

益脑康胶囊对脑梗死大鼠溶栓后血脑屏障的保护作用及对 ZO-1 蛋白表达的影响

李跃^{1,2}, 孙景波², 黄燕^{2*}

(1. 广州中医药大学第二临床学院, 广州 510405; 2. 广东省中医院, 广州 510120)

[摘要] **目的:** 观察益脑康胶囊(YC)配伍对急性脑梗死大鼠重组组织型纤溶酶原激活剂 rt-PA 溶栓后血脑屏障通透性及紧密连接的附着蛋白(ZO-1)蛋白表达的影响。**方法:** 将 SD 大鼠随机等分为假手术组、溶栓组、益脑康胶囊低剂量组($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、益脑康胶囊高剂量组($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 连续口服 3 d。建立大鼠自体血栓栓塞大脑中动脉闭塞模型, 采用分光光度计法及 Western blot 法分别检测大鼠脑组织伊文思蓝含量及 ZO-1 蛋白的表达。**结果:** 与假手术组相比, 各组脑内 EB 含量均显著增高, ZO-1 蛋白水平明显降低; 与溶栓组相比, YC 低剂量组脑内 EB 含量差异不显著, 高剂量组脑内 EB 含量显著下降, 高、低剂量组 ZO-1 蛋白表达水平均显著增加; 与 YC 低剂量组相比, 高剂量组脑内 EB 含量显著下降, ZO-1 蛋白表达水平显著增加。**结论:** 益脑康胶囊可以减轻溶栓后血脑屏障破坏, 可能与其上调 ZO-1 蛋白的表达有关。

[关键词] 溶栓治疗; 益脑康胶囊; 血脑屏障; ZO-1 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0268-04

[doi] 10.11653/syfy2013110268

Protective Effects of Yinaokang Capsule on Blood-brain Barrier and Influence on Expression of ZO-1 Protein after Thrombolysis Therapy in Cerebral Ischemia Rats

LI Yue^{1,2}, SUN Jing-bo², HUANG Yan^{2*}

(1. Second Clinical Medicine College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Yinaokang capsule (YC) on blood-brain barrier opening and expression of zonular occludens protein (ZO-1 protein) after thrombolysis therapy by recombinant tissue type plasminogen activator (rt-PA) in rats. **Method:** The rats were randomly divided into sham operation group, thrombolysis group, YC low dose group ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ daily for 3 d), YC high dose group ($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ daily for 3 d). Model of middle cerebral artery occlusion in rats was established by embolizing left middle cerebral artery with autologous blood clots. The permeability of the brain-blood barrier was observed with Evan's blue (EB) with spectrophotometer and the expression of ZO-1 protein was detected by Western blot. **Result:** Compared with the sham group, EB leakage in brain tissue was increased significantly and the expression of ZO-1 protein was decreased obviously in all other groups. Compared with the thrombolysis group, the EB leakage showed no difference in YC low dose group and increased in the high dose YC group; the expression of ZO-1 protein was increased significantly in both YC groups. Compared with the low dose YC group, the EB leakage in the high dose YC group was decreased, and the expression of ZO-1 protein in the high dose YC group was increased.

[收稿日期] 20121231(682)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072783); 广东省财政厅专项经费项目(粤财社[2010]5号)

[第一作者] 李跃, 在读博士, 从事脑病的中医临床与基础研究, Tel: 18664656939, E-mail: 115142221@qq.com

[通讯作者] * 黄燕, 博士生导师, 从事中医药防治脑病的临床与基础研究工作, Tel: 15915777925, E-mail: gdszyhyh@163.com

Conclusion: YC could attenuate the breakdown of brain-blood barrier after thrombolysis therapy. Its mechanisms may be associated with up-regulated expression of ZO-1 protein.

[Key words] thrombolysis therapy; Yinaokang capsule; brain-blood barrier; zonular occludens protein

脑梗死因具有发病率高、致残率高、病死率高及神经功能损伤的难治性等特点。溶栓目前被认为是治疗急性缺血性卒中最有效的方法,但易引起出血转化(hemorrhagic transformation, HT)等多种并发症。现代研究证实,血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性的增高和完整性的破坏是溶栓后出血转化的重要原因。内皮细胞的紧密连接(Tight Junction, TJ)是血脑屏障最主要的结构,与星形胶质细胞足突、周细胞及基膜共同构成了 BBB,构成人体脉管系统独特的形态和生化结构,维持中枢神经系统内环境的稳定^[1]。TJ 由跨膜蛋白、连接黏附分子及胞质附着蛋白等构成,ZO-1 是第一个被证实的 TJ 附着蛋白,是构建细胞间紧密连接的主要成分之一,其在细胞内的表达水平可以反映细胞间紧密连接的状态。益脑康胶囊是广东省中医院治疗中风常用药物,黄芪为方中主药,具有豁痰熄风通窍、益气活血通脉之功效。已有研究证明益脑康胶囊具有促进微血管再生^[2]、修复损伤的内皮细胞、纠正内皮功能紊乱、抑制新生血管生成和炎性浸润等功能^[3]。本研究通过观察益脑康胶囊对脑梗死大鼠溶栓后血脑屏障及紧密连接相关 ZO-1 蛋白表达的影响,探讨其血管保护机制及对出血转化的预防作用。

