

丰富环境干预对缺血再灌注脑损伤后大鼠神经功能改善的血脑屏障机制研究*

余克威^{1,2} 张琦琪¹ 谢鸿宇^{1,2} 刘 罡¹ 吴军发¹ 吴 毅^{1,2,3}

摘要

目的:观察丰富环境干预对缺血再灌注脑损伤大鼠的血脑屏障结构及其功能的影响。

方法:采用线栓栓塞大鼠大脑中动脉的方法制备缺血再灌注脑损伤模型,经丰富环境干预2周,采用神经功能7分评分方法对缺血再灌注脑损伤大鼠进行神经功能的缺失评分,运用透射电镜拍照观察大鼠梗死皮层周边区血脑屏障的超微结构变化情况,采用股静脉注射 Evans 蓝染液外渗法检测血脑屏障通透性的变化情况,以及免疫荧光染色法观察星形胶质细胞表达情况。

结果:Evans 蓝染液结果显示丰富环境干预可明显修复血脑屏障的通透性,表现为降低 Evans 蓝染液外渗至大鼠大脑实质中的量,电镜结果显示丰富环境干预可显著改善梗死皮层周边区血脑屏障结构的完整性,并且显著减轻了皮层血管周边的星形胶质细胞和周细胞的损伤和水肿程度,且丰富环境干预可促进皮层星形胶质细胞的表达,保持血脑屏障结构和功能的完整性。

结论:丰富环境干预可修复缺血再灌注脑损伤大鼠引发的血脑屏障结构和功能的破坏,从而促进神经功能的恢复,其可能与星形胶质细胞的表达有关。

关键词 丰富环境;缺血再灌注脑损伤;血脑屏障;星形胶质细胞

中图分类号:R493,R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-05-0581-06

Effects of enriched environment on the structure and permeability of blood-brain barrier in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury/YU Kewei,ZHANG Qiqi,XIE Hongyu,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2022,37(5): 581—586

Abstract

Objective: To observe the effects of enriched environment on the structure and permeability of blood-brain barrier in rats with ischemia-reperfusion injury.

Method: The model of ischemia-reperfusion brain injury was prepared by tMCAO method. After enriched environment intervention for 2 weeks, the rats were scored for neurological deficit by 7-point scoring method. The ultrastructural changes of blood-brain barrier were observed by transmission electron microscope, the permeability changes of blood-brain barrier were observed by intravenous Evans blue extravasation, and the expression of astrocytes was observed by immunofluorescence.

Result: Enriched environment significantly improved the permeability of blood-brain barrier, which was manifested by reduced distribution of Evans blue in the brain. The ultrastructure of blood-brain barrier showed that enriched environment significantly improved the integrity of blood-brain barrier, significantly reduced the swelling of perivascular astrocytes and pericytes. In addition, enriched environment promoted the expression of astrocytes and maintained the integrity of the structure and function of blood-brain barrier.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.05.002

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(82072547,81672242)

1 复旦大学附属华山医院康复医学科,上海市,200040; 2 复旦大学医学神经生物学国家重点实验室; 3 通讯作者

第一作者简介:余克威,男,博士,主治医师; 收稿日期:2022-01-03

Conclusion: Enriched environment could repair the damage of blood-brain barrier structure and function caused by ischemia-reperfusion brain injury in rats, and promote the recovery of neural function, which may be related to the expression of astrocytes.

Author's address Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200040

Key word enriched environment; ischemia-reperfusion brain injury; blood brain barrier; astrocytes

脑卒中是世界上最常见的疾病之一,每年导致大量的患者死亡或残障。尽管存在有效的干预方法^[1-2],但由于时间窗狭窄和不良反应,手术或药物治疗只适用于少部分卒中患者,而大部分患者会遗留神经功能障碍。因此,促进脑卒中后神经功能康复是减少脑卒中患者神经功能缺损、提高日常生活活动能力乃至回归工作岗位的可行方法。

血脑屏障结构主要由毛细血管的内皮细胞、基底膜和细胞间紧密连接,以及星形胶质细胞组成,血脑屏障结构和功能的完整性是维持大脑系统内环境稳定的重要保证。缺血再灌注脑损伤不仅会引起血脑屏障结构及其功能的破坏,而且损伤的血脑屏障也会再次加重缺血再灌注脑组织的损伤,从而形成恶性循环。相关研究发现,通过保护或修复大脑血脑屏障结构及其功能的完整性,可以减轻神经细胞的损伤,从而实现脑缺血后的神经功能保护作用^[3-4]。

