

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.03.006

文章编号: 1005-8982 (2024) 03-0034-08

实验研究·论著

GW0742对凝血酶诱导的体外血脑屏障破坏的保护作用*

汪朝云¹, 陈琴¹, 王筱雅¹, 熊英², 张金娟², 张晴², 冯占辉³, 叶兰²

(贵州医科大学 1.基础医学院药理学教研室, 2.基础医学院多媒体机能学实验室,
贵州 贵阳 550025; 3.贵州医科大学附属医院 神经内科, 贵州 贵阳 550025)

摘要: **目的** 探讨GW0742对凝血酶诱导的体外血脑屏障破坏的保护作用。**方法** 选取新生3~7日龄的SD大鼠若干,提取原代脑微血管内皮细胞(BMEC)及星形胶质细胞(AC)。于体外构建BMEC单层培养模型和BMEC+AC共培养模型,分为BMEC单层培养模型组、BMEC+AC共培养组及Blank组(只加培养基);取体外血脑屏障(BBB)共培养模型,分为Control组和脑出血组(ICH组),Control组加入完全培养基处理,ICH组加入40 u/mL凝血酶处理,分别处理12 h模拟体外ICH模型,并通过4 h渗漏试验、荧光素钠通透性试验评价BBB及ICH模型的通透性。另取BBB共培养模型大鼠分成5个组:Control组、ICH组,以及GW0742低、中、高剂量组(1.25、2.50、5.00 $\mu\text{mol/L}$),给药24 h后采用Western blotting检测MMP-9、ZO-1、Occludin蛋白表达。**结果** 4 h渗漏试验结果显示:与Blank组比较,BMEC单层培养组能维持一定的液面差;与BMEC单层培养组比较,BMEC+AC共培养组能维持较好的液面差。荧光素钠通透性试验结果显示各组通透性为:Blank组> BMEC单层培养组> BMEC+AC共培养组。荧光素钠通透性试验结果显示:与Blank组比较,BMEC单层培养组在0.5、1.0、2.0 h时通透性降低($P<0.05$);与BMEC单层培养组比较,BMEC+AC共培养组在0.5、1.0、2.0 h时通透性降低($P<0.05$)。4 h渗漏试验结果显示:与Control组相比,ICH组液面差降低,通透性增加。荧光素钠通透性试验结果显示:与Control组比较,ICH组在0.5、1.0、2.0 h时通透性增加($P<0.05$)。细胞形态学观察结果显示:与Control组比较,ICH组内皮细胞形态明显皱缩、拉长;与ICH组比较,给药组内皮细胞形态未见明显皱缩、拉长,呈剂量依赖。与Control组比较,ICH组MMP-9蛋白相对表达量升高($P<0.05$),ZO-1、Occludin蛋白相对表达量降低($P<0.05$);与ICH组比较,GW0742高剂量组MMP-9蛋白相对表达量降低($P<0.05$),ZO-1、Occludin蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。**结论** GW0742对凝血酶诱导的血脑屏障破坏具有保护作用,其保护作用可能与抑制MMP-9的过度表达及促进紧密连接蛋白ZO-1、Occludin的表达有关。

关键词: 脑出血; 血脑屏障; GW0742; MMP-9; ZO-1; Occludin

中图分类号: R743.34

文献标识码: A

Protective effect of GW0742 on thrombin-induced destruction of the blood-brain barrier in vitro*

Wang Zhao-yun¹, Chen Qin¹, Wang Xiao-ya¹, Xiong Ying², Zhang Jin-juan²,
Zhang Qing², Feng Zhan-hui³, Ye Lan²

(1. Department of Pharmacology, 2.Laboratory of Multimedia Functionality, School of Basic Medicine,
Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 3. Department of Neurology,
Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

收稿日期: 2023-08-19

* 基金项目: 国家自然科学基金(No:81960224)

