

三化汤及其拆方对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制

巩子汉¹, 李雯洁², 孙明杰^{2*}, 黄颖^{2*}

(1. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 中国中医科学院 医学实验中心, 中医药防治重大疾病基础研究北京市重点实验室, 北京 100700)

[摘要] **目的:**观察三化汤及其拆方对脑缺血再灌注大鼠脑组织的保护作用,探讨三化汤的作用机制及其组方配伍特点。**方法:**将140只清洁级SD大鼠随机分为正常组,假手术组及模型组,造模组采用Longa线栓法制作大鼠脑缺血再灌注损伤(CIRI)动物模型,后按照随机数字表法分为模型组,尼莫地平组,三化汤去羌活组,羌活组及三化汤组,灌胃给药5 d。采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法检测各组大鼠脑组织梗死面积,苏木素-伊红(HE)染色及电镜检测各组大鼠脑组织病理变化情况,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测脑组织紧密连接闭合蛋白-5(Claudin-5),咬合蛋白(Occludin)及闭锁小带蛋白-1(ZO-1) mRNA表达水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织Claudin-5, Occludin及ZO-1蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠脑组织梗死灶显著,病理形态及超微结构改变明显, Claudin-5, Occludin及ZO-1 mRNA及蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,尼莫地平组、三化汤组大鼠脑组织梗死面积显著降低($P<0.01$),病理损伤减轻;三化汤去羌活组及羌活组大鼠脑组织梗死面积及病理改变有减小趋势,差异无统计学意义;与模型组比较,尼莫地平组、三化汤组、羌活组大鼠脑组织Claudin-5, Occludin, ZO-1 mRNA及蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与三化汤去羌活组比较,羌活组大鼠脑组织Claudin-5, ZO-1 mRNA及蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**三化汤对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与调节Claudin-5, Occludin及ZO-1表达,改善血脑屏障的功能密切相关。其中羌活可能在三化汤保护大鼠脑缺血再灌注损伤中发挥了重要作用。

[关键词] 三化汤; 羌活; 脑缺血/再灌注; 血脑屏障; 紧密连接闭合蛋白-5(Claudin-5); 咬合蛋白(Occludin); 闭锁小带蛋白-1(ZO-1)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0011-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220102

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20211111.1533.002.html>

[网络出版日期] 2021-11-15 9:33

Protective Effect and Mechanism of Sanhuatang and Its Modifications on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

GONG Zi-han¹, LI Wen-jie², SUN Ming-jie^{2*}, HUANG Ying^{2*}

(1. *Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*; 2. *Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, China Academy of Chinese Medical Sciences, Medical Experiment Center, Beijing Key Laboratory of Research of Chinese Medicine on Prevention and Treatment for Major Diseases, Beijing 100700, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of Sanhuatang and its modifications on the brain tissue of rats exposed to cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) and explore its action mechanism and compatibility characteristics. **Method:** One hundred and forty SD male rats of clean grade were randomly

[收稿日期] 20210825(020)

[基金项目] 北京市自然科学基金面上项目(7192142);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ2018005)

[第一作者] 巩子汉,在读博士,从事中医药方证相关基础研究, E-mail: 1217253647@qq.com

[通信作者] *孙明杰,研究员,硕士生导师,从事中药药理及中医方剂学基础研究, E-mail: sunmj62@tom.com;

*黄颖,副研究员,硕士生导师,从事中医药防治心脑血管疾病研究, E-mail: huangying0518@126.com

divided into the control group, sham-operation group, and operation group. The Longa suture method was employed to establish the CIRC model. The successfully modeled CIRC rats were further divided into five groups, namely the model group, nimodipine group, Sanhuatang without *Notopterygii Rhizoma et Radix* group, *Notopterygii Rhizoma et Radix* group, and Sanhuatang group, and treated with the corresponding medicines by gavage for five days. The cerebral infarct size in each group was examined by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, and the pathological changes in the brain tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and electron microscopy. The mRNA and protein expression levels of Claudin-5, Occludin, and zonula occludens-1 (ZO-1) in brain tissues were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** Compared with the control group, the model group exhibited markedly increased infarct size, obvious changes in brain morphology and ultrastructure, and down-regulated mRNA and protein expression of Claudin-5, Occludin, and ZO-1 ($P<0.01$). Compared with the model group, both nimodipine and Sanhuatang significantly decreased the infarct size ($P<0.01$) and relived the pathological changes. The infarct sizes in the Sanhuatang without *Notopterygii Rhizoma et Radix* group and *Notopterygii Rhizoma et Radix* group were reduced without exhibiting a statistically significant difference. The mRNA and protein expression levels of Claudin-5, Occludin, and ZO-1 in the nimodipine group, Sanhuatang group, and *Notopterygii Rhizoma et Radix* group were up-regulated significantly in comparison with those in the model group ($P<0.01$, $P<0.01$). The mRNA and protein expression levels of Claudin-5 and ZO-1 were higher in the *Notopterygii Rhizoma et Radix* group than in the Sanhuatang without *Notopterygii Rhizoma et Radix* group ($P<0.01$, $P<0.01$). **Conclusion:** Sanhuatang exerts the protective effect against CIRC in rats possibly by regulating the expression of Claudin-5, Occludin, and ZO-1 and improving the blood-brain barrier function. *Notopterygii Rhizoma et Radix* in Sanhuatang may play an important role in the protection of rats from CIRC.

