

刺槐素对小鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的影响

牛晓珊 杨丽娟 补娟

【摘要】 目的 探讨刺槐素对小鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障紧密连接主要结构蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 表达水平的影响。**方法** 将 18 只雄性 C57BL/6 小鼠采用随机数字法分为假手术组、缺血再灌注组和刺槐素治疗组,每组各 6 只;刺槐素治疗组再灌注时腹腔注射刺槐素(Acacetin)(25 mg/kg);采用改良线栓法制作大脑中动脉闭塞模型,再灌注 24 h 后免疫组化测定 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 染色阳性细胞数。**结果** 免疫组化染色显示,与假手术组比较,缺血再灌注组无论是皮层还海马,紧密连接蛋白 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 染色阳性细胞数显著减少($P<0.01$);与缺血再灌注组比较,刺槐素治疗组皮层和海马紧密连接蛋白 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 染色阳性细胞数显著增加($P<0.01$)。**结论** 刺槐素可能通过增加 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 蛋白表达来降低血脑屏障的通透性,从而在脑缺血再灌注损伤中发挥神经保护作用。

【关键词】 刺槐素 紧密连接蛋白 occludin claudin-5 ZO-1

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2020)05-0572-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.05.003

The effects of Acacetin on blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion injury in mice Niu Xiaoshan, Yang Lijuan, Bu Juan. Xinjiang Renmin Hospital, Wulumuqi 830000

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Acacetin on ZO-1, Occludin and Claudin-5 expressive levels after cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. **Methods** 18 male C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group, ischemia-reperfusion group and Acacetin treatment group by random number method. Acacetin (25mg/kg) was intraperitoneally injected during reperfusion in the Acacetin treatment group. The Occludin, Claudin-5 and ZO-1 expression levels was determined by immunohistochemistry after 24 h of reperfusion. The occlusion model of middle cerebral artery was made with modified thread occlusion. **Results** Immunohistochemistry showed that the Occludin, Claudin-5 and ZO-1 expression levels of tight junction proteins in both cortical and hippocampal areas were significantly decreased in the ischemia-reperfusion group compared with the sham operation group ($P<0.01$). Compared with the ischemia-reperfusion group, the Occludin, Claudin-5 and ZO-1 expression levels in the cortex and hippocampus of the Acacetin treatment group were significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** Acacetin could reduce the permeability of the blood-brain barrier by increasing the Occludin, Claudin-5 and ZO-1 expression levels, and thus play a neuroprotective role in cerebral ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 Acacetin Claudin Occludin Claudin-5 ZO-1

脑缺血再灌注损伤是缺血性脑卒中重要的病理生理改变,而脑缺血后产生的氧化应激、炎症反应及钙超载导致血脑屏障损伤,进而进一步加重脑损伤。血脑屏障(BBB)主要由脑微血管内皮细胞及其紧密连接、基底膜和星形胶质细胞足突组成,能阻止外周的

有害物质进入脑组织^[1]。紧密连接(TJ)是保持BBB完整性的重要因素,由跨膜蛋白(Claudin, Occludin, JAM)和膜相关蛋白(ZO, AF-6, 7H6)共同组成,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、参与细胞生长分化的信号的传递等。分子生物学等研究证实, TJ 是 BBB 通透性调节的中心环节, Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 是 TJ 的主要结构蛋白^[2]。刺槐素具有抗氧化作用和抗炎效应,我们前期的研究初步发现刺槐素可以增加氧糖剥夺后 SH-SY5Y 细胞的存活率,降低细

基金项目:新疆维吾尔自治区人民医院科技引进创新项目(No 20170202)

作者单位:830000 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院[牛晓珊 杨丽娟 补娟(通信作者)]

胞死亡率,减少缺血再灌注损伤后的脑梗死体积,改善神经功能评分,从而发挥神经保护作用^[3-4],但其神经保护作用是否与保护血脑屏障完整有关尚不清楚,故本研究将通过小鼠脑缺血再灌注模型来研究刺槐素对 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 表达水平的影响,以探讨刺槐素的神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重(25±2)g,由新疆实验动物研究中心提供(许可证号:SCXK(新)2011-0001);按随机数字法将小鼠分为假手术组、缺血再灌注组、刺槐素治疗(25 mg/kg);假手术组仅分离颈内动脉,但不闭塞大脑中动脉;缺血再灌注组再灌注时腹腔注射等体积生理盐水;刺槐素治疗组再灌注时腹腔注射等体积刺槐素。

