

[文章编号] 1671-587X(2010)04-0616-04

可分泌表达神经保护肽的重组慢病毒对闭合性脑损伤小鼠的神经保护作用

杨宇¹, 杨欣², 孙欣¹, 吴昊¹, 王全颖³, 杨广笑³, 吴江¹

(1. 吉林大学第一医院神经内科, 吉林 长春 130021; 2. 上海交通大学瑞金医院神经内科, 上海 200025;
3. 华广生物工程有限公司, 陕西 西安 710000)

[摘要] 目的: 通过滴鼻给药途径, 给予闭合性脑损伤小鼠可分泌表达神经保护肽 NAP 的重组慢病毒, 观察该重组病毒经鼻-脑通路对中枢神经系统的保护作用, 为携带可分泌表达 NAP 的重组慢病毒治疗神经系统退行性疾病提供理论依据。方法: 选用 8~12 周成年雄性昆明小鼠 54 只, 随机分为 4 组: 空白对照组 10 只 (Control 组)、重锤加害组 20 只 (CHI 组)、重组慢病毒 rLent/NT4-NAP 保护组 20 只 (rLent 组) 和重组慢病毒 rLent/GFP 组 4 只 (GFP 组)。观察各组小鼠的死亡率、神经功能损伤 (NSS) 评分、脑水肿含量和病理改变情况。应用共聚焦显微镜观测 GFP 组小鼠鼻黏膜、嗅神经和脑组织内绿色荧光表达情况。结果: rLent 组小鼠死亡率 (15%) 明显低于 CHI 组小鼠 (55%); rLent 组小鼠 NSS 评分在创伤后 1、3、5 和 7 d 均显著低于 CHI 组 ($P < 0.01$); rLent 组小鼠创伤后 24 h 的脑水肿含量明显低于 CHI 组 ($P < 0.01$); HE 染色显示 rLent 组小鼠病理改变明显轻于 CHI 组; GFP 组仅在鼻黏膜处可见呈条索样的绿色荧光, 而在嗅神经及大脑则未发现绿色荧光。结论: 分泌表达 NAP 的重组慢病毒可感染鼻黏膜细胞, 分泌表达的短肽 NAP 能够改善闭合性脑损伤小鼠的神经功能; 未加装分泌表达元件的重组慢病毒 rLent/GFP 仅能感染鼻黏膜细胞, 不能通过血脑屏障进入中枢神经系统。

[关键词] 神经保护肽 NAP; 慢病毒; 基因治疗; 闭合性脑损伤; 疾病模型, 动物

[中图分类号] R651 **[文献标志码]** A

Neuroprotective effect of lentiviral vector secreting neuroprotective peptide on closed head injury in mice

YANG Yu¹, YANG Xin², SUN Xin¹, WU Hao¹, WANG Quan-ying³, YANG Guang-xiao³, WU Jiang¹

(1. Department of Neurology, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Neurology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China;
3. Hua-Guang Biotechnology Co., Ltd, Xi'an 710000, China)

Abstract: Objective To observe the neuroprotective effect of lentiviral vector expressing and secreting neuroprotective peptide (NAP) on closed head injury in mice via nose-brain pathway and provide theoretical basis for treatment of neurodegeneration diseases by lentiviral vector secreting NAP. **Methods** 54 adult male Kunming mice were divided into four groups: control group ($n=10$), closed head injury group (CHI, $n=20$), rLent/NT4-NAP group (rLent, $n=20$), and rLent/GFP group (GFP, $n=4$). The mortality, NSS and brain edema in various groups were observed. The pathological changes in brain injury region of various groups stained by HE were observed. The expressions of GFP in nasal epithelium olfactory nerve and brain tissue in GFP group were detected

[收稿日期] 2010-05-14

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (30872721); 国家自然科学基金青年基金资助课题 (30801211); 高等学校博士学科点专项科研基金新教师基金资助课题 (200801831073)

