

马娴,高萍,刘真一,等. 补阳还五汤减轻氧化应激保护脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障的作用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 75-84, 101.

Ma X, Gao P, Liu ZY, et al. Effect of Buyang Huanwu Decoction in reducing oxidative stress and protecting cerebral ischemia-reperfusion injury to rat blood-brain barrier [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 75-84, 101.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.010

补阳还五汤减轻氧化应激保护脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障的作用研究

马娴^{1,2},高萍^{1,2},刘真一^{1,2},辛紫媛^{2,3},靳晓飞^{1,2},周晓红^{1,2},高维娟^{1,2*}

(1.河北中医学院,石家庄 050000;2.河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室,石家庄 050000;
3.承德医学院附属医院,河北承德 067000)

【摘要】 目的 探究补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)降低氧化应激水平保护脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia/reperfusion injury, CIRI)大鼠血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的机制。方法 采用线栓法建立大鼠大脑中动脉栓塞再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型,应用PeriCam PSI激光散斑血流成像系统检测脑血流量判定模型建立是否成功。通过Zea Longa评分评价大鼠神经功能缺损情况;HE染色观察大鼠脑组织病理学改变;干湿重法检测脑水肿程度;伊文思蓝(Evans blue, EB)染色检测BBB通透性;透射电镜观察BBB超微结构改变;试剂盒检测氧化应激相关指标活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)的含量及总超氧化物歧化酶(SOD)活性;免疫组织化学染色及Western blot检测基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达水平;免疫荧光双染及Western blot检测紧密连接蛋白(tight junction protein, TJP)中Occludin、ZO-1、Claudin-5蛋白的表达水平。结果 BYHWD能够降低MCAO/R大鼠神经功能缺损评分,减轻脑组织病理学损伤,减轻血脑屏障结构破坏,延长紧密连接结构致密区,减轻缺血侧大脑脑水肿情况,降低BBB通透性。BYHWD可以降低ROS与MDA水平,提高SOD活性,降低MMP-9表达水平,提高Occludin、Claudin-5、ZO-1蛋白表达水平。结论 BYHWD可以升高BBB紧密连接蛋白的表达水平,降低血脑屏障通透性,保护血脑屏障超微结构,减轻脑水肿,其机制可能与BYHWD抗氧化应激,抑制MMP-9的激活相关。

【关键词】 补阳还五汤;脑缺血再灌注损伤;透射电镜;氧化应激;血脑屏障;基质金属蛋白酶-9

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)03-0075-10

Effect of Buyang Huanwu Decoction in reducing oxidative stress and protecting cerebral ischemia-reperfusion injury to rat blood-brain barrier

MA Xian^{1,2}, GAO Ping^{1,2}, LIU Zhenyi^{1,2}, XIN Ziyuan^{2,3}, JIN Xiaofei^{1,2}, ZHOU Xiaohong^{1,2}, GAO Weijuan^{1,2*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000, China. 2. Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardio-cerebrovascular Disease, Shijiazhuang 050000. 3. Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000)

【Abstract】 Objective To explore the mechanisms of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) in reducing oxidative stress levels to protect the blood-brain barrier (BBB) in cerebral ischemia/reperfusion injury (CIRI) rats. **Methods** A

【基金项目】 中央引导地方科技发展资金项目(206Z7706G);河北省科技研发平台与新型研发机构建设专项(20567626H);河北中医学院科技能力提升重点项目(KTZ2019018)。

【作者简介】 马娴(1995—),女,硕士研究生,研究方向:缺血性脑血管病的发生机制及中医药防治。E-mail:530199749@qq.com

【通信作者】 高维娟(1966—),博士,女,教授,博士生导师,研究方向:脑血管疾病的发生机制及中医药防治。E-mail:gwj6088@163.com

middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model in rats was established via wire embolization method. PeriCam PSI laser speckle flow imaging was applied to detect whether the model was successfully established. Neurological deficits in the rats were evaluated by Zea Longa score, and histopathological changes in the rat brain were observed by HE staining. The degree of brain edema was detected by the dry and wet weight method. BBB permeability was detected by Evans blue staining, and ultrastructural changes to the BBB were observed by transmission electron microscopy. The levels of ROS, MDA and SOD activities, which are related to oxidative stress, were detected using kits. The expression levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by immunohistochemical staining and Western blot. The expression levels of Occludin, ZO-1, and Claudin-5 tight junction proteins were determined via immunofluorescence and Western blot.

Results BYHWD reduced neurological deficit scores, alleviated brain histopathological damage, alleviated BBB structural disruption, prolonged the appearance of dense regions in the tight junction structure, attenuated edema of the brain on the ischemic side, and reduced BBB permeability in MCAO/R rats. BYHWD decreased the levels of ROS and MDA, increased the activity of SOD, decreased the expression levels of MMP-9, and increased the expression levels of Occludin, Claudin-5 and ZO-1. **Conclusions** BYHWD can increase BBB tight junction protein expression levels, reduce the permeability of the BBB, protect the ultrastructure of the BBB, and reduce brain edema, and its mechanisms may be related to its antioxidant activity and inhibition of MMP-9 activation.

[Keywords] Buyang Huanwu Decoction; cerebral ischemia-reperfusion injury; transmission electron microscopy; oxidative stress; blood-brain barrier; matrix metalloproteinase-9

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

近年来,我国脑血管疾病的病死率逐年升高^[1]。脑卒中属于急性脑血管疾病的范畴,其中缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)的发病率高达 83% 左右,严重危害国民健康^[2]。目前,IS 的主要治疗方法是采用溶栓治疗恢复缺血区的血液供应。然而,血液恢复会进一步引起脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)^[3],造成 CIRI 的机制复杂、因素众多,往往是多种因素共同作用导致。CIRI 的机制研究还不够透彻,给临床的用药和治疗带来诸多困难。

