

褪黑素对慢性脑低灌注大鼠血-脑屏障的保护作用

王少朋 王茹 李丹丹 赵弘轶 迟丽屹 黄勇华

【摘要】 目的 探讨褪黑素对慢性脑低灌注模型大鼠血-脑屏障通透性的影响及其作用机制。**方法** 健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠通过改良双侧颈总动脉结扎法制备慢性脑低灌注模型, 随机分为假手术组、模型组、褪黑素 5 mg/(kg·d) 组和 10 mg/(kg·d) 组, 以伊文思蓝和异硫氰酸荧光素标记的右旋糖酐双重染色检测血-脑屏障通透性, 聚合酶链反应测定基质金属蛋白酶-2 和 9 (MMP-2 和 MMP-9)、Western blotting 法测定 Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白表达变化。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠基底节荧光强度增强 ($P = 0.000$), MMP-2 ($P = 0.000$) 和 MMP-9 ($P = 0.000$) 水平升高, Occludin 蛋白 ($P = 0.000$) 和 Claudin-5 蛋白 ($P = 0.000$) 水平降低; 经褪黑素 5 mg/(kg·d) 治疗后, 大鼠基底节荧光强度减弱 ($P = 0.021$)、MMP-2 水平降低 ($P = 0.000$)、Claudin-5 蛋白水平升高 ($P = 0.000$), 与假手术组差异仍有统计学意义 ($P = 0.000, 0.006, 0.000$); 而褪黑素 10 mg/(kg·d) 治疗后, 大鼠基底节荧光强度进一步减弱 ($P = 0.000$)、MMP-2 ($P = 0.000$) 和 MMP-9 ($P = 0.000$) 水平持续降低且接近假手术组水平 (均 $P > 0.05$), 而 Occludin 蛋白 ($P = 0.000$) 和 Claudin-5 蛋白 ($P = 0.000$) 水平升高但仍低于假手术组 ($P = 0.003, 0.000$); 褪黑素两剂量组比较, 10 mg/(kg·d) 组疗效优于 5 mg/(kg·d) 组 (均 $P < 0.05$)。**结论** 褪黑素通过抑制基质金属蛋白酶的表达而使 Occludin 和 Claudin-5 蛋白降解减少, 进而保护血-脑屏障的完整性。

【关键词】 大脑小血管疾病; 褪黑激素; 血脑屏障; 疾病模型, 动物

Protective effect of melatonin on blood-brain barrier dysfunction in rats with chronic cerebral hypoperfusion

WANG Shao-peng¹, WANG Ru¹, LI Dan-dan¹, ZHAO Hong-yi¹, CHI Li-yi², HUANG Yong-hua¹

¹Department of Neurology, the Seventh Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100700, China

²Department of Neurology, the 986 Hospital of the Air Force PLA, Xi'an 710054, Shaanxi, China

Corresponding author: HUANG Yong-hua (Email: huangyh@163.com)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of the effect of melatonin (MT) on permeability of blood-brain barrier (BBB) in chronic cerebral hypoperfusion (CCH) rats. **Methods** The rat model of CCH was established by bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO). A total of 72 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: sham group (N = 18), BCCAO group (N = 18), the melatonin [5 mg/(kg·d)] treatment model group (MT1 group, N = 18), and the melatonin [10 mg/(kg·d)] treatment model group (MT2 group, N = 18). Evans blue staining and fluorescein-labeled glucoside (FITC-Dextran) staining marked by fluorescein isothiocyanate (FITC) were used to assess the permeability of BBB in rats. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 mRNA levels in basal ganglia of the brain were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Expression of Occludin and Claudin-5 protein in rat basal ganglia were measured by Western blotting method. **Results** Compared with the sham group, the fluorescence density in basal ganglia was increased ($P = 0.000$), expression of MMP-2 and MMP-9 were increased (all $P = 0.000$), and expression of Occludin and Claudin-5 were decreased (all $P = 0.000$) of BCCAO group. Compared with the BCCAO group, the fluorescence density in basal ganglia was decreased ($P = 0.021$), the expression of MMP-2 was decreased ($P = 0.000$) and the expression of Claudin-5 was increased ($P = 0.000$) in MT1 group, and the differences with sham group were statistically significant ($P = 0.000, 0.006, 0.000$). Compared with the BCCAO group, in MT2 group,

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2019.08.004

基金项目: 吴阶平医学基金会基金资助项目 (项目编号: 320.6750.18456)

作者单位: 100700 北京, 解放军总医院第七医学中心神经内科 [王少朋, 王茹, 李丹丹 (现在山东省泰安市市立医院神经内科, 邮政编码: 271000), 赵弘轶, 黄勇华]; 710054 西安, 解放军空军第九八六医院神经内科 (迟丽屹)

通讯作者: 黄勇华, Email: huangyh@163.com

the fluorescence degree in basal ganglia was further decreased ($P = 0.000$), the expression of MMP-2 and MMP-9 were decreased (all $P = 0.000$), and were similar to the sham group (all $P > 0.05$), while expression of Occludin and Claudin-5 were increased (all $P = 0.000$) but lower than those of sham group ($P = 0.003, 0.000$). Compared with the two melatonin treatment groups, the efficacy of the 10 mg/(kg·d) group (MT2 group) was better than that of the 5 mg/(kg·d) group (MT1 group, all $P < 0.05$). **Conclusions** Melatonin may protect the integrity of BBB by inhibiting the degradation of Occludin and Claudin-5 protein through inhibiting the expression of matrix metalloproteinases.

