

补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的影响

王新高¹, 童萼塘², 孙圣刚²

(1. 首都医科大学附属北京天坛医院神经内科, 北京市 100050;

2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科, 武汉市 430022)

[关键词] 神经病学; 脑缺血再灌注损伤; 血脑屏障; 补阳还五汤; 基质金属蛋白酶 9

[摘要] 目的 观察补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的影响并探讨其影响机制。方法 48 只 SD 大鼠随机分为 3 组: 假手术组 ($n=16$); ④对照组 ($n=16$); ④补阳还五汤组 ($n=16$)。线栓法制作大鼠脑缺血再灌注模型, 再灌注 48 h 后干湿重法测定缺血脑组织含水量, 经股静脉注射伊文思蓝观察血脑屏障的通透性, 取缺血脑组织提取总 RNA 和蛋白质分别应用逆转录聚合酶链反应和 Western 杂交技术检测基质金属蛋白酶 9 的转录及表达情况, 同时电镜观察血脑屏障的变化。结果 脑缺血再灌注 48 h, 对照组缺血侧脑含水量明显升高, 伊文思蓝含量也明显增加, 电镜观察发现血脑屏障破坏严重, 基质金属蛋白酶 9 的转录与表达也较假手术组显著增加; 而应用补阳还五汤处理的大鼠其缺血脑组织含水量明显减少, 缺血侧伊文思蓝含量较对照组也明显降低 ($P<0.05$), 同时电镜观察到血脑屏障的破坏减轻, 而基质金属蛋白酶 9 mRNA 和蛋白表达水平也明显低于对照组。结论 对大鼠脑缺血再灌注损伤后的血脑屏障具有保护作用, 其作用机制可能是通过抑制基质金属蛋白酶 9 的转录和表达来实现的。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Effect of Buyang Huanwu Decoction on Blood Brain Barrier after Cerebral Ischemia and Reperfusion Injuries in Rats

WANG Xin-Gao¹, TONG E-Tang², and SUN Sheng-Gang²

(1. Department of Neurology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050. 2. Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College of HUST, Wuhan 430022, China)

[KEY WORDS] Cerebral Ischemia and Reperfusion Injuries; Blood-Brain Barrier; Buyang Huanwu Decoction; Matrix Metalloproteinase-9

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of Buyang Huanwu Decoction on blood-brain barrier of cerebral ischemia and reperfusion rats, and explore the mechanism of the decoction. Methods 48 normal male SD rats were distributed randomly to 3 groups: Sham operation ($n=16$); ④Control ($n=16$); ④Buyang Huanwu Decoction ($n=16$). Cerebral ischemia and reperfusion rat models were made using the method of thread inserting right middle cerebral artery occlusion (MCAO). The brain water content were measured 48 h after reperfusion. At the same time, The permeability of blood-brain barrier was observed with electron microscope and by detecting the content of Evans Blue leaked out the brain tissue of ischemic side. The expression of MMP-9 in different groups was detected by Western Blotting. The transcription of MMP-9 mRNA was detected by RT-PCR.

Results 48 h After cerebral ischemia and reperfusion injuries, the content of brain water and Evans Blue leaked out the brain tissue of ischemic side increased obviously. The breakdown of blood-brain barrier was severe on electron microscope, the transcription and expression of MMP-9 also increased obviously. However, Buyang Huanwu Decoction can subtract the content of brain edema ($P<0.05$) and Evans blue ($P<0.01$), relieve the breakdown of blood-brain barrier on electron microscope. The transcription and expression of MMP-9 were decreased in BYHWD group contrasted with control group ($P<0.05$). Conclusion BYHWD has the protective effect on BBB in the model rats of cerebral ischemia and reperfusion injuries. The mechanism may be by restraining the expression and transcription of MMP-9.

Conclusion BYHWD has the protective effect on BBB in the model rats of cerebral ischemia and reperfusion injuries. The mechanism may be by restraining the expression and transcription of MMP-9.

