

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.007

血管紧张素 1-7 对蛛网膜下腔出血后血脑屏障通透性的保护作用*

张健民, 陈鹏, 张凡喜[△], 黄晓龙, 周玉峰

(中国人民解放军第三二四医院神经外科, 重庆 400020)

[摘要] 目的 分析血管紧张素 Ang-(1-7)对蛛网膜下腔出血(SAH)后血脑屏障通透性的作用及机制。方法 枕大池二次注血法制备 SAH 大鼠,伊文思蓝(Evans blue)检测 Ang-(1-7)处理后 SAH 大鼠血脑屏障通透性及脑组织含水量;实时荧光定量 PCR(RT-PCR)与蛋白免疫印迹法(Western blot)分析脑组织黏连蛋白 ICAM-1、VCAM-1 的表达。人工血性脑脊液(BCSF)刺激血管内皮细胞(HBMEC),检测细胞通透性及细胞增殖与凋亡情况。结果 Ang-(1-7)可降低 SAH 大鼠脑组织中 Evans blue 渗透量及脑组织含水量,具有剂量和时间依赖性,以 10^{-5} mol/L Ang-(1-7)处理 24 h 时变化最为显著,SAH 大鼠脑组织中 ICAM-1、VCAM-1 表达水平显著上调。同时 Ang-(1-7)作用的 BCSF 刺激的血管内皮细胞中 Evans blue 的渗透量明显减少,ICAM-1、VCAM-1 的表达水平及细胞增殖活力显著增加,细胞凋亡减少。结论 Ang-(1-7)具有保护蛛网膜下腔出血后血脑屏障通透性作用。

[关键词] 蛛网膜下腔出血;血脑屏障通透性;Ang-(1-7);血管内皮细胞

[中图分类号] R363.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)17-2327-03

Protective effect of Ang-(1-7) on the permeability of blood brain barrier after subarachnoid hemorrhage*

Zhang Jianmin, Chen Peng, Zhang Fanxi[△], Huang Xiaolong, Zhou Yufeng

(Department of Neurosurgery, the NO. 324 Hospital of People's Liberation Army, Chongqing 400020, China)

[Abstract] **Objective** To analysis the effects of Ang-(1-7) on the blood brain barrier permeability after subarachnoid hemorrhage. **Methods** SAH-rats were produced by two times injection of blood into cisterna magna. Evans blue was used to detect the permeability of SAH-rats brains and brain water content. RT-PCR and Western blot were performed to measure the expression of adhesion protein ICAM-1 and VCAM-1 in brains of SAH-rats. The artificial hemorrhagic cerebrospinal fluid (BCSF) was used to stimulate vascular endothelial cells (HBMEC), and the proliferation and apoptosis of HBMEC cell were analyzed. **Results** Ang-(1-7) reduced the content of Evans blue and brain water in brains of SAH-rats in dose and time dependent manner with the most significant change under the treatment of 10^{-5} mol/L Ang-(1-7) for 24 h ($P < 0.05$). Under the above condition, the mRNA and protein levels of ICAM-1 and VCAM-1 in brains of SAH-rats were significantly up-regulated ($P < 0.05$), while the content of Evans blue in HBMEC cells stimulated by BCSF was obviously reduced. Besides, Ang-(1-7) was observed to increase the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in BCSF-stimulated HBMEC cells, enhance the proliferation of HBMEC cells but reduce their apoptosis. **Conclusion** Ang-(1-7) plays a protective role in the blood-brain barrier damage induced by subarachnoid hemorrhage.

