

硫辛酸对脑缺血再灌注损伤大鼠 RAGE/LRP1 通路及神经血管单元重塑的影响

李耀汝¹, 于 恺², 张 聪³, 闫秋月^{1*}, 王 妍¹, 安泽鑫¹, 王 静⁴, 张祥建³, 李 猛¹

1. 沧州市中心医院 神经内科, 河北 沧州 061000

2. 沧州市中心医院 心血管内科, 河北 沧州 061000

3. 河北医科大学第二医院 神经内科, 河北 石家庄 050000

4. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017

摘要: 目的 探究硫辛酸对脑缺血再灌注损伤大鼠神经血管单元重塑的作用及对晚期糖基化终产物受体 (RAGE) /低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (LRP1) 的影响。方法 108 只雄性 Wistar 大鼠, 除 18 只作为假手术组外, 其余大鼠采用线栓法制备大脑中动脉短暂缺血再灌注 (tMCAO) 模型。模型成功大鼠根据神经评分分为模型组、FPS-ZM1 (RAGE 抑制剂, 1 mg·kg⁻¹) 组和硫辛酸高、中、低剂量组 (40、20、10 mg·kg⁻¹), 再灌注 2 h 后 ip 给药, 假手术组和模型组注射等量生理盐水, 每天 1 次, 连续给药 14 d。术后 1、7、14 d 对大鼠进行神经功能缺损程度评分 (mNSS) 和激光散斑成像仪监测脑血流量 (CBF)。术后 14 d, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色法检测大鼠脑梗死面积; 伊文思蓝 (EB) 检测血脑屏障通透性; 免疫荧光染色检测脑微血管密度并采用免疫组化法检测胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、神经元核抗原 (NeuN) 表达; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测血管内皮生长因子 (VEGF)、促血管生成素 1 (Ang-1)、促血管生成素 2 (Ang-2) 的 mRNA 表达; Western blotting 检测基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、紧密连接相关蛋白 5 (claudin5)、RAGE、LRP1 蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠 mNSS 评分、脑梗死百分比、EB 含量、GFAP 阳性细胞数、脑组织 Ang-2 mRNA 水平、MMP9 和 RAGE 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), CBF、NeuN 阳性细胞数、VEGF 和 Ang-1 mRNA 水平、claudin5 和 LRP1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 硫辛酸高、中剂量组大鼠 mNSS 评分、脑梗死百分比、EB 含量、GFAP 阳性细胞数、脑组织 Ang-2 mRNA、MMP9 和 RAGE 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), CBF、脑微血管密度、NeuN 阳性细胞数、VEGF 和 Ang-1 mRNA、claudin5 和 LRP1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。结论 硫辛酸可降低 BBB 的通透性, 促进血管新生, 对神经血管单元起着修复和保护作用; 其作用机制可能与下调 RAGE 的表达, 上调 LRP1 的表达有关。

关键词: 硫辛酸; 脑梗死; 血管新生; 神经血管单元; 晚期糖基化终产物受体/低密度脂蛋白受体相关蛋白 1

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 03-0464-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.03.009

Effects of lipoic acid on RAGE/LRP1 pathway and neurovascular unit remodeling in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

LI Yaoru¹, YU Kai², ZHANG Cong³, YAN Qiuyue¹, WANG Yan¹, AN Zexin¹, WANG Jing⁴, ZHANG Xiangjian³, LI Meng¹

1. Department of Neurology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, China

2. Department of Cardiology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, China

3. Department of Neurology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

4. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To investigate the effects of lipoic acid on neurovascular unit remodeling and microvascular regeneration in rats with cerebral infarction and the effect of receptor for advanced glycation end products (RAGE)/low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1). **Methods** A total of 108 male Wistar rats were used to establish tMCAO model by suture method except 18

收稿日期: 2021-07-18

基金项目: 2020 年度河北省医学科学研究指导性课题 (20200304)

第一作者: 李耀汝 (1988—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑血管病。Tel: 18003278932 E-mail: ngy400@163.com

*通信作者: 闫秋月 (1986—), 女, 博士, 副主任医师。Tel: 15133771266 E-mail: yqywc@163.com

rats as sham operation group. The successful rats were divided into model group, high, medium and low dose lipoic acid groups (40, 20, 10 mg·kg⁻¹), RAGE inhibitor group (FPS-ZM1, 1.0 mg·kg⁻¹), with 18 rats in each group. After two hours of reperfusion, the drug was administered, once a day for 14 consecutive days. On the 1st, 7th and 14th day after operation, neurological deficit score (mNSS) was performed, the cerebral blood flow (CBF), cerebral infarction area (CI) and blood-brain barrier permeability (BBB) were measured by laser speckle imaging, 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and Evans blue (EB) respectively; the number of cerebral microvessels was measured by immunofluorescence staining, and the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuron nuclear antigen (NeuN) were detected by immunohistochemistry; real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin-1 (Ang-1) and angiopoietin-2 (Ang-2); Western blot was used to detect the expression of MMP9, claudin5, RAGE and LRP1. **Results** Compared with those in sham operation group, mNSS score, cerebral infarction ratio, EB content, GFAP positive cells number, Ang-2 mRNA, MMP9 and RAGE protein expression in brain tissue of rats in model group were significantly increased ($P < 0.05$), CBF, NeuN positive cells number, VEGF and Ang-1 mRNA, claudin5 and LRP1 protein expression were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with those in the model group, mNSS score, cerebral infarction ratio, EB content, GFAP positive cells number, Ang-2 mRNA, MMP9 and RAGE protein expression in brain tissue of rats in the high and middle dose lipoic acid groups were significantly decreased ($P < 0.05$), CBF, microvessel density, NeuN positive cells number, VEGF and Ang-1 mRNA, claudin5 and LRP1 protein expression were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Lipoic acid can reduce BBB permeability, promote angiogenesis, repair and protect neurovascular units; its mechanism may be related to down-regulating RAGE expression and up-regulating LRP1 expression.