临床研究表明, 超早期溶栓是治疗急性脑梗死的最有效方法, 但溶栓后再灌注所造成的损伤却大大限制了溶栓疗法的广泛应用。再灌注损伤涉及到

多方面的机制, 细胞外蛋白水解酶的激活是其中之一。近年研究发现, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 在脑缺血再灌注脑损伤中起重要作用。缺血后脑组织 MMP-9 表达增高是血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 损伤和加重缺血性脑损伤的重要机制之一。补阳还五汤 (Buyanghuanwu Decoction, BYHWD) 系清代名医王清任所创, 我们前期研究结果显示有良好的脑保护作用, 但这种脑保护作用是否与 MMP-9 有关, BYHWD 是否能通过影响

[收稿日期] 2004-08-26 [修回日期] 2005-06-08

[作者简介] 王新高, 医学博士, 主治医师, 主要从事脑血管病的基础与临床研究; 联系电话 010-67423480, E-mail 为 wangxingao1@163.com 或 wangxingao1@126.com。童萼塘, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脑血管病和帕金森病的研究。孙圣刚, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脑血管病和帕金森病的研究。

MMP-9 的表达而减轻 BBB 的破坏? 为此, 我们进行了研究。

1 材料与方法

1.1 受试药物

补阳还五汤 (BYHWD) 为黄芪、赤芍、当归、地龙、川芎、红花、桃仁按原方比例 12: 1: 1: 1: 1: 1 组成, 购于协和医院门诊中药房。水煎制成浓缩剂, 使生药浓度为 1 kg/L, 于冰箱中保存备用。

1.2 动物及分组

成年雄性 SD 大鼠 48 只, 体重为 220~ 260 g (华中科技大学同济医学院实验动物中心提供), 随机分为 3 组: 假手术组 ($n=16$) 和对照组 ($n=16$) 动物每日灌服生理盐水 4 mL/kg, 连续 5 d; BYHWD 组 ($n=16$) 动物根据前期研究结果用 10 g/kg 药液^[1]连续灌胃 5 d; 第 6 d 分别进行下面实验。

1.3 大鼠脑缺血再灌注损伤过程

大鼠经 10% 水合氯醛 (350 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉后, 作颈正中切口, 依次暴露右颈动脉, 结扎右颈外动脉、翼腭动脉及颈总动脉远端, 夹闭颈内动脉, 然后在颈外动脉近分叉处剪一小口并插入丝线 (线端预先用清漆处理, 直径 0.30~ 0.35 mm), 松开动脉夹, 缓慢向颈内动脉插进丝线, 当进线约 18±1 mm 时, 可感轻微阻力, 提示丝线已阻塞大脑中动脉, 用缝线在颈内动脉起始端结扎固定丝线, 逐层缝合手术切口, 丝线残端约 5 mm 暴露于外备用。线栓 90 min 后, 抽出进行再灌注。对照组及 BYHWD 组于大鼠清醒后及第 2 d 分别继续灌胃, 假手术组丝线只插至颅底而不阻塞大脑中动脉, 余处理同对照组。手术过程及动物苏醒期间, 以 60 W 灯泡维持体温在 37℃ 左右。

1.4 脑含水量测定

于脑缺血再灌注后 48 h 每组处死 6 只大鼠, 快速断头取脑, 将大脑半球分开, 以干湿重法测量缺血侧含水量。取出脑立即测湿重, 然后置 110℃ 电烤箱 24 h, 再迅速测干重。脑含水量 (%) = $100 \times (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重}$ 。

1.5 缺血脑组织伊文思蓝含量的测定

每组取 6 只大鼠, 于再灌注 47 h 经股静脉注射 2% 伊文思蓝 (Evans Blue, EB) 2 mL/kg 体重, 1 h 后迅速断头取脑, 分开大脑半球, 去除蛛网膜、血凝块及脑室脉络丛, 置已知体积的甲酰胺中, 测量脑体积。继续加甲酰胺至脑体积的 5 倍, 置 37℃ 水浴 48 h 后在波长 632 nm 处测定光密度值。甲酰胺作空白比

色, 根据标准曲线计算出 EB 含量 (mg/L)。脑 EB 含量为上述值的 5 倍 ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$ 体积)。

1.6 脑组织蛋白的提取和定量测定

每组取 4 只大鼠, 于再灌注 48 h 后, 深度麻醉切下右侧大脑中动脉供应的脑组织置于 3 倍体积匀浆缓冲液中 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L EDTA, 100 mg/L PMSF, Leupeptin 2 mg/L, Aprotinin 2 mg/L)。低温下匀浆, 4℃ 静置 20 min 后, 12 kr/min 离心 20 min, 取中间上清液, 用 ELISA Kit 测定蛋白浓度, 各取上样量 100 μg 加 2×SDS 上样缓冲液 (总体积为 20 μL) 经 95℃ 变性 5 min 后置 -20℃ 冰箱保存。

