

· 药理 ·

注射用丹参多酚酸配伍注射用血栓通(冻干)通过抑制MMPs对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性的影响及机制

贾壮壮, 赵磊, 陈红阳, 袁庆, 殷孟兰, 徐耀, 王少峡, 柴丽娟, 胡利民*

(天津中医药大学, 天津中医药大学中医药研究院, 组分中药国家重点实验室, 天津市中药药理学重点实验室, 方剂学教育部重点实验室, 天津 301617)

[摘要] 目的:探究注射用丹参多酚酸配伍注射用血栓通(冻干)通过抑制金属基质蛋白酶(MMPs)对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障(BBB)通透性的影响及机制。方法:采用线栓法建立大鼠中动脉栓塞/再灌注(MCAO/R)模型。选取雄性Wistar大鼠60只,随机分为假手术组,模型组,依达拉奉组($6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),丹参多酚酸组($21\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),血栓通组($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),丹参多酚酸配伍血栓通组($21\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}+100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),尾静脉注射给药每日1次,连续2 d。采用神经功能(mNSS)评分法观察大鼠神经功能缺损情况;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠脑缺血半暗带组织病理学变化;Nissl染色及神经元特异核蛋白(NeuN)荧光染色检测缺血半暗带神经元损伤情况;免疫球蛋白G(IgG)/CD31免疫荧光双染观察缺血半暗带IgG渗漏情况;免疫荧光法观察紧密连接(TJs)相关蛋白Occludin, Claudin-5及基底膜(BM)相关蛋白IV型胶原(Col-IV),层粘连蛋白(LN),纤维连接蛋白(FN)表达情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测金属基质蛋白酶MMP-2, MMP-9蛋白表达情况。结果:与模型组比较,丹参多酚酸组、血栓通组、丹参多酚酸配伍血栓通组可显著改善大鼠脑缺血再灌注损伤神经功能缺损、组织形态学变化,并可抑制神经元损伤,减轻缺血半暗带IgG渗漏,明显升高TJs蛋白Claudin-5, Occludin及基底膜相关蛋白Col-IV, LN, FN表达($P<0.05, P<0.01$),明显降低MMP-2, MMP-9蛋白表达($P<0.05, P<0.01$);且配伍用药组疗效最佳,对各项指标均有明显的改善,改善程度优于丹参多酚酸或血栓通单独干预。结论:注射用丹参多酚酸、注射用血栓通(冻干)及两者配伍应用可减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,且配伍应用效果优于单独应用,其机制可能与通过抑制MMPs的表达减轻脑微血管内皮紧密连接蛋白及基底膜损伤,进而抑制缺血后BBB损伤有关。

[关键词] 注射用丹参多酚酸;注射用血栓通(冻干);脑缺血再灌注损伤;金属基质蛋白酶;紧密连接;基底膜;血脑屏障

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)19-0135-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202001

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200721.1401.007.html>

[网络出版日期] 2020-7-21 16:28

Effect of Salvianolate Lyophilized Injection and Xueshuantong Injection (Lyophilized) on Permeability of Blood-brain Barrier via Inhibition of MMPs in Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Rats

JIA Zhuang-zhuang, ZHAO Lei, CHEN Hong-yang, YUAN Qing, YIN Meng-lan, XU Yao, WANG Shao-xia, CHAI Li-juan, HU Li-min*

(Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Key Laboratory of Pharmacology of TCM Formulae under Ministry of Education, Tianjin University of TCM, Tianjin 301617, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong

[收稿日期] 20200217(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573644);“十·三五”期间天津市高等学校“创新团队培养计划”基金项目(TD13-5050)

[第一作者] 贾壮壮,在读博士,从事中医药防治心脑血管疾病及其机制研究, E-mail: jiazth@126.com

[通信作者] *胡利民,博士,研究员,从事中药药理研究, E-mail: hulimin@tjutcm.edu.cn

injection (lyophilized) on the permeability of blood-brain barrier (BBB) via inhibition of metalloproteinase (MMPs) in cerebral ischemia/reperfusion injury rats. **Method:** The focal cerebral ischemia/reperfusion model in rats was built by middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) technique. Male Wistar rats were randomly divided into sham operation group, ischemia/reperfusion (I/R) group, edaravone (Eda, 6 mg·kg⁻¹) group, salvianolate lyophilized injection (SLI, 21 mg·kg⁻¹) group, Xueshuantong (XST, 100 mg·kg⁻¹) group and SLI combined with XST (SLI+XST, 21 mg·kg⁻¹+100 mg·kg⁻¹) group. Drugs were injected via tail vein for 2 d, while sham group and I/R group were injected with the same amount of normal saline. Neurological deficit score, hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining were assessed 2 d after MCAO/R. The permeability of BBB was observed by the leakage of IgG/CD31. The expressions of Claudin-5, Occludin, collagen-IV (Col-IV), Laminin, Fibronectin were observed by immunofluorescence staining, and MMP-2 and MMP-9 were observed by Western blot. **Result:** Compared with the I/R group, SLI group, XST group and SLI+XST group showed improvements in neurological deficit score, HE staining and Nissl staining. The leakage of IgG was alleviated; The positive expressions of Claudin-5, Occludin, Col-IV, Laminin, Fibronectin in ischemic penumbra were significantly up-regulated, while the expressions of MMP-2 and MMP-9 were down-regulated. The effect in improving SLI combined with XST was much better than a single factor. **Conclusion:** Salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection (lyophilized) can alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury and exert the synergistic effect when they are used in combination. The mechanisms might be associated with the improvement in the permeability of blood-brain barrier by inhibiting MMPs in cerebral ischemia/reperfusion injury rats.

[Key words] salvianolate lyophilized injection; Xueshuantong injection (lyophilized); cerebral ischemia/reperfusion injury; matrix metalloproteinase; tight junction; basement membrane; blood-brain barrier

缺血性脑卒中是神经系统常见的疾病,具有高发病率、高致残率和高致死率的特点^[1],其病理机制包括缺血后炎症反应、氧化应激、兴奋性氨基酸毒性、细胞凋亡等^[2]。血脑屏障(BBB)作为血液和脑组织之间对物质通过具有相对选择性的动态界面,主要由血管内皮细胞,紧密连接(TJs),基底膜(BM),周细胞以及星形胶质细胞的终足共同构成^[3]。脑微血管内皮细胞是BBB的结构基础,其封闭特性可以部分归因于TJs^[4]。TJs存在于相邻血管内皮细胞之间,是BBB结构和功能基础,主要包括胞浆黏附蛋白ZO家族、跨膜蛋白和细胞骨架蛋白,跨膜蛋白又包括闭合蛋白(Claudin),咬合蛋白(Occludin)以及连接黏附分子^[5]。基底膜主要由IV型胶原蛋白(Col-IV),层粘连蛋白(LN),纤维连接蛋白(FN)等细胞外基质(ECM)构成。脑缺血性损伤后,金属基质蛋白酶(MMP)-2, MMP-9可降解脑血管ECM成分,减少TJs蛋白表达,内皮细胞之间结构破坏,基底膜各个组分破坏, BBB各组成部分空间构型解离,进而破坏BBB完整性,血管壁通透性增加^[6]。