[作者简介] 杨宇 (1977-), 女, 吉林省长春市人, 主治医师, 讲师, 医学博士, 主要从事神经退行性疾病的基因治疗。

[通信作者] 吴江 (Tel: 0431-88782763, E-mail: sjnkwjiang@sina.com)

under laser confocal microscope. **Results** The mortality of mice in rLent group (15%) was significantly lower than that in CHI group (55%). The NSS in rLent group were lower than those in CHI groups at 1, 3, 5 and 7 d after brain injury ($P < 0.01$). The percentage of H_2O in rLent group was lower than that in CHI group at 24 h after brain injury ($P < 0.01$). HE staining result showed that the pathological changes in rLent group were fewer than those in CHI group. There was significant GFP in the nasal epithelium, but no fluorescence in olfactory nerve and brain tissue. **Conclusion** The recombinant rLent/NT4-NAP could efficiently infect nasal epithelium *in vivo*. NAP provides significant neuroprotective effect from the complex array of injuries elicited by head trauma. The recombinant rLent/GFP could only infect nasal epithelium, but not go through blood-brain barrier (BBB) to central nervous system (CNS).

Key words: neuroprotective peptide NAP; lentiviral vector; gene therapy; closed head injury

闭合性脑损伤 (closed head injury, CHI) 被认为是散发型阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的高危因素之一。CHI 后的组织损伤会引起一系列的神经化学改变, 最终导致继发的短期/长期神经元以及其他中枢神经细胞永久不能恢复, 从而出现认知、情感、行为能力和警觉性的下降^[1]。目前尚无特异的延缓脑损伤患者神经功能损害的药物, 因此寻找和开发神经保护药物来阻止损伤后的细胞死亡是非常重要的。神经保护短肽 NAP 是活性依赖性神经保护蛋白 (activity dependent neuroprotective peptide, ADNP) 上的一段 8 肽 (NAPVSIPQ), 具有很强的神经保护作用。应用 NAP 滴鼻治疗 AD 的二期临床试验中证实, NAP 可以改善中度认知障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 的记忆力减退, 因此 NAP 非常有希望成为治疗 AD 等神经系统退行性疾病的候选药物之一^[2]。本实验在成功构建能够分泌表达 NAP 的重组慢病毒的基础上^[3], 通过滴鼻给药途径, 观察重组病毒对 CHI 小鼠的神经保护作用, 为重组慢病毒 rLent/NT4-NAP 用于 AD 的基因治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

8~12 周成年昆明小鼠 54 只, 雄性, 体质量 25~30 g (第四军医大动物实验中心提供)、rLent/NT4-NAP 重组慢病毒及 rLent/EGFP 重组慢病毒 (本文作者构建, 吉林大学第一医院神经内科实验室保存)、立体定位装置、液氮、冰冻切片机、共聚焦显微镜等。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 取 8~12 周成年昆明小鼠 54 只, 随机分为 4 组: 空白对照组 10 只 (Control 组)、重锤加害组 20 只 (CHI 组)、rLent/NT4-

NAP 保护组 20 只 (rLent 组) 和 rLent/GFP 组 4 只 (GFP 组)。

1.2.2 给药途径和方法 将 rLent 组和 GFP 组小鼠分别用 rLent/NT4-NAP 和 rLent/EGFP 10 μ L (10 μ g) 滴鼻, 每天 1 次, 连续 5 d。对照组和 CHI 组给药生理盐水 (10 μ g) 滴鼻。

1.2.3 模型制备 滴鼻后恢复 3 d, 除 rLent/GFP 组小鼠外, 将其余各组小鼠固定于立体定位装置, 用 14 g 砝码自 30 cm 处自由落体砸在小鼠左侧大脑半球。