1.7 脑组织基质金属蛋白酶 9 蛋白表达的测定

将提取的蛋白等量加样, 经 10% SDS-8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (60 V 电压) 结束后, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。转膜后的硝酸纤维素膜经漂洗后用 5% 脱脂奶粉阻断非特异性结合, 然后用 1:200 的山羊抗大鼠 MMP-9 多克隆抗体和 1:1000 的兔抗山羊 HRP (Santa Cruz) 先与硝酸纤维素膜上的蛋白质进行反应, 然后在暗室中用化学发光法显影。高敏感胶片 (Sigma) 摄片、洗片。设立阴性对照组 (不加一抗)。测定 Western Blot 蛋白带光密度 (OD) 值。

1.8 脑组织基质金属蛋白酶 9 mRNA 的检测

右侧脑组织取距额极 4~ 6 mm 的脑片, -70℃ 冻存。按 Trizol 试剂盒 (Gibco 公司) 说明书进行。取冻存脑组织约 0.15 g 置试管中匀浆后室温放置 5 min, 分装于 1.5 mL EP 管中, 每管 1 mL 加入 0.2 mL 氯仿, 强力震荡 15 s 后, 4℃, 12 kr/min 离心 15 min, 收取上层液相, 加入 0.5 mL 异丙醇, 混匀, 12 kr/min 离心 10 min, 弃上清后风干, 加入 15 μL DEPC 使 RNA 溶解, 各取 0.5 μL 用紫外分光光度计测定细胞总 RNA 浓度。取 8 μg 总 RNA 进行 RT-PCR 反应。逆转录反应体系体积为 15 μL , MMP-9 上游引物为 5'-GGT CCC CCC ACT GCT GGC CCT TCT ACG GCC-3', 下游引物为 5'-GTC CTC AGG GCA CTG CAG GAT GTC ATA GGT-3', PCR 反应条件为 94℃ 45 s[→] 58℃ 60 s[→] 72℃ 90 s, 72℃ 延伸 7 min, 30 个循环, 产物片段为 540 bp。内参照 β -actin 正义引物为 5'-ACT CCT ACG T-G GGC GAC GAG-3', 反义引物为 5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GGC-3', 扩增片段为 400 bp。RT-PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 (100 V 1 h), 溴化已啶染色, 以 Sximage 软件进行密度扫描。mRNA 水平以 PCR 产物的光密度与内参照光密度之比表示。

1.10 电镜观察血脑屏障的改变

每组取 2 只大鼠,于再灌注 48 h 后断头取脑,用薄刀片切取距前囟 4~5 mm,中线旁开 3~4 mm,大小为 1 mm³ 的缺血周边脑组织标本,经 2.5% 戊二醛固定,梯度酒精脱水,Epon 包埋后制成超薄切片,在透射电镜下观察 BBB 的超微结构。

1.11 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠脑含水量的比较

大鼠脑含水量如表 1(Table 1) 所示。可见补阳还五汤能明显减少脑缺血再灌注大鼠缺血侧的脑含水量,与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

表 1. 各组大鼠脑含水量及伊文思蓝含量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of brain water content and Evans Blue leaked out brain tissue in three groups rats

分 组	n	脑含水量 (%)	EB 含量 ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)
假手术组	6	79.28% \pm 4.57%	3.12 \pm 0.65
对照组	6	88.72% \pm 5.02%	15.87 \pm 3.96
BYHWD 组	6	82.52% \pm 4.51% ^a	12.13 \pm 3.04 ^{ad}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; d 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较。

2.2 补阳还五汤对大鼠血脑屏障通透性的影响

如表 1(Table 1) 所示。脑缺血再灌注 48 h, 对照组及 BYHWD 组缺血侧大脑半球脑组织 EB 含量明显高于假手术组脑组织 ($P < 0.01$), 而 BYHWD 组脑组织 EB 含量较对照组明显降低 ($P < 0.05$), 提示 BYHWD 对血脑屏障有保护作用。

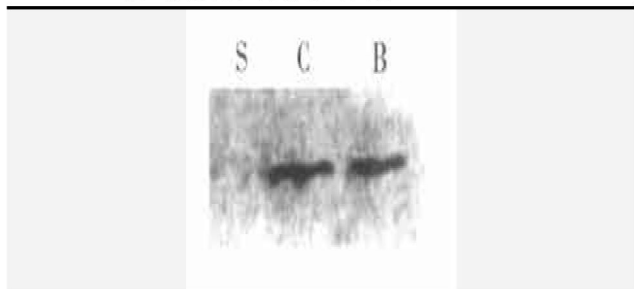


图 1. 各组大鼠脑组织基质金属蛋白酶 9 蛋白的表达 (Western Blot) S 为假手术组, C 为对照组, B 为 BYHWD 组。

Figure 1. The expression of MMP-9 protein in the brain tissue of three groups rats (detected by Western Blot)