1.2 小鼠脑缺血再灌注模型的建立

试验小鼠在实验环境中适应 3 d,自由饮水;参照 Koizumi 线栓法,制备右侧大脑中动脉闭塞(tMCAO)模型;小鼠给予1.5%戊巴比妥钠,腹腔注射麻醉,仰卧位固定齿及四肢;手术显微镜下行颈部正中纵行切口(5~6 mm),依次钝性分离及暴露右侧颈总动脉、右侧颈外动脉及右侧颈内动脉;暂时夹闭颈总动脉及颈内动脉;结扎颈外动脉远心端并小心剪断颈外动脉,于颈外动脉残端插入尼龙线(尖端硅胶包被)至大脑中动脉;缺血 60 min 抽出尼龙线,恢复脑血流再灌;术中及术后 3 h,注意保温。

1.3 免疫组织化学染色

4%水合氯醛深麻醉小鼠后开胸暴露心脏,经左心室分别灌注生理盐水和 4%多聚甲醛后取脑,置于 4%多聚甲醛中固定过夜;在前凶后 2~5 mm 之间连续冠状位切片,片厚 5 μm,附于多聚赖氨酸包被的载玻片备用;切片经常规脱蜡、水化、微波抗原修复后按试剂说明书以 SP 法进行 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 免疫组化染色,二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布及方差齐性检验则采用单因素分析,3 组间的两两比较采用 LSD-*t* 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 Occludin 染色阳性细胞数的变化

免疫组化染色显示假手术组皮层和海马 Occludin 染色阳性细胞数较多;与假手术组比较,缺血再灌注组无论是海马还是皮层 Occludin 染色阳性细胞数显著减少($P<0.01$);与缺血再灌注组比较,刺槐素治疗组皮层和海马 Occludin 染色阳性细胞数显著增加($P<0.01$)(图 1、表 1)。

表 1 各组小鼠 Occludin 染色阳性细胞数($\bar{x} \pm s$, 个/HP)

组别	Occludin 染色阳性细胞数	
	海马	皮层
假手术组	32.0±3.4	20.8±2.9
缺血再灌注组	11.8±1.9*	8.8±1.6*
刺槐素治疗组	21.8±1.4#	17.7±2.3#

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与缺血再灌注组比较,# $P<0.01$

2.2 各组小鼠 Claudin-5 染色阳性细胞数的变化

免疫组化染色显示假手术组皮层和海马 Claudin-5 染色阳性细胞数较多;与假手术组比较,缺血再灌注组无论是海马还是皮层 Claudin-5 染色阳性细胞数显著减少($P<0.01$);与缺血再灌注组比较,刺槐素治疗组皮层和海马 Claudin-5 染色阳性细胞数显著增加($P<0.01$)(图 2、表 2)。

表 2 各组皮层和海马 Claudin-5 染色阳性细胞数($\bar{x} \pm s$, 个/HP)

组别	Claudin-5 染色阳性细胞数	
	海马	皮层
假手术组	28.0±3.1	16.2±1.2
缺血再灌注组	10.8±2.1*	8.1±1.9*
刺槐素治疗组	23.6±1.9#	15.4±3.1#

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与缺血再灌注组比较,# $P<0.01$

2.3 各组小鼠 ZO-1 染色阳性细胞数的变化

免疫组化染色显示假手术组皮层和海马 ZO-1 染色阳性细胞数较多;与假手术组比较,缺血再灌注组中无论是海马还是皮层 ZO-1 染色阳性细胞数显著减少($P<0.01$);与缺血再灌注组比较,刺槐素治疗组皮层和海马 ZO-1 染色阳性细胞数显著增加($P<0.01$)(图 3、表 3)。

表 3 各组小鼠 ZO-1 染色阳性细胞数的变化($\bar{x} \pm s$, 个/HP)

组别	ZO-1 染色阳性细胞数的变化	
	海马	皮层
假手术组	37.0±2.1	25.3±3.2
缺血再灌注组	13.8±1.5*	14.2±2.5*
刺槐素治疗组	24.8±1.4#	22.1±4.1#

