

• 论 著 •

黄芪甲苷对脑缺血再灌注后血脑屏障的保护作用
及 IL-1 β 含量、MMP-9 蛋白表达的影响

曲友直 杨震 李敏 高国栋

【摘要】 目的 探讨黄芪甲苷对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障的保护作用及其机制。**方法** 将 SD 大鼠 72 只随机等分为 4 组:假手术组、生理盐水对照组、小剂量黄芪甲苷治疗组(10 mg/kg)和大剂量黄芪甲苷治疗组(20 mg/kg),采用分光光度计法、酶联免疫吸附法及免疫组化法分别检测各组大鼠脑组织伊文氏蓝、IL-1 β 含量及 MMP-9 蛋白的表达水平。**结果** 与假手术组相比,生理盐水对照组脑组织伊文氏蓝含量明显增多、IL-1 β 含量显著增高、MMP-9 蛋白的表达明显增强($P<0.01$);与生理盐水对照组相比,小剂量黄芪甲苷治疗组及大剂量黄芪甲苷治疗组脑组织伊文氏蓝含量均显著减少、IL-1 β 含量明显降低、MMP-9 蛋白表达明显减弱($P<0.05$);小剂量黄芪甲苷治疗组与大剂量黄芪甲苷治疗组相比,伊文氏蓝、IL-1 β 含量及 MMP-9 蛋白表达无显著差异($P>0.05$)。**结论** 黄芪甲苷对脑缺血再灌注后血脑屏障具有保护作用,这可能与其下调 IL-1 β 含量、抑制 MMP-9 蛋白的表达有关。

【关键词】 黄芪甲苷 脑缺血再灌注 血脑屏障 IL-1 β MMP-9

【中图分类号】 R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)06-0389-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.06.001

Protective effects of astragaloside IV on blood-brain barrier and the content of IL-1 β and expression of MMP-9 protein after cerebral ischemic reperfusion Qu Youzhi, Yang Zhen, Li Min, et al. Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710038

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of astragaloside IV on blood-brain barrier and the content of IL-1 β , expression of MMP-9 protein after cerebral ischemic reperfusion. **Methods** 72 SD rats were divided randomly into four groups: sham-operated group, normal- saline control group, group treated by low dose of astragaloside IV (10 mg/kg), group treated by high dose of astragaloside IV (20 mg/kg). Evans Blue (EB) leakage, the content of IL-1 β , expression of MMP-9 protein were respectively detected by spectrophotometry, ELISA and immunohistochemistry. **Results** Compared with sham-operated group, EB leakage, the content of IL-1 β and expression of MMP-9 protein were higher in normal- saline control group ($P<0.01$). Compared with normal saline control group, EB leakage, the content of IL-1 β and expression of MMP-9 protein were lower in group treated by low dose of astragaloside IV and group treated by high dose of astragaloside IV ($P<0.05$). There was no statistical difference between group treated by low dose of astragaloside IV and group treated by high dose of astragaloside IV ($P>0.05$). **Conclusion** Astragaloside IV could have protective effects on blood-brain barrier after cerebral ischemic reperfusion. Its mechanisms may be associated with down-regulation of the content of IL-1 β and expression of MMP-9 protein.

【Key words】 Astragaloside IV Cerebral ischemic reperfusion Blood-brain barrier IL-1 β MMP-9

血脑屏障(Blood-brain barrier, BBB)的破坏可导致血管源性脑水肿,是脑缺血再灌注损伤后脑水肿的重要病理基础^[1-2]。基膜在维持 BBB 稳定性中起重要作用。基质金属蛋白酶-9(matrix metallo-

proteinases-9, MMP-9)可通过降解毛细血管内皮细胞外基质破坏 BBB 基膜,与脑缺血再灌注后 BBB 的破坏密切相关^[3]。黄芪甲苷是中药黄芪的主要活性成分,常作为黄芪及含黄芪(君药)的中成药定性定量评价的指标^[4-5]。已有研究表明黄芪甲苷具有减少脑缺血再灌注后脑组织白细胞浸润、抗炎性反应、减轻脑水肿等作用,但目前作用机制尚不明

确^[4,6]。本研究通过观察黄芪甲苷对大鼠脑缺血再灌注后脑组织伊文氏蓝(Evans Blue,EB)含量、IL-1 β 含量及MMP-9蛋白表达的影响,进一步探讨其对BBB的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

黄芪甲苷购自中国药品生物制品检定所(批号为110781-200613)。伊文氏蓝购自美国Sigma公司。IL-1 β 定量ELISA测定试剂盒购于美国BIO-SOUCE公司。MMP-9蛋白免疫组化试剂盒购自美国Zymed公司。医学图像分析系统,型号Olympus BX-51。健康成年雄性SD大鼠,体重250~300 g,购自本校实验动物中心。

