

杨净松, 吕梁, 宋巍, 等. 脑缺血性卒中血脑屏障破坏模型建立与功能障碍的定量检测方法及其进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 129-135.

Yang JS, Lyu L, Song W, et al. Establishment of blood-brain barrier damage model for cerebral ischemic stroke and the quantitative detection methods and progress of its dysfunction [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 129-135.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 03. 019

脑缺血性卒中血脑屏障破坏模型建立与功能障碍的定量检测方法及其进展

杨净松, 吕 梁*, 宋 巍, 刘兴利

(云南省第一人民医院放射科, 昆明 650000)

【摘要】 回顾缺血性脑卒中过程总血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的动态病理改变与关于 BBB 在脑缺血性卒中过程中的破坏过程以及当前实验方法在 BBB 的破坏评估量化过程中的新进展。

【关键词】 脑缺血性卒中; 动物模型; 定量分析; 血脑屏障

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856 (2022) 03-0129-07

Establishment of blood-brain barrier damage model for cerebral ischemic stroke and the quantitative detection methods and progress of its dysfunction

YANG Jingsong, LYU Liang*, SONG Wei, LIU Xingli

(Department of Radiology, Yunnan First People's Hospital, Kunming 650000, China)

【Abstract】 This article reviews dynamic pathological changes of the total blood-brain barrier (BBB) in the process of ischemic stroke as well as the destruction process of BBB in the process of ischemic stroke and the progress of current experimental method in the quantification of BBB destruction.

【Keywords】 ischemic stroke; animal model; quantitative analysis; BBB

脑卒中(stroke)尤其是占大部分的脑缺血性卒中(ischemic stroke, IS)是当前威胁人类的尤其是发展中国家人民健康的首要因素^[1-2], IS 主要是由突然流向大脑的局部脑血流量减少引起的, 脑血性卒中后不久, 代谢紊乱和能量失衡在细胞和亚细胞水平传播到继发性损伤机制中如炎症、神经胶质细胞增生和氧化应激等, 继而导致神经元, 神经胶质细胞和血管内皮细胞死亡。

血脑屏障(BBB)是中枢神经系统的独特而重

要的特异性结构, 早期认为 BBB 可以调控脑组织血流供应, 在控制物质交换功能上也具有重要的调节的作用^[3], 参与维持脑组织液中水和电解质的平衡, 并且必须保护神经元免受血液中潜在有害物质的侵害^[4], BBB 损伤和功能障碍是脑缺血后卒中的突出病理特征, 缺血卒中后的脑细胞水肿、凋亡到坏死过程 BBB 的破坏程度与发病的严重程度有着密切的关联, 但既往的实验仅仅关注 BBB 的破坏与否, 既 0 或 1, 对于 BBB 破坏程度的量化仍是实验中

【基金项目】 吴阶平医学基金(320. 6759. 2020-08-12); 2020SKY 影像科研基金(Z-2014-07-2003-21)。

【作者简介】 杨净松(1991—), 男, 硕士, 研究方向: 神经影像。E-mail: yangjingsonggo@163.com

【通信作者】 吕梁(1961—), 男, 硕士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 脑卒中影像诊断。E-mail: lyuliang0720@hotmail.com

的一项难题,本文将针对各种动物模型及相关 BBB 影像学评估手段的最近进展进行阐述及回顾。

1 与 BBB 构成结构破坏的相关检测敏感标记物

BBB 内侧为血管内皮细胞以及其周围的紧密连接(tight junction, TJ)构成的,参与构成 TJ 主要结构蛋白包括 ZO-1、occludin 与 claudin-5 等,在脑缺血卒中发生后可以通过免疫组化与蛋白质印迹实验评估连接蛋白的表达,继而反映血脑屏障的破坏情况(BBB 破坏时连接蛋白表达、分布减低)^[5],实验证实,缺血 2 h 后, BBB 在体外和体内均受到破坏,在体外细胞实验中, BBB 的破坏主要由 caveolin1 介导的 claudin-5 重新分布和 MMP 介导的闭合蛋白降解导致快速内皮屏障破坏引起的氧葡萄糖剥夺^[6],因此 ZO-1、occludin 与 claudin-5 的表达改变提示了血脑屏障破坏与重建, BBB 内皮细胞较周围毛细血管内皮细胞较为明显的特点是丰富的线粒体量,有实验发现在梗塞后 30 min,约 60% 受缺血影响的血管显示出了内皮水肿,并伴有水肿星形细胞,证实在缺血性脑卒中发生后血管内皮水肿早于 BBB 破坏^[7],同时也暗示 BBB 的破坏是一系列级联反应引起的,是一个动态变化的过程。