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与缺血再灌注组比较,# $P<0.01$

3 讨论

刺槐素(Acacetin)又称刺槐黄素、金合欢素,属

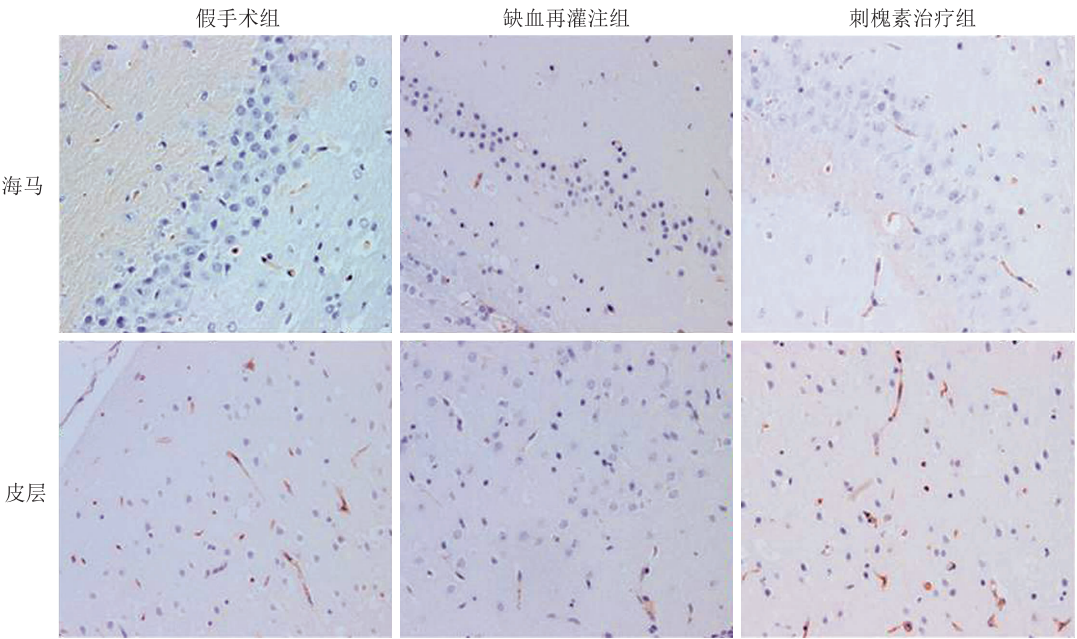


图 1 各组小鼠 Occludin 染色阳性细胞数的变化

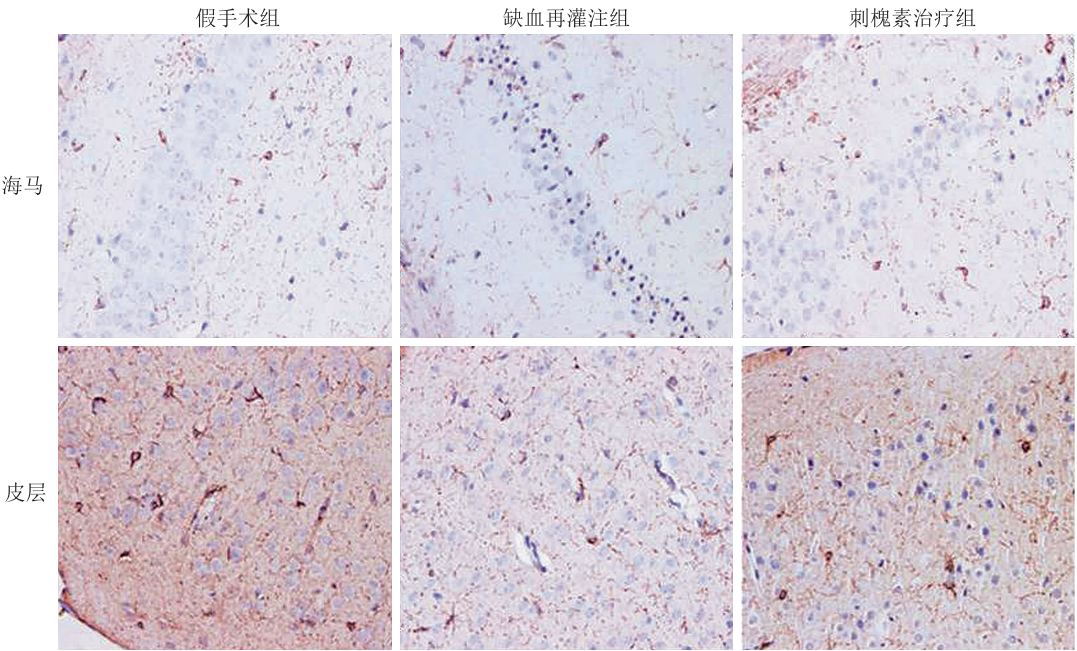


图 2 各组皮层和海马 Claudin-5 染色阳性细胞数的变化

黄酮类化合物,可从菊花、刺槐、雪莲等多种植物中提取获得,分子量284.26^[3]。既往研究发现刺槐素可增加氧糖剥夺后 SH-SY5Y 细胞的存活率,降低细胞死亡率,减少缺血再灌注损伤后的脑梗死体积,改善神经功能评分,从而发挥神经保护作用^[4-5]。本研究发现刺槐素可能通过增加 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 蛋白表达来降低血脑屏障的通透性,从而在脑缺血再灌注损伤中发挥神经保护作用。

紧密连接是保持血脑屏障完整性的重要因素,

由跨膜蛋白 (Claudin, Occludin, JAM) 和膜相关蛋白 (ZO、扣带蛋白、AF-6, 7H6) 共同组成,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级联传递等。有研究证实,紧密连接是血脑屏障通透性调节的中心环节,其表达水平的变化与血脑屏障的通透性改变密切相关^[6-7]。本研究采用免疫组织化学法检测了紧密连接蛋白 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 染色阳性细胞数,结果显示生理条件下紧密连接蛋白

