

千叶素 A 对缺氧损伤下血脑屏障通透性的影响及其机制研究

郭虹, 史芳, 王少峡, 李美娇, 刘青青, 胡利民*

天津中医药大学中医药研究院 天津市现代中药重点实验室 省部共建国家重点实验室培育基地 天津市中药药理学重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 研究千叶素 A 对缺氧损伤下血脑屏障通透性的影响及其调控机制。**方法** 利用原代培养大鼠脑微血管内皮细胞 (BMEC) 建立体外血脑屏障模型, 缺氧诱导损伤。荧光分光光度法检测千叶素 A 对 BMEC 异硫氰酸荧光素 (FITC)-葡聚糖的荧光强度, 观察其对体外血脑屏障模型通透性的影响; RT-PCR 法检测千叶素 A 对 BMEC 紧密连接蛋白 ZO-1、claudin-1 基因表达的影响, Cell-Based ELISA 法检测千叶素 A 对 BMEC 中 ZO-1 蛋白表达的影响。**结果** 缺氧使体外血脑屏障模型对 FITC-葡聚糖的通透量明显增加, 脑微血管内皮细胞 ZO-1 基因和蛋白表达下调; 千叶素 A 能明显拮抗缺氧造成的上述损伤。**结论** 千叶素 A 对缺氧损伤体外血脑屏障具有保护作用, 其机制与其影响 ZO-1 表达有关。

关键词: 千叶素 A; 缺氧损伤; 血脑屏障; 通透性; ZO-1 表达

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)16-2278-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.16.016

Effect of oroxylin A on blood-brain barrier permeability induced by hypoxic injury *in vitro* and its mechanism

GUO Hong, SHI Fang, WANG Shao-xia, LI Mei-jiao, LIU Qing-qing, HU Li-min

Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To study the protective effect of oroxylin A on blood-brain barrier (BBB) permeability induced by hypoxic injury and its possible mechanism. **Methods** The BBB model *in vitro* was established by primarily culturing brain microvascular endothelial cells (BMEC), and the hypoxic injury was induced. To observe the changes of BBB permeability, fluorospectrophotometry was used to detect the fluorescence intensity of oroxylin A on fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran in BMEC. The effects of oroxylin A on the mRNA expression of ZO-1 and claudin-1 were assayed by RT-PCR, and the effect on the ZO-1 protein expression was measured by Cell-Based ELISA. **Results** Hypoxia significantly increased FITC-dextran permeability, decreased the expression of ZO-1 mRNA and protein, while oroxylin A could antagonize these effects caused by hypoxia. **Conclusion** Oroxylin A has a protective effect on BBB permeability induced by hypoxia *in vitro*, and the mechanism is involved in the regulation of ZO-1 expression.

Key words: oroxylin A; hypoxic injury; blood-brain barrier; permeability; ZO-1 expression

血脑屏障是中枢神经系统和血液的分界面, 它一方面允许脑组织需要的营养物质通过, 另一方面阻挡有害物质的入侵, 维持脑环境稳定^[1]。脑受到缺血、缺氧、炎症等损害时, 血脑屏障结构的完整性被破坏, 导致血脑屏障开放, 引起一系列脑血管损害。有研究显示, 川芎嗪、灯盏细辛等能保护血脑屏障的完整性和脑环境稳定, 其作用机制主要是

增强紧密连接蛋白、抑制金属蛋白酶的表达等^[2]。

千叶素 A (oroxylin A), 又名木蝴蝶素 A、千层纸素 A, 属黄酮类化合物, 是唇形科植物黄芩的主要药效成分之一, 能有效抑制细胞凋亡, 抑制脂多糖诱导的诱生型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶-2 (COX-2) 基因表达和 P-糖蛋白 (P-gp) 表达, 提高 P-gp 底物的利用率^[3-5]。然而其是否具有维持

收稿日期: 2012-09-20

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20121210120005); 天津市科技创新体系及条件平台建设 (10SYJJC28900)

