

重组人源 Kunitz 型蛋白酶抑制剂治疗大鼠 脑皮质缺血/再灌注损伤

孙晓杰, 郭宝锋, 王冰*

(吉林大学中日联谊医院整形外科, 长春 130021)

【摘要】 目的 旨在研究人源重组丝氨酸蛋白酶抑制剂 rhKD/APP 治疗大鼠脑皮质缺血/再灌注损伤的临床前景。**方法** 构建大鼠大脑中动脉(MCAO)局灶性脑缺血/再灌注(I/R)的动物模型,分别用三个剂量 rhKD/APP(4、8、16 mg/kg)的干预进行临床治疗,设神经保护药物尼莫地平治疗作为阳性对照,各干预治疗组分别进行临床评分、神经病理损伤、脑水肿程度的评估和比较,评价 rhKD/APP 在大鼠脑缺血/再灌注神经保护的临床疗效。同时,分组检测缺血/再灌注脑皮质的自由基氧化程度的三个指标(抗氧化酶 SOD 活性、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性、膜脂过氧化产物丙二醇 MDA 含量)、反映中性粒细胞呼吸爆发的髓过氧化物酶 MPO 活性、血管内皮表达粘附因子 ICAM-1 和 E-selectin 的表达水平以及损伤区神经元凋亡的状况。**结果** 低、中、高剂量组 rhKD/APP 干预均能改善脑缺血/再灌注损伤大鼠的临床症状、脑水肿和神经病理损伤,且呈一定量效关系。与缺血/再灌注模型组大鼠比较,各个剂量的 rhKD/APP 干预均能提高损伤区脑组织抗氧化酶 SOD 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性,降低丙二醇 MDA 含量,降低髓过氧化物酶 MPO 活性,下调粘附因子 ICAM-1 和 E-selectin 的表达,拮抗受损神经元的凋亡。与尼莫地平治疗组比较,在降低 MPO 活性上,三个剂量 rhKD/APP 均显示出显著优势($P < 0.05$)。其余各个检测指标, rhKD/APP 干预组与尼莫地平治疗组之间比较,差异无显著性。**结论** 重组人源 rhKD/APP 丝氨酸蛋白酶抑制剂能够对大鼠脑缺血/再灌注神经损伤发挥保护作用,这些保护作用可能通过清除自由基、抑制中性粒细胞激活和炎性损伤,拮抗神经元凋亡等多层面综合完成。因此,人源 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂可成为一个潜在的神经保护药物。

【关键词】 神经保护药物;人重组丝氨酸蛋白酶抑制剂;脑缺血/再灌注损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 03-0378-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.017

An *in vivo* study of neural protective effect of recombinant human KD/APP on rats with cerebral ischemia/reperfusion injury

SUN Xiaojie, GUO Baofeng, WANG Bing*

(Department of Plastic Surgery, the China-Japan friendship Hospital of Jilin University,
Changchun 130021, China)

Corresponding author: WANG Bing. E-mail: 5021395@qq.com

【Abstract】 Objective The amyloid β -protein precursor contains a domain highly homologous to Kunitz-type serine protease inhibitors. We have successfully established and characterized the recombinant human rhKD/APP *in vitro*. The aim of this study is to investigate the potential neuroprotective role of rhKD/APP on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Methods** Rats pretreated with rhKD/APP (4, 8, 16 mg/kg) were subjected to prepare models of cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury and those rats treated with Nimodipine were used as positive control. Comparison of the scores of neurological deficits, TTC-stained infarct volume and cerebral water content between the groups was performed.

【基金项目】 国家自然科学基金项目(No. 81371384)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (No. 81371384).

【作者简介】 孙晓杰(1976—)女,博士研究生,研究方向:皮肤再生的细胞生物学机制。Email:43538563@qq.com

【通信作者】 王冰(1964—)女,副主任医师。Email:50213995@qq.com

The activities of SOD, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and the content of MDA in the cortex tissues were measured and the activities of serum myeloperoxidase (MPO) enzyme were also compared. The expressions of adhesion molecules (ICAM-1 and E-selectin) were compared by immunohistochemistry. End-labeling of nuclear DNA fragmentation (TUNEL) and qualification of caspase-3, Bcl-2 and Bax were also employed to evaluate the local apoptosis in cortex tissues. **Results** By pretreatment with the rhKD/APP at three doses, cerebral infarct volume, water content and neurological deficits were all reduced. The activities of SOD, and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ were increased, the contents of MDA were decreased in the cortex tissues, and the serum MPO activity was reduced. The expressions of adhesion molecules were downregulated and the apoptotic signaling of neurons were inhibited. All the changes induced by rhKD/APP treatment in the ischemia/reperfusion injury models showed statistical significance compared with the control rats. However, no significant difference was shown between the rhKD/APP group and Nimodipine group excepted for the reduced MPO in sera. **Conclusions** The result of this study suggest that rhKD/APP has neuroprotective effect on the cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting multiple signaling pathways and is promising to be a potential neuroprotective drug.

