

本文引用: 陆展辉, 李艳玲, 孙婧怡, 杨芙蓉, 丁煌, 邓常清, 刘晓丹. 黄芪甲苷配伍三七总皂苷对 OGD/R 大鼠脑微血管内皮细胞屏障功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1786-1792.

黄芪甲苷配伍三七总皂苷对 OGD/R 大鼠脑微血管内皮细胞屏障功能的影响

陆展辉, 李艳玲, 孙婧怡, 杨芙蓉, 丁煌, 邓常清*, 刘晓丹*

湖南中医药大学中西医结合学院, 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208

[摘要] 目的 观察黄芪甲苷(astragaloside IV, AST IV)配伍三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)对氧糖剥夺后再复糖复氧(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)大鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, rBMECs)屏障功能的影响。方法 原代培养并鉴定 rBMECs, 取第3代 rBMECs, 采用 AST IV 与 PNS 高(100 $\mu\text{mol/L}$ +60 $\mu\text{mol/L}$)、中(50 $\mu\text{mol/L}$ +30 $\mu\text{mol/L}$)、低(25 $\mu\text{mol/L}$ +15 $\mu\text{mol/L}$)剂量配伍预处理 24 h, 以 OGD/R 建立缺血再灌注损伤模型, 同时设立对照组和模型组。CCK-8 检测细胞存活情况, 利用跨内皮细胞电阻(transendothelial electrical resistance, TEER)检测细胞屏障功能的改变, 免疫荧光检测血管屏障连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 蛋白含量, Western blot 检测黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 的蛋白表达及 NF- κ B-p65 的活化表达情况, ELISA 检测细胞培养液中炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 表达水平。结果 成功培养分离 rBMECs, 阳性表达 vWF。与对照组比较, 模型组细胞存活数量明显减少($P<0.01$), 与模型组比较, AST IV 与 PNS 不同剂量配伍均能提高 rBMECs 的存活率($P<0.05$, $P<0.01$)。与对照组比较, 模型组 TEER 值、Occludin 和 ZO-1 荧光强度显著降低($P<0.01$), 与模型组比较, AST IV 与 PNS 不同剂量配伍均能显著增高 TEER 值($P<0.01$)、增加 Occludin 和 ZO-1 荧光强度($P<0.05$, $P<0.01$)。与对照组比较, 模型组 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1、p-NF- κ B-p65 表达显著增强($P<0.01$), 与模型组比较, AST IV 与 PNS 中高剂量配伍组 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1、p-NF- κ B-p65 表达量下降($P<0.01$)。结论 AST IV 配伍 PNS 能够显著抑制 NF- κ B 活化, 降低细胞炎症因子的表达, 增高 OGD/R 模型 rBMECs 屏障功能, 保护缺血缺氧后的脑组织。

[关键词] 大鼠脑微血管内皮细胞; 脑缺血再灌注; 黄芪甲苷; 三七总皂苷; 屏障功能

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.10.006

Effects of astragaloside IV combined with *Panax notoginseng* saponins on the barrier function of OGD/R rBMECs

LU Zhanhui, LI Yanling, SUN Jingyi, YANG Furong, DING Huang, DENG Changqing*, LIU Xiaodan*

Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-cerebral Diseases, School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[收稿日期] 2023-06-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81904181); 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30439); 湖南省卫生健康委科研项目(2022202203075430); 湖南省大学生创新创业训练计划项目(S202010541017); 湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2020ZXYJH70); 湖南中医药大学2022年大学生创新创业训练项目(编号152)。

[第一作者] 陆展辉, 男, 硕士研究生, 研究方向: 心脑血管疾病的中医药防治。

[通信作者] * 刘晓丹, 女, 高级实验师, E-mail: 314086131@qq.com; 邓常清, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: dchangq@sohu.com。

