

姜黄素对人过氧化物酶体增殖物激活受体 γ_1 激活作用的研究

杨雪梅¹, 邱红梅¹, 田 蜜¹, 李苌青¹, 周岐新¹, 谢 炜², 蒋青松^{1*}

1. 重庆医科大学 药理教研室, 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016

2. 重庆市人民医院 肝胆外科, 重庆 400013

摘要: 目的 测定姜黄素(CUR)与人过氧化物酶体增殖物激活受体 γ_1 (hPPAR γ_1) 的亲力和内在活性, 确定 CUR 是否为 hPPAR γ_1 的天然配体。方法 通过放射性标记配基竞争结合实验和反式激活报告基因分别检测 CUR 与 hPPAR γ_1 的结合活性和功能活性。结果 CUR 与 hPPAR γ_1 结合的半数抑制浓度(IC₅₀)为(8.82±0.74) $\mu\text{mol/L}$, 抑制常数(K_i)为 0.72 $\mu\text{mol/L}$; CUR 对 hPPAR γ_1 的半数有效浓度(EC₅₀)为 7.3 $\mu\text{mol/L}$, 最大活性倍数(E_{max})为 43.3。结论 CUR 不仅能与 hPPAR γ_1 受体结合, 而且能激活 hPPAR γ_1 , 可能是 hPPAR γ_1 的天然配体。

关键词: 姜黄素; 人过氧化物酶体增殖物激活受体 γ_1 ; 天然配体; 亲和力; 放射性标记配基竞争结合实验; 反式激活报告基因

中图分类号: R285.8 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)15-3122-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.15.017

Receptor activation of curcumin on human peroxisome proliferators-activated receptors γ_1

YANG Xue-mei¹, QIU Hong-mei¹, TIAN Mi¹, LI Chang-qing¹, ZHOU Qi-xin¹, XIE Wei², JIANG Qing-song¹

1. Department of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Hepatobiliary Surgery, Chongqing General Hospital, Chongqing 400013, China

Abstract: **Objective** To determine whether curcumin is a natural ligand for human peroxisome proliferators-activated receptors γ_1 (hPPAR γ_1) by measuring the combination ability and internal activity. **Methods** The combination ability was determined by radioactively labeled ligand binding experiment (RBCA), and the internal activity was estimated by trans-activation reporter gene test. **Results** The combination ability of curcumin on hPPAR γ_1 showed that IC₅₀ was (8.82 ± 0.74) $\mu\text{mol/L}$, and K_i was 0.72 $\mu\text{mol/L}$. The internal activity showed that EC₅₀ was 7.3 $\mu\text{mol/L}$ and E_{max} was 43.3. **Conclusion** Curcumin has affinity and intrinsic activity with hPPAR γ_1 , which suggests that curcumin may be a natural ligand of hPPAR γ_1 .

Key words: curcumin; human peroxisome proliferators-activated receptors γ_1 ; natural ligand; affinity; radioactively labeled ligand binding experiment; trans-activation reporter gene

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors γ , PPAR γ) 是 PPARs 受体 3 个亚型之一^[1], 在体内糖代谢、脂质平衡、炎症反应等方面具有重要调控作用。姜黄素(curcumin, CUR)是姜科植物郁金、姜黄、莪术及天南星科植物石菖蒲根茎中的主要成分, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗血管生成、免疫调节等多种与 PPAR γ 激活剂相似的药理活性^[2]。大量研究也发现, CUR 的效应与其激活 PPAR γ 表达, 从而调控相关下游通路的作用有关^[3],

提示 CUR 可能是 PPAR γ 的天然配体, 但国内外未见 CUR 与 PPAR γ 受体相互作用直接检测的报道。

根据启动子和拼接方式的不同, PPAR γ 可分为 γ_1 、 γ_2 、 γ_3 和 γ_4 亚型, 各亚型组织学分布不同。与其他 PPARs 受体一样, PPAR γ 的结构也分为 A/B、C、D 和 E/F 区, 其中 C 区为 DNA 结合区 (DNA binding domain, DBD), D 区为铰链区, E/F 区含配体结合区 (ligand binding domain, LBD) 和激活功能区-2 (activation function-2 domain, AF-2) (图 1)^[4-5]。DBD