[Keywords] Sanhuatang; *Notopterygii Rhizoma et Radix*; cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRC); blood-brain barrier; Claudin-5; Occludin; zonula occludens-1 (ZO-1)

缺血性脑卒中最常见的卒中类型,其发病率呈逐年上升趋势,严重危害人们健康。脑缺血发生后各种炎症因子表达水平升高,引发血脑屏障(BBB)完整性损害,通透性增加,血管内的有害成分渗出到脑组织内^[1]。BBB是维持中枢神经系统微环境稳定的重要结构,其完整性是中枢神经系统发挥生理功能的重要保证。多种因素共同参与调节BBB结构和功能,其中细胞间连续紧密连接(TJs)是保证BBB选择性通透的重要结构之一,TJs是由相邻细胞膜外层通过特异性的跨膜蛋白彼此融合构成的闭锁结构,位于脑微血管内皮细胞(BMECs)间^[2],主要由跨膜蛋白[闭合蛋白(Claudin)家族,咬合蛋白(Occludin)家族],胞质附着蛋白闭锁小带蛋白家族(ZOs)及细胞骨架蛋白等多种蛋白构成^[3],具有调节BBB通透性的作用^[4]。

三化汤出自金元·刘完素《黄帝内经·素问病机气宜保命集·中风论第十》,有祛风理气、通腑导滞之功效,可用于治疗急性脑卒中。现代研究表明三化汤能有效减轻大鼠脑缺血再灌注损伤(CIRC),对CIRC大鼠脑组织具有保护作用^[5-6]。本研究采用

Longa线栓法制作大鼠脑中动脉CIRC动物模型,检测脑组织紧密连接蛋白如Claudin-5, Occludin及胞质附着蛋白ZO-1的表达水平,研究CIRC后三化汤对BBB功能的保护作用及其可能机制,并在此基础上探讨三化汤的组方配伍特点。

1 材料

1.1 动物 雄性SPF级SD大鼠140只,体质量(260±20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[动物合格证号SCXK(京)2016-0006],相对湿度45%~55%,室温22~25℃,自由饮水进食。实验动物处理遵守中国中医科学院医学实验中心实验动物伦理委员会的伦理要求。

1.2 药物 中药饮片:枳实20g,厚朴20g,大黄20g,羌活20g组成,购自北京同仁堂药店,由中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》(一部)规定。称取药材,加入蒸馏水浸泡30min,武火沸腾后文火继续煎煮30min后取滤液,将药材残渣中加入水继续煎煮,合并2次水煎液,浓缩至含生药1g·mL⁻¹,冷藏备用。三化汤去羌活组去除羌活,煎煮方法同

上。羌活组药液为单味羌活,煎煮方法同上。尼莫地平片(天津市中央药业有限公司,批号H20043915)。

1.3 试剂 大鼠MCAO线栓(北京西浓科技有限公司,批号2838-A4);RIPA裂解液,二喹啉甲酸(BCA)定量试剂盒,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒,增强型化学发光(ECL Plus)超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为R0010,PC0020,P1200,PE0010);一步法快速蛋白免疫印迹法(Western blot)辣根过氧化物酶(HRP)试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号CW2029M);Claudin-5, Occludin抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab131259, ab168986);ZO-1抗体(美国Novus Biologicals公司,批号NBP1-85047);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号bs-10900R);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,北京西浓科技有限公司,批号409E033);苏木素-伊红(HE)染液(武汉谷歌生物科技,批号G1005);TRIzol(美国Thermo公司,批号15596026);mRNA逆转录试剂盒,mRNA扩增试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司,批号分别为A6002, A6010]。

1.4 仪器 CFX96™ Optics Module型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);DYCZ-40D型电泳仪(北京六一生物技术有限公司);5810R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Elx800型酶标仪(美国BioTek公司);Pro200型电动匀浆器(美国PRO Scientific公司);AR2130型分析天平(美国Ohaus公司);H7650型透射电镜(日本日立公司)。

2 方法

2.1 动物分组与造模制备 大鼠适应性饲养3 d后随机分为正常组、假手术组与造模组,造模成功后按随机数字表法分为模型组、尼莫地平组、三化汤去羌活组、羌活组及三化汤组。

采用Longa线栓法建立MCAO模型^[7],大鼠术前禁食不禁水12 h,采用1%戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉并备皮,取仰卧位,于颈部正中中线处做2.0~2.5 cm的纵形切口,用组织镊钝剥离皮下肌肉,暴露右侧颈动脉三角,沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉和筋膜,分离右侧颈总动脉(CCA),颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。然后在近心端结扎CCA,ECA,用小动脉夹暂时夹闭