1 材料

1.1 动物 健康成年 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 250~300 g,由广东省医学实验动物中心提供,许可证号 0058101。

1.2 药物 注射用凝血酶(湖南一格制药有限公司),重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA,德国 Boehringer Ingelheim 公司,批号 909452),益脑康胶囊(广东省中医院院内制剂,广东省中医院中心药房,批号 100207),伊文思蓝(EB,美国 Sigma 公司,批号 050604),Western blot 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 061178N),兔抗大鼠 ZO-1 一抗(美国 Invitrogen 公司),内参 β -actin(美国 CST 公司),山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗(IgG-HRP,美国 CST 公司),其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 UV2450 紫外分光光度计(日本岛津公司),S22R 高速低温离心机(美国 Beckman 公司),

PB602-N 电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司),聚丙烯酰胺凝胶电泳装置(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 大鼠大脑中动脉自体血栓栓塞模型的建立及评价 采用 Zhang 等^[4]的改良栓塞法进行改进。大鼠以 10% 水合氯醛 $3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉,仰卧固定,颈部正中位备皮,消毒,铺巾。取颈正中皮肤切口,钝性分离,暴露右侧颈总动脉,分离迷走神经,将颈总动脉钝性分离至暴露颈外动脉和颈内动脉分叉处。用 1 mL 注射器穿刺进大鼠股动脉取动脉血 0.1 mL,加入 4 U 凝血酶,混匀静置 10 min,待血液凝固后将其注入 24G 静脉留置针管,制成长约 1 cm 的栓子,后接 1~2 mL 的生理盐水注射器。制作过程中注意勿使留置针管内进入空气。将留置针在颈外动脉和颈内动脉分叉的前方穿刺进颈总动脉,并向前内侧进入颈内动脉内 10 mm,拔出针芯,用吸有生理盐水的注射器快速将栓子冲入颈内动脉内,结扎颈总动脉并缝合肌肉及皮肤。假手术组手术操作与模型组相同,注入生理盐水代替栓子。术后 2 h 观察造模大鼠的行为学改变:对其进行提尾悬空实验,神经功能评分采用 Bedersen 法^[5],0 分:无明显神经功能缺损;1 分:对侧前肢屈曲;2 分:拉尾时对侧前肢抓力下降;3 分:向各方自发运动,拉尾时向对侧旋转;4 分:向对侧自发旋转。神经功能评分 1~4 分者纳入实验。

2.2 动物分组及给药 将 48 只大鼠随机分为假手术组、溶栓组、益脑康低剂量组、益脑康高剂量组,每组 12 只。术前 3 d 开始高、低剂量组分别给予益脑康 $3, 1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,灌胃前将益脑康溶于 3 mL 生理盐水中,假手术组和溶栓组给以等体积的生理盐水灌胃。1 次/d,连续 3 d。动物若有死亡及时补充。除假手术组外各组均于造模术后 3 h 后经股静脉给予 rt-PA($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。假手术组给予等体积生理盐水。各组在溶栓后 24 h 处死。

2.3 血脑屏障通透性的测定 血脑屏障通透性通过渗出血管外的 EB 来评价。参考 Lao Y 等^[6]的方法。称取 32 mg EB 溶于 1 L 甲酰胺溶液,配制成 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EB 溶液,再将其倍比稀释为 4, 2, 1, 0.5, 0.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以分析纯甲酰胺溶液作为空白对照,用紫外分光光度计在 620 nm 波长下比色,以测定的

吸光度 (A), 绘制标准曲线, 求得回归方程 $Y = 10.154X - 0.0218$ (Y 为 EB 浓度, X 为吸光度), $R^2 = 0.9996$ 。每组各取 6 只大鼠, 在处死前 1 h 股静脉注射 2% 的 EB 生理盐水 ($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 循环 30 min 后心脏灌注生理盐水 200 mL 以清除血管内的 EB, 取梗死侧大脑半球置于 4 mL 甲酰胺中, 37°C 水浴 24 h 以提取组织中的 EB, 离心 15 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液于 620 nm 波长处测定吸光度 (A), 根据标准曲线计算样品 EB 浓度。