[Key words] neuroprotective drug; recombinant human KD/APP; cerebral ischemia/reperfusion(I/R) injury

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

牛胰蛋白酶抑制剂 (bovine pancreatic trypsin inhibitor) BPTI 作为 Kunitz 属丝氨酸蛋白酶抑制剂,是目前研究的最广泛的蛋白酶抑制剂之一^[1]。人 $\text{A}\beta$ 淀粉样蛋白前体 (APP) 包含的一段 57 个氨基酸序列结构,与 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂家族高度同源^[2]。我们前期利用同源重组技术制备了人源丝氨酸蛋白酶抑制剂 (rhKD/APP),并在体外研究了它的三级结构、空间构象和活性中心,证实了它的丝氨酸蛋白酶的抑制功能活性^[3]。缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤是指机体器官缺血一定时间后再恢复血液灌注,组织损伤反而进行性加重的病理生理学现象,其中,保护神经元缺血/再灌注损伤,是缺血性脑血管病挽救半暗带神经功能的核心要素。既往研究显示, BPTI 能通过降低脑细胞水肿^[4],保护血脑屏障,发挥明确的神经保护作用^[5-6]。然而,作为从牛肺中提纯的碱性蛋白酶,异体蛋白 BPTI 具有高抗原性^[7]。本研究旨在大鼠脑缺血/再灌注动物模型上,探索人源重组丝氨酸蛋白酶抑制剂 rhKD/APP 治疗缺血/再灌注损伤的临床效果和潜在分子调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

2~3 月龄清洁级 Sprage-Dawley (SD) 大鼠 60 只,雄性,体重 270~300 g,来源于吉林大学实验动物部【SCXK(吉)2015-0001】,无菌手术在吉林大学实验动物科学部动物实验室进行【SYXK(吉)2015-0001】。饲养期间给予大鼠标准饲料和洁净

饮用水,饲养环境:昼夜各半节律,湿度恒定,所有操作均符合实验动物伦理学要求。

1.1.2 实验试剂

rhKD/APP (吉林大学药学院贺巾超博士惠赠),尼莫地平针剂 (Bayer, 德国),氯化三苯基四氮唑 (TTC) (北京化学试剂厂),SOD 测定试剂盒 (Sigma, 美国), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性试剂盒 (Sigma, 美国),MDA 检测试剂盒 (Sigma, 美国),MPO 测定试剂盒 (南京建成生物公司),TUNEL 检测试剂盒 (宝灵曼,德国),ICAM-1 单抗、E-selectin 多抗、caspase-3 免疫组化、Bcl-2 和 Bax 的 western blot 试剂盒,均购置 Santa Cruz,美国。

1.2 方法

1.2.1 大脑缺血/再灌注大鼠模型的构建和评估

参照 Zealanga 线栓法制备大鼠右侧脑中动脉阻断 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 的局灶脑缺血/再灌注模型,神经功能缺损用双盲法进行评分。取 60 只大鼠随机均分为 6 组,每组 10 只。3 个干预组分别为低剂量干预组 (rhKD/APP, 4 mg/kg);中剂量干预组 (rhKD/APP, 8 mg/kg);高剂量干预组 (rhKD/APP, 16 mg/kg);尼莫地平治疗组 (Nimodipine, 0.7 mg/kg 腹腔注射)为阳性对照;同时设置 MCAO 缺血/再灌注模型组作为阴性对照,伪手术组作为空白对照。

1.2.2 病理学评估

取缺血 3 h 再灌注 24 h 大鼠,麻醉牺牲后取脑。常规苏木素-伊红 (H&E) 染色进行病理评估。冠状逐片切取脑片进行 TTC 磷酸缓冲液染色,评估脑片梗死面积。染色前后称湿重和干重,计算脑片含水量。

1.2.3 自由基链、中性粒细胞酶 MPO 以及粘附因子表达的分组检测

制备 5% 脑组织匀浆,分别检测反映经典自由基激活程度的三个指标超氧化物歧化酶(SOD)活性、Na⁺-K⁺-ATP 酶活性、膜氧代谢产物丙二醇(MDA)含量,以及反映中性粒细胞激活程度的髓过氧化物酶(MPO)活性。脑片常规固定,免疫组化试剂盒检测脑片 ICAM-1 和 E-selectin 表达。所有检测均根据试剂盒说明书操作。

1.2.4 神经细胞的凋亡评估

常规制备缺血/再灌注石蜡切片,计数 TUNEL 阳性细胞为凋亡细胞,图像分析计算凋亡细胞个数。caspase-3 的免疫组化检测在 4% 多聚甲醛处理的 30 μm 厚冠状切片上完成。脑组织冰上分离即刻制备匀浆,右侧损伤区为被检测区,对侧作为对照区,常规 Western blot 法检测 caspase-3、Bcl-2 以及 Bax 的蛋白表达。