周细胞除了血脑屏障(BBB)的发育和维持,跨 BBB 的白细胞运输和血管生成外,调节神经组织血流以配给相应的神经代谢也起到了重要作用^[8]。周细胞对于缺血较敏感且容易受损而产生大量的过氧化酶如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、氧化酶 4(NOX4)等^[9-10],这种酶会在梗塞周围区域的微血管周细胞中表达上调,这有助于激活金属蛋白酶 9(MMP-9)加剧 BBB 分解^[11],发生 IS 后,血浆基质金属蛋白酶(MMP)首先升高, MMP 是一种蛋白水解酶,可以降解细胞外的大多数成分并重塑细胞外空间,其中如 MMP-9 异常升高与脑卒中的加剧存在关联^[12],实验证实血脑屏障的破坏与 MMP-9 表达增加呈明显相关^[13],这些机制会加重缺血卒中后的组织损伤和脑水肿^[14],因此,预防周细胞功能障碍可通过促进微循环再灌注并预防出血和水肿来改善再通疗法的疗效。在梗塞周围组织中,周细胞与微血管分离并促进血管生成和神经发生,对中风预后产生积极影响,有研究证实血小板衍生生长因子- β (PDGFR- β) 在周细胞中表达上调^[15-16],其数量增加并开始从微血管壁迁移至新形成的脉管芽以促进缺血性损伤后的成熟。

2 脑缺血卒中 BBB 破坏的模型建立与 BBB 破坏的实验检测方法进展

2.1 体外 BBB 细胞培养模型及与其局限性

体外 BBB 模型的构建主要是基于原代细胞或永久脑内皮细胞系(BCE)的细胞培养模型,目前主要应用于研究 BBB 的渗透性筛查、各种药物向脑内转运的模式检验与脑血管毛细血管内皮细胞物质转运机制及病理生理研究^[17]。与基于动物的 IS 体内模型相比,体外模型具有多种优势:(1)研究缺氧/葡萄糖糖减低对细胞死亡的影响更为直接和容易;(2)可以在血脑屏障内的细胞水平上进行代谢研究,而不会使其他器官的其他细胞复杂化;(3)可以容易地研究培养细胞之间复杂的细胞内信号传导途径及其在疾病过程中的潜在作用^[18]。

不同物种的 BBB 体外模型构建采用以进行各方面的研究工作,其中小鼠或大鼠来源的脑内皮细胞培养物的优势在于其来源已充足,并且经常被用作临床前研究的首选^[18],在脑缺血性卒中的 BBB 研究主要聚焦于氧气葡萄糖剥夺(OGD)条件下脑血管内皮细胞的病理改变与各种蛋白、水解酶、核酸等物质的表达检测及 BBB 其他细胞如周细胞在缺血缺氧状态下的功能改变与保护/破坏作用机制研究^[19-22],尽管大/小鼠的脑容易获得,但这些物种中内皮细胞的普遍产量较低,实验的可重复性也受到各种因素影响。其他动物如牛、猪等动物细胞的体外模型也应用于 BBB 的相关研究当中,但是鉴于不可避免的物种差异,一种可靠的人源性体外 BBB 模型将对高通量筛选以识别脑穿透分子或研究 BBB 的发育,调节和疾病途径显然具有更高的实验价值。