Key words: lipoic acid; cerebral infarction; angiogenesis; neurovascular unit; receptor for advanced glycation end products/low-density lipoprotein receptor related protein 1

脑梗死又称缺血性卒中,是由大脑血流供应减少引起血脑屏障(blood brain barrier, BBB)破坏,从而导致脑组织坏死的一类疾病,可诱导神经功能紊乱;具有高发病率、高致残率和高死亡率,预后较差,给家庭和社会带来沉重负担^[1]。研究发现,血管新生是脑梗死后促进神经功能恢复的关键^[2]。神经血管单元由神经元、星形胶质细胞(astrocytes, AS)、小胶质细胞、血管内皮细胞(endothelial cell, EC)、周细胞、基底膜以及细胞外基质组成,是一个相互作用的整体,其中EC、AS、周细胞也是BBB的主要成分。当脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)发生后,会出现神经元退化、坏死, BBB通透性改变,小胶质细胞增生等病理变化,引起后续严重的脑损伤^[3]。因此,探究胶质细胞-神经-EC之间的内在联系,有效促进脑梗死区域血管的新生对脑梗死患者的预后具有重要意义^[4],但目前尚未发现能明确促进脑梗死后神经血管单元微血管再生的药物。硫辛酸是一种强力抗氧化剂,近年来临床研究发现硫辛酸用于治疗脑梗死,可明显改善血液循环,改善患者神经功能^[5]。动物研究也表明硫辛酸能抑制神经元凋亡,减轻大鼠CIRI。然而硫辛酸对缺血脑损伤血管新生方面的影响尚未可知。因此,本研究通过制备大鼠大脑中动脉短暂缺血再灌注(tMCAO)模型,探究硫辛酸对脑梗死大鼠神经血管单元重塑及微血管再生的作

用及可能的机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性Wistar大鼠108只,体质量(300±20)g,购自北京维通利华动物中心,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2016-0011,动物喂养严格按照动物饲养规则,动物房温度为(24±2)℃,湿度为50%~60%,自由饮水和摄食。

1.2 药品及主要试剂

硫辛酸(南京新百药业有限公司,国药准字H20093235,批号20190211);晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)抑制剂(FPS-ZM1,美国APEX BIO,货号945714-67-0);线栓(北京西浓科技有限公司);2,3,5-氯化三苯基四氮唑试剂(TTC,美国Sigma公司,批号T8877);伊文思蓝(EB)染色液(南京沃博生物科技有限公司,批号R3248);封闭正常山羊血清(北京Solarbio公司,货号SL038);兔抗大鼠CD31抗体(货号ab222783)、羊抗兔IgG H&L(FITC)(货号ab97050)、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(GFAP,货号ab7260)、神经元特异核蛋白(NeuN,货号ab177487)、基质金属蛋白酶9(MMP9,货号ab76003)、紧密连接相关蛋白(claudin5,货号ab217316)、RAGE(货号ab216329)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1(low density lipoprotein receptor

related protein 1, LRP1)(货号 ab92544)、 β -actin(货号 ab8227)、山羊抗兔 IgG H&L (HRP)(货号 ab205718)抗体,均购自英国 abcam 公司;HE 染色试剂、RIPA 裂解液和 BCA 试剂盒均购自上海碧云天生物科技公司;反转录试剂盒及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒购买于日本 TaKaRa 公司;PCR 引物由上海 Gene Pharma 合成。

1.3 主要仪器

蛋白转膜装置购自美国 Bio-Rad 公司;PeriCam PSI 血流成像仪购自瑞典帕瑞医学(中国)公司;大鼠脑立体定位仪、维纳斯剪(血管剪)购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司;倒置荧光显微镜(IX73)购自日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 模型制备

大鼠适应性饲养 7 d 后开始实验,随机选取 18 只为假手术组。用 3% 戊巴比妥钠($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)ip 麻醉,除假手术组外,其余大鼠采用线栓法^[6]制备 tMCAO 模型。大鼠颈部脱毛,碘伏消毒,于颈部正中偏左切一小口,钝性分离肌肉,暴露左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA),结扎 CCA 近心端和 ECA,并于 CCA 远心端穿线打一活结,动脉夹夹闭 ICA,用血管剪在 CCA 两结扎之间血管剪一小口,将线栓由 CCA 插入到 ICA,进入脑动脉,2 h 后,拔出线栓,缝合手术切口。假手术组除不插栓外,其余操作同上。待大鼠清醒后,若大鼠提尾时左侧前肢不能完全伸展,爬行时向对侧转圈,不能走直线,说明模型成功。为了保证实验样本的充足,实验过程中死亡大鼠进行随机补充,保证每组大鼠数量 18 只。

2.2 分组及给药

将模型制备成功的 90 只大鼠根据神经评分分为模型组、FPS-ZM1 组(RAGE 抑制剂, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[7]、硫辛酸高、中、低剂量组(40 、 20 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[8],每组 18 只。再灌注 2 h 后 ip 给药,假手术组和模型组注射等量生理盐水,每天 1 次,连续给药 14 d。

2.3 样本采集及指标检测

2.3.1 神经评分 于术后 1、7、14 d 采用改良神经功能缺损程度评分法(modified neurological severity score, mNSS)^[9]检测大鼠运动、感觉、反射、平衡等能力,总分 18 分,得分越高表示神经功能损伤越重。

2.3.2 激光散斑血流成像仪监测脑血流量(CBF) 于术前、术后即刻及 7、14 d 监测 CBF,麻醉后,将大鼠固定于立体定位仪上,消毒后切开头皮,充分暴露颅骨,分离骨膜,生理盐水保持颅骨表面湿润,用棉签清除颅骨表面的细小杂质。随后将大鼠置于激光散斑成像系统下扫描测量两个半球的 CBF。记录左侧梗死区感兴趣区域(ROI)的平均灌注量。