[Key words] subarachnoid hemorrhage; blood-brain barrier permeability; Ang-(1-7); vascular endothelial cell

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是由动脉硬化等多种病因引起的脑部血管病变过程,具有极高的致死、致残率^[1]。其发病机制与血脑屏障通透性的改变有关,后者则受血管内皮细胞、黏连蛋白等多种因素综合调控^[2-3]。血管紧张素 1-7[Ang-(1-7)]是由 Ang I 或 II 在血管紧张素转化酶作用下产生的活性物质,能改善脑部氧化应激及神经功能状况,降低脑梗死风险,对心血管及脑部组织病变具有保护作用^[4]。本文以 SAH 小鼠模型为对象,分析了 Ang-(1-7)对 SAH 后血脑屏障通透性及黏连蛋白 ICAM-1、VCAM-1 表达的影响,并以人工血性脑脊液体外模拟 SAH 过程,分析 Ang-(1-7)对血管内皮细胞功能活性的影响,探讨其作用机制。

1 材料与方

1.1 材料 雄性 SD 级大鼠 60 只(平均体质量 280~320 g,重庆医科大学实验动物中心);实时荧光定量 PCR(RT-PCR)仪(Bio-Rad 公司);流式细胞仪(Becton-Dickinson 公司);Ang-(1-7)(Sigma 公司);伊文思蓝(Evans, blue, Sigma 公司);人脑

微血管内皮细胞(上海复蒙基因生物科技有限公司);DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司);ICAM-1、VCAM-1、 β -actin 抗体(北京博奥森生物技术有限公司);羊抗兔二抗(北京鼎国公司);总 RNA 提取试剂盒(Tiagen 公司);RT-PCR MasterMix kit(Toyobo 公司);ICAM-1、VCAM-1、GAPDH 引物(Takara 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)细胞增殖-毒性检测试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 SAH 动物模型制备及分组 SD 大鼠分为假手术组(6 只)、模型对照组(6 只)、实验组(48 只)。参照 Müller 等^[5]方法用枕大池二次注血法制备 SAH 大鼠。SD 大鼠用 3%戊巴比妥钠麻醉,注射器针头经环枕筋膜刺入枕大池中,抽出 0.4 mL/kg 脑脊液,将 0.8 mL/kg 耳中央动脉血缓慢注入枕大池蛛网膜下腔中。手术 48 h 后,同样方法二次注入 0.4 mL/kg 动脉血。假手术组注入等量生理盐水。模型制备 24 h 后,用微型真空泵在大鼠侧脑室植入导管,缓慢注入含不同浓度

* 基金项目:国家科技惠民计划项目(2013GS500101-15);中国人民解放军神经创伤防治重点实验室 2013 开放课题资助项目(NTP2013005)。作者简介:张健民(1976-),主治医师,本科,主要从事脑外科工作。△ 通讯作者, Tel: (023)68762064; E-mail: youhua_huang@163.com。

Ang-(1-7) (10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} mol/L) 脑脊液, 每种浓度设 6 个重复, 24 h 后进行 Evans blue 及脑水肿检测。同时对 10^{-5} mol/L Ang-(1-7) 处理 6、12、24、48 h 后的 SAH 大鼠进行检测。设未经 Ang-(1-7) 处理的 SAH 大鼠为对照组。

1.2.2 细胞培养与处理 参照陈志等^[5]方法, 按正常人血液与人工脑脊液 1:1 比例混合配制血性脑脊液(BCSF), 离心后取上清液与 DMEM 培养基 2:1 比例混合待用。HBMEC 细胞分为对照组、BCSF 刺激组和 Ang-(1-7) 处理组。各组处理 24 h 后用于相关检测。

1.2.3 Evans blue 检测 大鼠静脉注射 100 μ L Evans blue 染液(2%, 4 mL/kg), 循环 3 h, 过量麻醉处死, 自右心室注入 50 mL 生理盐水冲洗血管, 取出脑组织标本, 称质量, 取一定量组织切块, 按 1:9 比例 4 $^{\circ}$ C 过夜浸泡于 50% 三氯乙酸中。匀浆后 4 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液于 620 nm 下测 Evans blue 吸光值, 根据 Evans blue 标准溶液(0~6.25 μ g/mL) 绘制 Evans blue 吸光值标准曲线, 得出脑组织中 Evans blue 水平。

1.2.4 脑组织含水量检测 大鼠过量麻醉处死, 迅速取出其脑组织称质量, 并于 100 $^{\circ}$ C 烘箱焙干 48 h 后再称质量, 脑组织含水量百分比=(湿质量-干质量)/湿质量 \times 100%。

