

# 化痰通络方对急性脑梗死大鼠溶栓后 脑微血管内皮细胞构成蛋白基因表达的影响

张玉莲<sup>1</sup>, 周震<sup>1\*</sup>, 刘爽<sup>1</sup>, 宋宛珊<sup>2</sup>, 马妍<sup>2</sup>, 田涛涛<sup>2</sup>, 王凯<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

**[摘要]** 目的: 观察化痰通络法对急性脑梗死大鼠重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)溶栓后脑微血管内皮细胞构成蛋白基因表达的影响, 为化痰通络法防治急性脑梗死溶栓后缺血再灌注损伤提供实验依据。方法: 240只健康SD大鼠随机分为6组: 假手术组、模型组、rt-PA组、化痰通络方低、中、高剂量联合rt-PA组(联合组), 每组40只, 采用自身栓子法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型(MCAO), rt-PA组与化痰通络方联合rt-PA组于血栓注入后3h一次性予以rt-PA溶栓治疗, 后者联合给予低、中、高剂量(生药3.6, 7.2, 14.4 g·kg<sup>-1</sup>)化痰通络方灌胃治疗, 每日2次, 分别于造模后6, 24, 72 h, 7 d 4个时点, 应用RT-PCR法观察不同时相大鼠皮质及海马紧密连接蛋白Occludin, claudin-1, Zonula occludens proteins-1(ZO-1)基因的表达。结果: 在不同时点, 各实验组在不同脑组织中Occludin, claudin-1, ZO-1基因表达量均在6h最高, 24h最低, 72 h, 7 d数值逐渐升高, 且联合组升高趋势更明显。与组内6h时比较, rt-PA组、联合低、中、高剂量组Occludin, claudin-1, ZO-1基因表达量多于24, 72 h( $P < 0.05$ )。而同一时点与模型组相比, 联合中、高剂量组各时点Occludin, claudin-1基因表达量均明显升高( $P < 0.05$ )。而ZO-1基因表达量虽具有相似变化趋势, 但仅在24, 72 h, 7 d差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: 化痰通络方联合rt-PA溶栓, 可通过调控微血管内皮细胞构成蛋白Occludin, claudin-1, ZO-1基因的表达, 进而保护血脑屏障完整性, 防治急性脑梗死溶栓后缺血再灌注损伤的发生与发展。

**[关键词]** 化痰通络法; 急性脑梗死; Occludin; claudin-1; ZO-1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0157-06

**[doi]** 10.11653/syfy2014020157

## Effects of Huatan Tongluo on Gene Expression of Brain Microvascular Endothelial Cells in Rats with Acute Cerebral Infarction after Thrombolysis

ZHANG Yu-lian<sup>1</sup>, ZHOU Zhen<sup>1\*</sup>, LIU Shuang<sup>1</sup>, SONG Wan-shan<sup>2</sup>, MA Yan<sup>2</sup>, TIAN Tao-tao<sup>2</sup>, WANG Kai<sup>2</sup>

(1. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Huatan Tongluo therapy on gene expression of brain microvascular endothelial cells in rats with acute cerebral infarction after recombinant tissue-type plasminogen (rt-PA) thrombolysis, and provide experimental basis for preventive and therapeutic effects of Huatan Tongluo on ischemia-reperfusion injury induced by acute cerebral infarction after thrombolysis. **Method:** Two hundred and forty healthy SD rats were randomly divided into six groups, sham operation group, model group, rt-PA group, rt-PA combined with Huatan Tongluo low dose group, rt-PA combined with Huatan Tongluo middle dose group, rt-PA combined with Huatan Tongluo high dose group. The middle cerebral artery occlusion (MCAO) rat model was prepared by autologous blood clots. rt-PA group and rt-PA combined with Huatan Tongluo groups used rt-PA

**[收稿日期]** 20130509(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81072796);天津市应用基础及前沿技术研究计划(10JCZDJC20500)

**[第一作者]** 张玉莲, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 从事中西医结合治疗脑病临床、科研及教学工作, Tel: 022-60335355, E-mail: zhy11220@126.com

