

## 丹酚酸 B 对缺糖缺氧/复糖复氧的体外血脑屏障模型的影响\*

何吉洪,杨海洋,龙江<sup>△</sup>

(昆明医科大学第一附属医院神经外科,昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 探讨丹酚酸 B 对体外血脑屏障缺糖缺氧/复糖复氧的保护作用。**方法** 利用人脑微血管内皮细胞与 C6 细胞非接触共培养建立体外血脑屏障模型并分为正常组、实验组和给药组。利用无糖 Earle's 液代替培养液在 93% N<sub>2</sub>、2% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 2 h 模拟缺糖缺氧环境。辣根过氧化物酶通透性实验检测血脑屏障通透性变化。免疫荧光和电子显微镜观察紧密连接变化情况。**结果** 给药组对辣根过氧化物酶的通透性明显低于实验组 ( $P < 0.05$ ); 免疫荧光和超微结构图片显示正常的紧密连接连续和致密, 而实验组紧密连接中断和疏松, 给药组介于二者之间。**结论** 丹酚酸 B 能直接保护缺糖缺氧/复糖复氧引起的血脑屏障破坏和降低通透性, 为丹酚酸 B 对血脑屏障的保护机制提供的研究基础。

**[关键词]** 丹酚酸 B; 血脑屏障; 缺氧**[中图分类号]** R743.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)33-4611-04

## The influence of salvianolic acid B to blood brain-barrier with oxygen/glucose deprivation and reintroduction in vitro\*

He Jihong, Yang Haiyang, Long Jiang<sup>△</sup>

(Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the influence of salvianolic acid B (SalB) to blood brain-barrier (BBB) in vitro oxygen/glucose deprivation and reintroduction. **Methods** We used the human brain microvascular endothelial cells and C6 cells to build BBB model that in vitro, and the models was divided into normal groups, experiment groups, treatment groups. The Earle's liquid and the condition of 93% N<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> replaced the normal culture environment to simulate environment of oxygen/glucose deprivation and reintroduction. The changes of BBB permeability was detected by the horseradish peroxidase permeability test. The tight junctions (TJs) was detected by immunofluorescence and electron microscope. **Results** The permeability of treatment group was significantly lower than the experiment group ( $P < 0.05$ ); The TJs of normal group was continuous and density; the experiment group's TJs was interruption and osteoporosis; and the observation of treatment group's TJs was between of the two group above. **Conclusion** The SalB can directly protect the BBB during oxygen/glucose deprivation and reintroduction, and decrease the permeability. The investigation also provided the research foundation for the SalB to protect the BBB.

**[Key words]** salvianolic acid B; blood brain-barrier; anoxia

缺血再灌注损伤是创伤、扩血管治疗、溶栓治疗、介入治疗和休克复苏治疗后再损伤的主要病理基础<sup>[1]</sup>。脑组织对缺血很敏感, 尤其是神经元, 越来越多的研究表明血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 对缺血也十分敏感<sup>[2-3]</sup>。在脑缺血随后的灌注中, BBB 内皮细胞产生大量的活性氧和自由基可引起血脑屏障的紧密连接破坏, 血管内液体外渗, 导致脑水肿从而加重脑缺血<sup>[1,4-5]</sup>。BBB 是脑组织中的毛细血管, 将脑组织和血液分隔开, 稳定和维持了脑组织特定的微环境。血液成分要通过 BBB 可经过跨细胞途径和细胞旁途径, 后者由内皮细胞间的紧密连接控制。紧密连接由 occludin, claudin5, ZO-1, ZO-2, ZO-3 及辅助蛋白组成, 受细胞内多条信号通路精确控制, 调节 BBB 的通透性<sup>[6-8]</sup>。