【Key words】 Cerebral small vessel diseases; Melatonin; Blood-brain barrier; Disease models, animal

This study was supported by Wu Jieping Medical Foundation (No. 320.6750.18456).

Conflicts of interest: none declared

运动障碍是脑小血管病(cSVD)患者主要临床症状之一,表现为步态异常、平衡障碍和易跌倒等,严重影响生活质量,是老年患者病残和病死的重要原因^[1]。慢性脑低灌注(CCH)和穿支动脉血流减少是脑小血管病的主要病理生理学基础之一^[2],可以导致脑白质和脑深部核团缺血,破坏皮质下复杂运动网络,继而引起运动障碍^[3-4]。血-脑屏障(BBB)是中枢神经系统与外周循环之间的屏障结构^[5],由毛细血管内皮细胞、神经元、星形胶质细胞、周细胞和细胞外基质等组成,对维持中枢神经系统微环境稳态起关键作用。基质金属蛋白酶(MMPs)属于锌和钙依赖性蛋白水解酶家族,可以消化血-脑屏障内皮细胞的基底层,是病理状态下血-脑屏障破坏的主要原因^[6]。近年对脑小血管病动物模型的研究显示,毛细血管内皮细胞损伤和血-脑屏障通透性增加可导致血-脑屏障结构和功能严重损害,进而加剧脑小血管病进展^[7-8]。褪黑素主要产生于松果体,视网膜和胃肠道亦能分泌少量^[9],具有抗炎反应、免疫调节和调整昼夜节律等功能^[10]。既往动物实验显示,慢性脑低灌注大鼠血浆基质金属蛋白酶水平升高,进而诱导血-脑屏障内皮细胞凋亡^[4]。无论是离体还是在体模型均显示出褪黑素对基质金属蛋白酶活性和表达的抑制作用^[11-12],本研究以慢性脑低灌注模型大鼠为实验对象,拟观察褪黑素对血-脑屏障通透性的保护作用并探讨其药理学机制。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物 健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠共 72 只, 8 周龄, 体重 (280 ± 20) g, 购自斯贝福(北京) 生物技术有限公司[许可证号: SCXK(京) 2016-0002], 室温 (23 ± 2) °C、相对湿度 50% ~ 60%、

12 h 昼-12 h 夜循环照明环境饲养, 自由摄食、饮水。

2. 药品与设备 (1) 药品与试剂: 褪黑素(规格: 1 g/瓶)、质量分数 2% 伊文思蓝(Evans Blue) 溶液、异硫氰酸荧光素标记的右旋糖酐(FITC-Dextran) 溶液均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; RNA 提取试剂盒由日本 TaKaRa 公司提供; Trizol 试剂为生工生物工程(上海) 股份有限公司产品; 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR) 试剂盒和聚合酶链反应(PCR) 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。免疫试剂 I 抗工作液包括基质金属蛋白酶-2(MMP-2) 多克隆抗体(1 : 1000) 和基质金属蛋白酶-9(MMP-9) 单克隆抗体(1 : 1000) 购自美国 Abcam 公司, 兔抗大鼠 Occludin 多克隆抗体(1 : 500) 购自美国 Proteintech 公司, 兔抗大鼠 Claudin-5 多克隆抗体(1 : 100) 为美国 Boster 公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1 : 4000) 和内参照物甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 1 : 2000) 购自武汉谷歌生物科技有限公司。(2) 主要设备与仪器: CM1950 型冰冻切片机、DM500 型生物显微镜和 DML3000 型荧光显微镜均购自德国 Leica 公司; 749540-0000 型电动匀浆器由美国 Kimble 公司提供; 1645050 型基础电泳仪和 GelDoc XR + 全自动凝胶成像系统为美国 Bio-Rad 公司产品。

二、实验方法

1. 动物模型制备与分组 (1) 模型制备: 参照文献[13] 方法, 采用改良双侧颈总动脉结扎(BCCAO) 法制备慢性脑低灌注大鼠模型。大鼠仰卧位, 以质量分数为 10% 水合氯醛(4 ml/kg) 腹腔注射麻醉, 行颈部正中切口, 长度约 2 cm, 仔细分离左颈总动脉, 以 5-0 号丝线结扎左侧颈总动脉, 缝合手术切口, 待大鼠苏醒后返回饲养笼, 7 d 后采用相同方法结扎右颈总动脉。72 只大鼠均顺利完成手术, 其中 2 只死

