

脑清喷鼻微乳对急性脑梗死大鼠 血脑屏障通透性影响及其机制

石贺元¹, 宋宛珊², 黄燕^{3*}

(1. 广东省中山市人民医院, 广东 中山 528403;

2. 天津中医药大学, 天津 300193; 3. 广州中医药大学附属广东省中医院, 广州 510120)

[摘要] **目的:** 观察脑清喷鼻微乳对急性脑梗死大鼠血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 超通透性影响及其相关分子机制。**方法:** 采用自身栓子法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型 (MCAO), 筛选后随机分为对照组、模型组、脑清喷鼻微乳组, 并给予药物干预。脑清喷鼻微乳组予脑清喷鼻微乳 $0.19 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于含麝香酮 $0.011 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 滴鼻给药, 每日 3 次, 对照组与模型组给予相同时间点等量生理盐水滴鼻。每组于 1, 3, 7 d 3 个时相对大鼠进行神经功能缺损评分后, 取材观察各时相大鼠大脑皮质缺血区神经元及内皮细胞形态, 检测伊文思蓝 (EB)、紧密连接蛋白-1 (zonula occludens proteins-1, ZO-1)、层黏连蛋白 (laminin, LN) 及水通道蛋白-4 (aquaporin protein-4, AQP-4) 含量。**结果:** 与同一时相正常组相比, 模型组 Bederson's 评分、EB 及 AQP-4 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$), ZO-1、Laminin 蛋白含量显著降低 ($P < 0.05$), 神经元坏死较多及内皮细胞损害严重。与同一时相模型组相比, 脑清喷鼻微乳组 Bederson's 评分、EB 及 AQP-4 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$), ZO-1、Laminin 蛋白含量显著升高 ($P < 0.05$), 神经元存活率较高及内皮细胞损害较轻。同组内不同时相比较, 脑清喷鼻微乳组 Bederson's 评分、EB 及 AQP-4 蛋白含量逐渐降低 ($P < 0.05$), ZO-1 蛋白含量逐渐升高 ($P < 0.05$), Laminin 蛋白含量 3 d 后逐渐升高 ($P < 0.05$), 1 d 时神经元及内皮细胞水肿最严重, 7 d 时神经元变性坏死最多, 内皮细胞基膜及细胞器缺损最为严重。**结论:** 脑清喷鼻微乳通过调控血脑屏障 (BBB) 3 层结构中的主要蛋白 ZO-1、Laminin 及 AQP-4 蛋白的含量, 调节 BBB 通透性, 保护 BBB 结构及功能的完整性, 减少神经元凋亡, 减轻可逆性神经元损伤, 促进神经功能的恢复。

[关键词] 脑清喷鼻微乳; 急性脑梗死; 血脑屏障; 鼻腔给药

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0166-06

[doi] 10.11653/syfy2013200166

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130808.1525.009.html>

[网络出版时间] 2013-08-08 15:25

Influence and Mechanism of Naoqing Penbi Weiru on the Permeability of Blood-brain Barrier in Rats after Acute Ischemic Stroke

SHI He-yuan¹, SONG Wan-shan², HUANG Yan^{3*}

(1. The People's Hospital of Zhongshan City Guangdong province, Zhongshan 528403, China;

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

3. Guangdong Provincial TCM Hospital Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Naoqing Penbi Weiru on the permeability of blood-brain barrier (BBB) and ultrastructure of cortex endothelial cells after acute ischemic stroke. **Method:** The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established using self-embolus method. After screening, the male

[收稿日期] 20130419(017)

[基金项目] 广东省中山市科技计划项目(20113A015);天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(10JCZDJ20500)

[第一作者] 石贺元, 博士, 医师, 从事中医心脑血管、老年病及养生康复研究, E-mail: zhou7681@126.com

[通讯作者] * 黄燕, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中医脑病临床研究, Tel: 15915777925, E-mail: gdszyyhy@163.com