丹酚酸 B 是从中药丹参提取的主要活性成分, 分子式为: C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>, 能透过 BBB, 因其含有酚羟基, 具有很强的抗氧化和清除自由基的作用, 是治疗缺血性脑病代表性化合物<sup>[9-10]</sup>。有研究表明, 丹酚酸 B 通过抑制 MAPK 通路减轻大鼠脑缺血再灌注引起的 BBB 损伤<sup>[10]</sup>。该研究应用了动物的活体模型证实了丹酚酸 B 对 BBB 的保护效应, 然而缺血再灌注损伤中是一个多环节的过程, 其中涉及免疫细胞、炎症因子等参与, 故丹酚酸 B 对 BBB 的保护作用体现在免疫抑制还是

内皮细胞功能调节还有待进一步研究。本研究拟建立体外 BBB 模型通过缺糖缺氧/复糖复氧处理模拟缺血再灌注过程, 观察丹酚酸 B 对 BBB 的直接保护作用。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** 人脑微血管内皮细胞 (HBMEC, 上海通派生物技术有限公司), C6 细胞 (昆明市延安医院中心实验室), DMEM/F12 培养基 (美国 Invitrogen 公司), 胎牛血清 (杭州四季青有限公司), 双抗 (石家庄中诺药业有限公司), Transwell 插槽 (1.0 μm 孔径, 美国 Corning 公司), 人 Occludin 抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 丹酚酸 B (上海远慕生物科技有限公司), 辣根过氧化物酶 (HRP, 上海生工生物公司)。

**1.2 方法**

**1.2.1 细胞培养** 将冻存于液氮中的脑微血管内皮细胞和 C6 细胞取出迅速放入事先预热的 40 °C 水浴箱中快速溶解 (1 min 内完成该步骤), 在无菌操作台内将冻存管中的细胞分别移入 25 mL 培养瓶中, 每瓶加入预先配制的 DMEM/F12 培养液, 其中含 10% 胎牛血清、1% 双抗, 放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养, 24 h 换液, 每天在光镜下观察细胞生长情况, 隔天换液, 传代培养至后续实验所需细胞总量。

**1.2.2 BBB 模型建立和分组** 本实验参照 Untucht 等<sup>[11]</sup>通

过 C6 和 HBMEC 细胞构建体外 BBB 的方法。将培养瓶中培养的脑微血管内皮细胞用 0.05% 的胰酶消化、离心和计数。首先将 12 孔 Transwell 插槽按说明书插入 12 孔培养板并使底面悬空,分别向插槽内外加入 DMEM/F12(含 10% 血清)的细胞培养液。再将 HBMEC 以  $2.0 \times 10^5$  /mL 接种于插槽上室中,将 C6 细胞  $0.5 \times 10^5$  /mL 接种于插槽下的 12 孔板底,保持插槽内外液面相平。待内皮细胞生长融合后通过 4 h 试漏实验初步确定 BBB 模型成立<sup>[12]</sup>。所建 BBB 模型分为 3 个组:正常组、实验组、给药组,每组 3 个复孔。其中正常组不作任何处理。实验组待 BBB 初步成立后第 2 天放入特定的培养环境(5% CO<sub>2</sub>、2% O<sub>2</sub> 和 93% N<sub>2</sub>)并用无糖 Earle's 液代替培养液孵育 2 h 然后放回正常环境更换培养液继续培养。给药组缺氧处理同实验组,在实验组更换为正常环境时每孔加入 10 mg/L 丹酚酸 B(其余组加等量的培养液)在 Transwell 上室。

**1.2.3 HRP 通透性实验** 以实验组恢复正常环境后培养 24 h 和 72 h 为测量时间点测量各组对 HRP 的通透性。参照冯洁等<sup>[13]</sup>报道的方法,在加入丹酚酸 B 时,弃 Transwell 插槽原有的细胞培养液,然后在插槽上室中加入含有 HRP 500 ng 的通透性实验用培养液(无酚红 DMEM)培养基,其余成分相同)460  $\mu$ L,受池中加入相同培养基 1 140  $\mu$ L,使细胞插槽内外液面相平,以消除液面差产生的静压力对通透性的影响。放回培养箱中继续培养,于 24 h 和 72 h 为时间点,从插槽下室中各取样 50  $\mu$ L(同时向下室补充 50  $\mu$ L 相同培养液),放入 96 孔培养板中,取样结束后,每孔加入二甲基联苯胺溶液和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液各 50  $\mu$ L,显色 10 min,加入 50  $\mu$ L 浓度为 1 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(A)值;取 HRP 10 ng/mL,用无酚红 DMEM 培养基倍比稀释,同法显色并测定 A 值,绘制浓度对应 A 值的标准曲线。因为 A 值与