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)破坏导致脑水肿是造成脑卒中患者记忆力丧失、癫痫、昏迷甚至死亡的关键因素。研究发现,BBB 的破坏主要表现在其结构和通透性改变,BBB 通透性主要与脑血管内皮细胞间的紧密连接结构相关^[4]。CIRI 过程中 BBB 受损,脑血管通透性增加,水分溢出增多,积存在细胞间质造成脑水肿。脑水肿又可造成神经元损伤或凋亡,加重细胞功能障碍,进一步加重 CIRI,影响 BBB,形成恶性循环^[5]。CIRI 期间同时产生大量 ROS,导致 SOD 抗氧化能力不足,引发氧化应激反应^[6],也是加重 CIRI 的关键因素。因此,减轻脑缺血再灌注导致的氧化应激损伤和血脑屏障破坏在 CIRI 的治疗中至关重要。

补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)是由清朝名医王清任首创的传统中医经典方剂。现临床上 BYHWD 原方及其加减化裁方广

泛应用于气虚血瘀证的中风及中风后遗症的治疗^[7-8]。现代药理学研究表明,BYHWD 中药理活性成分复杂,可进行多靶点调节,能够通过抗氧化应激、调节钙超载、调控自噬、抑制炎症反应等途径减轻 CIRI^[9-11]。但是,BYHWD 抗氧化应激保护血脑屏障减轻 CIRI 的研究还比较少。本研究基于脑缺血再灌注后氧化应激导致血脑屏障破坏这一病理过程,进一步探讨 BYHWD 减轻 CIRI 的作用机制,为 BYHWD 的临床应用提供更加充分的理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

104 只实验用 SPF 级 8 周龄雄性 SD 大鼠,体重(250±10)g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011],饲养于河北中医院动物房[SYXK(冀)2022-0005],实验过程严格参照河北中医学院实验动物伦理审查标准执行(DWLL202302004),遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

补阳还五汤方剂组成:黄芪 120 g、当归尾 6 g、赤芍 5 g、红花 3 g、地龙 3 g、桃仁 3 g、川芎 3 g,以上药材均购自北京同仁堂石家庄桥东店;丁苯酞软胶囊(国药准字 H20050299)购自石药集团恩必普药业;伊文思蓝(E2129)购自德国 Sigma 公司;甲酰胺(F103361)购自阿拉丁试剂有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0012 S)购自碧云天生物;伊红染液

(G1001)、苏木素染液(G1004)、电镜固定液(G1102)、DAB 显色试剂盒(G1212)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;ROS 测定试剂盒(E004-1)、总 SOD 测定试剂盒(A001-3)、MDA 测定试剂盒(A003-1)均购自南京建成生物工程研究所;TIMP-1 抗体(AF7007)、Claudin-5 抗体(AF5216)均购自 Affinity 公司;ZO-1 抗体(21773-1-AP)、Occludin 抗体(66378-1)、MMP-9 抗体(10375-2-AP)均购自美国 Proteintech 公司。PeriCam PSI 激光散斑血流监测视频系统购自瑞典 Perimed 公司;Western blot 垂直电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司;Odyssey Fc 双色红外激光成像系统购自美国 LiCOR 公司;组织包埋机、全自动轮转切片仪均来自德国 Leica 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及给药

将 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、模型组(MCAO/R 组)、补阳还五汤组(BYHWD 组)、阳性对照药丁苯酞组(NBP 组),每组 26 只。BYHWD 组和 NBP 组大鼠术后 2 h 灌胃给药,BYHWD 组药液制备及给药参照实验室前期研究^[10],剂量为 14.3 g/(kg·d),NBP 组药液制备及给药参照文献^[12],剂量为 80 mg/(kg·d),BYHWD 组和 NBP 组每天给药 1 次,连续给药 3 d。Sham 组和 MCAO/R 组给予蒸馏水。

1.3.2 大脑中动脉栓塞再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型的建立

将 SD 大鼠麻醉后仰卧固定于手术台上,颈部备皮,消毒切口,分离出颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,在颈外动脉剪一小口插入线栓,线栓经颈内动脉到达脑内 Willis 环,实现大脑中动脉栓塞,2 h 后取出线栓,再灌注 72 h。

1.3.3 大鼠脑血流量的监测

将 SD 大鼠麻醉后,充分暴露前凶颅骨,应用 PeriCam PSI 激光散斑血流监测系统的监测探头在距离大鼠前凶 11 cm 处监测大鼠缺血前、缺血中、缺血再灌注后大脑中动脉供血区脑血流灌注量变化。

1.3.4 神经功能学评分

根据 Zea Longa 神经功能缺损评分标准^[13],对各实验组大鼠进行神经功能学评分并记录。分数为 0~4 分,分数越高,神经系统功能损伤越严重。1~3 分大鼠随机分配入组。

1.3.5 HE 染色观察脑组织病理学改变

SD 大鼠麻醉后,经心脏灌流取脑,4%多聚甲醛

固定 24 h 后,经脱水进行石蜡包埋,随后制备 5 μm 石蜡切片。石蜡切片脱蜡、脱水后,用苏木素染色液将细胞核染为蓝色,再将切片放入 1% 盐酸酒精分化液中分化,随后放入返蓝液中返蓝,最后将切片置于伊红染液中使细胞质染成红色,切片经乙醇脱水、二甲苯透明后用中性树胶封片,镜下采集图像。

1.3.6 大鼠脑含水量的测定

采用干湿重法测定各实验组大鼠左侧及右侧大脑半球的脑含水量^[14]。大鼠经麻醉后,迅速断头取脑,将大脑沿矢状位切开,分别称取左侧和右侧大脑半球的重量,记为湿重;将两侧大脑放入 110 °C 烘干箱内 9 h 后记为干重,按照公式计算脑含水量:脑含水量/%=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3.7 伊文思蓝(Evans blue, EB)染色测定血脑屏障通透性

各实验组大鼠于取材前 2 h 尾静脉注射 2% 的 EB 染色液(4 mL/kg),体循环 2 h 后,心脏灌流取脑,置于脑切片模具中制备 2 mm 的连续冠状脑切片,拍照记录各实验组大鼠 EB 染色面积并通过酶标仪测定其吸光度,计算标准曲线,依据标准曲线求得各实验组脑组织内 EB 含量(μg/g)。

1.3.8 透射电镜观察血脑屏障超微结构改变

各实验组大鼠脑组织经麻醉取材后,先放入电镜固定液内固定,经 1% 锇酸后固定、乙醇脱水后渗透包埋,制备 80 nm 的超微切片,用醋酸铀、柠檬酸铅染色,随后在透射电子显微镜下采集图像并分析。