1.2.5 RT-PCR 检测 取大鼠脑组织于离心管中, 提取总 RNA 逆转录出 cDNA, 进行 RT-PCR 检测, 以 GAPDH 为内参, 依据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各组 mRNA 的相对表达量。

1.2.6 Western blot 检测 SDS 裂解法提取大鼠脑组织总蛋

白, 煮沸 5 min 后, 取 80 μ g 上清液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳, 转 PVDF 膜。3% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗(1:1 000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜 3 次。加入二抗 HRP-IgG(1:2 000 稀释), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 显色液曝光显影。

1.2.7 细胞增殖检测 细胞接种于 96 孔板中, 分别于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 6、12、24、48 h, 用 MTT 细胞增殖-毒性检测试剂盒法, 490 nm 波长下测细胞光密度(OD)值, 判断细胞增殖情况。

1.2.8 细胞凋亡检测 收集并调整细胞密度为 1×10^6 cell/mL, 加入终浓度为 0.5 μ g/mL 的 Annexin V-FITC 和 0.6 μ g/mL 的 PI, 避光孵育 15 min 后, 流式细胞仪分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang-(1-7) 减缓 SAH 大鼠脑屏障通透性的改变 随 Ang-(1-7) 水平增加, SAH 大鼠脑组织 Evans blue 渗透量及含水量逐渐降低, 至 10^{-6} mol/L 时出现显著变化, 10^{-5} mol/L 时达到最低($P<0.05$), 且随浓度增加保持不变(图 1A、B)。 10^{-5} mol/L Ang-(1-7) 处理时, 脑组织 Evans blue 渗透量随处理时间不同差异明显, 以处理 24 h 的变化最为显著($P<0.05$), 随作用时间增加保持不变(图 1C)。

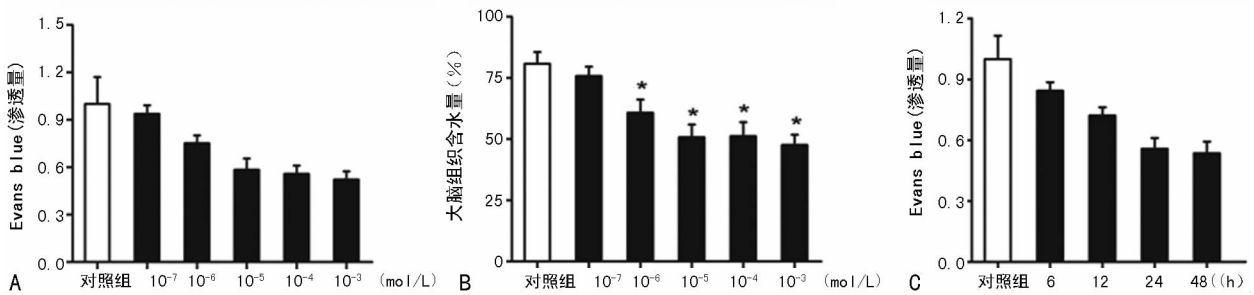


图 1 Ang-(1-7) 对 SAH 大鼠脑组织中 Evans blue 和脑组织含水量的影响

2.2 Ang-(1-7) 对 SAH 大鼠脑组织中 ICAM-1、VCAM-1 表达的影响 10^{-5} mol/L Ang-(1-7) 处理 24 h 后, SAH 大鼠脑组织中黏连蛋白 ICAM-1、VCAM-1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著上调, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 2。

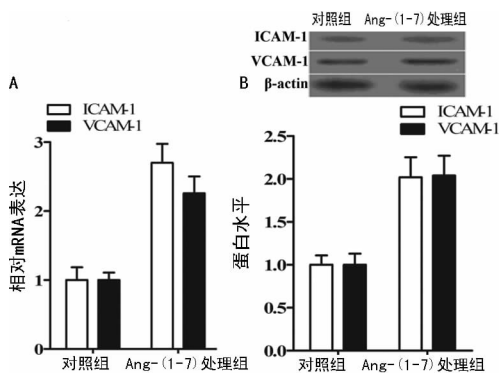


图 2 Ang-(1-7) 对 SAH 大鼠脑组织中 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响