HRP 浓度(C)具有良好的线性关系,线性方程为  $A = 0.381 1C + 0.098 1$ ,  $R^2 = 0.996 9$ ,因而根据各个样品测得的 A 值,利用标准曲线公式计算各组细胞 HRP 通透率。HRP 通透率(%) = [受池 HRP 浓度(ng/mL) × 受池培养液体积(mL)] / [供池 HRP 浓度(ng/mL) × 供池培养液体积(mL)] × 100%。

**1.2.4 免疫荧光和透射电镜观察内皮细胞间紧密连接** 取加入丹酚酸 B 后 72 h 的 3 组模型,用手术刀片将 Transwell 完整切下,用 PBS 液清洗 3 次,4% 的多聚甲醛固定 15 min, PBS 清洗 3 次,加入 1% 用 pH=7.2 的 PBS 配置小牛血清封闭 20 min, PBS 清洗 3 次,分别加入一抗(鼠抗人多克隆咬合蛋白 Occludin 抗体,浓度均为 1:50),4℃ 下过夜,对照组用 PBS 代替一抗,其余条件相同;次日,用 PBS 将一抗洗净,室温下加入适当浓度的二抗(TRITC 标记的山羊抗鼠 IgG,浓度为 1:50,北京中杉公司),室温下避光浮育 40~60 min 后,用 PBS 将二抗彻底洗净,然后将细胞置于荧光显微镜下检测各组模型上的表达情况。同时取各组模型,将插入器中内皮细胞层完整切下,用 2.5% 的戊二醛固定 60 min,经 PBS 清洗,脱水,包埋等处理后,透射电镜检查。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件包进行统计学处理,组间比较采用单因素方差分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 4 h 试漏实验** 在光学显微镜下观察 HBMEC 培养至汇合后,所有 BBB 模型相对于未接种任何细胞的 Transwell 小室空白组均保持大于 0.5 cm 的液面差,说明该体外 BBB 模型均具备一定的屏障功能,继续在正常环境培养 24 h 后可进行接下来的分组处理操作,见图 1。

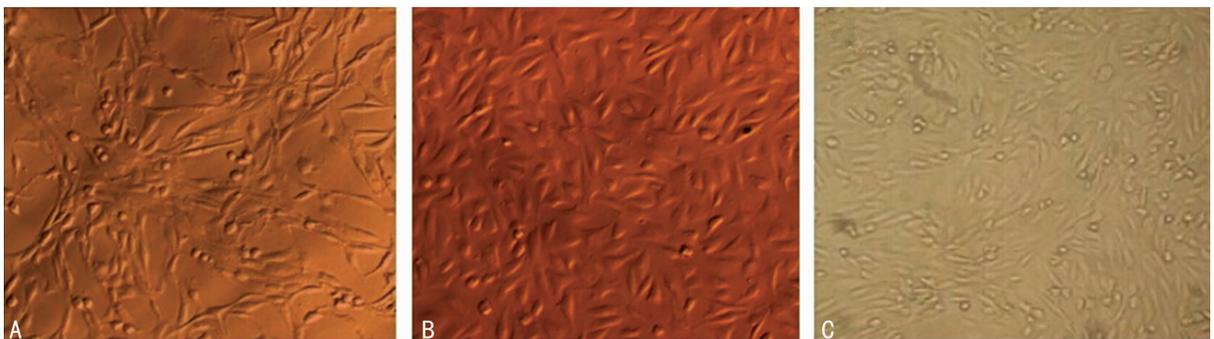


图 1 细胞的生长情况(×400)