采用完全分化的表型的人脑内皮细胞的原代培养对于药物开发和临床前研究是一种理想的建模工具^[23],但新鲜的人脑组织很难保证持续的获取。人类干细胞模型目前正在完善^[24],有学者通过模拟类似于胚胎脑体外的微环境使得人多功能干细胞(hPSC)成功向脑内皮细胞分化^[25],所得的内皮细胞具有许多 BBB 属性,包括组织良好的紧密连接,营养转运蛋白的适当表达和极化的外转运蛋白活性,成功检测到葡萄糖转运蛋白 GLUT-1、连接蛋白 occludin-5、claudin-5 以及 p-糖蛋白在内皮细胞中共表达^[26],如果证明这种体外建模方法易于处理并具有良好的可重复性,将为该领域的研究人员提供巨大的机会。

虽然体外的细胞培养技术逐渐进步,体外的 BBB 结构及功能也越来越接近实验动物(人)体内,但 BBB 是一个复杂的结构,其病理生理改变有多重复杂的细胞间相互作用,且研究过程中关注的仅仅是与 BBB 功能有紧密关系的相关蛋白,并没有将体外的 BBB 结构作为一个有机动态的整体进行研究。新鲜的原代细胞获取一直是限制体外 BBB 研究的瓶颈,已经有将星形细胞及周细胞与内皮细胞共同培养以模拟体内环境以提高内皮细胞相关功能高表达的方法^[27],但始终无法达到内环境的复杂调节,有学者通过评估永生化的 hCMEC/D3 和原代 hpBEC 细胞系的总体基因表达谱,发现脑微血管内皮细胞(BEC)中重要的功能相关基因的表达出现了明显的减低^[28],证明 BEC 中高表达并被描述转录 BBB 功能的特异性蛋白的相关基因表达受到分离培养细胞的影响,这可能与天然内环境的剥夺密切相关,故体外研究在相关的病理生理研究中仍然有较明显的局限性。

2.2 脑缺血卒中动物模型建立与 BBB 的破坏检测

多种动物(小鼠、大鼠、兔、犬、山羊、猪、灵长动物)等用于脑卒中后 BBB 功能观察及脑缺血在再灌注的神经病理生理及显微解剖相关的研究。在各类文献中,占大多数的是鼠(约 80%),这是因为鼠(小鼠/大鼠)的缺血性脑卒中模型的建立具有简单方便、具有较高的可重复性与成功率。目前使用的缺血性脑卒中建模方法最常用的是 MCAO(线栓法大脑中动脉局灶性脑缺血模型),闭塞时间一般为 60~120 min 不等,具体实验步骤不再赘述^[29-30],需要注意的是在 MCAO 处理后可能由于丘脑受损而导致体温过低,故需要一定的保温措施,使其体温保持在约 37℃。

目前对于脑卒中动物模型与 BBB 功能的相关研究主要集中在 BBB 在 IS 后的动态变化,既 BBB 在 IS 后的各个时间段的显微结构、功能与相关蛋白表达的变化研究,与之相关的各种神经保护药物的应用及药物对 BBB 的功能保护机制研究等方面。对于 BBB 的功能失调的定量研究主要包括染色剂的定量检测既伊文思蓝(EB)的定量检测与异硫氰酸荧光素-右旋糖酐(FITC-Dextran)免疫荧光检测,下面主要针对两种检测方法进行探讨。

2.3 伊文思蓝(EB)进行 BBB 渗漏定量检测

EB 染料具有很强的结合血清白蛋白的能力,可作为示踪剂检测血管渗漏并定量 BBB 分解,EB

的定量检测是一种公认且敏感的技术,已被用于评估包括缺血性中风在内的神经疾病中的血脑屏障完整性和功能^[31-33]。该方法经济简便、高效,具有较高的可重复性,并且可以适用于任何实验室,目前广泛应用于各种相关 BBB 的功能紊乱研究中^[34]。具体方法为:在 MCAO 建模成功后,采用静脉注射法(鼠尾静脉/颈静脉/股静脉)缓慢注射 EB 染色剂(5 min 注射完成),按照期望的时间(缺血后指定时间或再灌注指定时间等)处死,取出大脑,解剖大脑半球,锐器分离左右半球并分别称重,在磷酸盐缓冲盐水中制匀浆,然后使用涡旋仪将其与 2.5 mL 三氯乙酸(60%)混合之后进行离心 15~30 min,随后静置于并低温保存约 10 min,吸取上清液,使用分光光度计在 610 nm 处估计 EB 吸收^[33,35],根据 EB 的标准曲线估计 EB 渗漏的量,并将结果表示为 ug/g。

