博士生, 实习研究员 Tel: (0591)83732462
授 Tel: (0591)83732462 E-mail: raopingfan@gmail.com

E-mail: yenanhui@yahoo.cn ^{*}通信作者: 饶平凡, 男, 博士, 教

经细胞凋亡及神经退行性疾病的干预提供了有效的治疗方法^[6]。本课题组利用基因工程技术制备融合蛋白 PTD-SOD,证实了该蛋白具有将外源性生物活性物质导入细胞内的功能。本实验在此基础上通过观察 PTD-SOD 与脑损伤及脑内抗氧化能力的关系,探讨 PTD-SOD 对脑组织损伤后的保护作用和机制。

1 材料

1.1 主要试剂

PTD-SOD 冻干粉(福州大学生物工程研究所研制);红四氮唑(TTC)粉剂用磷酸缓冲液配成浓度 0.2%备用,避光保存(国药集团化学试剂有限公司);水合氯醛配成 10%水合氯醛溶液用于大鼠麻醉(国药集团化学试剂有限公司);丙二醛(MDA)、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)及过氧化氢酶试剂盒(南京建成生物工程技术有限公司);线栓(北京沙东生物技术有限公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

752 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);T10 basic 组织匀浆器(德国 IKA);UVM-340 电子天平(瑞士梅特勒公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

健康 SD 大鼠 50 只,♂,体重(230±20)g,购于福建医科大学实验动物中心,实验动物许可证号:SYXK(闽)2004-0007。实验前适应一周。大鼠按体重随机分为 5 组,每组 10 只,即假手术组、模型组、PTD-SOD 高、中、低剂量组(40, 20, 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹,即 PS 40、PS 20 和 PS 10 组);生物工程研究所提供 PTD-SOD 冻干粉溶于 2 mL 生理盐水,灌胃 2 次·d⁻¹,模型组、假手术组喂以 2 mL 生理盐水,连续 7 d。

2.2 脑缺血再灌注模型(MCAO)构建

于末次给药第 2 天,大鼠用 10%水合氯醛(350 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,仰卧位固定在手术台上;颈正中切口长约 2.0 cm,逐步分离出右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA),分别结扎 CCA 和 ECA,在结扎的 CCA 的远心端打一松结,用止血夹夹住颈内动脉(ICA),在 CCA 的结扎处与松节之间剪一“V”形切口,线栓由“V”形切口插入至止血夹,将松结打成死结,移走止血夹,继续插入线栓,至大脑中动脉处(长约 1.8~2.0 cm 依体重而异),感

觉到有阻力时即可,然后缝合肌肉和皮肤,单笼饲养;术后可自由进水,2 h 后,轻轻拔出线栓,直到感觉有阻力,剪去多余线栓,即退至颈总动脉处;假手术组,手术操作程序与实验组相同,但不插入线栓。缺血再灌注后 24 h 处死取脑。

2.3 指标测定

2.3.1 神经行为学评分 神经行为学评分参照 Longa^[7]评分法,大鼠造模清醒后进行评分。0 分:正常,无神经体征;1 分:不能完全伸展左侧前爪;2 分:行动不协调,屈曲,行走时向左侧旋转;3 分:偏瘫,行走时向左侧倾倒;4 分:不能行走,意识水平下降。得分高者运动障碍明显。

2.3.2 脑梗死面积的测量 大鼠在缺血 2 h 再灌注 24 h 后,用 10%水合氯醛麻醉后,开胸腔充分暴露心脏,经心脏灌注 PBS 缓冲液至心脏流出无色液体,迅速断头取脑,去除小脑和嗅脑,放入冰箱冻存至适当硬度,取出切片,每隔 2 mm 做冠状切片,共 7 片,迅速放置至于 37 °C 的 0.2%TTC 溶液中 30 min(避光)。正常脑组织为深红色,梗死区为白色,然后用 4%甲醛缓冲液固定,24 h 后数码相机拍照。应用 Imagepro 6.0 软件,计算各片脑梗死面积之和。