[通信作者] 叶兰, E-mail: frogyl266@163.com

Abstract: Objective To investigate the protective effects of GW0742 against thrombin-induced in vitro blood-brain barrier (BBB) disruption. **Methods** Neonatal SD rats aged 3 to 7 days were utilized to extract primary brain microvascular endothelial cells (BMEC) and astrocytes (AC). In vitro, BMEC monolayer culture and BMEC + AC co-culture models were established, including the BMEC monolayer culture model group, BMEC + AC co-culture group, and Blank group (culture medium only). For the in vitro BBB co-culture model, rats were assigned to the Control group and intracerebral hemorrhage (ICH) group. The Control group received complete culture medium, while the ICH group was treated with 40 u/mL thrombin for 12 hours to simulate the in vitro ICH model. BBB and ICH model permeability were evaluated through a 4-hour leakage test and sodium fluorescein permeability test. Rats in the BBB co-culture model were divided into five groups: Control group, ICH group, and GW0742 low, medium, and high dose groups (1.25, 2.50 and 5.00 $\mu\text{mol/L}$). After 24 hours of administration, Western blotting was used to detect MMP-9, ZO-1, and Occludin protein expressions. **Results** The 4-hour leakage test results showed that compared to the Blank group, the BMEC monolayer culture group maintained a certain fluid level difference, and the BMEC+AC co-culture group maintained a better fluid level difference than the BMEC monolayer culture group. The sodium fluorescein permeability test results demonstrated the following permeability order: Blank group > BMEC monolayer culture group > BMEC + AC co-culture group. In the sodium fluorescein permeability test, the BMEC monolayer culture group showed reduced permeability at 0.5, 1.0, and 2.0 hours compared to the Blank group ($P < 0.05$), and the BMEC + AC co-culture group exhibited decreased permeability at 0.5, 1.0, and 2.0 hours compared to the BMEC monolayer culture group ($P < 0.05$). The 4-hour leakage test results revealed that the ICH group had a decreased fluid level difference and increased permeability compared to the Control group. In the sodium fluorescein permeability test, the ICH group demonstrated increased permeability at 0.5, 1.0, and 2.0 hours compared to the Control group ($P < 0.05$). Morphological observations indicated that compared to the Control group, endothelial cells in the ICH group exhibited evident shrinkage and elongation. In comparison to the ICH group, the treatment groups showed no significant shrinkage or elongation of endothelial cells, exhibiting a dose-dependent response. Western blotting results demonstrated that compared to the Control group, the ICH group exhibited increased MMP-9 protein expression ($P < 0.05$) and decreased ZO-1 and Occludin protein expressions ($P < 0.05$). In comparison to the ICH group, the GW0742 high-dose group showed decreased MMP-9 protein expression ($P < 0.05$) and increased ZO-1 and Occludin protein expressions ($P < 0.05$). **Conclusion** GW0742 exerts protective effects against thrombin-induced blood-brain barrier disruption, likely mediated by inhibiting excessive MMP-9 expression and promoting the expression of tight junction proteins ZO-1 and Occludin.

Keywords: intracerebral hemorrhage; blood brain barrier; GW0742; MMP-9; ZO-1; Occludin

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是指原发性非创伤性脑实质内血管破裂, 是临床较为常见的脑血管疾病, 其主要特点表现为病情危重、救治难度大、致残率及致死率较高^[1-3]。据研究报道, 全球每10万人中就有10~20人会发生 ICH, 中国 ICH 患者占有住院脑卒中患者的18.8%~47.6%^[4-5]。在 ICH 的病理后遗症中, 因血肿引起的血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 破坏是主要问题之一, 在该病的病理生理改变中起着至关重要的作用。受到外界刺激时, 血脑屏障损伤的标志性蛋白基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表达增加, 进一步降解基底膜, 促使血脑屏障紧密连接相关蛋白 ZO-1、Occludin 表达降低, 使血脑屏障受到破坏。基于该病的凶险性及目前仍缺乏有效降低病死率和残疾率的治疗方案, 本研究探索新型治疗靶点和

新药物, 对 ICH 的预防及治疗具有重要的医学意义。

GW0742 是一种脂溶性高易透过血脑屏障的 PPAR β/δ 特异性激动剂。近年来 GW0742 常用于多种中枢系统疾病的基础研究。有研究报道, GW0742 对缺氧缺血大鼠^[6-7]、孤独症小鼠^[8]、ICH 模型小鼠^[9]均有保护作用。基于以上研究背景, 本文旨在探讨 GW0742 对凝血酶诱导体外血脑屏障破坏产生的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取新生 3~7 日龄的 SPF 级 SD 大鼠若干 (由贵州医科大学实验动物中心提供), 每提取 1 次原代细胞取 5 只, 雌雄均可。实验动物生产许可证号: SCXK (湘) 2019-0014, 实验动物使用许可证号:

SYXK(黔)2018-0001。

1.2 主要材料与试剂

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Thermo Fisher 公司, 2335473CP), DMEM/F12 培养基(美国 Thermo Fisher 公司, 8121756), 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(北京索莱宝科技有限公司, 1218Q0511), 胰蛋白酶(美国 Thermo Fisher 公司, 8122140), 磷酸盐缓冲液(PBS)(北京索莱宝科技有限公司, 20210821), D-Hank's 缓冲液(美国 Thermo Fisher 公司, 20210416), 青霉素-链霉素(北京索莱宝科技有限公司, 20211120), II 型胶原酶(北京索莱宝科技有限公司, 525Z023), 明胶(北京索莱宝科技有限公司), 嘌呤霉素(北京索莱宝科技有限公司, 1221S0435), 兔抗大鼠 VIII 因子相关抗原单克隆抗体(美国 Thermo Fisher 公司, 337E3A24), 抗兔荧光二抗(上海爱必信生物科技有限公司, A23D26), 凝血酶(上海 Sigma 公司, SLBW2056), GW0742(美国 MCE 公司, 20371), GFAP(美国 Thermo Fisher 公司, WI3380251), MMP-9 抗体、ZO-1 抗体、Occludin 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司, 批号分别为: A0289、A11417、DF7504), 高效 RIPA 裂解液(组织/细胞)(北京索莱宝科技有限公司, 20210908), Pierce BCA 蛋白检测试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司, VK316403), PageRuler 预染蛋白 Marker(美国 Thermo Fisher 公司, 00864849), PVDF 微孔转移膜(美国 Millipore 公司, R0BB23468)。

1.3 仪器

倒置相差显微镜(日本尼康, TS100), 正置荧光显微镜(苏州世达普通通信设备有限公司, RX50), 台式大容量离心机(常州朗越仪器制造有限公司, TDL-40B), 恒温摇床(山东欧莱伯仪器有限公司, THZ-82A), 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司, 2001HY-6003)。

1.4 方法

1.4.1 脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelium cell, BMEC)的原代培养 取 5 只新生 7 日龄的 SD 大鼠, 断头处死后浸泡于 75% 无水乙醇杀菌消毒 5 min, 置于超净工作台, 剪开颅骨, 取出大脑半球, 置于装有 4 ℃ 预冷的 D-Hank's 缓冲液的培养皿中, 去除小脑、间脑(包括海马组织), 保留大脑皮质部, 并将其置于无菌滤纸上来回滚动, 以除去

软脑膜及脑膜大血管等杂质, 保留大脑皮质, 依次用预冷的 D-Hank's 液、含双抗的培养基、D-Hank's 缓冲液洗涤 1 次, 期间用巴氏吸管或移液枪反复吹打以除去部分血细胞、血凝块及软脑膜, 再将大脑皮质部转移至 5 mL 离心管中剪至约 1 mm × 1 mm × 1 mm 的白色肉泥状, 过 100 目细胞筛, 收集网下滤液, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀并滴加 8 mL 0.1 % II 型胶原酶于 37 ℃ 摇床下消化 25 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 去除上清液后, 底部沉淀加入 8 mL 20 % BSA, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液再次离心, 离心 3 次, 混合 3 次离心后所得沉淀, 并用完全培养基混匀后接种于未处理的培养瓶中培养 1 h, 后换用 1 % 明胶包被的 50 mL 培养瓶置于 37 ℃、5 % 二氧化碳培养箱中培养 4 d, 其后全量换用含 2 mg/L 嘌呤霉素的培养液培养 24 h, 再改用不含嘌呤霉素的培养液继续培养, 并每隔 2 d 换液 1 次, 用倒置相差显微镜观察细胞形态, 贴壁细胞为 BMEC。

1.4.2 星形胶质细胞(Astrocyte, AC)的原代培养 取新生 3 日龄 SD 大鼠 5 只, 使用酒精消毒, 在超净台下取出大鼠脑组织置于 D-Hank's 缓冲液中, 使用眼科镊轻轻去除大脑表面膜后, 将大脑皮层分离出, 放入 DMEM/F12 培养基中, 使用剪刀将组织剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小组织块; 将组织块转移至离心管中, 加入 0.125% 胰酶 37 ℃ 消化 15 min, 每隔 5 min 轻轻摇晃促进消化, 消化结束后使用移液器轻轻将大脑皮层组织吹散, 静置 30 s, 上清用 100 目细胞筛过滤, 1 500 r/min 离心 5 min; 使用 DMEM+10% FBS 重悬细胞将细胞种在 0.1% 明胶包被的培养瓶中, 每隔 3 d 半量换液; 培养 7 d 后, 在摇床上 200 r/min 摇晃 4 h, 去除上清液, 用倒置相差显微镜观察细胞形态, 贴壁细胞为 AC。

1.4.3 原代 AC 的鉴定 胰酶消化提取原代 AC 5 min 后, 重悬细胞于完全培养基中, 充分吹打, 使之成为单细胞悬液, 计数。根据需选择合适的细胞密度种于培养板内, 滴加细胞悬液时, 需依据爬片大小, 先在每个孔里准备放爬片的位置上滴加 1 滴培养基, 然后将爬片置于液滴上, 压紧, 使爬片与培养板的张力黏合在一起, 防止加细胞悬液时爬片漂起, 造成双层细胞贴片。在培养板中培养好细胞后, 吸出培养基, 用预冷的 PBS 洗细胞 3 次, 5 min/次, 然后加入预冷的 4 % 多聚甲醛, 常