CCA远心端近分叉部,然后在CCA近心端距分叉部4 mm处剪一小口,将带有石蜡头的栓线插入到CCA,轻推栓线达分叉处,松开小动脉夹,从血管分叉处进入ICA,当插入深度约在18 mm时稍遇阻力即停,于CCA远心端用缝合线结扎,用蘸有碘伏的医用棉签进行消毒,后缝合伤口消毒。术后1.5 h后将栓线拔出约1 cm,行再灌注。假手术组除不插入线栓外其余操作均与模型组相同。手术过程中遵循无菌操作的原则,术后给予抗感染及营养护理。造模后应用Zea-Longa五分制评分法对大鼠进行评分,评分在1~3分者视为造模成功,方可纳入后续实验。

2.2 给药方法 造模24 h后,给药剂量依据人临床常用量,按人与大鼠体表面积比率换算确定大鼠给药量并给药干预,三化汤、三化汤去羌活及羌活分别给予7.20,5.40,1.80 g·kg⁻¹·d⁻¹对应的中药浓缩液灌胃,尼莫地平组大鼠给予0.010 8 g·kg⁻¹·d⁻¹尼莫地平溶液灌胃,正常及模型组大鼠给予等量蒸馏水灌胃,1次/日,共5 d。

2.3 动物取材 末次给药后禁食不禁水24 h,1%戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉并处死大鼠取脑,部分用4℃生理盐水灌流后TTC染色;部分置于4%多聚甲醛及2.5%戊二醛固定液中,待病检;部分参考《大鼠立体定位图谱》,选取视交叉至脑桥属大脑中动脉供血区域为病灶区,截取并置于-80℃冰箱冻存备用。

2.4 指标检测

2.4.1 各组大鼠脑组织梗死面积检测 用4℃生理盐水灌流,取脑后冠状横切约6片。将切片浸泡于2%的TTC溶液中染色。用Image J软件计算TTC染色后呈现白色部位占脑半球之百分比。

2.4.2 HE染色观察大鼠脑区病理学损伤 将脑组织固定于4%多聚甲醛,常规脱水,石蜡包埋切片,HE染色,封片,置于光学显微镜下观察脑组织形态变化。

2.4.3 透射电镜观察脑微血管超微结构 取基底节区及皮质区组织,迅速放入2.5%戊二醛中,并将组织修成1 mm³的组织块,放入2.5%戊二醛(电镜级)中充分固定。经1%锇酸后固定,丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,透射电镜观察血管超微结构。

2.4.4 Real-time PCR检测各组大鼠脑组织Claudin-5, Occludin, ZO-1 mRNA表达水平 采用TRIzol法提取各组大鼠病灶组织总RNA,加入无核

酸酶水 30 μL 溶解总 RNA。使用核酸定量分析仪测定 RNA 浓度,且吸光度 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0。设置 cDNA 反转程序,PCR 扩增 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 基因片段。以 GAPDH 作为内参基因,反应体系及参数依据 Promage 试剂盒说明书设置,反应参数为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 40 循环。连续检测荧光并记录扩增曲线,采用样点拟合法分析结果得到目的基因和 GAPDH 的 C_t 值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
GAPDH	5'-CTGGAGAACTGCCAAGTATG-3'	121
	5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCT-3'	
Claudin-5	5'-CTGCCTTCTGGACCACAATA-3'	128
	5'-GGTAACAAAGAGTGCCACAAGC-3'	
Occludin	5'-TGTATGGCGGAGAGATGCAC-3'	134
	5'-TCCTCCAAAGATGCCCGTTC-3'	
ZO-1	5'-GGCTGTCTCAACTCTGTAAAA-3'	147
	5'-TATTCCGACATCATTCCACCAG-3'	

2.4.5 Western blot 检测各组大鼠脑组织 Claudin-5, Occludin 及 ZO-1 的蛋白表达水平 称取各组大鼠病灶组织,加入 RIPA 组织裂解液并充分匀浆,冰浴静置 10 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min(离心半径 86 mm),吸取上清,BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白含量。SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜并封闭孵育。Blocking buffer 室温封闭 5 min 后洗膜,稀释一抗 GAPDH (1:5 000), Claudin-5 (1:4 000), Occludin (1:1 000) 及 ZO-1 (1:1 000), 目标抗体室温孵育 45 min,洗膜 10 min。采用 ECL 化学发光法显影。采用 Image J 软件计算各条带灰度值,以目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值计算样品目的蛋白相对表达量,进行统计学分析。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐时用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐时用 Tambane's T^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CIRI 大鼠脑组织梗死面积的影响 与正常组比较,模型组大鼠脑组织梗死面积显著升高($P<0.01$);与模型组,尼莫地平、三化汤组大鼠脑组织梗

