

# 脑通汤对缺氧-复氧损伤脑微血管内皮细胞的保护作用<sup>\*</sup>

何 筑<sup>1</sup>, 况时祥<sup>2\*</sup>, 张树森<sup>2</sup>, 邹家莉<sup>2</sup>

(1. 贵阳市第三人民医院, 贵州 贵阳 550000; 2. 贵阳中医学院第二附属医院, 贵州 贵阳 550003)

**[摘要]** 目的: 探讨脑通汤对缺氧-复氧损伤脑微血管内皮细胞(BMECs)的保护作用及机制。方法: 将大鼠原代BMECs培养传代至第二代,分为对照组、正常血清组、缺氧-复氧模型组、大、中、小剂量脑通汤含药血清组,后5组细胞均放入三气培养箱中持续通入95% N<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>混合气体缺氧24 h再复氧2 h制作脑缺血再灌注细胞模型;采用MTT法检测缺氧24 h和复氧2 h时BMECs的活性并计算细胞存活率,实时荧光定量PCR法检测BMECs中HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、MMP-9 mRNA的表达。结果: 缺氧24 h时,模型组的BMECs的活性及存活率较对照组明显下降( $P < 0.05$ ),与正常血清组及各剂量含药血清组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );复氧2 h时各剂量含药血清组BMECs的活性及存活率均较模型组明显升高( $P < 0.05$ ),正常血清组与模型组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );模型组HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、MMP-9 mRNA的表达量均升高( $P < 0.05$ ),与模型组比较,各剂量含药血清组的HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA的表达量明显升高,MMP-9 mRNA的表达量明显下降,脑通汤大、中剂量组变化更显著( $P < 0.01$ );正常血清组与模型组比较上述3种mRNA表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论: 脑通汤可以保护缺氧-复氧损伤的BMECs,其机制可能与其能上调HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA表达以及下调MMP-9 mRNA表达有关。

**[关键词]** 脑通汤; 缺血再灌注; 脑微血管内皮细胞; 血脑屏障; 通透性

**[中图分类号]** R743; R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)01-0017-07

## Study on Protective Effects of Naotong Soup on Brain Microvascular Endothelial Cell Injury Induced by Hypoxia-reoxygenation

HE Zhu<sup>1</sup>, KUANG Shixiang<sup>2</sup>, ZHANG Shuseng<sup>2</sup>, ZOU Jiali<sup>2</sup>

(1. Third People's Hospital of Guiyang, Guiyang 550000, Guizhou, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effects of Naotong soup on brain microvascular endothelial cell(BMECs) injury induced by hypoxia-reoxygenation and its mechanism. **Methods:** Primary rat BMECs were identified and passaged to the second generation. BMECs were divided into control group, normal serum group, hypoxia-reoxygenation model group, large, medium and small dose of Naotong soup medicinal serum group, BMECs in the later 5 groups were put into the three gas incubator for continuous infusion of mixture gas (95% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) for 24 h and reoxygenation for 2 h to establish the model of cerebral ischemia and reperfusion. The activity and the survival rate of BMECs at 24 hours after hypoxia and 2 hours after reoxygenation were evaluated by MTT assay. Real-time fluorescent quantitative PCR was adopted to detect the relative expression levels of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and MMP-9 mRNA. **Results:** Compared with normal cell groups, BMECs activity and the survival rate of model groups was significantly lower after hypoxia for 24 h ( $P < 0.05$ ) in the later five groups, and

\* [基金项目] 国家自然科学基金(81160490)

\* \* 通信作者 E-mail: kuangshixiang2009@163.com

网络出版时间: 2016-01-07 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160107.1810.004.html>

there was no significant difference among the later 5 groups ( $P > 0.05$ ). Compared with model group, different dose of Naotong soup medicinal serum groups were significantly increased after reoxygenation for 2 h ( $P < 0.05$ ). The relative expression levels of *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *MMP-9* mRNA increased in model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the relative mRNA expression levels of *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF* increased and *MMP-9* mRNA decreased in Naotong soup medicinal serum groups, the changes were more significant in large, medium Naotong soup medicinal serum groups ( $P < 0.05$ ). However, there was no significant difference between normal serum group and model group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions:** Naotong soup can protect BMECs after hypoxia-reoxygenation injury. Its mechanism may relate to up-regulate *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF* mRNA levels and down-regulate *MMP-9* levels.