**[通讯作者]** \*周震, 医学博士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中西医结合神经内科临床与科研工作, Tel: 13110057681, E-mail: zhouzhen7681@126.com

thrombolytic therapy after thrombosis. The later were also given low, medium, high dose (3.6, 7.2, 14.4 g · kg<sup>-1</sup>) Huatan Tongluo prescription by gavage two times a day. Then observed the expression of occluding, claudin-1, ZO-1 in rat cortex and hippocampus by RT-PCR at 6, 24, 72 h and 7 days respectively. **Result:** In different phases of every experimental group, the expression of occluding, claudin-1, ZO-1 in different brain tissue were highest at 6 h, minimum at 24 h, increased gradually at 72 h and 7 days, and the combined with Huatan Tongluo groups increased more obviously. The expression of occluding, claudin-1, ZO-1 in rt-PA, low, middle, high dose groups at 6 h were significantly higher than that at 24, 72 h ( $P < 0.05$ ). Compared the model group at the same time, the expression of occluding, claudin-1 in middle dose and high dose groups of Chinese traditional medicine were significantly increased in each phase ( $P < 0.05$ ). While the ZO-1 gene expression had the similar trends, but significant difference only existed at the 24, 72 h, 7 d ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Huatan Tongluo combined with rt-PA therapy can regulate the expression of occluding, claudin-1, ZO-1 in brain microvascular endothelial cells. So it can protect the integration of blood brain barrier, and have protective effects on ischemia reperfusion injury induced by acute cerebral infarction after thrombolysis.

[ **Key words** ] Huatan Tongluo; acute cerebral infarction; occludin; claudin-1; ZO-1

急性脑梗死为临床高致残率、致死率的多发病之一。重组组织型纤溶酶原激活剂 (rt-PA) 静脉溶栓治疗是目前唯一得到批准并确切有效的急性期治疗方法,已成为各国指南中的主要治疗手段<sup>[1]</sup>。但溶栓后出血转化与再灌注损伤是影响急性脑梗死临床疗效、限制溶栓疗法广泛开展最主要原因之一,其机制与血脑屏障 (BBB) 完整性破坏密切相关<sup>[2]</sup>。研究证明,脑毛细血管内皮细胞 (BMECs) 及其间的紧密连接 (TJ) 是 BBB 功能与结构的主要物质结构基础<sup>[3]</sup>,该连接复合体形态和结构完整性的损坏将会直接导致内皮屏障功能减弱<sup>[4]</sup>。在已知的结构蛋白中,occludin, claudin-1 和 ZO-1 3 种蛋白表达水平的高低与 TJ 的完整性直接相关<sup>[5]</sup>。因此,本研究拟观察不同剂量化痰通络方联合 rt-PA 对改良大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型大鼠不同部位脑组织中血脑屏障微血管内皮细胞中关键结构蛋白 occludin, claudin-1, ZO-1 基因表达的影响,从分子生物学角度探讨其可能作用机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 化痰通络方组成:天麻 10 g,半夏 10 g,胆南星 5 g,丹参 30 g,川芎 10 g,地龙 10 g,酒大黄 5 g。将上述药物 400 g (5 付),加 1 000 mL 水浸泡 12 h 之后加水 1 000 mL,80 °C,30 min 超声,过滤,滤液 A 保存,滤渣加水 1 000 mL,80 °C,30 min 超声,过滤,滤液 B 保存,滤渣加水 1 000 mL,80 °C,30 min 超声,过滤,滤液 C 保存,残渣弃去。将滤液 A, B, C 合并,过滤,滤液 100 °C 水浴加热,浓缩至 500 mL (为生药 0.8 g · mL<sup>-1</sup>)。由天津中医药大学制剂中心制备,4 °C 冰箱保存备用。

