

脑血疏口服液对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的影响

蒋锋 袁婕 崔小丽 王晓辉 程仙送 王莉 山媛

【摘要】 目的 探讨脑血疏口服液对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的影响。**方法** 将 120 只 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组、对照组、脑血疏组;采用线栓法建立大鼠左侧大脑中动脉闭塞再灌注模型,缺血 2 h 后拔出线栓,恢复灌注 24 h;采用 Longa FZ 5 级评分法进行大鼠神经功能缺损评分;TTC 染色计算脑梗死体积百分比;运用干-湿重法测脑含水率;通过伊文思蓝(EB)含量反映血脑屏障的损伤程度;免疫组化检测基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达水平。**结果** (1)假手术组大鼠在神经功能缺损评分、脑梗死体积、脑含水率均低于对照组($P<0.01$);脑组织中 EB 含量和 MMP-9 表达水平较对照组低($P<0.01$);(2)脑血疏组大鼠的神经功能缺损评分较低、脑梗死体积较小,脑水肿程度较轻;EB 含量和 MMP-9 表达水平均较对照组明显减少($P<0.01$)。**结论** 脑血疏口服液对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障具有保护作用,其机制可能是通过抑制 MMP-9 的表达。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤 脑血疏口服液 血脑屏障 基质金属蛋白酶-9

【中图分类号】 R743.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)05-0423-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.05.010

The effects of Naoxueshu oral liquid on blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

Jiang Feng, Yuan Jie, Cui Xiaoli, et al. Neurology Department I of Shanxi Province People's Hospital, Xi'an 710061

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Naoxuechu oral liquid on blood - brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** 120 SD rats were randomly divided among three groups: sham-operation group, control group and Naoxueshu group. The middle cerebral artery occlusion reperfusion model was established by thread embolism method. After 2 hours of ischemia, the suture was pulled out and the perfusion was resumed for 24h. The neurological deficit was assessed by Longa FZ 5-score while TTC staining was utilized to calculate the percentage of cerebral infarct volume. The dry-wet weight method was used to measure the water content of the brain and the level of the blood-brain barrier was reflected by Evans blue (EB) content. The expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) was considered by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the neurological deficit score, cerebral infarct volume and cerebral edema were significantly lower in the sham-operation group ($P<0.01$), and the EB content and MMP-9 expression in the brain tissue were less. The difference was significant ($P<0.01$). Compared with the control group, the scores of neurological deficits, cerebral infarction volume and cerebral edema were lower in Naoxueshu group. The content of EB and the expression of MMP-9 was significantly lower than those in the control group. There was considerable statistical difference ($P<0.01$). **Conclusion** Naoxueshu oral Liquid has the protective effect on the blood-brain barrier after cerebral ischemia reperfusion injury in rats. The mechanism might be through inhibition of MMP-9 expression.

【Key words】 Cerebral ischemia Naoxueshu oral liquid Blood-brain barrier MMP-9

脑缺血再灌注损伤指脑组织缺血一定时间后再恢复血液灌注,脑组织细胞损伤反而进一步加重。血脑屏障的破坏是引起缺血再灌注损伤的重要原

因,可导致脑水肿、脑出血等,目前认为存在多种因素,包括自由基的损伤、钙离子超载、炎性浸润等机制^[1-3]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)的激活是引起脑缺血再灌注损伤和血脑屏障受损的重要机制之一,主要包括 MMP-9 和

MMP-2 的表达,在脑缺血再灌注早期及时抑制 MMP 的表达,对减少血脑屏障的损害至关重要。脑血疏口服液是我国中医研究院研发的国家级中药新药(国药准字 Z20070059),由黄芪、水蛭、石菖蒲、牛膝、牡丹皮、大黄、川芎组成,具有益气、活血、化瘀的功效^[4]。本研究通过建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,探讨脑血疏口服液对血脑屏障的影响及检测 MMP-9 的表达水平。

1 资料与方法

1.1 动物分组及给药方式

采用健康雄性 SD 大鼠 120 只,体重 250~300 g (由西安交通大学医学院动物中心提供),昼夜循环光照,自由食水;适应性饲养 3 d 后随机分为 3 组,每组各 40 只:假手术组、对照组、脑血疏组。在动物模型建立前 7 d 开始脑血疏组每日灌服脑血疏口服液,每 1 次/8 h(1 mL/kg),其余 2 组给予等量盐水灌服。