[Abstract] Objective To observe the effects of astragaloside IV (AST IV) combined with *Panax notoginseng* saponins (PNS) on the barrier function of rat brain microvascular endothelial cells (rBMECs) by oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R). **Methods** The primary rBMECs were cultured and identified, and the third-generation rBMECs were selected. AST IV was combined with PNS at high (100 $\mu\text{mol/L}$ +60 $\mu\text{mol/L}$), medium (50 $\mu\text{mol/L}$ +30 $\mu\text{mol/L}$), and low-(25 $\mu\text{mol/L}$ +15 $\mu\text{mol/L}$) doses to pretreat rats for 24 hours, and an ischemia-reperfusion injury model was established using OGD/R. Meanwhile, control group and model group were established. Cells' survival status was checked by CCK-8, the changes of cell barrier function were measured by transendothelial electrical resistance (TEER), the content of blood-brain barrier junction protein Occludin and ZO-1 protein was determined by immunofluorescence, the protein expressions of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1, and NF- κ B-p65 activation expression were examined by Western blot, and the expression levels of inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in cell culture fluid were determined by ELISA. **Results** rBMECs, with the positive expression of vWF factor, were successfully cultured and isolated. Compared with control group, the number of survived cells in model group significantly reduced ($P<0.01$). Compared with model group, the combination of AST IV and PNS at different doses could improve the survival rate of rBMECs ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with control group, the TEER value, as well as the fluorescence intensity of Occludin and ZO-1 significantly decreased in model group ($P<0.01$). Compared with model group, the combination of AST IV and PNS at different doses significantly increased the TEER value ($P<0.01$), and also increased the fluorescence intensity of Occludin and ZO-1 ($P<0.05$, $P<0.01$); compared with control group, the expressions of TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, VCAM-1, and p-NF- κ B-p65 in model group significantly increased ($P<0.01$), while compared with model group, the expression levels of TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, VCAM-1, and p-NF- κ B p65 in the medium- and high-dose combination groups of AST IV and PNS decreased ($P<0.01$). **Conclusion** AST IV combined with PNS can significantly inhibit NF- κ B activation, suppress the expression of inflammatory cytokines, improve the barrier function of rBMECs in OGD/R model, and protect the brain tissue after ischemia and hypoxia.

[Keywords] rat brain microvascular endothelial cells; cerebral ischemia-reperfusion; astragaloside IV; panax notoginseng saponins; barrier function

脑缺血再灌注损伤后,脑组织紧密连接被破坏,血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性增高,进而继发的脑水肿,是导致高致残率、高死亡率的主要原因之一,直接影响患者的疗效和预后^[1]。脑微血管内皮细胞(brain microvascularendothelial cells, BMECs)是维持 BBB 结构和功能完整的主要组成单位,其紧密连接蛋白是维持其屏障功能,限制大部分大分子蛋白和有害物质进入脑组织的结构基础^[2-3]。脑缺血再灌注损伤后内皮细胞的功能改变是最早的病理性损伤变化,因此,脑微血管内皮细胞的保护成为脑缺血治疗的重要靶点。

黄芪甲苷(astragaloside IV, AST IV)和三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)分别是中药黄芪和三七中具有心脑血管效应的重要有效物质,课题组前期对其脑缺血后的神经保护作用 and 机制做了大量研究,最新研究发现黄芪甲苷和三七总皂苷可减轻脑缺血再灌注后 BBR 损伤,减轻脑缺血后脑微血管内皮细胞凋亡^[4-8]。基于此,本研究拟采用离体培养大鼠 BMECs,建立体外脑缺血再灌注模型,研究

中药有效组分配伍对 rBMECs 屏障功能的保护作用,为中药有效组分抗脑缺血治疗提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

健康新生 5~7 d SD 大鼠 6 只,雌雄各半,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物质量合格证号 ZS-202007210009,饲养于湖南中医药大学动物实验中心,实验动物许可证号 SYXK(湘)2013-0005。实验符合湖南中医药大学动物伦理委员会要求,伦理委员会编号 LLBH-202004290001。

1.2 主要药物与试剂

AST IV(质量分数 $\geq 98\%$,批号:MUST-17022804)、PNS(质量分数 $\geq 98\%$,批号:MUST-17060601)购于成都曼思特生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒(中国伊莱瑞特公司,批号:E-CK-A362),重组 Anti-Occludin 抗体、重组 Anti-ZO1 tight junction 蛋白抗体、NF- κ B-p65 抗体(美国 Abcam 公司,货号:ab216327、ab221547、ab32518);ICAM-1 抗体、VCAM-1 抗体、

p-NF- κ B-p65 抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司, 货号:sc-8439、sc-18854、sc-166748)。

