

片仔癀保护小鼠局灶性脑缺血再灌注后血脑屏障的分子机制研究

高骁君 田 珊 管 敏 刘 顺

(南京中医药大学附属医院, 江苏省中医院, 江苏南京 210029)

摘 要 目的:探讨片仔癀对局灶性脑缺血再灌注小鼠血脑屏障(BBB)的保护作用及其分子机制。方法:雄性C57BL/6J小鼠随机分为假手术组、模型组、丁苯酞组(120 mg/kg)、片仔癀低剂量组(370 mg/kg)、片仔癀高剂量组(740 mg/kg)和片仔癀(740 mg/kg)+LY294002(20 mg/kg)组,除假手术组以外,其余各组小鼠采用线栓法建立大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)模型,假手术组不插入线栓。再灌注后2 h,各给药组分别灌胃给予相应药物(LY294002采用腹腔注射),假手术组与模型组同期灌胃等量生理盐水,各组均每日给药1次,连续3 d。末次给药后2 h,各组分别取8只小鼠进行神经功能缺陷评分,评分结束后,处死小鼠取脑,采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法观察脑梗死情况并计算脑梗死率;各组分别取3只小鼠,处死取脑,苏木素-伊红(HE)染色,观察脑组织病理学改变;各组分别取6只小鼠,采用伊文思蓝(EB)法检测BBB通透性;各组分别取6只小鼠,分离缺血侧大脑皮层组织,其中3只小鼠提取总蛋白,采用Western blot法检测磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、磷酸化糖原合酶激酶-3 β (p-GSK3 β)、胞质紧密粘连蛋白1(ZO-1)和闭合蛋白5(Claudin-5)的表达水平,另3只提取核蛋白用于检测 β -连环蛋白(β -catenin)的核转位水平。结果:模型组小鼠的神经功能缺陷评分、脑梗死率均显著高于假手术组($P<0.01$),丁苯酞组及片仔癀高剂量组小鼠上述指标均显著低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$),片仔癀低剂量组小鼠脑梗死率显著低于模型组($P<0.01$),片仔癀+LY294002组上述指标与模型组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),其中神经功能缺陷评分显著高于片仔癀高剂量组($P<0.05$)。HE染色后脑组织病理变化提示,模型组小鼠缺血区脑组织水肿,神经元胞体变性;片仔癀高剂量组和丁苯酞组小鼠脑组织神经元变性坏死明显减轻;片仔癀+LY294002组小鼠脑组织病理改变较片仔癀高剂量组明显加重。模型组小鼠脑组织EB渗漏量显著高于假手术组($P<0.01$),丁苯酞组、片仔癀高剂量组EB渗漏量显著低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$),片仔癀+LY294002组EB渗漏量显著高于片仔癀高剂量组($P<0.01$),且与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组小鼠缺血侧大脑皮层p-Akt、p-GSK3 β 、ZO-1、Claudin-5蛋白表达水平及 β -catenin核转位水平均较假手术组显著降低($P<0.01$),丁苯酞组及片仔癀低、高剂量组小鼠上述指标均显著高于模型组($P<0.05$, $P<0.01$),其中片仔癀高剂量组对上述指标的改善更为明显,片仔癀+LY294002组上述指标与模型组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),且均显著低于片仔癀高剂量组($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:片仔癀对MCAO/R小鼠的BBB完整性具有保护作用,其机制可能与激活Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路,上调ZO-1和Claudin-5的表达有关。

关键词 缺血性脑卒中;片仔癀;血脑屏障;紧密连接蛋白;Akt/GSK3 β / β -catenin通路

基金项目 江苏省自然科学基金面上项目(BK20211395)

2019年,我国有近219万人死于脑卒中,在收治的340万卒中患者中,缺血性脑卒中约占82.6%^[1]。恢复缺血区血流再通是缺血性脑卒中的首要治疗手段,然而血流再灌注亦会造成血脑屏障(blood brain barrier, BBB)损伤,加重脑损伤和神经功能障碍,因此保护BBB的完整性可作为治疗缺血性脑卒中的治疗靶点^[2]。