1.2 动物模型制作

大脑中动脉闭塞再灌注(MCAO/R)模型制作采用改良的 Longa 法,即解剖分离暴露颈部血管,采用线栓法短时间栓塞左侧大脑中动脉,2 h 后拔出栓线,恢复缺血脑区的血液灌注 24 h,建立 MCAO/R 模型。假手术组只解剖分离暴露颈部血管,不插入栓线。

1.3 大鼠神经神经功能缺损评分

参考 Longa FZ 5 级评分法对大鼠神经功能缺损症状进行评分,0 分:无神经功能缺损症状;1 分:提尾时对侧前肢不能完全伸直;2 分:向病灶对侧转圈征象;3 分:向病灶对侧倾倒;4 分:不能自发行走及意识丧失。

1.4 TTC 染色、脑梗死体积计算

每组随机选 10 只大鼠,10%水合氯醛深度麻醉后断头处死,完整取出鼠脑,将脑组织切片,行 TTC 染色,后将脑片转至 100 g/L 甲醛液中,冰箱冷藏固定 24 h;取出后数码相机照相,将染色输入计算机,利用图像处理软件 Image-Pro Plus 6.0 分别计算出各个脑片缺血侧的总体积和梗死区域的体积,再求出梗死区域占大脑半球总体积的百分比作为脑梗死体积并记录。

1.5 脑组织含水量测定

采用干湿重法测定脑组织含水率,每组 10 只大鼠麻醉断头取脑,分离出缺血侧大脑组织,电子天平称湿重后放 100 ℃烤箱烤至恒重。脑组织含水量 =

(湿重 - 干重)/湿重 × 100%。

1.6 血脑屏障通透性检测

采用伊文思蓝(EB)追踪法评估血脑屏障损伤通透性。每组选 10 只大鼠,在处死前经大鼠尾静脉注 2%的 EB(4 mL/kg),大鼠皮肤、球结膜等变蓝表示注入成功;经心脏灌注 0.9%的肝素生理盐水 100 mL,快速断头取脑,按 1 mL/100 mg 脑组织加入甲酰胺溶液中,64 ℃恒温箱中孵育 24 h,1000 r/min 离心 5 min,测 630 nm 处的光密度值。

1.7 免疫组化检测 MMP-9 表达水平

每组随机选 10 只大鼠,10%的水合氯醛腹腔注射麻醉,迅速剪开胸腔,暴露心脏,经升主动脉插管后先用 200 mL 的生理盐水快速冲洗,然后用 4 ℃ 4%多聚甲醛 500 mL(先快后慢)继续灌注内固定至少 1.5 h;断头取脑,4%多聚甲醛固定,包埋成蜡片,进行免疫组化染色后每只动物随机选取 3 张脑片,单只组织切片随机选取 5 个不重复视野,在 400 倍镜下观察脑组织中 MMP-9 阳性细胞数。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件,实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经神经功能缺损评分

大鼠处死时间点前评分,除假手术组,其他 2 组均出现了不同程度的神经功能缺损症状。脑血疏组大鼠神经功能缺损评分均低于对照组($P < 0.01$)(表 1)。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	<i>n</i>	神经功能缺损评分
假手术组	40	0.00 ± 0.00
对照组	40	2.13 ± 0.65 [#]
脑血疏组	40	1.05 ± 0.45 ^{**}

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.01$;与对照组比较,^{*} $P < 0.01$

2.2 各组大鼠脑梗死体积

由 TTC 染色可见,假手术组脑片全部呈红色,对照组和脑血疏组大鼠缺血侧大脑半球可见明显的白色梗死灶,且脑血疏组梗死体积明显小于对照组($P < 0.01$)(表 2,图 1)。

