

加味四君子汤对脑缺血大鼠脑组织 Occludin, ZO-1, Claudin-1 蛋白及其 mRNA 表达的影响

唐冰镕, 李花*, 刘旺华, 胡康丽

(湖南中医药大学 中医诊断学湖南省重点实验室, 长沙 410208)

[摘要] **目的:**探讨加味四君子汤对脑缺血大鼠脑组织闭合蛋白(Occludin),密封蛋白-1(Claudin-1),闭锁连接蛋白-1(ZO-1)表达的影响,并探讨相关的作用机制。**方法:**将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组,模型组,依达拉奉组($3.2 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),加味四君子汤加减低、中、高剂量组($4.77, 9.54, 19.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。采用线栓法制备大鼠中动脉栓塞(MCAO)模型,治疗 7 d 后处死,运用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠缺血侧脑皮质区 Occludin, ZO-1, Claudin-1 蛋白的表达,运用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠缺血侧脑皮质区 Occludin, ZO-1, Claudin-1 mRNA 表达。**结果:**与假手术组比较,模型组 Occludin, Claudin-1, ZO-1 蛋白显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,依达拉奉组、加味四君子汤各剂量组 Occludin, Claudin-1, ZO-1 蛋白均显著增高($P < 0.01$)。与假手术组比较,模型组大鼠 Occludin, Claudin-1, ZO-1 mRNA 表达下调($P < 0.01$);与模型组比较,依达拉奉组、加味四君子汤各剂量组大鼠 Occludin, Claudin-1, ZO-1 mRNA 表达上升($P < 0.01$)。**结论:**加味四君子汤可能通过增加紧密连接蛋白 Occludin, ZO-1, Claudin-1 的表达,保护血脑屏障,减轻缺血性脑卒中大鼠脑水肿。

[关键词] 脑缺血; 脑水肿; 加味四君子汤; 健脾益气利水; 闭合蛋白; 密封蛋白-1; 闭锁连接蛋白-1

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0057-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191201

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190228.1601.001.html>

[网络出版时间] 2019-03-01 15:30

Effect of Modified Sijunzi Tang on Protein and mRNA Expressions of Occludin, ZO-1 and Claudin-1 in Cerebral Ischemia Rats

TANG Bing-rong, LI Hua*, LIU Wang-hua, HU Kang-li

(Key Laboratory of Diagnostics of Chinese Medicine in Hunan Province, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of modified Sijunzi Tang on protein and mRNA expressions of Occludin, Claudin-1 and zonula occludens-1 (ZO-1) in cerebral ischemia rats. **Method:** Totally 60 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group, edaravone group, small-dose modified Sijunzi Tang group, middle-dose modified Sijunzi Tang group and high-dose modified Sijunzi Tang group. The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was prepared by suture method. After 7 days of treatment, the modeling group was put to death. Western blot was used to detect the contents of Occludin, Claudin-1 and ZO-1 in the ischemic cerebral cortex of rats. Detection of Occludin, ZO-1, Claudin-1 mRNA expression in the ischemic cortex of rats by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR).

[收稿日期] 20181119(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202632, 81473567); 湖南省教育厅优秀青年基金项目(14B134); 湖南省高校创新平台开放基金项目(15K092); 湖南省中医药科研计划项目(201723)

[第一作者] 唐冰镕, 在读硕士, 从事《内经》治则治法与心脑血管病防治研究, E-mail: 327998056@qq.com

[通信作者] *李花, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事《内经》治则治法与心脑血管病防治研究, E-mail: 420039931@qq.com

Result: Compared with the sham operation group, protein expressions of Occludin, Claudin-1, and ZO-1 in the model group were significantly down-regulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, protein expressions of Occludin, ZO-1, Claudin-1 in the positive control group and modified Sijunzi Tang groups increased significantly, with statistically significant differences ($P < 0.01$). Compared with the Sham operation group, the expression of Occludin, Claudin-1, and ZO-1 mRNA in the model group was down-regulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, mRNA expressions of Occludin, Claudin-1, ZO-1 in the positive control group and modified Sijunzi Tang groups increased, with statistically significant differences ($P < 0.01$). **Conclusion:** Modified Sijunzi Tang may protect the blood-brain barrier and reduce brain edema in ischemic stroke rats by increasing the expression of tight junction proteins Occludin, ZO-1 and Claudin-1.