**2.2 HRP 通透性试验结果** 正常组对 HRP 的通透率 24 h 和 72 h 分别为  $(9.84 \pm 1.75)\%$  和  $(12.88 \pm 1.65)\%$ , 给药组为  $(18.52 \pm 1.83)\%$  和  $(25.61 \pm 2.86)\%$ , 实验组为  $(23.32 \pm 2.51)\%$  和  $(48.73 \pm 3.32)\%$ 。对 HRP 的通透率在同一时间点实验组 > 给药组 > 正常组,随着时间的增加,给药组和实验组之间通透率差距增大( $F = 100.247$ ,  $P = 0.000$ ),见图 2。

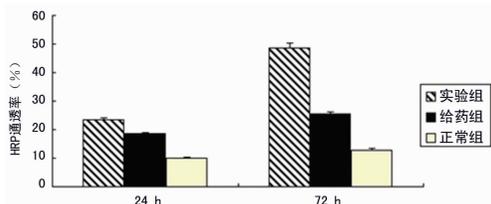
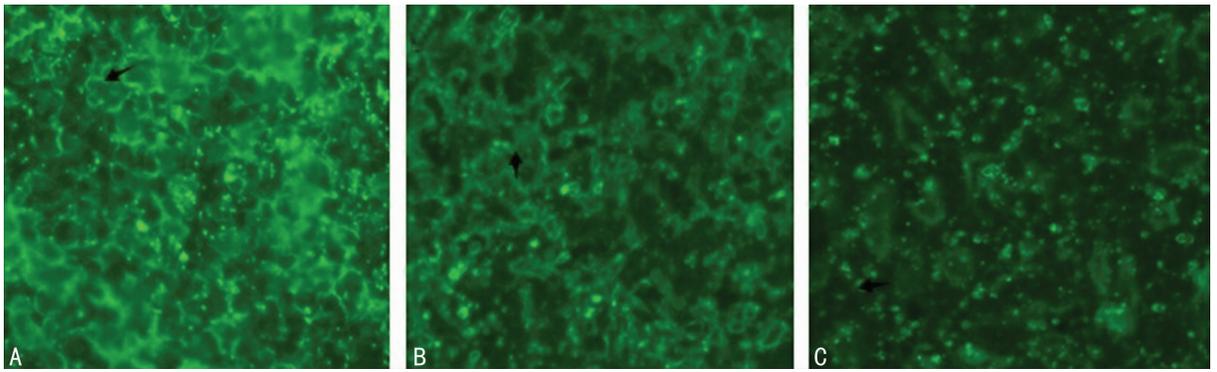