[**Key words**] Naotong soup; ischemia and reperfusion; brain microvascular endothelial cells; blood-brain barrier; permeability

缺血性脑血管病是导致血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 的主要病因<sup>[1]</sup>, 缺血再灌注损伤参与并介导了缺血性脑血管病的重要病理生理过程<sup>[2]</sup>。研究认为血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 结构及功能的损伤不仅参与脑缺血再灌注损伤的病理生理<sup>[3]</sup>, 也与 VD 的发生发展密切相关<sup>[4]</sup>。缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 是检测 BBB 的结构及功能损伤时常用到的指标。脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial Cells, BMECs) 是各种生理、病理因素作用的靶细胞。本课题组前期的研究证实脑通汤可以有效改善 VD 早期患者认知功能<sup>[5]</sup>。本实验利用离体培养大鼠脑 BMECs 制备体外细胞缺氧-复氧模型模拟体内脑缺血再灌注损伤, 观察脑通汤对缺氧-复氧损伤 BMECs 中 *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF*, *MMP-9* mRNA 表达的影响, 探讨脑通汤对缺氧-复氧损伤 BMECs 的保护作用及可能机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SD 大鼠, 雄性, SPF 级, 体重: (200  $\pm$  20) g, 购自于重庆腾鑫生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (渝)2012-0005。1 周龄 SD 大鼠, 雄性, SPF 级, 购自于贵阳学院实验动物中心, 合格证号: SCXK (黔)2012-0001。

### 1.2 主要药品与试剂

脑通汤 (中药成分) 由贵阳中医学院第二附属医院中药房提供。高糖 DMEM、0.25% 胰酶、双抗均购于 Hyclone 公司, MTT、二甲基亚砜、鼠尾明

胶、胶原酶 II 均购于 Sigma 公司, 羊抗兔 IgG-FITC、ICAM-1 (CD54, 批号 PB0054) 均购于博士德公司; VIII 因子相关抗原抗血清 (北京博奥森), 胎牛血清 (四季青), 无糖 DMEM (Gibco), Trizol (批号 1596-026, invitrogen), SYBR Green PCR 试剂盒 (批号 K0223, Thermo), 逆转录试剂盒 (批号 K1622, Fermentas)。

### 1.3 脑通汤含药血清的制备

脑通汤 (黄芪 40 g、西洋参 8 g、天麻 20 g、水蛭 24 g、葛根 60 g) 每剂方药 152 g, 加水 500 mL 煎制, 醇沉提取, 高温消毒, 制成含生药量为 3.04 g/mL (大剂量脑通汤组), 1.52 g/mL (中剂量脑通汤组), 0.76 g/mL (小剂量脑通汤组)。SD 大鼠 60 只, 随机分为正常组和大、中、小剂量脑通汤组 4 组, 每组 15 只。参照《药理实验方法学》<sup>[6]</sup> 换算出灌胃给药量, 大、中、小剂量脑通汤组给药量分别为 15.2、7.6、3.8 g/(kg  $\cdot$  d), 正常组灌服生理盐水 10 mL/(kg  $\cdot$  d), 一天 2 次, 连灌 4 d; 股动脉采血, 3 000 r/min 离心 20 min, 分离血清, 过滤除菌, 灭活, 获得正常血清及脑通汤大、中、小剂量含药血清, -20  $^{\circ}$ C 冻存。

### 1.4 BMECs 的原代培养、传代及鉴定

参考文献 [8-12] 方法, 稍作改良。选择出生 1 周以内 SD 大鼠, 参照大鼠脑立体定位图谱, 剥离双侧大脑皮质, 于预冷 D-Hanks 液中将其剪碎成 1 mm<sup>3</sup> 大小组织块, 加入 0.25% 胰蛋白酶, 消化 15 min, 滴加 20% FBS 培养基 (含 79% DMEM 高糖培养基, 20% FBS 和 1% 双抗) 终止消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 过筛目 (先过 100 目, 再过 200 目), 最后收集 200 目以上的细胞, 在沉淀组织中滴加适量 0.1% II 型胶原酶消化 20 min, 滴加

20% FBS 培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入适量 20% FBS 培养基吹打混匀,制成细胞悬液,转移至 2% 明胶包被过的 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中。放入 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育,隔 2 ~ 3 d 换液 1 次。7 ~ 9 d 后细胞呈现典型的单层“铺路石”样排列,用 0.125% 胰蛋白酶消化传代,Ⅷ因子相关抗原免疫荧光染色鉴定阳性,证明为 BMECs。