收稿日期: 2017-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572353); 重庆市医学科研计划项目 (2013-2-116)

作者简介: 杨雪梅 (1992—), 女, 在读硕士, 研究方向为分子药理学。Tel: (023)68485616 E-mail: 1060729934@qq.com

*通信作者 蒋青松 (1972—), 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为分子药理学。Tel: (023)68485161 E-mail: cqjiangqs@163.com

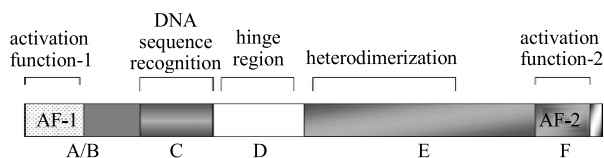


图 1 PPAR γ 结构示意图

Fig. 1 Structure of PPAR γ

和 LBD 分别决定着 DNA 序列和配体的特异性, AF-2 调控配体依赖性受体的激活, 各个分区能独立地发挥作用^[5]。PPAR γ 的 4 种亚型具有相同的 DBD 和 LBD, 其功能相同。其中, PPAR γ_1 是最主要的亚型^[6]。

本研究拟利用放射性标记配体竞争结合实验 (radioligand binding competition assays, RBCA) 探究 CUR 与 hPPAR γ_1 的结合能力 (即亲和力); 同时利用反式激活报告基因方法检测 CUR 对 hPPAR γ_1 的激活能力 (即内在活性), 以确定 CUR 是否为 PPAR γ_1 的天然配体, 为 CUR 的相关临床应用及进一步研发提供基础理论依据。

1 材料

1.1 药品和试剂

CUR (HPLC, 质量分数 $\geq 98\%$, 橙黄色结晶粉末) 购自中国食品药品检定研究院; 非诺贝特 (Fenofibrate, FEN, 质量分数 $\geq 98\%$, 目录号 10005368)、罗格列酮 (Rosiglitazone, ROS, 质量分数 $\geq 98\%$, 目录号 71740) 均为 Cayman 公司产品。 ^3H -ROS (9.25 MBq, 1 776 GBq/mmol) 为 ARS 产品; 闪烁液购自 Perkin Elmer 公司; 淬灭标准源为 Beckman 公司产品; 麦芽糖结合蛋白 (Maltose binding protein, MBP) 标签的 hPPAR γ_1 LBD 融合蛋白 (MBP-hPPAR γ_1 -LBD) 由重庆医科大学田蜜硕士提供^[7]; p hPPARs-IRES2-EGFP 和 p IRES2-EGFP 由重庆医科大学章涛博士构建; p TK-PPRE $\times 3$ -Luc 由美国芝加哥大学 TC He 教授惠赠; p RL-tk 购自 Promega 公司; DMEM 高糖培养基和胎牛血清 (FBS) 为 Gibco BRL 公司产品; LIPOFECTAMINE 2000 为 Invitrogen 产品; 双荧光素酶报告基因检测系统购自 Promega 公司; 无内毒素质粒中量提取试剂盒购自 Omega 公司; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 细胞

E. coli JM109 由川北医学院药物研究所提供; 非洲绿猴肾细胞 (CV-1, ATCCCL 70) 购自上海中国科学院细胞库。

1.3 主要仪器

液闪仪 LS1801 (Beckman); 高速冷冻离心机

(Eppendorf 5810R); 荧光倒置显微镜 (OLYMPUS); CO₂ 培养箱 (Beijing DSA Instrument Co., Ltd.); Gloma 20/20 发光计数器 (Promega 2030-101)。