1.3 主要仪器

Heracell 型 CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 有限公司);FORMA3131 型三气培养箱(美国 Forma 公司);SW-CJ-1FD 型超净工作台(中国苏净安泰公司);A1 激光共聚焦显微镜(日本 NIKON 公司);CYTATION5 多功能酶标成像系统仪(美国博腾仪器有限公司)。

2 方法

2.1 rBMECs 分离、培养及鉴定

参照本课题组前期研究方法^[8],将出生 5~7 d 的 6 只 SD 乳鼠用 75%乙醇消毒全身后,断头取脑。无菌条件下于冰上剥取大脑皮质,加入 10 mL 0.1% II 型胶原酶(内含 0.005% D-Nase I)37 °C 水浴 30 min 使其充分消化,加入等体积 DMEM-F12 完全培养液混匀,通过 100 目的筛网收集滤液,离心后收集离心底部沉淀,将收集到的细胞以大鼠脑微血管内皮细胞完全培养基(含 4 mg/L 的嘌呤霉素)重悬,1×10⁶ 个/mL 细胞密度接种于 T-75 培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。48 h 后更换不含嘌呤霉素的培养基,待贴壁细胞完全融合后,0.25% 胰酶消化传代。选取 P3 代 BMECs,采用免疫荧光法对 rBMECs 进行细胞鉴定,激光共聚焦拍照观察。

2.2 OGD/R rBMECs 模型的建立

根据本课题前期研究^[8]结果,以缺糖缺氧 2 h 再复糖复氧 24 h 复制脑缺血再灌注损伤细胞模型。具体操作如下:细胞分组处理后,弃培养液,加入大鼠微血管内皮细胞无糖培养基,置于 94% N₂、1% O₂、5% CO₂ 的三气培养箱中培养 2 h,换成大鼠微血管内皮细胞完全培养基继续培养 24 h 进行复糖复氧。

2.3 实验分组及给药

细胞分为正常组,模型组,AST IV 与 PNS 高、中、低剂量配伍组 5 组。正常组以大鼠脑微血管细胞完全培养基常规培养;药物组根据课题组前期研究^[8]选取 AST IV 与 PNS 高、中、低剂量配伍组分别加入终浓度为(100 μmol/L+60 μmol/L)、(50 μmol/L+30 μmol/L)、(25 μmol/L+15 μmol/L)剂量的 AST IV 与 PNS 预处理 24 h 后予以 OGD/R 造模;模型组给予等剂量的

大鼠脑微血管细胞完全培养基预处理 24 h 后予以 OGD/R 造模。

2.4 CCK-8 检测细胞增殖情况

细胞按分组接种于 2 块 96 孔板,处理完成后,取出培养板,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,37 °C 避光孵育 2 h,于多功能酶标仪测定吸光度(A)值并计算细胞存活率。

细胞存活率=(实验组 A 值-空白组 A 值)/(正常组 A 值-空白组 A 值)×100%

2.5 跨内皮细胞电阻抗检测细胞屏障功能的改变

细胞接种于 Transwell 小室内,按分组进行处理,于给药前、造模前及实验结束后分别测定各组 TEER 值,观察各组大鼠脑微血管内皮细胞紧密连接程度变化情况。

2.6 免疫荧光检测血脑屏障连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 蛋白含量

将细胞按分组接种于铺有细胞爬片的 24 孔培养板,处理结束后,取出细胞爬片,PBS 清洗 3 次(每次 3 min),给予 4%多聚甲醛固定 30 min,0.1% PBST 冲洗 3 次,2% BSA 常温封闭 30 min,一抗 4 °C 孵育过夜,荧光二抗室温孵育 1 h,0.1% PBST 冲洗 3 次,DAPI 染核,PBS 清洗 3 次,防荧光淬灭封片剂封片。于激光共聚焦显微镜 400 倍随机选取每张玻片 5 个非连续视野进行拍摄,测定平均荧光强度,以平均荧光强度值进行统计分析。