2.3 大鼠脑组织基质金属蛋白酶 9 蛋白表达

如图 1 (Figure 1) 及表 2 (Table 2) 所示, 假手术组脑组织 MMP-9 蛋白表达很低, 脑缺血再灌注 48 h

后, 对照组缺血侧蛋白表达明显增加, 而 BYHWD 组较对照组蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.01$)。

2.4 大鼠脑组织基质金属蛋白酶 9 mRNA 含量

如图 2 (Figure 2) 及表 2 (Table 2) 所示, 假手术组大鼠脑组织 MMP-9 mRNA 表达水平很低, 脑缺血再灌注 48 h 后, 对照组缺血侧脑组织 MMP-9 mRNA 转录水平显著增高, BYHWD 组能明显抑制 MMP-9 mRNA 的转录水平 ($P < 0.05$)。

表 2. 各组大鼠脑组织基质金属蛋白酶 9 基因转录及蛋白表达的比较

Table 2. Comparison of the transcription and expression of MMP-9 in brain tissue of three groups rats

分 组	n	MMP-9 蛋白 (OD 值)	MMP-9 mRNA
假手术组	4	1.5	0.05
对照组	4	68	0.69
BYHWD 组	4	47 ^a	0.48 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

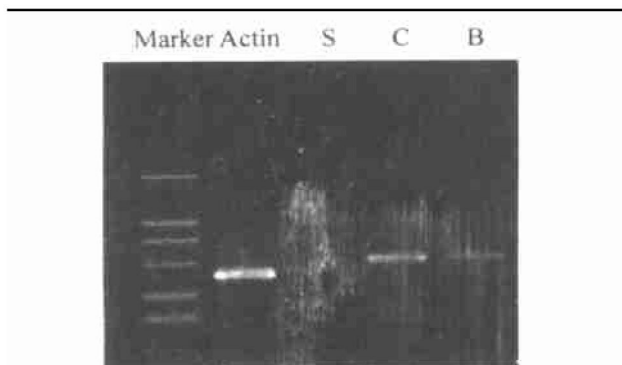


图 2. 各组大鼠脑组织基质金属蛋白酶 9 mRNA 水平 (RT-PCR) S 为假手术组, C 为对照组, B 为 BYHWD 组

Figure 2. Contents of the MMP-9 mRNA in brain tissue of three groups (detected by RT-PCR)

2.5 各组大鼠大脑皮层血脑屏障的变化

如图 3 (Figure 3) 所示, 假手术组大脑中动脉供应的大脑皮层区域 BBB 完好, 毛细血管周围无水肿。脑缺血再灌注 48 h 后的大鼠大脑皮层区 BBB 破坏严重, 毛细血管周围大片水肿, 而 BYHWD 组, BBB 破坏减轻, 毛细血管周围水肿减轻。

3 讨论

实验发现, 脑缺血再灌注 48 h 后, 渗漏到血管外的 EB 含量较对照组明显增加, 电镜观察到毛细血管周围有大片水肿, 提示 BBB 的通透性显著增加, 引起了血管源性脑水肿^[2]。而应用 BYHWD 后,

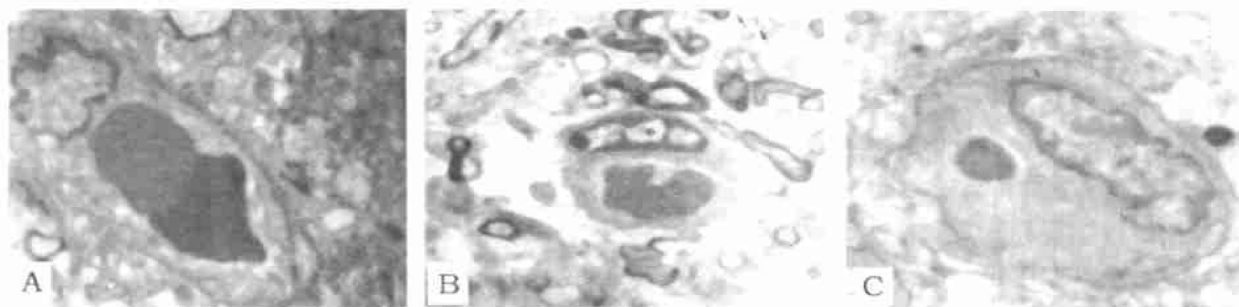


图3. 透射电子显微镜观察到的各组大鼠血脑屏障的破坏情况 A为假手术组,可见BBB完好($\times 4\,000$);B为对照组,可见BBB破坏严重,毛细血管周围大片水肿($\times 5\,000$);C为BYHWD组,可见BBB破坏减轻,毛细血管周围水肿减轻($\times 6\,300$)。