2.3.3 脑梗死体积百分比 第 14 天 CBF 监测完成后,每组随机选取 6 只大鼠,断头取脑,从额极开始连续切取 5 个冠状脑片(2 mm 厚),置于 1% 的 TTC 染色溶液中,37 °C 避光孵育 15 min(期间翻动脑片 1 次),4 °C 条件下置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h。拍照后采用 Image Pro Plus 6.0 进行分析,计算校正水肿后脑梗死体积百分比。

脑梗死体积百分比 = (缺血对侧半球体积 - 缺血侧半球非梗死体积) / 缺血对侧半球体积

2.3.4 EB 染色检测血脑屏障通透性 第 14 天 CBF 监测完成后,每组随机选取 6 只大鼠,麻醉后,尾 iv 注入 2% EB 溶液($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),6 h 后行心脏 PBS 灌注取脑。精确称取缺血侧脑组织,加入 2 mL 三氯乙酸溶液匀浆,静置 30 min,10 000 rmin⁻¹离心 20 min,取等量上清液,用酶标仪在 620 nm 波长处测定吸光度(A)值,利用样品作出标准曲线,根据标准曲线求得 EB 含量。EB 含量升高,表示 BBB 被破坏,通透性增加。

2.3.5 免疫荧光染色测量脑微血管密度 第 14 天 CBF 完成后,每组剩余 6 只大鼠心脏 PBS 灌注后,取脑后冠状切分为 2 部分,一部分液氮速冻后放入 -80 °C 冰箱保存。另一部分 4% 多聚甲醛固定后,置于 30% 蔗糖溶液脱水,冰冻切片(-20 °C,放入防冻液中保存),0.01 mol·L⁻¹ PBS 静置水化 20 min,漂洗后用 10% 山羊血清封闭 1 h,孵育一抗兔抗大鼠 CD31 抗体(1:20),4 °C 过夜,洗去一抗,滴加二抗羊抗兔 IgG-FITC(1:200),室温孵育 1 h,洗去二抗,甘油封片,在荧光显微镜下观察缺血侧皮质区微血管密度,用 Image J 软件定量分析。每张切片观察缺血侧半影区皮质 5 个区域,取平均值。

2.3.6 免疫组化法检测神经血管单元 GFAP、NeuN 的表达 取“2.3.5”项下的冰冻切片,梯度乙醇脱水,0.01 mol·L⁻¹ PBS 清洗 3 次,每次 3 min,高压修复 4 min, PBS 清洗 3 次。加入 3% H₂O₂ 孵育 10 min,再次清洗 3 次,羊血清封闭,加 GFAP(1:500)、NeuN(1:300)抗体,4 °C 过夜,洗去一抗,加二抗,室

温孵育1 h,洗去二抗,DAB显色,苏木精复染,脱水,二甲苯透明,封片;显微镜观察缺血侧脑皮质区GFAP、NeuN免疫阳性细胞,Image Pro Plus 6.0进行图像采集和分析。每只大鼠选择缺血侧半影区皮质5个高倍视野,取均值为阳性细胞数量。

2.3.7 qRT-PCR 法检测 VEGF、Ang-1、Ang-2 的 mRNA 表达 取-80 °C冰箱保存的部分脑组织,Trizol法提取总RNA,按照SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒说明书将RNA进行反转录,进行PCR扩增。反应体系(25 μL):SYBR® Premix Ex Taq™(2×) 12.5 μL,cDNA(200 ng·μL⁻¹)1 μL,上下游引物(引物序列见表1)各0.5 μL,ddH₂O 11 μL。反应条件:95 °C预变性10 min,然后95 °C、10 s,60 °C、20 s,72 °C、30 s;进行40次循环。以β-actin为内参,与假手术组相比,得到目的基因的C_t值,采用2^{-ΔΔC_t}方法,对结果进行分析。

表1 RT-PCR引物序列
Table 1 RT-PCR primer sequence

基因	引物序列
VEGF	F:5'-GGAGTACCCCGATGAGATAGA-3' R:5'-GCTGGCTTTGGTGAGGTTTGA-3'
Ang-1	F:5'-AGAGGCAGTACATGCTAAGAATT-3' R:5'-TCCATGGTTTTGTCCCGCAG-3'
Ang-2	F:5'-GCCVATGAAGTGTTGAAGTTC-3' R:5'-AGATGTCCAGGGTCTCAA-3'
β-actin	F:5'-GCTGTGCTATGTTGCTCTAG-3' R:5'-CGCTCGTTGCCAATAGTG-3'

2.3.8 Western blotting 检测 MMP9、claudin5、RAGE、LRP1 蛋白表达 取-80 °C冰箱保存的剩余脑组织,应用RIPA裂解液提取脑组织中的总蛋白,BCA法测定蛋白浓度后,取30 μg蛋白质样品上样,SDS-PAGE凝胶电泳,湿转法转膜,5%脱脂奶粉封闭,加入一抗(MMP9、claudin5、RAGE、LRP1按1:1 000稀释;β-actin按1:2 000稀释),4 °C下孵育过夜,洗去一抗,加入羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育1 h,ECL显色,以β-actin为内参,通过与内参的灰度比,得出目的条带的相对表达水平。

2.4 统计学分析

所得数据使用SPSS Statistics 22.0和Image-Pro Plus 6.0软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 硫辛酸对tMCAO大鼠mNSS评分的影响

与假手术组比较,模型组大鼠mNSS评分显著升高($P < 0.05$),随着时间的推移,mNSS评分逐渐降低;与模型组比较,术后7、14 d硫辛酸高、中剂量组大鼠mNSS评分显著降低($P < 0.05$);与FPS-ZM1组比较,硫辛酸高剂量组大鼠mNSS评分差异无统计学意义。见表2。