1.2 动物分组与模型建立

将72只SD大鼠随机等分为4组,每组各18只,假手术组:栓线仅插入颈总动脉6 mm,不阻塞大脑中动脉,其余步骤同生理盐水对照组;生理盐水对照组:参照Zea Longa^[7]报道的方法,采用线栓法制备局灶性脑缺血1.5 h再灌注24 h模型,再灌注即刻经腹腔注射等体积生理盐水;小剂量黄芪甲苷治疗组:再灌注即刻经腹腔注射黄芪甲苷10 mg/kg;大剂量黄芪甲苷治疗组:再灌注即刻经腹腔注射黄芪甲苷20 mg/kg。

1.3 指标测定

1.3.1 每组中随机取6只大鼠于处死前1 h经股静脉缓慢注入2.5%伊文氏蓝生理盐水液0.2 mL/100 g,断头取脑称重后放入甲酰胺中浸泡,收集浸泡的甲酰胺溶液,用分光光度计测得其吸光度,计算脑组织中EB含量。

1.3.2 每组中再随机取6只大鼠断头取脑,于冰盘上迅速剥离缺血侧大脑皮质,按脑湿重:生理盐水=100 mg:1 mL的比例加入生理盐水匀浆,离心后取上清液,采用ELISA法测定IL-1 β 含量。

1.3.3 每组其余6只大鼠,在术后相应的时间点4%多聚甲醛溶液固定,断头取脑,鼠脑自额极至枕叶分为A、B、C、D、E 5等份,取C脑片在恒温冰冻切片机上做厚度为15 μ m的冠状面切片,进行免疫组化染色。免疫组化染色用图像分析系统采集照片,在400倍视野下每张切片在梗死灶周围随机选取10个视野,计数免疫组化阳性细胞。

1.4 统计学处理

实验数据使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单

因素方差分析(Dunnett'-*t*检验)进行组间比较。采用SPSS 16.0软件包对数据进行处理,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

与假手术组相比,生理盐水对照组大鼠脑组织伊文氏蓝含量明显增多、IL-1 β 含量显著增高、MMP-9蛋白表达明显增强($P < 0.01$);与生理盐水对照组相比,小剂量黄芪甲苷治疗组和大剂量黄芪甲苷治疗组伊文氏蓝含量均显著减少、IL-1 β 含量明显降低、MMP-9蛋白表达显著减弱($P < 0.05$);小剂量黄芪甲苷治疗组与大剂量黄芪甲苷治疗组比较,伊文氏蓝、IL-1 β 含量及MMP-9蛋白免疫组化阳性细胞数无显著差异($P > 0.05$)(表1)。

表1 各组大鼠脑组织伊文氏蓝、IL-1 β 含量及MMP-9蛋白表达的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	IL-1 β (pg/mL)	伊文氏蓝含量 (μ g/g)	MMP-9 阳性细胞数 (个/每400倍视野)
假手术组	12.7 \pm 4.7	85.4 \pm 12.7	32.1 \pm 7.6
生理盐水对照组	29.5 \pm 6.1 Δ	419.3 \pm 19.4 Δ	88.9 \pm 5.6 Δ
小剂量黄芪甲苷治疗组	21.5 \pm 4.6*	291.6 \pm 1.6*	60.7 \pm 6.9*
大剂量黄芪甲苷治疗组	20.4 \pm 4.4* \blacktriangle	292.6 \pm 1.7* \blacktriangle	56.9 \pm 7.6* \blacktriangle

注:与假手术组比较, $\Delta P < 0.01$;与生理盐水对照组比较,* $P < 0.05$;与小剂量黄芪甲苷治疗组比较, $\blacktriangle P > 0.05$

3 讨论

脑水肿是脑缺血再灌注损伤的基本病理变化之一,也是导致病情加重、甚至引起患者死亡的常见病因。血脑屏障的破坏可导致血管源性脑水肿,是脑缺血再灌注损伤后脑水肿的重要病理基础^[1-2]。脑毛细血管内皮基膜在维持BBB稳定性中起重要作用^[3]。MMP-9是一种糖蛋白,可由中性粒细胞、单核细胞、血管内皮细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞等多种细胞分泌,属于Zn²⁺依赖性蛋白酶,主要功能是降解和重叠内皮细胞外基质。分泌MMP-9的细胞也同时分泌组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP),脑缺血再灌注后MMP-9高表达,使其与TIMP-1之间的平衡失调是引起基质破坏的重要因素^[8]。近年研究已表明,IL-1 β 是一种具有多效性作用的促炎性细胞因子,是启动炎症反应的关键细胞因子之一,在介导炎症反应中起重要作用。IL-1 β 在脑缺血再灌注损伤中具有增加缺血组织兴奋性氨基酸的神经毒性,增加脑缺血神经细胞钙超载,刺激内皮细胞表达白细

