

# 锦鸡儿总黄酮预处理对局灶性脑缺血再灌注损伤模型大鼠血脑屏障通透性的影响及机制研究<sup>△</sup>

张亚洲<sup>1\*</sup>,何前松<sup>2#</sup>,胡斐然<sup>2</sup>,樊梓媛<sup>2</sup>(1.贵州理工学院药学院,贵阳 550002;2.贵阳中医学院第二临床医学院,贵阳 550025)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1793-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.16

**摘要** 目的:研究锦鸡儿总黄酮(TFC)预处理对局灶性脑缺血再灌注损伤模型大鼠血脑屏障通透性的影响及机制,为其进一步开发和临床用于治疗缺血性脑卒中提供参考。方法:将120只大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组(阳性对照,12.6 mg/kg)和TFC高、中、低剂量组(60、30、15 mg/kg),每组20只。各给药组大鼠灌胃相应药物,假手术组和模型组大鼠灌胃等量生理盐水,每天1次,连续7 d。末次灌胃2 h后,除假手术组外的其余各组大鼠均采用线栓法复制局灶性脑缺血再灌注损伤模型。再灌注24 h后,进行神经功能缺损评分,采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色计算脑梗死面积百分比,分光光度法测定脑组织中伊文思蓝含量以考察血脑屏障的通透性;Western blot法检测脑缺血半暗带区基质金属蛋白酶9(MMP-9)、MMP-2和血脑屏障紧密连接相关蛋白Claudin-5、Occluding的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死面积百分比、脑组织中伊文思蓝含量和脑缺血半暗带区MMP-9、MMP-2蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ ),脑缺血半暗带区Claudin-5、Occluding蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,除TFC低剂量组大鼠脑缺血半暗带区MMP-2蛋白表达水平降低不显著外,其余各组大鼠上述指标均显著改善( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:TFC对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有一定的预防作用,可改善神经功能缺损,减少脑梗死面积;其机制可能与抑制MMP-9、MMP-2蛋白表达,促进Claudin-5、Occluding蛋白表达,降低血脑屏障的通透性有关。

**关键词** 锦鸡儿总黄酮;局灶性脑缺血再灌注损伤;血脑屏障;血脑屏障紧密连接相关蛋白;预防作用;大鼠

癌细胞体外生长及癌基因表达的影响[J].海南医学院学报,2017,23(6):728-731.

[4] 赵瑞娟,李宾.消癌平联合TACE术治疗老年原发性肝癌的疗效和生命质量的临床观察[J].中国实用医药,2016,11(27):3-5.

[5] 葛蕙心,畅继武.消癌平对人膀胱癌细胞体外生长作用的实验研究[J].临床合理用药杂志,2012,5(4B):86-87.

[6] 武阳.伊立替康单药与联合消癌平治疗老年晚期胃癌的比较研究[J].中国药房,2016,27(5):657-659.

[7] 国家食品药品监督管理总局.WS3-B-3959-98-2013 消癌平片[S]. 2014-01-08.

[8] 白爽,李奕诺,徐鑫,等.通关藤化学成分及药理活性研究进展[J].解放军药学学报,2015,31(3):260-264.

[9] 韩丽,张慧,康廷国,等.中药通关藤的研究进展[J].中华中医药学刊,2016,34(10):2329-2331.

[10] 王祁民,安静,李颖,等.UPLC-MS/MS法同时测定通关藤药材中3种皂苷的含量[J].中国药房,2018,29(8):1048-1051.

[11] 徐凯,乔佳,韩丽,等.HPLC法测定不同产地通关藤中通关藤苷G和I的含量[J].药物分析杂志,2016,36(4):607-610.

[12] 张慧,裴志东,姜欢,等.HPLC法同时测定乌骨藤中通关藤苷A和D的含量[J].药物分析杂志,2013,33(6):1037-1040.

[13] 谢丽艳,徐洁,戴国梁,等.HPLC同时测定消癌平注射液中7种主要成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(21):86-89.