片仔癀是由牛黄、蛇胆、麝香、三七等中药经发酵制成的中成药,常用于病毒性肝炎、痈疽疔疮及各种炎症的治疗。已有文献报道,片仔癀可显著改善

局灶性脑缺血再灌注大鼠的神经功能缺损,减少脑梗死体积^[3-4]。然而,片仔癀对缺血再灌注后BBB完整性的保护作用及其分子机制尚未见报道。BBB的功能依赖于内皮细胞间的紧密连接蛋白,如胞质紧密粘连蛋白1(ZO-1)和闭合蛋白5(Claudin-5),糖原合酶激酶-3 β (GSK3 β)/ β -连环蛋白(β -catenin)通路的激活可促进紧密连接蛋白的表达,而GSK3 β 作为通路的负向调控因子,其活性受到上游蛋白激酶B(Akt)活性的调控^[5-8]。本研究制备小鼠大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)模型,探索片仔癀对脑

缺血再灌注损伤后脑梗死率、BBB通透性的调控作用,以及对Akt/GSK3 β / β -catenin通路活化和紧密连接蛋白ZO-1、Claudin-5表达的调控作用,探讨片仔癀对脑缺血再灌注损伤后BBB的保护作用及其潜在的分子机制,为片仔癀应用于中枢神经系统疾病的治疗奠定实验基础。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级健康成年雄性C57BL/6J小鼠,体重(23 $\pm$ 2)g,购于南通大学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(苏)2019-0001。小鼠于温度25℃、湿度60%~70%、光暗比12h/12h的环境中适应性饲养7d,自由摄食饮水。本实验经江苏省中医院实验动物伦理委员会审议批准,动物使用许可证号:SYXK(苏)2017-0069。

1.2 药物与试剂 片仔癀(批号2109161),漳州片仔癀药业股份有限公司;丁苯酞(批号B304122),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;异氟烷(批号R510),深圳市瑞沃德生命科技有限公司;LY294002(批号S1105),Selleck生物科技有限公司;MCAO线栓(批号L3800),北京西浓科技有限公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,批号T8170)、核蛋白提取试剂盒(批号T8877)、全蛋白提取试剂盒(批号T8877)、BCA蛋白定量检测试剂盒(批号PC0020),北京索莱宝科技有限公司;ECL发光液(批号A38555),赛默飞世尔科技公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号KGA224),江苏凯基生物技术股份有限公司; β -catenin一抗(批号17565-1-AP)、ZO-1一抗(批号21773-1-AP),武汉三鹰生物技术有限公司;p-Akt一抗(批号#4060)、Akt一抗(批号#4691)、p(Ser9)-GSK3 β 一抗(批号#9322)、GSK3 β 一抗(批号#9315),赛信通生物试剂有限公司;Claudin-5一抗(批号ab131259)、Histone H3一抗(批号ab1791)、 β -actin一抗(批号ab8226),艾博抗贸易有限公司;伊文思蓝(EB,批号D10878),北京沃凯生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 R500小动物气体麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),XTL-165-XTWZ万向支架体视显微镜(凤凰光学股份有限公司),BS224型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),HW-1000超级恒温水浴箱(成都泰盟科技有限公司),BX53正置生物显微镜(奥林巴斯有限公司),WG2003台式干燥箱(重庆万达有限公司),TGL-18M型高速冷冻离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司),Criterion™电泳槽(Bio-Rad公司),Trans-Blot®转印槽(Bio-Rad公司),Tanon 6600发光成像工作站(Tanon公司),Infinite M200 Pro全波长

酶标仪(TECAN公司),Chemidoc XRS+化学发光系统(Bio-Rad公司)。

2 实验方法

2.1 分组与造模 将小鼠随机分为假手术组和造模组。造模组按照CHIANG T等^[9]的线栓法建立小鼠MCAO/R模型,缺血1h后移除线栓,形成再灌注;假手术组不插入线栓,其余手术操作与造模组一致。造模组再灌注1h后进行神经功能缺陷评分^[10],评分为2~3分的小鼠为造模成功。将造模成功的小鼠随机分为模型组、丁苯酞组(120 mg/kg)、片仔癀低剂量组(370 mg/kg)、片仔癀高剂量组(740 mg/kg)和片仔癀(740 mg/kg)+LY294002(20 mg/kg)组,每组23只,假手术组亦取23只。