1.3.9 免疫荧光双染法检测血脑屏障紧密连接相关蛋白的表达量

各实验组大鼠脑组织取材后制备石蜡切片,切片脱蜡脱水后置于抗原修复液(pH=6.0)中进行抗原修复,随后滴加 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,免疫荧光封闭液进行室温封闭,15 min 后轻轻甩去封闭液滴加小鼠来源一抗 Occludin 抗体(1:50)及家兔来源的 ZO-1 抗体(1:50)、Claudin-5 抗体(1:50)于 4 °C 过夜,次日清洗一抗,滴加相应种属荧光二抗室温避光孵育 1 h,最后滴加含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片。在荧光显微镜下采集图像,Image J 软件分析平均荧光强度。

1.3.10 氧化应激相关指标的检测

大鼠麻醉取材后脑组织立即放入预冷的 PBS 内漂洗组织,加入适量酶消化液消化细胞,用 300 目尼龙网过滤去掉组织块,收集滤过的细胞,离心后,

去上清液留沉淀, PBS 清洗后加入荧光探针, 测定 ROS 的水平。

大鼠麻醉后取脑组织, 对半暗带脑组织进行称重, 按照重量/g: 体积/mL=1:9 加入 9 倍体积生理盐水, 剪碎组织, 制备 10% 匀浆上清液, 按照试剂盒说明书操作, 并计算 SOD 活力、MDA 含量。

1.3.11 免疫组织化学染色检测 MMP-9 的表达量

脑组织石蜡切片经脱蜡脱水、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、室温封闭 20 min 后, 滴加适量一抗 MMP-9 抗体 (1:100) 于 4 °C 过夜, 次日清洗一抗后滴加二抗 (1:200) 室温孵育 1 h, PBS 清洗二抗后滴加 DAB 显色液, 置于镜下观察到细胞呈棕黄色时终止显色, 切片经脱水、透明后封片, 使用 Image J 软件分析平均吸光度值。

1.3.12 Western blot 法检测各组大鼠脑组织紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin、Claudin-5) 及 MMP-9 的表达

取各实验组大鼠缺血半暗带脑组织进行蛋白样品制备, 蛋白样品用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳 (80 V, 30 min; 120 V, 90 min), 湿转法转膜 (200 mA, 2 h), 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 封闭后滴加以下一抗溶液: ZO-1 (1:2000)、Occludin (1:10000)、Claudin-5 (1:1000)、MMP-9 (1:2000) 以及内参 β -actin (1:2000) 4 °C 孵育过夜, TBST 摇洗一抗, 随后室温孵育二抗 2 h, 经 TBST 摇洗 30 min 后, 滴加 ECL 显影液显色, 采用 Odyssey Fc 双色红外激光成像系统拍照并分析。

1.4 统计学方法

实验数据均以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。采用 Graphpad Prism 8.0.2 软件进行数据分析并绘图。计量资料采用单因素方差分析, 两两比较用

Tukey 法, 计数资料采用卡方 (χ^2) 检验, 以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑血流量评价模型构建是否成功

PeriCam PSI 激光散斑血流监测系统结果显示, SD 大鼠左侧脑血流灌注量 (ROI) 在脑缺血时 (TOI2) 下降了 54.50%, 再灌注后 (TOI3) 的脑血流灌注量上升至缺血前 (TOI1) 的 74.14% 水平, 提示脑缺血再灌注成功 (图 1)。

2.2 补阳还五汤减轻 MCAO/R 大鼠神经功能损伤

与 Sham 组相比, MCAO/R 组大鼠神经功能缺损评分显著升高 ($P<0.01$); 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组和 NBP 组大鼠神经功能缺损评分显著降低 ($P<0.01$); 与 NBP 组相比, BYHWD 组评分与之无统计学差异 ($P>0.05$, 图 2)。

2.3 补阳还五汤减轻 MCAO/R 大鼠脑组织病理损伤

Sham 组大鼠脑组织形态和结构未见异常, 细胞完整、排列整齐; MCAO/R 组大鼠脑组织可见细胞水肿, 数量减少、形态不规则, 核固缩、空泡变性等病理学改变; 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组和 NBP 组脑组织病变程度减轻, 细胞数量增多, 细胞排列较整齐, 且 BYHWD 组与 NBP 组病理损伤程度相当 (图 3)。

2.4 补阳还五汤减轻 MCAO/R 大鼠脑水肿

左侧 (Left) 含水量结果, 与 Sham 组相比, MCAO/R 组含水量显著升高 ($P<0.01$); 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组和 NBP 组含水量明显下降 ($P<0.01$); 与 NBP 组相比, BYHWD 组含水量较低, 但两治疗

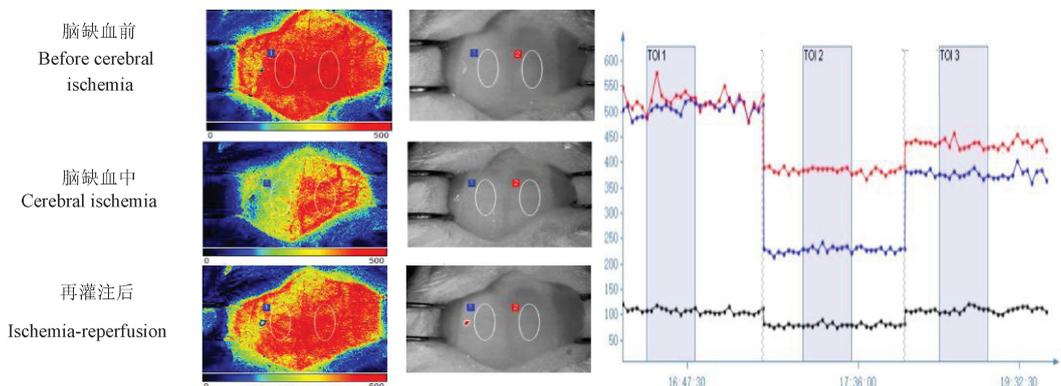
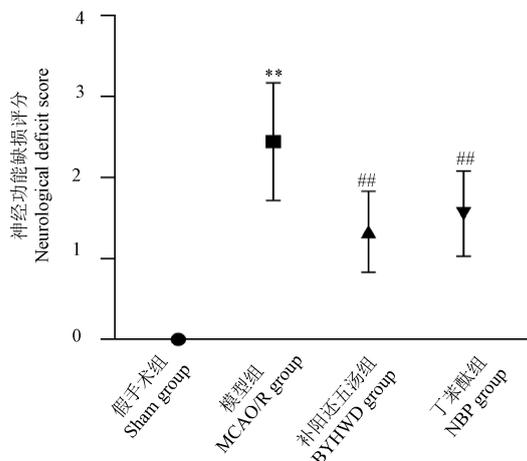


图 1 脑血流监测

Figure 1 Cerebral blood flow monitoring



注:与假手术组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠神经功能缺损评分 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. Compared with MCAO/R group, ## $P < 0.01$.