2.7 Western blot 检测 NF- κ B-p65、p-NF- κ B-p65、ICAM-1、VCAM-1 的蛋白表达

细胞按分组处理后,吸弃培养液,PBS 清洗 3 次,加入组织裂解液,冰上充分裂解,提取细胞总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度,根据总蛋白浓度,制备成上样蛋白。根据目的蛋白的分子量设置不同的电泳和转膜条件进行电泳和转膜,转膜结束后用 5%脱脂牛奶封闭 1~2 h,加入兔抗大鼠 NF- κ B-p65、p-NF- κ B-p65 单克隆抗体(稀释比例均为 1:3 000),兔抗大鼠 ICAM-1、VCAM-1 单克隆抗体(稀释比例均为 1:1 000),4 °C 孵育过夜,TBST 清洗 3 次,加入二抗 37 °C 水浴 1 h,TBST 洗膜后,于化学发光成像分析系统扫描显影。使用 Image Lab 图像分析软件进行测定。

2.8 ELISA 检测细胞培养液中炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 表达水平

细胞按分组处理后,吸取各组培养液,300 \times g/5 min 离心去除细胞碎片,0.22 μ m 针孔过滤器过滤后,按 ELISA 试剂盒说明书检测培养液中 TNF- α 及 IL-1 β 水平。

2.9 统计学分析

数据均用 SPSS 25.0 统计软件进行统计。计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用 Dunnett T3 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 rBMECs 鉴定

原代培养的 rBMECs 未贴壁时呈透亮的串珠样小圆形,培养 48 h 后细胞呈星芒状放射生长,出现多角形或长梭形样改变,7 d 左右融合成致密的单层,呈“铺路石”征象,有明显的漩涡样的成管特性。免疫荧光对其标志性蛋白 vWF 因子染色结果显示:90%以上细胞特异性表达 vWF 因子,提示所提取的细胞为 rBMECs。详见图 1。

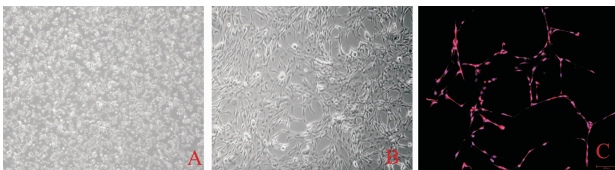


图 1 rBMECs 形态图(A 和 B)及 vWF 免疫荧光鉴定图(C)
注:A、B.光镜图($\times 100$),A 为培养 24 h,B 为培养 7 d;C.激光共聚焦($\times 100$)。

3.2 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R rBMECs 存活率的影响

OGD/R 损伤后,细胞存活率明显降低($P<0.01$);与模型组比较,AST IV 与 PNS 不同剂量配伍均能减少细胞损伤,提高细胞存活率($P<0.05$, $P<0.01$)。与

AST IV+PNS 高剂量组比较,AST IV+PNS 低剂量组细胞存活率显著降低($P<0.01$)。详见表 1。

表 1 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R rBMECs 存活率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	细胞存活率/%
正常组	100.00 \pm 0.00
模型组	44.83 \pm 9.39 [#]
AST IV+PNS 低剂量组	58.50 \pm 7.97* $\Delta\Delta$
AST IV+PNS 中剂量组	71.33 \pm 8.19**
AST IV+PNS 高剂量组	74.83 \pm 9.154

注:与正常组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 AST IV+PNS 高剂量组比较, $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

3.3 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R rBMECs 跨内皮细胞电阻抗的影响

细胞贴壁生长至 80% 融合后,会显现较强的 TEER,提示细胞紧密连接良好,具有较强的屏障功能,AST IV 配伍 PNS 预处理并不能增强正常细胞的 TEER 值。与正常组比较,模型组细胞 TEER 值明显降低($P<0.01$),细胞屏障功能受损;与模型组比较,AST IV 与 PNS 不同剂量配伍均可显著增强 OGD/R 损伤细胞的 TEER 的水平($P<0.01$)。与 AST IV+PNS 高剂量组比较,AST IV+PNS 低剂量组 TEER 值降低($P<0.05$)。详见表 2。

3.4 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R rBMECs Occludin 和 ZO-1 蛋白表达情况