1.3 统计学方法

所有的实验数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比

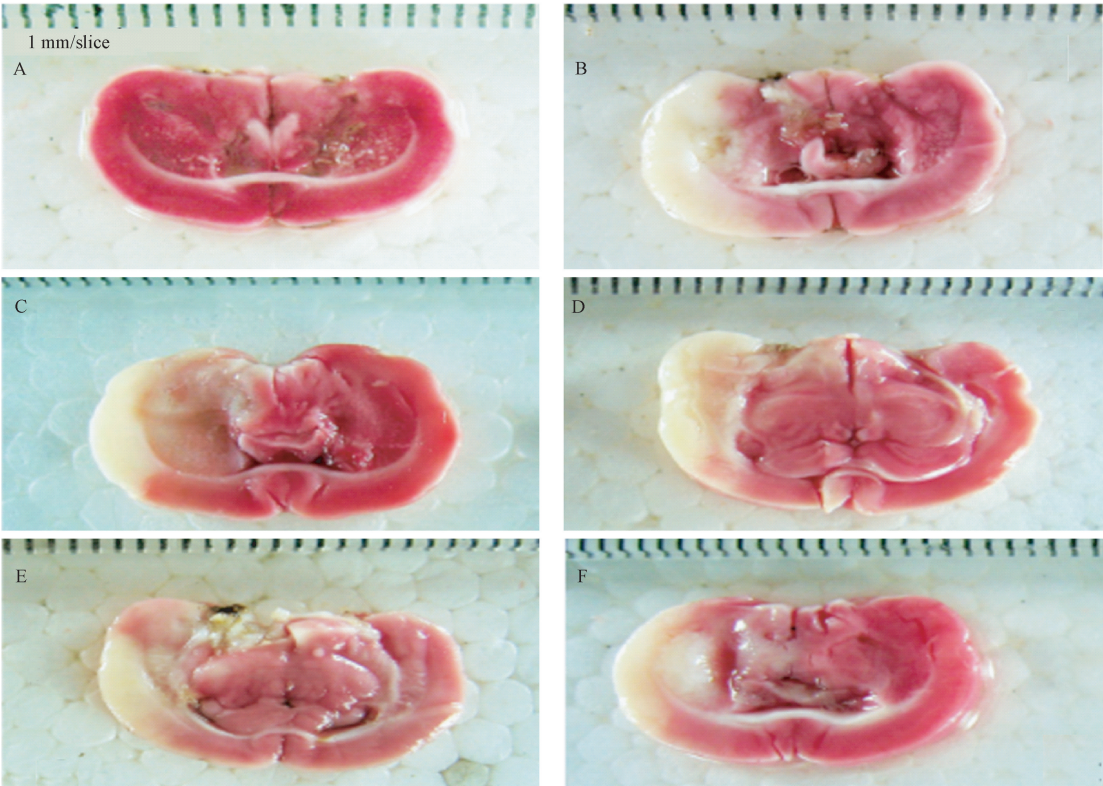
较用 Dunnet T 检验进行,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

各剂量 rhKD/APP 干预组的预处理,均能改善脑缺血/再灌注大鼠的神经缺损症状,降低脑梗死面积和脑水肿,且存在一定的剂量/效应相关性,此神经保护作用,可能通过清除自由基超载,拮抗炎性中性粒细胞呼吸爆炸,延迟神经元凋亡等综合实现。

2.1 rhKD/APP 干预的缺血/再灌注大鼠临床分组评估

缺血 3 h/再灌注 24 h 模型组大鼠的神经功能缺损明显,模型组评分为 (5.98 ± 1.00),低、中、高剂量组的神经功能缺损评分分别为 (1.80 ± 0.25)、(1.63 ± 0.05) 和 (1.30 ± 0.25) ($P < 0.05$)。与尼莫地平组 (1.92 ± 0.50) 比较,组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。模型组死亡率达 26.5%,低、中、高剂量干预组的死亡率分别为 18.5%、16.7% 和 14.0% ($P < 0.05$),但与尼莫地平组 (18.2%) 比较,组间



注:A. 假手术组;B. 缺血/再灌注模型组;C. rhKD/A PP 低剂量干预组(4 mg/kg);D. rhKD/APP 中剂量干预组(8 mg/kg);E. rhKD/APP 高剂量干预组(16 mg/kg);F. 尼莫地平组。

图 1 各组缺血/再灌注大鼠脑片的 TTC 染色结果

Note. A. Sham group. B. I/R reperfusion group. C. rhKD/APP (4 mg/kg) treatment group. D. rhKD/APP (8 mg/kg) treatment group. E. rhKD/APP (16 mg/kg) treatment group. F. Nimodipine group.

Fig.1 Representative TTC-staining results in the cerebral cortex tissues of rats with ischemia/reperfusion injury

差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 rhKD/APP 干预的大鼠脑缺血/再灌注脑皮质区病理改变和脑水肿的分组评估

缺血/再灌注右脑皮质中心可见脑梗死灶,周围出现半暗带区和脑水肿区。各个干预组和尼莫地平组大鼠,缺血中心区神经元坏死均减轻,半暗带区神经元数量均增多,周围细胞水肿均改善。经 TTC 染色的脑片梗死面积,低、中、高剂量干预组分别为(21.82 ± 2.96)、(20.43 ± 2.33)和(14.71 ± 3.12),与模型组(35.42 ± 2.21)比较均显著减少($P < 0.05$),但是与尼莫地平组(19.92 ± 3.47)比较,差异均无显著性($P > 0.05$)(图 1)。脑含水量定量检测结果的分组比较,与上述梗死面积的结果一致:低、中、高剂量干预组分别为(17.63 ± 1.54)、(13.52 ± 2.38)和(10.24 ± 1.42),与模型组(20.81 ± 2.37)比较显著降低($P < 0.05$),但是与尼莫地