[14] 张阿琴,张仓,梁敏钰.HPLC法测定消癌平注射液中5种酚酸的含量[J].药学与临床研究,2011,19(6):498-500.

[15] 方奕奇,孙雪梅.通关藤化学成分及抗肿瘤作用的研究进展[J].中国生化药物杂志,2011,32(2):165-167.

[16] 林耀才.乌骨藤总苷对SGC-7901、S180、P388肿瘤细胞的抑制作用研究[J].药学研究,2015,34(7):376-379.

[17] 邹渭洪,付成效,邓丽菁.乌骨藤总苷抑制肝癌细胞增殖和AFP分泌[J].中南医学科学杂志,2013,41(4):344-346.

[18] 常伟,李培培,袁平凡,等.乌骨藤总皂苷对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤的保护作用[J].中国新药杂志,2015,24(24):2835-2839.

[19] 国家食品药品监督管理局.WS-10630(ZD-0630)-2002-2011Z 消癌平注射液[S]. 2012-12-18.

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560725);贵州省科技计划项目(No.黔科合基础[2018]1071);贵州理工学院高层次人才科研启动项目(No. XJGC20141106)

\*副教授,博士。研究方向:中药化学成分及药效物质基础。电话:0851-88210126。E-mail:670566181@qq.com

#通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中西医结合防治脑血管疾病。E-mail:hqs0820@126.com

(收稿日期:2018-03-01 修回日期:2018-05-22)  
(编辑:余庆华)

# Effects of the Pretreatment of Total Flavonoids of *Caragana sinica* on the Permeability of Blood-brain Barrier in Focal Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Model Rats and Its Mechanism Study

ZHANG Yazhou<sup>1</sup>, HE Qiansong<sup>2</sup>, HU Feiran<sup>2</sup>, FAN Ziyuan<sup>2</sup> (1.College of Pharmacy, Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550002, China; 2.The Second School of Clinical Medicine, Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of the pretreatment of total flavonoids of *Caragana sinica* (TFC) on the permeability of blood-brain barrier in focal cerebral ischemia-reperfusion injury model rats, and to provide reference for further development and clinical treatment of cerebral ischemia stroke. METHODS: A total of 120 rats were randomly divided into sham operation group, model group, nimodipine group (positive control, 12.6 mg/kg) and TFC high-dose, medium-dose and low-dose groups (60, 30, 15 mg/kg), with 20 rats in each group. Administration groups were given relevant medicine intragastrically. Sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 7 d. 2 h after last intragastric administration, focal cerebral ischemia-reperfusion injury model was established by suture-occluded method in those groups except for sham operation group. 24 h after reperfusion, neurological deficit score was performed; 2, 3, 5-TTC staining was used to calculate the percent age of cerebral infraction area; the content of Evans blue was measured by spectrophotometer so as to investigate the permeability of blood-brain barrier. The expression of matrix metalloproteinases 9 (MMP-9), MMP-2 and blood-brain barrier closely linked protein (Claudin-5 and Occluding) in penumbra area of cerebral ischemic area were detected by Western blot. RESULTS: Compared with sham operation group, neurological deficit score, the percentage of cerebral infraction area, the content of Evans blue in cerebral tissue, the protein expressions of MMP-9 and MMP-2 in penumbra area of cerebral ischemic area were increased significantly ( $P < 0.01$ ); the protein expressions of Claudin-5 and Occluding in penumbra area of cerebral ischemic area were decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, above indexes of rats in each medicine group were all improved significantly except that the decrease of protein expression of MMP-2 in penumbra area of cerebral ischemic area was not significant in TFC low-dose group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: TFC can prevent focal cerebral ischemia-reperfusion injury of rats, improve neurological deficit and reduce cerebral ischemia area and the permeability of blood-brain barrier. The mechanism of it may be associated with inhibiting the expressions of MMP-9 and MMP-2, promoting the protein expressions of Claudin-5 and Occluding.