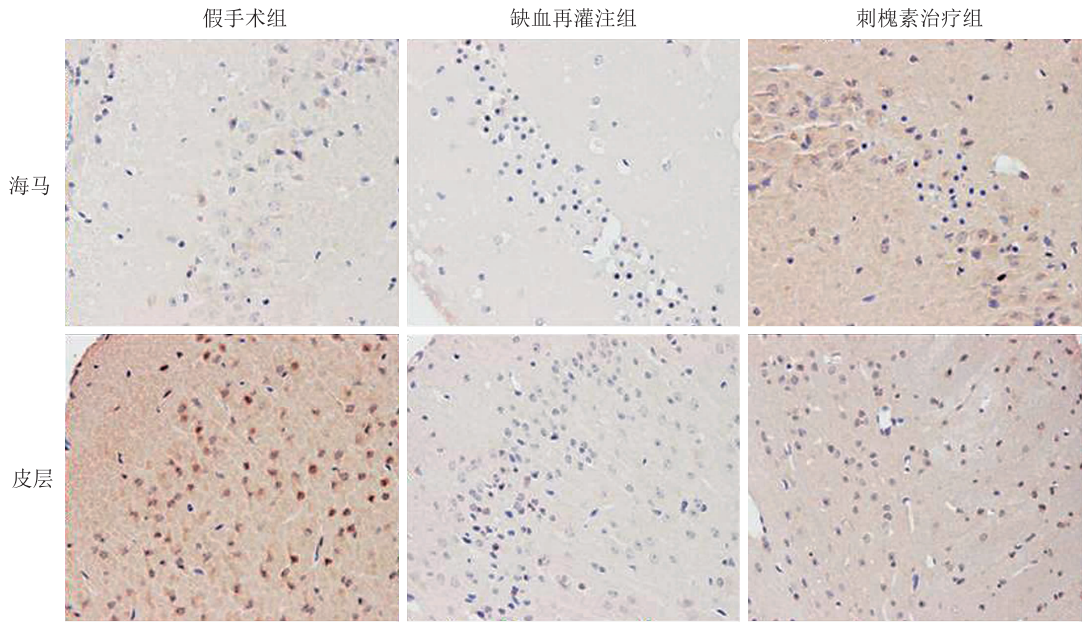


图 3 各组小鼠 ZO-1 染色阳性细胞数的变化

Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 表达维持在较高的水平,维持血脑屏障的完整性。当发生脑缺血再灌注损伤后紧密连接蛋白 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 蛋白染色阳性细胞数显著减少,增加血脑屏障的通透性,从而促进脑水肿的发生,加重脑缺血后二次损伤,例如在 Occludin, Claudin-5 缺失的小鼠中脑组织缺血再灌注的损伤严重程度和损伤后恢复所需时间高于野生对照组,也进一步说明 Occludin, Claudin-5 可能存在对于血脑屏障完整性的维护和脑组织的保护作用^[8]。本研究结果显示,辣椒素的神经保护作用可能与上调紧密连接蛋白 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 的表达,增加组成血脑屏障的细胞间连接,从而维持血脑屏障的稳定性,进而减轻脑水肿,避免脑缺血再灌注损伤后脑组织的二次损伤。但是以往研究表明 ZO-1 蛋白是通过影响内皮细胞内紧密连接蛋白(包括 Occludin 及 claudin-5)的多聚化而影响血脑屏障的通透性^[9],而且 claudin5 蛋白也可以通过胞内跨膜区域影响同一家族的紧密连接蛋白 claudin3 而发挥调节血脑屏障的紧密程度^[10]。本研究结果只是发现 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 染色阳性细胞数的一致性的减少,但三者之间的相互影响以及作用的机制还尚不清楚,因此辣椒素是否会影响这三种蛋白的关系来发挥作用还有待进一步的研究。同时紧密连接蛋白虽然在脑微血管内皮细胞上高表达,但在血脑屏障的参与细胞中(周细胞、星形胶质细胞)也有表达,例如有研究就提示内皮

细胞的 Claudin-5 水平的降低与周细胞的交互作用和活化密切相关^[11],Occludin 蛋白也可以通过影响周细胞的糖摄取能力进而调节星形胶质细胞的活化状态和吞噬功能^[12],因此关于 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 在不同细胞特异性的作用研究对于进一步阐明辣椒素保护脑组织的作用机理具有重要的生物学意义。

本研究初步揭示了辣椒素的神经保护作用可能与上调 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 等紧密连接蛋白的表达、维持血脑屏障的稳定性有关。但本研究仅通过免疫组织化学法从定性角度证实了该结果,需要今后通过进一步 WB,免疫荧光和流式细胞等试验方法进一步证实该结果的时间特异性和细胞特异性;同时,关于辣椒素上调 Occludin, Claudin-5 及 ZO-1 表达的机制还需要在明确了细胞类型后进一步阐明,为今后针对具体特异的药物靶点和临床干预提供可靠的实验数据。

参 考 文 献

- [1] Wang HX, Mei YW. The effect of hyperglycemia on blood brain barrier of rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. J Biomed Res, 2005, 19(5): 241-246.
- [2] Haixia Jiao, Zhenhua Wang, Yunhui Liu, et al. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult[J]. J Mol Neurosci, 2011, 44(2): 130-139.