于手术创伤,2 只死于术后感染,其余 68 只均于双侧颈总动脉结扎后 7 d 采用激光散斑成像(LSCI)测量脑血流量(CBF),以双侧顶叶皮质脑血流量 < 正常大鼠的 50% 为模型制备成功^[4]。(2) 动物分组:68 只大鼠采用随机数字表法随机分为假手术组、模型组、褪黑素 5 mg/(kg·d) 组和褪黑素 10 mg/(kg·d) 组,每组 17 只。褪黑素组于模型制备后 1 d 分别腹腔注射溶于含体积分数为 1% 乙醇的生理盐水中的褪黑素 5 和 10 mg/kg,1 次/晚,连续注射 4 周;假手术组按照手术操作处理但不结扎双侧颈总动脉,模型组结扎双侧颈总动脉但不给予褪黑素,两组均于模型制备后 1 d 腹腔注射等剂量生理盐水,1 次/晚,连续注射 4 周。

2. 伊文思蓝和 FITC-Dextran 双重染色检测大鼠血-脑屏障通透性 模型制备成功后 28 d,每组选择 5 只大鼠处死,经左心室分别注射 2% 伊文思蓝溶液(1 ml/300 g)和 FITC-Dextran 溶液各 1 ml,10 min 后以质量分数为 4% 多聚甲醛溶液和 4℃ 生理盐水匀速灌注心脏,待灌注液澄清后,于冰盒上迅速分离基底节组织,置于中性多聚甲醛溶液固定,以质量分数为 20%、30% 蔗糖溶液梯度脱水,于冰冻切片机上制备层厚 20 μm 的切片,荧光显微镜观察伊文思蓝和 FITC-Dextran 外渗量,即荧光光斑大小、密度和荧光强度,伊文思蓝染色阳性呈红色、FITC-Dextran 染色阳性呈绿色,代表血-脑屏障通透性。

3. 聚合酶链反应测定基质金属蛋白酶-2 和 9 表达变化 模型制备后 28 d,每组选择 6 只大鼠断头取脑,每只切取基底节组织约 50 mg,至 -80℃ 液氮冻存。严格按照试剂盒说明书要求以 Trizol 试剂提取总 RNA。以 1 μl 提取的总 RNA 为模板合成 cDNA,按照试剂盒说明书要求进行 qRT-PCR。PCR 反应体系共 20 μl,包括 SYBR[®] Premix Ex Taq II 12.50 μl,PCR 正向引物和反向引物各 1 μl,cDNA 模板 2 μl,dH₂O 8.50 μl;反应条件为 95℃ 预变性 30 s、95℃ 变性 5 s、60℃ 延伸 30~34 s,共 40 个循环。MMP-2 上游引物序列为 5'-GATCCGTGGTGAGATCTTCTTC-3'、下游引物序列为 5'-AGAACACAGCCTTCTCTTCCTG-3',MMP-9 上游引物序列为 5'-CCTCTGCATGAAGACGACATAA-3'、下游引物序列为 5'-GGTCAGTTT TAGAGCCACGA-3';以 GAPDH 作为内参照物,上游引物序列为 5'-ACGGGAAGCTCACTGGCATGG-3'、下游引物序列

为 5'-CGCCTGCTTACCCACCTTCTT-3'。获得目的基因扩增的 Ct 值的方法参照文献[14],经 GAPDH 校正后,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

4. Western blotting 法测定 Occludin 和 Claudin-5 表达变化 模型制备后 28 d,每组选择 6 只大鼠断头取脑,每只切取基底节组织约 30 mg,至 -80℃ 液氮冻存。大鼠基底节组织称重后,加入含苯甲基磺酰氟(PMSF)的 RIPA 蛋白裂解液(PMSF 与 RIPA 体积比 1:500)中,电动匀浆器冰上匀浆至组织完全溶解,4℃、12 000 × g 离心 10 min,取上清液。二辛可宁酸(BCA)法测定目的蛋白表达量,行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),PVDF 膜转膜,质量分数为 10% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2 h,分别加入兔抗大鼠 Occludin 多克隆抗体(1:500)和兔抗大鼠 Claudin-5 多克隆抗体(1:100),4℃ 孵育过夜,体积分数为 10% TBST 溶液洗涤 5 min(×3 次),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1:4000)室温孵育 2 h,10% TBST 溶液洗涤 5 min(×3 次);以 GAPDH 作为内参照物,采用 Image J 图像分析系统(美国国立卫生研究院)进行灰度分析,计算目的蛋白相对表达量。

5. 统计分析方法 以 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、血-脑屏障通透性变化

与假手术组相比,模型组大鼠基底节荧光强度增强($P = 0.000$),经褪黑素[5 或 10 mg/(kg·d)]治疗后,基底节荧光强度减弱($P = 0.021, 0.000$),尤以褪黑素 10 mg/(kg·d) 组减弱程度更为明显($P = 0.000$;表 1,2)。荧光显微镜观察,假手术组大鼠基底节几乎未见红色或绿色荧光,模型组大鼠基底节红色或绿色荧光明显增强,表明伊文思蓝和 FITC-Dextran 大量外渗,血-脑屏障的通透性增加,经褪黑素[5 或 10 mg/(kg·d)]治疗后大鼠基底节红色或绿色荧光明显减弱,表明伊文思蓝和 FITC-Dextran 外渗减少,褪黑素具有保护血-脑屏障的作用(图 1)。