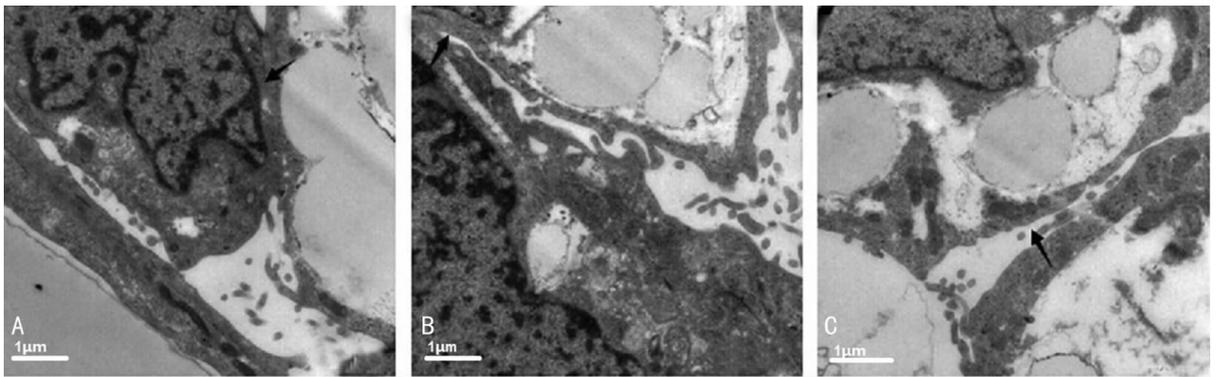
图 2 3 组体外 BBB 模型对 HRP 的通透率变化情况

**2.3 体外 BBB 的形态学变化结果** 3 组体外 BBB 模型经过上述处理 72 h 后在荧光显微镜下表现出各自的特点。正常组:血管内皮细胞边缘清晰、连续,彼此连接紧密呈蜂窝状高亮度荧光(图 3A);给药组:血管内皮细胞边缘部分清晰、连续,彼此之间连接欠紧密亮度较正常组稍弱(图 3B);实验组:血管内皮细胞边缘不清、不连续,彼此之间连接疏松亮度最弱(图 3C)。同一时间点 3 组模型在电镜下紧密连接超微结构也表现不同。正常组:内皮细胞间连接紧密,无间距,胞质内富含粗面内质网,游离核糖体减少(图 4A);给药组:内皮细胞间连续出现裂隙,间距较小,胞质内富含粗面内质网,游离核糖体较正常组多(图 4B);实验组:内皮细胞间裂隙明显连接疏松,间距较大,胞质内含内质网稀少,有大量包涵体(图 4C)。形态学结果表明,正常组体外 BBB 结构最完整紧密,给药组次之,实验组破坏明显。



A: 正常组; B: 给药组; C: 实验组。

图 3 3 组模型免疫荧光 Occludin 的表达情况 (×400)



A: 正常组; B: 给药组; C: 实验组。

图 4 3 组模型电镜下紧密连接超微结构情况 (×25 000)

### 3 讨 论

本研究主要探讨丹酚酸 B 对体外 BBB 的保护作用。在体状态对 BBB 的研究受诸多因素影响,不利于分析内皮细胞对紧密连接调节机制。体外建立 BBB 在以往有很多报道,最早的是应用一种血管内皮细胞建立,逐渐改进的有内皮细胞和星型胶质细胞二联及加入周细胞后的三联 BBB 模型,其中以三联 BBB 模型最能模拟在体情况<sup>[12]</sup>。由于周细胞的获得困难,本研究应用 C6 和 HBMEC 非接触共培养建立体外 BBB 模型,虽然不如三联 BBB 模型接近在体状态,但是并不影响实验结果,同时又具有较好的重复性和快捷性。

脑缺血再灌注是一个缺糖缺氧/复糖复氧的过程,能破坏 BBB,导致大量液体外渗引起脑损伤。在分子层面, BBB 的屏障功能体现在紧密连接的完整性,其中咬合蛋白 Occludin 是紧密连接的主要成分,对屏障功能起到关键作用<sup>[14-15]</sup>。本研究采用体外 BBB 模型在缺糖缺氧条件下培养来模拟在体状态下的脑缺血再灌注过程,从实验组结果可以看出 BBB 通透性明显高于正常组, Occludin 免疫荧光显示 Occludin 蛋白表达下降,紧密连接不完整,表明 BBB 破坏。

丹酚酸 B 是治疗缺血性脑病药物丹参的主要成分。在大鼠脑缺血再灌注模型中,丹酚酸 B 可能通过抑制 MAPK 通路,从而抑制 MMP-9 和一氧化氮合成酶的表达,减少血管内免疫球蛋白的渗出<sup>[10]</sup>。同时,丹酚酸 B 还能抑制血管内皮生长因子(VEGF)引起的大鼠脑血管通透性增加<sup>[5]</sup>。血管的通透性与 VEGF 有着密切的关系, VEGF 作用于血管内皮细胞的血管内皮生长因子受体(VEGFR)诱导内皮细胞间的紧密连接中的 Occludin 磷酸化,导致其随后的泛素化进而通过泛素-蛋白酶系统介导其降解,使血管通透性增加<sup>[16]</sup>。血管内皮细胞间的通透性一部分是通过细胞与细胞间的黏附连接的动态开放和关闭,血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)是黏附分子最主

