

梓葛冻干粉针对脑缺血/再灌注损伤大鼠脑微血管通透性的保护作用

尚远宏, 田金凤
(攀枝花学院, 四川攀枝花 617000)

摘要: 本文探讨梓葛冻干粉针对脑缺血/再灌注损伤大鼠脑微血管通透性的影响。选择雄性 SD 大鼠 272 只, 随机分为假手术组、模型组、葛根素注射液组和梓葛冻干粉针 3 个剂量组。线栓法复制大鼠缺血再灌注模型, 分别缺血 2 h, 于再灌注 1、4、7、14 d 给药后, 取脑提取微血管, 用 RT-PCR 法测定脑微血管中闭合蛋白 (Occludin)、紧密连接蛋白-5 (Claudin-5)、闭合小带蛋白-1 (ZO-1)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的 mRNA 表达。结果表明, 与模型组相比, 再灌注 4、7、14 d, 梓葛冻干粉针 16.40、32.70、65.40 mg·kg⁻¹ 能抑制脑缺血/再灌注大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 MMP-9 mRNA 表达的升高 ($p < 0.01$); 并促进微血管中 Claudin-5、Occludin、ZO-1 mRNA 表达 ($p < 0.05$)。说明梓葛冻干粉针通过抑制 MMP-9 基因表达, 并促进 Claudin-5、Occludin、ZO-1 基因表达, 进而保护和改善脑微血管通透性。

关键词: 梓葛冻干粉针, Claudin-5, Occludin, ZO-1, MMP-9, 脑微血管通透性

Study on the effect of Zige lyophilized powder for injection against the microvascular permeability after cerebral ischemia-reperfusion injury of rats in the cerebral microcirculation

SHANG Yuan-hong, TIAN Jin-feng
(Panzhihua University, Panzhihua 617000, China)

Abstract: This paper investigated the protective effect of Zige lyophilized powder for injection against the microvascular permeability after cerebral ischemia-reperfusion injury of rats in the cerebral microcirculation. 272 male sprague-dawley rats were randomly divided into sham group, model group, puerarin injection group, three groups of Zige lyophilized powder. It made a cerebral ischemia-reperfusion model using the line in the left middle cerebral artery occlusion (MCAO) of rats in ischemia for 2 h and reperfusion for 1, 4, 7 and 14 d, the model of rats was established by intravenous injection of drugs. The expression of MMP-9, ZO-1, Occludin and Claudin-5 mRNA of the brain microvessel in the lateral ischemic cerebral cortex was detected by fluorescence quantitative PCR. In reperfusion for 4, 7 and 14 d, compared with model group, Zige lyophilized powder groups (16.40, 32.70 and 65.40 mg·kg⁻¹) could reduce mmp-9 mRNA level in microvessel of the lateral ischemic cerebral cortex ($p < 0.01$), and could increase claudin-5, occludin, zo-1 mRNA level ($p < 0.05$) in the corresponding time. These results suggested that Zige lyophilized powder for injection could improve and protect the microvascular permeability by reducing MMP-9 and increasing claudin-5, occludin, zo-1 mRNA level.

Key words: Zige lyophilized powder for injection; Claudin-5; Occludin; Zo-1; MMP-9; microvascular permeability

中图分类号: TS201.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2017)13-0307-04
doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.13.057

梓葛冻干粉针主要由《千金方》中方剂“羌活汤”中药食同源的葛根提取的葛根素和熟地黄提取的梓醇组成, 并由西南大学中药研究所依据食疗养生防病思路自主研发的治疗脑卒中的制剂 (专利公开号 CN101574361A)^[1]。葛根为豆科植物野葛的干燥块根, 是中国南方一些省区的一种常食蔬菜, 其味甘凉可口, 常作煲汤之用, 也可作