中药丹参、三七粉为临床常用活血药对,二药

配伍后相辅相成,广泛应用于心脑血管疾病的治疗。其中丹参主要化学成分包括水溶性的酚酸类,如丹酚酸B,丹参素,迷迭香酸等,及脂溶性的二萜类,如丹参酮、隐丹参酮等^[7-8];三七的主要活性成分为三七总皂苷^[9]。现代药理研究显示,注射用丹参多酚酸及注射用血栓通(主要成分为三七总皂苷)可通过降低炎症反应、改善微循环障碍、促进血管新生等减轻脑缺血再灌注损伤^[10-13]。本文主要通过研究注射用丹参多酚酸配伍注射用血栓通(冻干)对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用,探讨二者配伍应用能否通过抑制脑缺血再灌注损伤后MMPs表达进而保护BBB功能,并起到协同增效的作用。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雄性Wistar大鼠60只,体重260~280 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。饲养于天津中医药大学实验动物中心,12 h/12 h光暗交替,自由饮水,温度18~26℃,湿度40%~60%。实验动物所有操作均严格按照天津中医药大学动物伦理委员会标准执行(批号TCM-LAEC2015028)。

1.2 药物及试剂 注射用丹参多酚酸(天津天士力

之骄药业有限公司,批号20180901);注射用血栓通(冻干,广西梧州制药股份有限公司,批号18080416);依达拉奉注射液(南京先声东元制药有限公司,批号80-170510);RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0013B);Nissl染色,苏木素-伊红(HE)染色试剂,BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为PC0020,PC0034,PC0018);CD31抗体,Col-IV抗体,LN抗体, FN抗体, MMP-2抗体, MMP-9抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab24590,ab6586,ab11575,ab2413,ab92536,ab38898);Occludin抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号sc-133256);Claudin-5抗体(美国Thermo公司,批号35-2500);NeuN抗体(美国CST公司,批号24307)。

1.3 仪器 170-3940型电泳仪(美国Bio-Rad公司);Trans-Blot型转膜仪(美国Invitrogen公司);Amersham imager 600型超灵敏多功能成像仪(美国General Electric公司);RM2135型病理切片仪,CM1950型冰冻切片仪(德国Leica公司);IX73型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 大鼠MCAO/R模型制备 采用改良线栓法^[14]建立MCAO/R模型,将大鼠吸入异氟烷麻醉后,仰卧固定于37℃恒温床,使用激光多普勒血流仪监测脑血流;将颈部正中备皮消毒,纵向切开,钝性分离颈总动脉(CCA),颈外动脉(ECA),颈内动脉(ICA),结扎ECA,暂时夹闭CCA及ICA,显微剪于ECA近心端做V形切口,将硅胶包被的尼龙线栓插入V形切口,缓慢推进,直至插入大脑中动脉,轻遇阻力即停止,观察激光多普勒监测脑血流急骤下降。栓塞1.5 h后将线栓拔出再灌,激光多普勒监测脑血流恢复。假手术组不进行插线栓操作,其余步骤同模型组。参考LONGA等^[14]的5级4分法进行神经功能评分,评分 ≥ 2 的大鼠为模型制备成功,可用于后续实验。

2.2 分组与给药 Wistar大鼠适应喂养1周后,采用随机数字表法将Wistar大鼠分为6组,假手术组,模型组,依达拉奉组($6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),丹参多酚酸组($21 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),血栓通组($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),丹参多酚酸配伍血栓通组($21 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}+100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),造模后3 h尾静脉注射给药,每日1次,连续给药2 d,假手术组与模型组给予相同容积生理盐水。

2.3 神经功能(mNSS)评分 观察各组大鼠神经功能情况,mNSS评分^[15]内容主要包括运动测试、感觉

测试、平衡测试、反射测试和异常运动5个方面,总分18分,神经功能受损越严重,得分越高。

2.4 Nissl染色及HE染色观察缺血大鼠半暗带组织形态变化 将大鼠吸入异氟烷麻醉后,仰卧开胸,经心尖灌流生理盐水,再缓慢灌注4%多聚甲醛溶液。将大鼠断头取脑,脑组织用4%多聚甲醛溶液固定过夜,然后将脑组织进行脱水、透明、浸蜡及包埋,做厚度 $5 \mu\text{m}$ 的冠状切片。将石蜡切片经脱蜡、复水后分别进行常规HE染色及Nissl染色,Olympus显微镜下观察组织形态。

2.5 免疫荧光法检测缺血半暗带免疫球蛋白(Ig)G渗漏,NeuN,TJs蛋白,BM相关蛋白表达 将大鼠脑冰冻切片用含0.5% Triton X-100的PBS溶液通透30 min后,置于煮沸的柠檬酸钠溶液中抗原修复,滴加正常山羊血清封闭30 min;在切片上滴加一抗,即NeuN(1:400),Occludin(1:100),Claudin-5(1:300),Collagen IV(1:400),LN(1:300),FN(1:300),CD31(1:400)抗体,放于湿盒内4℃孵育过夜;次日于37℃下避光孵育荧光二抗,使用DAPI溶液染核,滴加抗荧光淬灭封片剂;IgG/CD31免疫荧光双染检测IgG渗漏时需另孵育FITC标记的羊抗大鼠IgG。使用Olympus倒置荧光显微镜下,随机选取5个高倍视野拍照,统计阳性表达量。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测缺血半暗带MMP-9,MMP-2蛋白表达 提取各组大鼠脑缺血半暗带总蛋白,使用BCA法测蛋白浓度。采用SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,再将蛋白转移至PVDF转膜上,使用5%的脱脂奶粉封闭2 h后,分别加入MMP-9(1:1 000),MMP-2(1:1 000)一抗,4℃孵育过夜。次日孵育HRP标记的二抗1 h后,加入显影液。用超灵敏多功能成像仪曝光目的条带,采用Image J软件分析各目的蛋白/ β -actin的灰度值。