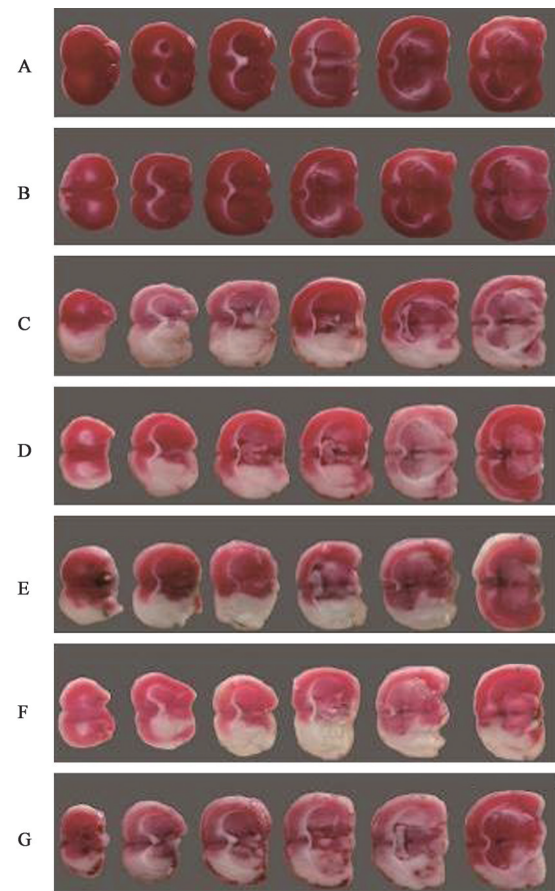
死面积明显降低($P<0.05, P<0.01$);三化汤去羌活、羌活组大鼠脑组织梗死面积有降低趋势,差异无统计学意义。见表 2,图 1。

表 2 三化汤及其拆方对 CIRI 大鼠脑组织梗死面积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Sanhuatang and its disassembled prescriptions on infarct area of brain tissue in CIRI rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	梗死面积/%
正常		0.00 \pm 0.00
假手术		0.00 \pm 0.00
模型		71.19 \pm 2.16 ¹⁾
尼莫地平	0.010 8	31.21 \pm 10.9 ^{1,3)}
三化汤去羌活	5.40	63.68 \pm 7.83 ¹⁾
羌活	1.80	58.83 \pm 9.65 ¹⁾
三化汤	7.20	37.30 \pm 16.16 ^{1,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。



A. 正常组;B. 假手术组;C. 模型组;D. 尼莫地平组;E. 三化汤去羌活组;F. 羌活组;G. 三化汤组(图 2~4 同)

图 1 三化汤及其拆方对 CIRI 大鼠脑组织梗死面积的影响

Fig. 1 Effect of Sanhuatang and its disassembled formula on cerebral infarction area of CIRI rats

3.2 对 CIRI 大鼠脑组织病理形态的影响 正常及假手术组大鼠脑组织形态基本正常,细胞结构完

整,细胞排列整齐,细胞核居中,核仁清晰,胞浆无红染。模型组大鼠缺血区脑组织大面积坏死,部分皮质区域呈高度疏松筛网状结构,细胞结构不清,脑组织细胞数量明显减少,神经元出现变性、坏死,

核固缩,核仁消失,胞浆红染。各给药组脑组织病理形态均得到了不同程度的改善,坏死灶明显减少,细胞排列趋于整齐。其中尼莫地平组、三化汤组的缺血侧脑组织结构改善最为明显。见图2。

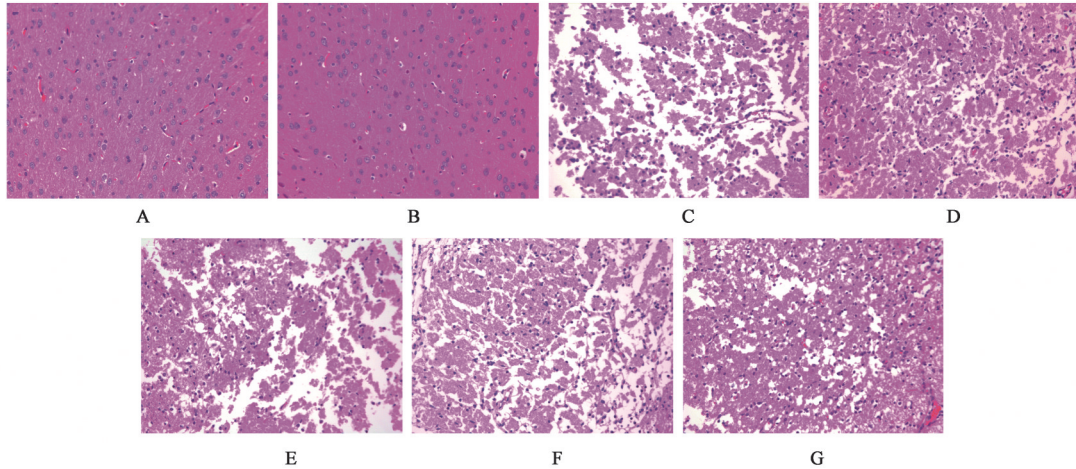


图2 三化汤及其拆方对CIRI大鼠脑组织病理结构的影响(HE,×40)