[**Key words**] cerebral ischemia; brain edema; modified Sijunzi Tang; invigorating spleen and replenishing Qi and draining water; Occludin; Claudin-1; zonula occludens-1 (ZO-1)

脑卒中是一种发生在脑部动脉的临床常见脑血管疾病,严重威胁人类的健康。脑水肿为缺血性脑损伤的早期标志。因此从中医角度,探求急性期脑水肿的治疗方法,寻找中风的有效治疗手段,从新的角度论述脑卒中仍是医学界乃至全社会的一大热点,对于提高脑卒中患者的治愈率和生活质量具有非常重要的意义。缺血性脑水肿缺血早期细胞稳态失效后发生“离子水肿”,其中渗透活性颗粒和水在细胞内积聚,这种现象被称为细胞(或细胞毒性)水肿。细胞内离子和水以细胞外区室为代价积聚,在血管内和细胞外区室之间建立渗透梯度,是导致脑组织肿胀的直接原因。随着缺血程度的加重,血脑屏障(BBB)的通透性被破坏,进而出现血管源性水肿。BBB的损害是血管源性脑水肿的病理基础,脑缺血再灌注发生后,由于各种原因导致BBB通透性破坏并开放,谷氨酸受体激活,线粒体功能障碍,Na⁺/Ca²⁺交换和活性氧(ROS)产生等原因导致脑组织发生肿胀,并形成水肿^[1]。紧密连接蛋白(TJ)在BBB中起着重要的作用,内皮细胞中的TJ是神经血管单元成分形成的BBB的主要结构成分。TJ将内皮细胞紧密连接在一起,形成血液和大脑之间的屏障。TJ是具有复杂架构的动态结构。他们由跨膜屏障蛋白和细胞质支架蛋白组成,他们与细胞内细胞骨架(肌动蛋白和微管)连接到调节蛋白。跨膜蛋白促进细胞黏附并形成细胞旁屏障。支架蛋白的主要作用是调节跨膜蛋白的链形成和TJ定位^[2]。闭合蛋白(Occludin),密封蛋白-1(Claudin-1),闭锁连接蛋白-1(ZO-1)是TJ相关蛋白中能够调节BBB通透性的蛋白,能够改变脑血管通透性,保护血脑屏障以及减轻缺血性脑卒中大鼠脑水肿^[3]。课题组前期研究显示加味四君子汤(健脾补土方)能够很好的保护神经功能,改善智能减退者

的智力(如记忆力、计算能力、定向能力),有利于恢复精神症状,提高患者生活质量^[4]。该方能增加某些神经细胞外基质(ECM)中层黏连蛋白(LN)的表达,降低基质金属蛋白酶(MMP)-2和MMP-9的表达,减少组织型纤溶酶原激活物(t-PA),增加纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)的表达,对神经ECM具有保护作用^[5-8]。此外,该方还能增加整合素 β_3 (INT β_3),整合素连接激酶(ILK)表达,增加神经细胞与细胞外基质之间的黏附性,上调磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK),p-蛋白激酶B(p-Akt),下调B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax)表达,减少神经细胞凋亡^[9-10]。该方对紧密连接蛋白表达的影响作用未见报道。本研究将从紧密连接蛋白Occludin,ZO-1,Claudin-1入手,进一步探讨加味四君子汤对ECM和血脑屏障的保护作用及机制,以期为临床防治缺血性脑水肿提供新的治法和新的切入点。

1 材料

1.1 动物 体质量250~280g,无特定病原体动物(SPF级)SD大鼠60只(动物来源于湖南斯莱克景达实验动物有限公司),因雌性动物周期性生理激素的影响,这里全部采用雄性大鼠。将大鼠分笼装入SPF级实验室的笼盒中(每笼2~3只),适应性喂养1周(饲料及垫料均由湖南中医药大学动物实验中心提供),平均室温22~26℃,相对湿度35%~70%。实验动物许可证号SYXK(湘)2013-0005,实验动物质量合格证号43004700048236。湖南中医药大学伦理委员会编号HN-LL-2017-025-03,符合动物伦理委员会的要求。

1.2 药物与试剂 加味四君子汤由人参片15g,白术12g,白茯苓10g,黄芪15g,淮山药12g,薏苡仁12g,泽泻12g,猪苓12g,炙甘草6g组成(各药物

购自湖南中医药大学第一附属医院),由湖南中医药大学黄小平教授鉴定均为正品,符合 2015 年版《中国药典》规范。依达拉奉注射液(吉林省博大制药有限公司,批号 80-140603)。0.45 μm PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号 TA-09);DAB 显色试剂盒(无锡傲锐东源生物科技有限公司,批号 k175914A);trizol(美国 Sigma 公司,批号 CW0581);十二烷基硫酸钠(SDS,北京索莱宝科技有限公司,批号 WC8762);兔抗免疫球蛋白(Ig)G(H+L)/辣根过氧化物酶(HRP)(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZB-2301);显影定影试剂,RIPA 裂解液,PMSF ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),转移缓冲液,TBS 缓冲液,BCA 蛋白定量检测试剂盒(武汉谷歌生物科技有限公司,批号分别为 G2001, G2016, G3201, G2003, G2004, G2014);牛血清白蛋白(BSA,德国 Roche 公司,批号 G5021);HyPure™ Molecular Biology Grade Water(美国 Thermo 公司,批号 SH3053802);兔抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 BS-0061R)。