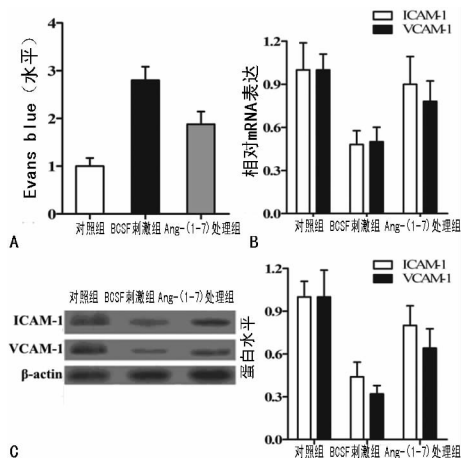


图 3 Ang-(1-7) 对血管内皮细胞中 Evans blue 及 ICAM-1、VCAM-1 表达的影响

2.3 Ang-(1-7)对血管内皮细胞通透性及 ICAM-1、VCAM-1 表达的影响 BCSF 刺激后,内皮细胞中 Evans blue 水平较对照组明显增高,ICAM-1、VCAM-1 表达水平则显著降低。 10^{-5} mol/L Ang-(1-7)处理 24 h 后,细胞中 Evans blue 水平明显减少,而 ICAM-1、VCAM-1 的表达水平则显著增加($P < 0.05$),见图 3。

2.4 Ang-(1-7)对血管内皮细胞增殖活力的影响 10^{-5} mol/L Ang-(1-7)处理 24 h 后,内皮细胞增殖活力显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。

2.5 Ang-(1-7)对血管内皮细胞凋亡的影响 10^{-5} mol/L Ang-(1-7)处理 24 h 后,内皮细胞凋亡水平显著下降($P <$

0.05),见图 5。

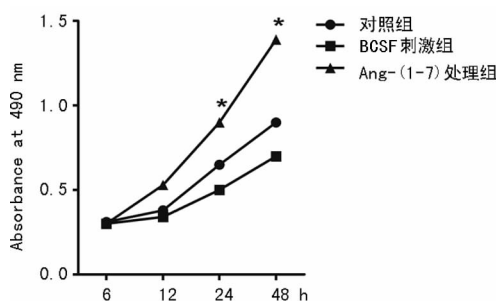
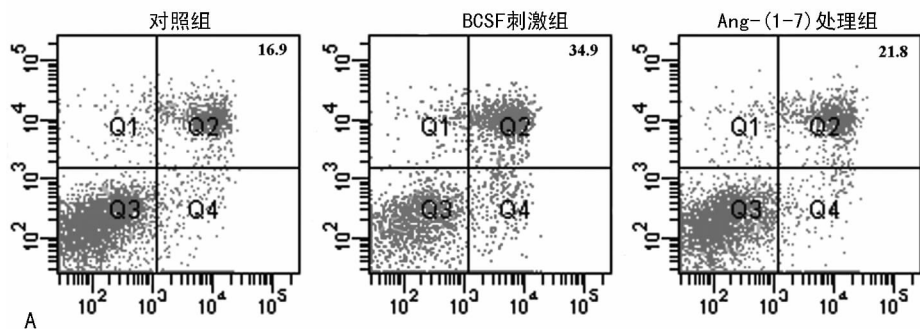


图 4 Ang-(1-7)对血管内皮细胞增殖活力的影响



A、B:细胞凋亡水平及定量。

图 5 Ang-(1-7)对血管内皮细胞凋亡的影响

3 讨论

血脑屏障结构发生变化时,血流中的蛋白等物质会渗透进入脑部组织中,引起脑水肿等继发性脑损伤的发生^[6]。已有研究表明,SAH 会诱发急性脑血管痉挛及脑组织缺血症状,引起胞内黏连蛋白 ZO-1 和 Occludin 表达水平的下调,Akt/FOXO 信号通路的失活,进而导致血脑屏障通透性发生改变^[7]。血脑屏障由血管内皮细胞及多种细胞和黏连蛋白构成,其结构完整性与内皮细胞的功能活性密切相关^[8]。血管内皮细胞凋亡是 SAH 引发血脑屏障损伤的重要原因。本文通过构建大鼠 SAH 模型,证实了 SAH 会导致动物脑部血脑屏障受损及脑水肿的出现。体外实验表明,人工血性脑脊液能引起血管内皮细胞通透性增加、增殖活力减弱、凋亡增强。