Fig. 2 Effect of Sanhuatang and its disassembled formula on pathological structure of brain tissue of CIRI rats (HE,×40)

3.3 对CIRI大鼠脑组织超微结构的影响 正常及假手术组大鼠大脑皮层神经元细胞形态正常,细胞器丰富,线粒体结构正常无肿胀,细胞间紧密连接存在。模型组大鼠大脑皮层神经元细胞结构疏松,轮廓不清晰,线粒体肿胀,数量减少,部分嵴断裂或

消失,细胞间紧密连接开放。各给药组脑组织结构有不同程度的改善。与模型组比较,尼莫地平组、羌活组、三化汤组微血管内皮完整,管腔正常,基底膜连续,线粒体数目增加,轻度肿胀,紧密连接部分开放。见图3。

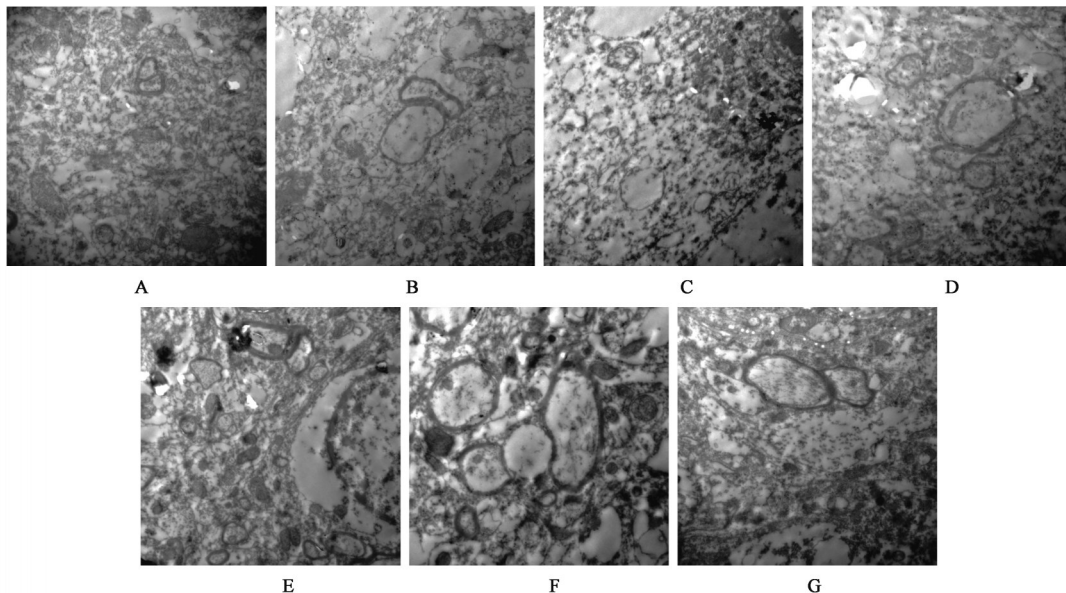


图3 三化汤及其拆方对CIRI大鼠脑组织超微结构的影响(扫描电镜,×20 000)

Fig. 3 Effect of Sanhuatang and its disassembled prescriptions on ultrastructure of brain tissue of CIRI rats (SEM, ×20 000)

3.4 对CIRI大鼠脑组织Claudin-5, Occludin及ZO-1 mRNA表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠脑组织病灶区Claudin-5, Occludin及ZO-1 mRNA表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,

尼莫地平组、羌活组及三化汤组大鼠脑组织病灶区Claudin-5, Occludin及ZO-1 mRNA表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);三化汤去羌活组大鼠脑组织病灶区Claudin-5, Occludin及ZO-1 mRNA表达水平

有升高趋势,但差异无统计学意义;与三化汤去羌活组比较,羌活组大鼠脑组织病灶区 Claudin-5 及

ZO-1 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$)。见表3。

表3 三化汤及其拆方对 CIRI 大鼠脑组织 Claudin-5, Occludin 及 ZO-1 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Sanhuatang and its disassembled prescriptions on expression levels of Claudin-5, Occludin and ZO-1 mRNA in brain tissue of CIRI rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Claudin-5	Occludin	ZO-1
正常		1.00±0.05	1.00±0.09	1.01±0.12
假手术		1.01±0.08	1.01±0.09	1.05±0.05
模型		0.65±0.04 ¹⁾	0.65±0.13 ¹⁾	0.70±0.09 ¹⁾
尼莫地平	0.010 8	1.10±0.10 ²⁾	0.83±0.25 ²⁾	0.96±0.03 ³⁾
三化汤去羌活	5.40	0.92±0.14	0.70±0.08	0.87±0.04
羌活	1.80	1.32±0.06 ^{3,5)}	0.81±0.10 ²⁾	1.09±0.12 ^{3,5)}
三化汤	7.20	1.15±0.04 ³⁾	0.90±0.07 ³⁾	1.01±0.14 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与三化汤去羌活组比较⁴⁾ $P<0.05$,⁵⁾ $P<0.01$ (表4同)。