Figure 2 Neurological deficit score of rats in each group

组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。右侧 (Right) 脑含水量各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4)。

2.5 补阳还五汤降低 MCAO/R 大鼠血脑屏障通透性

与 Sham 组相比, MCAO/R 组的 EB 渗漏量升高, 提示 BBB 通透性明显上升, 具有显著性差异 ($P < 0.01$); 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组和 NBP 组的 EB 含量均显著下降, 说明 BBB 通透性降低 ($P < 0.01$); 与 NBP 组相比, BYHWD 组的 EB 含量较低, 但两治疗组间差异无意义 ($P > 0.05$, 图 5)。

2.6 补阳还五汤减轻 MCAO/R 大鼠血脑屏障超微结构损伤

Sham 组血脑屏障各组成部分未见损伤; 与 Sham 组相比, MCAO/R 组血脑屏障组成部分呈重度损伤: 血管外基质明显水肿, 内皮细胞水肿, 线粒体重度肿胀, 基质溶解, 嵴消失, 空泡变化, 基底膜稀疏, 厚薄不一, 内皮细胞间紧密连接明显变少、消失, 星形胶质细胞终足明显水肿, 大面积基质溶解; 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组和 NBP 组血脑屏障

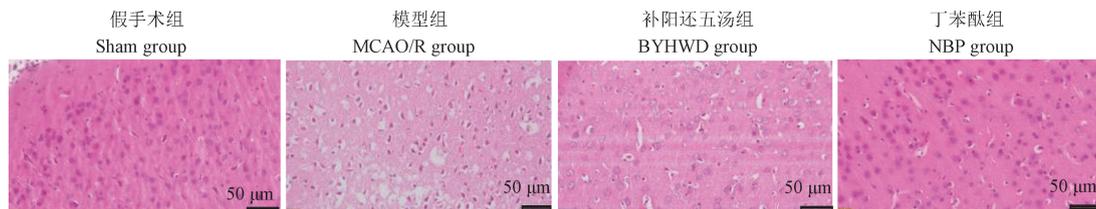
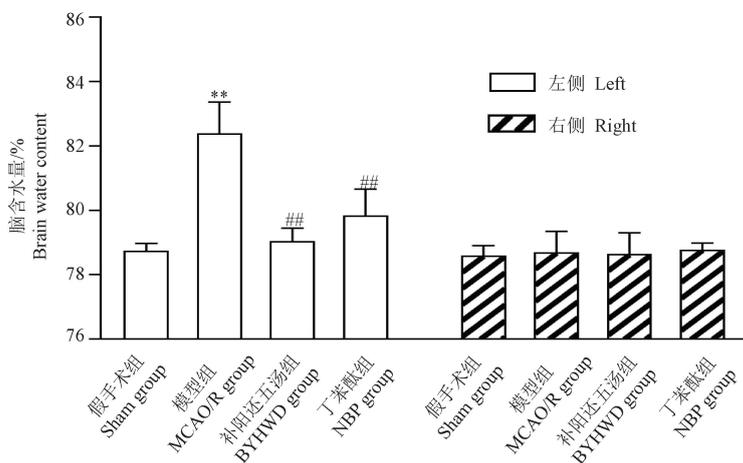


图 3 HE 染色观察各组大鼠脑组织病理变化

Figure 3 Pathological changes of brain tissue were observed by HE staining



注:与假手术组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 4 各组大鼠脑含水量 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Note. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. Compared with MCAO/R group, ## $P < 0.01$.

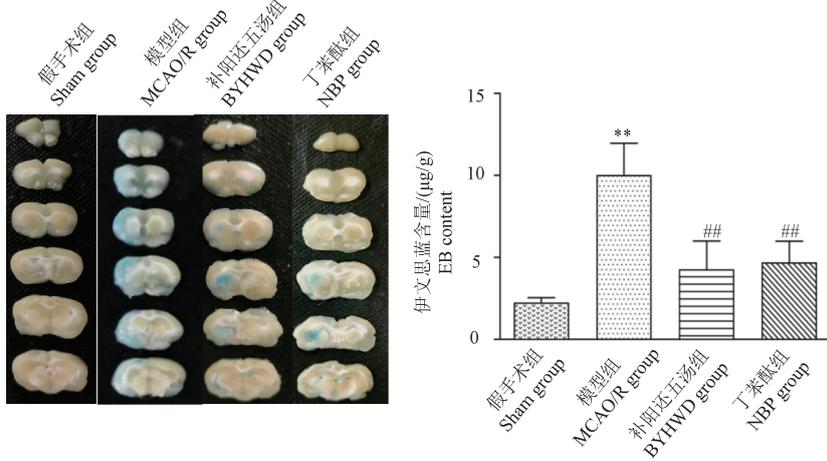
Figure 4 Brain water content of rats in each group

损伤程度较轻, 血脑屏障呈轻度损伤: 内皮细胞细胞膜完整, 呈长梭形, 细胞器轻度肿胀, 线粒体膜完整, 嵴减少, 局部基质变淡, 基底膜结构略显稀疏, 部分区域断裂, 内皮细胞间紧密连接致密区较长,

星形胶质细胞终足水肿较轻(图6)。

2.7 补阳还五汤减轻 MCAO/R 大鼠氧化应激损伤

结果见图7, 与Sham组相比, MCAO/R组的



注: 与假手术组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, ### $P < 0.01$ 。

图5 EB染色定量分析BBB通透性($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. Compared with MCAO/R group, ### $P < 0.01$.