### 1.5 BMECs 分组

取第 2 代 BMECs 随机分为 6 组:正常组、缺氧-复氧模型组、正常血清组、大、中、小剂量脑通汤含药血清组,后 5 组细胞均行缺血再灌注,后 4 组分别给予 10% 正常血清及 10% 脑通汤大、中、小剂量含药血清。10% 正常血清或 10% 脑通汤大、中、小剂量含药血清培养基分别用 89% 的无胎牛血清的 DMEM 培养基、1% 双抗和 10% 正常血清或 10% 脑通汤不同剂量含药血清配制而成。

### 1.6 BMECs 缺氧/复氧模型的建立

参照文献[13]的造模方法稍加改良,制备细胞缺氧 24 h 再复氧 2 h 模型:用无糖 DMEM 洗涤 2 次,缺氧前缺氧-复氧模型组、正常血清组、大、中、小剂量脑通汤含药血清组加入 10% FBS 培养基、10% SD 大鼠正常血清及 10% 脑通汤大、中、小剂量含药血清培养基,置入 37 ℃三气培养箱,持续通入 95% N<sub>2</sub> 与 5% CO<sub>2</sub> 混合气体,流速保持在 0.5 L/min,缺氧 24 h。再复氧时 5 组分别换液,培养基与缺氧前相同,放回 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱持续复氧 2 h。对照组用 10% FBS 培养基正常培养 26 h,不做任何处理。

### 1.7 MTT 比色法测定 BMECs 的活性及存活率

取第二代的 BMECs 以  $5 \times 10^5$  /mL 的细胞密度接种于 96 孔板中,造模后,吸弃 96 孔板各孔液体,每孔加四甲基偶氮唑蓝磷酸缓冲液 MTT (5 g/L) 20  $\mu$ L,混匀,37 ℃孵育 4 h。弃上清液,每孔加 100  $\mu$ L 的二甲基亚砷,均匀振荡 10 min,用酶标仪(微量波长为 570nm)处读取吸光度值(OD 值),用 OD 值表示 BMECs 活性。细胞存活率以对照组 OD 值均数为 100%,计算细胞存活率(%) = 各孔 OD 值/对照组 OD 值均数  $\times 100\%$ 。

### 1.8 实时荧光定量 PCR 法检测 BMECs 的 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、MMP-9 mRNA 的表达

HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、MMP-9 mRNA 引物均由上海基尔顿生物科技有限公司设计。引物设计如下: HIF-1 $\alpha$  mRNA 上游引物 5' CAGCGATGACACG-

GAAAC 3',下游引物 5' AGTGACTCTGGGCTTGAC 3',扩增长度 210 bp; VEGF mRNA 上游引物 5' GAGTCTGTGCTCTGGGATTG 3',下游引物 5' TCCTGCTACCTCTTTCCTCTG 3',扩增长度 188 bp; MMP-9 mRNA 上游引物 5' TCTCTACTGGGCATTAGGG 3',下游引物 5' GTGTCCGAGGAAGATACTTG 3',扩增长度 236 bp;  $\beta$ -catin mRNA 上游引物: 5' GTCGGTGTGAACGGATTG 3',下游: 5' TC-CCATTCTCAGCCTTGAC 3',扩增长度 181 bp。用 Trizol 提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,用 cDNA 按照 SYBR Green PCR 试剂盒说明进行实时荧光定量 RT-PCR 反应。反应总体积 25  $\mu$ L,PCR 参数设置:预变性,95 ℃,10 min,变性 95 ℃,15 s,退火 60 ℃,45 s,延伸 60 ℃,1 min,总共 40 次循环。反应结束时仪器自动显示达到阈值时的循环圈数(threshold cycles, CT)值。以内参  $\beta$ -actin mRNA 的 CT 值标化 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、MMP-9 mRNA 的 CT 值,目的基因相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算<sup>[14]</sup>。公式如下:样品目的基因  $\Delta CT$  = 样品目的基因 CT 值 - 内参基因 CT 值;  $\Delta\Delta CT$  = 样品目的基因  $\Delta CT$  值 - 对照组  $\Delta CT$  值。

### 1.9 观察指标

倒置显微镜下观察 BMECs 形态,第Ⅷ因子相关抗原免疫荧光鉴定 BMECs,比较各组 BMECs 的活性及存活率,观察 BMECs 中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、MMP-9 mRNA 的表达。