平组(14.72 ± 2.54)比较差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 各组脑片氧自由基的指标和髓过氧化物酶活性水平

分组检测脑匀浆反映氧自由基活化程度的三个指标(SOD 活性、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性、MDA 含量)以及反映脑匀浆内中性粒细胞激活程度的髓过氧化物酶 MPO 活性,各组平均水平见表 1。其中,每活性单位 MPO 的意义为每毫克每小时脑匀浆 H_2O_2 在标准条件下被分解为 1 nmol/L 的酶活性。由表可见,三个干预组的中性粒细胞 MPO 酶活性降低,与 R/I 模型组比较,均呈现显著降低($P < 0.05$),而尼莫地平组 MPO 活性,与模型组比较差异无显著性($P > 0.05$)。与尼莫地平组比较,各个剂量 rhKD/APP 降低 MPO 活性的能力均有显著优势($P < 0.05$)。

表 1 脑匀浆 SOD、MDA、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、MPO 的分组表达($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Expression of SOD, MDA, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and MPO activity in the cerebral cortex tissues of the rhKD/APP-treated rats with I/R($\bar{x} \pm s$)				
组别 Groups	SOD (nU/mg)	MDA (nU/mg)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity (nmol/mg)	Enzymatic activity of MPO(nmol/mg·h)
模型组 Model	15.23 $\pm$ 2.16	1.653 $\pm$ 0.192	1.032 $\pm$ 0.160	0.92 $\pm$ 0.06
低剂量抑制剂组 rhKD/APP	16.87 $\pm$ 2.63	1.201 $\pm$ 0.183 *	1.056 $\pm$ 0.153	0.46 $\pm$ 0.03 **
中剂量抑制剂组 rhKD/APP	19.58 $\pm$ 3.31 *	1.119 $\pm$ 0.168 *	1.386 $\pm$ 0.201 *	0.31 $\pm$ 0.04 **
高剂量抑制剂组 rhKD/APP	22.93 $\pm$ 3.26 *	1.096 $\pm$ 0.110 *	1.776 $\pm$ 0.213 *	0.29 $\pm$ 0.03 **
尼莫地平治疗组 Nimodipine	16.86 $\pm$ 3.17	1.103 $\pm$ 0.168 *	1.060 $\pm$ 0.171	0.77 $\pm$ 0.05

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与尼莫地平比较,# $P < 0.05$ 。
Note. * $P < 0.05$, vs. the model group;# $P < 0.05$, vs the Nimodipine group.

2.4 各组脑片 ICAM-1 和 E-selectin 免疫组化表达

重组人源丝氨酸酶抑制剂干预组和尼莫地平治疗组 I/R 大鼠脑片的 ICAM-1/E-selectin 的阳性血管表达情况见图 2,本图选择中剂量组 rhKD/APP 抑制剂组和尼莫地平治疗组的表达比较。在表达 ICAM-1 的视野内,抑制剂组阳性血管数量略少,且细胞表达强度略弱;在表达 E-seletin 的视野内,抑制剂组的阳性血管数略少,但是表达强度和尼莫地平组并无差异。I/R 模型组表达 ICAM-1 和 E-selectin 阳性血管,每视野不低于 5 个(结果未显示)。