2.7 统计学方法 采用SPSS 21.0统计软件进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料若符合正态分布,采用单因素方差分析,组间差异采用LSD法;若不符合正态分布,则采用非参数检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对缺血再灌注大鼠神经功能评分的影响 与假手术组比较,模型组mNSS评分显著升高,神经功能缺损严重($P<0.01$);与模型组比较,丹参多酚酸组、血栓通组、配伍用药组、依达拉奉组mNSS评分神经功能评分显著下降($P<0.01$),且联合用药组mNSS评分低于丹参多酚酸组、血栓通组($P<0.01$),

神经功能缺损得到显著改善。见表1。

表1 丹参多酚酸配伍血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能评分mNSS的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on neurological deficit score in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	mNSS/分
假手术	10	-	0
模型	8	-	13.5±0.9 ¹⁾
依达拉奉	10	6	5.0±1.1 ³⁾
丹参多酚酸	9	21	8.9±0.9 ³⁾
血栓通	9	100	9.2±1.0 ³⁾
配伍用药	10	21+100	6.8±0.9 ^{3,5)}

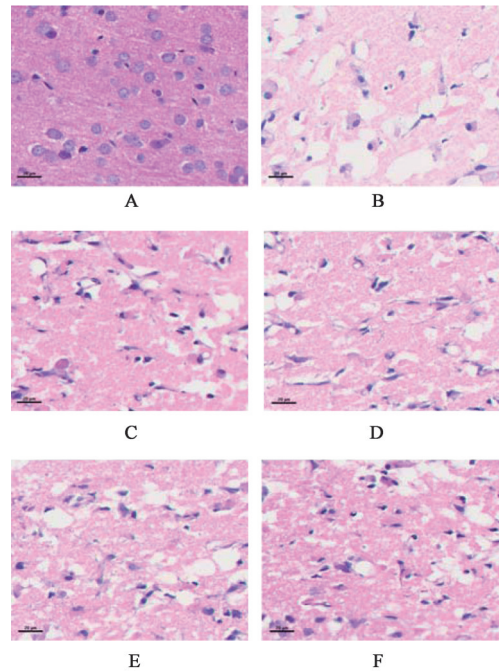
注:与假手术组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01;与丹参多酚酸或血栓通组比较⁴⁾P<0.05,⁵⁾P<0.01(表2~6同)。

3.2 对缺血再灌注大鼠缺血半暗带组织形态的影响 假手术组大脑皮层组织形态正常,细胞核清晰,染色均匀,细胞间隙致密;模型组细胞结构破坏,细胞排列不整齐,细胞核固缩,细胞间隙疏松;与模型组比较,依达拉奉组、丹参多酚酸组、血栓通组、丹参多酚酸配伍血栓通组形态学明显改善,正常细胞数量较多,结构较为完整,细胞核较为清晰,且二药配伍干预后形态学改善情况优于单独应用。见图1。

3.3 对缺血再灌注大鼠缺血半暗带神经元损伤的影响 Nissl染色显示,与假手术组比较,模型组神经元排列紊乱,结构异常,呈空泡样,正常Nissl体数目显著降低(P<0.01);NeuN阳性细胞表达数明显降低(P<0.01)。与模型组比较,各治疗组神经元形态明显好转,正常Nissl体数目增多,染色较均匀,NeuN阳性细胞表达数目增多(P<0.05, P<0.01);配伍用药组神经元数目多于丹参多酚酸组、血栓通组(P<0.05)。见图2,3,表2。

3.4 对缺血再灌注大鼠缺血半暗带IgG渗漏的影响 与假手术组比较,模型组IgG阳性染色明显增强(P<0.01),血管外可见明显的IgG阳性染色;与模型组相比,丹参多酚酸、血栓通及配伍应用干预后IgG阳性染色显著减弱(P<0.01),IgG阳性染色多位于血管内;且配伍应用优于单独应用(P<0.05)。见图4,表3。

3.5 对缺血再灌注大鼠缺血半暗带紧密连接蛋白的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑缺血半暗带Claudin-5阳性表达显著减少(P<0.01);与模型组比较,丹参多酚酸组、血栓通组及配伍应用组



A. 假手术组; B. 模型组; C. 依达拉奉组; D. 丹参多酚酸组; E. 血栓通组; F. 配伍用药组(图2,3同)

图1 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带组织形态改变的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on pathological change of penumbra in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury(HE, × 400)

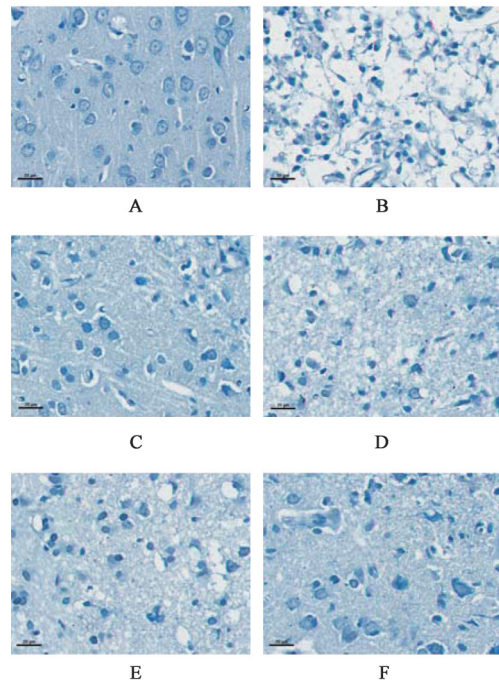


图2 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带Nissl染色的影响(Nissl, × 400)

Fig. 2 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on Nissl staining change of penumbra in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury (Nissl, × 400)

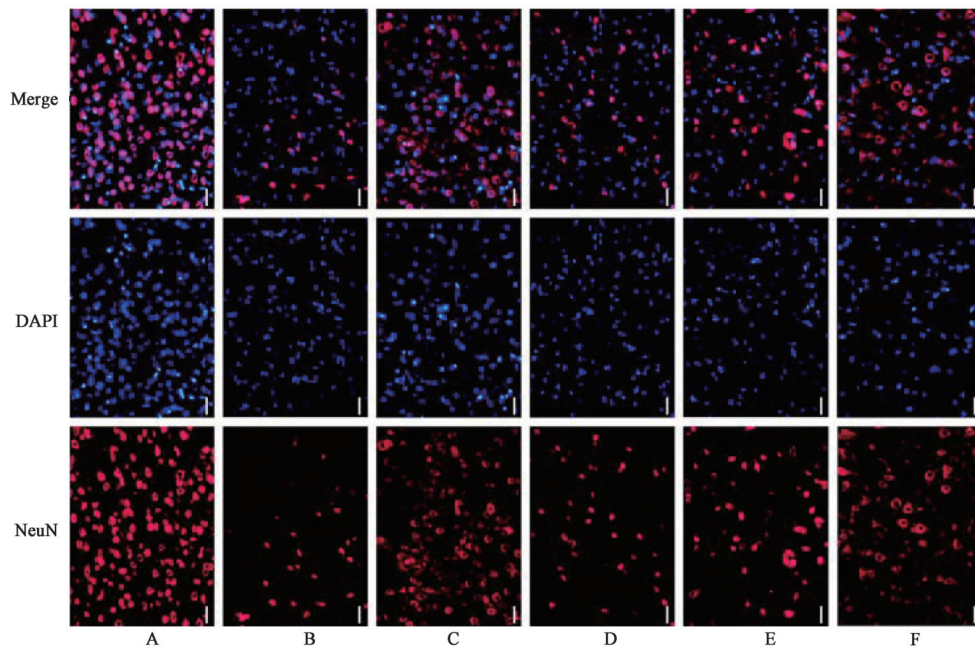


图3 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带 NeuN 的影响(IF, ×400)