与正常组比较,模型组 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,AST IV 与 PNS 不同剂量配伍均可显著增强 ZO-1 蛋白的表达水平($P<0.05$, $P<0.01$),AST IV 与 PNS 中、高剂量配伍均可显著增强 Occludin 蛋白的表达水平($P<0.01$)。与 AST IV+PNS 高剂量组比较,AST IV+PNS 低剂量组 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。详见图 2、表 3。

表 2 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R rBMECs TEER 值的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	给药前 TEER 值	造模前 TEER 值	造模后 TEER 值
正常组	349.00 \pm 16.72	347.80 \pm 15.16	349.80 \pm 13.95
模型组	345.00 \pm 23.28	343.40 \pm 25.16	110.00 \pm 15.01 [#]
AST IV+PNS 低剂量组	349.00 \pm 13.42	360.60 \pm 8.73	150.00 \pm 16.41** Δ
AST IV+PNS 中剂量组	356.20 \pm 9.47	364.80 \pm 7.68	202.20 \pm 13.83**
AST IV+PNS 高剂量组	348.20 \pm 16.94	364.00 \pm 13.34	197.40 \pm 15.93**

注:与正常组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与 AST IV+PNS 高剂量组比较, Δ $P<0.05$ 。

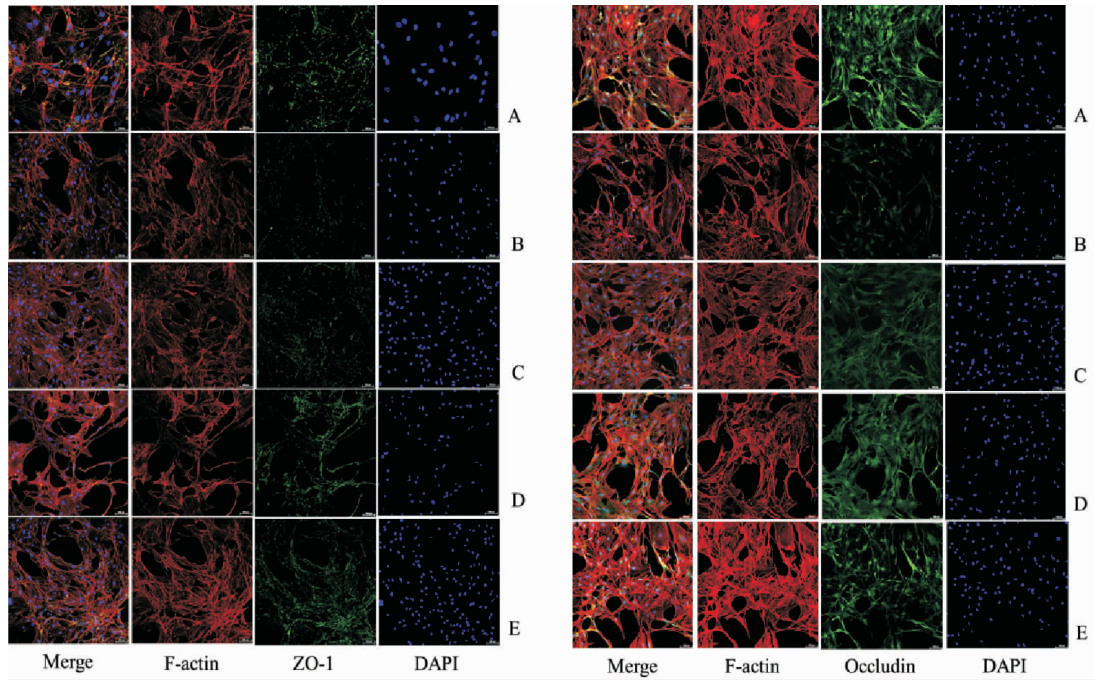


图 2 各组 Occludin 和 ZO-1 蛋白的荧光表达

注: A.正常组;B.模型组;C.AST IV+PNS 低剂量组;D.AST IV+PNS 中剂量组;E.AST IV+PNS 高剂量组。

表 3 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R rBMECs ZO-1、Occludin 蛋白表达情况($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	ZO-1 的平均荧光强度	Occludin 的平均荧光强度
正常组	6 468.00±1 497.17	9 248.40±975.42
模型组	2 731.20±547.40 ^{##}	4 943.60±843.98 ^{##}
AST IV+PNS 低剂量组	3 497.00±848.31* [△]	5 698.40±989.13 [△]
AST IV+PNS 中剂量组	4 405.20±800.30**	6 851.40±1 669.22**
AST IV+PNS 高剂量组	4 976.00±122.79**	7 756.80±491.81**