**KEYWORDS** Total flavonoids of *Caragana sinica*; Focal cerebral ischemia-reperfusion injury; Blood-brain barrier; Blood-brain barrier closely linked protein; Preventive effect; Rats

缺血性脑卒中是一种常见病、多发病,其发病率、致残率和致死率均很高<sup>[1]</sup>。目前,公认的唯一有效的治疗方法是急性期溶栓治疗,但溶栓后局部脑血流再通诱发再灌注损伤后导致的脑水肿是其常见的病理变化过程。然而,血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)的破坏可导致血管源性脑水肿,是脑缺血再灌注损伤后脑水肿发生的重要病理基础<sup>[2-3]</sup>。BBB紧密连接相关蛋白(Claudin-5和Occluding)是BBB的重要结构成分,其水平的高低与BBB的开放和关闭密切相关<sup>[4-5]</sup>。也有研究显示,脑缺血再灌注后基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMP)表达增多,其中MMP-9和MMP-2被认为是BBB损伤的标志物之一<sup>[6]</sup>。近年来,有研究报道中药黄酮类成分对BBB具有保护作用<sup>[7]</sup>,挖掘中药黄酮类成分治疗脑卒中中具有较好的开发前景。

锦鸡儿根又名金雀花根、板参、阳雀花根、土黄芪,是一种民间常用药,具有活血祛风、补气益肾之功,民间常用于治疗脑缺血疾病,其主要药效成分是锦鸡儿总黄酮(Total flavonoids in *Caragana sinica*, TFC)<sup>[8]</sup>。已有研究发现,TFC对脑缺血再灌注损伤有保护作用,可提高脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活性,降低丙二醛(MDA)含量,抑制血液黏度升

高,降低血小板聚集,改善红细胞变形能力<sup>[9-10]</sup>。本课题组前期研究证实,锦鸡儿根提取物具有显著抗缺血缺氧和抗疲劳能力<sup>[11-12]</sup>,对脑微血管内皮细胞有保护作用<sup>[13]</sup>。但TFC对脑缺血再灌注损伤后BBB的破坏是否具有保护作用,目前未见文献报道。为此,本研究采用大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型,探讨TFC对模型大鼠BBB通透性的影响及作用机制,为进一步开发和临床运用TFC治疗缺血性脑卒中提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

moorVMS-LDF激光多普勒血流仪(英国Moor instruments公司);Gemini XPS荧光酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];GelDoc 2000凝胶成像系统、Trans-Blot®转膜仪和垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 药品与试剂

TFC(由贵阳中医学院实验中心提取,批号:20160902,纯度:采用紫外分光光度法测定,以芦丁计含量为70.3%);尼莫地平片(拜耳医药保健有限公司,批号:20160823,规格:30 mg/片);伊文思蓝(Evansblue, EB)染料(上海恒远生物科技有限公司);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,美国Sigma公司);化学发光超敏反应

(ECL)试剂盒(美国Pierce公司,批号:36085);兔抗鼠MMP-9、MMP-2抗体(美国Cell Signaling Technology公司);兔抗鼠 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、兔抗Claudin-5、Occluding单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)-辣根过氧化物酶(HRP)抗体(北京索莱宝科技有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

### 1.3 动物

健康清洁级Wistar大鼠120只,♂,体质量(260±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001。购入后分笼饲养,自由饮水,饲养环境温度22~25℃、相对湿度为40%~60%。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

将120只大鼠随机分为6组:假手术组、模型组、尼莫地平组(阳性对照,12.6 mg/kg,根据临床用量的10倍剂量换算而得)和TFC高、中、低剂量组(60、30、15 mg/kg,分别根据临床用量的20、10、5倍剂量换算而得),每组20只。各给药组大鼠每天灌胃给药1次,连续给药7d;假手术组和模型组大鼠每天灌胃等量生理盐水。