为药物应用。其分离的葛根素是异黄酮类衍生物, 水溶性差, 具有扩冠、抗氧化、保护心肌和脑神经作用, 临床上用于治疗冠心病、心绞痛、高血压等疾病。熟地黄原名地黄, 补血滋阴, 益精填髓。其分离的梓醇是一种环烯醚萜葡萄糖苷类化合物, 易溶于水, 具有抗癌、神经保护、抗炎、利尿、降血糖及抗肝炎病毒等作用。梓葛冻干粉针充分利

收稿日期: 2016-12-08

作者简介: 尚远宏 (1980-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 中药药理和食品研究, E-mail: shyh611@126.com。

基金项目: 四川省教育厅重点基金项目 (14ZA0345, 15ZA0370); 攀枝花市社会发展科技计划项目 (2016 CY-S-10); 攀枝花学院博士科研启动经费项目 (bkqj2015026, bkqj2015023); 四川省高校重点实验室开放基金项目 (GR-2015-E-01, szjj2017-110)。

表1 Real-time PCR 引物序列及扩增产物大小

Table 1 Primer sequences used for Real-time PCR and the products' size

基因	引物名称	引物序列	产物(bp)
MMP-9	MMP-9-F	GACCTCAAGTGGCACCATCA	227
	MMP-9-R	AGTAGACCATCCTTGCCGTC	
ZO-1	ZO-1-F	AGTCTCGGAAAAGTGCCAGG	120
	ZO-1-R	GGGCACCATACCAACCATCA	
Claudin-5	Claudin-5-F	CTGCCTTCCTGGACCACAAT	119
	Claudin-5-R	CGCCAGCACAGACTCATACA	
Occludin	Occludin-F	TGTATGGCGGAGAGATGCAC	218
	Occludin-R	TCCTCCAAAGATGCCCCTTC	
β -actin	β -Actin-F	ATGTGGATCAGCAAGCAGGA	99
	β -Actin-R	AAGGGTGTAACGCAGCTCA	

用了食物原料的特性来调节机体功能,使人类获得健康或愈疾防病。

脑微血管是脑微循环的主要组成部分和物质交换场所,也是脑缺血损伤的最敏感部位^[2]。而脑微血管通透性主要取决于内皮细胞之间的紧密连接,紧密连接不仅是细胞间屏障,而且是具有控制细胞生长发育和信号转导的膜蛋白结构。其中,跨膜蛋白 Occludin、Claudin-5 和膜相关蛋白 ZO-1 的结构、功能异常与微血管通透性破坏密切相关^[3-4],且 MMP-9 能降解紧密连接蛋白 Claudins 和 Occludins,在脑缺血再灌注损伤急性期加重血脑屏障破坏,使脑微血管通透性增强,并参与脑水肿和脑出血的组织损伤过程^[5-6]。课题组发现梓葛冻干粉针改善脑缺血/再灌注损伤大鼠脑微血管通透性可能与抑制 MMP-9 蛋白表达,并促进 Claudin-5、Occludin 和 ZO-1 蛋白表达有关^[7],但是该制剂对影响脑微血管通透性的 4 个相关蛋白的基因表达变化尚不清楚。本研究拟通过复制脑缺血/再灌注损伤大鼠模型,考察梓葛冻干粉针对影响大鼠脑微血管通透性的 4 个相关蛋白与其基因表达变化的关联性,并为梓葛冻干粉针的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

梓葛冻干粉针(规格:49 mg/瓶,成分为葛根素和梓醇)^[8-9] 西南大学中药研究所;葛根素注射液 成都天台山制药有限公司;TRIzol Reagent 美国 ambion 公司;qPCR Master Mix 德国 TaKaRa 公司;RT mix 美国 Vazyme 公司;DEPC 美国 Sigma 公司;Agarose 上海基因公司;葡聚糖-40 美国 Fisher 公司;HEPES 北京鼎国昌盛生物技术有限公司;T-PER 组织蛋白提取液 美国 Pierce 生物技术公司;蛋白酶抑制剂 美国 sigma 公司;其他常规化学试剂 均为分析纯,成都科龙化工试剂厂。