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 AST IV+PNS 高剂量组比较,[△] $P<0.05$ 。

3.5 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R rBMECs ICAM-1、VCAM-1 的蛋白表达情况

与正常组比较,模型组 ICAM-1、VCAM-1 的蛋白表达显著增强($P<0.01$);与模型组比较,AST IV 与 PNS 中、高剂量配伍均可显著降低 ICAM-1、VCAM-1 的蛋白表达水平($P<0.01$);与 AST IV+PNS 高剂量组比较,AST IV+PNS 低剂量组 ICAM-1、VCAM-1 的蛋白表达水平增高($P<0.05$)。详见图 3、表4。

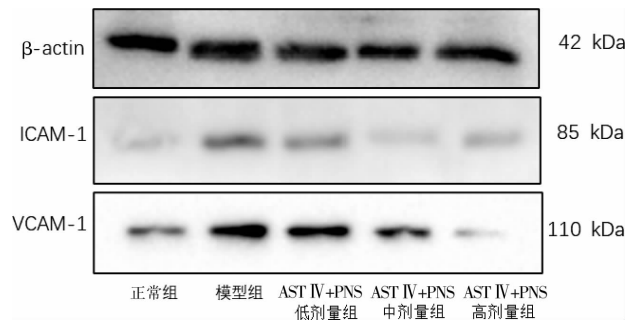


图 3 各组 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白条带图

表 4 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R rBMECs ICAM-1、VCAM-1 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	ICAM-1 的相对表达量	VCAM-1 的相对表达量
正常组	0.68±0.12	0.28±0.07
模型组	1.56±0.18 ^{##}	0.66±0.13 ^{##}
AST IV+PNS 低剂量组	1.19±0.29* [△]	0.35±0.12 [△]
AST IV+PNS 中剂量组	0.56±0.14**	0.24±0.08**
AST IV+PNS 高剂量组	0.55±0.27**	0.24±0.14**

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 AST IV+PNS 高剂量组比较,[△] $P<0.05$ 。

3.6 AST IV配伍PNS对OGD/R rBMECs细胞培养液中炎症因子TNF- α 及IL-1 β 表达水平的影响

与正常组比较,模型组TNF- α 及IL-1 β 的释放显著增强($P<0.01$);与模型组比较,AST IV与PNS不同剂量配伍均可减少TNF- α 及IL-1 β 的释放,减轻细胞炎症损伤($P<0.01$)。与AST IV+PNS高剂量组比较,AST IV+PNS低剂量组TNF- α 及IL-1 β 的表达水平增高($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表5。

表5 AST IV配伍PNS对OGD/R rBMECs细胞培养液中TNF- α 及IL-1 β 表达水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)
正常组	146.63±15.86	20.11±0.95
模型组	244.46±11.10 [#]	33.81±1.56 [#]
AST IV+PNS低剂量组	162.14±5.90 ^{**Δ}	27.43±1.73 ^{**$\Delta\Delta$}
AST IV+PNS中剂量组	126.96±5.27 ^{**}	25.65±1.07 ^{**}
AST IV+PNS高剂量组	134.66±9.21 ^{**}	14.04±0.85 ^{**}

注:与正常组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与AST IV+PNS高剂量组比较, ^{Δ} $P<0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.01$ 。

3.7 AST IV配伍PNS对OGD/R rBMECs细胞NF- κ B活化的影响

与正常组比较,模型组NF- κ B-p65和p-NF- κ B-p65蛋白的表达量显著增高($P<0.01$);与模型组比较,AST IV与PNS不同剂量配伍均可减少NF- κ B-p65和p-NF- κ B-p65蛋白的表达($P<0.01$)。与AST IV+PNS高剂量组比较,AST IV+PNS低剂量组NF- κ B-p65和p-NF- κ B-p65的表达水平增高($P<0.05$, $P<0.01$)。详见图4、表6。