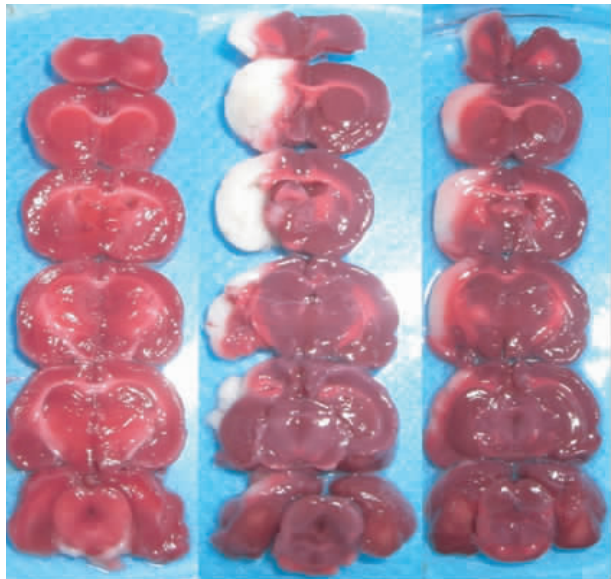
2.3 各组大鼠脑组织含水量比较

对照组和脑血疏组脑组织含水量较假手术组明显增多($P < 0.01$);与对照组比较,脑血疏组的脑组织含水量明显减少($P < 0.01$)(表 3)。

表 2 各组大鼠脑梗死体积($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	脑梗死体积(%)
假手术组	10	0.00 ± 0.00
对照组	10	18.74 ± 1.50 [#]
脑血疏组	10	6.30 ± 0.26 ^{**}

注:与假手术组比较, [#] $P < 0.01$;与对照组比较, ^{*} $P < 0.01$



假手术组 对照组 脑血疏组
图 1 各组大鼠脑梗死病灶(TTC 染色)

2.4 各组大鼠血脑屏障通透性比较

与假手术组比较,对照组的血脑屏障通透性明显增高($P < 0.01$),而脑血疏组的血脑屏障通透性较对照组显著降低($P < 0.01$)(表 3)。

2.5 各组大鼠脑组织中 MMP-9 表达水平的比较

在假手术中组脑组织中可见很少数 MMP-9 阳性细胞表达,而对照组和脑血疏组表达明显增多($P < 0.01$),脑血疏组阳性细胞数较对照组明显减少($P < 0.01$)(表 3)。

表 3 各组大鼠脑组织中含水量、EB 含量、MMP-9 阳性细胞数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脑组织含水量(%)	EB 含量($\mu\text{g/g}$)	MMP-9 阳性细胞数(个/每 400 倍视野)
假手术组	10	72.14 ± 1.54	3.67 ± 0.36	1.70 ± 0.83
对照组	10	79.62 ± 1.55 [#]	9.37 ± 0.31 [#]	57.20 ± 9.94 [#]
脑血疏组	10	74.11 ± 0.94 ^{**}	6.07 ± 0.29 ^{**}	26.40 ± 4.34 ^{**}

注:与假手术组比较, [#] $P < 0.01$;与对照组比较, ^{*} $P < 0.01$

3 讨 论

脑卒中中具有较高发病率、致残率、病死率等特点。脑卒中分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其

中缺血性脑卒中约占总人数的 80%^[5],主要由于局部血流供应障碍,导致脑组织缺血缺氧,出现细胞毒性水肿,进而血管源性水肿,最后导致脑组织坏死,如及时开通闭塞的血管可挽救部分缺血半暗带。改善缺血脑组织的血供为治疗重点,但缺血脑组织再灌注后引起的缺血再灌注损伤常为治疗的难点,减轻缺血再灌注损伤程度直接影响患者临床症状及预后的改善。导致缺血再灌注的损伤机制复杂,存在多种因素^[6-7]。血脑屏障(BBB)存在于脑组织与和血液之间,在维持脑组织内环境平衡及保障脑细胞发挥正常功能中至关重要。目前大量研究证实,脑缺血再灌注后血脑屏障遭到严重损害,致使其通透性增加,大量的有害物进入脑组织,引起脑组织内环境紊乱,导致脑水肿,加重脑细胞的损伤^[8]。MMP-9 是一种锌依赖蛋白水解酶,可以降解多种细胞外基质成份,MMP-9 的激活可引起血脑屏障的损害,引起颅内渗透压平衡改变,导致脑水肿,它还可促进炎症因子的释放,进一步加重脑损害^[9]。有研究认为,脑缺血再灌注损伤是由于中性粒细胞高度表达了 MMP-9 以及髓过氧化物酶(MPO),产生大量氧自由基,破坏了细胞膜,而继发脑水肿^[10]。通常在脑缺血后 2 h MMP-9 的表达增强,在 48h 到达高峰,后逐渐恢复至正常水平^[11],所以常将 MMP-9 的表达水平作为评价血脑屏障早期损害程度的检测指标^[12]。有研究发现,将大鼠的 MMP-9 的基因敲掉后可明显减轻血脑屏障损害和脑水肿程度,有学者认为 MMP-9 阻断剂可能对早期脑水肿进行预防和治疗^[13]。本研究发现,假手术组仅有少量 MMP-9 表达,血脑屏障未受到破坏,无梗死灶形成和神经功能缺损症状,而对照组的 MMP-9 的表达显著增多,血脑屏障的通透性增加,脑水肿程度加重,脑梗死体积和神经功能缺损症状明显,也说明了在脑缺血再灌注早期 MMP-9 表达增强,血脑屏障受到严重损害。