荧光定量 PCR 仪 瑞士 Roche 公司;Elx800 型酶标仪 美国 Bio Tek 仪器有限公司;BI 2000 数字图像分析系统 成都泰盟软件公司。

1.2 动物分组及给药

取雄性 SD 大鼠 272 只(由重庆医科大学实验动物中心供应,合格证号:SCXK(渝)2007-0001),体质

量(280 ± 25) g,SPF 级,随机分为假手术组、模型组、葛根素注射液组和梓葛冻干粉针 3 个剂量组。假手术组 32 只,其余各组 48 只动物,线栓法复制大鼠 I/R 模型^[10],再灌注时即刻给药(再灌注 0 h),尾静脉注射给药,每天 1 次($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,体质量),造模后有 4 个考察时间点(缺血 2 h 再灌注 1、4、7、14 d),每个时间点各组取材 8 只造模成功动物,假手术组和模型组给同等体积的生理盐水。

1.3 样品采集及操作

参照文献方法^[7,11],采集脑微血管。RT-PCR 样本处理:取 0.1 g 脑微血管沉淀加入 1 mL TRIzol 试剂, -80°C 保存(备 RNA 提取用)。

1.4 RT-PCR 法分析

根据试剂盒说明书操作,先提取总 RNA,定量后进行逆转录反应,上 PCR 扩增仪进行扩增反应。扩增曲线: 94°C 5 min; 94°C 20 s, 60°C 30 s,循环 45 次, 60°C 单点检测信号。溶解曲线: 95°C 15 s, 60°C 15 s, 95°C 15 s,连续检测信号,最后得 PCR 产物并分析数据($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算,以(-actin 为内参照基因,与假手术组(作基准值,对照)相比,得到目的基因表达的相对定量值(RQ 值),将 RQ 值统计分析)。根据 GenBank 中已知序列,按照实时荧光定量 PCR 对引物的要求,引物由上海生物工程公司合成,目标基因的序列见表 1。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件统计分析数据,统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。正态性和方差齐性检验实验数据,各组间的比较采用单因素方差分析 ANOVA 的 Tukey 检验分析,以 $p < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果与分析

2.1 脑缺血/再灌注大鼠缺血侧脑皮质层微血管中总 RNA 提取结果

各组脑组织提取总 RNA 的 OD260/OD280 比值均在 1.6~1.8 之间,表明提取的总 RNA 完整性好。提取的微血管中总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见 28、18、5 S 三个条带,无明显降解条带,无 DNA 污染条带,表明提取的总 RNA 纯度较高。见图 1。

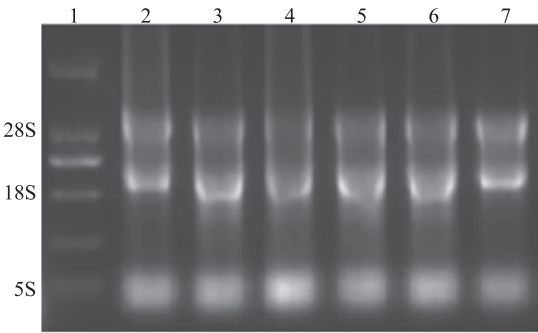


图1 总 RNA 电泳鉴定结果

Fig.1 The electrophoresis identification of total RNA
注:1、Marker;2、葛根素注射液组;3、假手术组;
4、5、6、梓葛冻干粉针 16.40、32.70、
65.40 mg·kg⁻¹组;7、模型组。

2.2 梓葛冻干粉针抑制脑缺血/再灌注大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 MMP-9 mRNA 表达的升高

