

川芎调节血脑屏障通透性的作用及机制研究

刘明妍^{1,2}, 刘力榕^{1,2}, 冯梦晗^{1,2}, 朱美霞^{1,2}, 张银环^{1,2}, 闫晓宁^{1,2}, 方 聪^{1,2}, 屈碧琼^{1,2}, 贾志鑫^{2,3}, 刘 洁^{2,3}, 肖红斌^{2,3*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102400

2. 北京中医药大学 中药分析与转化研究中心, 北京 102400

3. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 102400

摘要: **目的** 探讨川芎 *Chuanxiong Rhizoma* 调节血脑屏障通透性的作用特点, 并从紧密连接蛋白、外排蛋白表达、埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白 (ezrin/radixin/mesin, ERM) 磷酸化水平变化的角度阐述影响血脑屏障通透性的机制。**方法** 小鼠单次给予川芎提取物(5.8 g/kg)后 iv 不同相对分子质量(4×10^3 、 4×10^4 、 7×10^4 、 1.5×10^5)的异硫氰酸荧光素-葡聚糖(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran), 测定给药后 0、0.5、1、2、4、6、8 h 脑组织中 FITC-dextran 的荧光强度, 定量描述川芎对体内血脑屏障通透性的影响。建立 bEnd.3 细胞单培养血脑屏障模型, 给予川芎单体成分洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 H、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯、欧当归内酯 A、4-羟基-3-丁基苯酚, 比较相同作用时间内血脑屏障模型中荧光素钠(fluorescein sodium, Na-F)的表观渗透系数(apparent permeability coefficient, P_{app}), 确定各成分开放血脑屏障的效应。采用 Western blotting 检测川芎提取物给药前后小鼠脑组织及洋川芎内酯 I 给药 bEnd.3 细胞中闭锁小带蛋白 1(zonula occluden-1, ZO-1)、闭锁蛋白(Occludin)、P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、血管内皮细胞钙黏合素(VE-cadherin)、p-ERM/ERM 的表达水平。**结果** 川芎提取物给药 0.5 h 后可显著增加小鼠脑组织中 FITC-dextran (相对分子质量 4×10^3) 的透过量($P < 0.001$), 作用强度随给药时间延长减弱, 但对相对分子质量 4×10^4 、 7×10^4 、 1.5×10^5 的 FITC-dextran 透过量无影响。在脑组织中, 川芎提取物给药 0.5 h 时下调 ZO-1、Occludin 蛋白表达($P < 0.05$), 上调 P-gp 蛋白表达; 给药 2 h 时上调 ZO-1、Occludin 蛋白表达($P < 0.05$ 、 0.01), 下调 P-gp 蛋白表达($P < 0.01$); 给药 8 h 时, ZO-1、Occludin、P-gp 的蛋白表达水平与对照组无明显差异。不同浓度(1、10、100 $\mu\text{mol/L}$)的洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 H、阿魏酸 8 h 给药时间内显著增加 Na-F 透过血脑屏障模型的 P_{app} , 其中洋川芎内酯 I 的促透效应最强。洋川芎内酯 I (10 $\mu\text{mol/L}$) 给药 bEnd.3 细胞 0.5 h 时可下调 Occludin、ZO-1、p-ERM/ERM 的蛋白表达($P < 0.01$), 给药 1 h 时上调 Occludin、ZO-1、p-ERM/ERM 的蛋白表达($P < 0.01$), 给药 8 h 时 Occludin、ZO-1、p-ERM/ERM 的蛋白表达水平与对照组无明显差异。**结论** 川芎在一定程度上可增加血脑屏障通透性, 且该作用具有时效性, 其机制与调节 Occludin、ZO-1、P-gp 的蛋白表达及 ERM 磷酸化水平有关。

关键词: 川芎; 血脑屏障通透性; 闭锁蛋白; 闭锁小带蛋白 1; P-糖蛋白; 埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白; 洋川芎内酯 A; 洋川芎内酯 H; 阿魏酸; 洋川芎内酯 I; 藁本内酯; 欧当归内酯 A; 4-羟基-3-丁基苯酚

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)01-0138-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.015

Effect and mechanism of *Chuanxiong Rhizoma* on permeability of blood-brain barrier

LIU Mingyan^{1,2}, LIU Lirong^{1,2}, FENG Menghan^{1,2}, ZHU Meixia^{1,2}, ZHANG Yinhan^{1,2}, YAN Xiaoning^{1,2}, FANG Cong^{1,2}, QU Biqiong^{1,2}, JIA Zhixin^{2,3}, LIU Jie^{2,3}, XIAO Hongbin^{1,2,3}

1. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China

2. Research Center for Chinese Medicine Analysis and Transformation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China

3. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China

收稿日期: 2023-10-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81774155); 国家自然科学基金资助项目(82173957)

作者简介: 刘明妍(1996—), 女, 硕士, 研究方向为中药药效物质基础研究。Tel: 18810627605 E-mail: mingyan_0415@163.com

*通信作者: 肖红斌, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药作用物质及机理解析、中药新药开发。Tel: (010)53911883 E-mail: hbxiao69@163.com