2.2 药物配制及给药方法 以0.5%羧甲基纤维素钠水溶液将片仔癀配制成浓度分别为74.0 mg/mL、37.0 mg/mL的均匀混悬液,将阳性对照药丁苯酞配制浓度为12.0 mg/mL的药液;按产品说明将Akt抑制剂LY294002配制浓度为2 mg/mL的澄清溶液。药物剂量均根据成人临床用量按人-小鼠体表面积系数折算^[11]。各给药组于再灌注后2h给药,片仔癀、丁苯酞给药容积均为0.1 mL/10 g,灌胃给药,LY294002按0.1 mL/10 g腹腔注射给药,假手术组和模型组同时期开始每日灌胃给予等体积生理盐水,各组均每日给药或生理盐水1次,连续3 d。

2.3 观察指标

2.3.1 神经功能缺陷评分 末次给药后2h,各组分别取8只小鼠,按照文献[10]报道的5分制法对小鼠进行神经功能缺陷评分,分值越高表明神经功能缺陷越严重。

2.3.2 脑梗死率 神经功能缺陷评分结束后,以颈椎脱臼法对同一批小鼠进行安乐死,取脑,将脑组织沿冠状面切为5片,浸没于含2%TTC的溶液中,37℃温育15 min,其中梗死区呈现苍白色,非缺血区呈现鲜红色。按公式计算脑梗死率^[12]:脑梗死率(%)=(非缺血侧半球面积-缺血侧半球正常区面积)/(2 $\times$ 非缺血侧半球面积) $\times$ 100%。

2.3.3 脑组织病理形态 末次给药后2h,各组分别取3只小鼠进行麻醉,剪开胸腔,暴露心脏,将灌注针插入左心室,再将右心耳剪破,先后以100 mL 37℃的0.9%NaCl注射液和50 mL 4℃的4%多聚甲醛溶液进行心脏灌流,以去除脑中血细胞并固定脑组织,灌流至动物全身僵硬、肝脏发白后,断头取脑包埋,制备4 μ m切片,HE染色。使用正置显微镜($\times$ 100)对切片的皮层区域进行观察,细胞核呈蓝色,胞浆呈红色,其他成分呈深浅不同的红色。

2.3.4 BBB通透性 末次给药后2 h, 各组分别取6只小鼠进行麻醉, 自小鼠股静脉注入3%的EB溶液(20 μ L/10 g体重), 1 h后以100 mL 0.9%NaCl注射液进行心脏灌注, 断头取脑称重, 加入甲酰胺(0.5 mL/0.2 g脑组织), 匀浆, 取上清检测吸光度(OD 632 nm), 根据标准曲线计算脑组织EB渗漏量, 以此评估BBB通透性。

2.3.5 缺血大脑皮层p-Akt、p-GSK3 β 、ZO-1和Claudin-5的表达及 β -catenin的核转位水平 末次给药后2 h, 各组分别取6只小鼠, 分离缺血侧大脑皮层组织, 其中3只小鼠用于提取总蛋白(检测p-Akt、p-GSK3 β 、ZO-1和Claudin-5的表达水平), 另外3只小鼠用于提取核蛋白(检测 β -catenin的核转位水平)。BCA法测定蛋白浓度, 加入适当量的蛋白上样缓冲液混匀、变性、上样。每孔上样20 μ g蛋白, 经电泳、转膜、封闭、抗体孵育、ECL显影后, 使用Image J定量分析蛋白表达水平, 以目的蛋白与参比蛋白的灰度比进行量化(其中以Akt作为p-Akt的参比蛋白, 以GSK3 β 作为p-GSK3 β 的参比蛋白, 以Histone H3作为核内 β -catenin的参比蛋白, 以 β -actin作为ZO-1和Claudin-5的参比蛋白)。

2.4 统计学方法 使用SPSS 22.0统计学软件对数据进行分析。满足正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时采用Tukey事后检验对组间数据进行两两比较, 方差不齐时引入Welch校正后用Games-Howell检验进行两两比较。不满足正态分布的计量资料以中位数和四分位数[M(P25, P75)]表示, 采用非参数检验进行组间比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组小鼠神经功能缺陷评分、脑梗死率比较 造模成功后小鼠随机分组, 模型组与各给药组小鼠神经功能缺陷评分比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