表2 硫辛酸对tMCAO大鼠mNSS评分的影响($\bar{x} \pm s, n=18$)

Table 2 Effect of lipoic acid on mNSS score of tMCAO rats ($\bar{x} \pm s, n=18$)		mNSS 评分		
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	术后1 d	术后7 d	术后14 d
假手术	—	0.45±0.04	0.50±0.06	0.41±0.05
模型	—	11.63±1.07*	9.82±1.28*	8.75±1.16*
FPS-ZM1	1	11.34±1.22*	7.28±1.16*#	6.39±1.05*#
硫辛酸	40	11.25±1.04*	7.49±1.04*#	6.54±1.07*#
	20	11.48±1.19*	8.85±1.31*#△	7.23±1.11*#△
	10	11.29±1.23*	9.34±1.26*△	8.44±1.24*△

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与FPS-ZM1组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs FPS-ZM1 group

3.2 硫辛酸对tMCAO大鼠缺血侧CBF的影响

如图1、表3所示,假手术组大鼠术前、术后即刻及7、14 d时CBF无明显变化;模型组大鼠术后即刻缺血侧CBF较术前显著降低,显著低于对照组($P < 0.05$),随着时间的推移CBF逐渐恢复;术后7 d时,与模型组比较,硫辛酸各剂量组CBF有所增加,但

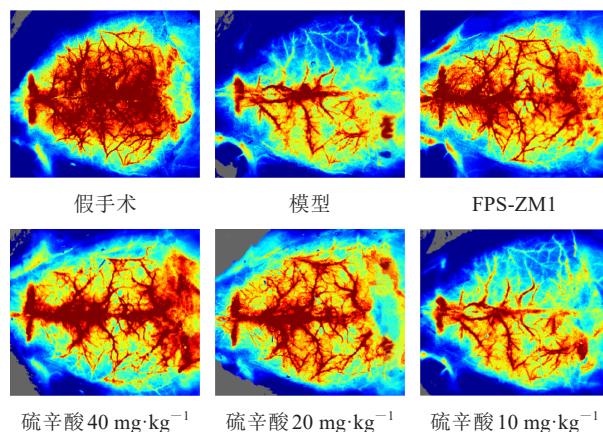


图1 硫辛酸对tMCAO大鼠CBF的影响(术后14 d)

Fig. 1 Effect of lipoic acid on CBF in tMCAO rats (14 d after operation)

表3 硫辛酸对tMCAO大鼠缺血侧CBF的影响($\bar{x}\pm s, n=18$)Table 3 Effect of lipoic acid on CBF in ischemic side of tMCAO rats ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	梗死区ROI的灌注量/PU			
		术前	术后即刻	术后7 d	术后14 d
假手术	—	302.14±32.55	299.85±26.23	300.10±31.37	304.02±30.12
模型	—	304.36±33.38	118.63±20.47*	139.72±24.58*	173.51±22.06*
FPS-ZM1	1	302.77±28.57	120.34±23.52*	145.28±26.96*	219.45±20.41*#
硫辛酸	40	299.52±29.66	117.25±21.84*	143.49±27.64*	216.17±23.04*#
	20	300.81±30.54	121.88±20.19*	141.85±30.91*	193.28±21.18*#△
	10	301.48±32.45	122.14±21.73*	140.14±24.56*	179.92±25.22*△

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与FPS-ZM1组比较: △ $P<0.05$ * $P<0.05$ vs sham operation group; # $P<0.05$ vs model group; △ $P<0.05$ vs FPS-ZM1 group

无统计学差异; 术后14 d, 与模型组比较, 硫辛酸高、中剂量组大鼠CBF显著升高($P<0.05$); 与FPS-ZM1组比较, 硫辛酸高剂量组大鼠缺血侧CBF差异无统计学意义。

3.3 硫辛酸对tMCAO大鼠脑梗死体积百分比的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠脑梗死体积百分比显著升高($P<0.05$); 与模型组比较, 硫辛酸高、中剂量组大鼠脑梗死体积百分比明显降低($P<0.05$); 与FPS-ZM1组比较, 硫辛酸高剂量组大鼠脑梗死体积百分比差异无统计学意义。结果见图2、表4。

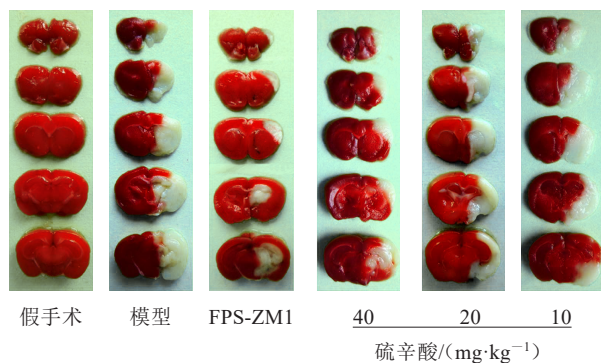


图2 各组大鼠TTC染色结果

Fig. 2 TTC staining results of rats in each group

3.4 硫辛酸对tMCAO大鼠血脑屏障的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织EB含量显著升高($P<0.05$); 与模型组比较, 硫辛酸高、中、低剂量组大鼠脑组织EB含量显著降低($P<0.05$); 与FPS-ZM1组比较, 硫辛酸高剂量组大鼠脑组织EB含量差异无统计学意义。见表5。

3.5 硫辛酸对tMCAO大鼠脑微血管密度的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠缺血侧半影区皮

表4 硫辛酸对tMCAO大鼠脑梗死体积百分比的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 4 Effect of lipoic acid on volume percentage of cerebral infarction in tMCAO rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脑梗死体积比/%
假手术	—	0.00±0.00
模型	—	34.58±2.21
FPS-ZM1	1	15.92±1.46*#
硫辛酸	40	16.37±1.79*#
	20	27.85±2.27*#△
	10	32.37±2.56*△