Figure 3. The breakdown of BBB on electron microscope in each group

缺血脑组织EB含量减少($P < 0.01$),毛细血管周围的水肿也减轻,提示BYHWD有保护BBB的作用。

补阳还五汤中黄芪、地龙具有利尿消肿作用,这可能与BYHWD保护血脑屏障,减轻脑水肿的作用相关。研究发现,脑缺血再灌注后,导致BBB结构或功能的完整性损伤,通透性增加,以基底膜损伤最为重要^[3]。近年的研究显示蛋白水解酶特别是基质金属蛋白酶在缺血早期BBB损害中起重要作用^[4]。

基质金属蛋白酶(MMP)是一组含 Zn^{2+} 的依赖 Ca^{2+} 的能降解或修饰细胞外基质的蛋白酶,在正常状态下其活性被控制在较低水平。在一些生理和病理条件下,活性明显增加,参与组织的损伤和修复。在脑缺血再灌注损伤中,起重要作用的是MMP-9。MMP-9也称明胶酶B,主要由脑血管内皮细胞合成。近年来,人们对MMP-9在脑缺血中的作用日益关注。Rosenberg等^[5]梗死半球MMP-9较对侧半球明显增加($P < 0.05$),此时血管源性水肿达高峰。而Romanic等^[6]则发现静脉内应用MMP-9的单克隆抗体(3 mg/kg),梗死灶缩小了29.9%($P < 0.05$)。因而人们设想,抑制MMP-9的表达及活性可保护BBB,减轻血管源性水肿,减小梗塞灶,有望成为一种治疗脑缺血的新手段。

本实验用Western Blotting技术和RT-PCR方法检测了脑缺血再灌注48 h后缺血脑组织MMP-9的蛋白表达和基因转录情况。假手术组脑组织只有极少量基因转录,蛋白表达几乎检测不到。再灌注48 h,mRNA和蛋白表达量显著增加,应用BYHWD干预后,二者水平均下降,BYHWD组能抑制MMP-9蛋白表达水平的31%,与BBB的结果基本一致,提示BYHWD可通过基因转录水平的调节而抑制MMP-9的蛋白表达,从而保护BBB,减轻脑水肿。

补阳还五汤保护BBB的作用可能是多方面的。

她能够抑制缺血再灌注后脑组织丙二醛的升高,同时提高谷胱甘肽过氧化物酶的活性,提示其有对抗自由基毒性的作用。^[7]因此认为,BYHWD保护BBB的作用可能与其能对抗自由基毒性,减轻自由基对内皮细胞的直接损伤密切相关。脑缺血再灌注损伤的机制极为复杂,涉及到很多方面^[8]。本研究结果表明,补阳还五汤对大鼠脑缺血一再灌注后BBB具有保护作用,其机制可能与抑制MMP-9的基因转录和蛋白表达有关。另外由于BYHWD有抗自由基的毒性作用,可使脑血管内皮细胞、基底膜免受自由基直接攻击,从而保护BBB,因此如何正确评价BYHWD的这些作用,自由基与MMP-9的关系如何,我们将在今后的研究中作深入探讨。

[参考文献]

- [1] 王新高, 童萼塘, 孙圣刚. 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤的保护作用. 浙江中西医结合杂志, 2005, 15 (1): 4-7
- [2] Montaner J, Fernandez-Cadenas I, Molina CA, Monasterio J, Arenillas JF, Ribo M, et al. Safety profile of tissue plasminogen activator treatment among stroke patients carrying a common polymorphism (C-1562T) in the promoter region of the matrix metalloproteinase-9 gene. *Stroke*, 2003, 34 (12): 2 851-855
- [3] Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*, 1995, 26 (11): 2 120-126
- [4] Lee SR, Lo EH. Induction of caspase-mediated cell death by matrix metalloproteinases in cerebral endothelial cells after hypoxia/reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24 (7): 720-727
- [5] Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology*, 1997, 48 (4): 921-926
- [6] Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke*, 1998, 29 (5): 1 020-030
- [7] 邓常青, 刘志龙, 葛金文, 彭延古, 李安国, 肖苏红. 补阳还五汤抗脑缺血再灌注损伤作用机理的研究. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4 (8): 32-35
- [8] Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med*, 2000, 36 (5): 483-506

(此文编辑 胡必利)