Fig. 3 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on NeuN change of penumbra in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury(IF, ×400)

表2 丹参多酚酸配伍血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带神经元损伤的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on injury of neurons in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	Nissl小体 /个	NeuN 阳性细胞 /个
假手术	-	74.6±5.7	131.4±7.7
模型	-	35.2±5.5 ¹⁾	40.2±3.3 ¹⁾
依达拉奉	6	60.2±3.7 ³⁾	92.6±10.5 ³⁾
丹参多酚酸	21	52.4±7.5 ³⁾	50.2±6.2 ²⁾
血栓通	100	51.8±8.1 ³⁾	50.0±5.0 ²⁾
配伍用药	21+100	62.8±7.2 ^{3,4)}	60.8±4.2 ^{3,4)}

Claudin-5 阳性表达增多($P<0.01$),且配伍应用改善情况显著优于单独应用($P<0.01$)。Occludin 蛋白表达情况与 Claudin-5 表达一致。见图 5, 6, 表 4。

3.6 对缺血再灌注大鼠缺血半暗带基底膜损伤的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑缺血半暗带 Collagen IV 阳性表达显著减少($P<0.01$),微血管短而不连续;与模型组比较,丹参多酚酸组、血栓通组及配伍应用组 Collagen IV 阳性表达升高($P<0.01$),微血管连续性较好,且配伍应用改善情况明显优于单独应用($P<0.05$);LN, FN 蛋白表达情况与 Collagen IV 表达一致。见图 7~9,表 5。

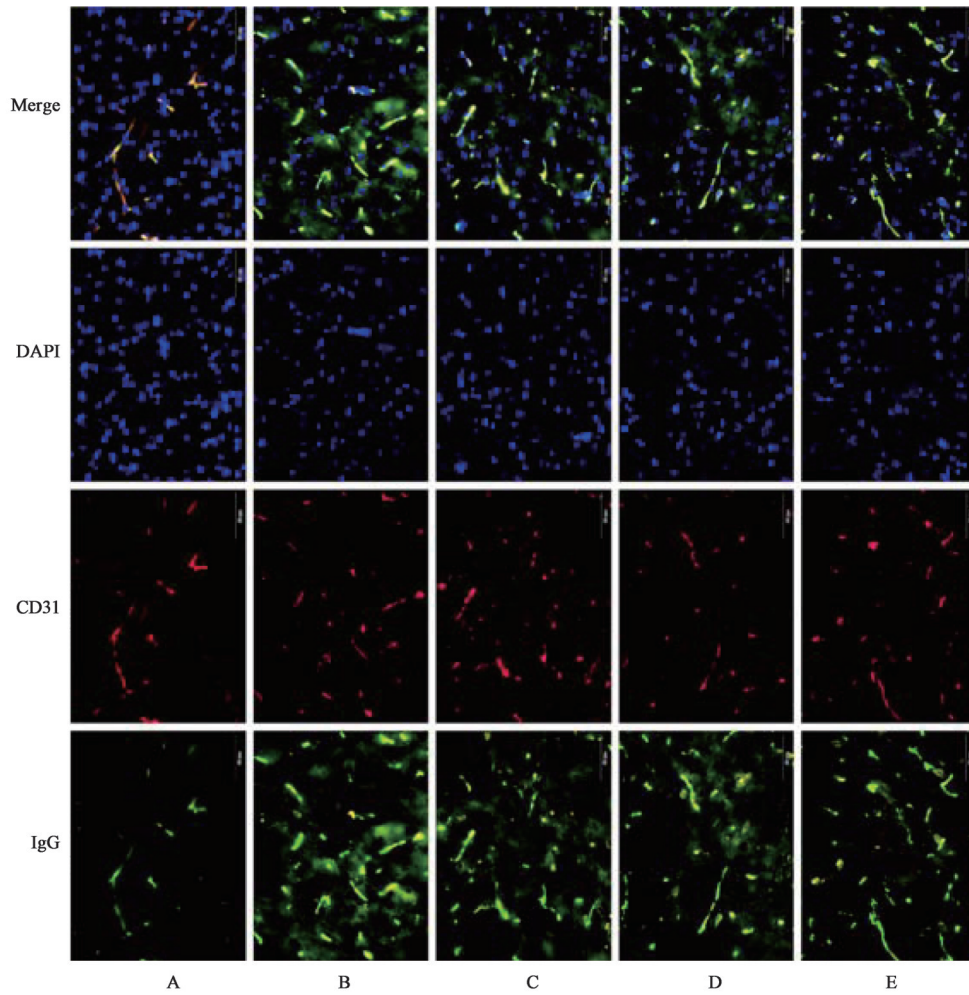
3.7 对缺血再灌注大鼠缺血半暗带 MMPs 蛋白表

达的影响 与假手术组比较,模型组脑缺血半暗带 MMP-2, MMP-9 表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,丹参多酚酸组、血栓通组及配伍用药组 MMP-2, MMP-9 表达降低($P<0.05, P<0.01$),且两药配伍干预后 MMP-2, MMP-9 改善情况优于单独应用($P<0.05$)。见图 10,表 6。

4 讨论

脑卒中目前已成为致死率仅次于缺血性心脏病的第二大致死性疾病,且以缺血性脑卒中为主。脑缺血损伤后可引发一系列病理反应^[16],其中包括 BBB 结构和功能的破坏, BBB 通透性增高可造成毛细血管内血浆蛋白与水分渗漏,进而引起血管源性脑水肿。