**1.2 动物** 健康 SD 大鼠 240 只,体重 200 ~ 250 g,雌雄各半,清洁级,购自中国军事医学科学院实验动物中心 (2 级),许可证号 SCXK-(军)2002-001。

**1.3 仪器** 754 型紫外分光光度仪 (上海光谱仪器有限公司), Linegene 9620 (BIOER) 荧光定量 PCR 仪、匀浆器 (涿州市琦瑞玻璃制品厂), TGL-16C 型离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

**1.4 试剂** Trizol 试剂盒 (Invitrogen 公司,批号 15596-018),注射用重组组织纤溶酶原激活剂 (rt-PA,批号 005765201304,德国勃林格殷格翰公司),血栓诱导剂 (长春国奥药业有限公司,批号 20081218),occluding (批号 ab31721)、claudin-1 (批号 ab15098)、ZO-1 (批号 ab59720),Abcam 公司。

## 2 方法

**2.1 动物分组与给药** 随机将大鼠分为 6 组,即假手术组、模型组、rt-PA 组、化痰通络方联合 rt-PA 组 (以下称联合组),联合组又分为化痰通络方低、中、高剂量组。每组分为 6, 24, 72 h, 7 d 共 4 个时点,每组每个时相 10 只大鼠。给药剂量参照文献 [6] 中“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表”计算。联合组与 rt-PA 组于血栓注入后 3 h 一次性由尾静脉缓慢注入 rt-PA 5.67 mg · kg<sup>-1</sup> 加入 0.9% 生理盐水 2 mL 中溶栓治疗,联合组分别给予化痰通络方低、中、高剂量 (3.6, 7.2, 14.4 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, 分 2 次 ig), rt-PA 组与模型组给予等量蒸馏水 ig。

**2.2 大鼠大脑中动脉栓塞模型制备** 参照文献方法制备大鼠中动脉栓塞 (MCAO) 模型大鼠<sup>[7-8]</sup>。先制备栓子,大鼠采用 10% 水合氯醛 (350 ~ 400 mg · kg<sup>-1</sup>) 腹腔麻醉。颈正中切开皮肤,剥离胸骨舌骨

肌、肩胛舌骨肌与胸骨乳突肌,暴露颈总动脉、颈外动脉与颈内动脉。分离左侧颈总动脉(CCA)与颈内动脉(ICA),分离并结扎翼腭动脉。游离ECA远端并结扎之,凝闭其分支。用金属动脉夹暂时夹闭颈总动脉,用5.5号静脉输液针逆行穿刺右颈外动脉至右颈内动脉起始处,随即用1 mL注射器缓慢推注栓子盐水悬液0.3 mL,撤去动脉夹,恢复ICA的血供,使栓子通过颈内动脉进入颅内至大脑中动脉,然后结扎颈外动脉,缝合皮肤。庆大霉素0.5 mL/只im抗感染。除假手术组外其余组大鼠均造模。大鼠脑缺血后表现出相应的症状及体征,反映大脑损伤的程度,可作为评价模型制作是否成功的标志。

**2.3 取材及检测方法** 各组大鼠相应时间点麻醉后,立即断头取脑,冰盐水冲洗,冰袋上迅速取出大脑皮质和海马组织,放在EP管中密封后,液氮中速冻30 s,放入-80℃冰箱中保存备用。采用RT-PCR检测Occluding, claudin-1, ZO-1基因的相对表达量。按照TRIzol试剂说明书操作,抽提脑组织总RNA,通过逆转录反应得到cDNA。-20℃保存待用。occludin上游引物5'-GAAGAGGACAGACCCAGACA-3',下游引物5'-ACTCCTGTAAACCTGCATCAA-3',扩增产物长度158 bp。claudin-1上游引物5'-GGCCATCTACGAGGGACTGTG-3',下游引物5'-ACACAAAGATTGCGATCAGCC-3',扩增产物长度161 bp。ZO-1上游引物5'-GGTGGAATGATGTCGGAATA-3',下游引物5'-AGGTCGAGGAGGAAAAGAACA-3',扩增产物长度:155 bp。内参照