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与FPS-ZM1组比较: △ $P<0.05$ * $P<0.05$ vs sham operation group; # $P<0.05$ vs model group; △ $P<0.05$ vs FPS-ZM1 group表5 硫辛酸对tMCAO大鼠脑组织EB含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)Fig. 5 Effect of lipoic acid on EB content in brain tissue of tMCAO rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	EB含量/(μg·mg ⁻¹)
假手术	—	1.60±0.12
模型	—	11.13±1.24*
FPS-ZM1	1	5.37±1.01*#
硫辛酸	40	5.69±1.15*#
	20	7.43±1.27*#△
	10	9.87±1.62*#△

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与FPS-ZM1组比较: △ $P<0.05$ * $P<0.05$ vs sham operation group; # $P<0.05$ vs model group; △ $P<0.05$ vs FPS-ZM1 group

质脑微血管密度无统计学差异; 与模型组比较, 硫辛酸高、中、低剂量组大鼠脑微血管密度明显增加($P<0.05$); 与FPS-ZM1组比较, 硫辛酸高剂量组大鼠脑微血管密度差异无统计学意义。结果见图3、表6。

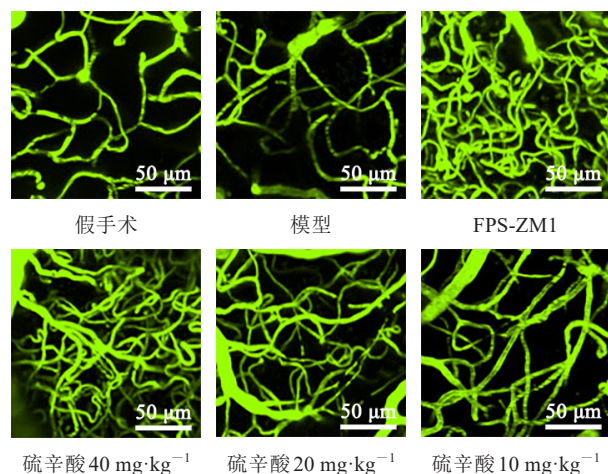


图3 各组大鼠脑微血管免疫荧光染色结果

Fig. 3 Immunofluorescence staining results of brain microvessels of rats in each group

表6 硫辛酸对tMCAO大鼠脑微血管密度的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 6 Effect of lipoic acid on cerebral microvessel density in tMCAO rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脑微血管密度/%
假手术	—	8.65±1.27
模型	—	9.23±1.43
FPS-ZM1	1	14.31±1.38 ^{*#}
硫辛酸	40	13.92±1.45 ^{*#}
	20	12.43±1.36 ^{*#△}
	10	10.87±1.24 ^{*#△}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与FPS-ZM1组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs FPS-ZM1 group

3.6 硫辛酸对tMCAO大鼠缺血侧脑皮质区GFAP、NeuN表达的影响

假手术组有少量GFAP阳性细胞,且突起细小,染色较浅,NeuN阳性细胞数较多;与假手术组比较,模型组可见GFAP阳性细胞数显著增加($P < 0.05$),且胞体变大,突起增粗,分支增多,染色较深,而NeuN阳性细胞数显著减少($P < 0.05$);与模型组比较,硫辛酸高、中剂量组大鼠GFAP阳性细胞数显著减少,NeuN阳性细胞数显著增加($P < 0.05$);与FPS-ZM1组比较,硫辛酸高剂量组大鼠GFAP和NeuN阳性细胞数差异无统计学意义。见图4、表7。

3.7 硫辛酸对tMCAO大鼠脑组织VEGF、Ang-1、Ang-2 mRNA表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织VEGF、Ang-1 mRNA表达显著降低,Ang-2 mRNA表达显

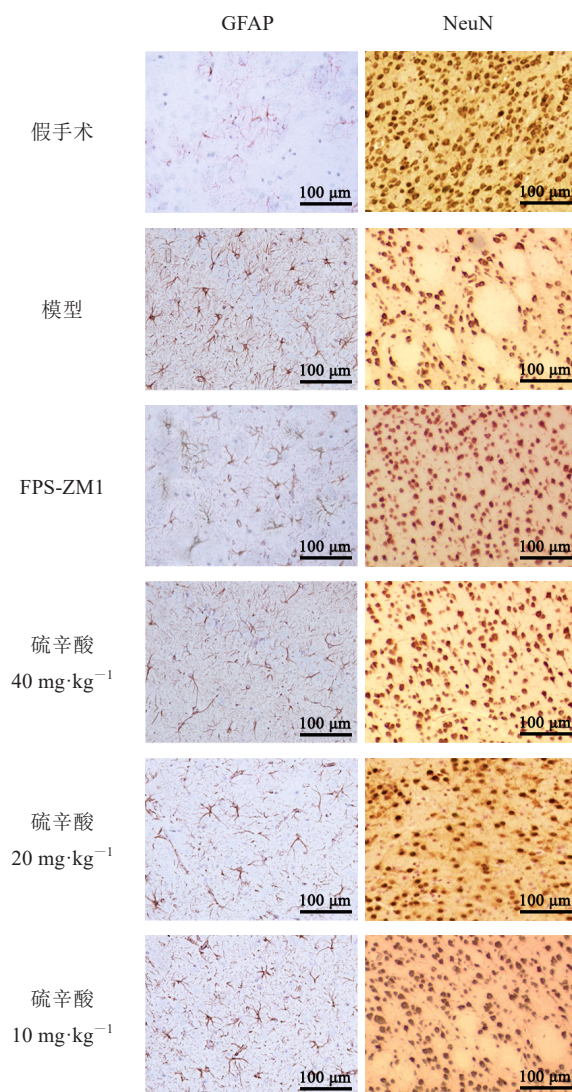


图4 各组大鼠GFAP、NeuN免疫组化染色结果

Fig. 4 Immunohistochemical staining results of GFAP and NeuN in rats of each group