温固定10 min;除去多聚甲醛后,用预冷的PBS洗细胞3次,5 min/次;加入含适量Triton X-100的封闭液,封闭30 min,封闭结束后不用洗,直接上一抗;将GFAP抗体按1:200比例稀释在一抗稀释液中,去除封闭液后,加入一抗,4℃孵育过夜;去除一抗,加入预冷的PBS,洗3次,5 min/次;将荧光二抗分别按照1:400比例稀释在二抗稀释液中,去除PBS后,加入二抗,室温避光孵育1 h,加入预冷的PBS,洗3次,5 min/次;加入DAPI溶液,室温避光孵育10 min;去除DAPI,加入预冷的PBS,洗3次,5 min/次;加入防荧光淬灭溶液,于正置荧光显微镜下拍照,鉴定细胞。

1.4.4 体外BBB的构建 分别构建BMEC单层培养模型和BMEC+AC共培养模型,分为BMEC单层培养模型组、BMEC+AC共培养组及Blank组(只加培养基)。取原代培养传至第2代的BMEC胰酶消化后,于Transwell小室上室接种BMEC,接种密度为 5×10^6 个/mL,下室只加培养基,构建单层培养模型;取原代培养传至第2代的BMEC和AC胰酶消化后,于Transwell小室上室接种BMEC,接种密度为 5×10^6 个/mL,下室接种AC,接种密度为 5×10^6 个/mL,构建共培养模型;于Transwell小室上室、下室加入培养基,构建Blank组;期间每2 d换液1次,培养5~8 d后检测体外血脑屏障的通透性。

1.4.5 体外BBB通透性的检测 ①4 h渗漏试验:取构建好的体外BMEC单层培养模型、BMEC+AC共培养模型及只加培养基的Blank组,将Transwell小室上室及下室的培养基吸尽,并用PBS冲洗3次后,分别于上室和下室加入0.5和1.5 mL的完全培养基,使上室和下室存在一定的液面差,并将其放入培养箱中继续培养,于4 h后观察液面变化情况。②荧光素钠通透性试验:配置不同浓度(0、0.2、2.0和20.0 $\mu\text{g/mL}$)荧光素钠,于多功能酶标仪下536 nm波长处测定OD值,绘制标准曲线;取构建好的体外BMEC单层培养模型、BMEC+AC共培养模型及只加培养基的Blank组,将Transwell小室的上室及下室的培养基吸尽,并用PBS冲洗3次后,于BBB单层培养、共培养及Blank组的上室加入含20 $\mu\text{g/mL}$ 荧光素钠基础培养基0.5 mL,下室加入不含荧光素钠的基础培养基1.5 mL,并分别于培养0.5、1.0、2.0 h吸取下室培养基各100 μL 备用,每组设3个复孔,实验重复3次,于多功能酶标仪下536 nm波长处测定

OD值,绘制标准曲线,并根据所得标准曲线计算荧光素钠透过BBB的量。

1.4.6 体外ICH模型的构建 取体外BBB共培养模型,分为Control组与ICH组,Control组加入完全培养基处理,ICH组加入40 u/mL凝血酶处理,分别处理12 h后,检测通透性变化,方法同1.4.5。

1.4.7 给药 取体外BBB共培养模型,将其分为Control组、ICH组,以及GW0742低、中、高剂量组(1.25、2.50、5.00 $\mu\text{mol/L}$)5个组,Control组加入完全培养基,ICH组、GW0742低、中、高剂量组中均加入40 u/mL的凝血酶,各组分别培养12 h后,Control组、ICH组加入完全培养基,低、中、高剂量组给予相应剂量的GW0742,分别培养24 h后,倒置相差显微镜下观察细胞形态学变化。

1.4.8 Western blotting检测蛋白ZO-1、MMP-9、Occludin的表达 提取各组细胞总蛋白,BCA法定量各组蛋白,制胶,上样,电泳,转膜,室温下快速封闭液封闭20 min后,加入 β -actin一抗(1:1 000)、ZO-1一抗(1:1 000)、MMP-9一抗(1:1 000)、Occludin一抗(1:1 000),4℃孵育过夜,TBST清洗3次,5 min/次,室温孵育二抗2 h,TBST清洗3次,5 min/次,使用ECL曝光显影,分析各组条带灰度值。

1.5 统计学方法

数据分析采用SPSS 24.0统计软件,用Graphpad Prism 8.0软件进行绘图。计量资料行正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布且方差齐的计量资料,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组计量资料的比较用独立样本 t 检验,多组计量资料的比较用单因素方差分析,进一步两两比较用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代细胞的培养