BBB 的屏障功能主要取决于毛细血管内皮细胞, TJs, BM, 星形胶质细胞的终足以及周细胞之间结构和功能的完整性^[17]。TJs 蛋白主要包括胞浆黏附蛋白 ZO 家族、跨膜蛋白和细胞骨架蛋白,跨膜蛋白又包括闭合蛋白 Claudin, 咬合蛋白 Occludin 以及连接黏附分子。Claudin, Occludin 及肌动蛋白是紧密连接复合体的重要组成部分,共同将跨膜蛋白锚定在形成细胞骨架的内皮细胞上^[18],共同参与调节 BBB 通透性,其表达降低可作为 BBB 结构损伤的重要标志^[19-21]。Occludin 是细胞极性蛋白,主要有栅栏作用和屏障调节功能;栅栏作用是把细胞膜分为顶侧的脂质部分和基侧的蛋白部分两个功能分区,



A.假手术组;B.模型组;C.丹参多酚酸组;D.血栓通组;E.配伍用药组(图5~10同)

图4 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带IgG渗漏的影响(IF, ×200)

Fig. 4 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on leakage of IgG in penumbra with cerebral ischemia/reperfusion injury rats(IF, ×200)

表3 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带IgG渗漏的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on leakage of IgG in penumbra with cerebral ischemia/reperfusion injury rats($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	荧光强度
假手术	-	2 182±508
模型	-	11 041±1 492 ¹⁾
丹参多酚酸	21	7 230±454 ³⁾
血栓通	100	7 172±510 ³⁾
配伍用药	21+100	5 972±445 ^{3,4)}

并阻止不同功能分区相互弥散,维持细胞极性;屏障调节作用是对跨膜物质具有相对选择性,调节细胞间物质运输。Claudin-5是血脑屏障TJs的特异性蛋白,是TJs形成的重要条件,直接决定血脑屏障的功能。

基底膜作为毛细血管的支持结构,介于内皮细胞与星形胶质细胞终足之间,构成血脑屏障的第二道屏障,主要由Collagen IV, LN, FN等ECM构成。LN作为ECM的重要成分,是胚胎发育中最早出现的ECM成分,与Collagen IV共同参与构成基底膜,并与细胞表面的特异性受体结合,使基底膜与细胞紧密结合,并参与维持细胞的极性,影响细胞的代谢、迁移、增殖等生理过程^[22]。由于基底膜是组成血脑屏障的重要成分之一,LN的变化可直接导致血脑屏障通透性的改变。FN作为基底膜的主要成分之一,与Collagen IV结合,将基底膜与周围组织以及细胞外间质相连^[23]。FN对维持BBB基底膜结构的完整性及功能活动至关重要^[24]。脑缺血再灌注损伤后,脑微血管基底膜3种成分均发生不同程度的降解,并且这3种成分对缺血性损伤的反应存在差异,其中Collagen IV与FN更为显著。脑缺血

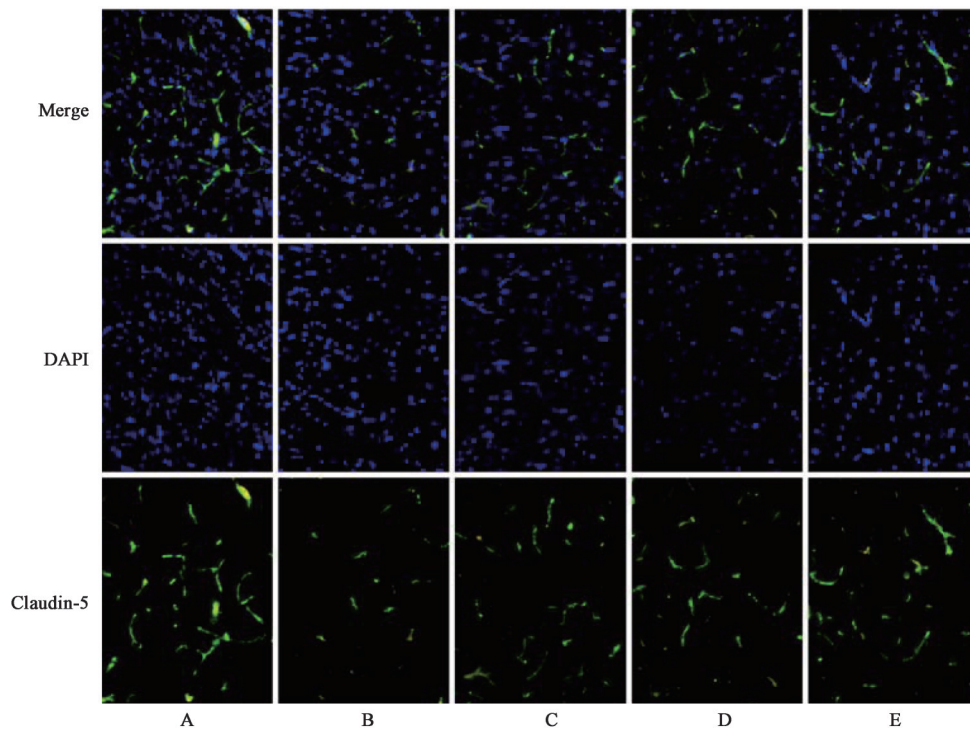


图5 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带 Claudin-5表达的影响(IF, × 200)

Fig. 5 Effect of salviaolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on Claudin-5 in penumbra with cerebral ischemia/reperfusion injury rats(IF, × 200)