表7 硫辛酸对tMCAO大鼠缺血侧脑皮质区GFAP、NeuN表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 7 Effect of lipoic acid on GFAP and NeuN expression in ischemic cerebral cortex of tMCAO rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	GFAP阳性细胞计数	NeuN阳性细胞计数
假手术	—	7.13±1.24	38.76±3.01
模型	—	32.55±3.06 [*]	20.83±2.14 [*]
FPS-ZM1	1	22.76±2.18 ^{*#}	29.35±2.36 ^{*#}
硫辛酸	40	24.19±2.25 ^{*#}	28.06±2.52 ^{*#}
	20	27.14±2.33 ^{*#△}	25.81±2.19 ^{*#△}
	10	30.46±2.42 ^{*△}	22.34±2.15 ^{*△}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与FPS-ZM1组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs FPS-ZM1 group

著增加($P<0.05$);与模型组比较,硫辛酸高、中剂量组大鼠脑组织 VEGF、Ang-1 mRNA 表达显著增加($P<0.05$),Ang-2 mRNA 表达显著降低($P<0.05$);与 FPS-ZM1 组比较,硫辛酸高剂量组大鼠脑组织 VEGF、Ang-1、Ang-2 mRNA 表达差异无统计学意义。见表 8。

表 8 硫辛酸对 tMCAO 大鼠 VEGF、Ang-1、Ang-2 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of lipoic acid on VEGF, Ang-1 and Ang-2 mRNA expression in tMCAO rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	VEGF/ β - actin	Ang-1/ β - actin	Ang-2/ β - actin
假手术	—	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	—	0.64±0.10*	0.82±0.12*	1.43±0.11*
FPS-ZM1	1	0.87±0.13**	1.26±0.14**	1.24±0.12**
硫辛酸	40	0.88±0.14**	1.22±0.15**	1.27±0.16**
	20	0.79±0.10** Δ	1.13±0.13** Δ	1.33±0.13** Δ
	10	0.70±0.13** Δ	1.08±0.12** Δ	1.38±0.14** Δ

与假手术组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: ** $P<0.05$;与 FPS-ZM1 组比较: $\Delta P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham operation group; ** $P<0.05$ vs model group; $\Delta P<0.05$ vs FPS-ZM1 group

表 9 硫辛酸对 tMCAO 大鼠脑组织 MMP9、claudin5、RAGE、LRP1 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 9 Effect of lipoic acid on expression of MMP9, claudin5, RAGE and LRP1 protein in tMCAO rat brain tissue ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MMP9/ β -actin	claudin5/ β -actin	RAGE/ β -actin	LRP1/ β -actin
假手术	—	0.32±0.04	0.39±0.08	0.53±0.07	0.95±0.07
模型	—	0.64±0.07*	0.14±0.06*	0.86±0.06*	0.60±0.08*
FPS-ZM1	1	0.42±0.08**	0.28±0.07**	0.66±0.07**	0.84±0.09**
硫辛酸	40	0.45±0.07**	0.25±0.08**	0.68±0.05**	0.82±0.09**
	20	0.51±0.06** Δ	0.22±0.06** Δ	0.76±0.07** Δ	0.77±0.08** Δ
	10	0.56±0.05** Δ	0.18±0.07** Δ	0.81±0.08** Δ	0.65±0.07** Δ

与假手术组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: ** $P<0.05$;与 FPS-ZM1 组比较: $\Delta P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham operation group; ** $P<0.05$ vs model group; $\Delta P<0.05$ vs FPS-ZM1 group

4 讨论

脑血管 EC 是脑微血管的主要组成部分,也是构成 BBB 的主要元素,维持健康的脑 EC 在维持 BBB 的完整性和脑稳态方面起主要作用^[10]。在脑缺血期间脑 EC 的结构和功能变化会导致 BBB 破坏、血管发炎、水肿等。这些复杂的病理过程直接导致脑梗死、神经功能缺损和卒中后神经血管重塑^[11]。激活的 AS 通过突起将血管和神经元联系在一起,GFAP 是 AS 活化的特异性标志物,NeuN 是成熟神经元的特异性标志物^[12]。本研究发现 CIRI 后 GFAP 阳性表达的 AS 数量显著增多,而且胞体变大,出现大量突起,NeuN 阳性表达却显著减少,说明脑缺血后神经血管单元被破坏。

硫辛酸是人体中天然存在的抗氧化剂,在临床

3.8 硫辛酸对 tMCAO 大鼠脑组织 MMP9、claudin5、RAGE、LRP1 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 MMP9、RAGE 表达显著增加,claudin5、LRP1 表达显著降低($P<0.05$);与模型组比较,硫辛酸高、中剂量组大鼠脑组织 MMP9、RAGE 表达显著降低,claudin5、LRP1 表达显著升高($P<0.05$);与 FPS-ZM1 组比较,硫辛酸高剂量组大鼠 MMP9、claudin5、RAGE、LRP1 表达差异无统计学意义。见图 5、表 9。

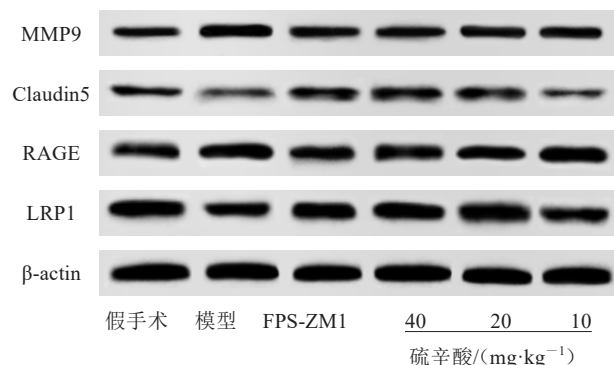


图 5 各组大鼠脑组织 BBB 相关蛋白表达结果

Fig. 5 Expression results of BBB related proteins in brain tissue of rats in each group

