·基础研究·

高压氧和SB203580联合应用对大鼠脑缺血再灌注紧密连接蛋白claudin-1的表达及血脑屏障通透性的影响*

孙 涛[1] 马秀岩[2] 张倩茹[3] 赵 红[3,5] 陈学新[4]

摘要

目的: 探讨高压氧(HBO)和SB203580联合应用对大鼠脑缺血再灌注紧密连接蛋白claudin-1的表达及血脑屏障的通透性影响。

方法:雄性Wistar大鼠,随机分成假手术组(sham)、脑缺血再灌注组(IR)、HBO+脑缺血再灌注组(HBO+IR)、脑缺血再灌注组+SB203580 (IR+SB203580)、HBO+脑缺血再灌注+SB203580组 (IR+HBO+SB203580)。复制局灶性脑缺血再灌注模型,IR+SB203580组和IR+HBO+SB20358组于脑缺血再灌注前30min经侧脑室注射100μl P38MAPK信号传导通路抑制剂SB203580, HBO+IR组与IR+HBO+SB203580组并于再灌注期间行0.25MPa(2.5ATA) HBO治疗5次,在处死动物前1h经尾静脉注射2%伊文思兰(EB),采用EB法检测缺血再灌注后血脑屏障通透性的变化。应用免疫组织化学的方法和Western blot法分别观察claudin-1蛋白缺血再灌注72h后脑组织中的分布及claudin-1蛋白的表达水平的变化。

结果: Claudin-1的蛋白表达与sham组相比于再灌注后72h表达显著降低($P<0.01$),同时伴有脑组织EB的含量显著增高($P<0.01$)。HBO+IR组与IR+ SB203580组较IR组脑组织claudin-1蛋白表达水平明显增加($P<0.01$,$P<0.05$),脑组织EB的含量显著降低($P<0.01$)。IR+HBO+SB203580组相比脑组织中claudin-1蛋白表达与IR+HBO组、IR+SB203580较比显著增加($P<0.01$),脑组织EB的含量显著降低($P<0.01$)。

结论:高压氧从蛋白水平可明显增加脑缺血再灌注脑组织中紧密连接相关蛋白claudin-1的蛋白表达,从而降低血脑屏障通透性;高压氧与SB203580二者具有协同作用。

关键词 高压氧; 血脑屏障; 脑缺血再灌注;claudin-1; SB203580; 大鼠

中图分类号:R743.3,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2012)-11-993-04

Synergic effects of hyperbaric oxygen and SB203580 on expression of claudin-1 in brain tissues and blood brain barrier permeability after cerebral ischemia-reperfusion in rat/SUN Tao, MA Xiuyan, ZHANG Qianru, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2012,27(11):993—996

Abstract

Objective: To investigate the effects of hyperbaric oxygen (HBO) and SB203580 on expressions of claudin-1 in brain tissues and blood brain barrier (BBB) permeability after cerebral ischemia-reperfusion.

Method: Male Wistar mice were randomly assigned into sham, ischemia-reperfusion (IR), IR+HBO, IR+SB203580, IR+HBO+SB203580 groups. After cerebral ischemia-reperfusion models were established, 0.25MPa (ATA) HBO were applied 5 times during the reperfusion period, and 2% Evans blue (EB) was injected into tail veins 1h be-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.11.002

*基金项目:辽宁省教育厅高等学校科学研究项目(2005L456)

1 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科,北京,100076; 2 沈阳市第九人民医院; 3 中国医科大学基础医学院机能实验中心; 4 中国医科大学附属第一临床医院高压氧科; 5 通讯作者

作者简介:孙涛,男,硕士,主治医师; 收稿日期:2011-09-26

fore animals were executed. Expressions of claudin-1 and the contents of EB were determined by immunohistochemistry, Western blot, and spectrophotometer, respectively.

Result: In IR group, the EB contents in brain tissue increased successively compared with sham group ($P<0.01$). While the expressions of claudin-1 decreased significantly consecutively in IR group, The protein expressions of claudin-1 increased significantly and contents of EB decreased significantly in IR+HBO group and IR+SB203580 group compared with IR group ($P<0.01$, $P<0.05$). The protein expressions of claudin-1 in IR+HBO+SB203580 group increased as compared with IR+HBO group ($P<0.01$) and IR+SB203580 group($P<0.01$).

Conclusion: HBO intervention can decrease the permeability of BBB via boosting the protein expressions of claudin-1. HBO and SB203580 have synergic effect.