2.1.1 BMEC的原代培养 原代培养的BMEC呈短梭型和多角形生长,当长至第5天后长成其典型的“铺路石”状。见图1。

2.1.2 AC的原代培养及鉴定结果 原代培养AC 7 d,第7天去除小胶质细胞,原代AC的形态呈星形发散生长,从胞体发出许多突起和分支;原代培养的AC经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)免疫荧光鉴定结果显示,所提原代细

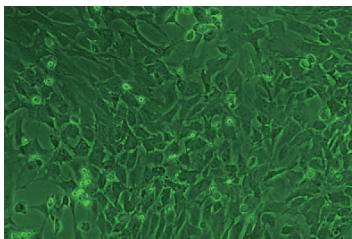


图1 原代培养BMEC的生长情况
(倒置相差显微镜×100)

胞确为AC,且其纯度达到实验要求(见图2、3)。

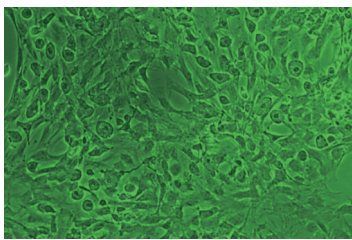


图2 原代培养AC的生长情况
(倒置相差显微镜×100)

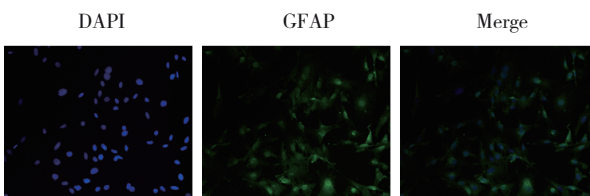


图3 原代AC的GFAP免疫荧光鉴定
(正置荧光显微镜×200)

2.2 体外BBB通透性的检测结果

2.2.1 4 h 渗漏试验 与 Blank 组比较,BMEC 单层培养组能维持一定的液面差;与 BMEC 单层培养组比较,BMEC+AC 共培养组能维持较好的液面差。通透性为:Blank 组> BMEC 单层培养组> BMEC+AC 共培养组。见图4。

2.2.2 荧光素钠通透性试验 Blank 组、BMEC 单层培养组及 BMEC+AC 共培养组荧光素钠渗透浓度在 0.5、1.0 和 2.0 h 时比较,经单因素方差分析,差异均有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较结果显示,与 Blank 组比较,BMEC 单层培养组荧光素钠渗透浓度降低,通透性降低($P<0.05$);与 BMEC 单层培养组比较,BMEC+ AC 共培养组荧光素钠渗透浓度降低,通透性降低($P<0.05$)。见表1和图5。

2.3 体外ICH模型的通透性评价

2.3.1 4 h 渗漏试验 与 Control 组比较,ICH 组液面差降低,通透性增加(见图6)。

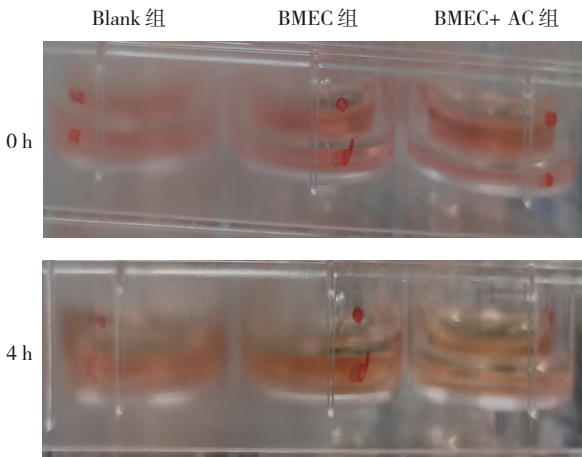


图4 4 h 渗漏试验

表1 培养0.5、1.0和2.0 h时各组荧光素钠的渗透浓度比较 ($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	0.5 h	1.0 h	2.0 h
Blank 组	10.0 ± 0.178	11.0 ± 0.611	11.9 ± 0.149
BMEC 单层培养组	6.88 ± 0.368^{①}	8.67 ± 0.254^{①}	9.93 ± 0.855^{①}
BMEC+AC 共培养组	2.33 ± 0.933^{②}	4.58 ± 1.04^{②}	7.51 ± 0.892^{②}
F 值	129.000	63.300	29.100
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与 Blank 组比较, $P<0.05$; ②与 BMEC 单层培养组比较, $P<0.05$ 。