EB 染色剂的定量评估主要用于以下方面:(1) BBB 相关研究如各种疾病模型的 BBB 功能变化,使用 EB 染色剂渗漏量衡量 BBB 的破坏程度,结合金属激酶 MMP 等 BBB 破坏相关联的水解酶^[36],继而分析 BBB 破坏程度的动态变化及与相关疾病病理变化的相关性^[37-38],通过 BBB 结构蛋白(ZO-1、occludin-5、claudin-5)等相关功能蛋白的表达检测以了解 BBB 破坏的机制^[36];(2)在药物研究中用于评估某种药物(刺激因素)对疾病模型的治疗/缓解效果^[38-41],将染色剂的定量分析作为评估 BBB 破坏情况的客观指标,继而了解实验/对照组在进行干预后的 BBB 功能差异,并对药物效果进行评估;(3)用于验证 BBB 诱导破坏模型建模是否成功^[42]。

虽然 EB 定量检测法简单易行,但是 EB 染色在检测过程中需要进行血管内的冲洗灌注然后再进行脑实质内的染料提取,这一过程中可能造成脑内小血管再破裂导致脑实质内染色剂增多^[43-45],且操作的人员个体及技术差异可能导致结果的差异,对于定量检测来说其客观性会受到质疑。分光光度计测量的 EB 染料浓度,在大体上无法进行 EB 染色区域的定量(BBB 破坏范围),Reeson 等^[46]在研究抑制 VEGF 信号转导对脑卒中的保护作用中应用免疫荧光图像定量分析的方法,将梗死区域内荧光体积减去血管官腔内荧光面积,之后将周围皮层的染料荧光面积减小鼠相对应深度的对侧染料荧光以量化 EB 的渗漏,在将来的研究当中值得进一步应用。

2.4 异硫氰酸荧光素-标记物荧光 (FITC-) 进行定量检测

使用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记不同分子量的物质 (白蛋白、高/低分子量右旋糖酐、葡萄糖等), 尤其是 FITC-Dextran 是用于检测 BBB 渗漏常用试剂^[44, 47-49], 该物质具有不同的分子量, 一般为了使 BBB 渗漏实验效果明显, 常选用分子量相对小的试剂用以标记 BBB 渗漏的感兴趣区^[50-51], 高分子量 (2000×10^3) 的 FITC-Dextran 可以很好地吸附于血管壁内, 继而作为标记血管管腔的高亮荧光标志而被识别, 且在 BBB 出现明显破坏渗漏时, 大分子 FITC-Dextran 也可以在管腔外被识别, 故也可以用于 BBB 渗漏的定量研究中, Chen 等^[52] 在使用大鼠进行脑缺血卒中 BBB 破坏对周围脑组织研究中通过半自动测量 FITC-Dextran 标记的荧光总面积, 再根据高亮区域 (既血管管腔内的 FITC-Dextran 富集) 调整亮度阈值, 计算血管面积, 继而计算出渗漏的荧光面积值, 证明了 BBB 破坏程度 (高分子 FITC-Dextran 周围渗漏面积) 与脑组织损伤的体积密切相关; Michalski 等^[47] 利用高分辨率扫描仪结合图像后处理工具对 FITC-白蛋白 (70×10^3) 的连续切片进行荧光面积计算, 并逐层累计 ($\times$ 层厚) 最后得出 BBB 渗漏组织的体积; Jin 等^[53] 将大鼠前囟作为基点作冠状切片, 将前囟至后方 2 mm 的切片作为观察切片, 使用图像处理软件进行多层面荧光定量检测 (显微镜下 FITC-Dextran 亮度最高、面积最大) 荧光面积总和, 并得到平均渗漏面积作为定量指标继而验证不同分子大小的 FITC-Dextran 在大鼠 IS 不同时间点的渗漏, 继而反映 BBB 在 IS 后的动态变化与相关机制; Bankstahl 等^[51] 在其进行大鼠癫痫发病后 BBB 功能变化研究时应用半定量分析法 (每只动物分析了 4 个冠状脑切片, 根据 FITC-白蛋白的细胞外分布进行评分, 无 = 0 分, 靠近血管的极小的细胞外分布 = 1 分; 局灶性的细胞外聚集 = 2 分; 大量的弥散分布的聚集 = 3 分, 计算平均值) 进行 BBB 渗漏情况的评价以了解 BBB 在癫痫发作后的动态改变; 上述实验由于重复性及样本量等因素影响, 目前尚未形成一种公认的、标准的定量评估方法。