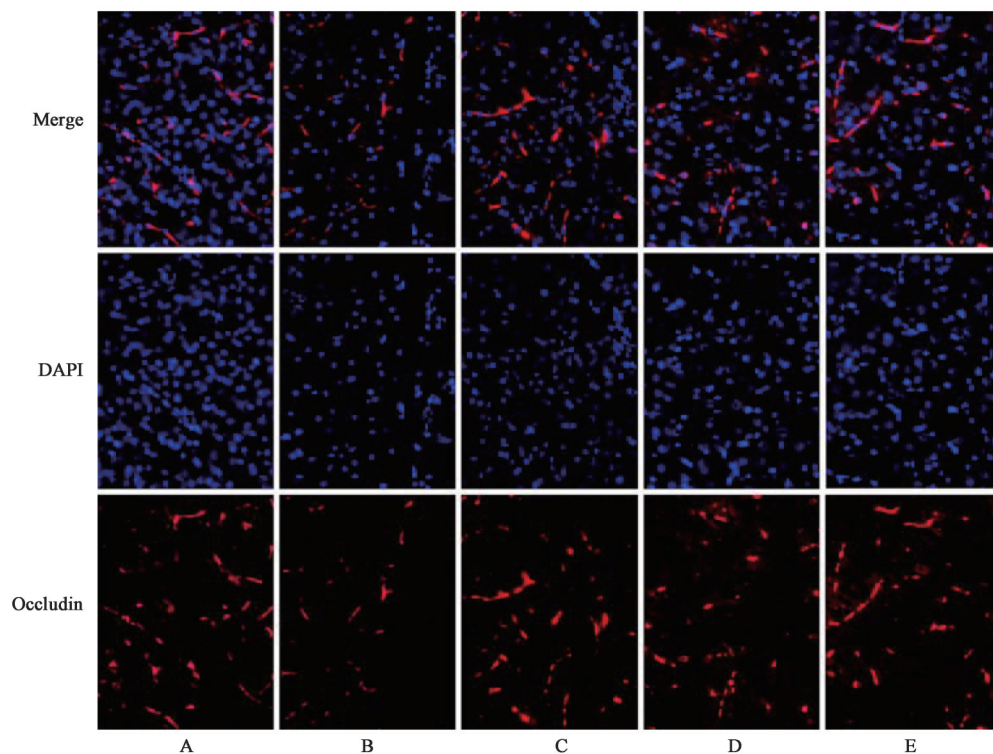


图6 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带 Occludin表达的影响(IF, × 200)

Fig. 6 Effect of salviaolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on Occludin in penumbra with cerebral ischemia/reperfusion injury rats (IF, × 200)

再灌注后LN和FN的降低伴随着MMP-9, MMP-2, 脑含水量及BBB通透性的变化, 说明基底膜中的

LN与FN参与BBB损伤过程, 并与MMPs密切相关。

表4 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带紧密连接蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection (lyophilized) on fluorescence intensity of TJs in penumbra with cerebral ischemia/reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Claudin-5	Occludin
假手术	-	2825±125	2082±254
模型	-	545±81 ¹⁾	617±135 ¹⁾
丹参多酚酸	21	1049±105 ³⁾	1535±226 ³⁾
血栓通	100	1048±98 ³⁾	1517±219 ³⁾
配伍用药	21+100	1554±96 ^{3,5)}	1861±270 ^{3,4)}

MMPs是一组依赖Ca²⁺和Zn²⁺的中性蛋白酶家族, MMPs对维持ECM内环境的稳态至关重要。ECM和BM是维持血脑屏障完整性的重要结构基础。正常情况下, MMPs以酶原形式由细胞分泌^[25], 激活后与纤维蛋白溶酶系统形成一个级联反应链。MMP-2, MMP-9属明胶酶, 主要作用为降解如胶原、明胶、弹力蛋白、纤维连接蛋白和蛋白聚糖等, 与组织重塑、创伤愈合和血管发生、肿瘤的生长、侵袭和转移等密切相关^[26]。脑缺血再灌注损伤后MMPs表达增高的机制可能与脑缺血引发即早基因c-Fos/Jun的表达、氧自由基释放以及ERK/JNK信号通路激活等有关。脑缺血MMP-9基因缺陷型小鼠

或MMP抑制剂治疗后, 可减小脑梗死体积, 该作用可能通过抑制紧密连接蛋白的降解, 稳定血脑屏障, 减轻脑水肿实现。脑缺血损伤时, MMP-2, MMP-9能降解脑血管基质的关键成分, 如Collagen IV, LN等, 使基底膜和TJs结构破坏, BBB通透性增加, 导致血管源性脑水肿, 加重脑损伤^[27]。

中医理论认为, 脑卒中的主要病理因素为风、火、痰、气、瘀, 而气虚血瘀是重要病机之一。中药具有多组分、多靶点等优势, 在抗脑缺血治疗中越来越受到人们的重视。丹参最早见于《神农本草经》, 具有活血祛瘀之功, 《本草便读》记载其为“调理血分之首药”; 三七可活血化瘀, 补虚强壮, 《本草求真》记载其“能于血分化其血瘀”。研究表明, 丹参及其有效组分可调节超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性, 调节脑缺血再灌注损伤后细胞凋亡、能量代谢异常等^[28]; 三七总皂苷抑制脑缺血再灌注损伤后炎症反应, 拮抗自由基损伤, 抑制细胞凋亡, 并可通过调节BDNF, VEGF发挥内源性神经保护作用^[29-30]。

本研究通过线栓法诱导大鼠脑缺血再灌注损伤, 配伍应用注射用丹参多酚酸及注射用血栓通(冻干), 研究发现丹参多酚酸及血栓通干预后, 可显著改善脑缺血再灌注损伤大鼠神经行为学缺损及神经元损伤, 减轻缺血半暗带IgG渗漏, 并有效促

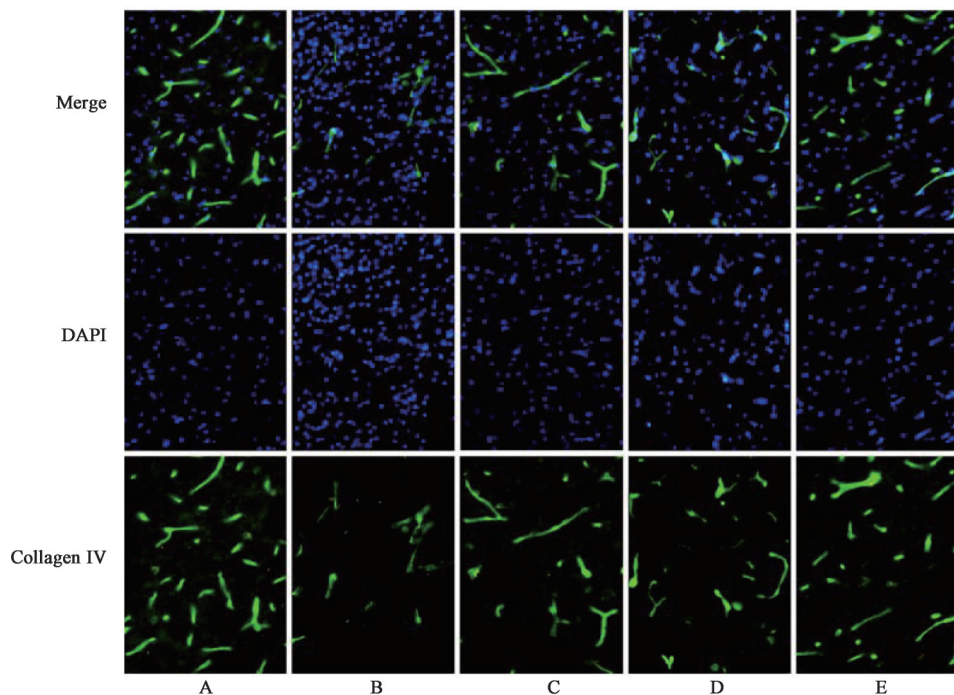


图7 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带Col-IV表达的影响(IF, ×200)