### 2.2 造模

末次给药2h后,采用改良线栓法<sup>[14]</sup>制作局灶性脑缺血再灌注损伤模型。术前将大鼠禁食8h,用面罩吸入持续给予2%三氟氯溴乙烷、70%N<sub>2</sub>+30%O<sub>2</sub>混合气体将大鼠麻醉,固定在手术台上,沿颈部中线切开皮肤及皮下组织,分离出右侧的颈总动脉及其颈内和颈外动脉分枝,夹闭颈总动脉和颈外动脉,将线栓插入颈外动脉,经颈外动脉和颈内动脉分叉处进入颈内动脉至大脑中动脉,插入深度约(18.5±0.5)mm,用激光多普勒血流仪监测脑血流,以血流值下降至进线栓时也不再变化为止,并在整个阻塞过程中用动脉夹夹闭颈总动脉,使脑血流保持在阻塞水平,造成局灶性脑缺血。缺血90min后间断式拔出线栓至颈外动脉切口处,直至线栓拔出之后用激光多普勒血流仪进行监测,当显示脑血流缓慢恢复至接近基础值时,再次缝合皮肤,消毒。假手术组大鼠除不栓线外其余操作均同模型组。手术过程中和术后大鼠均置于电热恒温板[(37±0.5)℃]上保温,密切观察生命体征,待大鼠麻醉清醒后放入饲养笼中,20~25℃恒温条件下饲养,自由进食进水。

### 2.3 神经功能缺损评分

观察大鼠缺血再灌注24h后的行为表现,参照文献方法<sup>[15]</sup>对神经功能缺损进行评分:0分,无神经功能缺损症状;1分,轻微神经功能缺损,不能完全伸展左侧前爪;2分,中度局灶性神经功能缺损,向左侧转圈;3分,重度局灶性神经功能缺损,向左侧倾倒;4分,意识丧失,不能行走。

### 2.4 脑梗死面积测定

缺血再灌注24h后,各组随机选取6只大鼠麻醉,迅

速断头取出完整脑组织放入脑槽中(-80℃)速冻3min,从额极至枕极连续切取厚度为2mm的冠状脑片,浸于2%TTC溶液中,避光,37℃恒温孵育30min。梗死区域脑组织呈白色,而周围正常脑组织呈红色。然后用4%的中性甲醛固定,数码相机拍摄图像后,运用图像分析软件(Image ProPlus 6.0)分别测出每片脑组织的梗死面积,最后计算出脑梗死面积百分比[脑梗死面积百分比(%)=脑梗死面积/总面积×100%]。

### 2.5 BBB通透性检测

缺血再灌注24h后,各组取6只大鼠,从尾静脉注射2%EB溶液(4mL/kg),麻醉后打开胸腔暴露心脏,剪开右心耳,经左心室灌注生理盐水清除血管内血液和EB至右心耳流出液体清亮为止,断头取脑,称取适量脑组织放入甲酰胺溶液中充分破碎(每100mg脑组织加入1mL甲酰胺),然后将组织匀浆液置于60℃恒温水浴中孵育24h,取出一份匀浆液于4℃条件下以12000×g离心10min,取上清液200μL加入96孔酶标板中,在酶标仪上测定630nm波长处的吸光度(A)值。脑组织中EB含量(μg/g)=待测样品中EB含量(μg/mL)×甲酰胺量(mL)/脑组织湿质量(g)。待测样品中EB含量根据前期已制备的标准曲线计算出。