Author's address Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, 100076

Key word hyperbaric oxygen; blood brain-barrier; ischemia-reperfusion; SB203580; rat

血脑屏障(blood brain barrier, BBB)破坏是缺血再灌注性脑损伤重要的病理生理基础。血脑屏障主要由内皮细胞和周细胞构成,星形细胞足突包围在毛细血管外周[1]。随着研究的进展,Praveen等提出血管内皮细胞之间的紧密连接是形成血脑屏障的关键因素[1]。紧密连接的分子组成成分包括细胞之间内在的跨膜蛋白,在不同细胞中发现的连接黏附分子(JAMs)和若干胞质附着蛋白。其中跨膜蛋白claudin对血脑屏障的紧密连接起着重要作用[2]。当claudin蛋白出现结构和功能上的障碍时,血脑屏障功能都会随之改变。Claudin-1是claudins基因家族主要成员之一, 近来的研究表明claudin-1是决定体内血脑屏障紧密连接的主要成分[3—4]。

丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路是生物体内重要的信号转导系统,参与介导细胞生长、发育、分裂和分化等多种生理及病理过程[5]。P38丝裂原激活蛋白激酶 (P38 mitogen-activated protein kinase, P38MAPK)是丝裂原活化蛋白激酶的一种非常保守的传导通路,P38MAPK信号传导通路在缺血再灌注性组织损伤中被激活,并发挥重要的作用[6]。SB203580作为P38MAPK特异性的抑制剂在研究P38 MAPK信号传导通路的作用中被广泛的应用。

高压氧(hyperbaric oxygen,HBO)疗法作为无创性治疗手段,在临床上已经得以应用。HBO可以增加血氧分压,提高氧在组织内的弥散性,增大氧的弥散距离,对改善组织内部微环境具有明显的作用[7—8]。但其对血脑屏障的作用研究甚少,作用的确切机制有待于进一步的研究。本研究通过复制脑缺血再灌注模型,观察高压氧和SB203580对claudin-1蛋白的表达的变化,从而探讨HBO在血脑屏障保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性Wistar大鼠, 3—4月龄,体重为(250±300)g(由中国医科大学动物部提供)。动物随机分为假手术组(sham)(48只)、脑缺血再灌注组(IR)(48只)、HBO+脑缺血再灌注组(HBO+IR)(48只)、脑缺血再灌注+SB203580组(IR+SB203580)(48只)和HBO+脑缺血再灌注组+ SB203580(HBO+IR+SB203580)(48只)。

1.2 脑缺血再灌注动物模型的复制

采用大脑中动脉线栓法[9],对照组为假手术组,仅结扎颈外动脉,造成与实验组同样的手术损伤。IR+SB203580与HBO+IR+SB203580组于再灌注前30min经侧脑室注射SB203580 100μl。

1.3 实验鼠的高压氧处理

HBO+IR组和HBO+IR+SB203580组于术后0h、2h、9h、21h、45h、69h(每组8只大鼠)进入HBO舱(型号GB12130-2005)内,方法参见[8]。sham组、IR组和IR+SB203580组亦置于舱内,模拟除压力,氧浓度外的类同实验组的其他处理过程和环境条件。

1.4 脑组织伊文思兰(Evans blue, EB)测定

参考文献9。

1.5 免疫组化检测

免疫组化检测脑缺血再灌注脑组织微血管内皮细胞claudin-1蛋白的分布和表达变化。大鼠于再

灌注后72h, 用水合氯醛麻醉后,沿胸骨左侧剪开胸腔,从左心室灌注预冷生理盐水(10ml/min),无血污后改滴4%多聚甲醛(5—10ml/min),约250ml,断头取脑;将标本在4%多聚甲醛后固定24h,依次放入15%、20%、30%蔗糖溶液中脱水;OTC包埋,冰冻切片机冠状连续切片,厚度为10μm,进行免疫组化染色。免疫组化结果用Motic Images Advanced 3.2图像分析系统采集照片,并进行定量分析。