要组成成分。VEGF 作用于血管内皮细胞可通过诱导血管内皮钙黏蛋白的络氨酸磷酸化,导致血管通透性增加和细胞的外渗<sup>[17]</sup>。VEGF 作用于血管内皮细胞也可通过血管内皮钙黏蛋白的胞内保守的区域的丝氨酸-苏氨酸磷酸化来募集 β-arrestin2,介导血管内皮钙黏蛋白可逆性内吞,促进血管的通透性增加,该过程依赖于 VEGFR2-Src-Vav2-Rac-PAK 信号轴,其中 Vav2 为鸟嘌呤交换因子(GEF),PAK 为血管内皮钙黏蛋白的丝、苏氨酸蛋白激酶<sup>[18]</sup>。以上研究都证实丹酚酸 B 对 BBB 的保护作用。然而,在体内试验中,脑缺血再灌注引起的 BBB 破坏有大量炎症因子的参与和对 BBB 基底膜的降解<sup>[10,19]</sup>。因此,在体内试验难以从血管内皮细胞紧密连接的调控机制上对丹酚酸 B 保护 BBB 作出进一步解释。本研究通过体外 BBB 的建立,避免了体内复杂的影响因素,探讨丹酚酸 B 对缺糖缺氧/复糖复氧条件下对 BBB 的保护作用。从 BBB 通透性实验结果中,缺糖缺氧/复糖复氧处理后 24 h 后对 HRP 的通透性给药组稍低于实验组,而 72 h 后给药组则明显低于实验组,说明丹酚酸 B 对 BBB 的保护作用是一个逐渐的过程,且效果明显。从形态学角度分别比较了 3 组模型光镜下结构和超微结构。结果显示,给药组从免疫荧光和电镜结构观察,紧密连接的完整性和 Occludin 的表达量都要优于实验组,但又弱于正常组紧密连接的完整性和 Occludin 的表达量。说明丹酚酸在一定程度上能直接保护 BBB,并能通过内皮细胞的调控机制影响紧密连接关键蛋白的表达量。

综上,通过体外建立了 BBB 模型,并利用这种模型分析了丹酚酸 B 对其在缺糖缺氧/复糖复氧环境下的保护作用,为丹酚酸 B 保护 BBB 的机制提供了研究基础,为脑缺血再灌注损伤的治疗提供了实验依据。