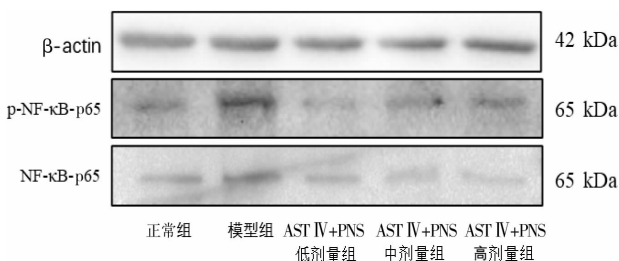


图4 各组NF- κ B-p65和p-NF- κ B-p65蛋白条带图

表6 AST IV配伍PNS对OGD/R rBMECs细胞p-NF- κ B-p65蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	NF- κ B-p65/ β -actin	p-NF- κ B-p65/NF- κ B-p65
正常组	0.34±0.02	0.24±0.02
模型组	0.53±0.06 [#]	0.48±0.02 [#]
AST IV+PNS低剂量组	0.36±0.01 ^{**Δ}	0.31±0.01 ^{**$\Delta\Delta$}
AST IV+PNS中剂量组	0.22±0.01 ^{**}	0.21±0.01 ^{**}
AST IV+PNS高剂量组	0.22±0.02 ^{**}	0.16±0.01 ^{**}

注:与正常组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与AST IV+PNS高剂量组比较, ^{Δ} $P<0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.01$ 。

4 讨论

随着全球人口老龄化速度的进一步加剧和人类饮食结构、生活方式的改变,脑卒中发病率呈逐年上升趋势,已成为全球第二大致死原因和我国第一大致死原因,其中80%以上归因于缺血性脑卒中^[9-10]。早期溶栓,建立再灌注被认为是最有效的治疗方法,然而再灌注后会导致BBB通透性增高、屏障功能严重受损,进而导致神经细胞水肿、坏死,造成不可逆性损伤。因此,BBB结构和功能的修护在脑缺血再灌注损伤的干预中显得尤为重要。

脑微血管内皮细胞是内覆于血管腔表面的连续单层扁平细胞,构成血液和组织细胞间的半通透性屏障,维持血管壁通透性和内环境稳定,与相邻内皮细胞膜上的紧密连接共同构成BBB的主要结构^[11-12]。紧密连接结构主要由内皮细胞膜上的咬合蛋白和细胞质内的紧密连接蛋白构成,两者在紧密连接结构功能上发挥着关键作用,决定着BBB通透性的严密性。Occludin蛋白是首个被分离出来的紧密连接跨膜蛋白,是紧密连接结构的基础组分,在维持紧密连接结构及BBB完整性上起着至关重要的作用;ZO-1可以通过调节紧密连接和黏附连接蛋白的相互作用来改变内皮的通透性。脑缺血再灌注损伤时,Occludin和ZO-1蛋白表达量显著降低,导致紧密连接结构解体、细胞间隙增大、微血管通透性升高^[13-15]。

正常情况下,血管内皮细胞中ICAM-1、VCAM-1的表达量很低,在缺血缺氧刺激下,血管内皮通透性增高,大量炎症因子渗出,刺激ICAM-1、VCAM-1表达量迅速升高^[16],故ICAM-1、VCAM-1的表达水平可评价血管内皮的屏障功能。NF- κ B作为转录调节因子,广泛存在于神经细胞及脑微血管内皮细胞中,在脑缺血损伤时被激活,促进炎症因子的大量释放,介导脑缺血损伤的炎症反应,因此,NF- κ B的激

活被认为是脑缺血后 BMECs 损伤的始动因素之一。

本研究用 OGD/R 体外诱导 rBMECs 损伤模型模拟脑缺血再灌注损伤,从跨内皮电阻抗水平、紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达水平、黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达水平、NF- κ B 活化水平及炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 的表达水平探讨益气活血组方中药 AST IV 配伍 PNS 对缺血再灌注后 rBMECs 屏障功能的修复作用及机制。