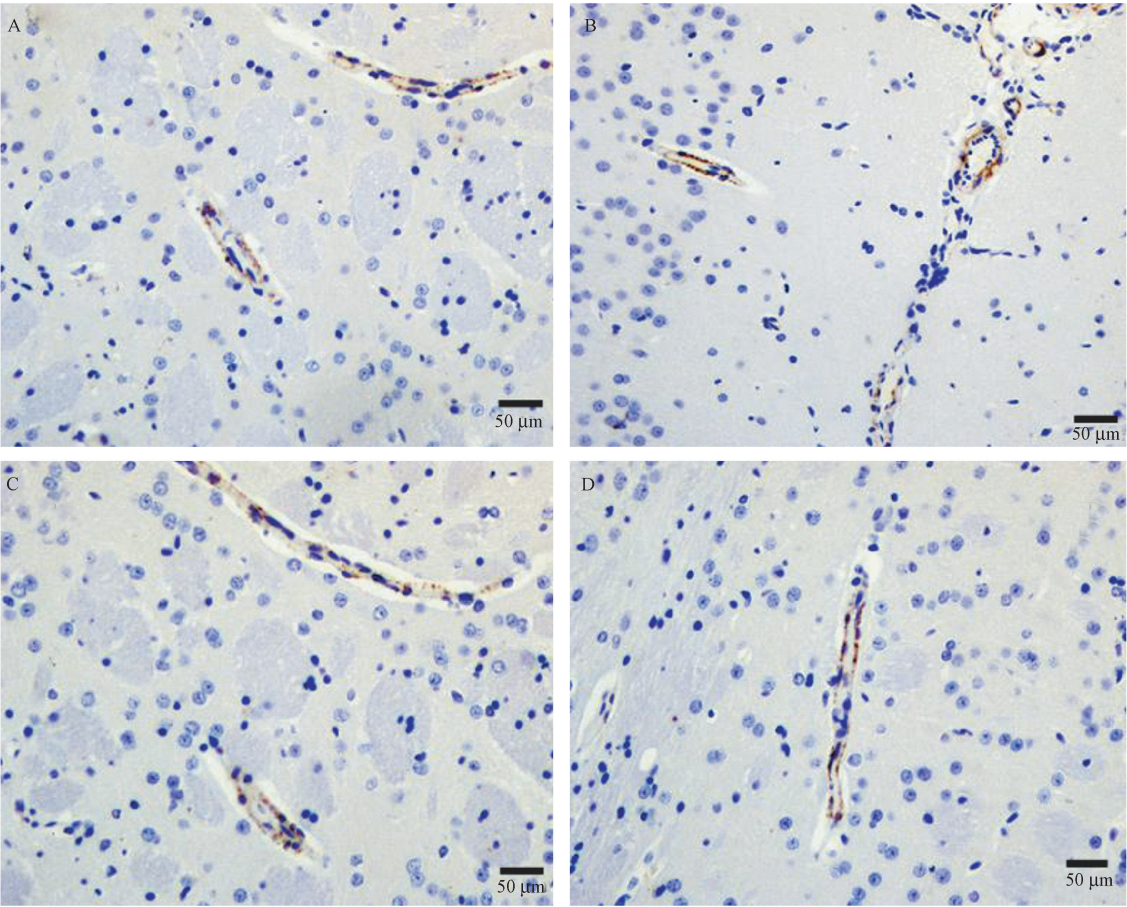
2.5 rhKD/APP 干预的大鼠缺血/再灌注神经细胞凋亡信号蛋白的分组表达

低、中、高剂量干预组大鼠脑组织 TUNEL 阳性细胞分别为(56.8 ± 3.6)、(33.2 ± 4.6)、(29.6 ± 2.1),尼莫地平组为(36.4 ± 4.3),与模型组(69.6 ± 4.6)相比,四组神经凋亡细胞均明显减少($P < 0.05$)。重组人源丝氨酸酶抑制剂干预组和尼莫

地平治疗组脑片 TUNEL 阳性细胞的表达结果见图 3,这里展示了中剂量组 rhKD/APP 和尼莫地平组的比较。展示的视野中,中剂量干预组凋亡细胞数量虽较尼莫地平组少,但局部脑组织的水肿程度略重。

重组人源丝氨酸酶抑制剂干预组和尼莫地平治疗组 I/R 大鼠脑片 caspase-3 的表达结果见图 4。这里展示的仍是中剂量组 rhKD/APP 干预组和尼莫地平组的比较。展示的视野中,中剂量干预组 caspase-3 阳性数量较尼莫地平组多,但表达强度降低,提示凋亡信号的复杂性。

为了进一步探索 caspase 依赖的凋亡信号的开启程度,对各组脑皮质凋亡蛋白进行定量检测(见图 5)。Western Blot 蛋白条带的数值化通过灰度分析进行,每个条带的定量结果均经各自内参配平,蛋白定量结果由在线软件分析后自动算出(Image J)。图 5 A 是 caspase-3 及其降解产物 P17 的表达条带。如图可见,伪手术组神经细胞内仅



注:A. rhKD/APP 干预组 ICAM-1 阳性表达; B. 尼莫地平组 ICAM-1 阳性表达; C. rhKD/APP 干预组 E-selectin 阳性表达; D. 尼莫地平组 E-selectin 阳性表达。

图 2 干预组和尼莫地平组脑片内皮细胞粘附因子 ICAM-1 与 E-selectin 的表达比较

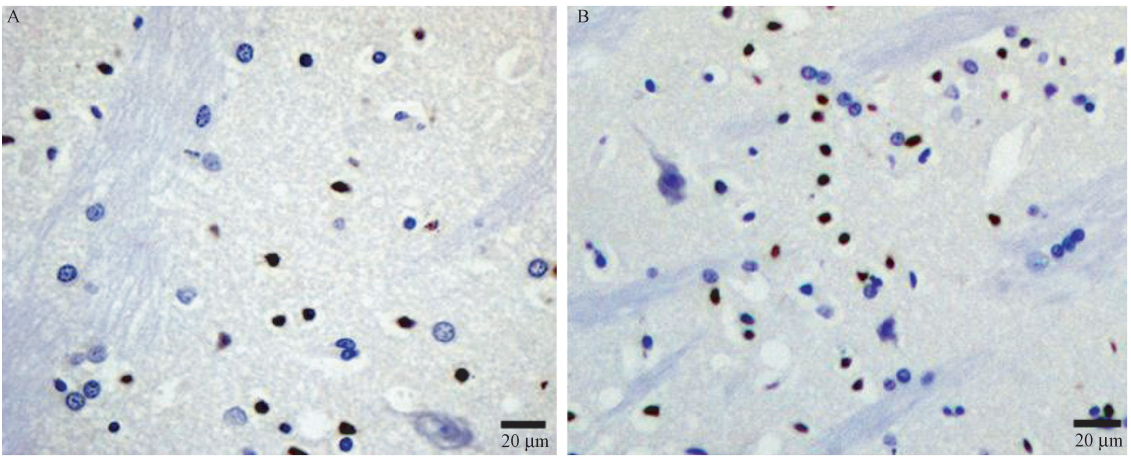
Note. A. Expression of ICAM-1 in the rhKD/APP group. B. Expression of ICAM-1 in the Nimodipine group. C. Expression of E-selectin in the rhKD/APP Group. D. Expression of E-selectin in the Nimodipine Group.