二、基底节 MMP-2 和 MMP-9 表达变化

与假手术组相比,模型组大鼠基底节 MMP-2 ($P = 0.000$)和 MMP-9 ($P = 0.000$)表达水平升高;经褪黑素 5 mg/(kg·d) 治疗后,大鼠基底节 MMP-2 表

表 1 不同处理组大鼠基底节血-脑屏障通透性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

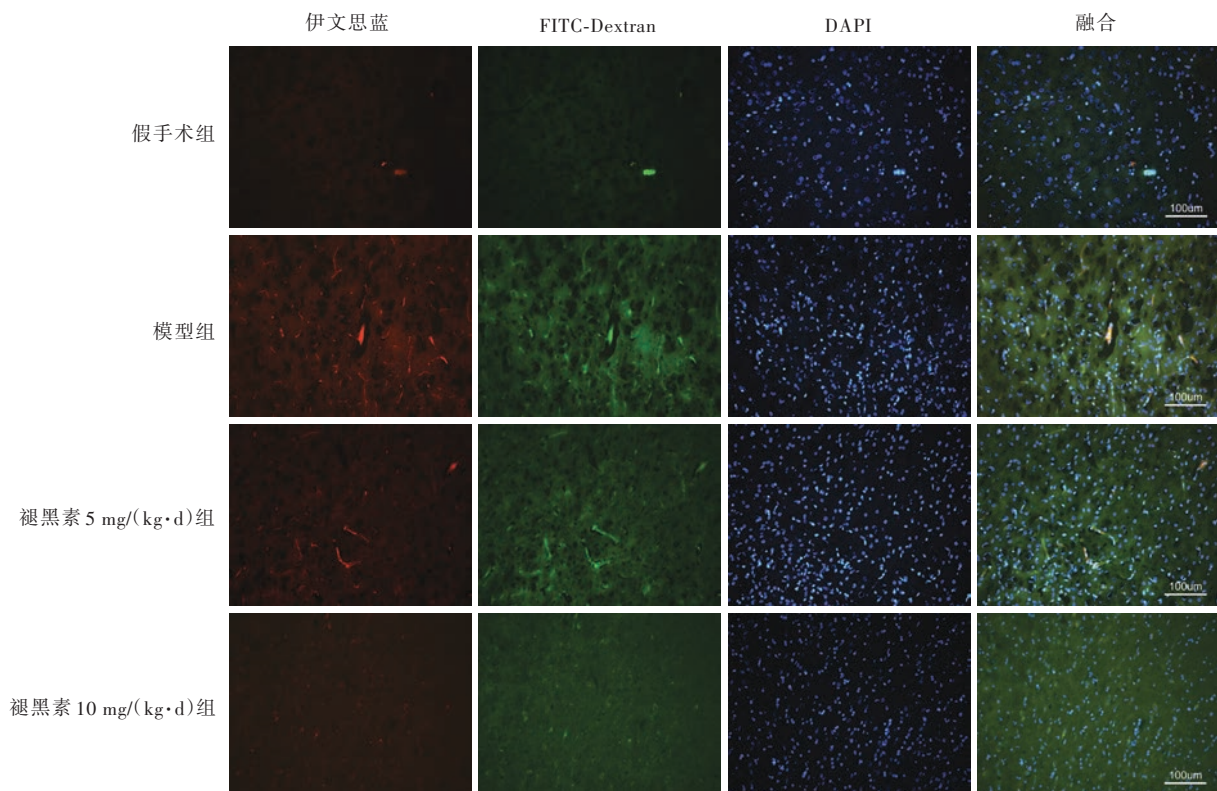
Table 1. Comparison of permeability of BBB in basal ganglia of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	荧光强度
假手术组(1)	5	2.47 ± 0.42
模型组(2)	5	16.47 ± 2.37
褪黑素 5 mg/(kg·d)组(3)	5	13.97 ± 2.37
褪黑素 10 mg/(kg·d)组(4)	5	4.53 ± 0.63
<i>F</i> 值		96.232
<i>P</i> 值		0.000

表 2 不同处理组大鼠基底节血-脑屏障通透性的两两比较

Table 2. Paired comparison of permeability of BBB in basal ganglia of rats in different groups

组间两两比	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1) (2)	-14.000	0.000
(1) (3)	-11.507	0.000
(1) (4)	-2.965	0.051
(2) (3)	2.493	0.021
(2) (4)	11.935	0.000
(3) (4)	9.442	0.000



FITC-Dextran, 异硫氰酸荧光素标记的右旋糖酐; DAPI, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚

图 1 荧光显微镜观察显示,假手术组大鼠基底节未见红色或绿色荧光,模型组大鼠基底节红色和绿色荧光明显增强,予褪黑素 [5 和 10 mg/(kg·d)] 治疗后,大鼠基底节组织红色和绿色荧光明显减弱 中倍放大

Figure 1 Fluorescence microscope findings mediam power magnified Neither red nor green fluorescent plots were found in basal ganglia of sham group rats. A number of red and green fluorescent plots were obvious in basal ganglia of BCCAO group rats. The number of red and green fluorescent plots decreased significantly in basal ganglia of 5 or 10 mg/(kg·d) melatonin treatment group rats.