研究结果显示,OGD/R 损伤后,黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 的蛋白表达增强,p-NF- κ B-p65 表达水平及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达增强,导致 rBMECs 存活率明显降低,跨内皮细胞电阻抗明显降低、紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达降低,提示 OGD/R 后由于炎症因子的激活,炎性反应加剧,导致 BBB 结构和功能均受到不同程度的破坏。AST IV 与 PNS 不同剂量配伍能通过减少 ICAM-1 及 VCAM-1 的分泌、抑制 NF- κ B 的激活、降低炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 的表达,从而提高 OGD/R 损伤后 rBMECs 的存活率、增高跨内皮细胞电阻抗、上调 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平,降低脑缺血后脑微血管内皮细胞通透性,增强其屏障功能,保护微循环状态。

参考文献

- [1] JIANG X Y, ANDJELKOVIC A V, ZHU L, et al. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke[J]. *Progress in Neurobiology*, 2018, 163/164: 144-171.
- [2] KADRY H, NOORANI B, CUCULLO L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity[J]. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2020, 17(1): 69.
- [3] ABDULLAHI W, TRIPATHI D, RONALDSON P T. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: Targeting tight junctions and transporters for vascular protection[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2018, 315(3): C343-C356.
- [4] 李静娴, 杨筱倩, 唐 标, 等. 黄芪甲苷和三七总皂苷配伍抗大鼠脑缺血再灌注损伤及其药动学的研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(19): 3786-3794.
- [5] 杨筱倩, 丁 煌, 刘晓丹, 等. 冰片配伍黄芪甲苷和三七总皂苷促进脑缺血再灌注后神经修复作用的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(12): 5854-5859.
- [6] 丁 煌, 唐 三, 杨筱倩, 等. 冰片配伍黄芪甲苷与三七总皂苷对脑缺血/再灌注后血脑屏障通透性的影响[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(11): 1516-1523.
- [7] 李艳玲, 丁 煌, 杨芙蓉, 等. 黄芪甲苷配伍三七总皂苷对脑缺血大鼠 BMSCs 移植后血管新生的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(21): 73-79.
- [8] 刘晓丹, 丁 煌, 李艳玲, 等. 黄芪甲苷配伍三七总皂苷对 OGD/R 大鼠脑微血管内皮细胞增殖、凋亡及线粒体功能的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(4): 498-503.
- [9] COLLABORATORS G 2 S. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *The Lancet Neurology*, 2021, 20(10): 795-820.
- [10] 吴 琼, 王晨冉, 赵 燕, 等. 1990-2019 年中国卒中危险因素归因负担及变化趋势[J]. *中华疾病控制杂志*, 2022, 26(1): 28-33, 79.
- [11] 郭慕真, 朱晨笛, 蔡 倩, 等. PKC α / β 通过调控紧密连接蛋白参与百草枯致脑微血管内皮细胞的通透性异常[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2018, 36(12): 881-889.
- [12] FENG S, ZOU L, WANG H J, et al. RhoA/ROCK-2 pathway inhibition and tight junction protein upregulation by catalpol suppresses lipopolysaccharide-induced disruption of blood-brain barrier permeability[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2371.
- [13] ZHANG Y, LI X F, QIAO S S, et al. Occludin degradation makes brain microvascular endothelial cells more vulnerable to reperfusion injury in vitro[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2021, 156(3): 352-366.
- [14] 段艳茹, 杜芸辉, 刘慧荣. 闭合蛋白(occludin)在血管内皮损伤中的研究进展[J]. *生理学报*, 2021, 73(6): 931-939.
- [15] ZHANG S, AN Q E, WANG T F, et al. Autophagy-and MMP-2/9-mediated reduction and redistribution of ZO-1 contribute to hyperglycemia-increased blood-brain barrier permeability during early reperfusion in stroke[J]. *Neuroscience*, 2018, 377: 126-137.
- [16] 张晋霞, 张志勇, 张 蕊, 等. 白藜芦醇后处理对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障和 ICAM-1、VCAM-1 的影响[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2021, 18(6): 39-41.

(本文编辑 苏 维)