$\beta$ -actin上游引物5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAA-3',下游引物5'-AGCACTGTGTTGGCATAGAGG-3',扩增产物长度169 bp。以上引物均由上海生物工程有限公司合成。采用两步法Real-time Q-PCR检测。反应体系为20  $\mu$ L。反应参数:预变性95℃,15 min,变性95℃,20 s,退火加延伸57℃,20 s,循环次数40次。分析结果及PCR扩增产物生成曲线。以内参 $\beta$ -actin mRNA Ct值标化occludin mRNA, cludin-1 mRNA和ZO-1 mRNA的Ct值,得到occludin mRNA, cludin-1 mRNA和ZO-1 mRNA相对Ct值,具体采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

**2.4 统计学处理** 采用SPSS 13.0 统计分析软件进行处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 皮质及海马 Occluding 基因的表达** 梗死区域皮质:同一组内与6 h时点比较,rt-PA组、联合各剂量组在24,72 h时点Occluding相对表达量都有显著差异( $P < 0.05$ ),并且以24 h时点为最低。同一时点内与假手术组比较,模型组、rt-PA组、联合低剂量组均具有显著差异( $P < 0.05$ ),联合中、高剂量组仅在24,72 h差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );同一时点内与模型组比较,联合低、中、高剂量组均有升高,在6 h时点,联合中、高剂量组具有显著差异( $P < 0.05$ );在7 d时点,联合低、中、高剂量具有显著差异( $P < 0.05$ )。rt-PA组虽然有升高的趋势,但无统计学意义(表1)。

表1 化痰通络方对不同时间点皮质Occluding基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	6 h	24 h	72 h	7 d
假手术	-	6.932 ± 0.901	6.819 ± 0.831	6.834 ± 0.704	6.918 ± 0.691
模型	-	4.406 ± 0.824 <sup>2)</sup>	1.209 ± 0.663 <sup>1,2)</sup>	2.346 ± 0.818 <sup>2)</sup>	3.703 ± 1.073 <sup>2)</sup>
rt-PA	-	5.023 ± 1.137 <sup>2)</sup>	1.445 ± 0.471 <sup>1,2)</sup>	2.372 ± 0.505 <sup>1,2)</sup>	4.521 ± 1.205 <sup>2)</sup>
化痰通络方 + rt-PA	3.6	5.153 ± 1.012 <sup>2)</sup>	1.017 ± 0.735 <sup>1,2)</sup>	2.632 ± 0.705 <sup>1,2)</sup>	5.560 ± 0.718 <sup>2,3)</sup>
	7.2	6.474 ± 1.402 <sup>3)</sup>	1.965 ± 0.433 <sup>1,2)</sup>	3.218 ± 0.712 <sup>1,2)</sup>	6.734 ± 1.221 <sup>3)</sup>
	14.4	6.735 ± 1.237 <sup>3)</sup>	2.019 ± 0.616 <sup>1,2)</sup>	2.903 ± 0.579 <sup>1,2)</sup>	6.612 ± 1.254 <sup>3)</sup>

注:与同一组内6 h时点比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与同一时点假手术组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与同一时点模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ (表2~6同)。

梗死区域海马组织:同一组内与6 h时点比较,rt-PA组、联合剂量组在24,72 h时点Occluding相对表达量有显著差异( $P < 0.05$ ),并且在24 h时点相对表达量最低。在同一时点与假手术组比较,模型组、rt-PA组、联合各剂量组均具有显著差异( $P <$

0.05),联合中、高剂量组仅在24,72 h差异显著( $P < 0.05$ );同一时点与模型组比较,联合低、中、高剂量组明显升高,在6,24 h,7 d时点,联合低、中、高剂量组具有显著差异( $P < 0.05$ ),rt-PA组虽然有升高的趋势,但无统计学意义(表2)。