2 方法

2.1 RBCA 法测定 CUR 与 hPPAR γ_1 配体结合能力^[8]

2.1.1 放射性标记 ^3H -ROS 的饱和结合实验 反应总体积 0.3 mL, 含反应缓冲液 (50 mmol/L KCl、10 mmol/L Tris、10 mmol/L 二硫苏糖醇, pH 8.4)、50 μL 融合蛋白液 (含 40 μg MBP-hPPAR γ_1 -LBD 蛋白), ^3H -ROS (10~1 000 nmol/L, 8 个不同浓度)、不含 [测定总结合量 (TB)] 或含 20 $\mu\text{mol/L}$ 非放射性标记的 ROS [测定非特异性结合量 (NB)]。反应混合液置 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min, 然后冰浴 5 min, 加入 5 mL 冷 PBS 终止反应。将反应混合液迅速真空抽滤到玻璃纤维滤膜上 (预先用 10 mL 含 10 mmol/L 非标记配基 ROS 的冷 PBS 洗涤), 用 5 mL 冷 PBS 洗涤 3 次。取下滤膜 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 40 min, 移至 5 mL 闪烁剂内, 暗适应 12 h, 于液闪仪上测其每分钟计数 (cpm)。根据 H-Number Plus 淬灭校正曲线计算样品的计数效率, 将 cpm 换算为每分钟衰变次数 (disintegration per minute, dpm)。特异性结合量 (SB) 为 TB 减去 NB。通过 Scatchard 作图, 求 ^3H -ROS 与 MBP-hPPAR γ_1 -LBD 结合的平衡解离常数 (K_d) 和最大结合容量 ($B_{\max}$)。

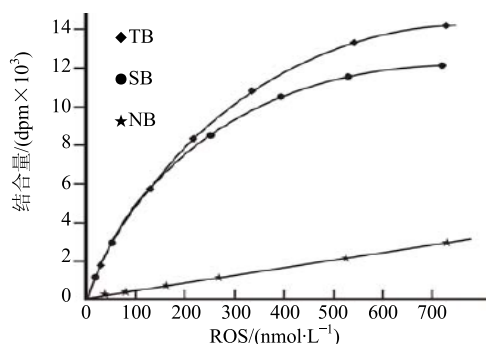
2.1.2 CUR 竞争结合实验 反应总体积 0.3 mL, 含反应缓冲液 (同“2.1.1”项)、1 $\mu\text{mol/L}$ ^3H -ROS、50 μL 融合蛋白液, 不含 (测定 dpm_{总结合管}) 或含 20 $\mu\text{mol/L}$ 非放射性标记的 ROS (测定 dpm_{非特异性结合管}), 或含不同待测药物 (测定 dpm_{竞争结合管}, 分别为阴性对照 FEN、阳性对照 ROS、待测药物 CUR, 浓度均为 2、4、6、8、10、12 $\mu\text{mol/L}$), 分别计算 FEN、ROS 及 CUR 的特异性结合抑制率 $[\text{IR} = (\text{dpm}_{\text{总结合管}} - \text{dpm}_{\text{竞争结合管}}) / (\text{dpm}_{\text{总结合管}} - \text{dpm}_{\text{非特异性结合管}})]$ 。然后以药物浓度为横坐标, IR 为纵坐标, 作图得到竞争曲线, 线性回归求得各药物的半数抑制浓度 (IC_{50}); 利用公式计算 CUR 的抑制常数 K_i 值 $[K_i = \text{IC}_{50} / (1 + L/K_d)]$, 其中 K_d 为放射性配体 ^3H -ROS 的平衡解离常数, L 为竞争结合实验中放射性配体的浓度]。

2.2 反式激活报道基因实验检测 CUR 的功能活性

2.2.1 质粒共转染细胞 用 50 μL 无血清培养基稀释 1~3 μL LIPOFECTAMINE 2000 试剂, 5 min 内与预先稀释的 DNA 混合 [用 50 μL 无血清培养基稀释的 DNA 0.9 μg (包含 0.4 μg p hPPARs-IRES2-

