

·基础研究·

聚焦超声联合微泡开放血脑屏障对小鼠紧密连接蛋白的影响*

王钰宏¹ 罗凯旋¹ 李俊瑞¹ 廖烨晖¹ 陈茉弦¹ 敖丽娟^{1,2}

摘要

目的:探讨聚焦超声(focused ultrasound, FUS)联合微泡开放血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的安全性,并通过对FUS辐照后紧密连接蛋白的检测探究FUS开放BBB的可能机制。

方法:健康昆明小鼠70只,随机分为对照组、FUS联合微泡开放BBB组,并进一步分为FUS开放BBB 1h、4h、24h组。采用Garcia量表评估小鼠的神经行为学变化;HE染色观察超声辐照脑区的出血情况;ELISA动态检测炎症因子:肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素 1β (interleukin 1 beta, IL- 1β)、白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)的表达水平。经尾静脉注射伊文思蓝(evans blue, EB)动态观察不同分组小鼠脑内EB的渗透情况。Western Blot检测水通道蛋白4(aquaporin-4, AQP4)表达量的变化分析脑组织的水肿情况;分别检测不同时段紧密连接蛋白occludin、claudin-5、紧密连接蛋白1(zonula occludens-1, ZO-1)的表达水平评估超声对紧密连接蛋白的影响。

结果:FUS诱导BBB开放后,小鼠不同时段的行为学评分均与对照组无明显差异($P>0.05$);HE染色显示FUS辐照后小鼠脑实质内无明显的红细胞渗出,炎症因子TNF- α 、IL- 1β 、IL-6的表达水平在BBB开放后的1h、4h、24h均与对照组无明显差异($P>0.05$)。在EB渗透实验中,1h组小鼠脑实质内有EB渗透,而其他分组均未观察到EB。不同时段AQP4蛋白表达量与对照组相比无显著性差异($P>0.05$)。FUS辐照后1h,occludin($P=0.034$)、claudin-5($P<0.001$)、ZO-1($P=0.002$)蛋白表达水平显著降低;4h后ZO-1、occludin蛋白水平逐渐上升至对照组水平($P>0.05$)。而claudin-5蛋白表达量在24h仍低于对照组($P=0.002$)。

结论:FUS可以安全有效的开放BBB,其机制可能是通过作用于紧密连接蛋白ZO-1、occludin、claudin-5实现的。

关键词 聚焦超声;微泡;血脑屏障;安全性;紧密连接蛋白

中图分类号:R493, R445 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2023)-01-0008-08

Effects of focused ultrasound combined with microbubbles to open the blood-brain barrier on tight junction proteins/WANG Yuhong, LUO Kaixuan, LI Junrui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2023, 38(1): 8—15

Abstract

Objective:To investigate the safety of focused ultrasound (FUS) combined with microbubbles opening the blood-brain barrier (BBB), and to explore the possible mechanism of BBB opening in FUS by detecting tight junction proteins after FUS irradiation.

Method: Seventy healthy Kunming mice were randomly divided into control group, FUS combined with microbubble open BBB group, and further divided into FUS open BBB 1h, 4h, 24h groups. The Garcia scale was used to evaluate the neurological behavioral changes of mice; HE staining was used to observe the bleeding in the brain area irradiated by ultrasound; ELISA dynamic detection of the expression levels of inflammatory

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.01.002

*基金项目:国家自然科学基金项目(81960421);昆明医科大学研究生创新基金项目(2021S025)

1 昆明医科大学康复学院,云南省昆明市,650500; 2 通讯作者

第一作者简介:王钰宏,女,硕士研究生; 收稿日期:2021-05-29

factors tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 beta (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6). Evans blue (EB) was injected through the tail vein to dynamically observe the infiltration of EB in the brains of mice in different groups. Western Blot detects changes in aquaporin-4(AQP4) expression to analyze brain tissue edema; detects the protein expression levels of occludin, claudin-5 and zonula occludens-1(ZO-1) at different time periods to evaluate the effect of ultrasound on tight junction proteins.

Result: After FUS induced BBB opening, the neurobehavioral scores of the mice at different time periods were not significantly different from those of the control group ($P>0.05$); HE staining showed that there was no obvious red blood cell exudation in the brain parenchyma of the mice after FUS irradiation, and inflammation. The expression levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were not significantly different from those of the control group at 1h, 4h and 24h after BBB was opened ($P>0.05$). In the EB penetration experiment, there was EB penetration in the brain parenchyma of mice in the 1h group, but no EB was observed in other groups. Compared with the control group, the expression of AQP4 protein in different periods was not statistically different ($P>0.05$). 1h after FUS irradiation, the protein expression levels of occludin ($P=0.034$), claudin-5 ($P<0.001$), and ZO-1 ($P=0.002$) decreased significantly; 4h later, the protein levels of ZO-1 and occludin gradually increased to the control group Level ($P>0.05$). The expression of claudin-5 protein was still lower than that of the control group at 24h ($P=0.002$).