Fig. 2 Expression of ICAM-1 and E-selectin in the cerebral cortex tissues of rhKD/APP-treated rats with ischemia/reperfusion injury (Immunohistochemical staining)

表达未降解激活的 caspase-32 片段, I/R 模型组则可看到降解产物 P17 的高表达。中、高剂量干预和尼莫地平治疗后, P17 的表达减少, 说明神经细胞凋亡 caspase 降解信号得到了拮抗, 尼莫地平组和中、高剂量组之间 P17 的定量表达, 组间差异无显著性。图 5B 和 5C 分别为 Bcl-2 和 Bax 的定量表达水平, 无论 Bcl-2 还是 Bax 的表达, 尼莫地平组的表达量均与中剂量干预组的表达量接近, 然而, 尼莫地平治疗组和中、高剂量干预组比较, 三组间差异仍无显著性。综上, 伴随丝氨酸蛋白酶抑制剂治疗量的增加, caspase-P17 表达下调, Bcl-2/Bax 比值呈现同步上调变化, 这些凋亡蛋白在中、高剂量干预组与尼莫地平组的表达灰度, 组间差异无显著性。

3 讨论

本实验应用人源重组丝氨酸蛋白酶抑制剂 rhKD/APP 临床治疗大鼠脑缺血/再灌注的脑皮质神经损伤, 显示出良好的神经保护效应, 且有剂量-疗效相关性。缺血/再灌注损伤的神经元凋亡调控网络具有明确的雌激素依赖的性别差异^[8-9], 而丝氨酸蛋白酶抑制剂可广泛下调性激素蛋白受体的表达, 因此, 本研究仅选择雄鼠进行动物模型的制备, 以消除本底雌激素差异对研究结果的影响。丝氨酸蛋白酶抑制剂临床最广泛应用是调控凝血功能和炎症反应。脑缺血/再灌注损伤的机制则非常复杂, 至少涉及缺血期的氧化应激异常、自由基超载、钙超载, 以及再灌注期的中性粒细胞激活(呼吸爆发)等多个信号网络的交叉调控。结合上述两个方向, 本研

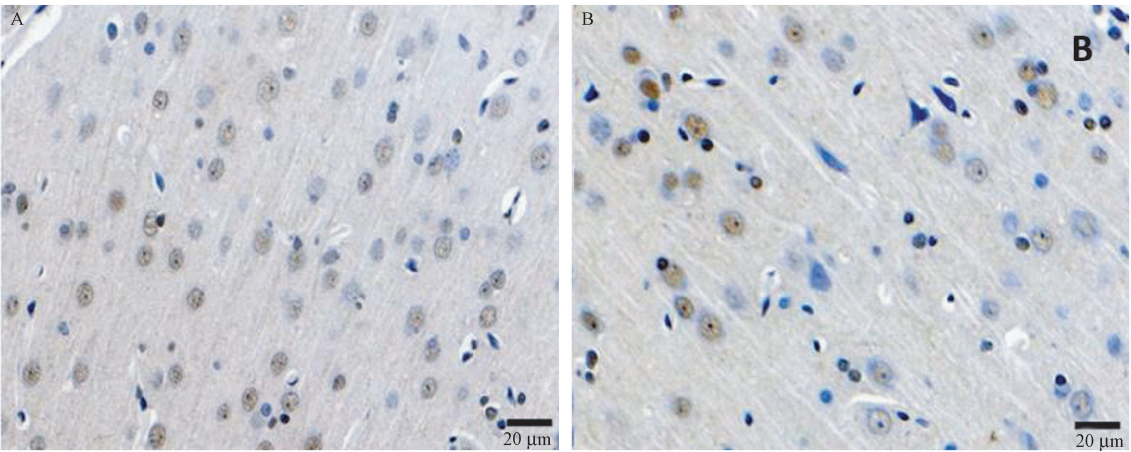


注:A. rhKD/APP 干预组 TUEL 阳性细胞;B. 尼莫地平组 TUEL 阳性细胞。

图 3 干预组与尼莫地平组大鼠脑片 TUNEL 阳性细胞表达比较

Note: A. TUNEL-positive cells in the rhKD/APP Group. B. TUNEL-positive cells in the Nimodipine group.