SD rats were randomly divided into the control group, the model group, the Naoqing Penbi Weiru group and given drug intervention. Naoqing Penbi Weiru group nasal drip with Naoqing Penbi Weiru $0.19 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (amount to contain muscone $0.011 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), three times one day. Control group and model group nasal drip with equivalent normal saline at the same time. Every group detected the permeability of nerve function by the Bederson's score, the permeability of blood-brain barrier (BBB) by the Evans blue dye (EB dye), watch the ultrastructure of Cortex endothelial cells in ischemic region by electron microscopy, Zonula occludens proteins-1 (ZO-1), laminin (LN) and Aquaporin Protein-4 (AQP-4) by western-blot. **Result:** Compared with the same phase control group, in the model group, the Bederson's score, the EB dye and the protein of AQP-4 significantly improved ($P < 0.05$). The protein of ZO-1 and LN were significantly lower ($P < 0.05$). Neurons and endothelial cell morphology were worse than the control group. Compared with the same phase model group, in the Naoqing Penbi Weiru group, the Bederson's score, the EB dye and the protein of AQP-4 significantly decreased ($P < 0.05$). The protein of ZO-1 and LN were significantly higher ($P < 0.05$). Neurons and endothelial cell morphology were better than the model group. With the same group but at different time points compared, in the Naoqing Penbi Weiru group, Bederson's score, the Evans Blue dye (EB dye) and the protein of AQP-4 gradually decreased ($P < 0.05$), the protein of ZO-1 were gradually higher ($P < 0.05$) and the protein of Laminin were gradually higher ($P < 0.05$) at 3 day. Neurons and endothelial edema were the most serious at 1 day. At 7 day, degeneration and necrosis of neurons was the most and basement membrane and organelle of endothelial cell defects most serious. **Conclusion:** Naoqing Penbi Weiru group can adjust BBB permeability, protect the integrity of BBB structure and function, reduce the apoptosis of neurons, reduce the damage of reversible neurons and promote the recovery of neurological function by regulating and controlling the main protein AQP-4, LN and ZO-1 in the three layer structure of BBB.

[**Key words**] Naoqing Penbi Weiru; acute cerebral infarction; blood-brain barrier; intranasal administration

急性脑梗死是中老年常见的神经系统疾病。急性脑缺血时,脑血管内皮细胞局部受损,血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)功能丧失,进而造成缺血局部脑组织损伤。保护 BBB 完整性成为挽救部分可逆性损伤神经元,减小脑梗死面积,促进神经功能恢复的有效方法之一^[1]。既往研究发现,脑清喷鼻微乳可迅速透过 BBB,提高药物在脑内的分布^[2]。故本文拟观察脑清喷鼻微乳对大鼠中动脉栓塞(MCAO)模型大鼠 BBB 超微结构及通透性的影响,从动物症状体征、神经元微观形态、内皮细胞超微结构、BBB 通透性及相关蛋白变化探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 选择健康雄性 SD 大鼠 90 只,体重 $200 \sim 250 \text{ g}$,清洁级,购自中国医学科学院实验动物中心及军事医学科学院第四研究所实验动物中心(2级),许可证号 SZXK(京)2011-00120。

1.2 药物与试剂 脑清喷鼻微乳由麝香、川芎、三七、冰片、石菖蒲、薄荷等组成,利用现代科技制成微乳喷剂, 0.09 mL 喷(每喷含生药相当于麝香酮 0.005 mg)。以上均由广东药学院制备(批号 20120913),常温保存备用。血栓诱导剂(批号

20081218,长春国奥药业有限公司);伊文思蓝(批号 25598,上海如吉生物发展有限公司);抗体:紧密连接蛋白-1(ZO-1,批号 ab59720)、层黏连蛋白(LN,批号 ab46182)和水通道蛋白-4(AQP-4,批号 ab14055), (均购自英国 Abcam 公司)。

1.3 仪器 Mode1550 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司生产), Leica dmrxa2 全自动多功能显微镜(德国莱卡公司), H-7500 型透射电子显微镜(日立建机株式会社生产)。

2 方法

2.1 分组与给药 随机将大鼠分为对照组、模型组、脑清喷鼻微乳组。每组分为 1, 3, 7 d 3 个时相,每组每个时相 10 只大鼠。给药剂量参照文献[3]中“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表”计算。脑清喷鼻微乳组予脑清喷鼻微乳 $0.19 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于含麝香酮 $0.011 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 滴鼻,每日 3 次,对照组与模型组给予相同时间点等量生理盐水滴鼻。