1.3 仪器 MDF-U72V 型 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱(日本 Sanyo 公司);SPLL806 型冰冻切片机(美国 Bio-Rad 公司);MC-N201 型恒温箱,DY CZ-24DN 型电泳仪(北京六一仪器厂);E-203-L 型显微镜(海口市远泰实验器材厂);ABI7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司);Centrifuge 5415D 型离心机(德国 Eppendorf 公司);BP310P 型称量天平(德国 Sartorius 公司);美国 SI Vortex-Genie2 涡旋振荡器(北京卓信宏业仪器设备有限公司);SPL0840 型超纯水仪(北京康铭泰克科技有限公司);WSE-4040 型半干转膜仪系统(美国 ATTO 公司);alphaEaseFC 灰度分析软件(美国 Alpha Innotech 公司)。

2 方法

2.1 造模前期随机分组 大鼠 60 只,按随机数表法分为假手术组 10 只、模型制备组 50 只。

2.2 模型制备与评价 参考 Longa 等^[11]方法建立大脑中动脉闭塞局灶性脑缺血模型(MCAO 模型),并于缺血 120 min 后拔线,并记录拔线时间。假手术组的大鼠只剥离组织及分离血管,不对血管进行任何结扎处理。在大鼠完全清醒后采用双盲法进行神经功能缺损评分,1~3 分者判断为造模成功。评分为 0 分,4 分的大鼠造模不成功,予以剔除。

2.3 造模后给药 因各种原因导致部分大鼠死亡(如手术不耐受,缺血损伤较严重、麻醉过量等),

剔除死掉的 3 只大鼠,余 47 只,然后再随机进行分组,模型组余 9 只、依达拉奉组余 10 只、小剂量组余 10 只、中剂量组余 9 只、大剂量组余 9 只,加上假手术组 10 只,共 6 组。在治疗喂养期间,又因为灌胃操作不当及老鼠耐受脑缺血损伤能力不一各种原因,再次剔除掉 9 只死亡老鼠,假手术组剩 8 只,模型组 7 只、依达拉奉组 7 只、加味四君子汤低剂量组剩 7 只、加味四君子汤中剂量组剩 8 只、加味四君子汤高剂量组剩 8 只。按照 70 kg 成人每日服用 111 g 生药剂量按体表面积进行换算给药。具体给药方式和剂量,假手术组冷开水灌胃;模型组灌胃蒸馏水;依达拉奉组以 $3.2 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 依达拉奉腹腔注射;低剂量组以 $4.77 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于临床等效剂量的 1/2)灌胃给药;中剂量组以 $9.54 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于临床等效剂量)灌胃给药;高剂量组以 $19.08 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于临床等效剂量 2 倍)灌胃给药。为避免给药方式带来的差异,假手术组、模型组及中药各剂量组还予以生理盐水腹腔注射,阳性对照组予以冷开水灌胃。从造模成功后 2 h 开始给药。连续给药 7 d,每日给药时间相同,每天 1 次。

2.4 标本采集 用 10% 水合氯醛($3.5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉大鼠,待大鼠完全昏迷后,将其固定于手术板上,迅速断颈,剪刀剪开头部,用手术镊子剥离大鼠头骨提取脑组织(注意操作时不要损伤脑组织,且此操作应在冰盘上进行),分离出缺血侧大脑皮质,将分离出的脑组织血迹清洗干净后,置于离心管中备用($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存)。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Occludin, ZO-1, Claudin-1 蛋白的表达 取缺血侧皮层组织,从中提取总蛋白,检测蛋白浓度,然后电泳,转膜,电泳后,将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜(Millipore)上。用 TBS-T 中的 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h 后,将膜在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下与一抗孵育过夜。将膜用 TBST 洗涤 3 次,持续 5 min,然后在室温下与辣根过氧化物酶缀合的二抗孵育 2 h。用 TBST 洗涤 6 次,每次 5 min 后,使用 ECL 试剂检测蛋白质。条带灰度扫描分析用 alphaEaseFC 灰度分析软件,目的蛋白以样品条带灰度值/相应内参灰度值表示,本研究以 β -actin 为内参。