表 2 化痰通络方对不同时间点海马 Occluding 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	6 h	24 h	72 h	7 d
假手术	-	90.011 ± 3.029	89.393 ± 4.223	90.330 ± 4.075	89.992 ± 5.522
模型	-	60.426 ± 6.704 <sup>2)</sup>	15.065 ± 3.402 <sup>1,2)</sup>	36.539 ± 4.258 <sup>1,2)</sup>	44.941 ± 5.182 <sup>1,2)</sup>
rt-PA	-	71.634 ± 5.257 <sup>2)</sup>	20.409 ± 4.331 <sup>1,2)</sup>	37.621 ± 4.315 <sup>1,2)</sup>	57.777 ± 6.392 <sup>2)</sup>
化痰通络方 + rt-PA	3.6	75.361 ± 5.713 <sup>2,3)</sup>	30.596 ± 3.435 <sup>1,2,3)</sup>	38.941 ± 3.628 <sup>1,2)</sup>	72.064 ± 6.076 <sup>2,3)</sup>
	7.2	85.393 ± 6.206 <sup>3)</sup>	31.933 ± 4.037 <sup>1,2,3)</sup>	42.813 ± 4.351 <sup>1,2)</sup>	88.261 ± 7.168 <sup>3)</sup>
	14.4	89.304 ± 4.537 <sup>3)</sup>	33.869 ± 5.456 <sup>1,2,3)</sup>	40.785 ± 5.227 <sup>1,2)</sup>	72.676 ± 5.317 <sup>2,3)</sup>

**3.2 皮质及海马 claudin-1 基因的表达** 梗死区域皮质组织:同一组内与 6 h 时点比较,各组在 24,72 h 时点 claudin-1 基因相对表达量具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),并以 24 h 相对表达量为最低。同一时点内与假手术组比较,模型组、rt-PA 组、联合低剂量组均具有显著差异 ( $P < 0.05$ ),联合中、高剂量组在 24,72 h,7 d 差异显著 ( $P < 0.05$ );同一时点内与模型组比较,联合中、高剂量明显升高,差异显著 ( $P < 0.05$ ),rt-PA 组,联合低剂量组虽有上升趋势,但差异无统计学意义(表 3)。

梗死区域海马组织:同一组内与 6 h 时点比较,各组各时点都有显著差异 ( $P < 0.05$ ),在 24 h 时点 claudin-1 基因相对表达量最低。同一时点内与假手术组比较,模型组、rt-PA 组、联合低剂量组均有显著差异 ( $P < 0.05$ ),中、高剂量组在 24,72 h,7 d 差异显著 ( $P < 0.05$ );同一时点内与模型组比较,联合中、高剂量组明显升高,差异显著 ( $P < 0.05$ ),rt-PA 组、联合低剂量组虽有上升趋势,但差异无统计学意义(表 4)。

表 3 化痰通络方对不同时间点皮质 claudin-1 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	6 h	24 h	72 h	7 d
假手术	-	6.592 ± 0.398	6.629 ± 0.216	6.383 ± 0.341	6.699 ± 0.294
模型	-	4.913 ± 0.618 <sup>2)</sup>	0.397 ± 0.175 <sup>1,2)</sup>	1.043 ± 0.333 <sup>1,2)</sup>	2.901 ± 0.822 <sup>2)</sup>
rt-PA	-	5.071 ± 0.431 <sup>2)</sup>	0.651 ± 0.151 <sup>1,2)</sup>	1.223 ± 0.125 <sup>1,2)</sup>	2.945 ± 0.931 <sup>2)</sup>
化痰通络方 + rt-PA	3.6	5.326 ± 0.752 <sup>2)</sup>	0.662 ± 0.127 <sup>1,2)</sup>	1.699 ± 0.748 <sup>1,2)</sup>	3.688 ± 0.854 <sup>2)</sup>
	7.2	6.387 ± 0.461 <sup>3)</sup>	0.740 ± 0.176 <sup>1,2,3)</sup>	1.967 ± 0.661 <sup>1,2,3)</sup>	4.562 ± 0.446 <sup>2,3)</sup>
	14.4	6.864 ± 0.623 <sup>3)</sup>	0.924 ± 0.141 <sup>1,2,3)</sup>	1.931 ± 0.551 <sup>1,2,3)</sup>	4.504 ± 0.636 <sup>2,3)</sup>