在康复医学领域,丰富环境干预为一种患者自主参与且无创的康复干预方式,通过视觉、味觉、嗅觉、听觉、运动和平衡感觉,以及社会情感等多方面的刺激,对缺血再灌注脑损伤后神经功能具有较好的保护及修复作用,但其具体机制尚不清楚。本文通过研究丰富环境干预对缺血再灌注脑损伤后血脑屏障的影响,初步探究丰富环境干预对缺血再灌注脑损伤神经修复的血脑屏障机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养

上海斯莱克实验动物有限责任公司的72只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)幼年SD雄性大鼠,体重在150—200g之间,实验期间均饲养于复旦大学上海医学院动物部,按照复旦大学动物实验部实验动物管理规定和伦理要求进行饲养及开展实验。

1.2 制备大脑中动脉缺血/再灌注模型

本研究采用国际通用的Longa线栓栓塞法^[5]制备大鼠左侧大脑中动脉缺血/再灌注损伤模型(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO),缺血时间为90min,之后拔出线栓使大脑中动脉血流进行再灌注,其具体步骤和方法可参见前期研究^[6]。

1.3 动物分组及康复干预

在tMCAO术后24h,按照Longa评分法^[5]对大鼠进行神经功能评分,将0分及4分的大鼠剔除实验,评分为1分、2分和3分的大鼠纳入实验,具体方法见前期研究^[7]。有1只大鼠因体重不足230g,不符合手术体重要求,剔除出实验,手术当天有2只大鼠死亡,手术后第二天有4只大鼠死亡,另有2只大鼠术后神经功能评分为0分,剔除实验,最后共有63只大鼠纳入本次研究。将纳入实验研究的大鼠随机分为缺血丰富环境干预(EE)组(21只)和缺血标准环境(SC)组(21只),未进行手术的大鼠为标准环境假手术(Sham)组(21只)。各组大鼠分别放入相应的环境里进行康复干预。干预方式如下:

EE组大鼠饲养于丰富环境鼠笼(专利号:ZL201020560281.3)中,每笼8—12只。丰富环境笼长120cm,高100cm,宽80cm,笼舍底部铺有约2cm厚碎木屑。此外,其内有丰富的环境布置:包括供动物攀登的小木梯、挡板、斜板和平台等;供动物探索的隧洞、暗盒和木屋等;供动物自主运动的滚轮、转台等;供动物撕咬的宠物咬棒等;供大鼠玩耍的粗细不同的绳索、球等;给动物以多感官刺激的不同颜色 and 不同体积及形状的积木、各种发声发光的玩具及不同气味的香囊等;为增加丰富的环境体验,每3天时间内对鼠笼的环境进行更换和布置,具体可参见前期的方法^[8-9]。

SC组大鼠饲养于动物部的标准大鼠饲养笼内,每笼饲养3只。标准大鼠饲养笼长40cm,高20cm,宽30cm,饲养条件严格参照实验动物部要求进行,每3天更换一次木屑垫料。假手术组大鼠亦饲养于

标准笼中,条件如上。

1.4 神经行为功能缺失评分

在tMCAO术后的第2,7,14天,根据Rogers^[10]描述的神经功能7分法对大鼠进行双盲法的神经功能缺失评分,具体方法和评分细则参照前期研究^[11],每组有6只大鼠。

1.5 透射电镜检测脑皮层血管超微结构

术后第14天,通过透射电镜检测大鼠大脑皮层血管超微结构的变化,每组有6只大鼠。具体方法^[3]如下:大鼠经过量水合氯醛麻醉后再进行断头取脑,用刀片切取数块梗死皮层周边区大小约为1mm³皮层组织后,将其放置在戊二醛电镜固定液(浓度为2.5%)里固定12h,然后用0.1 M磷酸缓冲液进行漂洗后,再用1% OsO₄固定1h后再次经0.1 M磷酸缓冲液漂洗后,在乙醇和丙酮溶液中进行系列脱处理,再用环氧树脂618进行组织原位包埋。利用LKB-1型超薄切片机(Leica)对包埋的脑组织进行每张厚度为50μm切片操作,然后再利用枸橼酸铅和醋酸双氧铀对切片组织进行染色,然后在CM120电子透射电镜(Philips)下观察组织超微结构及拍照。