2.2 大鼠大脑中动脉栓塞模型制备 首先进行栓子制备,随后参照文献[4-5]建立大鼠大脑中动脉栓塞模型。模型组、脑清喷鼻微乳组大鼠均造模。对照组手术方法同模型制作,只在注射时以 0.9% 生

理盐水 0.3 mL 代替栓子溶液。

2.3 检测指标

2.3.1 神经功能缺损症状 大鼠造模成功后,分别于 1,3,7 d 3 个时相从大鼠的精神状态、活动力、四肢状态等进行简单的症状观察,评分标准参考 Bederson 等^[6]的方法。

2.3.2 HE 染色 大鼠 10% 水合氯醛 (400 mg · kg⁻¹) 麻醉,左心室快速灌注 0.9% 生理盐水,待肝脏变为灰白色,换 4% 多聚甲醛 10 mL · min⁻¹ 灌注,当大鼠四肢强直时断头取脑,置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h。经乙醇系列脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋,制成 5 μm 厚石蜡切片,HE 染色,光学显微镜观察皮质组织形态学变化。

2.3.3 电镜检测 大鼠直接脱颈处死,快速断头取脑,在冰上取皮层区 1 mm³ 的组织块迅速放入 4% 戊二醛固定液中。7 d 之内进行锇酸固定、乙醇系列脱水、树脂包埋聚合,制成 50 nm 的超薄切片。用醋酸铀 30 ~ 40 min 和柠檬酸铅 30 min 双重电子染色,置于透射电镜下观察皮质超微结构。

2.3.4 血脑屏障通透性检测 大鼠处死前 1 h 经尾静脉注入 2% EB (2 mL · kg⁻¹),开颅取全脑,快速切取双侧大脑皮质,称取质量,置入盛有 50% 三氯乙酸 (TCA) 溶液 1.5 mL 的匀浆器中,匀浆并离心 (10 000 r · min⁻¹, 20 min),取上清液 1.0 mL 加入

1.5 mL 混合液 (50% TCA 和无水乙醇按 1:3 的比例配制),充分混匀。酶标仪 (λ = 680 nm) 测定上清液吸光度 (A),根据标准曲线计算出 EB 含量。

2.3.5 Western-blot 检测 各组大鼠在不同时间点断头处死,取脑梗死组织匀浆。采用 BCA 蛋白浓度测定法定量蛋白浓度。取等量蛋白上样,电泳、转膜。将转好的膜封闭液封闭 2 h 后,与 1:1000 稀释的抗体 4 ℃ 孵育过夜,室温下二抗孵育 2 h 后, TBST 洗膜。取 1 mL 工作液滴于 PVDF 膜上室温孵育 5 min;保鲜膜封包;暗室 X 光胶片曝光,定影、显影,得到图像结果后应用软件测量灰密度值。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据间的比较采用单因素方差分析方法。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠神经功能评分 同一时相内同对照组相比,模型组在 3 个时相 (1,3,7 d) 中 Bederson's 评分明显升高 (P < 0.05)。同一时相内同模型组相比,脑清喷鼻微乳组在 3 个时相 (1,3,7 d) 中 Bederson's 评分均明显减低 (P < 0.05)。脑清喷鼻微乳组各时相与 1 d 相比较,3,7 d Bederson's 评分逐渐降低 (P < 0.05),符合脑梗死的发展规律 (表 1)。

表 1 脑清喷鼻微乳对急性脑梗死大鼠不同时相 Bederson's 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mL · kg ⁻¹	1 d	3 d	7 d
对照	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	-	9.41 ± 0.83 ¹⁾	9.09 ± 0.71 ¹⁾	8.69 ± 0.74 ¹⁾
脑清喷鼻微乳	0.19	7.26 ± 0.73 ²⁾	4.91 ± 0.63 ^{2,3)}	4.47 ± 1.17 ^{2,3)}

注:同一时相内同对照组比较¹⁾ P < 0.05;同一时相内同模型组比较²⁾ P < 0.05;脑清喷鼻微乳组各时相与 1 d 相比较³⁾ P < 0.05 (表 2 同)。