作者简介: 郭虹 (1983—), 女, 天津人, 博士研究生, 主要从事中药神经药理和毒理研究。E-mail: cacti1983@163.com

*通信作者 胡利民 E-mail: huliminh@126.com

血脑屏障稳定性的作用则鲜见报道。本实验利用原代培养大鼠脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMEC) 建立体外血脑屏障模型, 探讨千叶素 A 对细胞缺氧损伤下血脑屏障通透性的保护作用及可能的机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

千叶素 A (质量分数 >90%), 天津大学苏艳芳教授提供; DMEM 培养基, Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS)、牛血清白蛋白 (BSA), 索莱宝公司; II 型胶原酶、胶原酶/分散酶、内皮细胞生长因子 (ECGF), 罗氏公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC)-葡聚糖, Sigma 公司; PrimeScript TMRT 试剂盒、SYBR[®]Premix Ex TaqTM, TaKaRa 公司; ZO-1 抗体, Invitrogen 公司; β -actin、ZO-1、claudin-1 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 动物

Wistar 大鼠, 20 日龄, 体质量 (40 ± 5) g, 雌雄不限, 购自中国医学科学院放射医学研究所, 许可证号: (津) 2012-0001。

1.3 仪器

Transwell 套筒, BD 公司; FlexStation 3 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; C1000PCR 扩增仪, 美国伯乐公司; ABI[®]7300 实时荧光定量系统, 美国 Applied Biosystems 公司。

2 方法

2.1 BMEC 培养

BMEC 培养采用本实验室已建立的方法^[6]。取约 20 日龄 Wistar 大鼠, 颈椎脱臼处死, 浸泡于 75% 乙醇中消毒 3~5 min, 取出全脑置于盛有冷 D-Hanks 液的玻璃培养皿中解剖去除小脑、间脑, 剥除血管、软脑膜等, 保留大脑皮质, 用虹膜剪将其剪成约 1 mm^3 , 加入 0.7 mg/mL II 型胶原酶, 37°C 消化 1 h, $1\,000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 加入 20% BSA 悬浮混匀, $1\,000 \times g$ 离心 20 min, 去除中上层神经组织及大血管, 保留底部沉淀。加入 1 mg/mL 胶原酶/分散酶, 37°C 消化 1 h, $700 \times g$ 离心 6 min, 弃上清, 用 DMEM 漂洗 2 次, 去上清液, 加入 DMEM 完全培养液 (含 20% FBS、 2 mmol/L L-谷氨酰胺、 $30 \mu\text{g/mL}$ ECGF、 $100 \mu\text{g/mL}$ 肝素钠) 悬浮后接种于 75 cm^2 培养瓶中, 2 d 换液 1 次, 直至长成细胞单层, 70%~80% 融合时传代。以 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 等体积组成的消

化液混合消化, 终止后轻轻吹打制成细胞悬液, 离心, 弃上清, 细胞重悬于 DMEM 完全培养液中, 以所需密度种于培养板中。

2.2 对 BMEC 缺氧损伤下血脑屏障通透性的影响

将传代的 BMEC 调整密度至 $4 \times 10^5/\text{mL}$, 吸取 0.5 mL 种植于 Transwell 套筒内, 使多聚酯膜上细胞密度约 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$, 向 Transwell 套筒外侧培养孔内加入 DMEM 完全培养基 (内容物同 “2.1” 项) 1.5 mL , 放入 5% CO_2 、 37°C 培养箱继续培养, 2 d 换液 1 次。待细胞生长至融合时分为 3 组: 对照组 Transwell 套筒上下两侧均加入 DMEM 完全培养液, 正常孵育 10 h; 缺氧组 Transwell 套筒上下两侧加入平衡盐溶液, 缺氧孵育 10 h; 千叶素 A 组 Transwell 套筒上侧加入终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的千叶素 A (预实验结果显示, 千叶素 A 浓度只有在 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, 对血脑屏障通透性和 ZO-1 蛋白表达有明显作用, 因此这 2 项实验只选用 $10 \mu\text{mol/L}$), 下侧加入平衡盐溶液, 缺氧孵育 10 h。取出培养板, 倒掉上清液, 用 D-Hanks 洗 2 遍, Transwell 套筒上侧加入 1 mg/mL FITC-葡聚糖, 下侧加入 1.5 mL 平衡盐溶液, 4 h 后分别取上下 2 侧液体各 $100 \mu\text{L}$, 加入到 96 孔板, 酶标仪检测, 激发波长为 494 nm , 发射波长为 520 nm , 计算血脑屏障通透率。