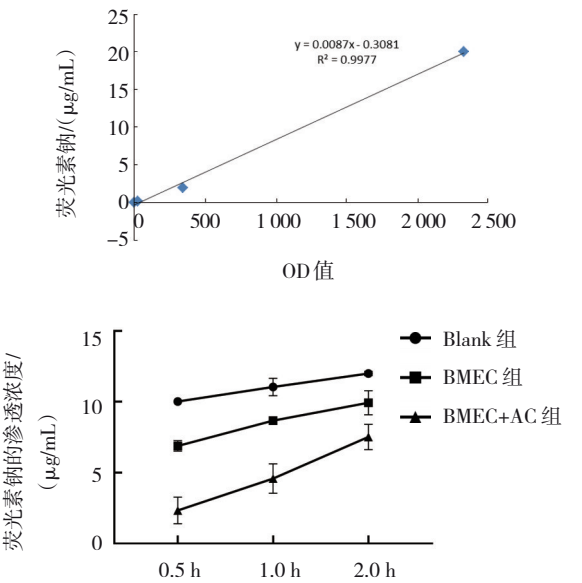


图5 荧光素钠标准曲线及荧光素钠渗透浓度比较

2.3.2 荧光素钠通透性试验 Control 组的荧光素钠的渗透浓度与 ICH 组比较,经 t 检验,差异有统计学意义($P<0.05$);与 Control 组比较,ICH 组在 0.5、1.0 和 2.0 h 时,荧光素钠渗透浓度增加,通透性增

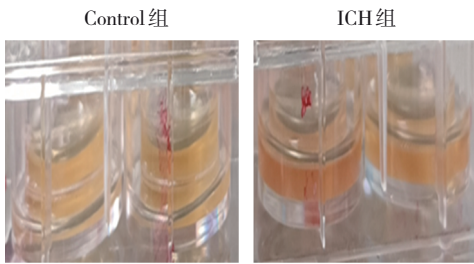


图6 体外BBB双层模型及体外ICH模型的渗漏性试验

加。见表 2 和图 7。

表 2 两组荧光素钠的渗透浓度比较 (μg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	0.5 h	1 h	2 h
Control 组	2.33 ± 0.93	4.58 ± 1.04	7.51 ± 0.89
ICH 组	4.74 ± 0.57 [†]	9.29 ± 0.49 [†]	10.3 ± 0.61 [†]
<i>t</i> 值	14.500	50.600	20.100
<i>P</i> 值	0.018	0.002	0.011

注：[†]与 Control 组比较, *P* < 0.05。

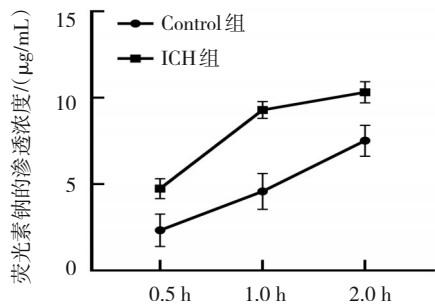


图7 Control组与ICH模型组通透性比较

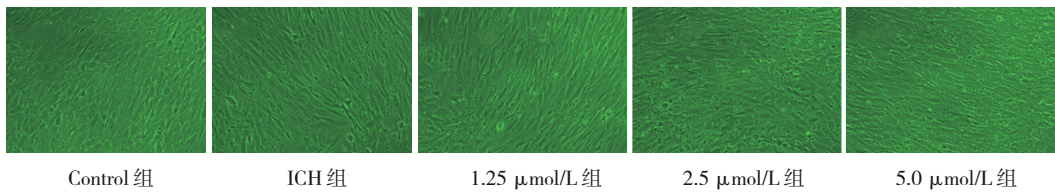


图9 给药后细胞形态学观察 (倒置相差显微镜×100)

表 3 各组ZO-1、MMP-9、Occludin蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ZO-1 蛋白	MMP-9 蛋白	Occludin 蛋白
Control 组	0.833 ± 0.142	0.515 ± 0.079	1.02 ± 0.054
ICH 组	0.429 ± 0.140 ^①	0.779 ± 0.069 ^①	0.579 ± 0.082 ^①
GW0742 低剂量组	0.541 ± 0.086	0.754 ± 0.076	0.610 ± 0.073
GW0742 中剂量组	0.697 ± 0.025 ^②	0.738 ± 0.025	0.718 ± 0.041
GW0742 高剂量组	0.734 ± 0.103 ^②	0.533 ± 0.023 ^②	0.801 ± 0.070 ^②
<i>F</i> 值	6.610	13.200	22.400
<i>P</i> 值	0.007	0.001	0.000