3.5 对 CIRI 大鼠脑组织 Claudin-5, Occludin 及 ZO-1 蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠脑组织病灶区 Claudin-5, Occludin 及 ZO-1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,尼莫地平组大鼠脑组织病灶区 Claudin-5 及 ZO-1 蛋白表达水平显著升高,三化汤去羌活组大鼠脑组织病灶区

ZO-1 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$),羌活组、三化汤组大鼠脑组织病灶区 Claudin-5, Occludin 及 ZO-1 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05, P<0.01$);与三化汤去羌活组比较,羌活组大鼠脑组织病灶区 Claudin-5 及 ZO-1 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05, P<0.01$)。见表4,图4。

表4 三化汤及其拆方对 CIRI 大鼠脑组织 Claudin-5, Occludin 及 ZO-1 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effects of Sanhuatang and its disassembled formulas on expression levels of Claudin-5, Occludin and ZO-1 protein in brain tissue of CIRI rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Claudin-5/GAPDH	Occludin/GAPDH	ZO-1/GAPDH
正常		0.63±0.07	0.70±0.06	0.44±0.05
假手术		0.59±0.05	0.70±0.07	0.41±0.02
模型		0.34±0.03 ¹⁾	0.51±0.04 ¹⁾	0.31±0.02 ¹⁾
尼莫地平	0.010 8	0.43±0.06 ²⁾	0.59±0.07	0.36±0.04 ²⁾
三化汤去羌活	5.40	0.36±0.04	0.59±0.06	0.37±0.04 ²⁾
羌活	1.80	0.52±0.11 ^{3,5)}	0.60±0.10 ²⁾	0.46±0.05 ^{3,4)}
三化汤	7.20	0.43±0.08 ²⁾	0.73±0.09 ³⁾	0.36±0.04 ²⁾

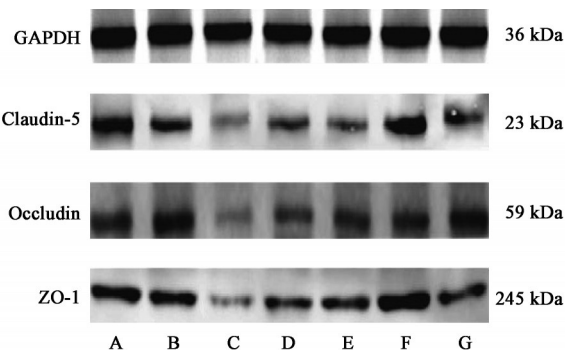


图4 各组大鼠脑组织相关蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoretic expression of related proteins in brain tissues of rats in each group

4 讨论

BBB 可防止血液中的有害物质进入大脑^[8],对有效维持中枢神经系统的微环境至关重要^[9]。CIRI 可破坏 BBB 结构和功能,从而引起继发性脑损伤^[10]。TJs 是 BBB 的重要组成部分,具有加强内皮细胞间的连接,封闭细胞间隙、调节物质扩散、参与细胞信号的传递等功能。紧密连接形成跨内皮电阻能够防止物质通过细胞旁路径进入脑实质^[11],极大地限制血液中化合物进入中枢神经系统。

Claudin-5 和 Occludin 是构成脑微血管内皮细胞中紧密连接蛋白中的特异性蛋白,直接参与 BBB

形成并维持BBB功能稳定^[12]。Claudins是紧密连接的关键整合膜蛋白,其中Claudin-5主要存在于脑毛细血管内皮细胞中,可以选择性地调节紧密连接,影响紧密连接的开放,是调节脑血管内皮细胞通透性最重要的因子之一^[13-14]。Claudin-5蛋白通过密闭的脑血管内皮细胞间隙形成血管之间联系,导致跨内皮电阻增高,对维持BBB低通透性具有至关重要的作用。

Occludin是第一个被分离出来组成紧密连接的完整的膜蛋白,在非神经系统的内皮细胞中表达较少,主要参与脑微血管内皮细胞上紧密连接的形成^[15]。其作用是连接跨膜蛋白和细胞骨架,封闭内皮细胞之间的间隙,在细胞间形成同源连接,控制通透性^[16]。Occludin缺失将导致细胞骨架破坏和细胞突起减少,影响肌动蛋白的收缩性^[17]。在缺血、炎症等情况下,Claudin-5蛋白与Occludin蛋白通过表达降低以及再分布两种方式影响BBB完整性^[18]。Claudin-5, Occludin蛋白表达下降可作为BBB损伤的标志^[19]。

ZO-1是膜结合鸟苷酸激酶同系物家族中唯一可形成高度稳定二聚体的蛋白,是与TJs相关的主要细胞质蛋白,对维持紧密连接的连续性和完整性发挥重要作用^[20]。ZO-1其作用是将Occludin和Claudins的COOH末端连接到潜在的肌动蛋白细胞骨架上,对形成细胞骨架、维持细胞极性等具有重要作用,ZO-1表达水平与BBB开放与关闭状态密切相关,其功能和结构的改变可导致TJs解离,继而引起细胞间隙和血管通透性增加^[21],ZO-1表达下调常提示BBB完整性受损。