1.6 大鼠血脑屏障通透性的测定

血脑屏障通透性采用外渗至脑组织中Evans蓝含量来表示。在缺血再灌注脑损伤后2周,将浓度为2%的Evans蓝染液从大鼠左侧股静脉注入,剂量为5ml/kg。等待3h后,10%水合氯醛经腹腔麻醉大鼠后立即从左心室灌注300ml生理盐水冲洗心脏及其血液,然后迅速断头取脑后将其浸泡在800μl甲酰胺溶液中,在60℃避光环境下放置48h。浸泡后的损伤侧脑组织高速离心后取上清液,用酶标仪在λ为632nm下检测样本OD值,每个样本有3孔进行重复检测,然后3个结果取平均值。根据Evans蓝标准曲线计算出每克大鼠脑组织中Evans蓝染液含量(μg/g),具体方法参考前期研究方法^[3],每组有6只大鼠。

1.7 组织冰冻切片制备和免疫荧光检测星形胶质细胞数

随机从各组大鼠中取3只大鼠腹腔注射浓度为10%的水合氯醛(0.4ml/100g体重)进行深度麻醉后,然后经心脏快速灌注生理盐水在生理盐水灌注结束后迅速灌注浓度为4%多聚甲醛溶液取脑后放

置在20%和30%蔗糖液中梯度脱水,然后将脱水的脑组织在冰冻切片机上进行切片处理,其每张厚度为30μm,然后进行组织免疫荧光化学染色,在抗体稀释液中加入GFAP一抗(100μl)。每只大鼠脑组织随机测量两张切片,所有切片均在相同光强及25倍镜下视野下进行计数GFAP阳性细胞数量,每切片取3个视野取平均值。

1.8 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件进行实验数据的分析,数据结果用均数±标准误表示,采用单因素方差分析(one way-ANOVA)方法进行组间差异统计分析,多重比较统计使用post hoc LSD tests方法进行统计分析, $P<0.05$ 即为差异具有显著性意义。

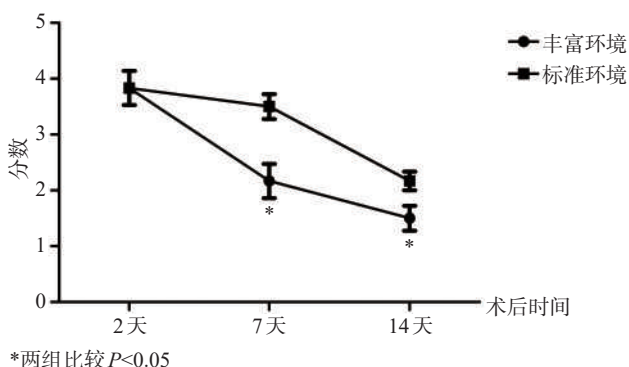
2 结果

2.1 丰富环境干预促进缺血再灌注性脑损伤后大鼠神经功能缺失的修复

本实验采用神经功能缺失评分对脑缺血引起的神经功能障碍进行了评估,假手术组表现为无神经功能缺失症状,其神经行为学缺失评分为0。见图1,在手术后的第2天,丰富环境干预组与标准环境之间的神经行为功能缺失无显著性差异,但是在术后的第7和14天时,丰富环境干预组大鼠的神经行为功能明显优于标准环境组($P<0.05$)。以上表明丰富环境干预可以促进缺血再灌注脑损伤后大鼠的神经行为功能的修复。

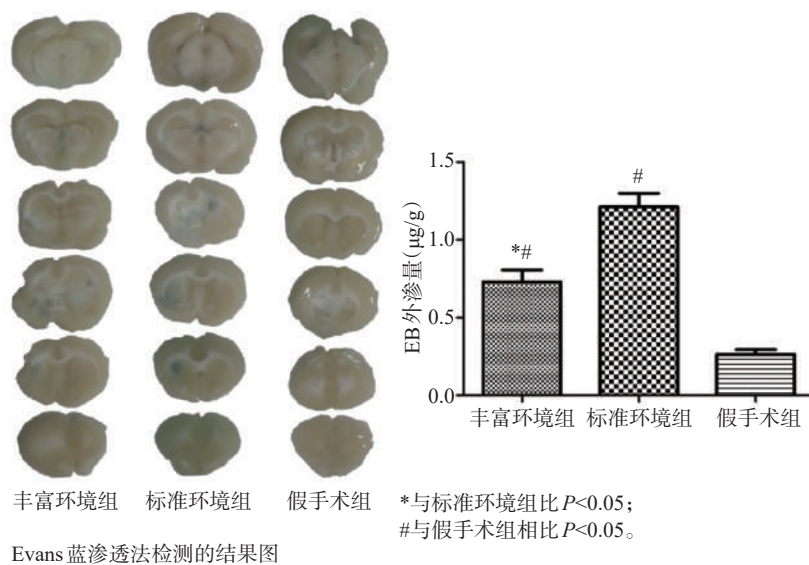
2.2 丰富环境干预促进缺血再灌注性脑损伤后大鼠梗死皮层周边血脑屏障功能的完整性