Abstract: Objective To explore the effect of Chuanxiong (*Chuanxiong Rhizoma*) on blood-brain barrier permeability, and explain the mechanism of its effect on blood-brain barrier permeability from the point of view of the changes of tight junction protein, efflux protein expression and ezrin/radixin/mesin (ERM) phosphorylation level. **Methods** After a single administration of *Chuanxiong Rhizoma* extract (5.8 g/kg), different molecular weights (4×10^3 , 4×10^4 , 7×10^4 , 1.5×10^5) fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) were injected intravenously, the fluorescence intensity of FITC-dextran in brain tissue was measured at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h after administration, and the effect of *Chuanxiong Rhizoma* on blood-brain barrier permeability *in vivo* was quantitatively described. The blood-brain barrier model was established by single culture of bEnd.3 cells, monomeric components (senkyunolide A, senkyunolide H, ferulic acid, senkyunolide I, ligustilide, levistilide A, 4-hydroxy-3-butylphthalide) in *Chuanxiong Rhizoma* were given, the apparent permeability coefficient (P_{app}) of fluorescein sodium (Na-F) in a blood-brain barrier model for the same duration of action were compared, and the effect of each component on opening the blood-brain barrier was determined. Western blotting was used to detect the expressions of zonula occluden-1 (ZO-1), Occludin, P-glycoprotein (P-gp), VE-cadherin, p-ERM/ERM protein in brain tissue and bEnd.3 cells before and after administration of *Chuanxiong Rhizoma* and its components. **Results** After 0.5 h of administration of *Chuanxiong Rhizoma* extract, it significantly increased the transmittance of FITC-dextran (molecular weight 4×10^3) in brain tissue of mice ($P < 0.001$), and the intensity of action was weakened with prolonged administration time, but had no effect on the transmittance of FITC-dextran (molecular weight of 4×10^4 , 7×10^4 , 1.5×10^5). In brain tissue, after 0.5 h of administration of *Chuanxiong Rhizoma* extract, the expressions of ZO-1 and Occludin protein were downregulated ($P < 0.05$), and the expression of P-gp protein was upregulated; After 2 h of administration, ZO-1 and Occludin protein expressions were upregulated ($P < 0.05$, 0.01), and P-gp protein expression was downregulation ($P < 0.01$); At 8 h of administration, there was no significant difference in the protein expression levels of ZO-1, Occludin, and P-gp compared with control group. Within 8 h administration time of different concentrations (1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$) of senkyunolide I, senkyunolide A, senkyunolide H and ferulic acid, P_{app} of Na-F penetration through the blood-brain barrier model was significantly increased, with senkyunolide I had the strongest promoting effect. bEnd.3 cells were treated with senkyunolide I (10 $\mu\text{mol/L}$) for 0.5 h, the protein expressions of Occludin, ZO-1 and p-ERM/ERM were downregulated ($P < 0.01$), and the protein expressions of Occludin, ZO-1 and p-ERM/ERM were upregulated at 1 h of treatment ($P < 0.01$). At 8 h of treatment, there was no significant difference in the protein expression levels of Occludin, ZO-1 and p-ERM/ERM compared with control group. **Conclusion** *Chuanxiong Rhizoma* can increase the permeability of blood-brain barrier to a limited extent, and the effect is time-dependent, and its mechanism is related to the change of protein expression level of Occludin, ZO-1, P-gp and ERM phosphorylation level. **Key words:** *Chuanxiong Rhizoma*; blood-brain barrier permeability; Occludin; ZO-1; P-glycoprotein; ezrin/radixin/mesin; senkyunolide A; senkyunolide H; ferulic acid; senkyunolide I; ligustilide; levistilide A; 4-hydroxy-3-butylphthalide

血脑屏障存在于哺乳动物脑部结构中, 为神经元功能创造离子稳态^[1], 调节营养物质或代谢物在血液和大脑之间的运输, 保护中枢神经系统免受外来物质的伤害^[2]。相比其他组织屏障, 血脑屏障具有低通透性、高选择性及低胞饮特点, 其对物质运输的严格调控使得药物的脑靶向运输成为难题^[3-4]。适当地调节血脑屏障的通透性是临床中常采用的手段^[5]。

川芎 *Chuanxiong Rhizoma* 是现代临床中治疗头痛的常用中药之一^[6-7]。《医学启源》(金·张元素)记载: “川芎属风药, 能升散, 轻清上达, 充塞头顶, 引药上行至脑, 直达病所^[8]”。一项探析风药对血管性痴呆各种证型治疗效果的研究发现川芎可引他药直达脑络^[9]。研究发现川芎与复方舒郁健脑方配伍可增加酸枣仁皂苷 A 在小鼠脑组织中的蓄积^[10], 与天麻配伍可提高天麻素苷元在脑内的生物利用度^[11]。Zheng 等^[12]进一步发现川芎成分藁本内酯、洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 I 可降低 MDCK-MDR1 细胞单

培养血脑屏障模型的跨细胞内皮电阻值, 增加芍药苷、松果菊苷从顶端侧到基底侧方向上的表观渗透系数。川芎具有引导他药通过血脑屏障上行于头部^[13]的作用, 但目前缺乏具体阐述川芎对血脑屏障通透性的研究数据, 且对体外血脑屏障模型通透性的研究只集中在少数成分(藁本内酯、洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 I)。故本研究考察川芎对血脑屏障通透性的作用及机制, 以期对相关研究提供依据。

1 材料

1.1 动物及细胞系

SPF 级雄性昆明小鼠 118 只, 体质量 19~22 g, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 实验动物使用许可证号 SCXK(京)2020-0033, 饲养于北京中医药大学动物房屏障环境中(伦理批准号 1117052400125), 24 h 光照和黑暗循环, 温度 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, 相对湿度 $(50 \pm 10)\%$, 正常饮食, 自由饮水。