Figure 5 Quantitative analysis of BBB permeability by EB staining

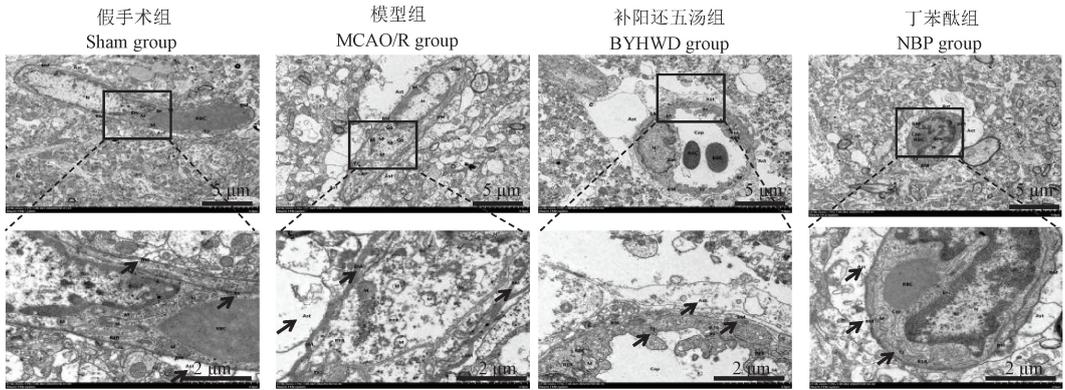
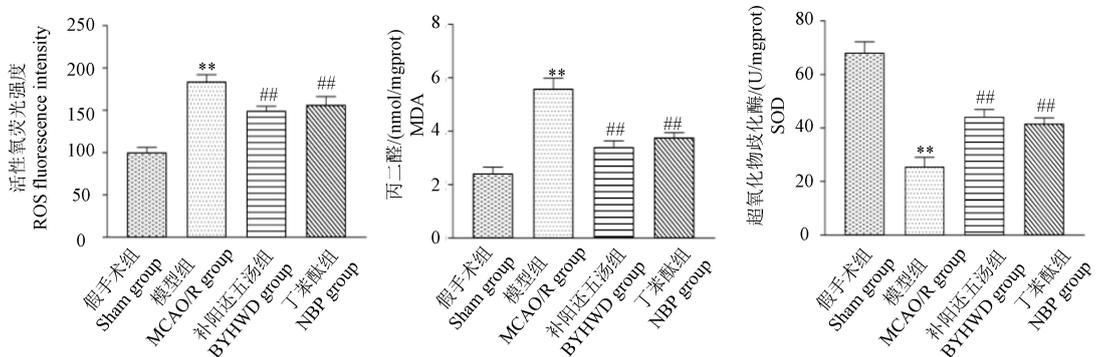


图6 血脑屏障超微结构

Figure 6 Ultrastructure of blood-brain barrier



注: 与假手术组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, ### $P < 0.01$ 。

图7 各实验组脑组织中ROS、MDA和SOD的含量($\bar{x} \pm s, n=3$)

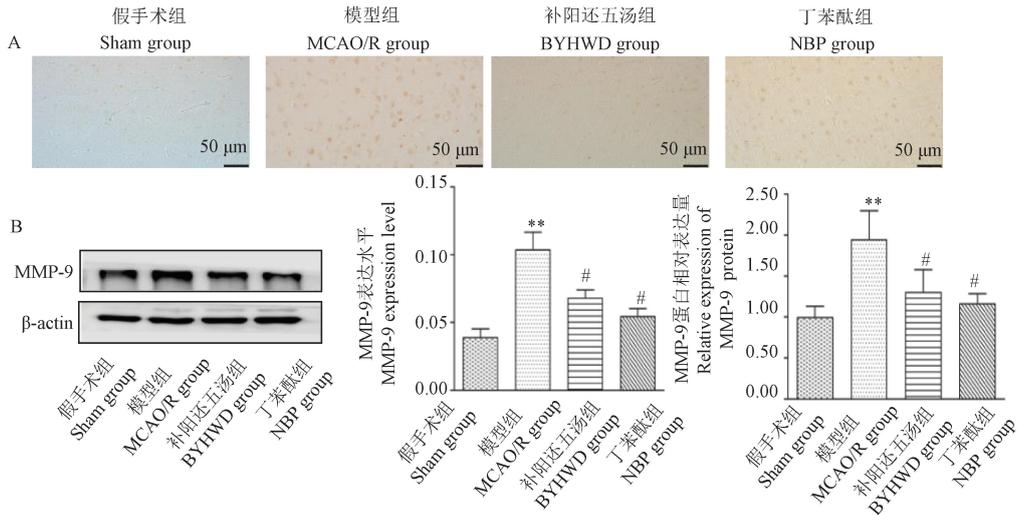
Note. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. Compared with MCAO/R group, ### $P < 0.01$.

Figure 7 Content of ROS, MDA and SOD in brain tissues of each experimental group

ROS 与 MDA 含量显著升高, SOD 含量显著降低 ($P < 0.01$); 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组和 NBP 组的 ROS 与 MDA 含量显著降低, SOD 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与 NBP 组相比, BYHWD 组的 ROS 与 MDA 含量较低, SOD 含量较高, 但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.8 补阳还五汤降低 MMP-9 蛋白的表达水平

与 Sham 组相比, MCAO/R 组的 MMP-9 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组和 NBP 组的 MMP-9 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 NBP 组相比, BYHWD 组的 MMP-9 表达略高, 但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 8)。