2.3.3 脑组织匀浆中 SOD、GSH-PX、CAT 的活性和 MDA、NO 含量测定 大鼠处死取脑,取缺血侧大脑中动脉(MCA)供血区脑组织,电子天平称量后置于试管中,用移液枪量吸预冷的生理盐水,配制成 10%的匀浆液。组织匀浆液以 5 000 r·min⁻¹, 6 min, 4 °C 离心,取上清液,按试剂盒的方法测定脑组织中 SOD、GSH-PX、CAT 的活性和 MDA、NO 含量。

2.3.4 脑组织 HE 染色 大鼠处死后立即取脑切片,经常规脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片,片厚 4~6 μm。贴片后进行苏木素-伊红(HE)染色,于光学显微镜(200 倍)观察病理变化。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计学软件作方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 时判定差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PTD-SOD 对神经功能的影响

大鼠术后清醒状态下,观察各组神经行为学特征。模型组和给药组出现不同程度上的神经功能缺损,表现为手术侧眼球内陷,非手术侧眼球

稍突出并出现追尾征现象,运动时躯体向左侧旋转,假手术组没有这些特征。与假手术组相比,模型组神经功能评分明显增高($P<0.01$),说明造模成功;与模型组相比,PS 40 组神经功能评分明显降低($P<0.05$),PS 20 和 PS 10 组差异具有统计学意义($P<0.01$);与 PS 40 组相比,PS 20 和 PS 10 组的神经功能评分明显降低($P<0.01$),结果见表 1。

表 1 口服灌胃 PTD-SOD 对缺血再灌注大鼠神经功能和脑梗死面积的影响

Tab 1 Effect of PTD-SOD by oral on the neurological score and cerebral infarct area of rats subjected to ischemia/reperfusion injury

组别	动物数/只	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	神经行为 学评分	脑梗死面积/ mm^2
假手术组	9	0	0	0
模型组	9	0	$2.53\pm0.52^{1)}$	169.83 ± 2.72
PS 40 组	8	40	$2.00\pm0.74^{2)}$	$101.60\pm8.14^{3)}$
PS 20 组	8	20	$1.55\pm0.52^{3)4)}$	$90.32\pm7.15^{3)}$
PS 10 组	7	10	$1.50\pm0.52^{3)4)}$	$87.56\pm7.64^{3)}$

注:与假手术组相比, $^{1)}P<0.01$;与模型组相比, $^{2)}P<0.05$, $^{3)}P<0.01$;与 PS 40 组相比, $^{4)}P<0.01$

Note: Compared with sham group, $^{1)}P<0.01$; compared with model group, $^{2)}P<0.05$, $^{3)}P<0.01$; compared with PS 40 group, $^{4)}P<0.01$

3.2 PTD-SOD 对脑梗死面积的影响

肉眼观察:脑片经 TTC 染色后,假手术组脑切片未见白色区域的梗死灶,整个脑片为深红色;模型组脑片可见到较大的梗死灶;各给药组也相应出现脑梗死灶;脑片拍照后经 Imagepro 6.0 软件计算各组脑梗死面积,结果显示各给药组梗死面积与模型组比较明显减少($P<0.01$),结果见表 1 和图 1。

3.3 PTD-SOD 对脑组织匀浆中 SOD、GSH-PX、CAT 活性和 MDA、NO 含量的影响

表 2 口服灌胃 PTD-SOD 对 MCAO 大鼠脑组织生化指标的影响

Tab 2 Effect of PTD-SOD by oral on the biochemical indicators of rats subjected to ischemia/reperfusion injury