末次给药后2 h, 假手术组小鼠未见神经功能缺陷, 也未出现脑梗死; 模型组小鼠神经功能缺陷评分、脑梗死率均显著高于假手术组($P < 0.01$); 丁苯酞组和片仔癀高剂量组小鼠神经功能缺陷评分、脑梗死率均显著低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 片仔癀低剂量组脑梗死率显著低于模型组($P < 0.01$); 片仔癀+LY294002组上述指标与模型组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$), 其中神经功能缺陷评分显著高于片仔癀高剂量组($P < 0.05$)。各组小鼠神经功能评分、脑梗死率比较详见表1, 脑组织梗死情况见图1。

3.2 各组小鼠脑组织病理变化 见图2。假手术组小鼠脑皮层区域神经元组织形态和结构未见异常,

表1 各组小鼠神经功能缺陷评分、脑梗死率比较

组别	动物数/只	神经功能缺陷评分[M(P25, P75)]/分	脑梗死率($\bar{x} \pm s$)/%
假手术组	8	0(0, 0)	-
模型组	8	2(2, 2) ^{△△}	31.36 $\pm$ 4.59 ^{△△}
丁苯酞组	8	1(1, 1) [*]	14.75 $\pm$ 3.64 ^{**}
片仔癀低剂量组	8	1(1, 2)	23.07 $\pm$ 5.63 ^{**}
片仔癀高剂量组	8	1(1, 1) ^{**}	18.62 $\pm$ 2.85 ^{**}
片仔癀+LY294002组	8	2(1.5, 2) ^{\$}	24.24 $\pm$ 7.43

注: 与假手术组比较, $\triangle \triangle P < 0.01$; 与模型组比较, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与片仔癀高剂量组比较, $^{\$} P < 0.05$; 与丁苯酞组比较, $^{\&} P < 0.05$ 。

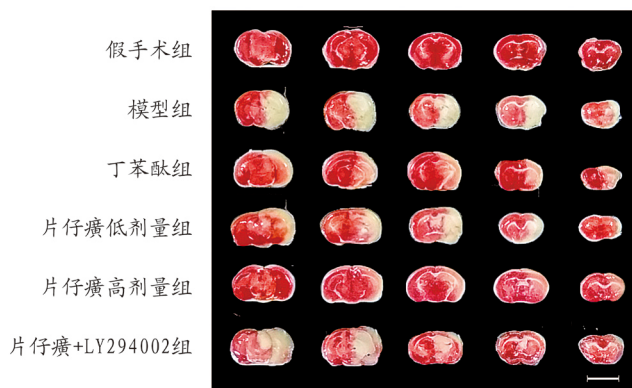


图1 各组小鼠脑组织梗死情况(TTC染色, 标尺示: 4 mm)

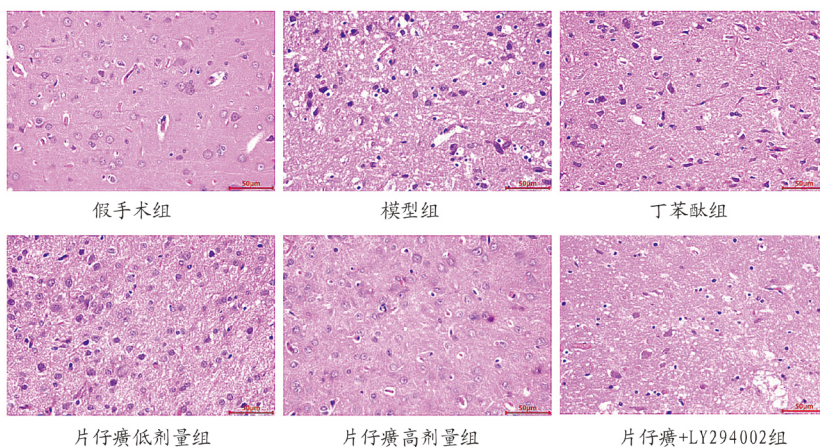


图2 各组小鼠脑组织病理变化(HE染色, $\times 100$)