2.6 Real-time PCR 检测 Occludin, ZO-1, Claudin-1 mRNA 的表达 取缺血侧皮层组织提取总 RNA,然后反转录 cDNA 进行 PCR 扩增(扩增引物序列见表 1)。电泳,取 RNA 5 μL 用 1% 琼脂糖凝胶进行,检测 RNA 的完整性。反转录,向反应管中加入反应

体系的第一部分 50 μL , 混匀。加热 5 min (加热温度为 70 $^{\circ}\text{C}$), 于冰上冷却 2 min, 迅速简短离心, 收集反应液后加入相应组分, 轻轻吸打混匀, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 及 42 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别温浴 10, 50 min, 然后加热 5 min。将反应体系稀释到 50 μL , -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对数据进行相对定量分析, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值反映目的基因表达倍数。反应体系 (20 μL) 为 Mix 10 μL , 上下游引物各 0.6 μL , cDNA 模板 100 ng, 加入 ROX Reference Dye 0.4 μL , 无酶双蒸水至 20 μL 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 1 次循环。58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 次循环。分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增。溶解曲线 65 ~ 95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
Occludin	5'-ATAGCCATGTCTCGGGTTCAT-3'	83
	5'-TCCATCTTCTTCGGGTTTCAC-3'	
ZO-1	5'-TGATCGTGTCTCTACCTGTC-3'	101
	5'-CGCCTTCTGTATCTGTCTCT-3'	
Claudin-1	5'-GAGACTACCACTGTCC-3'	109
	5'-AAAGAATCTCAAAACCA-3'	
β -actin	5'-CCTAGACTCGAGCAAGAGA-3'	140
	5'-GGAAGGAAGGCTGGAAGA-3'	

2.7 数据学分析 采用 SPSS 22.0 进行统计, 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布, 多组间均数比较用完全随机设计多样本单因素方差分析, 组间

表 2 加味四君子汤对大鼠缺血侧脑组织 Occludin, Claudin-1, ZO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of modified Sijunzi Tang on expression of Occludin, Claudin-1, ZO-1 in ischemic brain tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Occludin/ β -actin	ZO-1/ β -actin	Claudin-1/ β -actin
假手术	8	-	2.357 \pm 0.016	1.317 \pm 0.021	2.407 \pm 0.011
模型	7	-	0.450 \pm 0.015 ¹⁾	0.181 \pm 0.013 ¹⁾	0.211 \pm 0.017 ¹⁾
依达拉奉	7	3.2 \times 10 ⁻³	1.323 \pm 0.021 ²⁾	0.421 \pm 0.025 ²⁾	1.601 \pm 0.013 ²⁾
加味四君子汤	7	4.77	0.818 \pm 0.010 ²⁾	0.281 \pm 0.012 ²⁾	0.610 \pm 0.016 ²⁾
	8	9.54	1.262 \pm 0.013 ²⁾	0.401 \pm 0.013 ²⁾	1.111 \pm 0.014 ²⁾
	8	19.08	1.341 \pm 0.021 ²⁾	0.452 \pm 0.011 ²⁾	1.571 \pm 0.012 ²⁾

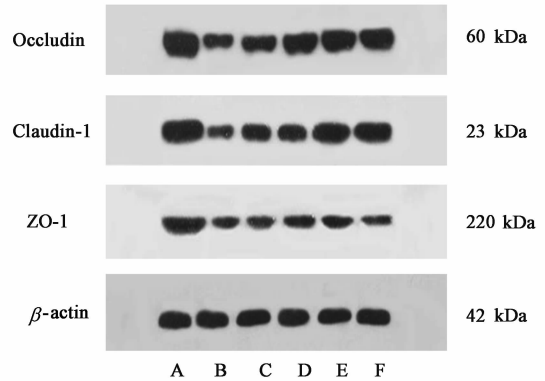
注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.2 对缺血性脑卒中大鼠 Occludin, ZO-1, Claudin-1 mRNA 表达的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠 Occludin, ZO-1, Claudin-1 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 依达拉奉组、加味四君子汤低、中、高剂量组大鼠 Occludin, ZO-1, Claudin-1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。见表 3。