通过 SYBR Green I 染料法实时荧光定量 PCR 检测脑缺血再灌注大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 MMP-9 基因。实验结果表明,假手术组皮层脑组织中有少量 MMP-9 mRNA 表达。脑缺血再灌注后,各考察时间点(1、4、7、14 d),与假手术组相比,模型组的大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 MMP-9 mRNA 表达均呈升高趋势,分别升高 487.0%、349.8%、301.6% 和 276.8% ($p < 0.01$),显示造模成功,且随着观察时间延长而逐渐下降,其中再灌注后第 1 d 时大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 MMP-9 mRNA 表达相对最高,与文献报道相一致^[12-14]。与模型组相比,葛根素注射液组(30.00 mg·kg⁻¹),梓葛冻干粉针 16.40、32.70、65.40 mg·kg⁻¹组均能极显著降低大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 MMP-9 mRNA 表达水平($p < 0.01$)。见图 2。

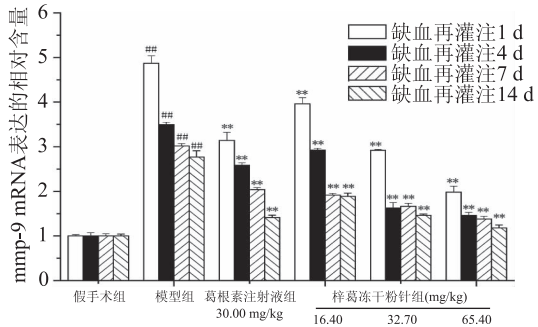


图2 梓葛冻干粉针对脑缺血/再灌注 1、4、7、14 d 大鼠缺血侧脑皮质层 MMP-9 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.2 Effects of Zige lyophilized powder on MMP-9 mRNA levels of the cortex in focal cerebral ischemia-reperfusion rats on 1,4,7 and 14 d($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注:在相应时间下,与假手术组比较^{##} $p < 0.01$;

与模型组相比^{*} $p < 0.05$,^{**} $p < 0.01$ 。图 3~图 5 同。

2.3 梓葛冻干粉针促进脑缺血/再灌注大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 Claudin-5 mRNA、Occludin mRNA 和 ZO-1 mRNA 表达

脑缺血再灌注后,各考察时间点(1、4、7、14 d),与假手术组相比,模型组的大鼠缺血侧脑皮质层微

血管中 Claudin-5 mRNA 表达均呈降低趋势,分别降低 35.44%、32.73%、29.44% 和 29.08% ($p < 0.01$),显示造模成功。与模型组相比,葛根素注射液组(30.00 mg·kg⁻¹),梓葛冻干粉针 32.70 mg·kg⁻¹ 和 65.40 mg·kg⁻¹组均能极显著升高大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 Claudin-5 mRNA 表达水平($p < 0.01$),而梓葛冻干粉针 16.40 mg·kg⁻¹组仅在 7 d 时能显著升高 Claudin-5 mRNA 表达水平($p < 0.05$)。见图 3。

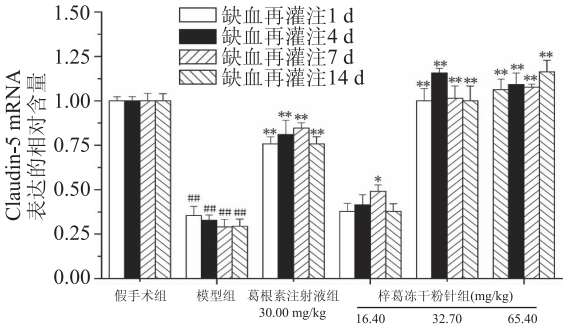


图3 梓葛冻干粉针对脑缺血/再灌注 1、4、7、14 d 大鼠缺血侧脑皮质层 claudin-5 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.3 Effects of Zige lyophilized powder on claudin-5 mRNA levels of the cortex in focal cerebral ischemia-reperfusion rats on 1,4,7,14 d($\bar{x} \pm s, n = 8$)