EGFP 或 p IRES2-EGFP, 0.4 μg p TK-PPRE $\times$ 3-Luc, 0.1 μg p RL-tk], 室温 20 min, 形成 DNA-LF2000 复合物。同时, 取生长良好的非洲绿猴肾 CV-1 细胞, 按 1.5×10^5 /孔的比例接种于 24 孔板, 加入 0.5 mL 无血清培养基。将 DNA-LF2000 复合物加入培养孔中与培养基均匀混合。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 4 h 后更换为含 10% FBS 的培养基, 分别加入 FEN、ROS、CUR (0.1~100 $\mu\text{mol/L}$, 8 个浓度), 进行量效关系的研究, 计算各药物半数有效浓度 (EC_{50})。

2.2.2 检测目的基因的表达 移去培养基, 用 PBS 清洗细胞。每孔加入被动裂解液 (PLB), 室温轻摇 15 min 裂解细胞。取 100 μL 荧光素酶检测试剂 II 加入发光计测定管。加入 20 μL 细胞裂解液, 吸混均匀, 加入 100 μL Stop&Glo 试剂颠倒混匀, 检测相对发光单位 (relative light unit, RLU)。利用内对照排除非特异性生物学反应, 作对照归一实验, 计算 RLU 比率, 即 F/R ($F/R = \text{RLU}_{\text{萤火虫荧光素酶活性}} / \text{RLU}_{\text{海肾荧光素酶活性}}$); 以未加药的测定结果为对照, 计算各药物的活性倍数 [活性倍数 = $(F/R_{\text{样品}}) / (F/R_{\text{对照}})$]。



以各药物的最大活性倍数 (E_{max}) 为指标比较不同药物 ROS、CUR 和 FEN 目的报告基因的激活程度。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 t 检验进行方差分析。

3 结果

3.1 CUR 与 hPPAR γ_1 的亲合力

ROS 为 hPPAR γ_1 的特异性结合配体, ^3H -ROS 与 MBP-hPPAR γ_1 -LBD 结合的 K_d 值为 89 nmol/L, B_{max} 为 32 pmol/mg (图 2)。

RBCA 法测得 ROS 的 IC_{50} 为 4.30 $\mu\text{mol/L}$, 而 FEN 的 $\text{IC}_{50} > 15 \mu\text{mol/L}$, 可判断 ROS 为 hPPAR γ_1 配体, 而 FEN 不是, 与预期结果相符 (图 3)。CUR 与 hPPAR γ_1 结合的 IC_{50} 值为 $(8.82 \pm 0.74) \mu\text{mol/L}$, 小于 15 $\mu\text{mol/L}$, 故可以确定 CUR 为 hPPAR γ_1 配体, CUR 的 IC_{50} 值大于 ROS 的 IC_{50} 值, 即抑制 50% ^3H -ROS 所需要的浓度大于 ROS, 因此 CUR 的亲合力小于 ROS。依据公式计算, 得 CUR 抑制 hPPAR γ_1 结合 ^3H -ROS 的 $K_i = 0.72 \mu\text{mol/L}$ 。

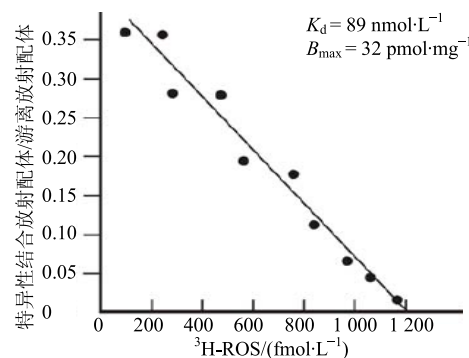


图 2 ^3H -ROS 与 MBP-hPPAR γ_1 -LBD 的饱和结合曲线和 Scatchard 作图

Fig. 2 Combination curves of ^3H -ROS and MBP-hPPAR γ_1 -LBD and Scatchard analysis