小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3 由北京博奥凯

美科技有限公司提供。

1.2 药品与试剂

川芎饮片(批号 2104040)购自北京太洋树康药业有限责任公司,经北京中医药大学王学勇教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎;对照品洋川芎内酯 I(批号 Y-085-170609)、洋川芎内酯 A(批号 Y-083-200326)、洋川芎内酯 H(批号 Y-084-180408)、藁本内酯(批号 G01001909024)、欧当归内酯 A(批号 O002006004)、阿魏酸(批号 A-002-161216)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司,质量分数>98%;4-羟基-3-丁基苯酐为实验室分离制备得到,经核磁共振波谱与高效液相色谱检测确定质量分数>98%;SDS-PAGE 配胶试剂盒(批号 20200328)购自北京索莱宝科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 9232)、RIPA 裂解液(批号 9116)均购自爱必信(上海)生物科技有限公司;异硫氰酸荧光素-葡聚糖[fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran, 批号 46944(相对分子质量 4×10^3)、批号 FD40S(相对分子质量 4×10^4)、批号 46945(相对分子质量 7×10^4)、批号 46946(相对分子质量 1.5×10^5)]均购自默克西格玛公司;荧光素钠(fluorescein sodium, Na-F, 批号 S19188)购自上海源叶生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒(批号 K001062211)购自北京兰博利德生物科技有限公司;嵌入式细胞培养小室(批号 665640)购自德国格瑞纳公司;闭锁蛋白(Occludin)抗体(批号 27260-1-AP)、闭锁小带蛋白 1(zonula occluden-1, ZO-1)抗体(批号 21773-1-AP)、血管内皮细胞钙黏合素(VE-cadherin)抗体(批号 27956-1-AP)、P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)抗体(批号 22336-1-AP)、 β -actin 抗体(批号 81115-1-RR)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白(ezrin/radixin/mesin, ERM)抗体(批号 DF12396)购自 Affinity Bioscience 公司;p-ERM 抗体(批号 ab76247)购自艾博康(上海)贸易有限公司;HRP 标记的山羊抗鼠/兔二抗(批号 20040/20039)、蛋白酶抑制剂(PMSF, 批号 36978)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;磷酸酶抑制剂混合型(批号 1861281)、甲醇(批号 206403)购自美国赛默飞世尔科技公司;DMEM 高糖培养基(批号 8121451)购自 Invitrogen 公司;胎牛血清(批号 1928700)购自 Biological Industries;胰酶蛋白酶-EDTA 消化液(批号 202011229)购自江苏凯基

生物技术有限公司;人血浆纤连蛋白(批号 F-2006)购自默克西格玛公司;0.05 mol/L Tris-HCl(批号 R00237)购自北京雷根生物技术有限公司。

1.3 仪器

Milli-Q Advantage A10 型纯水仪制备系统、旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社,配备有 N-1300 型旋转支架、OSB-2200 型水浴锅、WELCH 真空泵);Infinite M200Pro 型多功能酶标仪[帝肯(上海)实验器材有限公司];MM400 型珠式样品匀浆仪(上海弗尔德上海仪器设备有限公司);Mini-PROTEAN Tetra Cell and PowerPac Basic Power 垂直电泳系统套装(伯乐生命医学产品有限公司);Amersham Imager 680 型化学发光成像仪[思拓凡生物科技(杭州)有限公司];SQP-PRACTUM224-1CN 型分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);3K15 型高速冷冻离心机(默克西格玛公司);ERS-2 型跨内皮电阻仪(密理博中国有限公司)。

2 方法

2.1 川芎提取物的制备

川芎饮片分别以 12 倍量、10 倍量 95%乙醇加热回流提取 2 次,滤过,滤渣以 10 倍量水加热回流提取 2 次,滤过,合并滤液浓缩,得到质量浓度为 1 g/mL 的川芎提取液。

2.2 川芎提取物含量测定

2.2.1 样品制备 川芎提取物稀释至 1 μ g/mL,0.22 μ m 微孔滤膜滤过,转移至棕色液相小瓶,待测。

2.2.2 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m);流动相 A 为 0.1%乙酸-10 mmol/L 乙酸铵-水溶液,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱,正离子:0~5 min, 80%~60%A;5~6 min, 60%~40%A;6~8 min, 40%~20%A;8~10 min, 20%~5%A;10~12 min, 5%A。负离子:0~3 min, 98%~70%A;3~6 min, 70%~5%A;6~7 min, 5%A。体积流量 0.4 mL/min;柱温 35 $^{\circ}$ C;进样量 5 μ L。

2.2.3 质谱条件 Dual AJS 电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI),正、负离子多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描模式,干燥气温度 300 $^{\circ}$ C,干燥气体积流量 9 L/min,鞘气温度 250 $^{\circ}$ C,鞘气体积流量 11 L/min,毛细管电压 +4 kV、-3.5 kV,具体参数见表 1。

2.3 动物分组与给药

实验前动物禁食 12 h,自由饮水。小鼠随机分

表 1 7 个化合物的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of seven compounds

化合物	t_R/min	离子对 (母离子>子离子)	碎裂电压/V	碰撞能量/eV	扫描模式
阿魏酸	3.87	193.0>134.0	95	15	负离子
洋川芎内酯 I	2.47	207.0>91.0	115	25	正离子
洋川芎内酯 H	2.81	207.0>91.0	115	25	正离子
洋川芎内酯 A	7.30	193.1>137.0	80	12	正离子
4-羟基-3-丁基苯酚	4.62	207.0>165.0	115	15	正离子
藁本内酯	7.84	191.0>173.0	75	12	正离子
欧当归内酯 A	9.27	381.2>191.1	65	14	正离子