## 参考文献

- [1] 韩晶岩,樊景禹,郭治昕,等. 丹参对缺血再灌注引起的微循环障碍和靶器官损伤的多环节改善作用[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2008,20(3):87-93.
- [2] Krizbai IA, Bauer H, Bresgen N, et al. Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2005, 25(1): 129-139.
- [3] 汪芸,蒋玉凤,黄启福,等. 丹酚酸 B 保护缺糖缺氧/复糖复氧神经元的作用机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 15(2): 275-279.
- [4] Reischl S, Li L, Walkinshaw G, et al. Inhibition of HIF prolyl-4-hydroxylases by FG-4497 reduces brain tissue injury and edema formation during ischemic stroke [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84767.
- [5] 邱彦,芮耀诚,张黎,等. 血管内皮生长因子对大鼠脑血管通透性的影响及丹酚酸 B 对其抑制作用[J]. 解放军药理学学报, 2002, 31(1): 17-18, 72.
- [6] Tang Y, Jacobi A, Vater C, et al. Salvianolic acid B protects human endothelial progenitor cells against oxidative stress-mediated dysfunction by modulating Akt/mTOR/4EBP1, p38 MAPK/ATF2, and ERK1/2 signaling pathways[J]. *Bioc Phar*, 2014, 90(1): 34-49.
- [7] Yu H, Wang P, An P, et al. Recombinant human angiotensin-1 ameliorates the expressions of ZO-1, occludin, VE-cadherin, and PKC $\alpha$  signaling after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2012, 46(1): 236-247.
- [8] Willis CL, Meske DS, Davis TP. Protein kinase C activation modulates reversible increase in cortical blood-brain barrier permeability and tight junction protein expression during hypoxia and posthypoxic reoxygenation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(11): 1847-1859.
- [9] 张文静,曹琦琛,曹珂,等. 丹酚酸 B 的药理学研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 14(7): 608-612, 624.
- [10] Li Q, Han LP, Li ZH, et al. Salvianolic acid B alleviate the disruption of blood-brain barrier in rats after cerebral ischemia-reperfusion by inhibiting MAPK pathway[J]. *Yao Res*, 2007, 17(1): 13-19.
- [11] Untucht C, Rasch J, Fuchs E, et al. An optimized in vitro blood-brain barrier model reveals bidirectional transmigration of African trypanosome strains[J]. *Microbiology*, 2011, 157(10): 2933-2941.
- [12] 杨海洋,蔡理,龙江,等. 应用 U251 胶质瘤细胞、脑内皮细胞和周细胞体外构建血瘤/脑屏障模型的研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(20): 2613-2616, 2619.
- [13] 冯洁,叶丽亚,张文健,等. 人血脑屏障体外实验模型的建立及缺氧-复氧对其通透性的影响[J]. 中国医药生物技术, 2008, 17(2): 109-115.
- [14] Xu Y, Che H, Liu M, et al. Changes and regulatory mechanism of tight junction proteins in in vitro model of lead-induced blood-brain barrier injury[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2013, 29(11): 1141-1146.
- [15] Wacker BK, Freie AB, Perfater JL, et al. Junctional protein regulation by sphingosine kinase 2 contributes to blood-brain barrier protection in hypoxic preconditioning-induced cerebral ischemic tolerance [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(6): 1014-1023.
- [16] Murakami T, Felinski EA, Antonetti DA. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(31): 21036-21046.
- [17] Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 13): 2115-2122.
- [18] Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(11): 1223-1234.
- [19] Mccoll BW, Rothwell NJ, Allan SM. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice[J]. *J Neur*, 2008, 28(38): 9451-9462.
- (收稿日期:2015-07-25 修回日期:2015-09-10)
- (上接第 4610 页)
- 乌鲁木齐:新疆人民卫生出版社,2008:7-46.
- [2] 解好群,夏刚,金远林,等. 不同海拔青年人肺功能和血氧饱和度测定[J]. 高原医学杂志, 2001, 11(3): 47-48.
- [3] 陆保革,郭志坚,黄慧群,等. 高原地区室内空气弥散给氧对血氧饱和度和心率的影响[J]. 高原医学杂志, 2008, 18(3): 5-7.
- [4] 王琰,何湘,罗佳,等. 急进不同海拔高原人员的血氧饱和度、心率及血压变化[J]. 临床军医杂志, 2010, 38(3): 468-469.
- [5] 陈主初,郭恒怡,王树人. 病理生理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:158-159.
- [6] Hainsworth R, Drinkhill MJ, Rivera-Chira M. The autonomic nervous system at high altitude[J]. *Clin Auton*
- [7] 包政权,马国素,胡进明,等. 观察初次进入高原的旅客在不同海拔高度生理指标变化[J]. 高原医学杂志, 2011, 21(1): 17-19.
- [8] Staab JE, Beidleman BA, Muza SR, et al. Efficacy of residence at moderate versus low altitude on reducing acute mountain sickness in men following rapid ascent to 4300 m[J]. *High Alt Med Biol*, 2013, 14(1): 13-18.
- [9] Wright AD, Birmingham MS. Medicine at high altitude [J]. *Clin Med*, 2006, 6(6): 604-608.
- [10] 金海英. 急进高原集训新兵静态血氧饱和度及血压与心率的观察[J]. 西部医学, 2013, 25(3): 404-406.
- (收稿日期:2015-06-08 修回日期:2015-07-16)