Conclusion: FUS can safely and effectively open BBB, and the mechanism may be realized by acting on tight junction proteins ZO-1, occludin and claudin-5.

Author's address School of Rehabilitation, Kunming Medical University, Yunnan Province, 650500

Key word focused ultrasound; microbubble; blood-brain barrier; safety; tight junction protein

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)主要由脑毛细血管内皮细胞、紧密连接、周细胞、基底膜和星形胶质细胞足突组成,严格控制血液和脑内物质的交换。通常只有脂溶性和分子量较小的物质能透过BBB,此结构阻碍了许多大分子药物进入脑内发挥作用。因此人们也在探索不同的方法调节BBB的通透性以增强药物在脑内的输送。研究发现聚焦超声(focused ultrasound, FUS)联合微泡可以暂时、可逆地诱导BBB开放,为颅内疾病的治疗提供了新的思路 and 方向^[1]。相关研究也进一步证实FUS开放BBB后还可使脑组织中的药物浓度增加到对照组的8倍,有效增强了药物的疗效^[2]。而FUS联合 SonoVue微泡是开放BBB的常用方法, SonoVue微泡的半衰期为 (1.04 ± 0.15) min,尾静脉注射后 SonoVue微泡可于1min内在大鼠脑内达到高峰,所以常选择在微泡注射后立即进行FUS辐照^[3]。目前,有研究发现FUS联合微泡开放BBB时会导致无菌性炎症、脑组织水肿、出血甚至坏死,因此,FUS是否可以作为一种诱导BBB安全开放的手段仍需要进一步研究^[4-5]。

大量研究发现FUS诱导BBB开放可能与跨细

胞的胞饮作用、破坏紧密连接相关。Jalali等^[6]发现FUS诱导BBB开放会破坏occludin和紧密连接蛋白1(zonula occludens-1, ZO-1)的相互作用,同时激活神经元细胞中蛋白激酶Akt信号通路,破坏BBB的完整性。但Pandit等^[7]认为FUS开放BBB与小窝蛋白-1(caveolin-1)相关,FUS作用后caveolin-1表达增多,并促进500kDa以上的大分子物质入脑。目前尚不清楚FUS诱导BBB开放的具体机制。本研究旨在进一步证实FUS诱导BBB开放的安全性,并通过对BBB开放24h内紧密连接蛋白动态变化的检测探究FUS开放BBB的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性昆明小鼠70只,8周龄,体质量(35—40)g,购买于昆明医科大学实验动物中心,所使用的实验动物均经过昆明医科大学动物实验伦理审查委员会批准。

1.2 材料与试剂

注射用六氟化硫微泡(SonoVue, Bracco Imaging SpA)、伊文思蓝(Sigma)、ZO-1抗体(absin)、

claudin-5 抗体(absin)、水通道蛋白 4(aquaporin-4, AQP4) 抗体(proteintech)、occludin 抗体(proteintech)、 β -actin 抗体(Santa)、 α -tubulin 抗体(cellsignaling technology)、OTC 包埋剂(SAKURA)、超声耦合剂(津亚)、高效 RIPA 组织/细胞裂解液(Solarbio)、PMSF 蛋白酶抑制剂(Solarbio)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)、IL-6、TNF- α 、IL-1 β ELISA 试剂盒(Thermo Fisher Scientific)。

1.3 实验设计

为检测 FUS 诱导 BBB 开放的安全性,将 34 只昆明小鼠随机分为对照组和 FUS 辐照组,通过 Garcia 量表持续评估 FUS 开放 BBB 后小鼠的神经行为学变化(每组 $n=6$);取对照组和 FUS 辐照组小鼠(每组 $n=3$)进行 HE 染色检测辐照脑区的出血程度;ELISA 检测不同时段 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的变化以评估 FUS 对炎症因子的影响(每组 $n=4$)。为探讨 BBB 通透性随时间的变化,将 12 只昆明小鼠随机分为对照组、1h 组、4h 组、24h 组,每组 3 只,分别于超声辐照后的 0h、3h、23h 注射质量分数为 2% 的伊文思蓝(evans blue, EB)溶液(50mg/kg),EB 在小鼠体内循环 1h 后处死小鼠,通过 EB 的渗透情况表征 BBB 的开放程度。随后,将 24 只小鼠随机分为对照组、1h 组、4h 组、24h 组,每组 6 只,分时段处死小鼠,Western Blot 检测 AQP4 的表达量确定脑组织的水肿情况;评估紧密连接蛋白 occludin、claudin-5、ZO-1 的蛋白表达量,探究 FUS 诱导 BBB 开放 24h 内对紧密连接蛋白的影响。