达水平降低 ($P = 0.000$) 但仍高于假手术组 ($P = 0.006$), 而 MMP-9 表达水平无明显变化 ($P > 0.05$); 经褪黑素 10 mg/(kg·d) 治疗后, 大鼠基底节 MMP-2 ($P = 0.000$) 和 MMP-9 ($P = 0.000$) 表达水平均降低且接近假手术组 ($P > 0.05$); 褪黑素 10 mg/(kg·d) 组大鼠基底节 MMP-2 ($P = 0.025$) 和 MMP-9 ($P = 0.000$) 表达水平相较 5 mg/(kg·d) 组下降更为明显 (表 3, 4)。

三、基底节 Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白表达变化

与假手术组相比, 模型组大鼠基底节 Occludin 蛋白 ($P = 0.000$) 和 Claudin-5 蛋白 ($P = 0.000$) 表达水平降低; 经褪黑素 5 mg/(kg·d) 治疗后, 大鼠基底节 Claudin-5 蛋白表达水平升高 ($P = 0.000$) 但仍低于假手术组 ($P = 0.000$), 而 Occludin 蛋白表达水平无明

表3 不同处理组大鼠基底节 MMP-2 和 MMP-9 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Comparison of expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA levels in basal ganglia of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

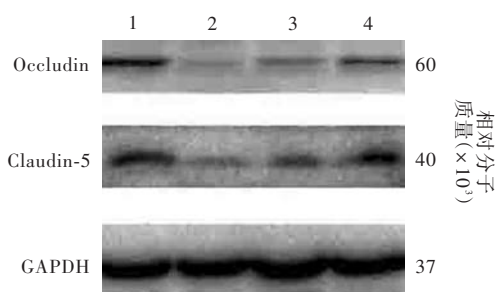
组别	例数	MMP-2	MMP-9
假手术组(1)	6	1.02 ± 0.29	1.05 ± 0.16
模型组(2)	6	18.35 ± 2.55	4.15 ± 1.08
褪黑素 5 mg/(kg·d)组(3)	6	3.32 ± 0.40	3.49 ± 0.50
褪黑素 10 mg/(kg·d)组(4)	6	1.50 ± 0.08	1.11 ± 0.21
<i>F</i> 值		242.650	41.432
<i>P</i> 值		0.000	0.000

MMP-2, matrix metalloproteinase-2, 基质金属蛋白酶-2; MMP-9, matrix metalloproteinase-9, 基质金属蛋白酶-9。The same for Table 4

表5 不同处理组大鼠基底节 Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5. Comparison of Occludin and Claudin-5 protein levels in basal ganglia of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Occludin	Claudin-5
假手术组(1)	6	1.18 ± 0.07	1.31 ± 0.05
模型组(2)	6	0.81 ± 0.04	0.79 ± 0.03
褪黑素 5 mg/(kg·d)组(3)	6	0.88 ± 0.09	1.15 ± 0.06
褪黑素 10 mg/(kg·d)组(4)	6	1.04 ± 0.06	1.16 ± 0.03
<i>F</i> 值		33.687	152.257
<i>P</i> 值		0.000	0.000



1, 假手术组; 2, 模型组; 3, 褪黑素 5 mg/(kg·d)组; 4, 褪黑素 10 mg/(kg·d)组
GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图2 Western blotting 法检测显示, 相较假手术组基底节 Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白条带的表达灰度, 模型组大鼠基底节 Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白表达水平明显降低; 经褪黑素 5 mg/(kg·d) 治疗后, Claudin-5 蛋白表达水平升高, 但 Occludin 蛋白表达无明显变化; 经褪黑素 10 mg/(kg·d) 治疗后, Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白表达水平平均升高

Figure 2 Western blotting findings. Occludin and Claudin-5 protein bands in basal ganglia of BCCAO group rats were less dense than that of sham group rats. 5 mg/(kg·d) melatonin treatment could elevate Claudin-5 level but not in Occludin expression. 10 mg/(kg·d) melatonin treatment was able to elevate both Claudin-5 and Occludin levels.