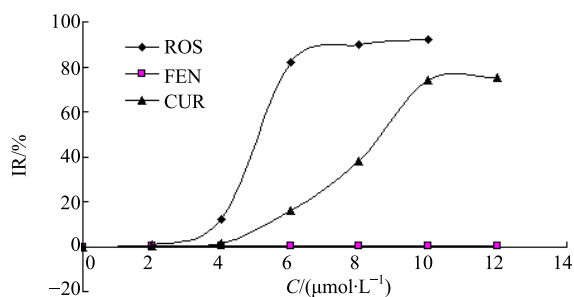


图 3 ROS、FEN、CUR 与 ^3H -ROS 对 hPPAR γ_1 的竞争性结合实验结果

Fig. 3 Competitively binding assay from ROS, FEN, and CUR with ^3H -ROS to hPPAR γ_1

3.2 CUR 对 hPPAR γ_1 的激活作用

CUR、ROS 及 FEN 对 hPPAR γ_1 激动作用的量效关系见图 4。ROS 的 EC_{50} 为 2.5 $\mu\text{mol/L}$, E_{max} 为 123.0; CUR 的 EC_{50} 为 7.3 $\mu\text{mol/L}$, E_{max} 为 43.3; FEN 对 hPPAR γ_1 没有激动作用。

4 讨论

PPARs 是一种配体激活的核转录因子, 与相应配体结合后, PPARs 与维甲酸受体 (RXR) 形成二聚体结合到过氧化物酶体增殖物反应元件 (PPREs), 启动下游基因的转录和翻译^[9]。PPARs 的作用涵盖了众多的生理和病理生理学过程, 包括细胞增殖和凋亡、细胞免疫、创伤愈合、能量代谢

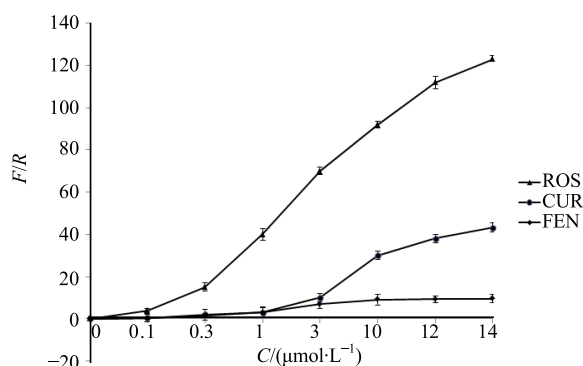


图 4 CUR、FEN、ROS 对 hPPAR γ_1 激活作用的量效曲线
Fig. 4 Concentration-activity curves of CUR, FEN, and ROS with hPPAR γ_1

等^[10]。其中 PPAR γ 参与了 2 型糖尿病、动脉粥样硬化、血脂调节等多种生理及病理过程,是治疗许多疾病的共同靶点,其配体的筛选和应用是目前研究的热点。但遗憾的是,现今用于临床的选择性 PPAR γ 激动剂仅有噻唑烷酮类,可增加胰岛素敏感性和葡萄糖耐受性,调控体内血糖的平衡,用于 2 型糖尿病的治疗^[11]。但体重增加、心肌梗死^[12]等不良反应限制了其使用。因此,寻找低毒高效的 PPAR γ 天然配体,具有重要临床意义。

CUR 很早就用于食品工业中,现被广泛用作天然色素、调味剂、香料以及防腐剂,已被世界卫生组织 (WHO) 和食品药品监督管理局 (FDA) 批准为天然食品添加剂^[13]。大量的研究表明, CUR 的药理作用与其对 PPAR γ 的作用密切相关。在高糖、高胰岛素诱导的心肌肥大中, CUR 可以激活 PPAR γ , 调控下游 PI3K/AKT, 引起 PI3K 和 AKT 及 eNOS 活化, 对高糖、高胰岛素诱导的心肌肥厚产生保护作用^[14]。CUR 改善由 β 淀粉样蛋白导致的星型胶质细胞炎症反应也与其上调 PPAR γ 有关^[15]。刘尊敬等^[16]利用 PPAR γ 表达质粒和报告质粒共转染 U937 细胞构建的 PPAR γ 激动剂细胞筛选模型也证实, CUR 可能是 PPAR γ 受体的激活剂, 但始终缺乏直接依据。作为 PPAR γ 受体的天然配体, CUR 首先应具有与 PPAR γ 受体结合的能力, 即亲和力 (以 IC₅₀ 表示); 其次还必须具有激活 PPAR γ 受体的能力, 即内在活性 (以 EC₅₀ 和 E_{max} 表示)。