Fig.3 TUNEL-positive cells in the cerebral cortex tissues of rhKD/APP-treated rats with cerebral ischemia/reperfusion injury (Immunohistochemical staining)



注:A. rhKD/APP 干预组 caspase3 阳性表达细胞;B. 尼莫地平组 caspase3 阳性表达细胞。

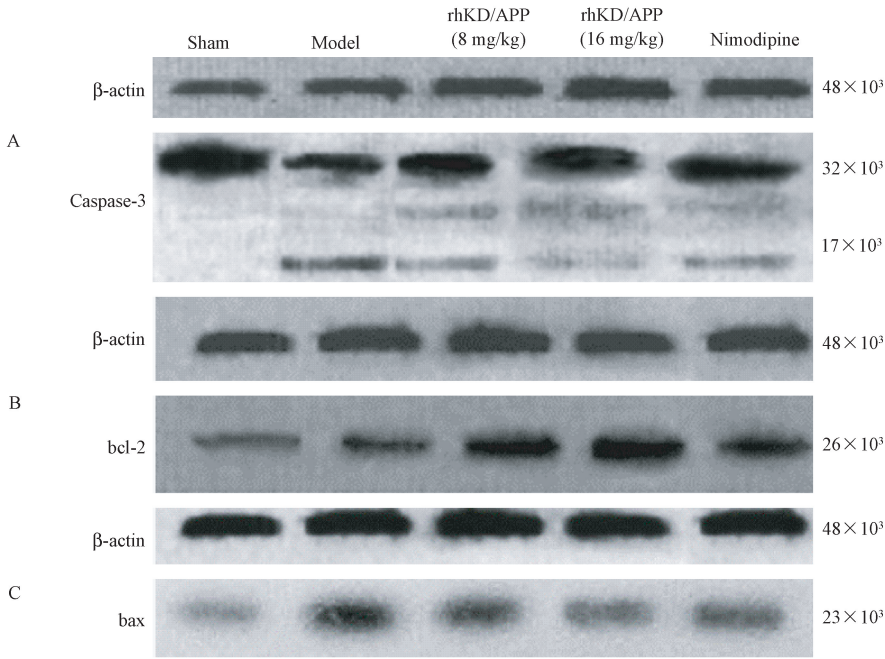
图 4 干预组与尼莫地平组大鼠脑片 Caspase-3 阳性细胞表达比较

Note: A. Caspase 3-positive cells in the rhKD/APP group. B. Caspase 3-positive cells in the Nimodipine group.

Fig.4 Caspase 3-positive cells in the cerebral cortex tissues of rhKD/APP-treated and Nimodipine-treated rats with ischemia/reperfusion injury (Immunohistochemical staining)

究选择了以拮抗钙超载为核心的经典神经保护药物尼莫地平为阳性对照,在神经细胞缺血/再灌注损伤的检测指标选择上,我们分别入选了针对缺血超早期的氧化应激和自由基超载指标,以及针对再灌注超早期的中性粒细胞激活指标 MPO 以及促进中性粒细胞激活的血管内皮分泌的粘附因子。线粒体功能异常是缺血期的启动核心,它直接激活了细胞色素 C 依赖的细胞凋亡信号。细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶虽然对缺血缺氧的敏感性不高,但是对再灌注损伤非常敏感,这些细胞膜离子转运蛋白的再灌注损伤,加重了细胞内钙超载以及自由基连锁

反应,同时激活了细胞表面受体依赖的凋亡信号。因此,如何拮抗神经元的凋亡,是挽救脑缺血/再灌注半暗带损伤的重心。既往研究显示,丝氨酸蛋白酶抑制剂能够拮抗多个凋亡信号,抑制神经元凋亡^[10-12]。本实验结果也显示,各个剂量人源重组丝氨酸蛋白酶抑制剂的干预,均能够拮抗大鼠缺血/半暗带区受损细胞的凋亡,表现为 caspase-17 表达降低, Bcl-2/Bax 比值下调。从缺血期的分子机制看,丝氨酸蛋白酶抑制剂下调了自由基超载,酶抑制剂通过抑制溶酶体的破坏稳定细胞膜,同时抑制了溶酶体释放出来的具有丝氨酸中心的活性酶的激活^[13]。Na⁺-



注:A. Caspase-3 及其降解产物 P17 的 Western Blot 表达条带;B 和 C. bcl-2 以及 bax 的 Western blot 表达条带。

图 5 各组 Caspase-3、bcl-2 以及 bax 的 Western blot 表达结果

Note: A. Quantitative expression of caspase-3 and its degenerated P-17. B and C. Quantitative expression of Bcl-2 and Bax.

Fig. 5 Western blot analysis of the expression of caspase-3, Bcl-2 and Bax in the cerebral cortex tissues after ischemia/reperfusion injury

K⁺-ATP 系列酶中也有以丝氨酸为活性中心的关键酶,因此,rhKD/APP 能延缓 ATP 的降解速度,改善缺血缺氧。同时,丝氨酸蛋白酶抑制剂能下调激酶和缓肽酶的生成,抑制次黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶,对抗氧自由基的损伤。从再灌注期的机制看,丝氨酸酶抑制剂能显著降低再灌注区反映中性粒细胞激活的 MPO 酶活性^[14],而且显著优于尼莫地平。激活的中性粒细胞会产生大量活性氧,使炎症与自由基形成正反馈,共同加重脑组织缺血/再灌注损伤^[15]。在这个激活环路中,ICAM-1 和 E-选择素的上调尤为关键,敲除 ICAM-1 基因的大鼠对缺血/再灌注损伤的易感性降低^[16]。同时,ICAM-1 的表达下调,也可以降低缺血/再灌注脑皮质的凋亡信号。丝氨酸蛋白酶抑制剂可以抑制粘附因子表达过程以丝氨酸为活性中心蛋白,减少血管内皮细胞表达粘附因子^[5],进一步下调中性粒细胞的过激活。综上,丝氨酸酶抑制剂在大脑缺血/再灌注损伤的双期,均显示出临床治疗机制^[17]。