血脑屏障通透率 = 下侧荧光值 / 上侧荧光值

2.3 RT-PCR 法检测 ZO-1、claudin-1 基因表达

将传代的 BMEC 调整至 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$, 接种于 6 孔培养板中, 培养至细胞 80% 融合。实验分为对照组, 缺氧组, 千叶素 A 0.1 、 1.0 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 组。在千叶素 A 作用细胞 10 h 后, 各组用 Trizol 提取细胞总 RNA, 按 Two-Step RT-PCR 试剂盒说明书反转录合成 cDNA。反转录体系 ($20 \mu\text{L}$): $10 \times \text{RT Mix}$ $2 \mu\text{L}$, Super Pure dNTP $2 \mu\text{L}$, Oligo (dT)₁₅ $2 \mu\text{L}$, Quant 逆转录酶 $1 \mu\text{L}$, 总 RNA 按实际的量加入 200 ng , 用无 RNase 酶水补足至 $20 \mu\text{L}$, 混匀。反转录条件: 37°C , 60 min。PCR 反应体系 ($25 \mu\text{L}$): $2 \times \text{SuperReal PreMix}$ $12.5 \mu\text{L}$, 正反相引物 ($10 \mu\text{mol/L}$) 各 $0.75 \mu\text{L}$, cDNA 模板 $2 \mu\text{L}$, $50 \times \text{ROX Reference Dye}$ $0.5 \mu\text{L}$, 无 RNase 酶水 $8.5 \mu\text{L}$, 混匀。 β -actin 引物 (138 bp) 序列: 正向引物 $5'$ -AGAGGGAAATCGTGC- $3'$, 反向引物 $5'$ -CGATAGTGATGACCT- $3'$; ZO-1 引物 (64 bp) 序列: 正向引物 $5'$ -GAGCTACGCTTGCCACACTGT- $3'$, 反向引物 $5'$ -TCGGATCTCCAGGAGACACTT- $3'$; Claudin-1 引物 (202 bp) 序列: 正

向引物 5'-AGGTCTGGCGACATTAGTGG-3', 反向引物 5'-TGGTGTTGGGTAAGAGGTTG-3'。反应条件: 95 °C、预变性 15 min; 95 °C、10 s; 60 °C、32 s; 循环 40 次。反应结束后自动生成溶解曲线, 结果以 Ct 值表示, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[7]对目的基因进行相对定量分析。

2.4 Cell-Based ELISA 法检测 ZO-1 蛋白表达

将传代的 BMEC 调整至 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$, 种植于 96 孔培养板中, 培养至细胞 80% 融合。实验分为对照组、缺氧组、千叶素 A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组。在千叶素 A 作用 10 h 后, 各组倒掉细胞上清液, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次, 加入 0.6% H_2O_2 淬灭 20 min, PBS 洗 3 次, 加 10% FBS 封闭 1 h, 倒掉封闭液, 加入 ZO-1 抗体 50 μL (1:300), 37 °C 放置 2 h, PBS 洗 3 次, 加入生物素标记免疫球蛋白 G (IgG), 室温放置 1 h, PBS 洗 3 次, 加入 50 μL 显色剂, 避光室温放置 15 min, 加入 50 μL 终止液终止反应, 酶标仪检测 450 nm 处吸光度 (A) 值。

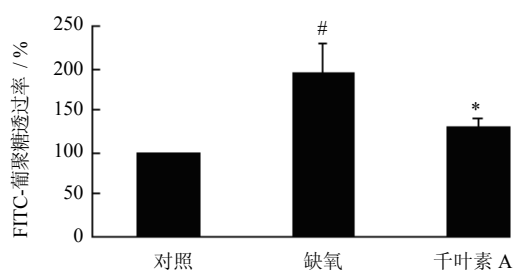
2.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件包进行分析, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 BMEC 缺氧损伤下血脑屏障通透性的影响