脑组织 EB 含量 = 样品 EB 浓度 / 脑湿重

2.4 Western Blot 法检测大鼠缺血区脑组织血管内皮细胞 ZO-1 蛋白量 各组取 6 只大鼠, 造模给药后 24 h 处死取脑, -80°C 保存备用。取右侧大脑半球额顶叶皮质相同部位组织, 提取总蛋白, 酚试剂法测定蛋白浓度。取蛋白 100 μL , 加入 100 μL SDS 上样缓冲液 ($2 \times$), 沸水煮 3 ~ 5 min 使蛋白完全变性。SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 转膜, 将膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 2 h。 4°C 下 ZO-1 一抗 1:1 000 稀释孵育过夜。TBST 漂洗、结合二抗、TBST 漂洗、ECL 光化学法曝光显影、定影。将胶片扫描, 用凝胶成像分析仪分析目标条带和内参条带的 A, 以 $A_{\text{目的条带}}/A_{\text{内参条带}}$ 作为蛋白相对表达量。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 非正态分布、方差不齐采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 益脑康对模型大鼠脑组织 EB 含量的影响 假手术组脑内 EB 含量极低, 其余各组与其相比均有显著增高 ($P < 0.05$)。低剂量组同溶栓组差异不显著; 高剂量组与低剂量组以及溶栓组相比均有显著下降 ($P < 0.05$)。表明高剂量组保护溶栓后血脑屏障的作用强于低剂量组。见表 1。

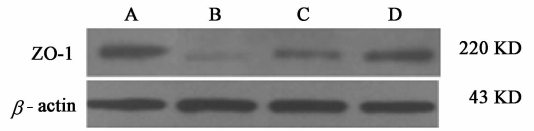
表 1 益脑康对模型大鼠脑组织 EB 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	EB/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
假手术	-	0.05 \pm 0.01
溶栓	-	6.69 \pm 0.42 ¹⁾
益脑康	1	6.17 \pm 0.62 ¹⁾
	3	4.12 \pm 0.51 ^{1,2,3)}

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与溶栓组比较²⁾ $P < 0.05$; 与益脑康低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

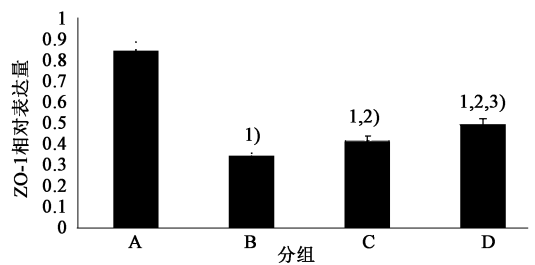
3.2 益脑康对模型大鼠脑组织 ZO-1 蛋白表达水平的影响 假手术组与其余各组相比蛋白表达水平

均显著增高 ($P < 0.05$); 溶栓组与高、低剂量组相比蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$); 高剂量组比低剂量蛋白水平显著增高 ($P < 0.05$)。Western blot 的结果提示溶栓组大鼠脑组织的 ZO-1 蛋白的含量较低, 而给予益脑康胶囊治疗后蛋白表达均有增加, 而其中高剂量组的效果较强。见图 1, 2。



A. 假手术组; B. 溶栓组; C. 益脑康 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 益脑康 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 (图 2 同)

图 1 益脑康对溶栓后大鼠脑组织 ZO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)



与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与溶栓组比较²⁾ $P < 0.05$; 与低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$

图 2 益脑康对溶栓后大鼠脑组织 ZO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

4 讨论

出血转化作为溶栓后最为凶险的并发症, 限制了溶栓治疗的临床应用。而出血转化的一个重要原因就是 BBB 通透性的增高和完整性的破坏。BBB 结构和功能的破坏在急性缺血性脑损伤中占有非常重要的地位。因此脑卒中后微血管及 BBB 保护的研究已为目前脑保护研究的热点之一。

脑卒中属于中医中风病范畴, 是由于患者积损正衰, 脏腑功能失调, 气血素虚, 痰瘀内生, 加之劳倦内伤、忧思恼怒、气候骤变等诱因, 而致瘀血阻滞、脑脉痹阻引起, 属本虚标实之证。溶栓药物能在极短时间之内使瘀血消散、脑络再通, 按照中医理论当属强力破血逐瘀之品。然气与血二者关系密切, 气为血之帅, 血为气之母, 破血的同时势必耗气。故临床在用溶栓药降解血栓的同时, 常用益气补虚之品。益脑康胶囊为我院院内制剂, 由黄芪、川芎、制南星、水蛭、制天麻、半夏组成, 是刘茂才、黄培新等主持的国家科技部“九五”、“十五”攻关课题制定的以调节