表 4 化痰通络方对不同时间点海马 claudin-1 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	6 h	24 h	72 h	7 d
假手术	-	9.837 ± 0.398	9.373 ± 0.108	9.573 ± 0.239	9.889 ± 0.337
模型	-	8.033 ± 0.633 <sup>2)</sup>	1.243 ± 0.245 <sup>1,2)</sup>	2.002 ± 0.347 <sup>1,2)</sup>	5.011 ± 0.846 <sup>1,2)</sup>
rt-PA	-	8.347 ± 0.426 <sup>2)</sup>	1.362 ± 0.413 <sup>1,2)</sup>	3.207 ± 0.582 <sup>1,2)</sup>	5.061 ± 0.951 <sup>1,2)</sup>
化痰通络方 + rt-PA	3.6	8.274 ± 0.715 <sup>2)</sup>	1.499 ± 0.237 <sup>1,2)</sup>	3.515 ± 0.773 <sup>1,2)</sup>	5.301 ± 0.866 <sup>1,2)</sup>
	7.2	9.873 ± 0.427 <sup>3)</sup>	1.575 ± 0.376 <sup>1,2)</sup>	4.986 ± 0.649 <sup>1,2,3)</sup>	8.324 ± 0.446 <sup>1,2,3)</sup>
	14.4	9.743 ± 0.644 <sup>3)</sup>	1.999 ± 0.382 <sup>1,2,3)</sup>	3.967 ± 0.527 <sup>1,2,3)</sup>	7.276 ± 0.626 <sup>2,3)</sup>

**3.3 皮质及海马 ZO-1 基因的表达** 梗死区域皮质组织:同一组内与 6 h 时点比较,各组 ZO-1 相对表达量均有下降,以 24 h 时点 ZO-1 相对表达量最低。同一时点与假手术组比较,rt-PA 组、联合低剂量组均具有显著差异 ( $P < 0.05$ ),模型组、联合中、高剂量组在 24,72 h,7 d 差异显著 ( $P < 0.05$ );同一时点与模型组比较,rt-PA 组、联合低剂量组、联合中、高

剂量组有上升趋势,在 24 h 时点联合中剂量组明显升高 ( $P < 0.05$ );在 72 h 时点,联合高剂量组相对表达量明显升高 ( $P < 0.05$ ) (表 5)。

梗死区域海马组织:同一组内与 6 h 时点比较,各组 ZO-1 相对表达量均有明显下降,在 24,72 h 时点差异明显 ( $P < 0.05$ )。同一时点与假手术组比较,联合低剂量组均具有显著差异 ( $P < 0.05$ ),模型

组、rt-PA 组、联合中、高剂量组在 24,72 h,7 d 差异显著( $P < 0.05$ );同一时点与模型组比较,rt-PA 组、联合低、中、高剂量组有上升趋势,在 24 h、7 d 时

点,rt-PA 组、联合低、中、高剂量组相对表达量明显升高( $P < 0.05$ );在 72 h 时点,联合高剂量组相对表达量明显升高( $P < 0.05$ )(表 6)。

表 5 化痰通络方对不同时间点皮质 ZO-1 基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	6 h	24 h	72 h	7 d
假手术	-	2.491 ± 0.431	2.502 ± 0.012	2.489 ± 0.089	2.442 ± 0.286
模型	-	2.247 ± 0.231	0.391 ± 0.055 <sup>1,2)</sup>	0.629 ± 0.254 <sup>2)</sup>	1.093 ± 0.448 <sup>2)</sup>
rt-PA	-	2.155 ± 0.321 <sup>2)</sup>	0.359 ± 0.047 <sup>1,2)</sup>	0.716 ± 0.233 <sup>2)</sup>	1.435 ± 0.310 <sup>2)</sup>
化痰通络方 + rt-PA	3.6	1.889 ± 0.303 <sup>2)</sup>	0.419 ± 0.093 <sup>2)</sup>	0.751 ± 0.097 <sup>2)</sup>	1.428 ± 0.125 <sup>2)</sup>
	7.2	2.311 ± 0.358	0.529 ± 0.041 <sup>1,2,3)</sup>	0.843 ± 0.215 <sup>2)</sup>	1.458 ± 0.309 <sup>2)</sup>
	14.4	2.049 ± 0.123	0.430 ± 0.062 <sup>1,2)</sup>	0.974 ± 0.072 <sup>2,3)</sup>	1.474 ± 0.401 <sup>2)</sup>