3.2 大鼠大脑皮质形态观察 神经元以皮质第 3,5,6 层细胞,海马锥体细胞和小脑蒲肯野细胞对缺氧最为敏感^[7]。故本研究选取皮质第 5 层 (内锥体层) 进行观察 (图 1)。HE 染色显示对照组可见较清晰的神经元,突起明显,核浆比值大,细胞核为圆形或椭圆形,着色均匀为浅蓝紫色,可见深染的核仁,偶见神经元胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色,散在胶质细胞。

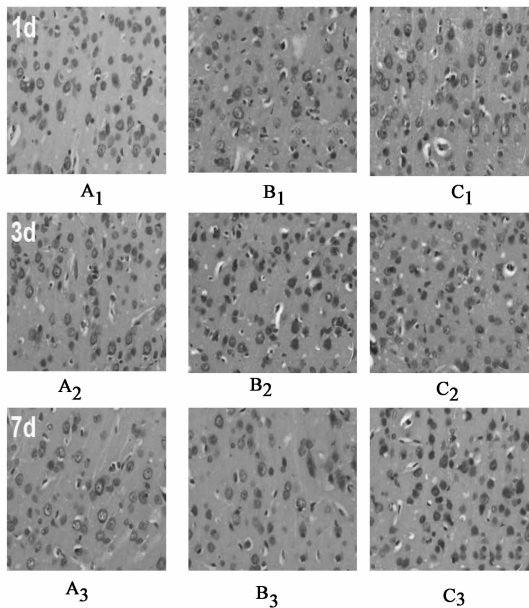
1 d 后,HE 染色显示模型组大部分神经元高度肿胀,可见少部分神经细胞胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色,神经元数量明显减少;脑清喷鼻微乳组神经元中度肿胀,可见少部分神经

细胞胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色,神经元数量轻度减少,以脑清喷鼻微乳组神经元肿胀相对较轻。

3 d 后,HE 染色显示模型组大部分神经细胞胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色,神经元数量明显减少;脑清喷鼻微乳组部分神经细胞胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色,神经元数量中度减少,以脑清喷鼻微乳组神经元整体形态损伤相对较轻。

7 d 后,HE 染色显示模型组神经细胞明显减少,几乎全部神经元胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色;脑清喷鼻微乳组神经细胞中度减少,

部分神经元胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染成红色,以脑清喷鼻微乳组神经元数量相对较多。



A1-A3. 对照组;B1-B3. 模型组;

C1-C3 脑清喷鼻微乳 0.19 mL·kg⁻¹组(图2同)

图1 脑清喷鼻微乳对急性脑梗死大鼠皮质组织病理学改变的影响(HE染色,×40)

3.3 大鼠大脑皮质内皮细胞超微结构观察 对照组内皮细胞基膜完整,线粒体结构基本完整,可见极少量吞饮小泡(图2)

1 d后,模型组基膜大部分融合且模糊不清,细胞质呈中、重度水肿,线粒体大部分嵴和部分膜融合且模糊不清,可见大量吞饮小泡;脑清喷鼻微乳组基膜部分融合且模糊不清,细胞质呈轻、中度水肿,线粒体部分嵴和少部分膜融合,可见吞饮小泡,以脑清喷鼻微乳组内皮细胞水肿较轻。

3 d后,模型组基膜大部分融合且模糊不清,线粒体绝大部分嵴和少部分膜融合、模糊不清,可见线粒体空化现象,存在少量吞饮小泡;脑清喷鼻微乳

组基膜少部分融合,线粒体少部分嵴和膜融合、模糊不清,可见少量吞饮小泡,以脑清喷鼻微乳组细胞器损害相对较轻。

7 d后,模型组基膜绝大部分融合且模糊不清,线粒体大部分嵴和部分膜融合、模糊不清;脑清喷鼻微乳组基膜少部分融合、模糊不清,线粒体部分嵴和膜融合,其中以脑清喷鼻微乳组细胞器损害及基膜相对融合消失相对较轻。