显变化($P > 0.05$); 经褪黑素 10 mg/(kg·d) 治疗后, 大鼠基底节 Occludin 蛋白($P = 0.000$)和 Claudin-5 蛋白($P = 0.000$)表达水平升高但仍低于假手术组($P = 0.003, 0.000$); 褪黑素 10 mg/(kg·d) 组大鼠基底节 Occludin 蛋白表达水平较 5 mg/(kg·d) 组升高更明显($P = 0.001$), 而 Claudin-5 蛋白水平褪黑素两剂量组间差异无统计学意义($P > 0.05$; 表 5, 6; 图 2)。

讨 论

本研究显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠基底节伊文思蓝和 FITC-Dextran 外渗增加, MMP-2 和

表4 不同处理组大鼠基底节 MMP-2 和 MMP-9 表达水平的两两比较

Table 4. Paired comparison of MMP-2 and MMP-9 mRNA levels in basal ganglia of rats in different groups

组间两两比	MMP-2		MMP-9	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1) (2)	-17.331	0.000	-3.095	0.000
(1) (3)	-2.297	0.006	-2.445	0.000
(1) (4)	-0.475	0.534	-0.058	0.870
(2) (3)	15.035	0.000	0.650	0.080
(2) (4)	16.857	0.000	3.037	0.000
(3) (4)	1.822	0.025	2.387	0.000

表6 不同处理组大鼠基底节 Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白表达水平的两两比较

Table 6. Paired comparison of Occludin and Claudin-5 protein levels in basal ganglia of rats in different groups

组间两两比	Occludin		Claudin-5	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1) (2)	0.370	0.000	0.517	0.000
(1) (3)	0.297	0.000	0.157	0.000
(1) (4)	0.138	0.003	0.148	0.000
(2) (3)	-0.073	0.084	-0.360	0.000
(2) (4)	-0.232	0.000	-0.368	0.000
(3) (4)	-0.158	0.001	-0.008	0.744

MMP-9 水平升高, Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白表达水平降低, 表明慢性脑低灌注可使大鼠基底节基质金属蛋白酶活化伴 Occludin 蛋白降解, 进而破坏血-脑屏障完整性。经褪黑素治疗后, 大鼠基底节伊文思蓝和 FITC-Dextran 外渗减少, MMP-2 和 MMP-9 水平降低, Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白水平升高, 表明褪黑素可抑制大鼠基底节基质金属蛋白酶活化、延缓 Occludin 蛋白降解, 使血-脑屏障破坏改善。

血-脑屏障通过调节血液与脑实质间的离子交换, 及氧气和营养物质的流入与废弃物等的流出, 以维持中枢神经系统代谢^[15]。脑血管内皮细胞具

有与其他组织内皮细胞不同的生理学特性,通过紧密连接相连,这些紧密连接形成跨内皮电阻而防止物质通过细胞旁路径进入脑实质^[16],极大地限制血液中化合物进入中枢神经系统。脑血管内皮细胞表达特定的转运蛋白和受体蛋白,允许代谢物(或)营养物进入毛细血管。FITC-Dextran 和伊文思蓝是临床常用的评价血-脑屏障完整性的染料,基质金属蛋白酶隶属锌和钙依赖性蛋白水解酶家族,具有消化 Occludin 蛋白的作用,此类蛋白质在血-脑屏障的破坏过程中发挥重要作用;而 MMP-2 和 MMP-9 为明胶酶的一种,可消化脑血管内皮细胞的基底层,亦是血-脑屏障破坏的主要原因之一^[17]。

血-脑屏障在脑组织缺氧、缺血等病理情况下极易受损,导致通透性改变,允许有害大分子物质自由出入中枢神经系统。目前鲜有关于 BCCAO 法制备慢性脑低灌注大鼠模型后血-脑屏障破坏的研究报道^[18],在 Shin 等^[19]的动物实验中,将慢性脑低灌注模型制备后 1、2、3 和 6 周大鼠皮质和丘脑伊文思蓝的外渗量化,发现模型制备后 2~6 周大鼠即发生血-脑屏障功能障碍。在本研究中,慢性脑低灌注模型制备后 28 天,伊文思蓝和 FITC-Dextran 仍有外渗,表明血-脑屏障完整性仍未得到完整修复。

由 Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白组成的紧密连接蛋白(TJP)是血-脑屏障的重要组成部分^[20]。Claudin-5 蛋白通过密闭的脑血管内皮细胞间隙形成血管之间联系,导致跨内皮电阻增高,允许水溶性物质通过细胞旁途径自血液进入脑实质^[21]。研究显示,在铅暴露的血-脑屏障损伤模型中,伴随神经炎症反应,基质金属蛋白酶在早期和延迟的血-脑屏障破坏中发挥关键作用^[22]。Wang 等^[23]的研究显示,急性缺血、缺氧损伤可使氧自由基和蛋白酶攻击细胞膜并降解脑血管内皮细胞之间的紧密连接蛋白,从而破坏血-脑屏障的完整性。

业已证实,褪黑素可通过多种途径保持血-脑屏障的完整性和通透性,包括对还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶-2的抑制,以及对沉默信息调节因子 1(SIRT1)和核苷酸结合寡聚化的促进^[24]。Wang 等^[25]的动物实验显示,褪黑素可通过激活老年小鼠腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)和抑制 gp91phox(NADPH 氧化酶催化亚基),以减轻脂多糖(LPS)诱导的血-脑屏障破坏。在本研究中,经褪黑素 5 mg/(kg·d) 治疗后,大鼠基底节伊文思蓝和 FITC-Dextran 外渗减少、MMP-2 水平降低、Claudin-5