7 组 ($n=10$), 其中 1 组为对照组, 其他 6 组均为给药组。对照组 ig 生理盐水后麻醉, 给药组 ig 川芎提取物 (5.8 g/kg, 以生药量计), 分别于给药 0.5、1、2、4、6、8 h 后麻醉, iv FITC-dextran (30 $\mu\text{g/g}$, 相对分子质量 4×10^3), 循环 5 min, 从心脏灌流生理盐水后取脑组织。

另取同一批次的小鼠 48 只, 随机按 FITC-dextran 相对分子质量 (4×10^4 、 7×10^4 、 1.5×10^5) 分成 3 组 ($n=16$), 每组再分为对照组和给药组 ($n=8$), 对照组 ig 生理盐水 0.5 h 后麻醉, 给药组 ig 川芎提取物 0.5 h 后麻醉, iv 不同相对分子质量的 FITC-dextran (30 $\mu\text{g/g}$), 循环 5 min, 从心脏灌流生理盐水后取脑组织。

2.4 脑组织样品处理^[14]

脑组织加入等倍量的 Tris-HCl (pH 7.6), 匀浆 10 min, 4 500 r/min 离心取上清液, 上清液中加入等体积甲醇沉蛋白, 15 000 r/min 离心取上清液。采用多功能酶标仪 ($E_x=485 \text{ nm}$, $E_m=535 \text{ nm}$, $n=3$) 测定各组脑组织上清液的荧光强度, 计算单位脑组织质量含有的 FITC-dextran 含量。

2.5 体外血脑屏障模型构建及川芎单体成分透过血脑屏障通透性实验

2.5.1 细胞培养 bEnd.3 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素 (10 U/mL) 的高糖 DMEM 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养, 按 1:3 传代, 0.25% 胰酶 (含 0.05% EDTA) 消化。冻存液为胎牛血清-二甲基亚砷 (9:1), 每管细胞数 $\geq 1 \times 10^6$ 个/mL。复苏时在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下快速解冻转移至预热完全培养基中, 吹打离心后常规培养。

2.5.2 血脑屏障模型构建及评价 取生长密度 80% 的 bEnd.3 细胞, 消化计数, 调整细胞密度为 2×10^5 个/mL。取内表面铺被入血浆纤连蛋白^[15] 的 Transwell 小室, 供给池加入 0.5 mL 细胞溶液, 接收池加入 1.5 mL 完全培养基, 细胞沉降后转移至培养箱中。供给池每天换液, 接收池隔天换液。

细胞贴壁后使用跨内皮电阻仪检测跨内皮电阻 (transepithelial resistance, Teer), 计算组织电阻 Ω , Ω 最高且维持稳定认为血脑屏障基本形成。

$$\Omega = (\Omega_{\text{实验}} - \Omega_{\text{对照}}) \times S$$

$\Omega_{\text{实验}}$ 为细胞模型小室 Teer 值, $\Omega_{\text{空白}}$ 为对照小室 Teer 值, S 为小室底膜面积 (1.1 cm^2)

2.5.3 分组及给药 实验分为对照组和不同浓度的洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 H、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯、欧当归内酯 A、4-羟基-3-丁基苯酚给药组。对照组供给池加入含终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ Na-F 的完全培养基 0.5 mL, 接收池加入空白完全培养基 1.5 mL; 给药组供给池分别加入含终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ Na-F 和不同浓度 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 药物的完全培养基 0.5 mL, 接收池均加入空白完全培养基 1.5 mL。

给药后 0.5、1、2、4、6、8 h 于接收池取样 100 μL , 取样后补充相同体积培养基至接收池。样品采用多功能酶标仪 ($E_x=485 \text{ nm}$, $E_m=535 \text{ nm}$) 检测, 计算 Na-F 的表观渗透系数 (apparent permeability coefficient, P_{app})。

$$P_{\text{app}} = (dQ/dt) \times 1/A \times 1/C_0$$

dQ/dt 表示转运时间 dt 内的药物转运速率 ($\mu\text{g/s}$), A 表示小室单层膜表面积 (cm^2), C_0 表示初始荧光素钠药物质量浓度 (1 $\mu\text{g/mL}$)

血脑屏障模型成功与否采用 Teer^[16-17] 及 Na-F^[18] 的 P_{app} 评价。

2.6 Western blotting 检测蛋白表达

取“2.3”项下给予川芎提取物 0、0.5、1、2、4、8 h 的小鼠脑组织, 加入含 1% PMSF、2% 磷酸酶抑制剂的裂解液, 低温匀浆静置, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。取“2.5.3”项下给予 10 $\mu\text{mol/L}$ 洋川芎内酯 I、0.5、1、2、4、8 h 的 bEnd.3 细胞, 收集细胞沉淀, 加入含 1% PMSF、2% 磷酸酶抑制剂的裂解液吹散, 低温静置, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。采用 BCA 试剂盒定量蛋

白,沸水浴 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经 4%~15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%牛血清白蛋白室温封闭,脑组织蛋白样品孵育 Occludin (1:2 500)、VE-cadherin (1:300)、ZO-1 (1:6 000)、P-gp (1:800) 一抗,细胞蛋白样品孵育 p-ERM (1:1 000)、ERM (1:1 200)、ZO-1 (1:6 000)、Occludin (1:6 000)、P-gp (1:1 250) 一抗,4 ℃孵育过夜。洗涤,加入二抗 (1:10 000),室温孵育 1 h,采用化学发光成像仪分析成像。