图1 神经功能缺失评估



为了检测血脑屏障的功能状况,本实验从大鼠股静脉注射 Evans 蓝染料,然后通过计算 Evans 蓝染料渗出至脑实质的含量,间接评估血脑屏障的通透性的改变情况。结果见图2。从实验结果可知,缺血再灌注脑损伤2周后,丰富环境干预能降低 Evans 蓝外渗至脑实质的含量,表明丰富环境干预能有效促进血脑屏障的功能完好性。

图2 缺血再灌注脑损伤后大鼠血脑屏障通透性的检测结果



2.3 丰富环境干预促进缺血再灌注脑损伤后大鼠梗死皮层周边血脑屏障结构的完整性

每组大鼠缺血再灌注脑损伤2周后,本实验采用透射电镜检测梗死皮层周边区血脑屏障超微结构,即血脑屏障结构的变化情况。结果如图3所示:①丰富环境干预明显的减轻了缺血再灌注脑损伤后血脑屏障的破坏程度,血脑屏障超微结构显示:丰富环境干预组毛细血管管腔未见明显变形,基膜结构基本完整以及连续围绕在内皮细胞外侧,内皮细胞内线粒体结构稍有肿胀,紧密连接相对假手术组有所减少,但其形态较规则,星形胶质细胞稍有肿胀;②标准环境组观察到大脑皮层血脑屏障的超微结构显示:皮层毛细血管管腔皱缩严重,紧密连接有断裂现象,基膜有缺失和溶解现象,内皮细胞胞内细胞器有损伤,表现为内质网和线粒体出现空泡,线粒体嵴肿胀较严重,星形胶质细胞终足肿胀甚至出现溶解

消失现象,在结构上呈现为较大面积的空白区;③假手术组大鼠大脑皮层毛细血管管腔规整,紧密连接、基膜和内皮细胞比较完整,内皮细胞比较完整,各细胞器无明显异常。

2.4 丰富环境干预促进缺血再灌注脑损伤后大鼠梗死皮层周边星形胶质细胞的表达

本研究通过免疫荧光化学染色的方法检测了脑

内 GFAP 表达情况,其为脑内星形胶质细胞的特异性标志物,可间接反映激活的星形胶质细胞情况^[12]。缺血再灌注脑损伤2周后,丰富环境干预组大鼠在梗死皮层周边区出现了激活状态的星形胶质细胞,但标准环境组大鼠梗死皮层周边区激活状态的星形胶质细胞较少,两者具有显著性差异($P < 0.05$)。GFAP 的免疫荧光化学染色的统计结果表明(图4),丰富环境干预明显增加缺血皮层周边区 GFAP 阳性细胞数量。

3 讨论

血脑屏障的细胞基础是脑内微血管内皮细胞和星形胶质细胞,并且星形胶质细胞足突包裹了99%以上的脑微血管的内皮细胞^[13],两者互相影响对调节血脑屏障的结构和功能具有重要意义。血脑屏障结构中,星形胶质细胞和周细胞覆盖包绕微血管内皮细胞的表面,参与神经细胞和血管之间的营养物质交换和神经递质转运以及维持血管内外渗透压与电离平衡^[14-15];在这个过程中,参与形成血脑屏障的细胞间存在丰富的信号交流^[16]。因此,血脑屏障的完整性对于维持脑内微环境的稳定和正常的脑功能具有重要意义。

缺血再灌注脑损伤后大脑组织的损伤是比较复杂的病理过程,有多种损伤机制互为因果共同参与,最终破坏血脑屏障结构的完整性和功能的完好性,从而会发生细胞毒性脑水肿,在此基础上可以继发血管源性脑水肿,最终会引起神经突触和神经元功能紊乱,从而造成神经功能障碍^[17]。本研究运用透