BMEC 缺氧损伤后, 与对照组比较, 缺氧组 BMEC 的 FITC-葡聚糖荧光强度明显增强 ($P < 0.05$), 表明血脑屏障通透性增大。与模型组相比, 千叶素 A 能明显拮抗血脑屏障通透性增大 ($P < 0.05$)。结果见图 1。



与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与缺氧组比较: ^{*} $P < 0.05$

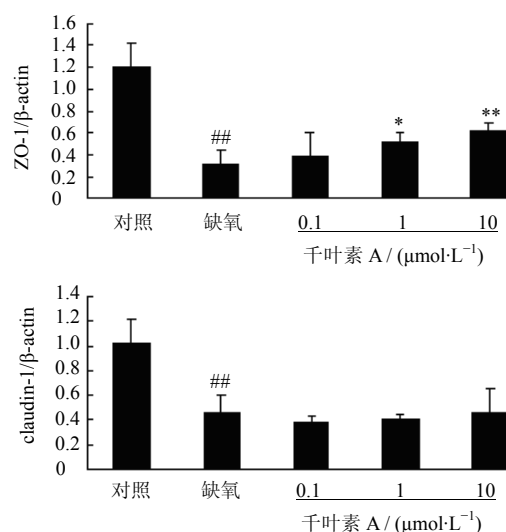
[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs hypoxia group

图 1 千叶素 A 对 BMEC 缺氧损伤下血脑屏障通透性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effect of oroxynlin A on BBB permeability in hypoxic injury of BMEC ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 对 BMEC 缺氧损伤下 ZO-1、claudon-1 基因表达的影响

BMEC 缺氧损伤后, 与对照组比较, 缺氧组 ZO-1、claudon-1 基因表达显著降低 ($P < 0.01$)。与缺氧组相比, 千叶素 A 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 组均可上调 ZO-1 基因表达, 其中 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 组的作用更为显著 ($P < 0.05$ 、0.01), 但千叶素 A 各浓度组对 claudon-1 基因表达无明显影响。结果见图 2。



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$

与缺氧组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下图同

^{##} $P < 0.01$ vs control group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs hypoxia group, same as below

图 2 千叶素 A 对 BMEC 缺氧损伤下 ZO-1、claudin-1 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of oroxynlin A on mRNA expression of ZO-1 and claudin-1 in hypoxic injury of BMEC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 对 BMEC 缺氧损伤下 ZO-1 蛋白表达的影响

BMEC 缺氧损伤后, 与对照组比较, 缺氧组 ZO-1 蛋白表达明显减弱 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 千叶素 A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组能明显增强 ZO-1 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。结果见图 3。

4 讨论

BMEC 是血脑屏障形成的主要结构, 它们之间形成的紧密连接是血脑屏障的主要物质基础^[8]。紧密连接蛋白表达量的改变、位置分布的变化或结构功能的异常均可能破坏 BMEC 紧密连接的完整性, 引起细胞间连接的开放, 导致血脑屏障通透性的改变^[9]。ZO-1 是紧密连接蛋白复合体中非常重要的结构蛋白, 在维持上皮细胞极性、细胞骨架的形成和

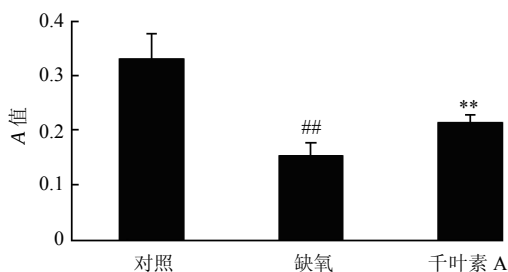


图3 千叶素A对BMEC缺氧损伤下ZO-1蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effect of oroxylin A on protein expression of ZO-1 in hypoxic injury of BMEC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