两两比较满足方差齐性者, 用 LSD 法检验或 SNK 法, 数据不符合方差齐性时, 用 Games-Howell 方法或 Dunnett's T3 方法进行两两比较; 不符合正态分布者用多样本秩和检验, 以 $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对缺血性脑卒中大鼠缺血侧脑皮质 Occludin, Claudin-1, ZO-1 蛋白表达的影响 与假手术组比较, 模型组 Occludin, Claudin-1, ZO-1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 依达拉奉组、加味四君子汤各剂量组 Occludin, Claudin-1, ZO-1 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.01$)。其中以依达拉奉组和加味四君子汤高剂量组蛋白含量增加最为明显。见图 1, 表 2。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 加味四君子汤低剂量组; D. 加味四君子汤中剂量组; E. 加味四君子汤高剂量组; F. 依达拉奉组

图 1 大鼠脑组织 Occludin, ZO-1, Claudin-1 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Occludin, ZO-1, Claudin-1 protein expression in brain tissue of rats

4 讨论

从宏观来看, 脑水肿亦属于水肿的范畴。在《黄帝内经》中就提到: “诸湿肿满, 皆属于脾”, 认为水肿, 胀满等湿气所致疾病, 都是由于脾气受损所引起的。《景岳全书》中也提到: “凡水肿一疾, 乃肺脾肾三脏相干之病, 盖水为至阴, 故其本在肾; 水化于

表 3 加味四君子汤对大鼠脑组织 Occludin, ZO-1, Claudin-1 mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of modified Sijunzi Tang on relative expression of Occludin, ZO-1, Claudin-1 mRNA in brain tissue of rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Occludin	ZO-1	Claudin-1
假手术	8	-	0.982 ± 0.011	0.884 ± 0.013	0.831 ± 0.009
模型	7	-	0.209 ± 0.007 ¹⁾	0.236 ± 0.013 ¹⁾	0.124 ± 0.007 ¹⁾
依达拉奉	7	3.2 × 10 ⁻³	0.623 ± 0.009 ²⁾	0.697 ± 0.009 ²⁾	0.612 ± 0.018 ²⁾
加味四君子汤	7	4.77	0.316 ± 0.011 ²⁾	0.363 ± 0.008 ²⁾	0.284 ± 0.011 ²⁾
	8	9.54	0.424 ± 0.009 ²⁾	0.433 ± 0.014 ²⁾	0.407 ± 0.007 ²⁾
	8	19.08	0.550 ± 0.013 ²⁾	0.586 ± 0.009 ²⁾	0.511 ± 0.008 ²⁾

气,故其标在肺;水畏土,故其制在脾。”水肿是由于津血、水液代谢失常所产生的,与脾的关系非常密切。脾失健运,则水湿泛滥;脾气虚损,气不摄血,血溢脉外,发为淤血,瘀血阻滞,水液输布障碍,津停气阻,津液溢出脉外,导致水肿。《诸病源候论》提到:“脾病则不能制水。”因此,脑水肿的形成与脾有密切关系,基于此,本研究提出了健脾益气利水法保护细胞外基质抗脑水肿的治法。

血脑屏障(BBB)的连接复合物由 TJ 和黏附连接蛋白(AJ)组成。TJ 是具有复杂架构的动态结构。他们由跨膜屏障蛋白和细胞质支架蛋白组成,他们与细胞内细胞骨架(肌动蛋白和微管)连接到调节蛋白。跨膜蛋白促进细胞黏附并形成细胞旁屏障。支架蛋白的主要作用是调节跨膜蛋白的链形成和 TJ 定位^[2]。Occludin 是第一个被确定的 TJ 跨膜蛋白,被认为是最重要的、相对特征性强的 TJ 跨膜蛋白。Occludin 有助于多种细胞功能,包括控制屏障特性,细胞迁移和增殖。Occludin 是 BBB 中紧密连接复合体的成员,有助于细胞生长和分化,改变着细胞间的通透性。Occludin 是脑内皮细胞(CECs)中的关键 TJ,在调节 BBB 功能中起重要作用^[12]。ZO-1 为 TJ 主要结构蛋白,属于膜结合鸟苷酸激酶家族,ZO-1 表达量与位置分布改变均对 BBB 完整性有一定的影响作用。ZO-1 蛋白是首个被发现且研究最为深入的紧密连接相关蛋白^[13]。ZO-1 紧密连接蛋白在相邻内皮细胞边界处的表达和定位对于紧密连接的功能和维持是至关重要的。研究表明,ZO-1 蛋白是 BBB 破坏的标志性蛋白,其与 BBB 的损伤有着较为密切的关系^[14-15]。ZO-1 与 Occludin 的相互作用有助于紧密连接屏障的调节,同时与 BBB 的通透性关系紧密,血管的通透性增加与否,与蛋白的表达多少密切相关^[16]。Claudins 是 TJ 的关键整合膜蛋白,是 21 ~ 28 kDa 蛋白质,4 个跨膜(TM)结构域,2 个细胞外环(ECL1 和 ECL2),氨基和羧基末端细胞质结构域和短细胞质转角组成。