表 6 化痰通络方对不同时间点海马 ZO-1 基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	6 h	24 h	72 h	7 d
假手术	-	4.901 ± 0.431	5.001 ± 0.119	4.939 ± 0.287	4.897 ± 0.263
模型	-	4.701 ± 0.307	0.327 ± 0.072 <sup>1,2)</sup>	1.078 ± 0.294 <sup>1,2)</sup>	1.879 ± 0.271 <sup>1,2)</sup>
rt-PA	-	4.641 ± 0.116	0.623 ± 0.156 <sup>1,2,3)</sup>	1.103 ± 0.254 <sup>1,2)</sup>	2.261 ± 0.297 <sup>1,2,3)</sup>
化痰通络方 + rt-PA	3.6	4.117 ± 0.122 <sup>2,3)</sup>	0.656 ± 0.109 <sup>1,2,3)</sup>	1.145 ± 0.107 <sup>1,2)</sup>	2.450 ± 0.159 <sup>2,3)</sup>
	7.2	4.995 ± 0.241	0.775 ± 0.189 <sup>1,2,3)</sup>	1.305 ± 0.232 <sup>1,2)</sup>	2.530 ± 0.078 <sup>2,3)</sup>
	14.4	4.839 ± 0.089	0.687 ± 0.161 <sup>1,2,3)</sup>	1.520 ± 0.161 <sup>1,2,3)</sup>	2.631 ± 0.024 <sup>2,3)</sup>

#### 4 讨论

脑梗死属祖国医学“中风病”范畴,痰瘀互结同病为急性缺血性中风的基本病机。既往临床研究显示<sup>[9]</sup>,对急性脑梗死风痰瘀阻证患者采用化痰通络法联合溶栓治疗疗效显著。同时,前期基础研究发现,化痰通络法可以减轻溶栓后缺血再灌注损伤<sup>[10]</sup>。

rt-PA 溶栓后出血转化与缺血再灌注损伤是影响急性脑梗死临床疗效、限制溶栓疗法广泛开展最直接、最主要的原因之一,其机制与血脑屏障完整性破坏密切相关。研究表明,BBB 结构和功能的改变是缺血再灌注早期一个重要的病理过程,BBB 通透性的增加将加重缺血脑组织的损伤<sup>[11]</sup>。因此,保护 BBB 完整性是防治溶栓后出血转化和再灌注损伤等严重并发症的一种有效的治疗方法。BBB 的基础结构是脑微血管内皮细胞(BMEC),BMEC 及其间的紧密连接(TJ)构成了 BBB 的第一道屏障,有助于维护脑组织微环境的稳定<sup>[12]</sup>。研究表明<sup>[13-14]</sup>,TJ 相关蛋白表达量的改变,位置分布的变化或结构功能的异常均可能破坏 TJ 的完整性,引起细胞间连接的开放,导致 BBB 通透性的改变。跨膜蛋白 Occludin, claudin-1 和胞质附着蛋白 ZO-1 是构成 TJ 的主要蛋白,研究表明,在脑缺血再灌注的过程中,

Occludin 沿血管的表达由连续状态变得间断、乃至消失<sup>[15]</sup>;有实验显示蛛网膜下腔出血后, BBB 明显开放, Claudin 表达水平明显降低<sup>[16]</sup>;ZO-1 将跨膜蛋白定位于 TJ,维持 TJ 的结构与功能,同时又是 occludin 与细胞内骨架系统连接及信号传导机制中的一个重要结构<sup>[17]</sup>。因此, Occludin, claudin-1, ZO-1 3 种蛋白的表达可有效反映溶栓治疗后出血转化和再灌注损伤时 BBB 结构和功能的损伤程度。