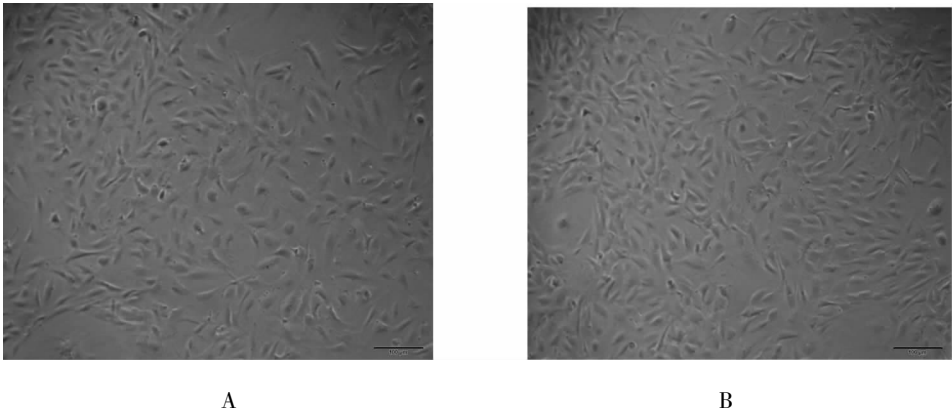
### 1.10 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,各组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,以  $P < 0.05$  判定差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 原代脑 BMECs 鉴定

倒置显微镜下观察 BMECs 形态:12 h 大部分细胞贴壁,24 h 后细胞伸出细小突起。培养 4 d,细胞围绕成“漩涡状”;细胞继续生长 7 ~ 9 d 后融合,呈现典型的“鹅卵石样”密集的排列;细胞形态呈现扁平梭形,椎体形,多角形,核卵圆形,可见核仁。第Ⅷ因子相关抗原免疫荧光鉴定:荧光倒置显微镜下观察,传代细胞胞核周围的胞浆内均出现黄绿色荧光,即第Ⅷ因子抗原阳性,阳性率达 95%,胞质与胞核间界限明显,证明细胞为 BMECs。见图 1、2。



注：A 为 BMECs 培养第 5 天,B 为 BMECs 培养第 7 天  
图 1 原代 BMECs 形态学观察(×400)

Fig.1 Morphological observation of primary BMECs

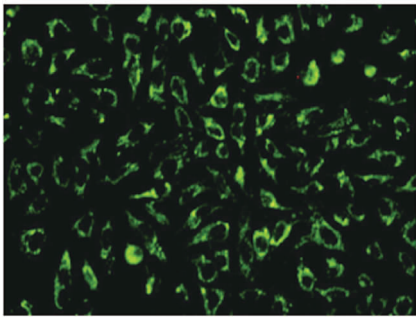


图 2 BMECs Ⅷ因子相关抗原免疫荧光鉴定(×400)  
Fig.2 Identification of factor VIII related antigen  
in BMECs by immunofluorescence

2.2 BMECs 的活性及存活率

缺氧 24 h 时模型组、脑通汤不同剂量含药血清组、正常血清组的 BMECs 活性及存活率均较对照组明显下降( $P < 0.05$ ),这 5 组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );复氧 2 h 时 5 组 BMECs 活性及存活率仍均较对照组明显下降( $P < 0.05$ ),而脑通汤不同剂量含药血清组较缺氧-复氧模型组明显升高( $P < 0.05$ ),正常血清组较模型组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。复氧 2 h 时模型组、脑通汤不同剂量含药血清组、正常血清组的 BMECs 的活性及存活率组内比较均较缺氧时明显升高( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 缺氧 24 h 及复氧 2 h 各组 BMECs 活性及存活率( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Tab.1 BMECs activity and the survival rate at 24 hours after hypoxia  
and 2 hours after reoxygenation in each group

分组	BMECs 缺氧 24 h		BMECs 复氧 2 h	
	BMECs 活性(OD 值)	存活率(%)	活性(OD 值)	存活率(%)
对照组	0.748 ± 0.065	100	0.748 ± 0.065	100
缺氧-复氧模型组	0.375 ± 0.052 <sup>(1)</sup>	51.22 ± 3.11 <sup>(1)</sup>	0.425 ± 0.047 <sup>(1)(3)</sup>	62.38 ± 4.45 <sup>(1)(3)</sup>
正常血清组	0.388 ± 0.052 <sup>(1)</sup>	52.38 ± 4.02 <sup>(1)</sup>	0.438 ± 0.051 <sup>(3)</sup>	63.27 ± 4.57 <sup>(3)</sup>
脑通汤大剂量含药血清组	0.412 ± 0.044 <sup>(1)</sup>	51.34 ± 5.28 <sup>(1)</sup>	0.685 ± 0.052 <sup>(2)(3)</sup>	82.75 ± 7.41 <sup>(2)(3)</sup>
脑通汤中剂量含药血清组	0.405 ± 0.039 <sup>(1)</sup>	53.22 ± 5.42 <sup>(1)</sup>	0.638 ± 0.048 <sup>(2)(3)</sup>	77.53 ± 6.55 <sup>(2)(3)</sup>
脑通汤小剂量含药血清组	0.448 ± 0.046 <sup>(1)</sup>	52.59 ± 4.93 <sup>(1)</sup>	0.576 ± 0.044 <sup>(2)(3)</sup>	61.05 ± 5.34 <sup>(2)(3)</sup>