脑缺血再灌注后,各考察时间点(1、4、7、14 d),与假手术组相比,模型组的大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 Occludin mRNA 表达均呈降低趋势,分别降低 37.81%、32.09%、21.07% 和 23.11% ($p < 0.01$),显示造模成功。与模型组 Occludin mRNA 表达相比,除葛根素注射液组(30.00 mg·kg⁻¹)在再灌注 1 d 升高无差异外,葛根素注射液其余时间组(30.00 mg·kg⁻¹),梓葛冻干粉针 16.40、32.70、65.40 mg·kg⁻¹组均能极显著升高大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 Occludin mRNA 表达水平($p < 0.01$)。见图 4。

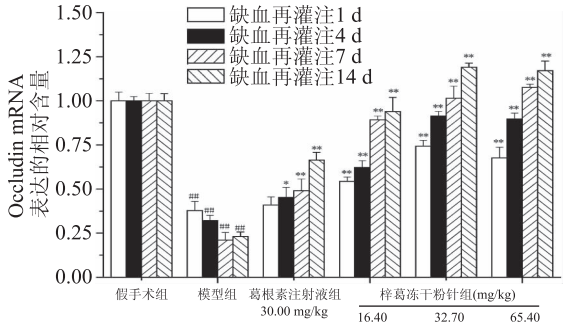


图4 梓葛冻干粉针对脑缺血/再灌注 1、4、7、14 d 大鼠缺血侧脑皮质层 occludin mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.4 Effects of Zige lyophilized powder on occludin mRNA levels of the cortex in focal cerebral ischemia-reperfusion rats on 1,4,7,14 d($\bar{x} \pm s, n = 8$)

脑缺血再灌注后,各考察时间点(1、4、7、14 d),与假手术组相比,模型组的大鼠缺血侧脑皮质层微血管中 ZO-1 mRNA 表达均呈降低趋势,分别降低 41.08%、23.11%、21.08% 和 23.16% ($p < 0.01$),显示造模成功。与模型组 ZO-1 mRNA 表达相比,除葛根素注射液组(30.00 mg·kg⁻¹)和梓葛冻干粉针

16.40 mg·kg⁻¹组在再灌注1 d时升高无差异外,葛根素注射液其余时间组(30.00 mg·kg⁻¹),梓葛冻干粉针16.40 mg·kg⁻¹(4、7、14 d)、32.70 mg·kg⁻¹和65.40 mg·kg⁻¹组均能显著升高大鼠缺血侧脑皮质层微血管中ZO-1 mRNA表达水平($p < 0.01$, $p < 0.05$)。见图5。

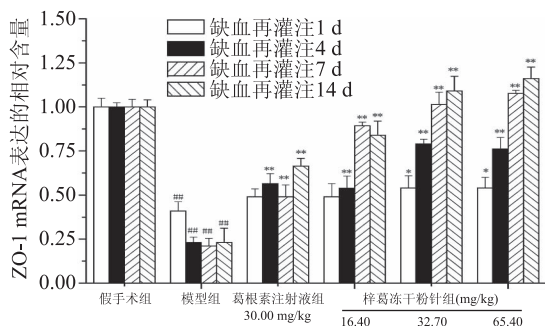


图5 梓葛冻干粉针对脑缺血/再灌注1、4、7、14 d大鼠缺血侧脑皮质层ZO-1 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig.5 Effects of Zige lyophilized powder on ZO-1 mRNA levels of the cortex in focal cerebral ischemia-reperfusion rats on 1, 4, 7, 14 d($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

3 讨论

MMP-9与脑缺血再灌注损伤的关系十分密切^[15],且其在继发性脑损伤和血管源性水肿中起重要作用。梓葛冻干粉针16.40、32.70、65.40 mg·kg⁻¹均能抑制MMP-9 mRNA的表达升高,进而减少MMP-9的生成,提示药物降低脑缺血模型大鼠脑微血管通透性的机制可能与降低在脑微血管中MMP-9 mRNA的表达有关。