上已被广泛用于某些以氧化应激为主要病理过程的疾病^[13]。近年研究发现它在神经变性疾病如阿尔茨海默病(AD)、帕金森病或卒中的发病机制中起着多种作用,可作为神经保护剂^[14-15]。Zhang 等^[16]研究发现硫辛酸可通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路减轻神经炎症,保护大鼠 CIRI。本研究发现 tMCAO 大鼠 mNSS 评分、脑梗死体积显著升高,缺血侧 CBF 较术前显著降低,虽然随着时间的推移有所恢复,但仍处于较低水平,且脑组织 EB 含量显著升高,说明 tMCAO 大鼠 BBB 破坏,存在明显的神经功能缺损症状。而经硫辛酸干预的大鼠 EB 含量、GFAP 阳性表达的 AS 数量明显降低,缺血侧 CBF、脑微血管密度、NeuN 阳性表达明显升高;提示硫辛酸可能促进血管新生,降低 BBB 的通透性,促进神

经血管单元重塑。

VEGF是脑血管生成的关键介质,尽管VEGF有潜在的不利影响(例如血管通透性和脑水肿),但是VEGF也是卒中的潜在治疗靶点^[17]。Kong等^[18]发现iv内皮祖细胞可通过促进VEGF的血管生成,改善大鼠局灶性脑缺血后的神经功能恢复和血运重建。VEGF主要负责早期促进血管网络的形成,并在保护脑EC免受CIRI诱导的损伤中起重要作用^[19]。Ang-1是胚胎和出生后生命中生理和病理性血管生成的重要调节剂,Ang-1可以保护周围血管免受缺血性损伤后的血管渗漏。Ang-2是Ang-1的拮抗剂,可介导内皮细胞死亡,破坏血管化,并增加血管渗透性,并且具有促炎作用^[20]。在中枢神经系统中,高水平的Ang-1和低水平的Ang-2构成了动态平衡,对维持BBB完整性非常重要^[21]。紧密连接蛋白(例如occludin,ZO-1和claudin-5)连接大脑EC形成BBB,其中claudin-5被认为是主要的紧密连接蛋白^[22]。MMP9参与脑缺血后BBB的破坏,Zhu等^[23]体外培养大鼠原代脑微血管内皮细胞,发现氧-葡萄糖剥夺和复氧后MMP9明显增加,而claudin-5、occludin和ZO-1明显降低。为了进一步明确硫辛酸对血管新生的影响,本研究采用qRT-PCR和Western blotting检测脑组织血管新生和BBB相关基因和蛋白表达,结果显示,硫辛酸可明显升高大鼠脑组织VEGF、Ang-1和claudin5蛋白的表达,降低Ang-2 mRNA、MMP9蛋白表达。提示,硫辛酸可能上调VEGF、Ang-1的表达,下调Ang-2的表达,促进血管新生,并通过下调MMP9的表达,上调claudin5的表达,保护BBB的完整性。

RAGE和LRP1是脑微血管EC上的主要转运蛋白,研究发现AD中 β -淀粉样蛋白(A β)的跨BBB转运主要是通过脑微血管EC上LPR1和RAGE完成,LPR1使A β 转运出脑,而RAGE使A β 转运入脑^[24]。研究发现,通过增加LRP1的表达,同时降低RAGE的水平,可降低BBB的通透性,恢复自主神经系统功能,并促进A β 从大脑清除^[25-26]。目前对于LRP1和RAGE的研究主要集中在AD,而CIRI过程中,BBB的破坏和神经损伤的加重是否与LPR1和RAGE有关,还未见相关报道。本研究检测了LPR1和RAGE蛋白表达,并设置RAGE的抑制剂(FPS-ZM1)组,结果显示tMCAO大鼠脑组织RAGE表达显著升高,LRP1表达显著降低;而硫辛酸干预后,RAGE表达明显降低,LRP1表达明显升高,且硫辛酸对RAGE的抑制作用与FPS-ZM1接近;提示硫辛

酸可下调RAGE表达,上调LRP1表达。

硫辛酸可降低BBB的通透性,促进血管新生,对神经血管单元起着修复和保护作用;其作用机制可能与下调RAGE的表达,上调LRP1的表达有关。因研究有限本研究仅在动物水平进行了初步探究,后续可从体外细胞水平进行深入研究,此外,硫辛酸对BBB的保护作用是否与周细胞有关,有待进一步明确。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li YC, Zhong W, Jiang Z, et al. New progress in the approaches for blood-brain barrier protection in acute ischemic stroke [J]. Brain Res Bull, 2019, 144: 46-57.
- [2] Liang C, Ni G X, Shi X L, et al. Astragaloside IV regulates the HIF/VEGF/Notch signaling pathway through miRNA-210 to promote angiogenesis after ischemic stroke [J]. Restor Neurol Neurosci, 2020, 38(3): 271-282.
- [3] 刘抒雯, 杨丽华, 马 春, 等. 中医药保护脑缺血再灌注损伤后神经血管单元的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 225-234.
Liu S W, Yang L H, Ma C, et al. Effect of neurovascular unit after cerebral ischemia reperfusion injury treated by traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(23): 225-234.
- [4] Peng H, Yang H, Xiang X, et al. MicroRNA-221 participates in cerebral ischemic stroke by modulating endothelial cell function by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(1): 443-450.
- [5] 杨荣成, 尹金阁. 硫辛酸注射液对脑梗死神经功能恢复及C-反应蛋白的影响 [J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2019, 37(1): 34-36.
Yang R C, Yin J G. Effect of lipoic acid injection on the recovery of nerve function and C-reactive protein in patients with cerebral infarction [J]. J Henan Univ Sci Technol Med Sci, 2019, 37(1): 34-36, 62.
- [6] 黄亚光, 王金凤, 杜利鹏, 等. 葛根素调节AMPK-mTOR信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3127-3133.
Huang Y G, Wang J F, Du L P, et al. Effect of puerarin on regulation of AMPK-m TOR signaling pathway to inhibit autophagy and alleviate focal cerebral ischemia reperfusion injury [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(13): 3127-3133.
- [7] 何林全, 刘家云, 屈园利, 等. 加味补阳还五颗粒对脑梗死大鼠HMGB1/RAGE信号通路的影响 [J]. 中国中医急救, 2018, 27(7): 1159-1162.