1.4 FUS 联合微泡开放 BBB 的实验步骤

FUS 辐照系统由信号发生器(普源精电科技股份有限公司)、功率放大器(mini-circuits)、单阵元聚焦超声换能器组成。超声换能器的基础频率为 1 MHz,焦点距离换能器表面 2.3cm。异氟烷麻醉小鼠后将其于俯卧位固定,去除头顶部毛发及皮肤,充分暴露颅骨。超声换能器放置于适配器内,并将其固定于小鼠的左侧海马区域(Bregma 后 2.92mm,左 2mm),用超声耦合剂填充颅骨与超声适配器之间的空隙。随后,建立尾静脉通道,于尾静脉注射 SonoVue 微泡,注射剂量 0.1ml/15g。FUS 组小鼠注射微泡后立即采用输出电压 200mV,脉冲重复频率 1Hz,脉宽 10ms 参数的 FUS 辐照 120s^[8-9]。对照组

仅注射微泡不做 FUS 辐照。

1.5 神经功能评估

采用 Garcia 评分量表^[10]分别在 FUS 开放 BBB 前以及 BBB 开放后 1h、4h、24h、72h 对正常组和 FUS 组小鼠进行行为学评估,主要观察小鼠的自由活动、躯干知觉、触须本体感觉、肢体活动对称性、侧方转体、前肢伸展实验、攀爬 7 项指标,每项 3 分,评分越低则神经功能损伤越严重。

1.6 HE 染色

经腹腔注射 1% 的戊巴比妥钠(50mg/kg),待小鼠麻醉后开胸暴露心脏,采用 4% 的生理盐水进行灌注,至右心耳流出的液体为无色时停止灌注,开颅取脑。小鼠脑组织于 4% 的多聚甲醛溶液中固定,24h 后取出脑组织并将其放置于脱水盒内依次梯度蔗糖脱水。OTC 包埋后对辐照区脑组织做 10 μ m 厚冠状位切片,切片间隔 100 μ m,每组取 6 张切片进行 HE 染色。用显微镜观察皮质、皮质与白质连接处、海马组织的损伤情况。

1.7 ELISA

各组小鼠超声辐照区脑组织经匀浆、离心后取上清用于指标测定,使用 ELISA 试剂盒检测炎症细胞因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)的表达水平。

1.8 观察脑组织 EB 的渗透情况

小鼠脑组织于 4% 的多聚甲醛溶液中固定 24h,从超声辐照脑区中心点做冠状切片,观察 EB 在脑内的渗透情况,用单反相机拍摄小鼠脑组织的上视面和冠状面。

1.9 Western Blot 检测

分离超声辐照脑区的组织,加入 RIPA 裂解液及 PMSF 蛋白酶抑制剂,用超声破碎仪粉碎脑组织,离心 30min 后取上清为总蛋白。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒制作标准曲线,并根据标准曲线测算不同样品的蛋白浓度。在不同的蛋白样品中加入蛋白上样缓冲液,密封后放入沸水中煮 25min。配制丙烯酰胺电泳凝胶,按每孔 20 μ g 蛋白样品进行上样。当蛋白跑至分离胶下层边缘时停止电泳,分别切 occludin、AQP4、ZO-1、 α -tubulin、 β -actin 蛋白进行转膜。5% 的脱脂牛奶封闭后一抗孵育并放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱

中过夜。一抗孵育结束后用TBST洗涤后于常温下二抗孵育,用TBST清洗后在凝胶显影仪上显影,使用Gel-Pro Analyzer软件分析不同蛋白条带的灰度值。

1.10 统计学分析

应用SPSS 25.0软件进行统计分析,实验数据以均值±标准差表示。对于符合正态分布的数据,两组数据间的比较采用 t 检验,多组数据间的比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA),进一步采用SNK- t 检验进行两两比较,方差不齐时采用Tamhane' T2法检验,

检验水准 $\alpha=0.05$ 。采用GraphPad Prism 8.01软件进行统计绘图。

2 结果

2.1 FUS诱导BBB开放不会引起小鼠的神经行为学变化

FUS开放BBB前以及FUS开放BBB后1h、4h、24h、72h,对照组和FUS组小鼠的Garcia评分无显著性差异($P>0.05$),说明FUS诱导BBB开放后并不会影响小鼠的神经行为学(表1)。