Fig. 7 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on Col-IV in penumbra with cerebral ischemia/reperfusion injury rats (IF, ×200)

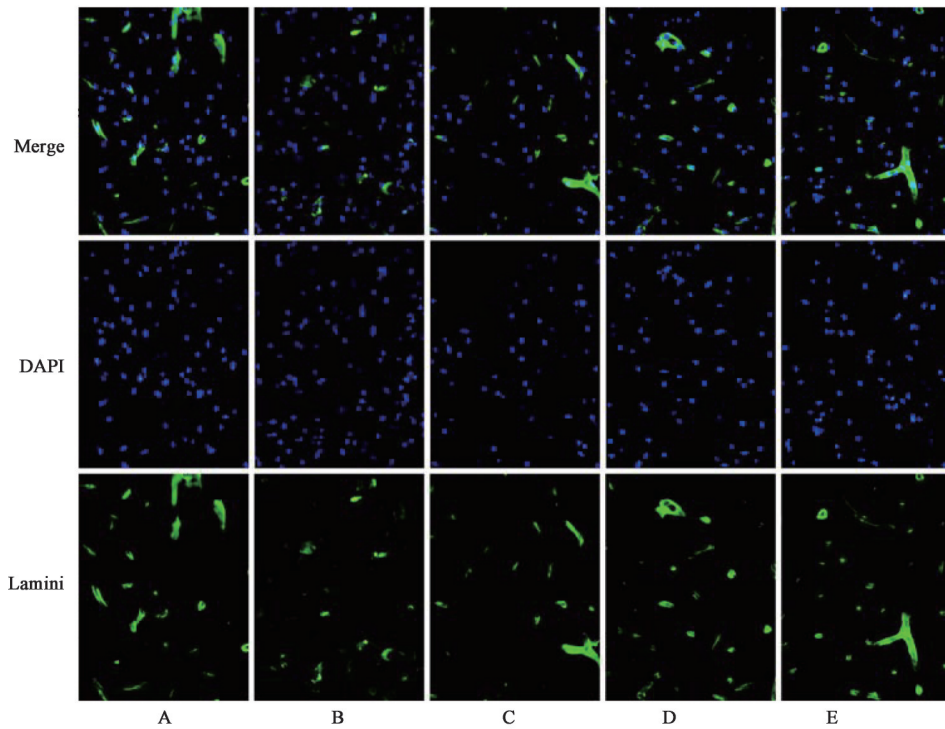


图8 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带LN表达的影响(IF, × 200)

Fig. 8 Effect of salviaolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on LN in penumbra with cerebral ischemia/reperfusion injury rats(IF, × 200)

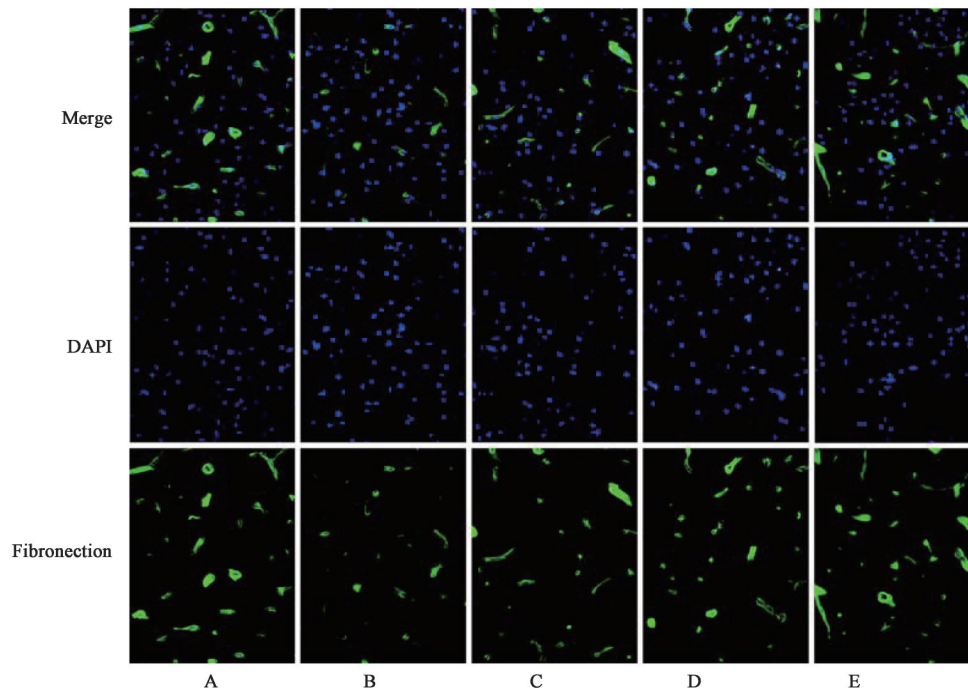


图9 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带FN表达的影响(IF, × 200)

Fig. 9 Effect of salviaolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on FN in penumbra with cerebral ischemia/reperfusion injury rats (IF, × 200)

进紧密连接蛋白 Claudin-5, Occludin 表达, 上调基底膜 Collagen IV, LN, FN 表达, 改善血管内皮细胞及基膜损伤, 抑制金属基质蛋白酶 MMP-2, MMP-9 表

达, 且二药配伍应用治疗效果优于单独应用。综上所述, 注射用丹参多酚酸及注射用血栓通(冻干)配伍应用可显著减轻大鼠脑缺血再灌注损伤, 其机制

表5 丹参多酚酸与血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带基底膜相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on fluorescence intensity of proteins of BM in penumbra with cerebral ischemia/reperfusion injury rats($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Col-IV	LN	FN
假手术	-	3 582±251	2 071±352	2 558±490
模型	-	831±217 ¹⁾	750±235 ¹⁾	771±273 ¹⁾
丹参多酚酸	21	2 757±385 ³⁾	1 429±349 ³⁾	1 451±351 ²⁾
血栓通	100	2 683±312 ³⁾	1 455±285 ³⁾	1 515±390 ²⁾
配伍用药	21+100	3 280±530 ^{3,4)}	1 865±298 ^{3,4)}	2 437±549 ^{3,5)}

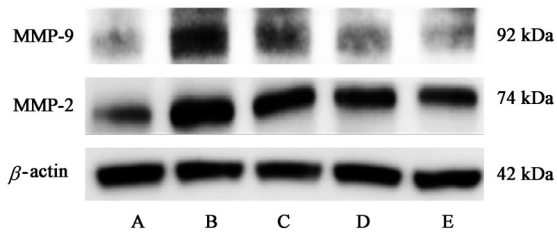


图10 各组大鼠缺血半暗带MMPs表达电泳

Fig. 10 Electrophoresis of MMPs in penumbra with cerebral ischemia/reperfusion injury in each group