- [3] 周媛媛, 仲伯华, 史卫国. 辣椒素的生物活性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2014, 13(9): 1053-1056 + 1080.

- 2019,38(5):357-360.
- [8] Merchant S, Nadaraj S, Chowdhury D, et al. Macrophage migration inhibitory factor in pediatric patients undergoing surgery for congenital heart repair[J]. *Molecular Medicine*, 2008, 14(3/4):124-130.
 - [9] Du GL, Luo JY, Wang DL, et al. MIF gene rs755622 polymorphism positively associated with acute coronary syndrome in Chinese Han population: case-control study[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):140.
 - [10] Luo JY, Rui X, Li XM, et al. MIF gene polymorphism rs755622 is associated with coronary artery disease and severity of coronary lesions in a Chinese kazakh population [J]. *Medicine*, 2016, 95(4):e2617.
 - [11] Ji KT, Wang XY, Ji L, et al. Macrophage migration inhibitory factor polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory coronary heart disease[J]. *Biomed Res Int*, 2015;1-6.
 - [12] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48(4):246-257.
 - [13] 刘燕, 刘晓辉, 宋艳玲, 等. 急性脑梗死患者血清 I 型胶原羧基末端肽改变及其与颈动脉粥样硬化斑块的关系[J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(1): 39-41 + 45.
 - [14] Lan MY, Yung-Yee C, Wei-Hsi C, et al. Association between MIF gene polymorphisms and carotid artery atherosclerosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(2):319-322.
 - [15] 王三敏, 伏兵, 余瑞芳, 等. 血清同型半胱氨酸和巨噬细胞移动抑制因子水平与颈动脉粥样硬化相关性研究[J]. *重庆医学*, 2014, 43(2):182-184.
 - [16] 代传芬, 刘兴德, 罗惠兰, 等. MIF 及其基因 - 173G/C 多态性与飞行员动脉粥样硬化危险因素的相关性研究[J]. *解放军医学杂志*, 2016, 41(2):153-157.
 - [17] Herder C, Illig T, Baumert J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and risk for coronary heart disease: Results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 200(2):380-388.