图3 电子透射电镜检测结果

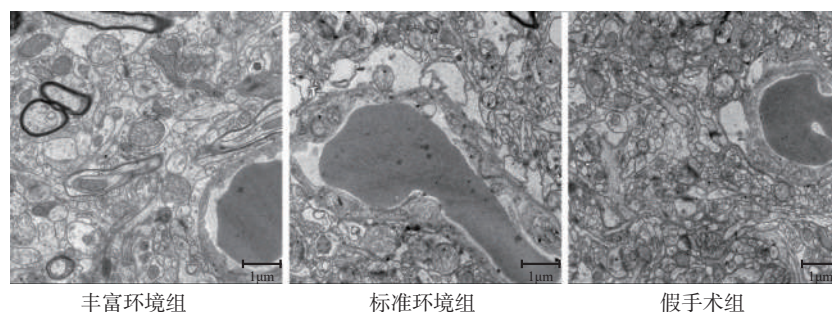
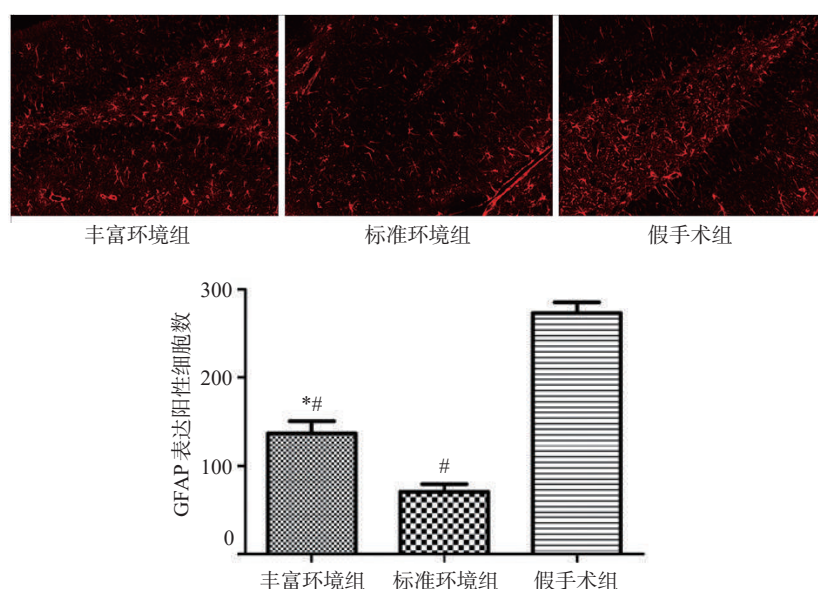


图4 缺血再灌注脑损伤后皮层周边区域星形胶质细胞激活 (GFAP阳性细胞)情况



红色为GFAP阳性细胞。

*与标准环境组比较 $P<0.05$;#与假手术组比较 $P<0.05$ 。

射电镜证实缺血再灌注脑损伤发生后标准环境大鼠的血脑屏障的超微结构遭受较严重的破坏,皮层结构的毛细血管管腔皱缩严重,基膜有溶解和缺失情况发生,紧密连接有损伤及断裂现象,内皮细胞胞内的细胞器出现空泡,如内质网和线粒体肿胀比较严重,星形胶质细胞终足损伤较重,表现为水肿以及溶解消失的症状,呈现为较大面积的电子空白区,而丰富环境干预可以显著减轻缺血再灌注脑损伤导致的血脑屏障形态及结构的改变,从而减轻神经功能的缺损。

缺血再灌注脑损伤后,脑血管屏障功能随着血脑屏障结构的损伤也会随之遭到破坏,并且作为血

脑屏障结构之一的星形胶质细胞损伤后,其释放的相关活性物质,对内皮细胞参与的屏障保护能力下降甚至消失^[3]。研究发现,星形胶质细胞在血管内皮细胞的生长、毛细血管的发生和重塑以及新生血管的形成具有重要的作用^[18-19]。此外,星形胶质细胞的旁分泌功能具有间接保护大脑微血管内皮细胞功能、稳定血脑屏障的作用^[20]。相关研究表明,特异性敲除星形胶质细胞的ADAM10基因后神经元的发育和迁移以及神经系统的血管发育和血脑屏障的形成都会出现明显的异常^[4,15,21]。因此,在病理情况下,星形胶质细胞的激活和增生可以维持神经血管单元微环境的稳定性以及血脑屏障的完整性。本研究发现,丰富环境干预可以促进缺血再灌注脑损伤皮层周边区星形胶质细胞的特异性标志物GFAP的表达,表明丰富环境干预可以通过促进星形胶质细胞的表达从而改善缺血再灌注脑损伤后血脑屏障的结构和功能,进而减轻神经功能的缺损。