表1 FUS诱导BBB开放前后不同时间点各组小鼠神经行为学评分比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	例数	FUS开放BBB前	FUS-1h	FUS-4h	FUS-24h	FUS-72h
对照组	6	20.50±0.55	20.50±0.55	20.50±0.55	20.50±0.55	20.50±0.55
FUS组	6	20.67±0.52	20.17±0.75	20.17±0.75	20.33±0.52	20.67±0.52
t 值		-0.542	0.877	0.877	0.542	-0.542
P 值		0.599	0.401	0.401	0.599	0.599

2.2 HE染色显示FUS辐照脑区未见红细胞渗出

显微镜下观察HE染色切片,结果显示对照组和FUS开放BBB组小鼠左侧皮质和海马区细胞排列整齐,形态规整,细胞数量和结构正常,未见红细胞渗出(图1)。

2.3 FUS诱导BBB开放后不会引起无菌性炎症

与对照组相比,FUS诱导BBB开放后1h、4h、24h炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达水平与对照组无明显差异($P>0.05$)。虽然TNF- α ($P=0.898$)、IL-1 β ($P=0.485$)、IL-6($P=0.480$)在1h时有上升的趋势,但没有显著性差异(表2),提示在合适参数下,FUS诱导BBB开放不会引起无菌性炎症。

2.4 BBB的渗透性随开放时间延长逐渐降低

观察对照组、1h组、4h组、24h组EB在脑内的渗透情况,结果观察到1h组辐照脑区有EB渗透,冠状切面上可见EB蓝染面积较大,可渗透至脑底部。对照组、4h组和24h组脑实质内均未见EB渗透。随着FUS开放BBB的时间延长,BBB的渗透性降低,4h、24h时已无EB渗透入脑(图2)。

2.5 FUS诱导BBB开放后脑组织中AQP4的表达量无明显变化

AQP4维持着脑内的水平衡,与脑水肿密切相关。Western Blot检测发现1h、4h、24h AQP4的表达量与对照组无明显差异($P>0.05$),1h组AQP4较

对照组略有升高但无明显差异($P=0.629$),提示FUS诱导BBB开放并不会引起脑组织水肿(表3,图3)。

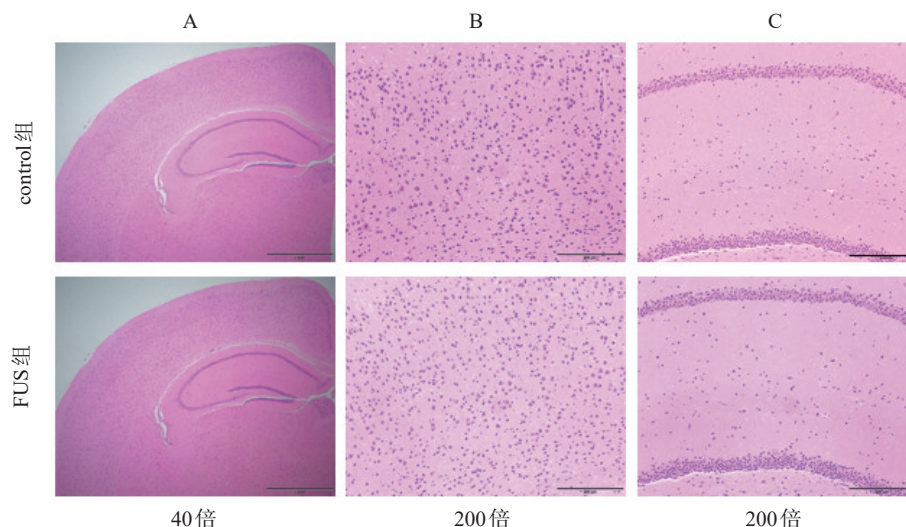
2.6 脑组织occludin、claudin-5、ZO-1的蛋白表达量均有不同程度的变化

occludin、claudin-5、ZO-1是紧密连接的主要构成蛋白。与对照组相比,occludin($P=0.034$)、claudin-5($P<0.001$)和ZO-1($P=0.002$)蛋白表达量在1h显著下降,随着FUS开放BBB时间的延长,ZO-1和occludin蛋白表达量逐渐增加,4h、24h的蛋白表达量已与对照组无明显差异($P>0.05$)(表4、图4A、B)。虽然,1h后claudin-5的蛋白表达量逐渐增加,但24h蛋白表达量仍低于对照组($P=0.002$)(表4、图4C)。