### 2.6 脑缺血半暗带区MMP-9、MMP-2、Claudin-5和Occluding蛋白表达检测

采用Western blot法。脑缺血再灌注24h后,各组取8只大鼠麻醉,取缺血区脑组织,称量100mg,放于无菌的EP管中,用Western blot及IP细胞裂解液浸泡,匀浆,然后在4℃条件下以12000×g离心10min,取上清液,用蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量后调整样品浓度。取50μg蛋白样品上样,进行电泳(浓缩胶恒压80V,约40min;分离胶恒压120V,电泳至溴酚蓝到凝胶底部)、转膜(恒流300mA,冰浴转膜2h)、封闭(TBST溶解的5%脱脂奶粉,pH7.5),室温轻摇90min,加入相应抗体MMP-9(1:1000)、MMP-2(1:1000)、Claudin-5(1:500)、Occluding(1:1000)及内参 $\beta$ -actin(1:1000),然后4℃孵育过夜。洗膜后用封闭液将羊抗兔IgG-HRP二抗稀释(1:5000),然后37℃恒温孵育90min,加显影和定影试剂,X射线胶片显像,扫描。应用Image J分析软件分析目的条带和内参条带的灰度值,以目的条带与内参条带的灰度值比值对MMP-9、MMP-2、Claudin-5和Occluding蛋白表达进行半定量分析。

### 2.7 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 大鼠神经功能缺损评分和脑梗死面积百分比测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分以

及脑梗死面积百分比均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠的神经功能缺损评分和脑梗死面积百分比均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且具有一定的TFC量效关系。各组大鼠神经功能缺损评分和脑梗死面积百分比测定结果见表1。

表1 各组大鼠神经功能缺损评分和脑梗死面积百分比测定结果( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 1 Results of neurological deficit score and the percentage of cerebral infraction area in rats in each group( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量,mg/kg	神经功能缺损评分(n=20)	脑梗死面积百分比,%(n=6)
假手术组		0	0
模型组		3.7±0.5**	33.35±3.75**
尼莫地平组	12.6	1.5±0.7##	20.78±3.55##
TFC高剂量组	60	1.7±0.6##	20.56±2.73##
TFC中剂量组	30	2.5±0.6##	26.25±2.50##
TFC低剂量组	15	2.9±0.8#	29.38±2.32#

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

### 3.2 BBB通透性测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中EB含量显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠脑组织中EB含量均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且具有一定的TFC量效关系。各组大鼠脑组织中EB含量测定结果见表2。

表2 各组大鼠脑组织中EB含量测定结果( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Tab 2 Content determination of EB in cerebral tissue in rats in each group( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量,mg/kg	EB含量, $\mu\text{g/g}$
假手术组		75.3±3.5
模型组		84.6±3.8**
尼莫地平组	12.6	76.5±4.8##
TFC高剂量组	60	76.7±5.5##
TFC中剂量组	30	79.6±3.7##
TFC低剂量组	15	80.5±4.6#

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

### 3.3 脑缺血半暗带区MMP-9、MMP-2、Claudin-5和Occluding蛋白表达水平测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠脑缺血半暗带区MMP-9、MMP-2蛋白表达水平显著升高,Claudin-5、Occluding蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,除TFC低剂量组大鼠脑缺血半暗带区MMP-2蛋白表达水平降低不显著外,其余各组大鼠上述指标均显著改善( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组大鼠脑缺血半暗带区MMP-9、MMP-2、Claudin-5和Occluding蛋白表达的电泳图见图1,测定结果见表3。

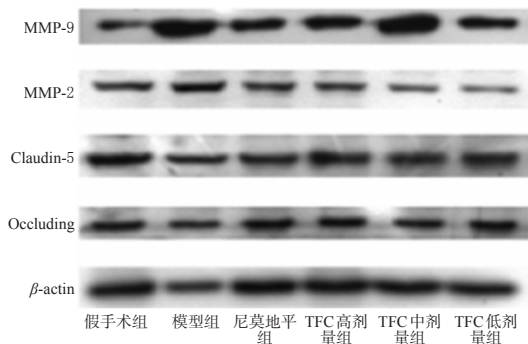


图1 各组大鼠脑缺血半暗带区MMP-9、MMP-2、Claudin-5和Occluding蛋白表达的电泳图( $n=8$ )

Fig 1 Electropherograms of protein expression of MMP-9, MMP-2, Claudin-5 and Occluding in penumbra area of cerebral ischemic area in rats in each group( $n=8$ )