Xu 等^[48] 利用 EB 的荧光染色与大分子量 (2000×10^3) FITC-Dextran 免疫荧光染色特性, 由于大分子 FITC-Dextran 会聚集在血管管腔内, 故可以利用这一特性计算 FITC-Dextran 覆盖面积以估算血管面积, 使用显微图像处理软件对切片进行分析并得

到 EB 荧光染色的集合光密度 (integrated optical density, IOD) 与 FITC-dextran 渗漏面积, 计算两者的比值 ($IOD/Area_{FITC-Dextran}$), 这种做法可以降低血管荧光对于 BBB 渗漏量化的影响, 但是这种方法目前仅应用于诱导的 BBB 渗漏, 并未用于 IS 引起的 BBB 渗漏中, 根据既往研究, 当 IS 发生后发生 BBB 渗漏严重程度更重, 故血管内外均可见 FITC-Dextran 分布, 如果可以结合 Chen 等^[52] 的研究策略, 分析 EB 荧光的 IOD 值与 FITC-Dextran 荧光的面积渗漏面积 (总面积-血管面积) 的关系以发现更好的 BBB 渗漏评估手段, 值得进一步探讨。

3 影像学方法对于血脑屏障破坏的相关检测技术进展

在正常生理条件下, CT 增强检查中所应用到的对比剂如碘对比剂与 MRI 增强所用到的对比剂如钆类对比剂均为大分子物质, 无法通过功能正常的 BBB 进入脑组织微环境内, 故在正常增强造影时脑实质不会强化, 如果 BBB 功能发生破坏, 则会发生对比剂通过 BBB 进入脑实质, 使得脑实质异常强化, 故对于 BBB 的破坏评估实际上是对原本不能通过 BBB 的物质 (对比剂) 进行量化以反映 BBB 破坏程度。

已经有研究通过检测脑实质中大分子对比剂来反映相关疾病如脑退行性疾病等对于血脑屏障功能的影响, 如应用 Patlak 模型的 CT 灌注成像中的渗透系数-渗透性-表面积乘积 (permeability-surface area product, PS)^[54], 使用这种参数来反映肿瘤、脑缺血卒中等病变对于 BBB 破坏的检测, 也有应用这种模型进行动态增强磁共振 (dynamic contrast enhanced MRI, DCE-MRI), 产生类似的参数如容积转移常数 K^{trans} (transfer constant), 目前这种技术主要在中枢神经系统疾病主要应用, 进行脑内小血管渗透性定量评估和脑小血管疾病器质性评价^[55], 但是以上技术方法都是基于数学模型的模拟计算, 对于脑组织内真实的对比剂渗漏情况无法切实反映。

目前已经有对于脑实质内对比剂定量分析的技术, 主要为 CT 双能量碘分析技术与磁共振检查的高强度急性再灌注标记物 (HARM) 检测技术。对于碘对比剂, 双源双能量 CT 于图像重建后在图像空间域使用三物质解析算法, 应用碘图可对特定区域组织内的碘含量进行定量, 目前双能量扫描可以将水平在 0.3~0.5 mg/mL 的极低量碘进行精确的

定量评估^[56];高强度急性再灌注标记物(hyperintense acute reperfusion marker, HARM),被定义为急性卒中患者对比后 FLAIR 图像上蛛网膜下腔或蛛网膜下腔的延迟增强,并被认为是与 BBB 的通透性变化有关,已经有文献对于脑梗死后对比剂的外渗与出血的 HARM 改变与 CT 进行对照及脑短暂性缺血后的在今后的研究领域中^[57-58],HARM 与双能量 CT 在对比剂外渗的相关性与脑缺血卒中的研究潜力。