Claudins 是调节细胞旁离子和溶质大小选择性的关键重要成分。Claudin-1 蛋白能够限制离子进入上皮细胞并与相同细胞和邻近细胞中的其他密封蛋白相互作用,形成避免脂质和蛋白质扩散的围栏,可降低紧密连接复合体的通透性^[17]。Claudin-5 是 BBB 中的 TJ 蛋白,Claudin-5 调节 BBB 的完整性和通透性。Claudin-5 表达的增加在神经系统疾病中起着保护神经的作用,尤其表现于缺血性中风中。此外,Claudin-5 可能是缺血性中风早期出血性转化检测的潜在标志物。ZO-1 能够充当细胞内支架蛋白,通过将跨膜蛋白 Occludin 和 Claudin-1, Claudin-5 锚定到细胞骨架来调节紧密连接蛋白的完整性。实验研究证明 Claudin-1 和 Claudin-5 蛋白表达增高能够保护血脑屏障,改善 BBB 的通透性^[18]。由此可见,增加紧密连接蛋白 Claudin-1, Occludin, ZO-1 的表达可以改善 BBB 的通透性,减轻脑缺血再灌注大鼠脑水肿,保护脑组织,提高患者的治愈率和病死率,改善患者的生存质量。

目前,中医药在治疗缺血性脑水肿方面已经有了一定的成果。如郑春雷^[19]对脑出血后脑水肿患者采用西医常规治疗和中医活血健脾利水方,发现活血健脾利水方联合西药的治疗能降低脑出血患者的致残率和病死率,提高治疗效果,提高患者的生存质量。戴伟娟等^[20]研究温脾汤提取物发现温脾汤能通过恢复脑组织 SOD 活力及减少 MDA 含量来增强正常小鼠的记忆功能,并能改善脑缺血再灌注损伤小鼠的记忆能力。林鑫^[21]发现健脾益智胶囊可能通过促进 VIP, NT, NPY, SP 的增多,扩张或收缩血管,以达到治疗脑卒中的作用。健脾益智胶囊可以改善 MCAO 大鼠的学习、记忆和空间识别能力。牛犇等^[22]研究补气健脑汤联合针灸治疗缺血性脑卒中(气虚血瘀证)恢复期患者,结果表明补气健脑汤能明显改善患者肌张力及其运动功能,提高日常生活活动能力,提高平衡能力和步行能力,同时降低了患者血清 S100B 和同型半胱氨酸(HCY)水平。

课题组前期研究显示,加味四君子汤加减方(健脾补土方)能提高患者认知能力、智力的改善以及生活质量,对脑缺血损伤大鼠模型具有保护作用^[4-10],但是其作用机制有待进一步深入。林汉杰等^[23]在观察四君子汤治疗溃疡性结肠炎大鼠中发现,四君子汤能有效增加 Occludin 蛋白表达,促进实验性溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜屏障功能修复。何爱明等^[24]通过实验研究发现四君子汤治疗溃疡性结肠炎大鼠是通过调控 Claudin-1, Claudin-3 蛋白变化,加速结肠黏膜上皮修复,促进溃疡愈合,发挥缓解溃疡性结肠炎的功效。本研究以四君子汤为基础进行加减,研究加味四君子汤(健脾益气利水法)对紧密连接蛋白 Claudin, Occludin, ZO-1 的表达。结果显示,模型组大鼠 Occludin, Claudin-1 及 ZO-1 蛋白及 mRNA 表达显著降低,与文献报道一致。提示 Occludin, Claudin-1 及 ZO-1 蛋白表达的降低与脑缺血损伤、血脑屏障破坏及脑水肿形成关系密切。阳性对照组和加味四君子汤组均能升高 Occludin, Claudin-1 及 ZO-1 蛋白表达。提示加味四君子汤可能减轻紧密连接蛋白 Occludin, Claudin-1, ZO-1 降解而保护 BBB,对脑缺血再灌注大鼠脑水肿形成具有抑制作用。