虽然各个剂量的丝氨酸酶抑制剂干预均展示出神经保护疗效,但是,只有反映中性粒细胞激活

程度的 MPO 酶活性这一个指标,与尼莫地平治疗比较,有显著优势。这可能是因为丝氨酸酶抑制剂分子量大,通过血脑屏障效率低,但是中性粒细胞呼吸爆发不需要通过血脑屏障,所以该指标对酶抑制剂的敏感度高。除这个指标外,反映氧自由基超载、粘附因子表达和神经凋亡的各个指标,酶抑制剂干预与尼莫地平治疗并无显著差异。从整体上看,中剂量 rhKD/APP 干预组的各个均数与尼莫地平组基本接近,而高剂量组则显示出一定的优势。

综上,丝氨酸蛋白酶抑制剂通过抑制多种以丝氨酸为活性中心的蛋白酶,拮抗缺血期的自由基损伤,降低再灌注期的中性粒细胞过度活化,双信号拮抗神经细胞凋亡,发挥对脑缺血/再灌注的神经保护作用,与经典神经保护药物尼莫地平比较,临床疗效无明显差异。虽然我们的研究结果显示一定的剂量/效应相关,而且本研究未见明显毒副作用,但是由于丝氨酸酶抑制剂的广谱性,应该慎重提高给药剂量。我们拟加大样本量,延长临床观察窗,继续相关的临床治疗研究。得益于人源重组丝氨酸酶抑制剂的低免疫原性,该生物工程药物

rhKD/APP 应用人脑缺血/半暗带的神经保护的临床前景值得期待。

参 考 文 献(References)

- [1] Ascenzi P, Bocedi A, Bolognesi M, et al. The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2003, 4: 231 – 251
- [2] Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer ’ s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE [J]. *Science*, 1999, 286: 735 – 741
- [3] Dong W, Lv B, Wei F, et al. Recombinant bovine pancreatic trypsin inhibitor protects the liver from carbon tetrachloride-induced chronic injury in rats [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51: 1298 – 1303
- [4] Kamiya T, Katayama Y, Kashiwagi F, et al. The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats [J]. *Stroke*, 1993, 24: 571 – 575; discussion 575 – 576
- [5] Wu W, Li H, Navaneetham D, et al. The Kunitz protease inhibitor domain of protease nexin-2 inhibits factor XIa and murine carotid artery and middle cerebral artery thrombosis [J]. *Blood*, 2012, 120: 671 – 677.
- [6] Yeh CH, Chen TP, Wang YC, et al. Potent cardioprotection from ischemia-reperfusion injury by a two-domain fusion protein comprising annexin V and Kunitz protease inhibitor [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11: 1454 – 1463.
- [7] 孟威宏, 王虹蛟, 颜炜群. 人 Kunitz 型蛋白酶抑制剂-KD/APP 的研究进展 [J]. *中国实验诊断学*. 2013, 13: 60 – 61.
Meng WH, Wang HJ, Yan WQ. The investigative development on human Kunitz proteinase inhibitor (KD-APP) [J]. *Chin J Lab Diagn*, 2013, 13: 60 – 61.
- [8] Hum PD, Vannucci SJ, Hagberg H. Adult or perinatal brain injury: does sex matter ? [J]. *Stroke*, 2005, 36: 193 – 195.
- [9] Wen Y, Yang S, Liu R, et al. Estrogen attenuates nuclear factor-kappa B activation induced by transient cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 2004, 1008: 147 – 154.
- [10] Lu F, Lamontagne J, Sun A, et al. Role of the inflammatory protein serine protease inhibitor Kazal in preventing cytolytic granule granzyme A-mediated apoptosis [J]. *Immunology*, 2011, 134: 398 – 408.
- [11] Sonnemann J, Palani CD, Beck LF, et al. Serine proteases in histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9: 2440 – 2441. Author reply 2441 – 2442.
- [12] Srinivasula SM, Gupta S, Datta P, et al. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 31469 – 31472.
- [13] Koga Y, Fujita M, Tsuruta R, et al. Urinary trypsin inhibitor suppresses excessive superoxide anion radical generation in blood, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats [J]. *Neurol Res*, 2010, 32: 925 – 932.
- [14] Schwartz H, Carter JM, Russ M, et al. Serine protease inhibitor nafamostat given before reperfusion reduces inflammatory myocardial injury by complement and neutrophil inhibition [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, 52: 151 – 160.
- [15] Kim GW, Kondo T, Noshita N, et al. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals [J]. *Stroke*, 2002, 33: 809 – 815.
- [16] Soriano SG, Lipton SA, Wang YF, et al. Intercellular adhesion molecule – 1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Ann Neurol*, 1996, 39: 618 – 624.
- [17] Tu Q, Cao H, Zhong W, et al. Atorvastatin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through anti-inflammatory and antioxidant effects [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9: 268 – 275.

[收稿日期] 2018 – 04 – 05