组别	动物数/只	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	GSH-PX/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	CAT/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$	NO/ $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$
假手术组	9	329.21 ± 6.190	191.20 ± 30.01	0.495 ± 0.031	11.11 ± 1.25	12.67 ± 0.96
模型组	9	317.28 ± 9.94	153.24 ± 15.14	0.331 ± 0.036	18.46 ± 2.24	17.44 ± 0.99
PS 40 组	8	$351.60\pm7.68^{2)4)}$	$213.02\pm53.98^{1)4)}$	$0.368\pm0.030^{2)3)}$	$13.25\pm2.02^{1)4)}$	$13.15\pm0.45^{4)}$
PS 20 组	8	$333.58\pm13.67^{4)}$	$235.94\pm66.22^{4)}$	$0.516\pm0.069^{4)}$	$10.87\pm2.27^{4)}$	$12.05\pm1.25^{4)}$
PS 10 组	7	325.06 ± 7.65	$231.55\pm53.62^{4)}$	$0.534\pm0.092^{4)}$	$9.56\pm1.48^{2)4)}$	$11.79\pm0.76^{2)4)}$

注:与假手术组相比, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$;与模型组相比, $^{3)}P<0.05$, $^{4)}P<0.01$

Note: Compared with sham group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; compared with model group, $^{3)}P<0.05$, $^{4)}P<0.01$

3.4 电镜观察

假手术组细胞形态正常,核仁清楚,核模完整且神经细胞及毛细血管周围间隙正常,间质无

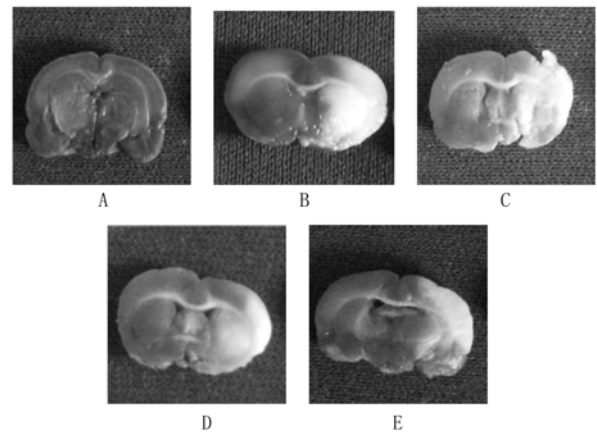


图 1 脑组织切片 TTC 染色结果

A-假手术组; B-模型组; C-PS 40 组; D-PS 20 组; E-PS 10 组

Fig 1 Results of the TTC staining in brain tissue slices

A-sham group; B-model group; C-PS 40 group; D-PS 20 group; E-PS 10 group

与假手术组相比,模型组中的 SOD、GSH-PX、CAT 的活力水平明显降低($P<0.01$),而 MDA 和 NO 的含量明显增加($P<0.01$);与模型组相比,各给药组 SOD、GSH-PX、CAT 的活力水平明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 MDA 和 NO 的含量明显减少($P<0.01$);与假手术组相比,PS 20 和 PS 10 组的 SOD、GSH-PX、CAT 的活力水平差异均无统计学意义,PS 40 组的 SOD 和 GSH-PX 活力增强,其中 SOD 的活力差异具有统计学意义($P<0.01$),但 CAT 的活力则出现显著下降($P<0.01$);与假手术组相比,PS 40 组的 MDA 和 NO 的含量有所增加,其中 MDA 含量差异具有统计学意义($P<0.05$),PS 20 和 PS10 组的 MDA 和 NO 的含量有所下降,其中 PS 10 组的 MDA 和 NO 的含量与假手术相比则差异具有统计学意义($P<0.01$),结果见表 2。

隙增宽,在皮层和纹状体可见大量死亡神经元;给药组神经细胞及毛细血管周围间隙稍大,但明显小于缺血模型组,皮质及间质水肿也轻于模型组;各给药组间比较发现,PS 40 组的神经细胞及毛细血管周围间隙和皮质及间质水肿均大于 PS 20 组和 PS10 组。结果见图 2。