1.6 Western blot法检测

应用Western blot法检测脑缺血再灌注72h脑组织微血管段claudin-1蛋白表达的变化。分离脑缺血再灌注脑组织微血管段,加入裂解液后匀浆,4℃,15000g离心15min,制成蛋白质抽提液,取上清20μl,用考马斯亮蓝G-250结合法进行蛋白定量;10%SDS-PAGE分离后,转印到硝酸纤维素膜上;claudin-1的一抗稀释度均为1∶500(Santa Cruz Biotechnology),β-actin抗体的稀释度为1∶5000,4℃孵育过夜;相应二抗室温孵育3h;ECL试剂反应,示出活性的claudin-1位于蓝色背景上的透亮带。采用Chemi Imager 5500 2.03版软件扫描胶片,Fluor Chem 2.0图像分析仪对条带积分光密度进行定量分析。

1.7 统计学分析

用SPSS 13.0统计学软件进行统计学分析,所有资料用平均值±标准差表示,两组均数间的比较用t检验。

2 结果

2.1 HBO和SB203580对脑缺血再灌注72h大鼠脑组织中EB含量的影响

从表1可见,IR组脑组织EB的含量与sham组相比明显增加($P<0.01$)。IR+HBO组和IR+SB203580组与IR组相比,EB渗出明显减少($P<0.01$,$P<0.05$)。IR+HBO+SB203580组脑组织EB的含量,与IR+HBO组相比显著增加($P<0.01$),与IR+SB203580组相比显著降低($P<0.01$)。

2.2 HBO和SB203580对脑缺血再灌注72h大鼠微血管段claudin-1蛋白表达分布的变化

见图1—2,表2。从图1中可见,紧密连接蛋白claudin-1在各组大鼠脑组织中沿血管呈阳性表达。图2 Western blot显示高压氧和SB203580对脑缺血再灌注72h大鼠claudin-1蛋白表达的影响。免疫组化和Western blot显示一致的实验结果。脑组织claudin-1的蛋白表达在IR组显著降低与sham组相比($P<0.01$),与IR组相比IR+HBO和IR+SB203580组claudin-1的蛋白表达明显增加($P<0.01$,$P<0.05$)。IR+HBO+SB203580组脑组织claudin-3的蛋白表达与IR+HBO组相比显著减少($P<0.01$);与IR+SB203580组相比显著增加($P<0.01$)。

表1 HBO和SB203580对脑缺血再灌注24h大鼠脑组织中EB含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	EB含量(μg/g脑组织)
sham组	8	0.12±0.009
IR组	8	0.53±0.028①
IR+HBO组	8	0.21±0.026②
IR+SB203580组	8	0.33±0.043③
IR+HBO+SB203580组	8	0.15±0.029④

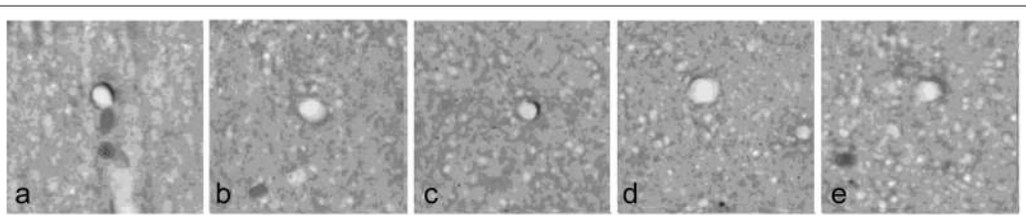
注:与sham组比较①$P<0.01$;与IR组比较②$P<0.01$,③$P<0.05$;与IR+HBO组和IR+SB203580组相比④$P<0.01$

表2 HBO和SB203580对脑缺血再灌注72h大鼠claudin-1蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$,%)

组别	例数	平均面密度值	平均光密度值
sham组	8	0.22±0.011	0.43±0.032
IR组	8	0.02±0.003①	0.13±0.013①
IR+HBO组	8	0.11±0.008②	0.22±0.015②
IR+SB203580组	8	0.13±0.006③	0.20±0.012③
IR+HBO+SB203580组	8	0.20±0.011④	0.33±0.022④

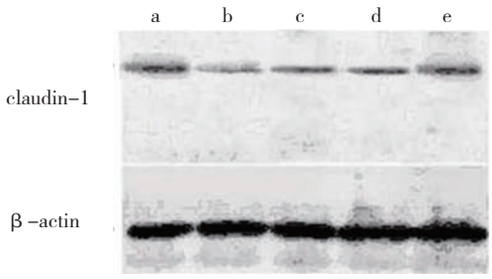
注:与sham组比较①$P<0.01$;与IR组比较②$P<0.01$,③$P<0.05$;与IR+HBO和IR+SB203580相比④$P<0.01$