3 讨论

FUS作为一种非侵入性治疗技术,近年来已成为颅内疾病治疗研究的热点。本研究发现FUS联合微泡可在不改变小鼠神经行为学的情况下增加BBB的通透性,且不会引起结构损伤和组织病理学改变,并促进EB入脑,这可能为改善BBB的通透性增加药物在颅内的递送提供了新的选择。但Kovacs等^[5]发现FUS诱导BBB开放后可引起无菌性炎症,使大鼠脑实质中热休克蛋白70、IL-1、TNF- α 、IL-18的表达量增加,并刺激小胶质细胞和星形胶质细胞活化。2017年,McMahon等^[11]将微泡剂量降低

图1 对照组和FUS辐照组HE染色结果



A. 小鼠左侧脑区的细胞排列情况;B. 小鼠皮质细胞排列情况;C. 小鼠海马区细胞排列情况。

表2 各组小鼠TNF- α 、IL-1 β 、IL-6表达水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

项目	对照组	FUS-1h组	FUS-4h组	FUS-24h组	统计值
TNF- α	31.87 $\pm$ 7.99	33.24 $\pm$ 22.59	25.48 $\pm$ 8.37	34.43 $\pm$ 8.55	$F=0.335$
LSD- t 检验统计值(与对照组相比)		$P=0.898$	$P=0.556$	$P=0.812$	$P=0.800$
IL-1 β	1.41 $\pm$ 0.96	2.25 $\pm$ 2.07	1.27 $\pm$ 0.28	1.97 $\pm$ 1.88	$F=0.354$
LSD- t 检验统计值(与对照组相比)		$P=0.485$	$P=0.906$	$P=0.640$	$P=0.788$
IL-6	3.72 $\pm$ 0.43	4.61 $\pm$ 2.71	3.91 $\pm$ 0.53	4.73 $\pm$ 1.27	$F=0.360$
LSD- t 检验统计值(与对照组相比)		$P=0.480$	$P=0.881$	$P=0.425$	$P=0.783$

表3 各组小鼠脑组织AQP4/ β -actin蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	FUS-1h组	FUS-4h组	FUS-24h组	统计值
AQP4/ β -actin	1.15 $\pm$ 0.53	1.26 $\pm$ 0.74	1.03 $\pm$ 0.56	1.13 $\pm$ 0.59	$F=0.397$
LSD- t 检验统计值(与对照组比较)		$P=0.629$	$P=0.568$	$P=0.813$	$P=0.756$

表4 各组小鼠脑组织紧密连接蛋白occludin、claudin-5、ZO-1表达比较

($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	FUS-1h组	FUS-4h组	FUS-24h组	统计值
occludin/ β -actin	1.55 $\pm$ 0.58	1.19 $\pm$ 0.44 ^①	1.34 $\pm$ 0.43	1.47 $\pm$ 0.36	$F=2.932$
LSD- t 检验统计值(与对照组相比)		$P=0.010$	$P=0.059$	$P=0.481$	$P=0.045$
claudin-5/ β -actin	1.28 $\pm$ 0.40	0.76 $\pm$ 0.29 ^③	0.79 $\pm$ 0.25 ^③	0.85 $\pm$ 0.35 ^②	$F=7.167$
LSD- t 检验统计值(与对照组相比)		$P<0.001$	$P<0.001$	$P=0.002$	$P<0.001$
ZO-1/ α -tubulin	0.85 $\pm$ 0.40	0.37 $\pm$ 0.17 ^②	0.61 $\pm$ 0.13	0.73 $\pm$ 0.34	$F=7.953$
Tamhane检验统计值(与对照组相比)		$P=0.002$	$P=0.212$	$P=0.940$	$P<0.001$

注:与对照组相比,① $P<0.05$,② $P<0.01$,③ $P<0.001$

至10 μ l/kg后,大鼠脑组织中的炎症因子无明显上调,说明优化FUS开放BBB的条件后可以避免无菌性炎症。在本研究中,我们发现FUS诱导BBB开放后的24h内TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达量无明显变化,进一步说明此参数的安全性。

AQP4是一种水选择性膜转运蛋白,高表达于

中枢神经系统血管周围的星形胶质细胞末端足部,维持着中枢神经系统的水钾平衡。AQP4表达和分布异常与水肿的形成和消退密切相关。研究发现创伤性脑损伤可导致严重的充血水肿,在伤后的12h内,大鼠脑组织中AQP4的表达量显著升高;AQP4在星形胶质细胞末端足部的表达量急剧下降,在细