2.7 统计学分析

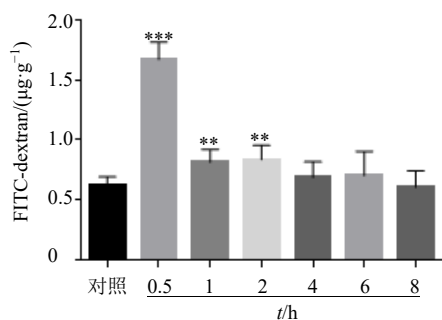
实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 17.0 软件进行统计与分析,采用单因素方差分析或双尾非配对 t 检验,使用 GraphPad Prism 6.02 软件作图。

3 结果

3.1 川芎提取物对小鼠血脑屏障的作用

3.1.1 川芎提取物各成分含量 采用外标两点法测定得川芎提取物中各成分质量分数由高到低依次为洋川芎内酯 A 7.1 mg/g、藁本内酯 4.37 mg/g、阿魏酸 1.9 mg/g、洋川芎内酯 I 1.1 mg/g、欧当归内酯 A 0.71 mg/g、洋川芎内酯 H 0.21 mg/g、4-羟基-3-丁基苯酚 0.057 mg/g。

3.1.2 川芎影响血脑屏障通透性的定量结果 如图 1 所示,与对照组比较,给予川芎提取液 0.5 h 后,单位脑质量中相对分子质量为 4×10^3 的 FITC-dextran 含量显著增加 ($P < 0.001$),随给药时间延长,含量逐渐降低至对照组水平。如图 2 所示,与对照组比较,给予川芎提取物 0.5 h 后,相对分子质



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures.

图 1 给予川芎提取物不同时间后 FITC-dextran (相对分子质量 4×10^3) 在脑组织中的透过量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Extravasation of FITC-dextran (molecular weight 4×10^3) in brain tissue after *Chuanxiong Rhizoma* extract treatment for different time ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

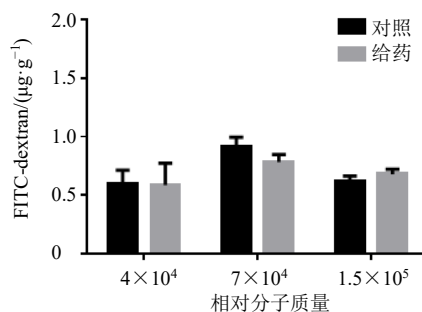


图 2 给予川芎提取物 0.5 h 后不同相对分子质量 FITC-dextran 在脑组织中的透过量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Extravasation of FITC-dextran with different molecular weight in brain tissue after treatment with *Chuanxiong Rhizoma* extract for 0.5 h ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

量为 4×10^4 、 7×10^4 、 1.5×10^5 的 FITC-dextran 在 小鼠脑组织中的含量无显著性差异。

3.1.3 川芎提取物不同给药时间脑组织中 Occludin、ZO-1、VE-cadherin、P-gp 蛋白表达 如图 3 所示,给予川芎提取物 0.5、1、2、4、8 h 后小鼠脑组织中 Occludin、ZO-1 蛋白表达量呈先降低后增加而后再降低的趋势:给药后 0.5 h Occludin 蛋白表达量降低,给药后 1、2、4 h 显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01),给药后 8 h 降低至对照组水平;给药后 0.5 h ZO-1 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$),给药后 2 h 显著增加 ($P < 0.05$),给药后 8 h 降低至对照组水平;给药后 0.5 h P-gp 蛋白表达量升高,给药后 2 h 显著降低 ($P < 0.01$),给药后 4、8 h 升高至对照组水平;给药后 VE-cadherin 蛋白表达基本无变化。

3.2 川芎单体成分对血脑屏障细胞模型的作用

3.2.1 血脑屏障细胞模型评价 采用单层内皮细胞模拟正常状态血脑屏障。bEnd.3 细胞呈多边形,汇合成片后呈现典型的铺路石样结构。模型在培养第 5 天时,Teer 值稳定为 $60 \Omega \cdot \text{cm}^2$, (与报道^[19]中的 $70 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 基本一致),Na-F 的 P_{app} 值为 $0.5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, (与报道^[20]中甘露醇 $4.9 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 基本一致),说明本研究中血脑屏障模型构建成功,可用于探究药物对通透性的影响。

3.2.2 川芎单体成分对血脑屏障细胞模型通透性的影响 给予 $0 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 的洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 H、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯、欧当归内酯 A、4-羟基-3-丁基苯酚后, bEnd.3 细胞存活率均大于 90%。