综上所述,丰富环境干预可通过增加缺血再灌注脑损伤恢复期梗死皮层周边区星形胶质细胞的

增生及增强其功能,从而在一定程度上修复脑缺血造成的血脑屏障结构和功能的损伤,进而改善大鼠的神经功能。因此,通过调控星形胶质细胞对血脑屏障的结构和功能重塑将是神经康复医学在未来研究和临床应用中的重要挑战和可能的突破口之一。

参考文献

- [1] Stinear CM, Lang CE, Zeiler S, et al. Advances and challenges in stroke rehabilitation[J]. Lancet Neurol, 2020, 19(4):348—360.
- [2] Szelenberger R, Kostka J, Saluk-Bijak J, et al. Pharmacological interventions and rehabilitation approach for enhanc-

- ing brain self-repair and stroke recovery[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2020,18(1):51—64.
- [3] 张宇玲. 早期运动训练对脑缺血损伤大鼠的脑保护作用及其机制研究[D]. 复旦大学康复医学与理疗学, 2014.
- [4] Wicha P, Tocharus J, Janyou A, et al. Hexahydrocurcumin alleviated blood-brain barrier dysfunction in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. *Pharmacol Rep*, 2020,72(3):659—671.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989,20(1):84—91.
- [6] Yu K, Wu Y, Hu Y, et al. Prior exposure to enriched environment reduces nitric oxide synthase after transient MCAO in rats[J]. *Neurotoxicology*, 2013,39:146—152.
- [7] Zhang F, Jia J, Wu Y, et al. The effect of treadmill training pre-exercise on glutamate receptor expression in rats after cerebral ischemia[J]. *Int J Mol Sci*, 2010,11(7):2658—2669.
- [8] 余克威, 吴毅, 谢鸿宇, 等. 丰富环境对缺血再灌注性脑损伤大鼠神经功能修复的实验研究[J]. *康复学报*, 2017,27(1):18—23.
- [9] 郭真真. 丰富环境对脑缺血再灌注损伤后脑血流和血管新生的影响[D]. 复旦大学康复医学与理疗学, 2014.
- [10] Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, et al. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. *Stroke*, 1997,28(10):2060—2065, 2066.
- [11] Yu K, Wu Y, Hu Y, et al. Neuroprotective effects of prior exposure to enriched environment on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: the possible molecular mechanism [J]. *Brain Res*, 2013,1538:93—103.
- [12] 张彭跃. 脑卒中后早期运动训练促进脑功能修复的作用及其机制研究[D]. 复旦大学康复医学与理疗学, 2012.
- [13] Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweer S, et al. Targeting and crossing the blood-brain barrier with extracellular vesicles[J]. *Cells*, 2020,9(4):4—6.
- [14] Zagrean AM, Hermann DM, Opris I, et al. Multicellular crosstalk between exosomes and the neurovascular unit after cerebral ischemia. therapeutic implications[J]. *Front Neurosci*, 2018,12:811.
- [15] 熊颖, 张强, 潘邓记. 星形胶质细胞特异性敲除 Adam10 基因对周细胞和血脑屏障的影响[J]. *神经损伤与功能重建*, 2019,14(3):109—112.
- [16] Qin C, Zhou LQ, Ma XT, et al. Dual functions of microglia in ischemic stroke[J]. *Neurosci Bull*, 2019,35(5):921—933.
- [17] Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, et al. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2018,135(3):311—336.
- [18] Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow[J]. *Trends Neurosci*, 2009,32(3):160—169.
- [19] Li Y, Ren M, Wang J, et al. Progress in borneol intervention for ischemic stroke: a systematic review[J]. *Front Pharmacol*, 2021,12:606682.
- [20] 朱碧峰, 王伟. 胶质细胞在神经血管单元中的作用[J]. *神经损伤与功能重建*, 2012,7(4):299—302.
- [21] Zhang Z, Chen G, Zhou W, et al. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2007,9(8):945—953.