蛋白水平升高,但仍与假手术组差异有统计学意义;经褪黑素 10 mg/(kg·d) 治疗后,大鼠基底节伊文思蓝和 FITC-Dextran 外渗进一步减少、MMP-2 和 MMP-9 水平持续降低且接近假手术组, Occludin 蛋白和 Claudin-5 蛋白持续升高但仍低于假手术组,表明褪黑素可通过抑制基质金属蛋白酶的表达使紧密连接蛋白降解减少,从而保护血-脑屏障的完整性。既往认为,褪黑素 5 mg/(kg·d) 腹腔注射即可对各类模型的血-脑屏障发挥有效保护作用^[26-28], 但仍 有 动 物 实 验 的 褪 黑 素 剂 量 需 高 达 20 mg/(kg·d)^[29]。本研究结果显示,褪黑素 5 mg/(kg·d) 即可产生部分疗效,但以褪黑素 10 mg/(kg·d) 组大鼠基底节荧光强度减弱、MMP-2 和 MMP-9 水平降低,以及 Occludin 蛋白水平升高程度更为明显,表明褪黑素 10 mg/(kg·d) 腹腔注射对慢性脑低灌注模型大鼠具有更为肯定的血-脑屏障保护作用。此外值得注意的是,与 Claudin-5 蛋白相比, Occludin 蛋白对褪黑素治疗更加敏感,此与既往研究结论相一致^[30-31]。Ren 等^[31]和 Simpson 等^[32]的研究均显示,经褪黑素治疗后 Occludin 蛋白水平显著升高,而 Claudin-5 蛋白水平升高得不明显,究其原因,可能是由于除血管内皮细胞外,部分胶质细胞也表达 Occludin 蛋白,而 Claudin-5 蛋白仅由血管内皮细胞表达。

综上所述,褪黑素可通过抑制基质金属蛋白酶的表达,延缓紧密连接蛋白的降解,从而有效减轻慢性脑低灌注模型大鼠的血-脑屏障损害。然而,褪黑素作用于哪条信号转导通路、通过哪些靶基因调控尚待进一步深入研究。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Yilmaz P, Ikram MK, Niessen WJ, Ikram MA, Vernooij MW. Practical small vessel disease score relates to stroke, dementia, and death[J]. Stroke, 2019, 49:2857-2865.
- [2] Duncombe J, Kitamura A, Hase Y, Ihara M, Kalaria RN, Horsburgh K. Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia [J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131:2451-2468.
- [3] Baezner H, Hennerici M. From trepidant abasia to motor network failure: gait disorders as a consequence of subcortical vascular encephalopathy (SVE): review of historical and contemporary concepts[J]. J Neurol Sci, 2005, 229/230:81-88.
- [4] Wang R, Liu N, Zhao HY, Du JM, Huang YH. Role of aerobic exercise in alleviating blood-brain barrier damage in rats with cerebral small vessel disease[J]. Zhonghua Shi Yong Zhen Duan Yu Zhi Liao Za Zhi, 2019, 33:417-421.[王茹,刘楠,赵弘轶,杜菊梅,黄勇华.有氧运动对脑小血管病大鼠血脑屏障损伤的改