川芎 7 个单体成分对血脑屏障细胞模型中 Na-F 表观渗透系数的影响见图 4,给药 0.5、1、2、4、

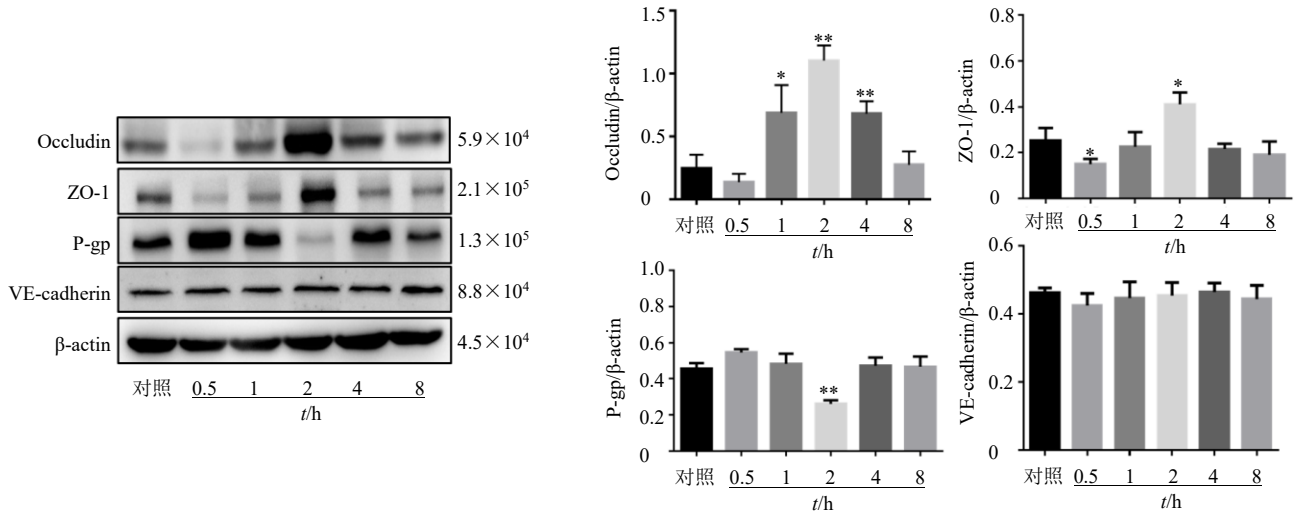
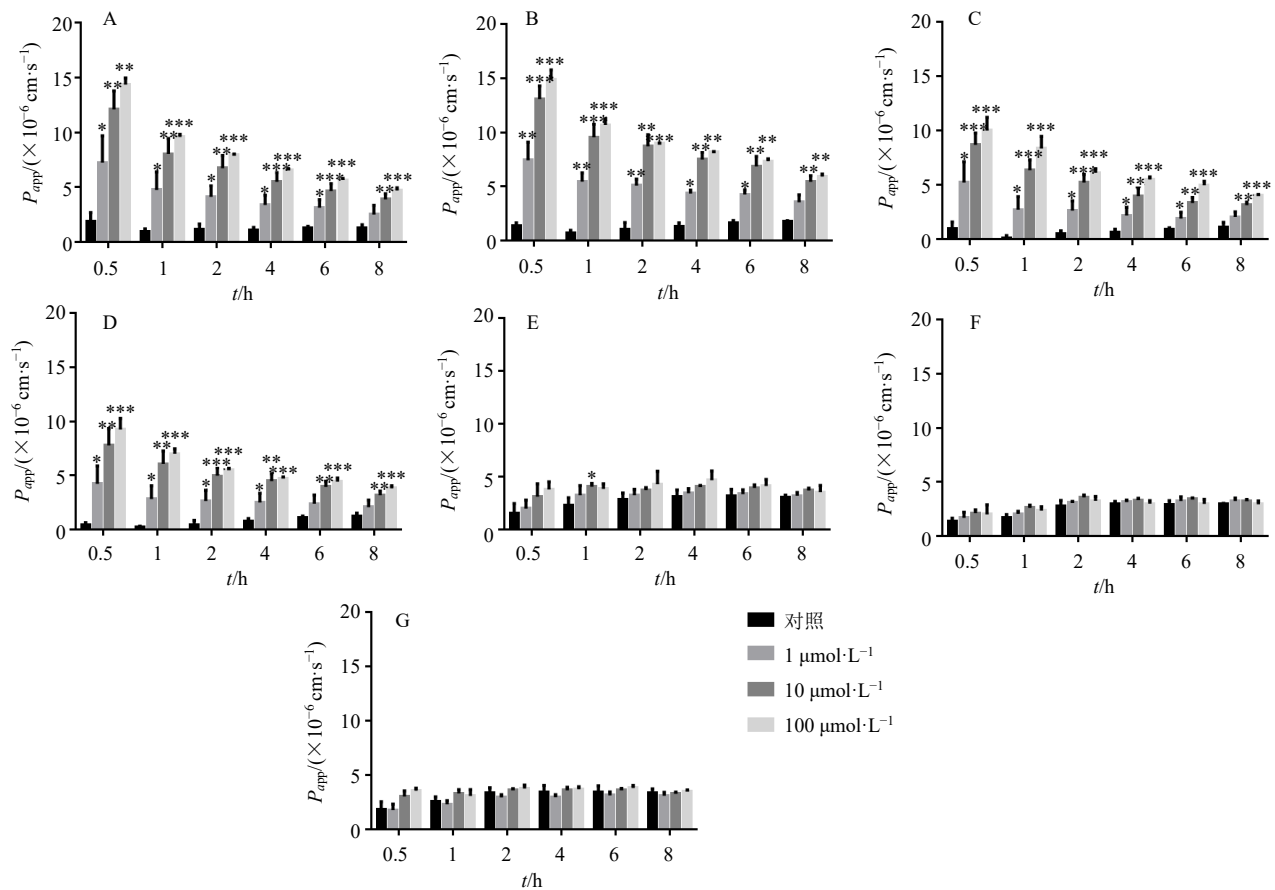


图 3 给予川芎提取物不同时间后小鼠脑组织中 Occludin、ZO-1、P-gp、VE-cadherin 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Changes in Occludin, ZO-1, P-gp, and VE-cadherin protein expressions in brain tissue of mice after different durations of administration of *Chuanxiong Rhizoma* extract ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-洋川芎内酯 A; B-洋川芎内酯 H; C-阿魏酸; D-洋川芎内酯 I; E-藁本内酯; F-4-羟基-3-丁基苯酞; G-欧当归内酯 A。

A-senkyunolide A; B-senkyunolide H; C-ferulic acid; D-senkyunolide I; E-ligustilide; F-4-hydroxy-3-butylphthalide; G-levistilide A.