<sup>(1)</sup>与同一时间点对照组比较, $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>与同一时间点模型组比较, $P < 0.05$ , <sup>(3)</sup>与缺氧 24 h 比较, $P < 0.05$

2.3 BMECs 中 *HIF-1α*、*VEGF*、*MMP-9*mRNA 表达  
实时荧光定量 PCR 结果显示:与正常细胞比较,模型组 *HIF-1α*、*VEGF*、*MMP-9* mRNA 的相对表达量均升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,脑通汤大、中、小剂量含药血清组的 *HIF-1α*、*VEGF* mRNA

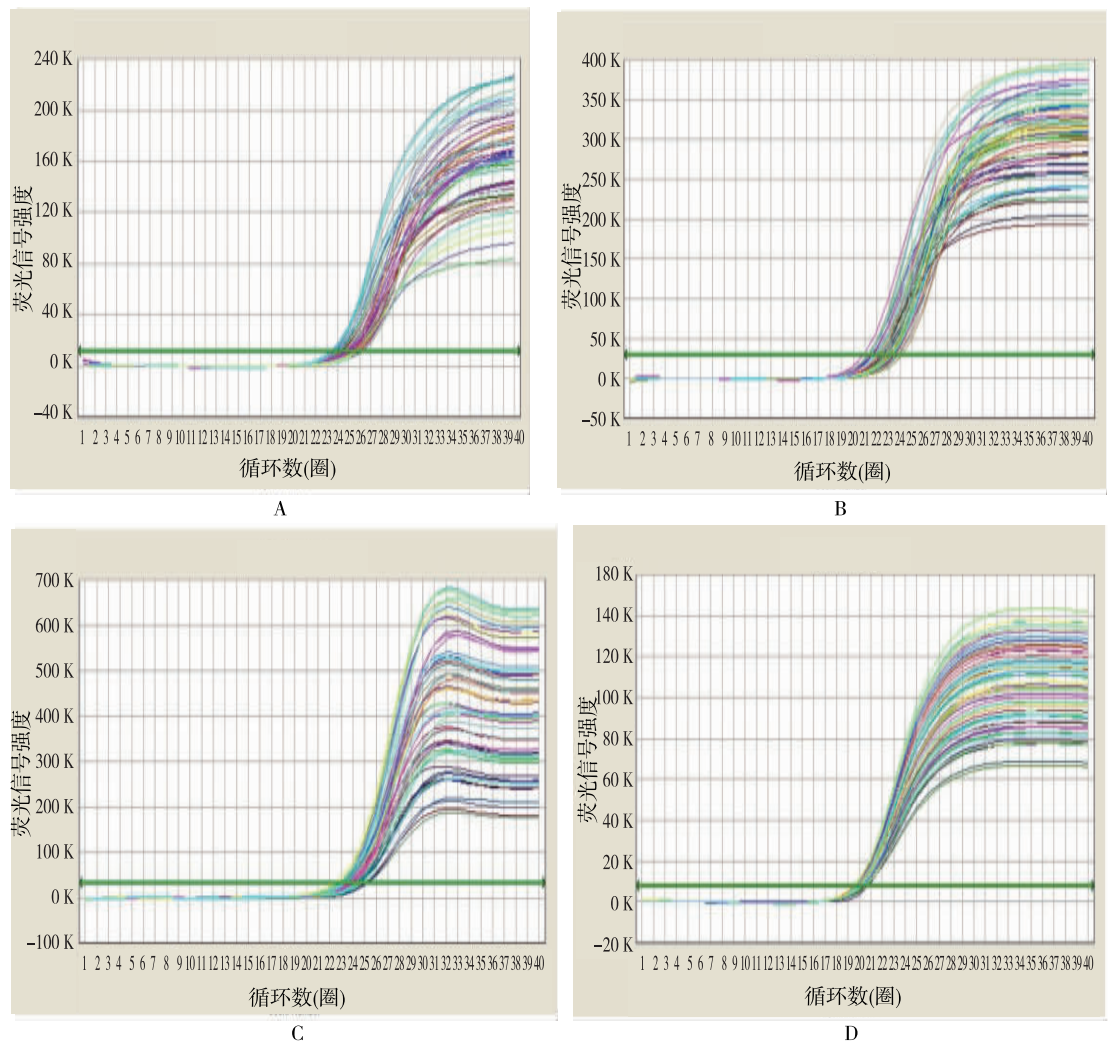
相对表达量明显升高,*MMP-9* mRNA 的相对表达量呈现明显下降趋势,这 3 种基因的表达变化在脑通汤大、中剂量含药血清组更为显著( $P < 0.05$ );正常血清组与模型组比较,*HIF-1α*、*VEGF*、*MMP-9* mRNA 的相对表达量差异无统计学意义( $P >$