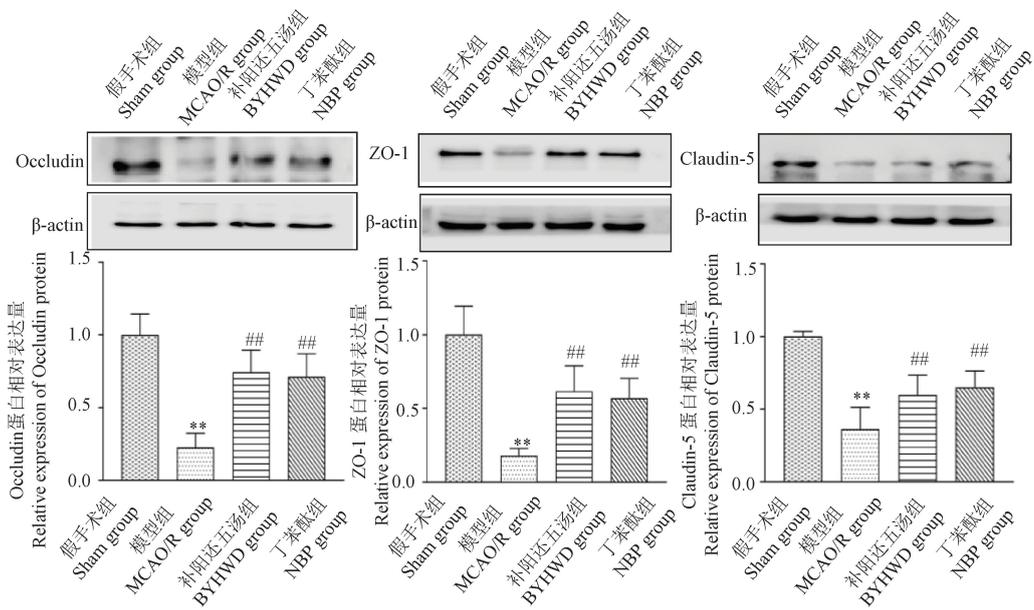


注: A: 免疫组化染色结果; B: Western blot 检测结果。与假手术组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 8 免疫组化染色及 Western blot 检测 MMP-9 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, Immunostaining result. B, Western blot result. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. Compared with MCAO/R group, # $P < 0.05$.

Figure 8 Expression levels of MMP-9 were determined by immunostaining and Western blot



注: 与假手术组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 9 ZO-1、Claudin-5 和 Occludin 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. Compared with MCAO/R group, ## $P < 0.01$.

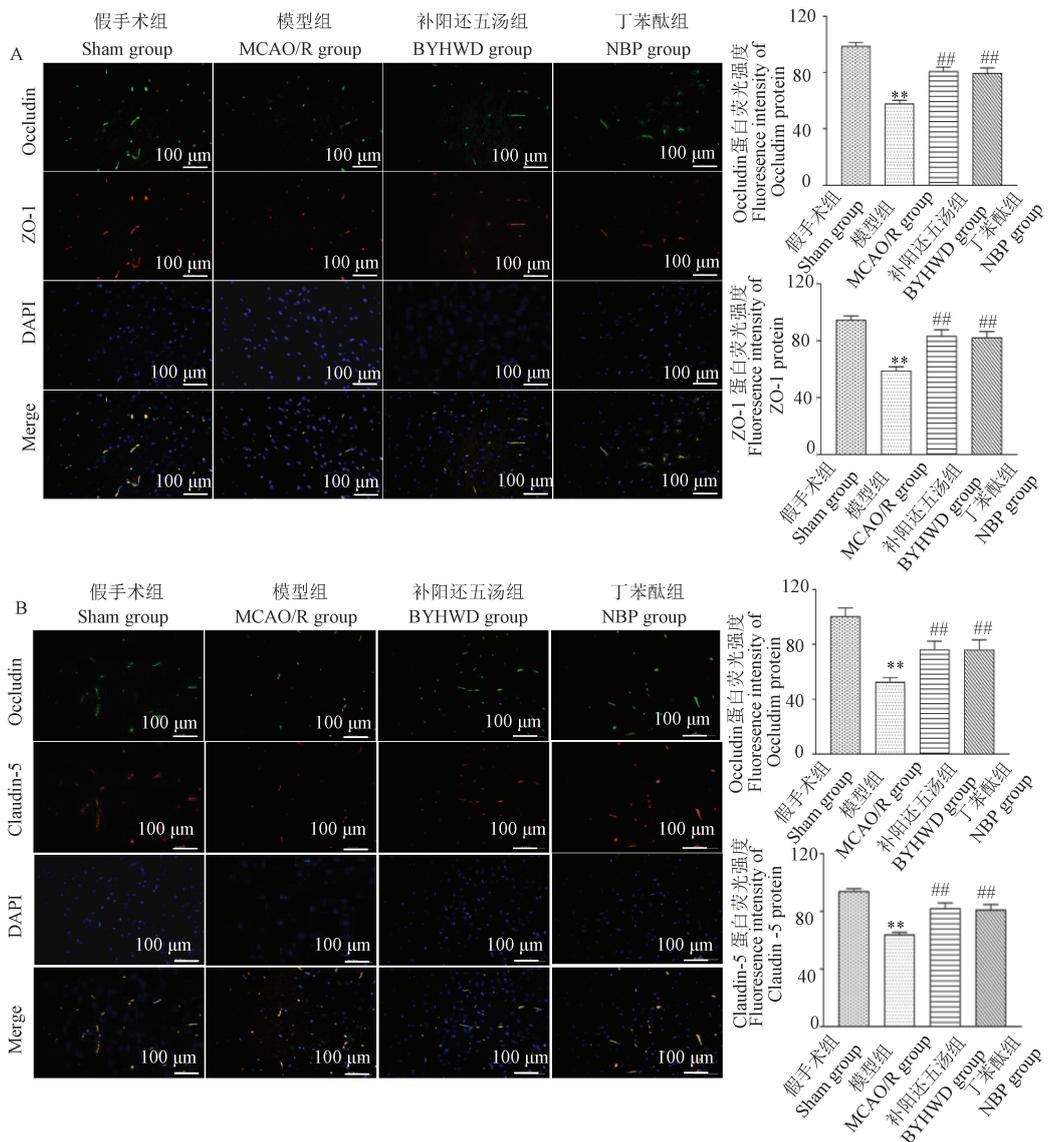
Figure 9 Protein expression levels of ZO-1, Claudin-5 and Occludin

2.9 补阳还五汤对紧密连接蛋白的表达水平的影响

与 Sham 组相比, MCAO/R 组的紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1、Claudin-5 的表达水平均有不同程度的下降($P < 0.01$); 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组及 NBP 组的 Occludin、ZO-1、Claudin-5 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$); 与 NBP 组相比, BYHWD 组的 Occludin、ZO-1 蛋白表达较高, Claudin-5 略低, 但两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.10 补阳还五汤对紧密连接相关蛋白的平均荧光强度的影响