1.3 观察指标

1.3.1 神经功能损伤 (neurological severity score, NSS) 评分 于创伤后 1 h、1 d、3 d、5 d 和 7 d 通过 NSS 评分观察小鼠行为学改变。NSS 评分标准见表 1, 最大值=10 (所有实验均失败)、最小值=0 (所有实验均成功)。

表 1 NSS 评分标准

Tab. 1 Reference of neurological severity score

Task	NSS
Presence of mono- or hemiparesis	1
Inability to walk on 3-cm-wide beam	1
Inability to walk on 2-cm-wide beam	1
Inability to walk on 1-cm-wide beam	1
Inability to balance on 0.5-cm-wide beam	1
Inability to balance on 0.5-cm-diameter round stick	1
Failure to exit 30-cm circle within 2 min	1
Inability to walk straight	1
Loss of startle reflex	1
Loss of seeking behavior	1
Maximum total	10

1.3.2 检测脑水肿含量 于创伤后 24 h 分别取 NSS 评分较一致的 CHI 小鼠 3 只、rLent 组小鼠 3 只和对照组小鼠 2 只。经颈断处死后取脑, 取左侧受损组织及右侧相对的组织, 分别记录干燥前、

后的重量。100℃干燥 24 h。水肿量用 $H_2O\%$ 表示, $H_2O\% = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$ 。

1.3.3 形态学改变 分别于 24 和 72 h 时取 NSS 评分较一致的 CHI 小鼠、rLent 组小鼠和对照组小鼠各 2 只, 经颈断处死后取脑, 做普通病理 HE 染色; 分别于 72 h 和 14 d 取 rLent/GFP 组小鼠各 2 只, 分别取鼻黏膜、嗅神经及大脑做冰冻病理切片, 在荧光显微镜下观察并摄影。

1.4 统计学分析

应用 SPSS11.5 统计学软件进行处理, NSS 评分和脑水肿含量以 $\bar{x} \pm s$ 表示。死亡率各组间比较采用单因素方差分析, NSS 评分和脑水肿含量成组数据的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠死亡率比较

重垂砸伤小鼠后, 小鼠均出现呼吸不规律(潮式呼吸或呼吸急促), 有些伴有全身抽搐, 但 rLent 组较 CHI 组小鼠恢复快(rLent 组约 2 min 呼吸恢复正常, 而 CHI 组约需 5 min 恢复)。CHI 组死亡率(55%)明显高于 rLent 组(15%)和对照组(0%)。

2.2 各组小鼠 NSS 评分比较

分别于创伤后 1 h、1 d、3 d、5 d 和 7 d 通过 NSS 评分观察小鼠行为学改变。发现 CHI 组小鼠的行为能力、平衡和警觉性比 rLent 组小鼠明显下降, rLent 组小鼠 NSS 评分在 1、3、5 和 7 d 均显著低于 CHI 组 ($P < 0.01$), 见图 1。

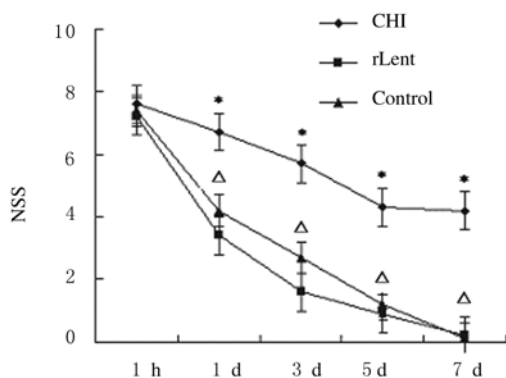


图 1 各组小鼠 NSS 评分比较

Fig. 1 Comparison of NSS between various groups

* $P < 0.01$ compared with control group; Δ $P < 0.01$ compared with CHI group.