RBCA 法是将待筛选的药物与已结合于受体的放射性标记配体竞争, 然后用快速抽滤、离心沉淀等方法分离未与受体结合的放射性配体, 检测同位素信号的变化, 计算竞争结合反应的动力学参数。

RBCA 法具有高灵敏度、受体识别特异性高、假阳性和假阴性少、快速、方便、重复性好等特点, 但也存在放射性环境污染和健康危害等问题^[17]。反式激活报告基因法是目前测试 PPARs 配体功能活性较为适宜的方法。本研究利用 RBCA 法检测显示, ROS 和 CUR 的 IC₅₀ 分别为 4.30 μ mol/L 和 8.82 μ mol/L, 均小于 15 μ mol/L, 提示 CUR 可能与 ROS 一样, 均为 hPPAR γ_1 的配体, 具有与 PPAR γ 结合的能力。同时, 反式激活报告基因测定结果显示, ROS 的 EC₅₀ 为 2.5 μ mol/L, E_{max} 为 123.0; CUR 的 EC₅₀ 为 7.3 μ mol/L, E_{max} 为 43.3, 提示 CUR 可能也具有激活 hPPAR γ_1 的能力。鉴于在反式激活报告基因实验中, 无法进行 CUR 对 ROS 剂量效应曲线影响的研究, 因此, 不能准确确定 CUR 为 hPPAR γ_1 的完全激动剂还是部分激动剂。由于实验中 ROS 的 E_{max} 远远大于 CUR (123.0 : 43.3), CUR 极可能是 hPPAR γ_1 的部分激动剂。

综上所述, CUR 不仅具有与 PPAR γ 结合的活性, 也具有激活 PPAR γ 的功能活性, 即既有亲和力, 又有内在活性, 符合作为受体的配体的条件, 结合目前药物效应动力学研究相关文献^[14-15, 18], 故推测 CUR 可能是 PPAR γ 的天然配体。但 CUR 的亲和力和内在活性作用均弱于 ROS。值得注意的是, CUR 的化学结构中并不具有目前常用的 PPAR γ 的特异性激动剂噻唑烷酮类相同或相似的母核^[19]。本研究结果为 PPAR γ 激动剂的研发提供了新的视角, 也为 CUR 的临床应用提供了基础药理学依据。但本研究仅针对 PPAR γ 最主要的亚型 PPAR γ_1 进行了研究, 而对于 CUR 与 PPAR γ 的其他亚型以及 PPAR α 、PPAR β 是否也具有激活作用, 尚需进行更多深入研究。

参考文献

- [1] Kadivar A, Heidari Khoei H, Hassanpour H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α , PPAR γ and PPAR β/δ) gene expression profile on ram spermatozoa and their relation to the sperm motility [J]. *Vet Res Forum*, 2016, 7(1): 27-34.
- [2] Shome S, Talukdar A D, Choudhury M D, et al. Curcumin as potential therapeutic natural product: a nanobiotechnological perspective [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 68(12): 1481-1500.
- [3] Mazidi M, Karimi E, Ferns G A, et al. Potential effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor- γ in vitro and in vivo [J]. *World J Methodol*, 2016, 6(1): 112-117.