脑组织未见水肿和缺血病变;模型组小鼠可见缺血区脑组织水肿,神经元胞体呈多角形,固缩,空泡变性;片仔癯高剂量组和丁苯酞组小鼠脑组织可见神经元变性坏死明显减轻。与片仔癯高剂量组比较,片仔癯+LY294002组小鼠脑组织病理变化明显加重。

3.3 各组小鼠脑组织EB渗漏量比较 模型组小鼠脑组织EB渗漏量显著高于假手术组 ($P<0.01$);丁苯酞组和片仔癯高剂量组小鼠脑组织EB渗漏量显著低于模型组 ($P<0.05$, $P<0.01$),丁苯酞组和片仔癯各剂量组组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);片仔癯+LY294002组小鼠脑组织EB渗漏量显著高于片仔癯高剂量组 ($P<0.01$),与模型组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见表2。

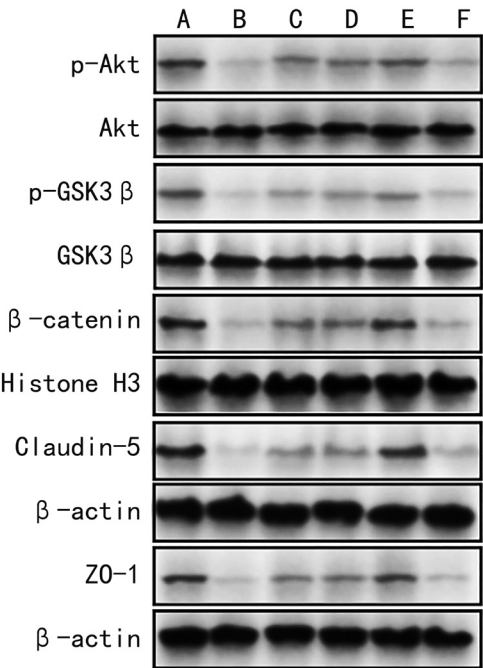
表2 各组小鼠脑组织EB渗漏量比较($\bar{x}\pm s$) 单位: $\mu\text{g/g}$ 脑组织

组别	动物数/只	脑组织EB渗漏量
假手术组	6	7.97 ± 1.78
模型组	6	$15.57\pm 3.66^{\triangle\triangle}$
丁苯酞组	6	$10.47\pm 1.87^*$
片仔癯低剂量组	6	11.82 ± 3.35
片仔癯高剂量组	6	$9.11\pm 2.38^{**}$
片仔癯+LY294002组	6	14.17 ± 3.05^{ss}

注:与假手术组比较, $\triangle\triangle P<0.01$;与模型组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与片仔癯高剂量组比较, $ssP<0.01$ 。

3.4 各组小鼠缺血大脑皮层p-Akt、p-GSK3 β 、ZO-1、Claudin-5蛋白表达及 β -catenin核转位水平比较 与假手术组比较,模型组小鼠脑缺血再灌注后,缺血侧皮层脑组织p-Akt、p-GSK3 β 、ZO-1、Claudin-5蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.01$), β -catenin核转位水平显著降低 ($P<0.01$)。丁苯酞组与片仔癯低、高剂量组小鼠上述指标表达均显著高于模型组 ($P<0.05$, $P<0.01$),其中以片仔癯高剂量组改善更为明显;片仔癯+LY294002组上述指标表达均显著低于片仔癯高剂量组 ($P<0.05$, $P<0.01$),且

与模型组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见图3、表3。



注: A.假手术组; B.模型组; C.丁苯酞组; D.片仔癯低剂量组; E.片仔癯高剂量组; F.片仔癯+LY294002组

图3 各组小鼠缺血大脑皮层p-Akt、p-GSK3 β 、 β -catenin、Claudin-5、ZO-1蛋白电泳图

4 讨论

缺血性脑卒中是国民健康的首要威胁。自20世纪80年代Simon教授提出“神经保护”的概念以来,针对神经元保护的药物研究大量涌现,然而1000余种候选药物的临床转化几乎全部失败,提示仅针对缺血区神经元的单一保护策略可能具有一定局限性^[13-14]。近年来,有学者提出“神经血管单元”概念,将脑缺血区的血管、神经元、胶质细胞等作为整体进行研究,以期寻找有效的脑缺血损伤干预策略^[15]。脑血管是神经血管单元的重要组成部分,亦是BBB的重要组成部分,脑缺血后,血管内皮细胞损伤造成BBB的完整性破坏,通透性升高,促使血浆蛋白成