在治疗脑缺血再灌注损伤时减轻血脑屏障受损害程度是药物选择的关键。脑血疏口服液中多种中药成分具有改善脑微循环障碍,延长血栓形成时间及出血和凝血时间,抑制血小板聚集,改善脑血管痉挛、抗自由基、减轻脑水肿及保护脑细胞等多种作用。目前临床主要应用于脑出血的早期治疗中,疗效也得到证实。结合脑血疏口服液中中药组成及功效,发现其在急性脑梗死中的治疗作用,但具体机制尚不清楚。艾鑫等^[14]报道了脑血疏口服液通过抗自由基损伤对大鼠急性脑梗死具有神经保护作用。

临床也发现其联合依达拉奉治疗急性期脑梗死也取得良好的效果^[15]以及可减轻急性脑梗死患者炎症反应而改善神经功能缺损症状^[16]。本研究结果显示,与对照组比较,脑血疏组大鼠的神经功能缺损症状较轻,梗死体积较小,血脑屏障损害程度及脑水肿减轻,MMP-9 的表达显著减少,说明脑血疏口服液可抑制脑缺血时 MMP-9 的表达,降低血脑屏障通透性,减轻脑水肿。

综上所述,本研究发现脑血疏口服液在脑缺血中具有神经保护作用,可用于急性脑梗死的临床治疗,为临床用药提供依据。

参 考 文 献

- [1] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion from mechanism to translation[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [2] Tsai WC. Treatment options for hypertension in high risk patients[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2011, 7: 137-141.
- [3] Ramos-Fernandez M, Bellolio MF, Stead LG. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2010, 20(1): 47-54.
- [4] 刘晓萍. 脑血疏口服液的实验研究与临床效果评价[J]. *中国药物经济学*, 2012, 6: 128-130.
- [5] 中华预防医学会卒中预防与控制专业委员会介入学组. 急性缺血性脑卒中血管内治疗中国专家共识组. 急性缺血性脑卒中血管内治疗中国专家共识[J]. *中国脑血管病杂志*, 2014, 11(10): 556-560.
- [6] Guo MF, Yu JZ, Ma CG. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia[J]. *Folia Neuropathologica*, 2011, 49(2): 78-87.
- [7] Dziedzic T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke[J]. *Expert Rev Neurother*, 2015, 15(5): 523-531.
- [8] Lee K, Lee JS, Jang HJ, et al. Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 689(1/3): 89-95.
- [9] Kurzepa J, Kurzepa J, Golab P, et al. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke [J]. *Int J Neurosci*, 2014, 124(10): 707-716.
- [10] Shimbo D, Abumiyi T, Shichinohe H, et al. Post-ischemic intra-arterial infusion of liposome-encapsulated hemoglobin can reduce ischemia reperfusion injury[J]. *Brain Res*, 2014, 1554: 59-66.
- [11] Piao MS, Lee JK, Park CS, et al. Early activation of matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier disruption after photothrombotic cerebral ischemia in rats[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2009, 151(12): 1649-1653.
- [12] Xiang J, Lan R, Tang YP, et al. Apocynin attenuates disruption of the blood-brain barrier and up-regulation of matrix metalloproteinase-9/-2 in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(8): 1820-1828.
- [13] Kim SJ, Lee SR. Protective effect of melatonin against transient global cerebral ischemia-induced neuronal cell damage via inhibition of matrix metalloproteinase-9[J]. *Life Sci*, 2014, 94(1): 8-16.
- [14] 艾鑫, 刘翠. 脑血疏口服液对急性脑梗死大鼠的神经保护作用[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2015, 13(11): 1278-1280.
- [15] 杨艳丽, 任占民, 李进. 联合应用依达拉奉和脑血疏治疗脑梗死临床观察[J]. *吉林医学*, 2012, 33(5): 950-951.
- [16] 刘玥, 唐鹏, 刘鹏, 等. 脑血疏口服液对急性脑梗死炎症反应物的影响及疗效观察[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2014, 12(11): 1337-1338.

(2016-12-07 收稿)