0.05)。见图 3 和表 2。

3 讨论

BBB 主要由脑毛细血管内皮细胞及其间的紧密连接、基底膜和细胞外基质、星形胶质细胞足板等组成,是维持中枢神经系统内环境稳定的重要天然屏障,也是血液循环重要物质转运到中枢的交通枢纽。BBB 破坏是缺血再灌注损伤的重要环节,研究显示,在脑缺血再灌注损伤时,多种重要调控因子如 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、MMP-9 等参与并调控脑缺

血再灌注 BBB 的结构及功能的损伤<sup>[15-17]</sup>。HIF-1 是存在人与哺乳动物细胞低氧应答反应中的一种重要核转录调节因子。其生物活性主要由  $\alpha$  亚基所决定,HIF-1 $\alpha$  的表达严格受到细胞氧浓度的调节<sup>[18]</sup>。HIF-1 $\alpha$  既是调节亚基又是活性亚基,在缺血再灌注损伤下可诱导 HIF-1 $\alpha$  快速大量的表达<sup>[19]</sup>。而在缺氧时,HIF-1 $\alpha$  在胞浆内合成增加,可以对其下游基因,如 *MMPs*、*VEGF* 等基因进行调控<sup>[20]</sup>。有研究证实,HIF-1 $\alpha$  的表达与 BBB 通透性的改变息息相关<sup>[21]</sup>。因而,促进 HIF-1 $\alpha$  表达是保护缺血再灌注损伤中 BBB 及其结构基础脑微血管内皮细胞的关键环节。



注:A、B、C、D 分别为 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 和 MMP-9 及内参 GAPDH mRNA 扩增动力学曲线

图 3 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 和 MMP-9 及内参 GAPDH mRNA 扩增动力学曲线

Fig. 3 Amplified kinetic curves of HIF-1 $\alpha$ ,VEGF, MMP-9 and GAPDH mRNA

表 2 各组 BMECs 中 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF* 和 *MMP-9* mRNA 对表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )Tab. 2 *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *MMP-9* mRNA levels in BMECs in each group

分组	<i>HIF-1<math>\alpha</math></i> mRNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	<i>VEGF</i> mRNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	<i>MMP-9</i> mRNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )
对照组	0.293 $\pm$ 0.032	0.310 $\pm$ 0.040	0.334 $\pm$ 0.025
缺氧/复氧组模型组	0.485 $\pm$ 0.052 <sup>(1)</sup>	1.008 $\pm$ 0.128 <sup>(1)</sup>	3.010 $\pm$ 0.260 <sup>(1)</sup>
正常血清组	0.748 $\pm$ 0.041 <sup>(2)</sup>	1.372 $\pm$ 0.363 <sup>(2)</sup>	0.943 $\pm$ 0.148 <sup>(2)</sup>
脑通汤大剂量含药血清组	2.148 $\pm$ 0.062 <sup>(2)</sup>	3.208 $\pm$ 0.446 <sup>(2)</sup>	0.409 $\pm$ 0.054 <sup>(2)</sup>
脑通汤中剂量含药血清组	1.847 $\pm$ 0.032 <sup>(2)</sup>	2.669 $\pm$ 0.265 <sup>(2)</sup>	0.582 $\pm$ 0.081 <sup>(2)</sup>
脑通汤小剂量含药血清组	1.275 $\pm$ 0.048 <sup>(2)</sup>	2.234 $\pm$ 0.552 <sup>(2)</sup>	0.805 $\pm$ 0.102 <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup> 与模型组比较,  $P < 0.05$