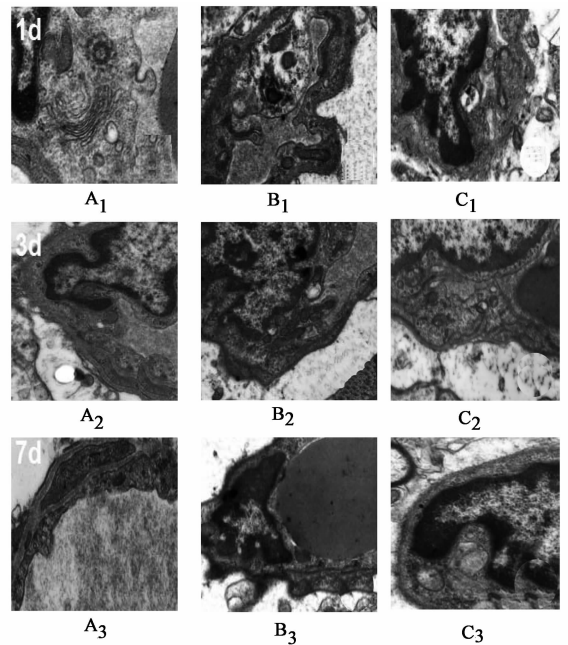


图2 脑清喷鼻微乳对急性脑梗死大鼠皮质

组织内皮细胞超微结构的影响(钨酸染色,×15 000)

3.4 大鼠皮层 EB 含量比较 同一时相内与对照组相比,模型组在 3 个时相(1,3,7 d)中 EB 含量明显升高($P < 0.05$)。同一时相内与模型组相比,脑清喷鼻微乳组在 3 个时相(1,3,7 d)中 EB 含量均明显减低($P < 0.05$)。脑清喷鼻微乳组各时相与 1 d相比较,3,7 d EB 含量逐渐降低($P < 0.05$),BBB 血脑屏障通透性逐渐降低(表 2)。

表2 脑清喷鼻微乳对急性脑梗死大鼠皮层 EB 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

ng·g⁻¹

组别	剂量/mL·kg ⁻¹	1 d	3 d	7 d
对照	-	0.52 ± 0.21	0.55 ± 0.17	0.51 ± 0.14
模型	-	556.70 ± 49.34 ¹⁾	361.60 ± 37.33 ¹⁾	307.62 ± 51.93 ¹⁾
脑清喷鼻微乳	0.19	155.63 ± 52.36 ²⁾	78.26 ± 22.35 ^{2,3)}	70.83 ± 26.91 ^{2,3)}

3.5 大鼠皮质 ZO-1, LN 蛋白含量比较 同一时相内同对照组相比,模型组在 3 个时相(1,3,7 d)中 ZO-1, LN 蛋白含量均明显降低($P < 0.05$)。同一时相内与模型组相比,脑清喷鼻微乳组在 3 个时相(1,3,7 d)中 ZO-1, LN 蛋白含量均明显升高($P <$

0.05)。脑清喷鼻微乳组各时相与 1 d 相比较,3,7 d ZO-1, LN 蛋白逐渐升高($P < 0.05$),BBB 细胞间连接复合体破坏减少,BBB 通透性逐渐降低。见图 3~4。

3.6 大鼠皮质 AQP4 蛋白含量比较 同一时相内

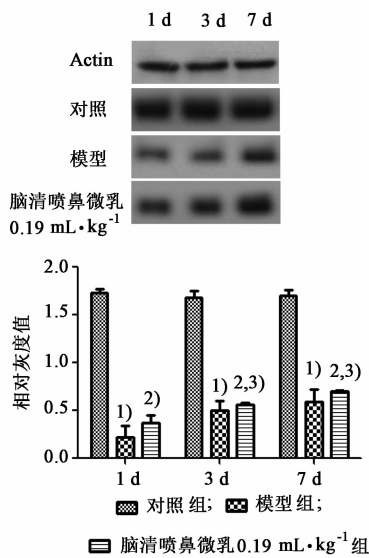


图 3 脑清喷鼻微乳对急性脑梗死大鼠皮质 ZO-1

蛋白相对灰度值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

同一时相内与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;
同一时相内与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;
脑清喷鼻微乳组各时相与 1 d 相比较³⁾ $P < 0.05$ (图 4 ~ 5 同)