注：①与 Control 组比较, *P* < 0.05; ②与 ICH 组比较, *P* < 0.05。

2.3.3 形态学观察 培养 12 h 后, 与 Control 组比较, ICH 组的紧密连接结构明显被破坏, 细胞形态改变(红色箭头所示)。见图 8。

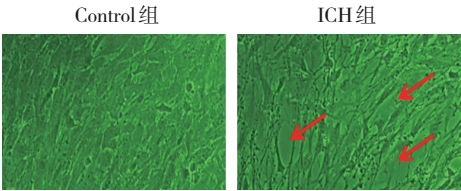


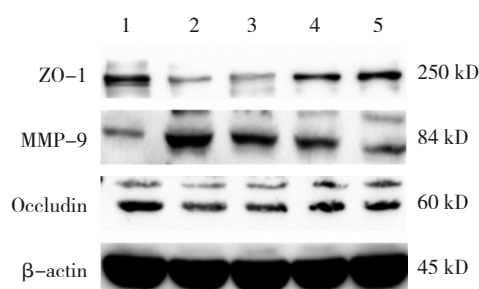
图8 Control组与ICH组细胞形态学观察

(倒置相差显微镜×100)

2.4 药效研究结果

2.4.1 形态学观察 细胞形态学观察结果显示, 与 Control 组比较, ICH 组内皮细胞形态明显皱缩、拉长; 与 ICH 组比较, 给药组内皮细胞形态未见明显皱缩、拉长, 呈剂量依赖。见图 9。

2.4.2 各组ZO-1、MMP-9、Occludin蛋白相对表达量比较 Control 组、ICH 组、GW0742 低、中、高剂量组的ZO-1、MMP-9、Occludin蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。进一步两两比较结果显示, 与 Control 组比较, ICH 组MMP-9蛋白相对表达量升高(*P* < 0.05), ZO-1、Occludin蛋白相对表达量降低(*P* < 0.05); 与 ICH 组比较, GW0742 高剂量组MMP-9蛋白相对表达量降低(*P* < 0.05), ZO-1、Occludin蛋白相对表达量升高(*P* < 0.05)。见表 3 和图 10。



1:Control组; 2:ICH组; 3:GW0742低剂量组; 4:GW0742中剂量组; 5:GW0742高剂量组。

图 10 各组 ZO-1、MMP-9、Occludin 蛋白表达

3 讨论

ICH 是一种较为严重的脑血管疾病, 致残率和致死率均较高^[10]。而在 ICH 的几种病理后遗症中, 水肿引起 BBB 的破坏是主要问题之一, 在该病的病理生理改变中起着至关重要的作用。ICH 发生后, 血液成分进入大脑, 激活先天和获得性免疫反应, 导致各种细胞因子、趋化因子、自由基及其他潜在有毒化学物质的释放^[11]; 在这些分子共同作用下, 导致继发性脑损伤, 表现为 BBB 完整性受损、邻近组织破坏, 以及细胞死亡^[12]; 而血脑屏障的破坏又导致组织渗出、神经元坏死和细胞凋亡, 进一步加重脑水肿^[13]。因此, 深入探讨并研究 ICH 后血脑屏障破坏的继发性损伤机制及相关治疗药物可能为 ICH 的防治提供新的思路。

血脑屏障主要由脑微血管内皮细胞、周细胞及星形胶质细胞组成, 其中脑微血管内皮细胞是血脑屏障的主要组成部分, 而脑微血管内皮细胞与其他外周血管内皮细胞不同的是脑微血管内皮细胞主要由紧密连接蛋白将脑微血管内皮细胞紧密连接在一起, 形成了这一特殊屏障, 因此, 当血脑屏障受到破坏时, 血脑屏障打开, 紧密连接蛋白会相应发生改变, 如 ZO-1、Occludin、Claudin 蛋白会相应下调, 血脑屏障损伤的标志蛋白 MMP-9 会相应上调。

凝血酶是 ICH 后凝血瀑布被激活所释放的一种酶, 凝血酶可以参与 ICH 所致的损伤, 同时也可作用于多种类型的细胞, 包括脑内皮细胞、神经元和星形胶质细胞、小胶质细胞, 并能导致血脑屏障破坏和脑水肿形成; 凝血酶在 ICH 后除参与凝血外, 同时也是一种促炎因子和神经毒性介质, 体外高浓度可抑制神经元和星形胶质细胞生长繁殖, 将大剂量凝血酶直接注入脑内会引起炎症细胞浸润、间充质细

胞增殖、瘢痕形成、脑水肿形成和癫痫发作。因此为模拟 ICH 的病理生理过程, 选择在体外血脑屏障模型构建成功后加入 40 u/mL 凝血酶来模拟体外 ICH 细胞模型。