胞黏附因子,诱导神经元凋亡基因的表达等重要作用。

IL-1 β 可通过促进白细胞和内皮细胞粘附激发炎症反应,从而上调 MMP-9 蛋白表达,破坏脑血管内皮基膜,血脑屏障损害导致血管源性脑水肿和出血,加重继发性脑损伤。同时,MMP-9 通过对富含基底膜的毛细血管床过度降解而使 BBB 开放,导致炎症细胞和因子侵入,发挥正反馈作用,因此 MMP-9 是炎症反应重要的“调节剂”^[9-10]。

本实验结果表明,大、小剂量黄芪甲苷均可降低脑缺血再灌注后脑组织伊文氏蓝含量。正常情况下伊文氏蓝进入体内后与血清白蛋白结合不能通过 BBB。大鼠脑缺血再灌注后脑伊文氏蓝含量显著增加,表明血脑屏障在缺血再灌注损伤中结构遭到破坏,通透性显著提高;使用黄芪甲苷治疗后伊文氏蓝含量明显降低,提示黄芪甲苷能够减轻缺血、缺氧造成的 BBB 通透性改变,一定程度上降低了脑细胞的水肿程度,遏制脑缺血病程的发展,从而发挥对脑缺血的保护作用。

本实验结果表明,大、小剂量黄芪甲苷均可显著下调缺血再灌注后脑组织 MMP-9 蛋白的高表达,从而改善脑缺血再灌注后 MMP-9 蛋白与 TIMP-1 之间平衡失调的状态、减少内皮细胞外基质的降解、保护血脑屏障、减轻血管源性脑水肿。本实验结果还发现大、小剂量黄芪甲苷均可抑制脑缺血再灌注后脑组织 IL-1 β 含量,从而减轻炎症反应、抑制 MMP-9 蛋白的高表达、保护血脑屏障。另外,作为炎症反应重要的“调节剂”,MMP-9 蛋白高表达的抑制又可进一步发挥其正反馈作用,减少炎症因子的侵入,从而降低脑缺血再灌注后脑组织 IL-1 β 含量。这可能是黄芪甲苷发挥对脑缺血再灌注后血脑屏障保护作用的分子机制之一。

本研究还发现,大剂量黄芪甲苷与小剂量黄芪甲苷比较,缺血再灌注后脑组织伊文氏蓝含量、IL-1 β 含量及 MMP-9 蛋白表达无显著差异,说明黄芪甲苷对 BBB 的保护作用在一定范围内与剂量大小无关,机制尚不清楚,这可能与脑缺血再灌注后血脑屏障破坏与多因素调控有关。

参 考 文 献

- [1] Nordal RA, Wong CS. Molecular targets in radiation-induced blood-brain barrier disruption[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 62(1): 279-287.
- [2] Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier[J]. *Prog Drug Res*, 2003, 61(1): 39-78.
- [3] Asahi M, Wang X, Mori T, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(19): 7724-7732.
- [4] 胡芳弟,封士兰,赵健雄,等. HPLC 法测定黄芪中黄酮类成分和黄芪甲苷的含量[J]. *分析测试技术与仪器*, 2003, 9(3): 173-177.
- [5] 黄惠,王岭,李艳,等. 黄芪注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. *卒中与神经疾病*, 2014, 21(1): 19-22.
- [6] 曲友直,赵燕玲,李敏,等. 黄芪甲苷对脑缺血再灌注后血脑屏障的保护作用及 occludin 蛋白表达的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2010, 17(2): 92-93, 96.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] 陈新云. 炎症因子在大鼠脑缺血后 MMP 和 TIMP-1 致脑损伤中的作用[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(2): 230-234.
- [9] 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.
- [10] Li M, Qu YZ, Zhao ZW, et al. Astragaloside IV protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury correlating to suppression of neutrophils adhesion-related molecules[J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(5): 458-465.

(2016-04-19 收稿 2016-05-10 修回)

• 投稿要求 •

《卒中与神经疾病》对关键词的要求

论著需标引 3~8 个关键词。关键词尽量从美国 NLM 的 MeSH 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh>)中选取,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用,建议排在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。有英文摘要的文章,应标注与中文对应的英文关键词。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称;每个英文关键词第一个单词首字母大写,各词汇之间用空格分隔。