脑缺血和再灌注导致脑微循环和微血管的许多变化,其中微血管通透性的改变在病变过程扮演重要角色^[16]。研究表明,在考察相对应的时间点(1、4、7、14 d),与假手术组比较,模型组的大鼠缺血侧脑皮质层微血管中Occludin、Claudin-5、ZO-1 mRNA的表达均显著下降,破坏了脑微血管细胞间紧密连接,进而破坏血脑屏障结构的完整性和功能正常发挥,使血管通透性增加,加重再灌注后脑水肿,使脑缺血/再灌注的损伤程度加重,与文献报道一致^[3,17]。梓葛冻干粉针16.40、32.70、65.40 mg·kg⁻¹均能抑制Occludin、Claudin-5、ZO-1 mRNA的表达降低,且3个剂量组对于3种结构蛋白具有正向调节作用,此结果说明梓葛冻干粉针对脑缺血起到保护作用可能与升高脑微血管中Occludin、Claudin-5、ZO-1 mRNA表达有关。

4 结论

本研究表明梓葛冻干粉针可以抑制MMP-9基因表达,并促进Claudin-5、Occludin、ZO-1基因表达,此基因水平结果与其蛋白结果变化基本一致,提示其可保护和改善脑微血管通透性,为梓葛冻干粉针的临床应用奠定了实验基础。

参考文献

[1] 尚远宏,田金凤,汪宏锦,等.梓葛冻干粉针剂对脑微血管内

皮细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J].食品工业科技,2016,37(7):358-373.

[2] Del Zoppo G J, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia[J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2003, 23(8): 879-894.

[3] Jiao H, Wang Z, Liu Y, 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]. Journal of Molecular Neuroscience, 2011, 44(2): 130-139.

[4] Lapierre L A. The molecular structure of the tight junction[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, 41(3): 255-264.

[5] Wang G, Guo Q, Hossain M, et al. Bone marrow-derived cells are the major source of MMP-9 contributing to blood-brain barrier dysfunction and infarct formation after ischemic stroke in mice[J]. Brain Research, 2009, 1294: 183-192.

[6] 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]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2007, 27(4): 697-709.

[7] 尚远宏,田金凤,汪宏锦,等.梓葛冻干粉针剂对脑缺血/再灌注损伤大鼠脑微血管通透性的影响及其机制研究[J].食品工业科技,2016,37(24):350-354.

[8] 原欢欢,张继芬,王琴,等. RP-HPLC测定梓葛冻干粉针剂中的药物含量及有关物质[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(16): 1276-1279.

[9] 原欢欢. 梓葛冻干粉针剂的研制及其初步安全性评价[D]. 西南大学, 2012.

[10] 尚远宏,田金凤,李松青,等. 不同缺血时间对脑缺血/再灌注损伤大鼠神经行为学的影响[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2015, 41(5): 539-543.

[11] Hawkins B T, Abbruscato T J, Egletton R D, et al. Nicotine increases *in vivo* blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution[J]. Brain Research, 2004, 1027(1): 48-58.

[12] 孙微. 脑缺血一再灌注损伤时MMP-9的表达及银杏叶的干预作用[D]. 长春: 吉林大学, 2006.

[13] Rosenberg G, Estrada E, Dencoff J. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain[J]. Stroke, 1998, 29(10): 2189-2195.

[14] 雷立芳,涂秋云,资晓宏. 依达拉奉对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障通透性及MMP-9表达的影响[J]. 广东医学, 2008, 29(7): 1128-1130.

[15] 袁毅,雷立芳,涂秋云,等. 大鼠脑缺血再灌注中血脑屏障通透性的改变与基质金属蛋白酶9表达的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(7): 510-512.

[16] 李向红. 脑缺血的微血管改变[J]. 微循环学杂志, 1997, 7(1): 13-13.

[17] 王静娥,田国萍,周进,等. 大鼠脑缺血时紧密连接相关蛋白occludin和claudin-5表达的变化[J]. 解剖科学进展, 2010, 16(2): 149-152.