结果见图 10, 与 Sham 组相比, MCAO/R 组的紧密连接蛋白 Occludin (绿光) 与 ZO-1 (红光)、Claudin-5 (红光) 平均荧光强度均有不同程度的下降($P < 0.01$); 与 MCAO/R 组相比, BYHWD 组及 NBP 组 Occludin、ZO-1、Claudin-5 的平均荧光强度显著升高($P < 0.01$); 与 NBP 组相比, BYHWD 组 Occludin、ZO-1、Claudin-5 的平均荧光强度较高, 但



注: A: Occludin 和 ZO-1 蛋白的荧光表达强度; B: Occludin 和 Claudin-5 蛋白的荧光表达强度。与假手术组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 10 Occludin 和 ZO-1、Claudin-5 蛋白的荧光表达强度($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note. A, Fluorescence expression intensity of Occludin and ZO-1 protein. B, Fluorescence expression intensity of Occludin and Claudin-5 protein. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. Compared with MCAO/R group, ## $P < 0.01$.

Figure 10 Fluorescence expression intensity of Occludin and ZO-1, Claudin-5 proteins

差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

BBB 由血管内皮细胞、内皮细胞间的紧密连接、基底膜、周细胞及星形胶质细胞突触末端终板组成^[15-16]。其中,脑血管内皮细胞间的紧密连接蛋白(tight junction protein, TJP)表达与排列对维持 BBB 结构完整性产生重要影响。CIRI 期间 TJP 表达降低,导致 BBB 通透性增加,有害物质进入脑组织,引发血管源性脑水肿,脑水肿作为 CIRI 的危重并发症,对患者的死亡率产生重大影响。Occludin 是 TJP 中的主要结构蛋白;Claudin-5 是 TJP 中的主要跨膜蛋白;ZO-1 是 TJP 中的重要连接枢纽,连接了跨膜蛋白与骨架蛋白。已有研究表明, Occludin、Claudin-5、ZO-1 蛋白的表达水平影响 BBB 的结构及通透性^[17-18]。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类高度进化保守的 Zn^{+} 依赖性内肽酶家族,可降解细胞外基质^[19],其中基质金属蛋白酶 9(MMP-9)在神经元等多种细胞中表达并参与多种生理病理过程。MMP-9 可以通过氧化和 S-亚硝基化被激活^[20],活化的 MMP-9 通过降解 TJP 破坏 BBB,诱发脑水肿。Montaner 等^[21]的研究发现 MMP-9 水平与急性缺血性脑卒中的 BBB 通透性及脑水肿的严重程度相关,李晒等^[22]实验表明 MMP-9 导致的脑水肿与其对 Occludin 蛋白的降解相关。可见, MMP-9 的激活诱导 TJP 的降解,造成 BBB 结构破坏,是引发脑水肿的关键机制。因此,抑制 MMP-9 的激活成为治疗 CIRI 后脑水肿的关键。

氧化应激反应是由于细胞氧化与抗氧化活性失衡导致的一种病理过程。中枢神经系统因其需氧量高,抗氧化损伤能力较差,极易受到氧化应激损伤的影响^[23]。缺血缺氧的脑组织恢复血供时, ROS 产生过多,超出 SOD 的代谢水平,引发氧化应激反应加重神经系统损伤^[24]。已有研究表明,过量的 ROS 在创伤性脑损伤、术后谵妄等中枢神经疾病的 BBB 功能障碍中起着关键作用^[25-26]。ROS 导致 BBB 功能障碍造成脑水肿,可能与其介导 MMPs 激活,导致 TJP 下调, BBB 通透性升高有关^[27]。目前,国内外学者对于 CIRI 病理学机制方面的研究相对独立,氧化应激、炎症反应、BBB 等发病机制相结合的研究较少,人体是一个复杂的整体,各种因素、机制、机理乃至通路、蛋白、靶点均具有内在的联系,

CIRI 病理生理学进程复杂,多种因素相结合的研究可以更深入、更全面探究 CIRI 病理学和有效药物的药理学机制。

中医理论认为,中风多由气虚血瘀导致,气不能运,血不能行,形成血瘀。血瘀是形成各种病理变化的基础,《血证论》中提到“瘀血化水,亦发水肿”。血液运行不畅,阻滞气机,气机不畅,不能行血,血中之津液成分不能在脉内正常运行渗透于脉外形成水肿。BYHWD 由黄芪、当归、赤芍、桃仁、川芎、红花和地龙 7 味中药材组成,具有补气、活血、通络的功效,此方用于治疗中风气虚血瘀证疗效显著,沿用至今。BBB 在脑组织中具有重要作用,能防止有害物质进入脑细胞,保护脑组织从而发挥正常的生理功能。中医理论中,“气血”是生命活动得以正常进行的根本,生命活动正常,组织细胞功能稳定又可以使气血充足。BYHWD“补气活血”的功效可能与维护 BBB 稳定性,恢复脑细胞生理功能密切相关。目前,虽然已有实验证明 BYHWD 能够减轻中风后的脑水肿,但是,涉及到 BYHWD 抑制氧化应激、恢复血脑屏障功能的研究还比较浅薄,没有挖掘更深入的机制和机理,其现代药理学机制尚不完全明确,仍有待更深入探究。本实验通过对 MCAO/R 大鼠的脑水肿程度的检测发现补 BYHWD 可以减轻 CIRI 大鼠脑水肿,进一步探讨其机制,结果表明, BYHWD 可以降低 CIRI 大鼠脑组织中 ROS、MDA 的含量,升高 SOD 的含量,降低氧化应激水平。氧化应激是多种病理学因素的始动环节,本研究发现, BYHWD 降低氧化应激的同时可以降低 MMP-9 的表达,升高 TJP 的表达水平。本研究将 BYHWD 降低氧化应激水平和恢复 BBB 功能进行结合研究,更深入挖掘了 BYHWD 的药理作用机制。综上所述, BYHWD 可以抑制氧化应激以及 MMP-9 的激活,保护血脑屏障结构和功能的完整性,可能是其发挥“补气活血通络”功效减轻脑水肿,改善 CIRI 的机制之一。

参考文献:

- [1] 赵继宗. 我国心脑血管共患疾病现状与临床研究 [J]. 首都医科大学学报, 2022, 43(5): 671-673.
ZHAO J Z. Current status and clinical research of brain-heart comorbid vascular diseases in China [J]. J Cap Med Univ, 2022, 43(5): 671-673.
- [2] 刘流, 张华, 莫永佳, 等. 缺血性脑卒中后脑水肿的研究进展 [J]. 中国当代医药, 2023, 30(7): 29-34.
LIU L, ZHANG H, MO Y J, et al. Research progress of cerebral

- edema after ischemic stroke [J]. *China Mod Med*, 2023, 30(7): 29-34.
- [3] Li M, TANG H, LI Z, et al. Emerging treatment strategies for cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neuroscience*, 2022, 507: 112-124.
- [4] 张志刚, 范小璇, 连露露, 等. 芳香开窍药对血脑屏障通透性调控作用的研究进展 [J]. *环球中医药*, 2022, 15(8): 1510-1516.
- ZHANG Z G, FAN X X, LIAN L L, et al. The research progress about the effect of Aromatic on the regulation of blood brain barrier permeability [J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2022, 15(8): 1510-1516.
- [5] 王征, 吴建华, 方云祥, 等. 脑脉泰胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤血脑屏障和脑水肿的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(19): 1483-1487.
- WANG Z, WU J H, FANG Y X, et al. Effect of Naomaitai capsules on rat blood-brain barrier and cerebral edema induced by cerebral ischemic reperfusion injury [J]. *Chin Pharm J*, 2009, 44(19): 1483-1487.
- [6] 谢明, 朱俊德, 周璐, 等. 依达拉奉对大鼠脑缺血再灌注损伤后氧化应激及凋亡的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2021, 37(4): 418-424.
- XIE M, ZHU J D, ZHOU L, et al. Effects of edaravone on oxidative stress and apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Neuroanat*, 2021, 37(4): 418-424.
- [7] 夏杰玲, 黄年正. 补阳还五汤治疗中风(中经络-气虚血瘀)的临床疗效分析 [J]. *系统医学*, 2022, 7(17): 1-4.
- XIA J L, HUANG N Z. Analysis of clinical efficacy of Buyang Huanwu Decoction in the treatment of stroke(middle meridian-qi deficiency and blood stasis) [J]. *Syst Med*, 2022, 7(17): 1-4.
- [8] 李梦. 补阳还五汤在缺血性脑血管病中的临床应用 [J]. *浙江中医杂志*, 2022, 57(6): 456.
- LI M. Clinical application of Buyanghuanwu Decoction in ischemic cerebrovascular disease [J]. *Zhejiang J Tradit Chin Med*, 2022, 57(6): 456.
- [9] 李磊, 图门巴雅尔, 宁康健, 等. 黄芪甲苷脑保护作用研究进展 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2017, 38(6): 62-65.
- LI L, TU M, NING K J, et al. Research progress on cerebral protection of astragaloside IV [J]. *Anim Husb Feed Sci*, 2017, 38(6): 62-65.
- [10] 马秀娟, 赵艳萌, 王文良, 等. 补阳还五汤通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路调控自噬减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(1): 147-152.
- MA X J, ZHAO Y M, WANG W L, et al. Buyang Huanwu Decoction attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by regulating autophagy through AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2022, 38(1): 147-152.
- [11] 辛紫媛, 靳晓飞, 周晓红, 等. 补阳还五汤通过 SIRT1/NF- κ B 信号通路减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(8): 1454-1462.
- XIN Z Y, JIN X F, ZHOU X H, et al. Buyang-Huanwu decoction reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through SIRT1/NF- κ B p65 signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(8): 1454-1462.
- [12] 马阳. 丁苯酞对慢性脑低灌注大鼠的认知功能及血脑屏障的影响 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- MA Y. Effects of butylphthalide on cognitive function and blood-brain barrier in rats with chronic cerebral hypoperfusion [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2020.
- [13] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] 李琳瑶, 岳志伟, 刘丽, 等. 脑水肿干湿度法的测定条件分析 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(3): 282-283.
- LI C Y, YUE Z W, LIU L, et al. Measuring condition analysis of dry/wet weight method of brain edema determination [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2016, 32(3): 282-283.
- [15] 申杰, 徐桂华. 血脑屏障与中枢神经系统疾病的相关性研究进展 [J]. *中华神经医学杂志*, 2020, 19(9): 961-965.
- SHEN J, XU G H. Recent advance in relation between blood-brain barrier and central nervous system diseases [J]. *Chin J Neuromed*, 2020, 19(9): 961-965.
- [16] 郑明华. 载脂蛋白 E 对实验性自身免疫脑脊髓炎血脑屏障通透性的影响 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.
- ZHENG M H. Effect of apolipoprotein E on permeability of blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2014.
- [17] 杨丽娟. 甲基苯丙胺调节紧密连接结构蛋白的表达改变血脑屏障通透性 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(6): 1172.
- YANG L J. Methamphetamine regulates the expression of tight junction structural protein and changes the permeability of blood-brain barrier [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2008, 24(6): 1172.
- [18] 阚红军, 刘丛华, 孙保中, 等. 右美托咪定复合羟考酮对高血压脑出血大鼠模型血脑屏障的保护作用及机制研究 [J]. *解剖科学进展*, 2022, 28(4): 424-428.
- KAN H J, LIU C H, SUN B Z, et al. Protective effect and mechanism of dexmedetomidine combined with oxycodone on blood-brain barrier in hypertensive intracerebral hemorrhage rat model [J]. *Prog Anat Sci*, 2022, 28(4): 424-428.
- [19] 温晓洲, 孙爱华, 李广平, 等. 基质金属蛋白酶 9 的研究进展 [J]. *岭南急诊医学杂志*, 2021, 26(2): 216-218.
- WEN X Z, SUN A H, LI G P, et al. Research progress of matrix metalloproteinase 9 [J]. *Lingnan J Emerg Med*, 2021, 26(2): 216-218.
- [20] CHANG M, NGUYEN T T. Strategy for treatment of infected diabetic foot ulcers [J]. *Acc Chem Res*, 2021, 54(5): 1080-1093.
- [21] MONTANER J, RAMIRO L, SIMATS A, et al. Matrix metalloproteinases and ADAMs in stroke [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(16): 3117-3140.