(2020-02-13 收稿)

(上接第 575 页)

- [4] 补娟, 赵宗峰, 王慧琴, 等. 刺槐素的不同给药时间对小鼠局灶性脑缺血的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2016, 23(4):263-266.
- [5] 马志, 补娟, 朱沂. 刺槐素腹腔注射对局灶性脑缺血小鼠脑再灌注损伤的预防作用及其机制[J]. *山东医药*, 2018, 58(39):43-46.
- [6] Eduard Urich, Stanley E L, Juliette Molnos, et al. Transcriptional Profiling of Human Brain Endothelial Cells Reveals Key Properties Crucial for Predictive In Vitro Blood-Brain Barrier Models[J]. *Plos One*, 2012, 7(5):e38149.
- [7] Bhowmick Saurav, D'Mello Veera, Caruso Danielle, et al. Impairment of pericyte-endothelium crosstalk leads to blood-brain barrier dysfunction following traumatic brain injury[J]. *Exp Neurol*, 2019, 317:260-270.
- [8] Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Hashimoto F M, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice[J]. *J Cell Biol*, 2003, 161(3):653-660.
- [9] Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation[J]. *Cell*, 2006, 126(4):741-754.
- [10] Rossa J, Ploeger C, Vorreiter F, et al. Claudin-3 and claudin-5 protein folding and assembly into the tight junction are controlled by non-conserved residues in the transmembrane 3 (TM3) and extracellular loop 2 (ECL2) segments[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(11):7641-7653.
- [11] Chen J, Luo Y, Hui H, et al. CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(36):e7622-e7631.
- [12] Castro V, Skowronska M, Lombardi J, et al. Occludin regulates glucose uptake and ATP production in pericytes by influencing AMP-activated protein kinase activity[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38(2):317-332.

(2020-04-17 收稿)

(上接第 598 页)

- [12] 陈伟红, 靳玮, 张淑倩, 等. 后循环缺血性卒中颅内动脉粥样硬化的高分辨率磁共振成像特征分析[J]. *中国脑血管病杂志*, 2019, 16(9):461-465.
- [13] 曾庆, 曾宪强, 李义, 等. 3.0T 高分辨率磁共振成像对中青年大脑中动脉狭窄性病变的诊断价值[J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*, 2019, 17(1):50-52.
- [14] 杨丽华, 刘义, 王艳玲, 等. 3.0T 高分辨率磁共振成像评估颅内动脉粥样硬化性狭窄的临床研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(21):3410-3414.
- [15] 赵义, 金灿, 王礼同, 等. 颅内动脉粥样硬化性狭窄患者斑块三维高分辨率磁共振成像强化特征与卒中发生时间的相关性研究[J]. *中华神经科杂志*, 2019, 52(12):1047-1053.
- [16] 赵义, 金灿, 王礼同, 等. 症状性大脑中动脉粥样硬化斑块分布及形态学特征的高分辨率磁共振成像研究[J]. *中华神经科杂志*, 2019, 52(9):724-731.
- [17] 韩柏林, 杨静, 罗彬, 等. 应用 HR-MRI 评价不同性别症状性大脑中动脉粥样硬化患者局部血管及斑块特征[J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14(12):614-617, 629.
- [18] 任加以, 何贵新, 秦伟彬, 等. 应用血管内超声评价高敏 C 反应蛋白与不稳定型心绞痛患者冠状动脉斑块性质的相关性[J]. *广东医学*, 2019, 40(4):498-502.
- [19] 伍琼, 罗喆, 洪李锋. 中老年冠心病患者超声心外膜脂肪垫厚度与冠状动脉易损斑块的相关性研究[J]. *中华老年医学杂志*, 2019, 38(1):34-36.
- [20] Zhang DF, Chen YC, Chen H, et al. A High-Resolution MRI study of relationship between remodeling patterns and ischemic stroke in patients with atherosclerotic middle cerebral artery stenosis[J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9(5):140.

(2020-03-30 收稿)