图2 FUS诱导BBB开放后EB在脑内的渗透性随时间的变化情况

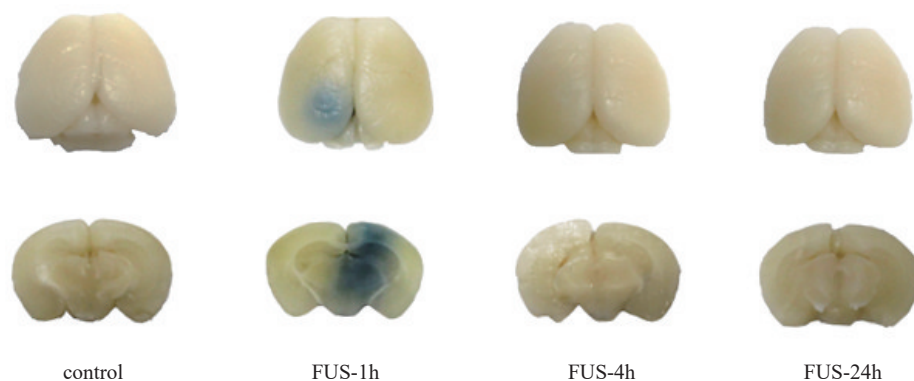
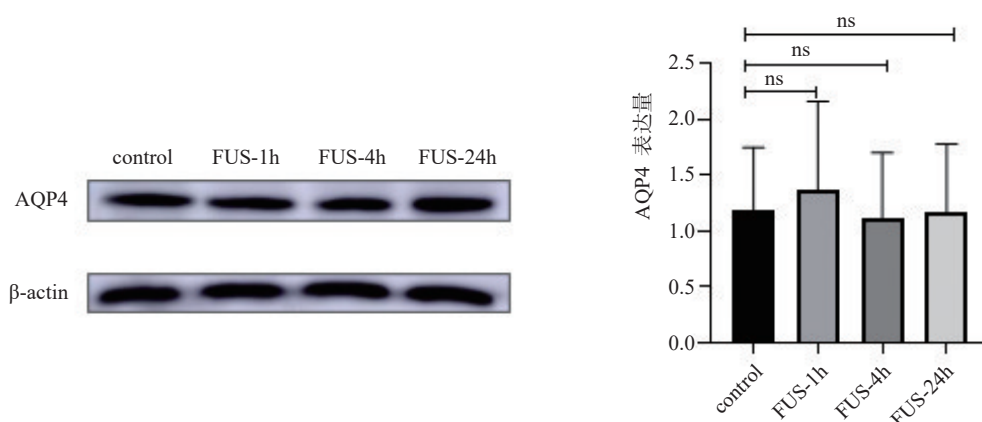