表3 各组小鼠缺血大脑皮层p-Akt、p-GSK3 β 、ZO-1、Claudin-5蛋白表达及 β -catenin核转位水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	p-Akt/Akt	p-GSK3 β /GSK3 β	β -catenin/Histone H3	Claudin-5/ β -actin	ZO-1/ β -actin
假手术组	3	1.13 ± 0.12	1.01 ± 0.12	1.10 ± 0.11	1.09 ± 0.04	1.03 ± 0.07
模型组	3	$0.29\pm 0.04^{\triangle\triangle}$	$0.31\pm 0.05^{\triangle\triangle}$	$0.32\pm 0.03^{\triangle\triangle}$	$0.29\pm 0.03^{\triangle\triangle}$	$0.17\pm 0.05^{\triangle\triangle}$
丁苯酞组	3	$0.51\pm 0.02^{**}$	$0.56\pm 0.09^*$	$0.53\pm 0.04^{**}$	$0.46\pm 0.03^{**}$	$0.32\pm 0.05^*$
片仔癯低剂量组	3	$0.52\pm 0.04^{**}$	$0.54\pm 0.07^{**}$	$0.55\pm 0.07^{**}$	$0.48\pm 0.04^{**}$	$0.34\pm 0.05^*$
片仔癯高剂量组	3	$0.73\pm 0.10^{##}$	$0.76\pm 0.08^{##}$	$0.77\pm 0.06^{##}$	$0.74\pm 0.10^{##}$	$0.54\pm 0.05^{##}$
片仔癯+LY294002组	3	0.45 ± 0.04^s	0.41 ± 0.04^{ss}	0.54 ± 0.04^{ss}	0.48 ± 0.06^s	0.33 ± 0.05^{ss}

注:与假手术组比较, $\triangle\triangle P<0.01$;与模型组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与片仔癯低剂量组比较, $^#P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与片仔癯高剂量组比较, $^sP<0.05$, $^{ss}P<0.01$;与丁苯酞组比较, $^&P<0.05$, $^{&&}P<0.01$ 。

分和外周免疫细胞进入脑组织,造成血管源性脑水肿和炎症损伤,加重脑缺血损伤和神经功能障碍^[16]。因此,保护脑血管内皮细胞,维持BBB的完整性可以作为脑缺血再灌注损伤的干预手段。丁苯酞是我国从芹菜籽中提取的左旋芹菜甲素消旋体,是治疗急性脑梗死的国家一类新药,可降低脑组织炎症因子水平,维持血管内皮功能,促进缺血区血流量恢复,抑制氧化应激反应,进而改善脑缺血患者神经功能损伤,在本研究中作为阳性对照药物^[17]。

磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号参与细胞增殖、凋亡、血管生成等过程,主要通过Akt的活化发挥调控作用。生理状态下Akt以非活化构象驻留在细胞质中,当细胞受到生长因子等第一信使作用时,PI3K首先发生激活,介导3,4,5-磷脂酰肌醇三磷酸(PIP3)的生成,由于Akt的PH作用域对PIP3的高亲和力,促使Akt易位至细胞膜上,并暴露磷酸化位点Thr308和Ser473残基。3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK1)可介导Thr308位点的磷酸化使得Akt部分活化,而Akt的充分活化则需要包括PDK2在内的多种激酶共同作用介导Ser473位点的磷酸化^[18]。Akt活化后也可介导其他底物蛋白的磷酸化修饰,已有研究显示Akt可通过介导GSK3 β 丝氨酸残基Ser9的磷酸化,抑制GSK3 β 活性。GSK3 β 是Wnt/ β -catenin通路的负向调控元件,活化态的GSK3 β 可与腺瘤息肉蛋白APC和轴蛋白Axin等组成降解复合体,介导 β -catenin的降解,使其在胞浆处于低水平,无法作为转录辅助因子促进紧密连接相关蛋白ZO-1和Claudin-5的表达^[19-20]。在生理状态下,BBB的屏障功能依赖于细胞间的紧密连接,而紧密连接的形成主要涉及特定的细胞间跨膜蛋白相互作用,在BBB内皮细胞中Claudin-5是最主要的Claudin亚型,其可通过与相邻细胞表面的Claudin-5发生同源相互作用,形成闭锁结构,Claudin-5的胞内段则通过与支架蛋白ZO-1相互作用而与细胞骨架相连,并且对于维持BBB屏障功能至关重要^[21]。活化的Akt可介导GSK3 β 的Ser9磷酸化修饰,使降解复合体失活,进而促进 β -catenin的胞浆积累和核转位^[22-23],同时促进ZO-1、Claudin-5的表达,维持BBB的屏障功能^[24-25]。