4 总结与展望

综前文所述,对于脑缺血性卒中后 BBB 的相关研究目前主要在脑缺血后的 BBB 功能变化与相关机制,各种干预因素(药物)在脑缺血后对 BBB 功能的保护机制与疗效评估,根据新近文献对卒中后 BBB 破坏的探讨,随着无创检查技术的进步(MRI、CT 功能成像),虽然相关技术已经有报道,但目前尚无相关实验发现明确的与 BBB 实验定量相关性或衡量手段,如果可以在无创检查与活体 BBB 破坏之间找到相关的实验数据可以支撑其高相关性,使得 BBB 的破坏检测可以通过影像学检测发现,继而应用于高级动物模型中,在今后的 BBB 相关实验中将是飞跃性的进展。

参考文献:

- [1] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the american heart association [J]. Circulation, 2015, 131(4): e29-e322.
- [2] Krishnamurthi RV, Moran AE, Feigin VL, et al. Stroke prevalence, mortality and disability-adjusted life years in adults aged 20-64 years in 1990-2013: data from the global burden of disease 2013 study [J]. Neuroepidemiology, 2015, 45(3): 190-202.
- [3] Schoknecht K, David Y, Heinemann U. The blood-brain barrier-gatekeeper to neuronal homeostasis: clinical implications in the setting of stroke [J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 38: 35-42.
- [4] Helms HC, Abbott NJ, Burek M, et al. *In vitro* models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use [J]. Cereb Blood Flow Metab, 2016, 36(5): 862-890.
- [5] Jiao H, Wang Z, Liu Y, et al. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult [J]. Mol Neurosci, 2011, 44(2): 130-139.
- [6] Liu J, Jin X, Liu KJ, et al. Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage [J]. Neurosci, 2012, 32(9): 3044-3057.
- [7] Krueger M, Mages B, Hobusch C, et al. Endothelial edema precedes blood-brain barrier breakdown in early time points after experimental focal cerebral ischemia [J]. Acta Neuropathol Commun, 2019, 7(1): 17.
- [8] Arimura K, Ago T, Kamouchi M, et al. PDGF receptor β signaling in pericytes following ischemic brain injury [J]. Curr Neurovasc Res, 2012, 9(1): 1-9.
- [9] Manea A, Raicu M, Simionescu M. Expression of functionally phagocyte-type NAD(P)H oxidase in pericytes: effect of angiotensin II and high glucose [J]. Bio Cell, 2005, 97(9): 723-734.
- [10] Kuroda J, Ago T, Nishimura A, et al. Nox4 is a major source of superoxide production in human brain pericytes [J]. Vasc Res, 2014, 51(6): 429-438.
- [11] Nakamura K, Arimura K, Nishimura A, et al. Possible involvement of basic FGF in the upregulation of PDGFR β in pericytes after ischemic stroke [J]. Brain Res, 2015, 1630: 98-108.
- [12] Ma F, Rodriguez S, Buxo X, et al. Plasma matrix metalloproteinases in stroke patients during intensive rehabilitation therapy [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2016, 97(11): 1832-1840.
- [13] Shi Y, Zhang L, Pu H, et al. Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury [J]. Nat Commun, 2016, 27(7): 10523.
- [14] Zhang L, Zhang ZG, Chopp M. The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke [J]. Trends Pharmacol Sci, 2012, 33(8): 415-422.
- [15] Fernandez-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, et al. Pericytes in capillaries are contractile *in vivo*, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(51): 22290-22295.
- [16] Yang Y, Thompson JF, Taheri S, et al. Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis during recovery [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(7): 1104-1114.
- [17] Helms HC, Abbott NJ, Burek M, et al. *In vitro* models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2016, 36(5): 862-890.
- [18] Lundquist S, Renftel M, Brillault J, et al. Prediction of drug transport through the blood-brain barrier *in vivo*: a comparison between two *in vitro* cell models [J]. Pharm Res, 2002, 19(7): 976-981.
- [19] Haseloff RF, Krause E, Bigl M, et al. Differential protein expression in brain capillary endothelial cells induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation [J]. Proteomics, 2006, 6(6): 1803-1809.
- [20] Nakagawa S, Mária A Deli, Kawaguchi H, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells,