VEGF 又称血管通透性因子,在新生血管及损伤 BBB 通透性方面起着重要作用。生理状态下,VEGF 在脑内仅有少量表达。在脑缺血再灌注损伤 VEGF 通过 *HIF-1 $\alpha$*  基因诱导表达发挥脑保护作用,陶陶,陈懿等<sup>[21-22]</sup>研究证实,在脑缺血再灌注中促进 VEGF 高表达,或通过中药复方干预提高 *HIF-1 $\alpha$*  的表达,进而激活 *HIF-1 $\alpha$ /VEGF* 通路,更进一步促进 VEGF 的表达,能达到保护大鼠脑缺血再灌注损伤的作用。

*MMP-9* 是基质金属蛋白酶家族 (MMPs) 的重要成员,生理状态下,*MMP-9* 合成后以无活性的酶原的形式存在脑组织中,在脑缺血时 *MMP-9* 被激活,可降解细胞外基质成分,破坏 BBB 的完整性。研究显示,在大鼠脑缺血再灌注损伤后 *MMP-9* 参与脑水肿的形成,改变 BBB 的通透性,与 BBB 结构及功能的破坏密切相关<sup>[23-24]</sup>。祝美珍等<sup>[25]</sup>进一步研究证实,通过中药复方清热化痰 II 号干预,下调脑缺血再灌注损伤 *MMP-9* 蛋白的表达,可以发挥脑保护作用。

脑通汤是况时祥教授通过长期临床经验累积针对 VD 早期的病理特征:脾气亏虚,清阳不升,脑络瘀阻,脑髓失养,兼肝阳浮越,加重脑部气血瘀滞而研制出来的。方中黄芪补气健脾,升清行血;水蛭活血通络;辅以葛根,升清活血,天麻潜降浮阳,又可通络,二药共奏升清阳,降浮阳,调畅并运行气血精微上荣于脑的作用;佐以西洋参益气养阴,健脑益智。诸药合用,共奏补气升阳,化痰通络,潜降浮阳之功。本课题前期临床及实验证实<sup>[5,26-28]</sup>,本方不仅可以改善 VD 早期患者认知功能,改善 VD 大鼠学习及记忆能力,还可减少 VD 大鼠海马 CA1 区的神经细胞及椎体细胞凋亡。

本实验结果显示,采用缺氧-复氧模型复制脑缺血再灌注 BMECs 损伤后,发现模型组的 BMECs 活性及存活率降低,而 *HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF*、*MMP-9* mRNA

的表达量明显升高;给予中药复方脑通汤不同剂量含药血清干预后,BMECs 活性及存活率较模型组明显升高,*HIF-1 $\alpha$* 、*VEGF* mRNA 的表达量显著上调,而 *MMP-9* mRNA 的表达量呈现明显下调趋势。由此可见,在缺氧-复氧损伤后一方面 *HIF-1 $\alpha$*  基因高表达可以有效激活 *HIF-1 $\alpha$ /VEGF* 通路,进而促进下游靶基因 *VEGF* 的表达;另一方面 *HIF-1 $\alpha$*  高表达可以诱导下游靶基因 *MMP-9* 的进一步增高。给予脑通汤不同剂量含药血清干预后,发现本方可以进一步有效的上调 *HIF-1 $\alpha$*  基因的表达,进而促进 *HIF-1 $\alpha$ /VEGF* 通路的激活,继续上调下游靶基因 *VEGF* 的表达;同时可显著下调 *MMP-9* 基因表达,共同参与降低血脑屏障通透性。

概言之,脑通汤可以保护缺氧-复氧损伤的脑微血管内皮细胞,可能与两种途径共同参与并介导降低 BBB 通透性有关,(1)上调 *HIF-1 $\alpha$*  mRNA 表达,进而促进 *HIF-1 $\alpha$ /VEGF* 通路的激活,增加 *VEGF* mRNA 的表达;(2)促进 *HIF-1 $\alpha$*  mRNA 的高表达,进而抑制下游靶基因 *MMP-9* mRNA 的表达。