Ang-(1-7)是由 Ang I 或 II 在血管紧张素转化酶 ACE2 作用下产生的活性物质,能与特异性受体 Mas 结合,形成 ACE2-Ang-(1-7)-Mas 反应通路,在体内内稳态的维持方面发挥重要作用^[9]。Ang-(1-7)能改善脑部氧化应激及神经功能状况,降低脑梗死风险,对心血管及脑部组织病变具有保护作用。Lu 等^[10]发现,在急性脑缺血损伤小鼠模型中,ACE2-Ang-(1-7)-Mas 反应通路被上调激活,证实了该通路对于急性脑损伤具有重要保护作用。Jiang 等^[11]进一步发现,在脑损伤小鼠模型中,Ang-(1-7)能特异性调节 Mas/eNOS 信号通路,促使脑血管内皮细胞发生增殖,进而促进脑血管再生,提高小鼠对脑缺血损伤的耐受能力。Wu 等^[12]也发现,外源性 Ang-(1-7)可以调节内皮细胞中 TIMP-1/MMP-9 表达水平,进而上调内皮黏连蛋白 Claudin-5 和 ZO-1 的表达,提升内皮细胞张力,对缺血再灌注引起的血脑屏障损伤发挥保护性作用。本实验证实,外源性 Ang-(1-7)可以剂量和时间依赖性方式降低 SAH 大鼠脑

组织中 Evans blue 水平及脑组织含水量,上调黏连蛋白 ICAM-1、VCAM-1 的表达水平,调控血管内皮细胞增殖凋亡活力,对 SAH 引起的血脑屏障损伤和脑水肿具有改善作用。

综上所述,本文以 SAH 小鼠模型为对象,证实了外源性 Ang-(1-7)对于 SAH 引起的血脑屏障损伤和脑水肿具有改善作用,这一过程可能与 Ang-(1-7)对血管内皮细胞功能活性的调控有关。该发现为治疗因 SAH 所引发的脑部病变提供了参考。

参考文献

- [1] Smith M, Citerio G. What's new in subarachnoid hemorrhage[J]. Intensive Care Med, 2015, 41(1): 123-126.
- [2] Engelhardt B, Liebner S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier[J]. Cell Tissue Res, 2014, 355(3): 687-699.
- [3] Müller AH, Povlsen GK, Bang-Berthelsen CH, et al. Regulation of microRNAs miR-30a and miR-143 in cerebral vasculature after experimental subarachnoid hemorrhage in rats[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 119.
- [4] Uhal BD, Nguyen H, Dang M, et al. Abrogation of ER stress-induced apoptosis of alveolar epithelial cells by angiotensin 1-7[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 305(1): L33-41.
- [5] 陈志, 朱刚, 唐卫华, 等. 蜕皮甾酮对实验性蛛网膜下腔出血后血管内皮细胞损害的作用研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(5): 540-543.
- [6] Alluri H, Stagg HW, Wilson RL, et al. (下转第 2333 页)