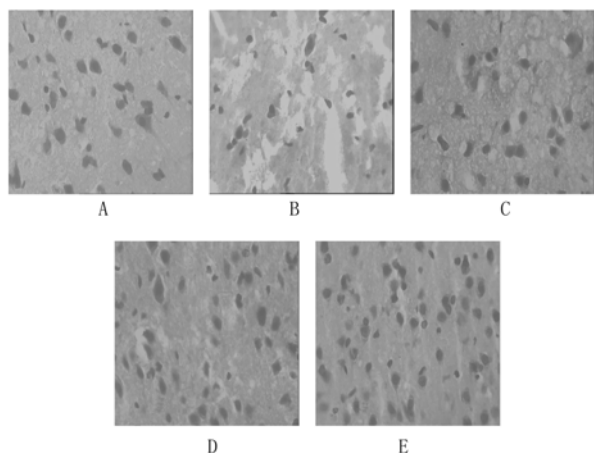


图 2 HE 染色结果图(200×)

A-假手术组; B-模型组; C-PS 40 组; D-PS 20 组; E-PS 10 组

Fig 2 Result of HE staining(200×)

A-sham group; B-model group; C-PS 40 group; D-PS 20 group; E-PS 10 group

4 讨论

大量临床和实验资料表明,在缺血再灌注损伤过程中,氧自由基的形成和脂质过氧化的增加是加重脑细胞损伤的主要病理作用。在正常情况下,体内会产生少量的自由基,同时也存在消除它们的酶如 SOD、CAT、GSH-PX,使得体内自由基的产生与消除处于动态平衡状态。缺血再灌注时这种平衡被打破,自由基的大量堆积对脑组织产生毒性作用,它们对脑内蛋白质、脂肪、核酸均产生攻击,造成组织器官结构损伤和功能障碍。目前临床上用于清除自由基和脂质过氧化抑制剂有 VitE、VitC、GSH、MLT、rt-PA、Edaravone、SOD 等,试验发现均可减轻缺血^[8-13],特别是再灌注后的脑损伤。随着细胞生物学和分子生物学的发展,人们对疾病的认识已经从细胞水平深入到分子水平,越来越多的蛋白质或多肽类大分子物质被应用于临床多种疾病的治疗,但存在诸多限制。而近年来 PTD 介导的转导技术的发展为多肽、蛋白质类生物大分子药物透过生物屏障进行疾病治疗开辟了广阔前景^[14-16]。

脑缺血损伤再灌注时自由基大量产生,发生难以中断的链式反应,攻击生物膜中的不饱和脂

肪酸引发脂质过氧化,并产生脂质过氧化产物 MDA。因此测定 MDA 能很好反映脑组织中自由基的含量和脂质过氧化的程度。NO 是一类具有自由基性质的分子,它在脑缺血损伤过程中参与不同的环节发挥着神经保护或是损伤的双重作用。NO 是以精氨酸为底物,在 NOS 催化下产生。NOS 分别有 nNOS、eNOS 和 iNOS 三个亚型。一般源于 nNOS 和 iNOS 过度表达所产生的 NO 具有神经毒性,而源于 eNOS 所产生的 NO 却有神经保护作用^[17]。抗氧化酶类是体内最重要的对抗自由基氧化损伤的防御系统,主要包括 SOD、过氧化氢酶(CAT)和 GSH-PX,其中 SOD 是体内对抗自由基的第一道防线,也是最重要的抗氧化酶。SOD 可催化超氧自由基发生歧化反应,生成过氧化氢和氧,在生物体内能够清除氧自由基,保护生物体免受自由基的攻击。SOD 活力的高低,间接反应了机体清除氧自由基的能力。有研究表明,脑内 SOD 水平与 MDA 水平变化有一定的时间规律,它们的含量存在负性相关性。体内的 SOD 水平也间接的影响了其它抗氧化酶如 GSH-PX、CAT 的氧化能力。本实验研究表明,各剂量组脑内的 SOD、GSH-PX、CAT 含量都较模型组和正常组有所提高,而 MDA 含量有所回落,这提示外源性的 PTD-SOD 能改善脑缺血再灌注大鼠脑内的抗氧化水平,降低脑内脂质氧化物的产生。在缺血性脑损伤中,模型组的 NO 含量明显升高,而各剂量组可有效降低脑内 NO 水平,说明 PTD-SOD 能减轻 NO 在脑缺血损伤中的细胞毒性作用。口服灌胃 PTD-SOD 各剂量组大鼠的神经功能的恢复要明显优于模型组,且大脑的梗死面积也要小于模型组,说明 PTD-SOD 能有效的改善脑内细胞损伤程度,恢复神经功能。HE 染色的结果表明各 PTD-SOD 剂量组脑内细胞形态及间质消肿情况较模型组有一定程度的改善。本实验提示了 PTD-SOD 对缺血再灌注引起的脑损伤具有一定的保护能力,其作用机制可能与提高体内各抗氧化酶的活力,参与清除缺血时产生的自由基有关。