本研究结果显示,给予片仔癀可改善MCAO/R小鼠神经功能缺陷,降低脑梗死率,改善BBB通透性,提高Akt和GSK3 β 的磷酸化水平,促进 β -catenin的核转位并上调ZO-1和Claudin-5的表达,其作用表现出一定的剂量依赖性,高剂量片仔癀对神经功能、脑梗死率、BBB通透性的改善与丁苯酞相当,对上述蛋

白表达的调节作用优于丁苯酞。LY294002是PI3K/Akt通路的特异性抑制剂,可抑制Akt的磷酸化激活,本研究在给予高剂量片仔癀的同时给予LY294002,以探究片仔癀是否通过激活Akt发挥脑保护作用。结果表明,在给予片仔癀的同时给予LY294002可阻断片仔癀对p-Akt的上调作用,降低GSK3 β 的磷酸化水平和 β -catenin的核转位,下调ZO-1和Claudin-5的表达,增加BBB通透性。此外,LY294002也显著逆转了片仔癀对小鼠神经功能缺陷和脑梗死的改善作用。因此,我们推测片仔癀可能通过调控Akt/GSK3 β / β -catenin途径保护BBB的完整性,从而减轻脑缺血再灌注损伤。

综上,本研究表明,脑缺血再灌注模型小鼠呈现显著的神经功能缺陷,脑组织发生明显的梗死,BBB的渗漏性显著升高,而给予片仔癀治疗后由缺血再灌注造成的脑组织损伤和神经行为缺陷得到改善,其机制可能与激活Akt/GSK3 β / β -catenin途径,上调紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-5的表达,维持BBB的完整性相关。本研究结果将为片仔癀临床应用于影响BBB功能的中枢神经系统疾病(脑卒中、帕金森病、阿尔兹海默病等)的治疗奠定基础。

本研究已初步明确片仔癀对Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路的激活作用,已有研究显示GSK3 β / β -catenin通路在中枢神经系统血管新生过程中亦发挥重要功能,且血管新生与缺血性脑卒中的神经功能预后密切相关,本课题组未来将进一步探究片仔癀对缺血性脑卒中恢复期血管新生的促进作用,以期为促进脑卒中后神经功能恢复提供新的疗法。

参考文献

- [1] 《中国卒中报告》编写委员会.中国卒中报告2020(中文版)[J].中国卒中杂志,2022,17(6):553.
- [2] WANG Y J, LI Z X, GU H Q, et al. China stroke statistics 2019: a report from the national center for healthcare quality management in neurological diseases, China national clinical research center for neurological diseases, the Chinese stroke association, national center for chronic and non-communicable disease control and prevention, Chinese center for disease control and prevention and institute for global neuroscience and stroke collaborations[J]. Stroke Vasc Neurol, 2020, 5(3): 211.
- [3] CHEN Z L. Pien Tze Huang (PZH) as a Multifunction Medicinal Agent in Traditional Chinese Medicine (TCM): a review on cellular, molecular and physiological mechanisms[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 146.