## 4 参考文献

- [1] 邓振明. 中风痴呆病[J]. 中国医药学报, 1991(3):13.
- [2] 刘国政. 缺血性脑血管病的研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2013(8):5-6.
- [3] 邹伟,孙晓伟,于学平,等. 血脑屏障与脑缺血再灌注损伤研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2009(3):466-468.
- [4] 温泽锋. 血脑屏障与血管性痴呆的研究进展[J]. 国外医学. 老年医学分册, 2007(5):211-215.
- [5] 姜海鹏,况时祥. 脑通胶囊治疗血管性痴呆早期疗效观察[J]. 中国中医急诊, 2010(10):1669-1678.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2005:203.
- [7] 邹移海,徐志伟,苏钢强. 实验动物学[M]. 北京:科学

- 出版社, 2004:184.
- [8] Ge S, Pachter JS. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord[J]. J Neuroimmunol, 2006(2):209-214.
- [9] Calabria AR, Weidenfeller C, Jones AR, et al. Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction [J]. J Neurochem, 2006(4):922-933.
- [10] Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary culture of rat brain endothelial cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2007(6):687-694.
- [11] 吴秀芹, 梅晓云, 吴颖昕, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011(3):187-189.
- [12] 王艳, 汪宁, 林辰雨. 脑微血管内皮细胞的原代培养方法概述[J]. 中国药理学通报, 2013(2):294-296.
- [13] Zhang WD, Smith C, Shapiro A, et al. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro [J]. J Neuroimmunology, 1999(2):148.
- [14] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. Nature Protocols, 2008(3):1101-1108.
- [15] 张春丽, 孟强. 缺血性脑血管病血脑屏障研究进展[J]. 医学综述, 2013(11):1935-1937.
- [16] 胡强. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 在缺血缺氧脑损伤中的作用研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2013(3):258-262.
- [17] 饶晓, 汤轶波, 潘彦舒, 等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血损伤血脑屏障的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2014(6):49-52.
- [18] Chandel NS, Budinger GR. The cellular basis for diverse response to oxygen [J]. Free Radic Biol Med, 2007(2):165-174.
- [19] 杨晓刚, 朱庆华, 常谨, 等. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 在鼠肺缺血再灌注损伤中的表达与意义[J]. 中国循环杂志, 2012(6):466-469.
- [20] 邹峥, 刘小惠, 邹大卫. 缺氧缺血性脑损伤[J]. 实用临床儿科学杂志, 2011(12):1446-1449.
- [21] 陶陶, 陈莉芬, 胡长林, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注后 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达[J]. 重庆医科大学学报, 2005(2):210-259.
- [22] 陈懿, 朱惠斌, 廖君, 等. 脑泰方对脑缺血再灌注大鼠 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 的调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2014(10):1225-1230.
- [23] 何娅, 胡春婷, 陈松盛, 等. 大鼠脑缺血再灌注后 MMP-9/MMP-2 表达与脑水肿的关系[J]. 温州医学院学报, 2013(3):181-186.
- [24] 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基质金属蛋白酶 9 表达的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008(7):510-512.
- [25] 祝美珍, 苏春寿, 吴志敏, 等. 清热化痰 II 号方对大鼠脑缺血再灌注损伤 MMP-2 及 MMP-9 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014(2):582-585.
- [26] 宋先红, 况时祥. 脑通汤对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡基因 Bcl-2、Bax 及 Bcl-2/Bax 比例变化的影响[J]. 时珍国医国药, 2014(11):2567-2570.
- [27] 张树森, 况时祥, 肖雁, 等. 脑通胶囊对 VD 大鼠海马组织 NMDA 受体 1 亚基和 2B 亚基 mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012(32):79-82.
- [28] 张树森, 况时祥, 肖雁, 等. 脑通胶囊对 VD 大鼠海马 NMDA 受体 mRNA 表达及锥体细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012(12):230-235.
- (2015-10-09 收稿, 2015-12-21 修回)
- 中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 周 凌

(上接第 16 页)

- [7] Blais ME, Dong T, Rowland-Jones S. HLA-C as a mediator of natural killer and T-cell Activation: spectator or key player[J]. Immunology, 2011(1):1-7.
- [8] Guerini FR, Clerici M. NK cells in human disease: An evolving story[J]. Clin Immunol, 2012(3):203-206.
- [9] O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, et al. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells[J]. J Immunol, 2007(1):235-241.
- [10] Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs [J]. Nature, 2007(7164):851-861.
- [11] 裴利国, 屈蕾, 贾飞, 等. 宁夏回、汉族群体 LIN28B 基因多态性[J]. 解剖学报, 2014(1):128-133.
- (2015-10-15 收稿, 2015-12-05 修回)
- 中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 刘 华