图 4 7 个单体成分作用不同时间下 Na-F 的 P_{app} ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 P_{app} of Na-F at different times of action of seven active components ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

6 h 后, 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I 及阿魏酸均能显著增加 Na-F 的 P_{app} ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 给药 8 h 后, 10、100 $\mu\text{mol/L}$ 洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I 及阿魏酸均能显著增加 Na-F 的 P_{app} ($P < 0.01$ 、0.001), 随给药时间延长, Na-F 的 P_{app} 逐渐降低至对照组水平。给药 1 h 后, 10 $\mu\text{mol/L}$ 藁本内酯显著增加 Na-F 的 P_{app} ($P < 0.05$)。欧当归内酯 A、4-羟基-3-丁基苯酚对 Na-F 的 P_{app} 无影响。

进一步比较给药后 0.5 h 洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、阿魏酸的 Na-F P_{app} 百分比(给药组与对照组 Na-F 的 P_{app} 比值)探讨其促透作用的强弱^[17], 结果见表 2, 相同浓度下洋川芎内酯 I 的 P_{app} 百分比最高, 表明洋川芎内酯 I 在 bEnd.3

单培养血脑屏障细胞模型中促透效应最强。

3.2.3 洋川芎内酯 I 对 bEnd.3 细胞中 Occludin、ZO-1、P-gp、p-ERM/ERM 蛋白表达的影响 如图 5 所示, 与对照组比较, 洋川芎内酯 I (10 $\mu\text{mol/L}$) 作用 bEnd.3 细胞 0.5 h 时 Occludin 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$), 给药 1、2 h 时表达量显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01), 给药 4、8 h 时, 表达量降低至对照组水平; 给药 0.5 h 时 ZO-1 蛋白表达量降低, 给药 1、2、4 h 时表达量显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01), 给药 8 h 时表达量降低至对照组水平; 给药 0.5 h 时 p-ERM/ERM 蛋白表达量降低, 给药 1、2、4 h 时表达量显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01), 给药 8 h 时表达量降低至对照组水平。P-gp 蛋白表达量呈先降低后升高趋势。

表 2 不同浓度药物给药 0.5 h 时的 P_{app} 百分比 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 P_{app} percentage at 0.5 h of drug administration with different concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

成分	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	P_{app} 百分比/%	成分	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	P_{app} 百分比/%
洋川芎内酯 A	1	390.42 ± 131.30	洋川芎内酯 H	1	558.03 ± 124.11
	10	652.08 ± 91.32		10	980.47 ± 91.79
	100	774.22 ± 32.24		100	$1\,115.67 \pm 67.54$
阿魏酸	1	555.15 ± 204.68	洋川芎内酯 I	1	740.31 ± 288.67
	10	924.10 ± 117.03		10	$1\,358.86 \pm 273.03$
	100	$1\,063.77 \pm 128.82$		100	$1\,617.55 \pm 177.64$

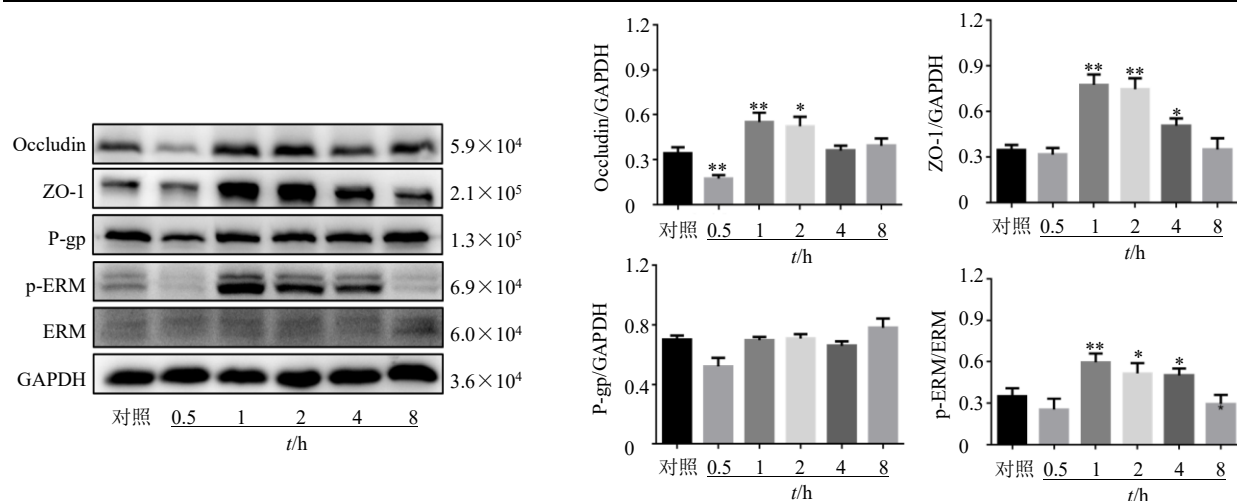


图 5 洋川芎内酯 I 对 bEnd.3 细胞中 P-gp、Occludin、ZO-1、p-ERM/ERM 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of senkyunolide I on P-gp, Occludin, ZO-1 and p-ERM/ERM protein expressions in bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