图1 HBO和SB203580对脑缺血再灌注72h大鼠微血管段claudin-1蛋白表达 (免疫组化,×400)



sham组 IR组 IR+HBO组 IR+SB203580组 IR+HBO+SB203580组

图2 HBO和SB203580对脑缺血再灌注72h大鼠claudin-1蛋白表达的影响(Western blot 蛋白图谱)



(a)sham组; (b)IR组; (c)IR+HBO组; (d)IR+SB203580组; (e)IR+HBO+SB203580组

3 讨论

BBB是维持中枢神经系统内环境稳定的结构基础,其结构与功能的变化也是多种神经系统疾病病理变化的核心过程[1]。脑缺血再灌注损伤,主要是指缺血脑组织恢复血液灌注后,脑组织损伤反而加重,表现为其神经损害体征和形态学改变有时会较前更加明显等[2]。血脑屏障的改变是脑缺血再灌注损伤过程中重要的病理生理过程。通常以EB的含量作为衡量血脑屏障通透性的检测指标,脑缺血再灌注后EB的含量明显增加。

Claudins属于一类跨膜蛋白,目前已发现其有24个家族成员,结构类似,分子量在17-27kDa之间。其中claudin-1在1998年被认为是组成紧密连接的必要组成部分。所以研究claudin-1在脑缺血再灌注损伤中导致BBB变化是非常必要的[10—12]。研究发现,缺血再灌注72h claudin-1的表达显著减少,表明claudin-1在BBB后期的延迟开放中起到重要的作用。

脑缺血再灌注损伤是常见的病理生理过程,近来研究发现脑缺血再灌注导致MAPK家族的迅速激活。MAPK家族在细胞信号转导中起着重要的作用,参与细胞生长、发育、分化、凋亡等生理、病理过程。P38MAPK通路是1993年发现的一条信号38MAPK通路,它是脑缺血损伤过程的重要信号系统[8]。应用P38MAPK信号传导通路的特异性的抑制剂SB203580后,结果显示脑缺血再灌注72h claudin-1的蛋白表达明显增加,同时伴有脑组织EB含量的减少。表明P38MAPK信号传导通路脑缺血再灌注损伤中导致claudin-1的蛋白表达的变化起一定的作用。

HBO的效应主要是通过提高血氧张力、增加组织中的氧储量和氧在毛细血管中的扩散距离、降低血液黏滞性、激活体内有氧氧化等实现[7]。本实验表明,HBO显著增加脑缺血再灌注claudin-1的蛋白表达及降低脑组织EB含量,具有在脑缺血再灌注损伤保护BBB的功能,HBO和SB203580二者具有协同作用。

参考文献

[1] Wang CX, Yang Y, Yang T, et al. A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: introduction and evaluation[J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2001,7(2):115—120.

[2] Gao D, Zhang X, Jiang X, et al. Resveratrol reduces the elevated level of MMP-9 induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice[J]. Life Sci ,2006,78(22):2564—2570.

[3] Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours[J]. Histopathology ,2005, 46(5):551—560.

[4] Tsukita S, Furuse M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores[J]. J Cell Biol ,2000,149(1):13—16.

[5] He QP, Ding C, Li PA. Effects of hyperglycemic and normoglycemic cerebral ischemia on phosphorylation of c-jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2003, 49(8):1241—1247.

[6] Pargellis C, Tong L, Churchill L, et al. Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site[J]. Nat Struct Biol,2002, 9(4):268—272.

[7] 赵红,张倩茹,卢晓梅,等.高压氧对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织小窝蛋白-1、基质金属蛋白酶-9表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(10):550—554.

[8] Ratajczak-Wrona W, Jablonska E, Marcinczyk M, et al. Role of p38 MAPK pathway in induction of iNOS expression in neutrophils and peripheral blood mononuclear cells in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2009,67(11):2354—2363.

[9] 赵红,张倩茹,卢晓梅,等.高压氧对局灶性脑缺血再灌注大鼠紧密连接蛋白及血脑屏障通透性的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2011,4(18):89—92.

[10] Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications [J]. Neurobiol Dis, 2004,16(1):1—13.

[11] Inoue K, Oyamada M, Mitsufuji S, et al. Different changes in the expression of multiple kinds of tight-junction proteins during ischemia-reperfusion injury of the rat ileum[J]. Acta Histochem Cytochem, 2006,39(2):35—45.

[12] Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins[J]. J Cell Sci ,2004, 117(Pt 12):2435—2447.