构成紧密连接中均起到重要作用^[10-11], ZO-1 缺失会导致紧密连接结构的破坏^[12]。本实验利用原代培养大鼠 BMEC 建立体外血脑屏障模型, 缺氧诱导损伤, 考察千叶素 A 对缺氧损伤下血脑屏障通透性的影响及其可能调控机制, 结果表明, 千叶素 A 能使 ZO-1 蛋白基因和蛋白表达上调, 抑制缺氧造成的血脑屏障通透性增高, 维持血脑屏障稳定性, 作用机制与其影响 ZO-1 蛋白的表达有关。

Claudin-1 是构成内皮细胞紧密连接的骨架蛋白, 参与维持紧密连接特有的栅栏功能和屏障功能, 是形成紧密连接超微结构、决定紧密连接屏障特性和离子通透性的主要元件和紧密连接形成的必要条件^[13]。在很多神经系统疾病中, claudin-1 表达下降已被证明与血管通透性增加密切相关^[14]。然而本实验发现, 千叶素 A 对 BMEC 缺氧损伤下的 claudin-1 基因表达无明显影响, 可能是千叶素 A 仅对内皮细胞间紧密连接蛋白有影响, 而对骨架蛋白的影响不大的缘故, 或者是千叶素 A 作用时间尚短, 不足以对骨架蛋白表达形成影响, 具体原因有待进一步研究。

本实验发现 BMEC 缺氧损伤后, FITC-葡聚糖的通透量明显增加, 细胞中 ZO-1 基因和蛋白表达下降, 而千叶素 A 能部分逆转缺氧造成的上述损伤, 提示其对缺氧诱导的体外血脑屏障通透性增高具有保护作用, 作用机制与其影响血脑屏障紧密连接蛋白 ZO-1 表达有关。这一结果为千叶素 A 神经保护作用的进一步研究提供了实验依据。

参考文献

[1] Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K, et al. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier [J]. *Pharmacol Rep*. 2008, 60(5): 600-622.
[2] Yeh W L, Lu D Y, Lin C J, et al. Inhibition of Hypoxia-Induced Increase of Blood-Brain Barrier Permeability by

YC-1 through the Antagonism of HIF-1 α Accumulation and VEGF Expression [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 72(2): 440-449.
[3] Go W J, Ryu J H, Qiang F, et al. Evaluation of the flavonoid oroxylin A as an inhibitor of P-glycoprotein-mediated cellular efflux [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(9): 1616-1619.
[4] Hu Y, Yang Y, You Q D, et al. Oroxylin A induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was involved in its antitumor activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(2): 521-527.
[5] Chen Y, Yang L, Lee T J. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(11): 1445-1457.
[6] 郭虹, 康立源, 柴丽娟, 等. 灯盏细辛总咖啡酸酯对 TNF- α 诱导脑微血管内皮细胞 ICAM-1 表达的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2009, 36(9): 1554-1556.
[7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PRC and the 2-DDCT method [J]. *Method*, 2001, 25(4): 402-408.
[8] Emerich D F, Dean R L, Marsh J, et al. Intravenous seere Port (RMP-7) enhances delivery of hydro Philiechemo therapeutics and increases survival in rats with metastatic tumor in the brain [J]. *Pharm Res*, 2000, 17(10): 1212-1219.
[9] Liu W Y, Wang Z B, Zhang L C, et al. Tight junction in blood-brain barrier: an overview of structure, regulation, and regulator substances [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(8): 609-615.
[10] Jiao H, Wang Z, Liu Y, et al. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult [J]. *J Mol Neurosci*, 2011, 44(2): 130-139.
[11] Mark W M, Margaret M W, Eugene B C. Roles of ZO-1, occluding and actin in oxidant-induced barrier disruption [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(2): 222-231.
[12] Yu H, Wang P, An P, et al. Recombinant human angiopoietin-1 ameliorates the expressions of ZO-1, occludin, VE-cadherin, and PKC α signaling after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. *J Mol Neurosci*, 2012, 46(1): 236-247.
[13] Pfeiffer F, Schäfer J, Lyck R, et al. Claudin-1 induced sealing of blood-brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Acta Neuropathol*, 2011, 122(5): 601-614.
[14] Zhao H, Zhang Q, Xue Y, et al. Effects of hyperbaric oxygen on the expression of claudins after cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *Exp Brain Res*, 2011, 212(1): 109-117.