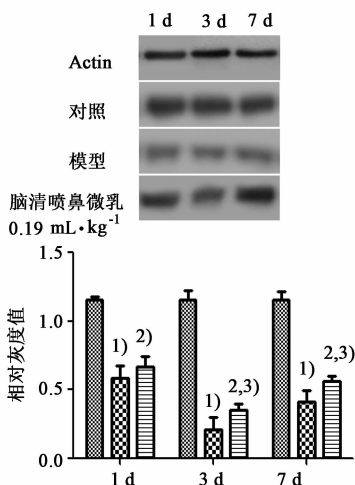


图 4 脑清喷鼻微乳对急性脑梗死大鼠皮质

Laminin (LN) 蛋白相对灰度值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

同对照组相比, 模型组在 3 个时相 (1, 3, 7 d) 中 AQP-4 蛋白含量均明显升高 ($P < 0.05$)。同一时相内同模型组相比, 脑清喷鼻微乳组在 3 个时相 (1, 3, 7 d) 中 AQP-4 蛋白含量均明显减低 ($P < 0.05$)。脑清喷鼻微乳组各时相与 1 d 相比较, 3, 7 d AQP-4 蛋白逐渐降低 ($P < 0.05$), 星形胶质细胞水肿逐渐减轻 (图 5)。

4 讨论

急性脑梗死属中医学“中风病”范畴, 病位在脑, 其主要病机是肝阳上亢, 化火生风, 痰瘀互结, 痹阻脑络, 壅塞脑窍, 以平肝熄风, 活血逐瘀, 涤痰开

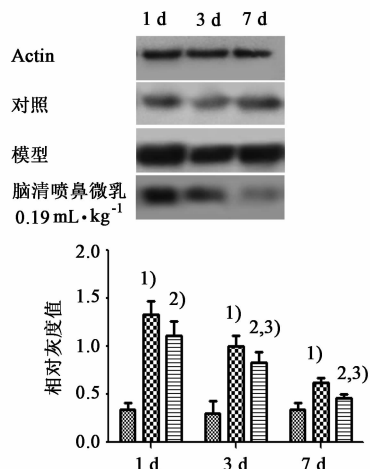


图 5 脑清喷鼻微乳对急性脑梗死大鼠皮质 AQP-4 蛋白相对灰度值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

窍, 通腑泻浊为其基本治则。脑清喷鼻微乳, 由麝香、三七、冰片、川芎、石菖蒲、薄荷等组成, 方中冰片、麝香醒脑开窍, 通经活络; 石菖蒲、川芎、三七通窍醒神、活血化瘀; 薄荷芳香走窜, 载药上行。诸药同用, 起醒脑开窍, 行气化痰之功。既往研究发现, 脑清喷鼻微乳可迅速透过 BBB, 提高药物在脑内的分布^[2], 故脑清喷鼻微乳对 BBB 通透性的影响很可能是其治疗急性缺血性脑卒中的关键机制所在。2004 年美国神经疾病和脑卒中研究院 (NINDS) 首次提出“神经血管单元”概念, 其中 BBB 是“神经血管单元”的核心结构^[8]。因此如何保护急性缺血性脑卒中 BBB 的完整性已成为防治急性缺血性脑卒中的关键环节。

BBB 主要包括 3 层结构, 即脑毛细血管内皮细胞 (brain microvessel endothelial cells, BMECs) 及其间的紧密连接 (tight junction, TJ)、微血管基底膜和周细胞、星形胶质细胞终足形成的胶质膜^[9]。第 1 道功能屏障: 脑微血管内皮细胞是 BBB 功能与结构的主要物质结构基础^[10], 具有完整的 BBB 特性^[11]。位于该细胞顶端的 TJ 能够限制血浆成分外流^[12], ZO-1 蛋白与 TJ 的完整性直接相关^[13]。S. Fischer 等发现, 在缺氧的 24 h, ZO-1 蛋白表达含量下降至 24% ~ 40%^[14]。第 2 道功能屏障: 基底膜与间质内的细胞外间质 (ECM) 是维持 BBB 结构及功能完整性的重要结构基础。LN 作为基底膜的主要成分之一, 能够防止细胞凋亡、维持细胞存活^[15]。张微微等发现, 在脑缺血 72 h 内, 脑微血管基底膜呈大片脱落、溶解、缺损, LN 抗原明显减少^[16]。第 3 道功能屏障: 星形胶质细胞终足参与诱导维护 BBB 形态与功能的完整^[17]。水通道蛋白 AQP-4 广泛存在于