2.3 各组小鼠脑水肿含量比较

rLent 组小鼠创伤后 24 h 脑水肿含量 ($80.3\% \pm 0.5\%$) 明显低于 CHI 组 ($83.8\% \pm 0.8\%$) ($P < 0.01$)。

2.4 各组小鼠病理改变结果

HE 染色结果显示: CHI 组小鼠在 24 h 有明显的细胞水肿, 在 72 h 可见炎性细胞浸润, 而对照组和 rLent 组则改变明显减轻, 见图 2 (封二)。

2.5 报告病毒在小鼠体内的表达情况

在共聚焦荧光显微镜 ($150 \mu\text{m}$) 下观察发现: GFP 组小鼠鼻黏膜处有条索样的绿色荧光, 而在嗅神经及大脑则未发现荧光, 见图 3 (封二)。

3 讨论

1996 年 Chen 等开始应用小鼠制作 CHI 的动物模型, 实验发现小鼠轻微 CHI 损伤后的认知功能障碍与人类 CHI 的情况一致。而且很轻微的 CHI 都可以引起神经元的损伤和凋亡, 以至于 CHI 后存在长期的认知和运动障碍^[4]。还有研究^[5]发现: CHI 的远期后遗症主要是由于广泛轴突损伤所造成的, 弥散性轴索损伤会导致严重的认知功能障碍和运动性残疾。目前已知 CHI 可导致拳击运动员痴呆, 而且 CHI 可以增加 AD 的易感性, 提示 CHI 是 AD 发病的最重要环境因素。流行病学研究^[6]也提示: CHI 损伤越严重, 其发生 AD 机率越大。人们在受到轻微颅脑外伤时经常被诊断为脑震荡, 虽然这些患者没有明确的脑组织受损, 但可以出现一个长期的行为和认知功能障碍, 这很可能是因为 CHI 后患者出现了神经元的凋亡和坏死^[7]。Wang 等^[8]发现: 在重锤加害前脑组织匀浆中没有 $A\beta_{42}$ 表达, 然而, 在加害后 24 h 可明显看到 $A\beta_{42}$ 的表达。在 CHI 猪模型中人们也发现轴索损伤和 β -APP 高表达, 研究结果显示: 反复的 CHI 会加重转基因小鼠脑内的 $A\beta$ 的沉积, 产生更多的不可溶性 $A\beta_{42}$, 引起氧化应激反应, 而这正是导致 AD 发生发展的重要因素^[9]。

自脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、神经营养素 3 (neurotrophin-3, NT3) 和神经营养素 4 (neurotrophin-4, NT4) 等神经营养因子被发现以来, 提高神经营养因子的脑内含量达到增强神经细胞自身对抗 $A\beta$ 毒性的能力, 是 AD 治疗的另一重要策略。神经保护短肽 NAP 在小于 1 fmol 的水平

即可保护神经元对抗由河豚毒素, β 淀粉样肽, N-甲基-D-天冬氨酸 (N-Methyl-D-aspartate, NMDA) 以及 GP120 等的细胞毒害作用, NAP 能够改善 AD 转基因小鼠的神经功能^[10-11]。因此神经保护短肽 NAP 有望用于神经系统退行性疾病治疗^[12]。但由于 NAP 短肽临床应用存在着价格昂贵和反复多次给药等问题, 本文作者前期通过基因重组的方法, 在体外通过大肠杆菌大量分泌表达了 NAP 肽, 表达的蛋白可明显促进鸡胚背根神经节轴突的生长^[13]; 构建了分泌表达 NAP 的重组慢病毒, 结果显示其对 APP^{sw} 转基因 AD 细胞模型起到很好的保护作用^[14]。