图3 FUS诱导BBB开放后AQP4表达量随时间的变化

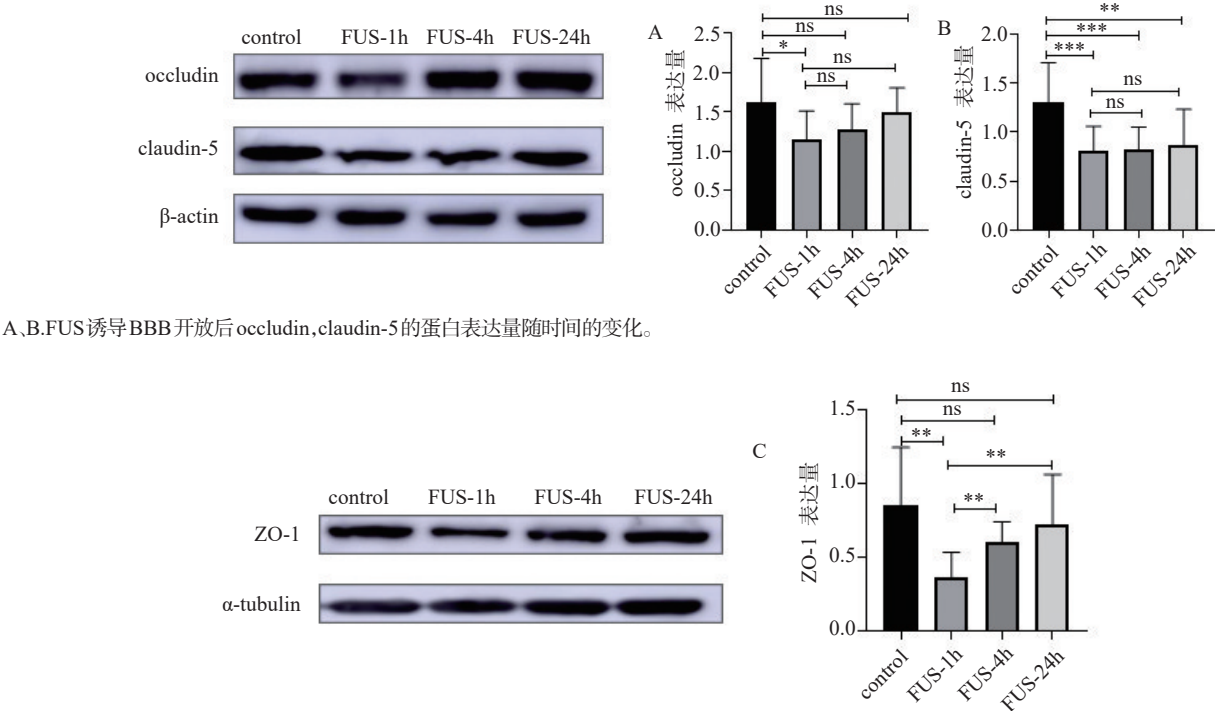


胞膜上的表达量增加,而AQP4抑制剂可下调脑外伤后AQP4的表达,并促进AQP4的极性分布,减轻脑损伤早期的脑水肿^[12-13]。在本实验中,我们检测了FUS开放BBB后1h、4h、24h内AQP4的变化,结果发现AQP4在不同时间段内的表达量与正常对照组相比无显著性差异,说明FUS诱导BBB开放并不会引起组织水肿。Zhang等^[14]用电针开放BBB以后也得到了类似的结果。相比于正常对照组,电针诱导BBB开放后不会引起组织水肿,其AQP4的表达量无明显变化。

BBB是中枢神经系统高选择性的膜屏障,基本上98%分子量<400Da和100%>500Da的药物均不能穿过BBB的紧密连接^[15]。紧密连接蛋白是维持BBB屏障功能的重要组分,主要由occludin、claudin、连接黏附分子和内皮细胞选择性黏附分子构

成,并通过细胞质内的闭锁连接蛋白(zonula occludin, ZO)与肌动蛋白细胞骨架相连。BBB的完整性与紧密连接蛋白的动态变化相关。通过检测FUS开放BBB 24h内紧密连接蛋白表达量的变化,我们发现occludin和ZO-1在1h表达量显著下降,随后逐渐上升,4h组与对照组已无显著性差异;而claudin-5在1h下降后,24h时的蛋白表达量虽有上升但仍低于正常对照组,差异有显著性意义,提示BBB开放后不同紧密连接蛋白的恢复存在先后顺序。在EB渗透实验中,我们还发现1h时EB在脑内的蓝染面积较大,到4h时脑组织内已无肉眼可见的EB,由此我们推测,这可能与occludin和ZO-1表达量的增加相关,而claudin-5对BBB的屏障作用影响相对较小。Nitta等^[16]的研究也发现,claudin-5表达量的轻度下降对BBB的正常结构和功能影响较小。在敲

图4 Fus诱导BBB开放后 occludin、claudin-5、ZO-1 表达量随时间的变化



A,B.FUS诱导BBB开放后 occludin,claudin-5的蛋白表达量随时间的变化。

C.FUS诱导BBB开放后 ZO-1 蛋白表达量随时间的变化。

与control组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: $P>0.05$

除 claudin-5 基因后,小鼠 BBB 的形态结构正常,虽可使分子量<800Da的示踪剂从血管内渗出,但对大分子物质仍有屏障作用,所以 claudin-5 可能与 BBB 对小分子物质的屏障作用相关。当同时抑制 occludin、claudin-5 基因表达后, BBB 对大分子的屏障作用减弱,可促进 3—10kDa 的示踪剂入脑^[17]。虽然 4h 时 EB(分子量为 960.81Da)无法渗透入脑,但此时 claudin-5 的表达量较低,我们尚不清楚小分子量的示踪剂是否会渗透入脑。因此,在 BBB 关闭过程中,仍需进一步探讨是否存在对不同分子量物质屏障作用恢复的先后顺序,此外还需进一步研究 claudin-5 的恢复时间及其对小分子的屏障作用,这对开放 BBB 递送不同分子量的药物入脑具有重要意义。

综上所述,FUS联合微泡可安全、局部、可逆地诱导正常小鼠的 BBB 开放,且不会引起无菌性炎症,其开放 BBB 的机制可能与 occludin、claudin-5、ZO-1 蛋白表达量的降低相关。但本实验仅在正常小鼠中初步探讨 FUS 开放 BBB 的安全性及可能机制,尚不清楚其在疾病模型中的安全性。目前已有