表6 丹参多酚酸配伍血栓通对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带MMPs蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of salvianolate lyophilized injection and Xueshuantong injection on expressions of MMPs in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MMP-2/β-actin	MMP-9/β-actin
假手术	-	0.47±0.07	0.56±0.07
模型	-	1.16±0.10 ¹⁾	1.05±0.08 ¹⁾
丹参多酚酸	21	0.87±0.06 ³⁾	0.88±0.04 ²⁾
血栓通	100	0.83±0.13 ³⁾	0.83±0.09 ³⁾
配伍用药	21+100	0.64±0.07 ^{3,4)}	0.66±0.11 ^{3,4)}

可能与通过抑制MMPs的表达减轻脑微血管内皮紧密连蛋白及基底膜相关蛋白损伤,进而抑制缺血后BBB损伤有关,为进一步探讨丹参及三七有效组分治疗脑缺血疾病奠定了实验基础。

[参考文献]

[1] BENIAMIN E J, MUNTNER P, ALONSO A, et al. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American heart association [J]. Circulation, 2019, 139(10): e56-e528.

[2] BERNHARD S, RUDOLF G. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(4): 351-371.

[3] KHATRI R, MC KINNEY A M, SWENSON B, et al. Blood-brain barrier, reperfusion injury, and

hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke [J]. Neurology, 2012, 79(13 Suppl1): S52-S57.

[4] LIU W Y, WANG Z B, ZHANG L C, et al. Tight junction in blood-brain barrier: an overview of structure, regulation, and regulator substances [J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(8): 609-615.

[5] ABDULLAHI W, TRIPATHI D, RONALDSON P T. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 315(3): 343-356.

[6] ZHAO Y J, NAI Y, LI S Y, et al. Retigabine protects the blood-brain barrier by regulating tight junctions between cerebral vascular endothelial cells in cerebral ischemia-reperfusion rats [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(23): 8509-8518.

[7] HE Q S, WANG S X, LIU X L, et al. Salvianolate lyophilized injection promotes post-stroke functional recovery via the activation of VEGF and BDNF-TrkB-CREB signaling pathway [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(1): 108-122.

[8] 李耀磊, 刘丽娜, 王莹, 等. 丹参多酚酸对照提取物在丹参药材及注射用丹参多酚酸质量控制中的应用研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5446-5450.

[9] 卢汝梅, 黄志其, 李兵, 等. 三七化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(7): 62-64.

[10] HU J, GU Y, FAN W. Rg₁ protects rat bone marrow stem cells against hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through the PI3K/Akt pathway [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 406-412.

[11] LI X, WANG G, SUN J, et al. Pharmacokinetic and absolute bioavailability study of total panax notoginsenoside, a typical multiple constituent traditional Chinese medicine (TCM) in rats [J]. Biol Pharm bull, 2007, 30(5): 847-851.

[12] SUN Z G, CHEN L P, WANG F W, et al. Protective effects of ginsenoside Rg₁ against hydrogen peroxide-induced injury in human neuroblastoma cells [J].

- Neural Regen Res, 2016, 11(7): 1159-1164.
- [13] 刘蕾, 丁世兰, 陈影, 等. 注射用血栓通抑制血栓形成及其对血流状态影响的研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10): 2446-2453.
- [14] LONGA E Z, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [15] CHE Q Q, HUANG T, ZHANG Y D, et al. Effect of miR-124 on neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction through Wnt/ beta-catenin signaling pathway [J]. Eur Rev Med pharmacol Sci, 2019, 23(15): 6657-6664.
- [16] GAO Y, WEN L L, YANG X, et al. Pathological mechanism of focal cerebral ischemia and reperfusion injuries in mice [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2019, 33(5): 1507-1513.
- [17] RONALDSON P T. Blood-brain barrier integrity and glial support: mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke[J]. Curr Pharm Design, 2012, 18(25): 3624-3644.
- [18] HANNELORE B, ANDREAS T. Tight junctions of the blood-brain barrier-a molecular gatekeeper [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2016, 15(9): 1016-1029.
- [19] JIA W, LU R, MARTIN T A, et al. The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (review)[J]. Mol Med Rep, 2013, 9(3): 779-785.
- [20] REINHOLD A K, RITTNER H L. Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review[J]. Pflugers Arch, 2017, 469(1): 123-134.
- [21] JATUPORN N, KANNIKA P, CHUTIKORN N, et al. Protective effects of melatonin on methamphetamine-induced blood-brain barrier dysfunction in rat model [J]. Neurotox Res, 2020, 37(3): 640-660.
- [22] LEE H, PARK J W, KIM S P, et al. Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation after transient global cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2009, 34(2): 189-198.
- [23] ASTROF S, HYNES R O. Fibronectins in vascular morphogenesis [J]. Angiogenesis, 2009, 12 (2) : 165-175.
- [24] YANQING Z, YU-MIN L, JIAN Q, et al. Fibronectin and neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor in focal cerebral ischemia[J]. Brain Research, 2006, 1098(1): 161-169.
- [25] HAMACHER S, MATEM S, ROEB E. Extracellular matrix-from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2004, 129(38): 1976-1980.
- [26] ZHANG H, TRIVEDI A, LEE J U, et al. Matrix metalloproteinase-9 and stromal cell-derived factor-1 act synergistically to support migration of blood-borne monocytes into the injured spinal cord[J]. J Neurosci, 2011, 31(44): 15894-15903.
- [27] ENGLISH J L, KASSIRI Z, KOSKIVIRTA I, et al. Individual TIMP deficiencies differentially impact pro-MMP-2 activation [J]. J Biol Chem, 2006, 281(15): 10337-10346.
- [28] HE Y, JIA K, LI L, et al. Salvianolic acid B attenuates mitochondrial stress against A beta toxicity in primary cultured mouse neurons [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498(4): 1066-1072.
- [29] HU S N, LIU T T, WU Y L, et al. Panax notoginseng saponins suppress lipopolysaccharide-induced barrier disruption and monocyte adhesion on bEnd. 3 cells via the opposite modulation of Nrf2 antioxidant and NF- κ B inflammatory pathways [J]. Phytother Res, 2019, 33(12): 3163-3176.
- [30] WANG F J, WANG S X, CHAI L J, et al. Xueshuantong injection (lyophilized) combined with salvianolate lyophilized injection protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through attenuation of oxidative stress[J]. Acta Pharmaco Sin, 2018, 39(6): 998-1011.

[责任编辑 周冰冰]