- pericytes and astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2009, 54(3-4): 253-263.
- [21] Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(8): 650-661.
- [22] Neuhaus W, Burek M, Djuzenova CS, et al. Addition of NMDA-receptor antagonist MK801 during oxygen/glucose deprivation moderately attenuates the upregulation of glucose uptake after subsequent reoxygenation in brain endothelial cells [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 506(1): 44-49.
- [23] Cucullo L, Couraud P, Weksler B, et al. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(2): 312-328.
- [24] Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, et al. Induction of steroidogenic cells from adult stem cells and pluripotent stem cells [J]. *Endocr J*, 2016, 63(11): 943-951.
- [25] Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, et al. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(8): 783-791.
- [26] Wang YI, Abaci HE, Shuler ML, et al. Microfluidic blood-brain barrier model provides *in vivo*-like barrier properties for drug permeability screening [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017 114(1): 184-194.
- [27] Boveri M, Berezowski V, Price A, et al. Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: comparison between primary glial cells and C6 cell line [J]. *Glia*, 2005, 51(3): 187-198.
- [28] Urich E, Lazic SE, Molnos J, et al. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive *in vitro* blood-brain barrier models [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e38149.
- [29] 陈佳俊, 石岩殊, 韩雪梅. 线栓法大鼠局灶性脑缺血模型 (PMCAO) 的实验研究 [J]. *吉林医学*, 2004, 25(5): 16-17.
- [30] Dirnagl U. Standard operating procedures (SOP) in experimental stroke research: SOP for middle cerebral artery occlusion in the mouse [J]. *Nature Precedings*, 2010, 8: 1-14.
- [31] Pasban E, Panahpour H, Vahdati A, et al. Early oxygen therapy does not protect the brain from vasogenic edema following acute ischemic stroke in adult male rats [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1-7.
- [32] Azar AH, Oryan S, Bohlooli S, et al. Alpha-tocopherol reduces brain edema and protects blood-brain barrier integrity following focal cerebral ischemia in rats [J]. *Med Princ Pract*, 2017, 26(1): 17-22.
- [33] Panahpour H, Farhoudi M, Omid Y, et al. An *in vivo* assessment of blood-brain barrier disruption in a rat model of ischemic stroke [J]. *J Vis Exp*, 2018, 133: 57156.
- [34] Panahpour H, Dehghani GA, Bohlooli S, et al. Enalapril attenuates ischaemic brain oedema and protects the blood-brain barrier in rats via an anti-oxidant action [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(3): 220-226.
- [35] 赵庭鉴, 张培林, 周勇, 等. 冰片和麝香酮对神经生长因子血脑屏障通透性的影响研究 [J]. *中国临床新医学*, 2015, 8(8): 728-731.
- [36] Qi J, Liu Y, Yang P, et al. Heat shock protein 90 inhibition by 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin protects blood-brain barrier integrity in cerebral ischemic stroke [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(10): 1826-1837.
- [37] Jiao YQ, Huang P, Yan L, et al. Yangxueqingnao wan, a compound chinese medicine, attenuates cerebrovascular hyperpermeability and neuron injury in spontaneously hypertensive rat: effect and mechanism [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1246.
- [38] Wang F, Liang W, Lei C, et al. Combination of HBO and memantine in focal cerebral ischemia: is there a synergistic effect? [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(3): 1458-1466.
- [39] Feng S, Zou L, Wang H, et al. RhoA/ROCK-2 pathway inhibition and tight junction protein upregulation by catalpol suppresses lipopolysaccharide-induced disruption of blood-brain barrier permeability [J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2371.
- [40] Gao W, Li F, Liu L, et al. Endothelial colony-forming cell-derived exosomes restore blood-brain barrier continuity in mice subjected to traumatic brain injury [J]. *Exp Neurol*, 2018, 307: 99-108.
- [41] Ni P, Dong H, Wang Y, et al. IL-17A contributes to perioperative neurocognitive disorders through blood-brain barrier disruption in aged mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 1-13.
- [42] Orhan N, Yilmaz CU, Ekizoglu O, et al. Effects of β -hydroxybutyrate on brain vascular permeability in rats with traumatic brain injury [J]. *Brain Res*, 2016, 1631: 113-126.
- [43] Wang X, Kang K, Wang S, et al. Focal cerebral ischemic tolerance and change in blood-brain barrier permeability after repetitive pure oxygen exposure preconditioning in a rodent model [J]. *J Neurosurg*, 2016, 125(4): 943-952.
- [44] Saunders NR, Dziegielewska KM, Kjeld M, et al. Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? [J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 385.
- [45] Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, et al. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier [J]. *Cell*, 2015, 163(5): 1064-1078.
- [46] Reeson P, Tennant KA, Gerrow K, et al. Delayed inhibition of VEGF signaling after stroke attenuates blood-brain barrier breakdown and improves functional recovery in a comorbidity-dependent manner [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(13): 5128-5143.
- [47] Michalski D, Grosche J, Pelz JO, et al. A novel quantification of blood-brain barrier damage and histochemical typing after embolic stroke in rats [J]. *Brain Res*, 2010, 1359: 186-200.
- [48] Xu Y, He Q, Wang M, Wang X, et al. Quantifying blood-brain-barrier leakage using a combination of evans blue and high molecular weight FITC-Dextran [J]. *J Neurosci Methods*, 2019,