REFERENCES

- [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(2): 33-41.
- [2] TAKEMURA S, KAYAMA T, KUGE A, et al. Correlation between copper/zinc superoxide dismutase and the proliferation of neural stem cells in aging and following focal

- cerebral ischemia [J]. *J Neurosurg*, 2006, 104(1): 129-136.
- [3] BRLLKS H, LEBLEN B, VIVES E. Tat peptide-mediated cellular delivery: Back to basics [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(4): 559-577.
 - [4] XU C, ZHANG Y, JIANG H. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cell by fusion protein TAT-Zfx [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(3): 771-774.
 - [5] YOSHIKAWA T, SUGITA T, MUKAI Y, et al. Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus [J]. *J Mol Biol*, 2008, 380(5): 777-782.
 - [6] KILIC E, KILIC U, HERMANN D M. TAT fusion proteins against ischemic stroke: Current status and future perspectives [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 1716-1721.
 - [7] LONGA E I, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
 - [8] WANG X, PEN W J. The experimental studies of different dose of vitamin E on prevention of cerebral infarction [J]. *Heilongjiang Med Pharm (黑龙江医药科学)*, 2005, 28(5): 56-57.
 - [9] YU C L. Vitamin C research and new role [J]. *Jilin Med J (吉林医学)*, 2008, 29(21): 1924.
 - [10] QIU H B, MA M C, LIU J C, et al. Protective effects of L-glutathione on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Sci Tech Inn Her (科技创新导报)*, 2008(24): 11-12.
 - [11] HAN Y X, ZHANG S H, WANG X M, et al. Inhibition of mitochondria responsible for the anti-apoptotic effects of melatonin during ischemia reperfusion [J]. *J Zhejiang Univ Sci B(浙江大学学报: 自然科学版)*, 2006, 7(2): 142-147.
 - [12] YASUYUKI I, KAZUMI K, KENSAKU S, et al. Increasing number of stroke specialists should contribute to utilization of IV rt-PA: Results of questionnaires from 1466 hospitals in Japan [J]. *Neurol Sci*, 2009, 279(1/2): 1854-1856.
 - [13] TOYODA K, FUJII K, KAMOUCI M, et al. Free radical scavenger, edaravone, in stroke with internal carotid artery occlusion [J]. *Neurol Sci*, 2004, 221(1/2): 11-17.
 - [14] WADIA J S, DOWDY S F. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2005, 57(4): 579-596.
 - [15] SONG H Y, LEE J A, JU S M, et al. Topical transduction of superoxide dismutase mediated by HIV-1 Tat protein transduction domain ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)-induced inflammation in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(6): 1348-1357.
 - [16] HANSEN M, KILK K, LANGE U, et al. Predicting cell-penetrating peptides [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2008, 60(4/5): 572-579.
 - [17] SHU M, ZHANG J J, ZHANG D L, et al. Oxidative stress reaction on chronic cerebral ischemia injury in rats [J]. *Chin J Geriatr (中华老年医学杂志)*, 2004, 23(5): 348-349.

收稿日期: 2010-09-13