本实验应用 RT-PCR 法观察不同时点大鼠皮质及海马 Occludin, claudin-1, ZO-1 蛋白基因的表达,结果显示在不同时点中,各实验组在皮质及海马 Occludin, claudin-1, ZO-1 基因表达量表现出相同变化趋势,即 6 h 时相表达量最高,24 h 时相表达量急剧下降至最低,随观察时间的推移,72 h,7 d 时点数值逐渐升高,且后期升高趋势联合组更明显,表明联合组可明显增加溶栓后不同脑组织中 Occludin, claudin-1, ZO-1 基因表达量。

由此可知,rt-PA 溶栓后,模型大鼠皮质及海马组织中 Occludin, claudin-1, ZO-1 蛋白基因表达降低,化痰通络中药能有效增加溶栓后 Occludin, claudin-1, ZO-1 蛋白基因表达,进而保护 BBB 完整性,防治急性脑梗死溶栓后缺血再灌注损伤的发生与发展,并且化痰通络中药的作用存在一定的浓度

依赖性和时间依赖性,从分子生物学角度初步探讨了其可能作用机制。

### [参考文献]

[1] 张晓莺,郭森,唐玉贞,等.重组组织型纤溶酶原激活剂治疗急性脑梗死临床研究[J].中馈与神经疾病杂志,2010,27(2):175.

[2] Lo E H. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research [J]. Br J Pharmacol,2008,153(Suppl 1):396.

[3] 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(12):719.

[4] Vorbrodt A W, Dobrogowska D H. Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2004,421(2):67.

[5] Vorbrodt A W, Dobrogowska D H. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers; electron microscopist's view [J]. Brain Res Rev,2003,42(3):221.

[6] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1861.

[7] Kato Y, Lambert C A, Colige A C, et al. Acidic extracellular pH induce smatrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastat melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activate protein kinase signaling[J]. J Biol Chem,2005,280(12):10938.

[8] Pun P B, Lu J, Moochhala S. Involvement of ROS in BBB dysfunction [J]. Free Radic Res, 2009, 43(4):348.

[9] 张玉莲,周震,王立存,等.化痰通络法联合尿激酶溶

栓治疗急性脑梗死临床研究[J].天津中医药,2010,27(1):12.

[10] 周震,宋宛珊,王占奎,等.化痰通络方联合 rt-PA 对急性脑梗死溶栓后神经功能缺损及皮质神经元微观形态的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(18):124.

[11] Yang Y, Rosenberg G A. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease [J]. Stroke,2011,42(11):3323.

[12] Persidsky Y, Heilman D, Haorah J, et al. Rho-mediated regulation of tight junction during monocyte migration across blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE) [J]. Blood, 2006, 107(12):4770.

[13] Ng I, Yap E, Tan W L, et al, Blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: roles of tight junction proteins[J]. Ann Acad Med Singapore,2003,32(5 Suppl):63.

[14] Kis B, Snipes J A, Deli M A, et al. Chronic adrenomedullin treatment improves blood-brain barrier function but has no effects on expression of tight junction proteins[J]. Acta Neurochir Suppl,2003,86:565.

[15] 孙伟,杨鲲鹏,盛利,等.大鼠局灶性脑缺血再灌注血脑屏障超微结构及紧密连接蛋白 Occludin 变化的研究[J].中馈与神经疾病杂志,2007,24(4):425.

[16] 陈铎,袁江伟,宋磊,等.紧密连接相关蛋白 Claudin-5、ZO-1 在大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的表达及意义[J].中国医科大学学报,2010,39(9):713.

[17] Hartwig W, Andrea L. Tight junctions of the blood-brain barrier; development, composition and regulation [J]. Vascul Pharmacol,2002,38(6):323.

[责任编辑 李玉洁]