表3 各组大鼠缺血半暗带区MMP-9、MMP-2、Claudin-5和Occluding蛋白表达水平测定结果( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Tab 3 Protein expressions of MMP-9, MMP-2, Claudin-5 and Occluding in penumbra area of cerebral ischemic area in rats in each group( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	MMP-9/ $\beta$ -actin	MMP-2/ $\beta$ -actin	Claudin-5/ $\beta$ -actin	Occluding/ $\beta$ -actin
假手术组	0.101±0.017	0.097±0.021	0.154±0.017	0.165±0.026
模型组	0.281±0.026**	0.176±0.015**	0.087±0.015**	0.085±0.022**
尼莫地平组	0.165±0.018##	0.158±0.023#	0.106±0.021##	0.123±0.018##
TFC高剂量组	0.172±0.025##	0.125±0.054##	0.115±0.023##	0.117±0.015##
TFC中剂量组	0.203±0.014#	0.132±0.06##	0.118±0.205##	0.134±0.016##
TFC低剂量组	0.196±0.032#	0.165±0.028	0.096±0.013#	0.108±0.025#

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

## 4 讨论

BBB是脑毛细血管壁与神经胶质细胞形成的血浆与脑细胞之间的屏障和由脉络丛形成的血浆和脑脊液之间的屏障,这些屏障能够阻止大分子物质由血液进入脑组织,对脑组织内环境的稳定起重要作用<sup>[6]</sup>。因此, BBB完整性的破坏导致其通透性改变是脑缺血再灌注损伤的重要病理基础。

脑缺血再灌注损伤导致BBB破坏的病理机制复杂, MMP是分解细胞外基质的蛋白水解酶类中最重要的一类,参与体内众多的生物学反应,包括动脉粥样硬化、炎症、肿瘤生长及转移等,其中MMP-2和MMP-9是MMPs家族的主要成员。有研究发现,MMP-2、MMP-9在急性大脑中动脉闭塞患者中的表达水平高低与脑梗死面积百分比大小具有显著相关性<sup>[7]</sup>;大鼠大脑中动脉闭塞12 h后MMP-9水平显著升高,脑梗死面积百分比和神经功能缺损评分均越高<sup>[8]</sup>。另有报道指出,脑出血24 h后

MMP-9、MMP-2水平显著升高,脑组织中含水量显著增加,当给予MMP-9抑制剂后脑组织中含水量显著减少<sup>[19]</sup>,可见MMP-2、MMP-9所致的BBB破坏在缺血性脑卒中的病理变化中起着关键作用。MMP-2和MMP-9通过分解细胞外基质IV型胶原、层黏连蛋白和纤维连接蛋白导致BBB构成成分的变化,如BBB的重要构成成分紧密连接相关蛋白(Claudin-5和Occluding)的表达及其位置分布的异常均可破坏紧密连接的完整性,从而引起BBB通透性的改变<sup>[20]</sup>。Claudin-5、Occluding蛋白表达发生变化时,BBB的功能可能随之改变,Claudin-5、Occluding蛋白表达水平下降的程度可作为BBB损伤程度的标志<sup>[21]</sup>。尼莫地平是一种经典的Ca<sup>2+</sup>通道阻滞药,可抑制平滑肌收缩,有效缓解脑血管痉挛,扩张脑血管,增加脑血流量,改善BBB通透性,故本研究以其为阳性对照药。本研究结果显示,TFC预处理可降低大鼠脑缺血再灌注损伤后神经功能缺损评分和脑梗死面积百分比,可抑制脑缺血再灌注后MMP-2、MMP-9蛋白的表达和促进Claudin-5和Occluding蛋白的表达。

综上所述,TFC对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有一定的预防作用,可降低BBB的通透性。其作用机制可能与抑制MMP-2、MMP-9蛋白的表达,促进Claudin-5和Occluding蛋白的表达有关,这为进一步阐明锦鸡儿在缺血性脑卒中具有神经保护作用提供了一定的实验基础。

#### 参考文献

[1] DING J, ZHOU D, SUI M, et al. The effect of normobaric oxygen in patients with acute stroke: a systematic review and meta-analysis[J]. *Neural Res*, 2018. DOI: 10.1080/01616412.2018.1454091.