- [4] ZHANG X Q, ZHANG Q, HUANG L L, et al. Pien-Tze-Huang attenuates neuroinflammation in cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats through the TLR4/NF- κ B/MAPK pathway[J]. *Pharm Biol*, 2021, 59 (1): 826.
- [5] WINKLER L, BLASIG R, BREITKREUZ-KORFF O, et al. Tight junctions in the blood-brain barrier promote edema formation and infarct size in stroke-Ambivalent effects of sealing proteins[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41 (1): 132.
- [6] JIN Z Q, LIANG J, LI J Q, et al. Absence of MCP-induced protein 1 enhances blood-brain barrier breakdown after experimental stroke in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (13): 3214.
- [7] JI Y B, GAO Q, TAN X X, et al. Lithium alleviates blood-brain barrier breakdown after cerebral ischemia and reperfusion by upregulating endothelial Wnt/ β -catenin signaling in mice[J]. *Neuropharmacology*, 2021, 186: 108474. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108474.
- [8] LI L, MCBRIDE D W, DOYCHEVA D, et al. G-CSF attenuates neuroinflammation and stabilizes the blood-brain barrier via the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway following neonatal hypoxia-ischemia in rats[J]. *Exp Neurol*, 2015, 272: 135.
- [9] CHIANG T, MESSING R O, CHOU W H. Mouse model of middle cerebral artery occlusion[J]. *J Vis Exp*, 2011 (48): 2761.
- [10] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84.
- [11] NAIR A B, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human[J]. *J Basic Clin Pharm*, 2016, 7 (2): 27.
- [12] FEI Y X, ZHU J P, ZHAO B, et al. XQ-1H regulates Wnt/GSK3 β / β -catenin pathway and ameliorates the integrity of blood brain barrier in mice with acute ischemic stroke[J]. *Brain Res Bull*, 2020, 164: 269.
- [13] SIMON R P, SWAN J H, GRIFFITHS T, et al. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain[J]. *Science*, 1984, 226 (4676): 850.
- [14] O'COLLINS V E, MACLEOD M R, DONNAN G A, et al. 1,026 experimental treatments in acute stroke[J]. *Ann Neurol*, 2006, 59 (3): 467.
- [15] SCHAEFFER S, IADECOLA C. Revisiting the neurovascular unit[J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24 (9): 1198.
- [16] ABDULLAHI W, TRIPATHI D, RONALDSON P T. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315 (3): C343.
- [17] 郑迪, 周骏宇, 王亮. 丁苯酞对实验性脑梗死小鼠神经功能改善、脑保护及促进血管新生的作用[J]. *中国药师*, 2019, 22 (11): 2003.
- [18] SZYMONOWICZ K, OECK S, MALEWICZ N M, et al. New insights into protein kinase B/Akt signaling: role of localized Akt activation and compartment-specific target proteins for the cellular radiation response[J]. *Cancers*, 2018, 10 (3): 78.
- [19] JIN Z, KE J J, GUO P P, et al. Quercetin improves blood-brain barrier dysfunction in rats with cerebral ischemia reperfusion via Wnt signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11 (8): 4683.
- [20] LIEBNER S, CORADA M, BANGSOW T, et al. Wnt/ β -catenin signaling controls development of the blood-brain barrier[J]. *J Cell Biol*, 2008, 183 (3): 409.
- [21] GREENE C, HANLEY N, CAMPBELL M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2019, 16 (1): 3.
- [22] YUAN Y, FAN Y L, GAO Z C, et al. SHP2 promotes proliferation of breast cancer cells through regulating Cyclin D1 stability via the PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway[J]. *Cancer Biol Med*, 2020, 17 (3): 707.
- [23] XU B T, WANG T T, XIAO J, et al. FCPR03, a novel phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury through activation of the AKT/GSK3 β / β -catenin signaling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 163: 234.
- [24] WANG W, LI M C, WANG Y F, et al. GSK-3 β as a target for protection against transient cerebral ischemia[J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14 (4): 333.
- [25] HOU Y, HU Z P, GONG X Y, et al. HSPB8 overexpression prevents disruption of blood-brain barrier after intracerebral hemorrhage in rats through Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway[J]. *Aging*, 2020, 12 (17): 17568.

第一作者: 高骁君 (1988—), 女, 药理学硕士, 主管中药师, 从事药理学、中药制剂研究。

通讯作者: 刘顺, 中药学博士, 副主任中药师。
liushun12@163.com

修回日期: 2022-11-10

编辑: 吴 宁