- 善作用[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33:417-421.]
- [5] Jin X, Liu J, Liu W. Early ischemic blood brain barrier damage: a potential indicator for hemorrhagic transformation following tissue plasminogen activator (tPA) thrombolysis [J]? *Curr Neurovasc Res*, 2014, 11:254-262.
- [6] Hainsworth AH, Brittain JF, Khatun H. Pre-clinical models of human cerebral small vessel disease: utility for clinical application[J]. *J Neurol Sci*, 2012, 322:237-240.
- [7] Edrissi H, Schock SC, Cadonic R, Hakim AM, Thompson CS. Cilostazol reduces blood brain barrier dysfunction, white matter lesion formation and motor deficits following chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Brain Res*, 2016, 1646:494-503.
- [8] Schreiber S, Bueche CZ, Garz C, Braun H. Blood brain barrier breakdown as the starting point of cerebral small vessel disease: new insights from a rat model [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2013, 5:4.
- [9] Liu SY, Ling N. Research progress on physiological effect of melatonin[J]. *Dong Wu Yi Xue Jin Zhan*, 2005, 26:11-14.[刘淑英, 龄南. 褪黑素生理作用的研究进展[J]. 动物医学进展, 2005, 26:11-14.]
- [10] Jenwitheesuk A, Nopparat C, Mukda S, Wongchitrat P, Govitrapong P. Melatonin regulates aging and neurodegeneration through energy metabolism, epigenetics, autophagy and circadian rhythm pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15:16848-16884.
- [11] Alluri H, Wilson RL, Anasooya Shaji C, Wiggins-Dohlvik K, Patel S, Liu Y, Peng X, Beeram MR, Davis ML, Huang JH, Tharakan B. Melatonin preserves blood-brain barrier integrity and permeability via matrix metalloproteinase-9 inhibition [J]. *PLoS One*, 2016, 11:E0154427.
- [12] Tai SH, Chen HY, Lee EJ, Chen TY, Lin HW, Hung YC, Huang SY, Chen YH, Lee WT, Wu TS. Melatonin inhibits postischemic matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activation via dual modulation of plasminogen/plasmin system and endogenous MMP inhibitor in mice subjected to transient focal cerebral ischemia[J]. *J Pineal Res*, 2010, 49:332-341.
- [13] Ma M, Zhao Q, Du JS, Wang Y. Evaluation of vascular dementia model by partial ligation of common carotid artery in rats [J]. *Zhongguo Lao Nian Xue Za Zhi*, 2012, 32:72-74.[马明, 赵晴, 杜建时, 王宇. 大鼠颈总动脉分次结扎建立血管性痴呆模型评价[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32:72-74.]
- [14] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29:E45.
- [15] Coureuil M, Lécuyer H, Bourdoulous S, Nassif X. A journey into the brain: insight into how bacterial pathogens cross blood-brain barriers [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15:149-159.
- [16] Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier [J]. *Trends Neurosci*, 2001, 24:719-725.
- [17] Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27:697-709.
- [18] Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54:162-180.
- [19] Shin JS, Hyun SY, Kim DH, Lee S, Jung JW, Choi JW, Ko KH, Kim JM, Ryu JH. Chronic hypoperfusion increases claudin-3 immunoreactivity in rat brain [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 445:144-148.
- [20] Xu B, Zhang Y, Du JL. Progress in the study of the blood-brain barrier [J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2016, 68:306-322.[许兵, 张俞, 杜久林. 脑屏障的研究进展[J]. 生理学报, 2016, 68:306-322.]
- [21] Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications [J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6:258-268.
- [22] Liu XQ. Mechanism of metalloproteinases MMP2/9 lead-induced brain barrier destruction [D]. Xi'an: the Forth Military Medical University, 2014.[刘新秦. 基质金属蛋白酶 MMP2/9 在铅导致脑屏障系统破坏中的机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2014.]
- [23] Wang X, Liu Y, Sun Y, Liu W, Jin X. Blood brain barrier breakdown was found in non-infarcted area after 2-h MCAO [J]. *J Neurol Sci*, 2016, 363:63-68.
- [24] Liu WC, Wang X, Zhang X, Chen X, Jin X. Melatonin supplementation, a strategy to prevent neurological diseases through maintaining integrity of blood brain barrier in old people [J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9:165.
- [25] Wang X, Xue GX, Liu WC, Shu H, Wang M, Sun Y, Liu X, Sun YE, Liu CF, Liu J, Liu W, Jin X. Melatonin alleviates lipopolysaccharide-compromised integrity of blood-brain barrier through activating AMP-activated protein kinase in old mice [J]. *Aging Cell*, 2017, 16:414-421.
- [26] Wang Z, Zhou F, Dou Y, Tian X, Liu C, Li H, Shen H, Chen G. Melatonin alleviates intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats via suppressing apoptosis, inflammation, oxidative stress, DNA damage, and mitochondria injury [J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9:74-91.
- [27] Dong Y, Fan C, Hu W, Jiang S, Ma Z, Yan X, Deng C, Di S, Xin Z, Wu G, Yang Y, Reiter RJ, Liang G. Melatonin attenuated early brain injury induced by subarachnoid hemorrhage via regulating NLRP3 inflammasome and apoptosis signaling [J]. *J Pineal Res*, 2016, 60:253-262.
- [28] Turgut M, Erdogan S, Ergin K, Serter M. Melatonin ameliorates blood-brain barrier permeability, glutathione, and nitric oxide levels in the choroid plexus of the infantile rats with kaolin-induced hydrocephalus [J]. *Brain Res*, 2007, 1175:117-125.
- [29] Chen YC, Sheen JM, Tain YL, Chen CC, Tiao MM, Huang YH, Hsieh CS, Huang LT. Alterations in NADPH oxidase expression and blood-brain barrier in bile duct ligation-treated young rats: effects of melatonin [J]. *Neurochem Int*, 2012, 60:751-758.
- [30] Zhou W, Marinescu M, Veltkamp R. Only very early oxygen therapy attenuates posthemorrhagic edema formation and blood-brain barrier disruption in murine intracerebral hemorrhage [J]. *Neurocrit Care*, 2015, 22:121-132.
- [31] Ren C, Li N, Wang B, Yang Y, Gao J, Li S, Ding Y, Jin K, Ji X. Limb ischemic preconditioning attenuates blood-brain barrier disruption by inhibiting activity of MMP-9 and occludin degradation after focal cerebral ischemia [J]. *Aging Dis*, 2015, 6:406-417.
- [32] Simpson JE, Wharton SB, Cooper J, Gelsthorpe C, Baxter L, Forster G, Shaw PJ, Savva G, Matthews FE, Brayne C, Ince PG. Alterations of the blood-brain barrier in cerebral white matter lesions in the ageing brain [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 486:246-251.

(收稿日期: 2019-07-24)