- [4] Olivares A M, Moreno-Ramos O A, Haider N B, *et al.* Role of nuclear receptors in central nervous system development and associated diseases [J]. *J Exp Neurosci*, 2015, 9(2): 93-121.
- [5] Blanquart C, Barbier O, Fruchart J C, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 85(2/5): 267-273.
- [6] Li D, Zhang F, Namwanje M, *et al.* Distinct functions of PPAR γ isoforms in regulating adipocyte plasticity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 481(1/2): 132-138.
- [7] 田蜜, 李菡清, 周岐新, 等. 人 PPAR γ_1 LBD 融合蛋白表达质粒的构建和诱导条件优化 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(9): 1254-1257.
- [8] 张均田. 现代药理实验方法 [M]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1997.
- [9] Laganà A S, Vitale S G, Nigro A, *et al.* Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in dysregulated metabolic homeostasis, inflammation and cancer: current evidence and future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, doi:10.3390/ijms17070999.
- [10] Yu F Q, Li P W, Zhang J J, *et al.* Association between peroxisome proliferator-activated receptor- α , δ , and γ polymorphisms and risk of coronary heart disease [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(32): e4299.
- [11] Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications-a review [J]. *Nutr J*, 2014, doi: 10.1186/1475-2891-13-17.
- [12] Alemán-González-Duhart D, Tamay-Cach F, Álvarez-Almazán S, *et al.* Current advances in the biochemical and physiological aspects of the treatment of type 2 diabetes mellitus with thiazolidinediones [J]. *PPAR Res*, 2016, doi: 10.1155/2016/7614270.
- [13] 刘兆金, 黄瑞林, 印遇龙, 等. 姜黄素营养生理作用综述 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(7): 1287-1288.
- [14] Chen R, Peng X, Du W, *et al.* Curcumin attenuates cardiomyocyte hypertrophy induced by high glucose and insulin via the PPAR γ /Akt/NO signaling pathway [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2015, 108(2): 235-242.
- [15] Wang H M, Zhao Y X, Zhang S, *et al.* PPAR gamma agonist curcumin reduces the amyloid-beta-stimulated inflammatory responses in primary astrocytes [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 20(4): 1189-1199.
- [16] 刘尊敬, 鲍秀琪, 田朝晖, 等. PPAR γ 激动剂筛选细胞模型的构建及验证姜黄素为 PPAR γ 天然激动剂的研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2011, 28(10): 872-874.
- [17] de Jong L A, Uges D R, Franke J P, *et al.* Receptor-ligand binding assays: technologies and applications [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 829(1/2): 1-25.
- [18] Lv F H, Yin H L, He Y Q, *et al.* Effects of curcumin on the apoptosis of cardiomyocytes and the expression of NF- κ B, PPAR- γ and Bcl-2 in rats with myocardial infarction injury [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6): 3877-3884.
- [19] Bajare S, Anthony J, Nair A, *et al.* Synthesis of *N*-(5-chloro-6-(quinolin-3-yl)oxy) pyridin-3-yl) benzenesulfonamide derivatives as non-TZD peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonist [J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 58: 355-360.
- (上接第 3121 页)
- proteins, claudin-5, occludin, and ZO-1, following traumatic brain injury in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(3): 881-886.
- [9] 周亚军, 赵玉武, 刘帮健, 等. 糖尿病大鼠血-脊髓屏障紧密连接蛋白 claudin-1、claudin-5、ZO-1 表达变化 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2010, 17(6): 439-442.
- [10] Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, TGF β signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy [J]. *Glia*, 2012, 60(8): 1251-1257.
- [11] Friedman A, Kaufer D, Heinemann U. Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2009, 85(2/3): 142-149.
- [12] Shi L Z, Li G J, Wang S, *et al.* Use of Z310 cells as an *in vitro* blood-cerebrospinal fluid barrier model: tight junction proteins and transport properties [J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22(1): 190-199.
- [13] Najjar S, Pearlman D M, Devinsky O, *et al.* Neurovascular unit dysfunction with blood-brain barrier hyperpermeability contributes to major depressive disorder: a review of clinical and experimental evidence [J]. *J Neuroinflamm*, 2013, 10(1): 142-146.
- [14] Patrick T, Ronaldson, Thomas P D. Blood-brain barrier integrity and glial support: Mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(25): 3624-3644.