- 325; 108349.
- [49] Nagaraja TN, Keenan KA, Fenstermacher JD, et al. Acute leakage patterns of fluorescent plasma flow markers after transient focal cerebral ischemia suggest large openings in blood-brain barrier [J]. *Microcirculation*, 2008, 15(1): 1-14.
- [50] Krueger M, Bechmann I, Immig K, et al. Blood-brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(2): 292-303.
- [51] Bankstahl M, Breuer H, Leiter I, et al. Blood-brain barrier leakage during early epileptogenesis is associated with rapid remodeling of the neurovascular unit [J]. *eNeuro*, 2018, 5(3): ENEURO.0123-18. 2018.
- [52] Chen B, Friedman B, Cheng Q, et al. Severe blood-brain barrier disruption and surrounding tissue injury [J]. *Stroke*, 2009, 40(12): e666-e674.
- [53] Jin X, Liu J, Yang Y, et al. Spatiotemporal evolution of blood brain barrier damage and tissue infarction within the first 3 h after ischemia onset [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 48(3): 309-316.
- [54] Santa-Maria AR, Heymans M, Walter FR, et al. Transport studies using blood-brain barrier in vitro models: a critical review and guidelines [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2020, 11: 1-18.
- [55] Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, et al. Vascular dysfunction-the disregarded partner of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2019, 15(1): 158-167.
- [56] Jacobsen MC, Cressman ENK, Tamm EP, et al. Dual-energy CT: lower limits of iodine detection and quantification [J]. *Radiology*, 2019, 292(2): 414-419.
- [57] De Prey J, Yu C, Echevarria FD, et al. Iodinated contrast extravasation on post-revascularization computed tomography mimics magnetic resonance hyperintense acute reperfusion marker: a case study [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29(12): 105294.
- [58] Kang J, Kwon H, Jung CK, et al. Usefulness of hyperintense acute reperfusion marker sign in patients with transient neurologic symptom [J]. *Medicine*, 2019, 98(19): e15494.

[收稿日期]2021-01-06

(上接第 77 页)

- [18] Gómez GI, Velarde V, Sáez JC. Role of a RhoA/ROCK-dependent pathway on renal connexin43 regulation in the angiotensin II-induced renal damage [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4408.
- [19] 张志强. SOX9 在肾小管上皮细胞纤维化中作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [20] Zhu F, Chong Lee Shin O, Pei G, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells employed exosomes to attenuate AKI-CKD transition through tubular epithelial cell dependent Sox9 activation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 70707-70726.
- [21] Kumar S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(1): 27-40.
- [22] 陈健文, 黄梦杰, 陈香美. 转录因子 SOX9 在肾病中作用的研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2020, 41(6): 634-637.
- [23] Nakagawa S, Nishihara K, Miyata H, et al. Molecular markers of tubulointerstitial fibrosis and tubular cell damage in patients with chronic kidney disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e136994.

[收稿日期]2021-02-04