GW0742 是一种特异性的 PPAR β/δ 激动剂, 近年来其在多种中枢疾病中均有研究, 如缺氧缺血、孤独症、ICH 动物疾病模型中均有报道。因此更为深入地研究探讨其对 ICH 的作用是必要的, 本研究旨在利用原代提取的脑微血管内皮细胞及星形胶质细胞于体外构建血脑屏障模型, 待血脑屏障模型构建成功后以 40 u/mL 凝血酶处理 12 h 模拟体外 ICH 模型, 后给予 GW0742, 研究 GW0742 是否对 ICH 所致血脑屏障破坏具有保护作用, 以期后续 ICH 研究治疗提供依据。通过体外试验结果显示, ICH 后血脑屏障损伤的标志蛋白 MMP-9 表达升高, 紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 表达下降; 给予 GW0742 后, 血脑屏障损伤的标志蛋白 MMP-9 表达下降, Occludin、ZO-1 蛋白表达升高, 改善了由凝血酶诱导的血脑屏障破坏情况; 因此推测 GW0742 能对 ICH 所致血脑屏障破坏具有保护作用, 其保护作用可能与其抑制 MMP-9 的过度表达及促进了紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 的表达有关。

综上所述, 本文通过原代脑微血管内皮细胞及星形胶质细胞构建体外血脑屏障, 并以 40 u/mL 凝血酶模拟体外 ICH 模型促使血脑屏障破坏, 后给予 GW0742 治疗, 结果表明 GW0742 对 ICH 所致血脑屏障破坏具有保护作用, 其保护作用可能与其抑制 MMP9 的过度表达及促进紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 表达有关。

参 考 文 献 :

- [1] 郭庆奇, 杨秋影, 马美娜, 等. 右美托咪定对脑出血大鼠神经功能及 JAK2/STAT3 通路的影响[J]. 实用医学杂志, 2022, 38(9): 1094-1101.
- [2] 严美茹, 张燕平, 罗瑞琦, 等. PI3K/Akt 信号通路对脑出血的研究进展[J]. 新医学, 2022, 53(5): 310-313.
- [3] 丁子惠, 袁月, 宋双, 等. 破血化瘀填精补髓中药汤剂对核因子 E 2 相关因子 2 基因敲除脑出血小鼠氧化应激的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2022, 24(5): 536-540.
- [4] 郑海军, 戴凯茜, 娄晓辉, 等. 缺氧诱导因子-1 α /血管内皮生长因子通路表达与高血压脑出血破入脑室患者颅内压及预后的相关性[J]. 中华高血压杂志, 2022, 30(3): 283-286.
- [5] 王雪, 刘阳, 徐剑峰, 等. 脐带间充质干细胞来源外泌体对脑出血模型小鼠海马神经元的保护作用[J]. 中国组织工程研究,

- 2022, 26(31): 4928-4934.
- [6] GAMDZYK M, DOYCHEVA D M, KANG R Q, et al. GW0742 activates miR-17-5p and inhibits TXNIP/NLRP3-mediated inflammation after hypoxic-ischaemic injury in rats and in PC12 cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12318-12330.
- [7] GAMDZYK M, DOYCHEVA D M, MALAGUIT J, et al. Role of PPAR- β/δ /miR-17/TXNIP pathway in neuronal apoptosis after neonatal hypoxic-ischemic injury in rats[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 140: 150-161.
- [8] AHMAD S F, NADEEM A, ANSARI M A, et al. The PPAR δ agonist GW0742 restores neuroimmune function by regulating Tim-3 and Th17/Treg-related signaling in the BTBR autistic mouse model[J]. *Neurochem Int*, 2018, 120: 251-261.
- [9] TANG X M, YAN K N, WANG Y G, et al. Activation of PPAR- β/δ attenuates brain injury by suppressing inflammation and apoptosis in a collagenase-induced intracerebral hemorrhage mouse model[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(4): 837-850.
- [10] 汪坤, 赵旭, 杨艳华, 等. 基于抗氧化应激研究醒脑灌肠液对脑出血大鼠血脑屏障的保护作用[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(8): 1813-1817.
- [11] REN H L, HAN R R, CHEN X M, et al. Potential therapeutic targets for intracerebral hemorrhage-associated inflammation: an update[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(9): 1752-1768.
- [12] LI Z G, LI M S, SHI S X, et al. Brain transforms natural killer cells that exacerbate brain edema after intracerebral hemorrhage[J]. *J Exp Med*, 2020, 217(12): e20200213.
- [13] SHEN H T, LIU C L, ZHANG D P, et al. Role for RIP1 in mediating necroptosis in experimental intracerebral hemorrhage model both in vivo and in vitro[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2641.
- (张西倩 编辑)
- 本文引用格式:** 汪朝云, 陈琴, 王筱雅, 等. GW0742对凝血酶诱导的体外血脑屏障破坏的保护作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(3): 34-41.
- Cite this article as:** WANG Z Y, CHEN Q, WANG X Y, et al. Protective effect of GW0742 on thrombin-induced destruction of the blood-brain barrier in vitro[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(3): 34-41.