本实验研究结果显示,模型组大鼠脑组织梗死灶显著,病理形态及超微结构改变明显,Claudin-5, Occludin, ZO-1含量明显降低,说明脑缺血再灌注后BBB结构和功能出现损伤。与模型组比较,三化汤能显著降低缺血再灌注大鼠脑组织梗死面积,对脑组织病理形态及超微结构具有改善作用,显著上调脑组织Claudin-5, Occludin及ZO-1 mRNA和蛋白的表达水平,由此推测三化汤对脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与调节脑组织Claudin-5, Occludin及ZO-1表达,进而减轻了BBB损伤密切相关。

此外,本研究结果发现,羌活能够上调脑组织Claudin-5及ZO-1 mRNA和蛋白的表达水平,对大鼠脑组织梗死面积具有一定改善趋势,提示羌活可能在大鼠脑组织梗死面积具有一定改善趋势,提示羌活可能在大鼠脑组织梗死面积具有一定改善趋势,提示羌活可能在大鼠脑组织梗死面积具有一定改善趋势。

可能通过调节不同途径在三化汤保护脑缺血再灌注损伤中发挥作用,其机制可在进一步研究中进行深入探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 陈红兵,刘一民,赵磊. 胡黄连苷Ⅱ对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及对AQP4、MMP-9表达的影响[J]. 中国中医急症, 2016, 25(1): 60-63.
- [2] 贺涓涓,洪华,杨世亮. 阿托伐他汀对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(2): 219-223.
- [3] 张楠,王思迪,涂盼春,等. 紧密连接相关蛋白对血脑屏障通透性影响的研究进展[J]. 沈阳医学院学报, 2017, 19(1): 72-75.
- [4] ZHAO L N, YANG Z H, LIU Y H, et al. Vascular endothelial growth factor increases permeability of the blood-tumor barrier via caveolae-mediated transcellular pathway [J]. J Mol Neurosci, 2011, 44(2): 122-129.
- [5] 樊凯芳,唐迎雪,李晓亮. 三化汤对脑缺血再灌注大鼠神经功能、脑含水量及脑组织病理改变的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 159-162.
- [6] 樊凯芳,李晓亮,梁晓东,等. 三化汤对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 181-184.
- [7] 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.
- [8] SHIN Y, CHOI S H, KIM E, et al. Blood-brain barrier dysfunction in a 3D *in vitro* model of Alzheimer's disease [J]. Adv Sci (Weinh), 2019, 6(20): 1900962.
- [9] ABDELNABY K, DAVID G, LEILA K. Plasma extracellular vesicles in children with OSA disrupt blood-brain barrier integrity and endothelial cell wound healing *in vitro* [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6233.
- [10] RUDY S, ROMAIN H, ARJAN B. A Mechanistic rationale for PDE-4 inhibitors to treat residual cognitive deficits in acquired brain injury [J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(3): 188-201.
- [11] HUBER J D, EGLETON R D, DAVIS T P. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier [J]. Trends Neurosci, 2001, 24(22): 719-725.
- [12] VOLKSDORF T, HEILMANN J, EMING S A, et al. Tight junction proteins claudin-1 and occludin are important for cutaneous wound healing [J]. Am J

- Pathol, 2017, 187(6): 1301-1312.
- [13] WANG J, CHEN J Q, TANG Z X, et al. The effects of copper on brain microvascular endothelial cells and claudin via apoptosis and oxidative stress [J]. Biol Trace Elem Res, 2016, 174(1): 132-141.
- [14] LI B, LI Y N, LIU K, et al. High glucose decreases claudins-5 and -11 in cardiac microvascular endothelial cells: antagonistic effects of tongxinluo [J]. Endocr Res, 2017, 42(1): 15-21.
- [15] UENO M. Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features [J]. Curr Med Chem, 2007, 14(11): 1199-206.
- [16] 赖佳薇, 赵逸彬, 焦俊玥, 等. 电针对脑微血管内皮细胞紧密连接调节作用研究进展 [J]. 新中医, 2019, 51(2): 229-232.
- [17] AYER R E, ZHANG J H. Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm [J]. Acta Neurochi Suppl, 2008, 104: 33-41.
- [18] WANG X, LIU Y, SUN Y, et al. Blood brain barrier break-down was found in non-infarcted area after 2-h MCAO [J]. J Neurol Sci, 2016, 363(1): 63-68.
- [19] YANG F, ZHOU L, WANG D, et al. Minocycline ameliorates hypoxia-induced blood-brain barrier damage by inhibition of HIF-1 α through SIRT-3/PHD-2 degradation pathway [J]. Neuroscience, 2015, 304(1): 250-259.
- [20] ABBOTT N J, PATABENDIGE A A, DOLMAN D E, et al. Structure and function of the blood-brain barrier [J]. Neurobiol Dis, 2010, 37(1): 13-25.
- [21] 张丽红, 郭敏芳, 张慧宇, 等. 黄芪糖蛋白对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠血脑屏障作用的研究 [J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(10): 878-882.