星形胶质细胞终足,其表达增加可导致 BBB 损伤,形成血管性脑水肿^[18]。Tan iguchi M 等发现,脑梗死灶周围 AQP4 的表达增高,与脑水肿的发展趋势一致^[19]。本实验结果显示,急性缺血性脑卒中后,ZO-1 及 LN 蛋白表达显著降低,AQP-4 蛋白表达升高,其变化趋势与脑内 EB 含量呈明显相关性,与上述报道一致。经脑清喷鼻微乳治疗后,ZO-1 及 LN 蛋白表达明显升高,AQP-4 蛋白表达降低,表明脑清喷鼻微乳可通过调控 BBB 三层功能屏障中的关键蛋白调节 BBB 通透性。

Bederson's 评分是脑梗死后运神经功能评价的最重要的指标之一,内皮细胞超微结构改变是评价 BBB 结构完整性的金指标,而神经元的组织微观形态可侧面反映 BBB 通透性的改变。本实验结果提示,急性缺血性脑卒中后,脑清喷鼻微乳可通过调控 BBB 三层结构中的关键蛋白 ZO-1, LN 及 AQP-4 蛋白,调节 BBB 通透性,减少神经元凋亡,减轻可逆性神经元损伤,促进神经功能的恢复。由此可见,作为复方中药的一种改良剂型,脑清喷鼻微乳同样具有多途径、多靶点的作用优势,通过调控不同组织形态结构中的关键蛋白,从内皮细胞、基底膜、星形胶质细胞三个层面保护 BBB 的完整性,为脑清喷鼻微乳应用于临床急性缺血性脑卒中的防治提供了重要的实验依据。

[参考文献]

- [1] 韩冰. 缺血性卒中的神经血管单元[J]. 中华脑血管病杂志:电子版, 2012, 4(6):220.
- [2] 张建伟. 脑清喷鼻微乳治疗急性缺血性脑卒中的临床研究[D]. 广州:广州中医药大学,2010.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1485.
- [4] 张新江,常雨英,张苏明,等. 大鼠自体血栓大脑中动脉闭塞模型的改良[J]. 卒中与神经疾病,2003, 10(1):12.
- [5] 刘瑜,胡文立,宋爱利,等. 大鼠脑血栓模型的实验研究[J]. 实用医学杂志,2005,21(8):1992.
- [6] 李建生,刘敬霞,王冬,等. 大黄苷元注射抗大鼠脑缺血损伤炎性级联反应[J]. 中国药理学通报,2007, 23(1):114.
- [7] 黄宇虹. 中风病急性期证候学研究[D]. 天津:天津中医学院,2005.
- [8] Lo E H. Experimental models, neurovascular mecha-nisms

- and translational issues in stroke research [J]. Br J Pharmacol, 2008, 153(Suppl 1):396.
- [9] Hawkins B T, Davis T P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease[J]. Pharmacol Rev, 2005(57):173.
- [10] 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.
- [11] Imperatore C, Germanò A, d'Avella D, et al. Effects of the radical scavenger AVS on behavioral and BBB changes after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Life Sci, 2000, 66(9):779.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Fischer S, Wobben M, Marti H H, et al. Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1 [J]. Microvascular Research, 2002, 63(1):70.
- [15] Gu Z, Cui J, Brown S, et al. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia [J]. J Neurosci, 2005, 27(25):6401.
- [16] 张微微,魏亚洲,周小英,等. 大鼠脑缺血/再灌注层黏连蛋白表达的实验研究[J]. 北京医学, 2005, 27(7):408.
- [17] Hawkins, B T, Davis T P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease[J]. Pharmacol Rev, 2005, 57(2):173.
- [18] Ke C, Poon W S, Ng H K, et al. Heterogeneous response of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats[J]. Neurosci Lett, 2001, 301(1):21.
- [19] Tan iguchi M, Yamashita T, Kumura E, et al. Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2000, 78(1/2):131.

[责任编辑 聂淑琴]