加味四君子汤是以《太平惠民和剂局方》健脾益气经典名方四君子汤为基础加入黄芪、山药、薏苡仁、泽泻、猪苓组成。方中黄芪、人参片共为君药,共奏补益脾胃之效。人参片性味甘、微苦、微温,能大补元气,补脾益肺,安神益智。人参片为补脾要药,与黄芪、白术等补中益气之品配伍,能补气以摄血,与白术、茯苓同用能健脾以利湿消水肿。黄芪味甘微温,能补气健脾,利尿消肿。与白术、人参片同用共奏补脾益气、利尿消肿之功,且本品又能补气生血。白术甘、苦,温。甘温能补气,能益气健脾,燥湿利水。白术善于补气以复脾运,又能燥湿、利尿以除湿邪,使水液输布排泄正常,为臣药。山药甘、平、无毒,入脾、肺、肾三经,能补脾肺肾,生津涩精,配伍人参片、白术,能增强健脾补气的功效。泽泻气平,味甘、寒,利水渗湿,甘淡渗泄,利水作用较强,治疗水湿停滞导致的各种水肿疗效甚佳。与山药、白术同为臣药。茯苓,甘、淡、平,利水渗湿,为利水消肿之要药,与泽泻、猪苓、白术同用,用以治疗水湿内停所致之水肿,即能渗湿助脾运化又能补中益气,走而不守,守而不走。猪苓甘、淡,平,主利水渗湿,本品利水作用较强。与泽泻、茯苓、白术同用以增利水渗湿之功效。且猪苓与泽泻配伍,能抑制泽泻温燥之性,

以防泽泻燥性太过而伤津。薏苡仁甘、淡、凉,具有利水渗湿,健脾消肿的功效。与茯苓、白术、黄芪等药同用可治疗脾虚湿盛之水肿腹胀,小便不利,薏苡仁、茯苓、猪苓 3 药同为佐药。炙甘草甘平,归心、肺、脾、胃经,补脾益气,配伍人参、黄芪、冬白术、淮山药能够使补脾益气之功效更强,且能调和诸药药性,为佐使药。9 味中药合用,健脾益气利水而不伤正气。

陈春富等^[25]通过实验研究黄芪对大鼠脑缺血血脑屏障及脑血流的影响发现黄芪能够保护脑缺血再灌注大鼠血脑屏障,并可以促进再灌注早期脑血流的恢复。黄芪含苷类、多糖、氨基酸、微量元素等成分,能够促进机体代谢,具有明显的利尿作用,能提高机体的抗病能力。实验研究发现黄芪浸出液和黄芪皂甙能提高 SOD 活性,清除 O₂⁻ 自由基,减轻脑缺血再灌注损伤^[26]。人参与人参总皂苷可以抵抗脑缺血损伤,防止脑细胞损伤的,保护脑组织的作用。此外尚有降血糖,抗炎,抗过敏,抗利尿及抗肿瘤等多种作用。田建明等^[27]研究发现人参皂苷能够改善缺血再灌注大鼠脑循环,保护缺血再灌注大鼠的脑组织。泽泻主要含有泽泻萜醇 A, B, C, 挥发油、生物碱、树脂等成分,有利尿作用,能增加尿量、增加尿素与氯化物的排泄,还具有降血压的作用。白术含挥发油,主要为苍术酮,苍术内脂等并含有果糖、菊糖、白术多糖、多种氨基酸及维生素 A 类成分等,它有促进新报免疫功能,能提升白细胞,还能保肝、利尿、降血糖、抗菌、抗血凝、抗肿瘤等作用。茯苓中的有效提取物茯苓三萜具有利尿、镇静、抗炎、抗菌、抗肿瘤、增加心肌收缩力的作用。猪苓中含猪苓葡聚糖 I, 甾类化合物,粗蛋白等,能利尿,其原理是通过抑制肾小管对水及电解质的重吸收来促进排尿。薏苡仁中含有脂肪油、薏苡仁脂、多糖、氨基酸和维生素 B₁ 等,其脂肪油能使血清钙、血糖量下降,并有解热、镇静、镇痛作用^[28],在脑血管疾病治疗方面也有着广泛临床应用。山药含有丰富的生物活性成分,山药对实验大鼠脾虚模型有预防和治疗作用,有助消化作用,对小鼠免疫调节具有重要促进作用还能够降血糖、抗氧化,此外其对心脑血管疾病有其独特的作用^[29]。这些可能是本方保护血脑屏障,减轻脑水肿和脑损伤的物质基础。