[责任编辑 周冰冰]

· 书讯 ·

新辅助化疗与中晚期乳腺癌患者 MMP-2 及 IL-8 表达的临床分析 ——评《乳腺癌合理用药指南》

新辅助化疗有别于传统辅助化疗,传统辅助化疗主要通过手术切除恶性肿瘤,其完整的化疗疗程要经过多个周期,可有效清除患者体内所残留的恶性肿瘤细胞,延长患者的生存寿命。但是,面对某些恶性肿瘤患者却无法使用传统辅助化疗彻底消除体内肿瘤细胞,而且一些恶性肿瘤细胞已经发生转移、局部肿块体积过大,所以采用手术疗法较难切除干净,只能相应缩小肿瘤体积,此时就需要采用新辅助化疗疗法,深度探究新辅助化疗疗法对当前乳腺癌患者的皮肤表皮生长因子分析必须到位。目前看来,新辅助化疗对乳腺癌组织中的基质金属蛋白酶-2(MMP-2),白细胞介素-8(IL-8)表达分析已经相当深入,基于二者的临床研究也非常到位,非常具有研究价值。

《乳腺癌合理用药指南》由国家卫生计生委合理用药专家委员会主编,人民卫生出版社2019年出版。该书共有六大章节,其中对乳腺癌病症的基本理论、乳腺癌的常用药物使用规范、治疗原则及规范、辅助治疗原则及规范、晚期乳腺癌治疗原则及规范、相关辅助用药原则与规范等进行了详细阐述,非常适合临床医师、药师阅读。书中提到了基于全国范围内所开展的乳腺癌合理用药治疗相关培训活动内容,专门针对乳腺癌的基本状况、诊断分析、总体治疗原则及合理用药等多方面展开叙述,对乳腺癌在新辅助化疗治疗的乳腺癌组织中 MMP-2、IL-8 的临床表达进行了相关研究。书中记载了20世纪70年代将新辅助化疗应用于临床,在杀灭肿瘤细胞、降低患者肿瘤负荷、缩小肿瘤体积、降低肿瘤分期方面,为获取肿瘤对治疗反应的信息提供了参考。从乳腺癌组织的雌激素受体(ER),孕激素受体(PR)及 MMP-2、IL-8 表达情况分析,其需要采用大量的内分泌治疗药物,合理判断乳腺癌在预后的化疗疗效、预测疗效评估水平,分析乳腺癌的不良预后因素。目的在于深度探讨其变化与化疗间相关性水平,这对于提高乳腺癌的综合治疗选择与预后评估都具有一定价值。在该书中专门提到了对乳腺癌组织中 MMP-2、IL-8 表达的方法,针对乳腺癌患者病例应该采用空心针活检,而病理诊断方面则诊断为浸润性乳腺癌,同时对其穿刺组织行中的 MMP-2、IL-8 表达变化指标进行测定;对患者采用新辅助化疗方法,在2~4个化疗周期后可评估化疗疗效,对乳腺癌患者予以改良根治手术或保乳手术,在手术后对本标再次进行 MMP-2、IL-8 表达测定。其化疗疗效的评定标准主要参考世界卫生组织(WHO)实体瘤评定标准,实施临床完全缓解与部分缓解的疗效评估分析,待患者病情稳定后再做统计分析。就 MMP-2、IL-8 的表达判定结果而言,主要基于细胞膜与细胞质进行分析,分析是否有超过25%的癌细胞胞膜被染色,染色间断分布的情况;再分析染色连续情况,环绕整个胞膜对病理完全缓解病情情况展开新辅助化疗疗法,了解 MMP-2、IL-8 的表达状态变化。通过一系列研究说明新辅助化疗在降低肿瘤细胞增殖活性方面表现突出,能直接诱导肿瘤细胞凋亡,目前已经成为了综合治疗乳腺癌的重要疗法。书中所制定的预测疗效与判断预后方案是非常有意义的,目前乳腺癌的新辅助化疗研究中最重要也最为活跃的一部分。

《乳腺癌合理用药指南》通过在全国范围内开展乳腺癌合理用药治疗的相关内容,将围绕乳腺癌的基本概况,发病情况,诊断与筛查,分期与治疗,合理用药等方面展开叙述。新辅助化疗后乳腺癌患者的 MMP-2 及 IL-8 的表达状态发生良性改变,其病理标本中的某些预后指标信息被有效规整,对临床工作该采取哪一种治疗措施提供了参考,《乳腺癌合理用药指南》是非常值得广大医务人员阅读的书籍。

[基金项目] 河北省邢台市科技局(2017ZC060)

(作者杜丽艳,国帅,宋爱林,马超,李小妹,宋小翠,曹晓静,邢台医专第一附属医院,河北 邢台 054000)