本研究采用重锤加害法制备了小鼠 CHI 模型, 并经滴鼻给予 CHI 小鼠重组慢病毒, 结果提示: 携带可分泌表达 NAP 的重组慢病毒能够减轻脑损伤导致的脑水肿, 改善神经功能, 降低小鼠的死亡率。本研究中重组慢病毒通过感染鼻黏膜细胞, 在外周鼻黏膜细胞内表达融合基因 NT4-NAP; 由于融合基因设计有信号肽和引导肽, 所以被重组病毒感染的鼻黏膜细胞能够将 NAP 肽分泌至细胞外, 这就相当于长期持续的通过滴鼻给予短肽; 本研究已证明鼻黏膜分泌表达的 NAP 肽能够顺利进入中枢神经系统, 对 CHI 起到神经保护作用, 说明通过鼻黏膜-脑通路给药的可行性。滴鼻给予昆明小鼠报告病毒 rLent/GFP, 3 d 后即发现鼻黏膜细胞内有绿色荧光蛋白表达, 但 14 d 后在脑内仍未见绿色荧光蛋白表达, 说明重组慢病毒能够感染鼻黏膜细胞, 但不能通过嗅神经通路入脑, 验证了慢病毒载体在中枢神经系统疾病中应用的安全性。本研究实现了通过经鼻外周给药, 以鼻黏膜细胞为加工厂长期分泌 NAP 的策略, 为神经保护肽 NAP 在临床中的应用提供了可靠的技术手段。

[参考文献]

- [1] Milman A, Rosenberg R, Weizman R, et al, Mild traumatic brain injury induced persistent cognitive deficits and behavioral disturbances in mice [J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22 (9): 214-219.
- [2] Gozes I, Stewart A, Morimoto B, Addressing Alzheimer's disease tangles: from NAP to AL-108 [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2009, 6 (5): 455-460.
- [3] 杨宇, 吴江, 杨欣. 分泌表达神经保护短肽重组慢病毒对 SK-N-SH 细胞的保护作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27 (3): 213-216.
- [4] Pan W, Kastin AJ, Rigai T, et al, Increased hippocampal intake of tumor necrosis factor α and behavioral changes in mice [J]. *Exp Brain Res*, 2003, 14 (9): 195-199.
- [5] Babikian T, Freier MC, Tong KA, et al, Susceptibility weighted imaging: neuropsychologic outcome and pediatric head injury [J]. *Pediatr Neurol*, 2005, 33 (3): 184-194.
- [6] Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, et al, Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias [J]. *Neurology*, 2000, 55 (8): 1158-1166.
- [7] Tashlykov V, Katz Y, Gazit V, et al, Apoptotic changes in the cortex and hippocampus following minimal brain trauma in mice [J]. *Brain Res*, 2007, 1130 (1): 197-205.
- [8] Wang H, Durham L, Dawson H, et al. An apolipoprotein E-based therapeutic improves outcome and reduces Alzheimer's disease pathology following closed head injury: evidence of pharmacogenomic interaction [J]. *Neuroscience*, 2007, 144 (4): 1324-1333.
- [9] Friess SH, Ichord RN, Owens K, et al., Neurobehavioral functional deficits following closed head injury in the neonatal pig [J]. *Exp Neurol*, 2007, 204 (1): 234-243.
- [10] Bassan M, Zamostiano R, Davidson A, et al, Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide [J]. *J Neurochem*, 1999, 72 (3): 1283-1293.
- [11] Fernandez-Montesinos R, Torres M, Baglietto-Vargas D. Activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) expression in the amyloid precursor protein/presenilin 1 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2009 Oct 21. [Epub ahead of print]
- [12] Teuchner B, Dimmer A, Humpel C, et al, VIP, PACAP-38, BDNF and ADNP in NMDA-induced excitotoxicity in the rat retina [J]. 2010 Jan 8. [Epub ahead of print]
- [13] 杨宇, 吴江, 杨欣, 等. NT4-NAP 融合基因原核表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达 [J]. *中华神经科杂志*, 2004, 37 (3): 260-261.
- [14] 杨宇, 吴江, 杨欣, 等. 携强绿色荧光蛋白重组慢病毒的构建及其在原代培养 SD 大鼠皮层神经细胞中的表达 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2007, 33 (2): 237-240.