- He L Q, Liu J Y, Qu Y L, et al. Effects of modified Buyang Huanwu granules(MBYHWG) on HMGB1/RAGE signal pathway in cerebral infarction rats [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2018, 27(7): 1159-1162.
- [8] 丁旭. α -硫辛酸对脑缺血再灌注大鼠凋亡调控基因的表达及炎症因子的影响[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2018, 15(4):75-79.
- Ding X. Effects of α -lipoic acid on expression of apoptosis-regulating genes and inflammatory factors in rats with cerebral ischemia-reperfusion [J]. J Hunan Norm Univ Med Sci, 2018, 15(4): 75-79.
- [9] 杨仁义, 颜思阳, 周德生, 等. 基于miR-34调控KLF4/VEGF传导轴探讨活血荣络方促脑梗死后血管新生的机制[J]. 中草药, 2021, 52(16): 4873-4881.
- Yang R Y, Yan S Y, Zhou D S, et al. Mechanism of Huoxue Rongluo Recipe on promoting angiogenesis after cerebral infarction based on miR-34 regulating KLF4/VEGF conduction axis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(16): 4873-4881.
- [10] Sun P, Zhang K, Hassan S H, et al. Endothelium-targeted deletion of microRNA-15a/16-1 promotes poststroke angiogenesis and improves long-term neurological recovery [J]. Circ Res, 2020, 126(8): 1040-1057.
- [11] Belayev L, Hong S H, Menghani H, et al. Docosanoids promote neurogenesis and angiogenesis, blood-brain barrier integrity, penumbra protection, and neurobehavioral recovery after experimental ischemic stroke [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(8): 7090-7106.
- [12] 朱炜楷, 沈会, 张朋新, 等. 针刺对脑缺血再灌注模型大鼠脑缺血皮质区神经血管单元微血管再生的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2020, 35(4): 398-403, 419.
- Zhu W K, Shen H, Zhang P X, et al. Effects of the acupuncture on the brain angiogenesis of neurovascular unit around the cerebral ischemic cortex in rats with cerebral ischemia reperfusion injury [J]. Chin J Rehabilitation Med, 2020, 35(4): 398-403, 419.
- [13] Liu W, Shi L J, Li S G. The immunomodulatory effect of alpha-lipoic acid in autoimmune diseases [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 8086257
- [14] de Sousa C N S, da Silva Leite C M G, da Silva Medeiros I, et al. Alpha-lipoic acid in the treatment of psychiatric and neurological disorders: A systematic review [J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(1): 39-52.
- [15] Wang Q Q, Lv C M, Sun Y X, et al. The role of alpha-lipoic acid in the pathomechanism of acute ischemic stroke [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(1): 42-53.
- [16] Zhang J, Xiao F, Zhang L L, et al. Alpha-lipoic acid preconditioning and ischaemic postconditioning synergistically protect rats from cerebral injury induced by ischemia and reperfusion partly via inhibition TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(3): 1448-1460.
- [17] Kim Y, Lee S, Zhang H Y, et al. CLEC14A deficiency exacerbates neuronal loss by increasing blood-brain barrier permeability and inflammation [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 48.
- [18] Kong Z H, Hong Y, Zhu J, et al. Endothelial progenitor cells improve functional recovery in focal cerebral ischemia of rat by promoting angiogenesis via VEGF [J]. J Clin Neurosci, 2018, 55: 116-121.
- [19] Yu Y L, Fang H B, Qiu Z, et al. DHA attenuates hypoxia/reoxygenation injury by activating SSeCKS in human cerebrovascular pericytes [J]. Neurochem Res, 2020, 45(2): 310-321.
- [20] Khelif Y, Toutain J, Quittet M S, et al. A heparan sulfate-based matrix therapy reduces brain damage and enhances functional recovery following stroke [J]. Theranostics, 2018, 8(21): 5814-5827.
- [21] Li W X, Wei D, Xie X M, et al. DL-3-n-Butylphthalide regulates the Ang-1/Ang-2/Tie-2 signaling axis to promote neovascularization in chronic cerebral hypoperfusion [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 113: 108757.
- [22] Berndt P, Winkler L, Cording J, et al. Tight junction proteins at the blood-brain barrier: Far more than claudin-5 [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(10): 1987-2002.
- [23] Zhu H Y, Dai R R, Fu H, et al. MMP-9 upregulation is attenuated by the monoclonal TLR2 antagonist T2.5 after oxygen-glucose deprivation and reoxygenation in rat brain microvascular endothelial cells [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(1): 97-106.
- [24] Cai Z Y, Qiao P F, Wan C Q, et al. Role of blood-brain barrier in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2018, 63(4): 1223-1234.
- [25] Pan Y M, Xu J Q, Jin P, et al. Royal jelly ameliorates behavioral deficits, cholinergic system deficiency, and autonomic nervous dysfunction in ovariectomized cholesterol-fed rabbits [J]. Molecules, 2019, 24(6): E1149.
- [26] Zhu D H, Su Y C, Fu B M, et al. Magnesium reduces blood-brain barrier permeability and regulates amyloid- β transcytosis [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(9): 7118-7131.

[责任编辑 兰新新]