血海为基本治疗法则的方剂,在临床上已被证实是治疗缺血中风的有效方剂^[7]。根据前期研究,益脑康能通过上调急性缺血性中风大鼠脑组织血管内皮生长因子的表达,从而促进缺血区及缺血半暗带毛细血管的再生和侧枝循环的建立^[8]。方中川芎辛散温通,既能活血,又能行气,可减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,对脑保护有协同作用,保护作用均与细胞外信号调节激酶(ERK)有关^[9];黄芪甘温,归脾、肺经,乃补气之圣药。罗玉敏等^[10]观察黄芪甲苷对局灶性脑缺血后 BBB 破坏的影响时发现,注射黄芪甲苷组 BBB 的通透性比单纯的缺血组明显降低,认为黄芪甲苷是一种脑组织保护剂,可以降低 BBB 的通透性。王洋等^[11]在脑缺血再灌注的研究中发现,水蛭素能减少及推迟原位大鼠脑缺血再灌注损伤中的细胞凋亡,从而证明,水蛭素可以作为脑缺血再灌注损伤的有效保护剂。本研究对急性脑梗死溶栓大鼠进行研究,观察其 BBB 超微结构与通透性的变化。伊文思蓝渗透法是评价 BBB 开放程度的常用方法。BBB 在溶栓后 24 h 的通透性在各组均出现显著性升高,低剂量组与溶栓组的差异不显著,而高剂量组与溶栓组的差异显著,说明高剂量组比低剂量组对血脑屏障的保护作用更明显,也更持久。

TJ 主要由跨膜蛋白和胞质附着蛋白以及细胞骨架组成,其中跨膜蛋白包括 occludin, claudins, 连接黏附分子(JAM)等;胞质附着蛋白包括 ZO-1, ZO-2, ZO-3, 扣带蛋白(cingulin), AF-6, 7H6 等;细胞骨架蛋白主要是由微丝组成。其功能包括加强内皮细胞间连接、封闭细胞间隙、调整各种物质扩散、参与细胞生长分化信号的传递等。分子生物学研究证实,TJ 是 BBB 通透性调节的中心环节,ZO-1 是构成 TJ 的主要结构蛋白,其表达水平的变化与脑微血管通透性的改变及脑水肿的程度密切相关。目前中药对脑血管 TJ 的保护也有不少研究,有研究发现黄芩可通过对脑微血管 TJ 的保护而降低 BBB 通透性^[12]。从 Western blot 结果可以看出,益脑康高剂量组保护作用最强,高于低剂量组,说明益脑康胶囊对血脑屏障的保护作用与药物剂量有关。

综上,益脑康胶囊对急性脑梗死溶栓后大鼠的血脑屏障具有保护作用。其可能的机制是益脑康胶囊能减少脑缺血性损伤及溶栓药物对 TJ 相关蛋白 ZO-1 的破坏。

[参考文献]

- [1] Liebner S, Czupalla C J, Wolburg H. Current concepts of blood-brain barrier development [J]. *Int J Dev Biol*, 2011, 55(4/5):467.
- [2] GUO Jian-wen, CHEN Chao, HONG Yan, et al. Combinatorial effects of Naomai Yihao capsules and vascular endothelial growth factor gene-transfected bone marrow mesenchymal stem cells on angiogenesis in cerebral ischemic tissues in rats [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 32(1): 87.
- [3] 朱磊,张彦红,时光,等. 益脑康对动脉粥样硬化急性性脑缺血大鼠血清 NO、VEGF 及 PDGF-BB 含量的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(8): 2048.
- [4] Zhang R L, Chopp M, Zhang Z G, et al. A rat model of focal embolic cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 1997, 766(1/2): 83.
- [5] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion; evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472.
- [6] 劳翼,修建成,谢昌联,等. 超声微波造影剂对大鼠骨骼肌毛细血管通透性的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(4): 542.
- [7] 刘茂才. 中西医结合综合救治高血压性中、大量脑出血 201 例临床研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2001, 18(1): 13.
- [8] 秦秀德,黄燕,朱磊,等. 益脑康对动脉粥样硬化基础急性缺血性中风大鼠脑组织病理及脑组织血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(16): 166.
- [9] 李贵柱,陈前芬,马琳. 川芎嗪和缺血预适应对大鼠再灌注脑损伤的保护作用 [J]. *山西医科大学学报*, 2010, 41(2): 97.
- [10] 罗玉敏,秦震. 黄芪甲苷对大鼠局灶性脑缺血血脑屏障破坏的影响 [J]. *中国临床神经科学*, 2000, 8(4): 280.
- [11] 王洋,王善政,何伟. 中药水蛭对脑缺血再灌注后细胞的抗凋亡作用 [J]. *山东中医药大学学报*, 2001, 25(2): 139.
- [12] Zhu Haiyan, Wang Zhiyao, Xing Yanwei. Baicalin reduces the permeability of the blood-brain barrier during hypoxia in vitro by increasing the expression of tight junction proteins in brain microvascular endothelial cells [J]. *Ethnopharmacol*, 2012, 141(2): 714.

[责任编辑 何伟]