善 NAFLD 模型中大鼠 ALT,MDA 水平和 SOD 活性及相应病理学改变,为富氢水对 NAFLD 的治疗提供实验依据,其具体机制有待深入研究。

参考文献

- [1] Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC, et al. Non-alcoholic fatty liver disease; a new and important cardiovascular risk factor? [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(10):1190-1200.
- [2] David K, Kowdley KV, Unalp A, et al. Quality of Life in adults with nonalcoholic fatty liver disease; baseline data from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network[J]. *Hepatology*, 2009, 49(6):1904-1912.
- [3] Chen ZW, Chen LY, Dai HL, et al. Relationship between alanine aminotransferase levels and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9(8):616-622.
- [4] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic Oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13(6):688-694.
- [5] 邢凌翔, 贺永文. 氧四环素腹腔注射制备大鼠非酒精性脂肪肝模型的实验研究[J]. *临床肝胆病杂志*, 2007, 23(1):29-31.
- [6] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病组. 非酒精性脂肪肝诊断标准(草案)[J]. *现代实用医学*, 2002, 14(2):100.
- [7] 秦秀军, 安全, 张伟, 等. 富氢水制备及保存方法的初步研究[J]. *癌变·畸变·突变*, 2013, 25(6):457-460.
- [8] Aygun C, Kocaman O, Sahin T, et al. Evaluation of metabolic syndrome frequency and carotid artery intima-media thickness as risk factors for atherosclerosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(5):1352-1357.
- [9] Alkhoury N, Tamimi TA, Yerian L, et al. The inflamed liver and atherosclerosis; a Link between histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease and increased cardiovascular risk[J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(9):2644-2650.
- [10] Schnedl WJ, Wallner SJ, Piswanger C, et al. Glycated hemoglobin and liver disease in diabetes mellitus[J]. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2005, 155(17/18):411-415.
- [11] Inoue H, Sameshima N, Ishida T, et al. Vulnerability of experimentally induced fatty liver to heat stress in rats [J]. *J Gastroenterol*, 2006, 41(1):55-61.
- [12] Caballeria L, Auladel MP. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an apparently healthy adult population in primary care units[J]. *BMC Gastroenterology*, 2007, 5(7):41.
- [13] Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Am J Clin Pathol*, 2007, 128(5):837-847.
- [14] 陈红霞, 孟忠吉. 非酒精性脂肪肝致肝细胞癌发病机制研究进展[J]. *临床内科杂志*, 2014, 31(12):858-860.
- [15] 王志刚, 卢莉莉, 潘智敏. 非酒精性脂肪肝的综合治疗现状[J]. *浙江临床医学*, 2010, 12(5):540-542.
- [16] 张霖, 吕志平. 虎杖苷对非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗和血清肿瘤坏死因子影响的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(4):1007-1008.
- [17] 张婧, 熊正英. 迷迭香对运动大鼠肝脏组织脂质过氧化损伤保护作用的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(2):365-368, 308.
- [18] 林育纯, 林忠宁. 肝脂类水平与脂质过氧化指标的多元相关分析[J]. *中国公共卫生学报*, 1997, 16(2):22.
- [19] 曾民德. 脂肪肝[J]. *中华消化杂志*, 1999, 19(2):120-122.
- [20] Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, et al. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology [J]. *Hepatology*, 1997, 25(2):351-355.
- [21] Dole M, Wilson FR, Fife WP. Hyperbaric Hydrogen therapy; a possible treatment for cancer[J]. *Science*, 1975, 190(4210):152-154.
- [22] 陆朝晖. 有氧运动与氢水对非酒精性脂肪肝 SOD&MDA 的影响[D]. 上海:上海体育学院, 2013.

(收稿日期:2015-11-28 修回日期:2016-02-26)

(上接第 2329 页)

Reactive Oxygen species-caspase-3 relationship in mediating blood-brain barrier endothelial cell hyperpermeability following oxygen-glucose deprivation and reoxygenation [J]. *Microcirculation*, 2014, 21(2):187-195.

- [7] Chen S, Feng H, Sherchan P, et al. Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 115(2):64-91.
- [8] Deracinois B, Pottiez G, Chafey P, et al. Glial-cell-mediated re-induction of the blood-brain barrier phenotype in brain capillary endothelial cells; a differential gel electrophoresis study[J]. *Proteomics*, 2013, 13(7):1185-1199.
- [9] Bennion DM, Haltigan E, Regenhardt RW, et al. Neuroprotective mechanisms of the ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in stroke [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2015,

17(2):3.

- [10] Lu J, Jiang T, Wu L, et al. The expression of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis are upregulated after acute cerebral ischemic stroke in rats[J]. *Neuropeptides*, 2013, 47(5):289-295.
- [11] Jiang T, Yu JT, Zhu XC, et al. Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(18):4222-4232.
- [12] Wu J, Zhao D, Wu S, et al. Ang-(1-7) exerts protective role in blood-brain barrier damage by the balance of TIMP-1/MMP-9[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015 (748):30-36.

(收稿日期:2015-12-18 修回日期:2016-03-06)