研究发现阿尔茨海默病^[18]、帕金森病^[19]、亨廷顿病^[20]患者的 BBB 完整性被破坏,紧密连接蛋白的表达量也有不同程度的改变^[21-22],如果要将 FUS 用于疾病治疗中,未来仍需大量的探索研究。

参考文献

- [1] McMahon D, Poon C, Hynynen K. Evaluating the safety profile of focused ultrasound and microbubble-mediated treatments to increase blood-brain barrier permeability[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2019, 16(2):129—142.
- [2] Wei HJ, Upadhyayula PS, Pouliopoulos AN, et al. Focused ultrasound-mediated blood-brain barrier opening increases delivery and efficacy of etoposide for glioblastoma treatment[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2021, 110(2): 539—550.
- [3] Wu SK, Chu PC, Chai WY, et al. Characterization of different microbubbles in assisting focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening[J]. Sci Rep, 2017, 7:46689.
- [4] Shin J, Kong C, Cho JS, et al. Focused ultrasound-mediated noninvasive blood-brain barrier modulation: preclinical examination of efficacy and safety in various sonication parameters[J]. Neurosurg Focus, 2018, 44(2):E15.

- [5] Kovacs ZI, Kim S, Jikaria N, et al. Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(1):E75—e84.
- [6] Jalali S, Huang Y, Dumont DJ, et al. Focused ultrasound-mediated bbb disruption is associated with an increase in activation of AKT: experimental study in rats[J]. *BMC Neurol*, 2010, 10:114.
- [7] Pandit R, Koh WK, Sullivan RKP, et al. Role for caveolin-mediated transcytosis in facilitating transport of large cargoes into the brain via ultrasound[J]. *J Control Release*, 2020, 327:667—675.
- [8] Tsai HC, Tsai CH, Chen WS, et al. Safety evaluation of frequent application of microbubble-enhanced focused ultrasound blood-brain-barrier opening[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17720.
- [9] Lin CY, Hsieh HY, Pitt WG, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening for non-viral, non-invasive, and targeted gene delivery[J]. *J Control Release*, 2015, 212:1—9.
- [10] 路正扬. GCN2蛋白在小鼠脑出血后炎症反应中的作用及其机制研究[D]. 苏州:苏州大学, 2020.
- [11] McMahon D, Hynynen K. Acute inflammatory response following increased blood-brain barrier permeability induced by focused ultrasound is dependent on microbubble dose [J]. *Theranostics*, 2017, 7(16):3989—4000.
- [12] Guan Y, Li L, Chen J, et al. Effect of AQP4-RNAi in treating traumatic brain edema: Multi-modal MRI and histopathological changes of early stage edema in a rat model [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3):2029—2036.
- [13] Lu H, Zhan Y, Ai L, et al. AQP4-siRNA alleviates traumatic brain edema by altering post-traumatic AQP4 polarity reversal in TBI rats[J]. *J Clin Neurosci*, 2020, 81:113—119.
- [14] Zhang S, Gong P, Zhang J, et al. Specific frequency electroacupuncture stimulation transiently enhances the permeability of the blood-brain barrier and induces tight junction changes[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14:582324.
- [15] Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development[J]. *Mol Interv*, 2003, 3(2): 90—105, 151.
- [16] Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice[J]. *J Cell Biol*, 2003, 161(3):653—660.
- [17] Keaney J, Walsh DM, O'Malley T, et al. Autoregulated paracellular clearance of amyloid-beta across the blood-brain barrier[J]. *Sci Adv*, 2015, 1(8):e1500472.
- [18] Wang H, Golob EJ, Su MY. Vascular volume and blood-brain barrier permeability measured by dynamic contrast enhanced MRI in hippocampus and cerebellum of patients with MCI and normal controls[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2006, 24(3):695—700.
- [19] Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(3):133—150.
- [20] Drouin-Ouellet J, Sawiak SJ, Cisbani G, et al. Cerebrovascular and blood-brain barrier impairments in Huntington's disease: Potential implications for its pathophysiology [J]. *Ann Neurol*, 2015, 78(2):160—177.
- [21] Kuan WL, Bennett N, He X, et al. α -Synuclein preformed fibrils impair tight junction protein expression without affecting cerebral endothelial cell function[J]. *Exp Neurol*, 2016, 285(Pt A):72—81.
- [22] Yamazaki Y, Shinohara M, Shinohara M, et al. Selective loss of cortical endothelial tight junction proteins during Alzheimer's disease progression[J]. *Brain*, 2019, 142(4): 1077—1092.