[2] ZHENG YP, WANG FX, ZHAO DQ, et al. Predictive power of abnormal electroencephalogram for post-cerebral infarction depression[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(2): 304-308.

[3] HALEY MJ, LAWRENCE CB. The blood-brain barrier after stroke: structural studies and the role of transcytotic vesicles[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(2): 456-470.

[4] YANG Y, KIMURA-OHBA S, THOMPSON JF, et al. Vascular tight junction disruption and angiogenesis in spontaneously hypertensive rat with neuroinflammatory white matter injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2018. DOI: 10.1016/j.nbd.

[5] SUN J, YU L, HUANG S, et al. Vascular expression of angiopoietin1,  $\alpha 5 \beta 1$  integrin and tight junction proteins is tightly regulated during vascular remodeling in the post-ischemic brain[J]. *Neuroscience*, 2017, 24(362): 248-256.

[6] ZHANG S, AN Q, WANG T, 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. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.035.

[7] 陈峰, 袁媛, 李泽友, 等. 黄酮类化合物组织分布研究进展

[J]. *中国药房*, 2007, 18(30): 2379-2382.

[8] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 392.

[9] 李媛媛, 石任兵, 岳永花, 等. 小叶锦鸡儿总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(24): 273-277.

[10] 康亚男, 李媛媛, 岳永花. 小叶锦鸡儿总黄酮提取工艺研究及对脑缺血再灌注损伤大鼠的作用[J]. *药物评价研究*, 2013, 36(1): 22-25.

[11] 何前松, 何峰, 蒲翔, 等. 阳雀花根提取物对小鼠抗缺血缺氧能力的影响[J]. *贵州农业科学*, 2012, 40(2): 115-116.

[12] 何前松, 何峰, 冯泳. 阳雀花根提取物对小鼠抗运动疲劳能力的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(2): 177-180.

[13] HE QS, ZHANG L, FAN ZY, et al. Protective effects of total flavonoids in Caragana against hypoxia/reoxygenation-induced injury in human brain microvascular endothelial cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.

[14] HE Q, WANG S, LIU X, et al. Salvianolate lyophilized injection promotes post-stroke functional recovery via the activation of VEGF and BDNF-TrkB-CREB signaling pathway in T1DM-MCAO rats[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(1): 108-122.

[15] FENG SQ, AA N, GENG JL, et al. Pharmacokinetic and metabolomic analyses of the neuroprotective effects of salvianolic acid A in a rat ischemic stroke model[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(11): 1435-1444.

[16] BEHROUZIFAR S, VAKILI A, BANDEGI AR, et al. Neuroprotective nature of adipokine resistin in the early stages of focal cerebral ischemia in a stroke mouse model[J]. *Neurochem Int*, 2018. DOI: 10.1016/j.neuint.

[17] YANG Y, ROSENBERG GA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke[J]. *Brain Res*, 2015, 14(162): 30-38.

[18] ZHANG Y, ZHANG P, SHEN X, et al. Early exercise protects the blood-brain barrier from ischemic brain injury via the regulation of MMP-9 and occludin in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 11096-11112.

[19] REUTER B, RODEMER C, GRUDZENSKI S, et al. Effect of simvastatin on MMPs and TIMPs in human brain endothelial cells and experimental stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(2): 156-159.

[20] ZHANG YM, XU H, SUN H, et al. Electroacupuncture treatment improves neurological function associated with regulation of tight junction proteins in rats with cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015. DOI: 10.1155/2015/898474.

[21] YANG F, ZHOU L, WANG D, et al. Minocycline ameliorates hypoxia-induced blood-brain barrier damage by inhibition of HIF-1 $\alpha$  through SIRT-3/PHD-2 degradation pathway[J]. *Neuroscience*, 2015, 24(304): 250-259.

(收稿日期: 2018-03-05 修回日期: 2018-05-09)

(编辑: 林 静)