综上所述,本研究为健脾益气利水法通过保护 ECM 和血脑屏障,治疗缺血性脑水肿的临床应用提供实验依据,其确切机制值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Mac Gregor D G, Avshalumov M V, Rice M E, et al. Brain edema induced by *in vitro* ischemia causal factors and neuroprotection [J]. *Neurochem*, 2003, 85 (6): 1402-1411.
- [2] YANG Y, Estrada E Y, Thompson J F, et al. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27 (4): 697-709.
- [3] Lamas M, Gonzalez-Mariscal I, Gutierrez R, et al. Presence of claudins mRNA in the brain. Selective modulation of expression by kindling epilepsy [J]. *Brain Res Mol Res*, 2002, 104(2): 250-254.
- [4] 李花, 刘旺华, 廖亮英, 等. 健脾补土方治疗缺血性脑卒中后遗症疗效观察 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2010, 17(3): 73-74.
- [5] 李花, 刘旺华, 廖亮英, 等. 健脾补土法对大鼠脑缺血再灌注后层黏连蛋白降解的影响 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2010, 12(7): 645-647.
- [6] 李花, 刘旺华, 周小青, 等. 健脾补土法对脑缺血再灌注大鼠脑组织 MMP-2 的表达及血脑屏障通透性的影响 [J]. *湖南中医杂志*, 2013, 29(2): 115-117.
- [7] 付小金, 刘旺华, 李花, 等. 健脾补土方对脑缺血/再灌注损伤大鼠 NF- κ B 和 κ B α 蛋白表达水平的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2015, 35(3): 10-12.
- [8] 钟银玲, 李花, 刘旺华, 等. 健脾补土法组方对脑缺血/再灌注损伤大鼠脑组织 t-PA、PAI-1、Col IV 的影响 [J]. *中国中医急症*, 2016, 25 (12): 2213-2215, 2267.
- [9] 钟银玲, 李花, 刘旺华, 等. 健脾补土法组方对脑缺血/再灌注大鼠脑组织 INT β ₃、ILK 及 FAK mRNA 及蛋白表达的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(3): 513-516.
- [10] 胡康丽, 李花, 刘旺华, 等. 四君子汤加减对脑缺血/再灌注损伤大鼠脑组织 ERK1/2, Akt, Bax 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(13): 152-158.
- [11] 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.
- [12] Haseloff R F, Dithmer S, Winkler L, et al. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 38(1): 16-25.
- [13] 王振华, 刘云会, 马腾, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注早期血脑屏障通透性变化的研究 [J]. *中国医科大学学报*, 2012, 41(12): 1073-1076.
- [14] Hawkins B T, Davis T P. The blood-brain barrier neurovascular unit in health and disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(2): 173-185.
- [15] Matter K, Balda M S. Functional analysis of tight junctions [J]. *Methods*, 2003, 30(3): 228-234.
- [16] 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, 25 (27): 6401-6408.
- [17] Hering N A, Fromm M, Schulzke J D. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics [J]. *J Physiol*, 2012, 590(5): 1035-1044.
- [18] WEN H, Watry D D, Marcodes M C, et al. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5 [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19): 8408-8417.
- [19] 郑春雷. 活血健脾利水方联合西药治疗脑出血后脑水肿临床观察 [J]. *中国中医急症*, 2013, 22(10): 1773-1774.
- [20] 戴伟娟, 王国芳, 林丽文, 等. 温脾汤提取物对小鼠记忆功能及脑内 SOD 和 MDA 的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2013, 22(11): 982-984.
- [21] 林鑫. 健脾益智法对 MCAO 大鼠 VIP、NT、NPY、SP 的影响 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2014.
- [22] 牛犇, 张卉, 杨铁骊. 补气健脑通络汤对气虚血瘀证缺血性脑卒中恢复期运动障碍的改善 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(5): 206-210.
- [23] 林汉杰, 张金卫, 卢月, 等. 四君子汤对 UC 模型大鼠的治疗作用及其对紧密连接蛋白 Occludin 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(13): 112-117.
- [24] 何爱明, 张涛. 四君子汤对溃疡性结肠炎模型小鼠 claudin-1/3 的影响 [J]. *医药导报*, 2016, 35(11): 1190-1194.
- [25] 陈春富, 郭述苏, 冯林, 等. 黄芪对大鼠脑缺血血脑屏障及脑血流的影响 [J]. *卒中与神经疾病*, 1998, 5(3): 132-134.
- [26] 罗玉敏, 秦震. 黄芪甲甙对局灶性脑缺血小鼠脑组织超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. *中华神经科杂志*, 1999, 32(1): 46, 62.
- [27] 田建明, 刘洁, 李浩, 等. 人参皂苷 RG2 对动物脑循环及脑水肿的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2009, 10(17): 1664-1666.
- [28] 肖开, 苗明三. 薏苡仁现代研究分析 [J]. *中医学报*, 2014, 29(9): 1348-1350.
- [29] 王珺, 徐俊杰. 山药多糖的组成及其药理作用的研究进展 [J]. *吉林医药学院学报*, 2018, 39(4): 304-306.

[责任编辑 周冰冰]