本研究采用 FITC-dextran、Na-F 作为示踪剂, 研究川芎提取物及单体成分对血脑屏障通透性的影响, 通过 Western blotting 检测给药后脑组织或模型细胞中细胞间连接蛋白的表达变化, 明确川芎对血脑屏障通透性的作用和机制。

FITC-dextran 是评估体内血脑屏障通透性常用的指示剂, 具有分子惰性、检测灵敏度高、体内清除速度快等优势^[21], 同时具有利用自身不同相对分子质量评价多种物质(溶质、离子和蛋白质)在血脑屏障上通透性的优势^[22]。生理状态下 0.2% 冰片可促进 FITC-dextran (相对分子质量 4×10^3) 经角膜

渗透, 这说明了冰片作为眼部药物穿透促进剂的安全性^[23]。3 种标志物肌酐、FITC-dextran (相对分子质量 4×10^3) 和罗丹明-dextran (相对分子质量 7×10^4) 根据不同相对分子质量可对应确定肠道屏障中孔隙途径、渗漏途径和不受分子大小限制的病理性途径的通透性变化, 用以区分肠道疾病中屏障特性的丧失属于紧密连接通透性增加还是上皮损伤从而辅助确认病程^[24]。本研究结果显示, 小鼠给予川芎提取物 0.5 h 后, 可显著增加 FITC-dextran (相对分子质量 4×10^3) 在脑组织中的外渗量, 但对相对分子质量 4×10^4 、 7×10^4 、 1.5×10^5 的 FITC-dextran 外渗量无影响, 说明川芎提取物给药后小鼠血脑屏障通透性增加, 但对途经血脑屏障的物质分子直径有所限制; 给药 8 h 后 FITC-dextran (相对分子质量 4×10^3) 的外渗量降低至对照组水平, 说明川芎提取物增加血脑屏障通透性的作用具有时效性, 作用强度由强至弱。

体外血脑屏障细胞模型是快速筛选出具有良好血脑屏障渗透性的中枢神经系统疾病候选药物的有力工具。本研究结果显示, 川芎中的洋川芎内酯 I、A、H 及阿魏酸在给药时间内能显著增加 Na-F 的 P_{app} , 表明其均具有促透作用。已有研究发现, 洋川芎内酯 I、A 在 MDCK-MDR1 血脑屏障模型中具有促透性, 能够增加水溶性物质松果菊苷的 P_{app} ^[12], 与本研究结果一致。洋川芎内酯 H 和阿魏酸的促透性为本研究首次报道。洋川芎内酯 H 与洋川芎内酯 I 互为手性异构体, 二者均易入脑, 已有研究学者发现洋川芎内酯 H 可用于防治脑卒中^[25], 本研究证明其在血脑屏障模型中具有促透性, 但洋川芎内酯 H 作用强度不如洋川芎内酯 I, 分析原因可能是二者结构上的差别造成本身活性不同。阿魏酸及其衍生化产物可入脑^[26-27], 常用于中枢神经系统疾病的治疗^[28]。值得注意的是, 本研究中藁本内酯未显著改变 Na-F 的 P_{app} 。然而有研究报道藁本内酯可下调 P-gp 的表达, 从而增加芍药苷在 MDCK-MDR1 血脑屏障细胞模型中的转运^[29]。本研究使用的示踪剂非外排蛋白 P-gp 底物^[23], 这可能是藁本内酯未显著改变 Na-F P_{app} 的原因。

血脑屏障对大脑微环境严格的保护作用限制了药物靶向到达脑组织中的病变部位。增大细胞旁通透性是亲水性药物更可能透过血脑屏障的途径^[30]。细胞旁通透性由紧密连接蛋白、黏附连接蛋白及彼此间相互作用控制。Na-F 为水溶性小分子物质, 主

要通过细胞旁途径运输, 常将其渗透情况作为评价体外模型旁路通透性的指标^[31]。Na-F 在血脑屏障模型中的高透过率与模型的低 TEER 值保持一致, 表明其渗透情况与模型的紧密程度有关^[32]。洋川芎内酯 I 作用 0.5 h 时, Na-F 的 P_{app} 最高, 随给药时间延长, 其有回到对照组水平的趋势, 这与洋川芎内酯 I 调节 bEnd.3 细胞中紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 及 pERM/ERM 表达水平的结果基本一致。ZO-1 联结跨膜连接蛋白与肌动蛋白细胞骨架^[33], ZO-1 失活将破坏紧密连接的实质结构^[34]。Occludin 与其他紧密连接蛋白的顺式相互作用增加紧密连接的复杂性, 从而增强血脑屏障的屏障完整性^[35]。各紧密连接蛋白与肌动蛋白或细胞骨架之间相互作用的改变会导致血脑屏障通透性增加^[36], 如 ERM 蛋白是维持细胞间蛋白质膜定位所必需的锚定蛋白^[37], 研究报道银杏内酯可通过影响 p-ERM/ERM 的表达水平增加 Na-F 在 HCMEC/D3 和 HEB 共培养血脑屏障细胞模型中的透过量^[32]。

冰片是应用广泛的紧密连接调节剂。研究表明, 大鼠给药冰片 0.5 h 时, 大鼠血-视网膜屏障中内皮细胞的 Claudin-5 和 Occludin 发生细胞膜-细胞质向易位, 1 h 时胞质中 Claudin-5 和 Occludin 表达量达到峰值, 4 h 时表达量开始下降, 8 h 时恢复至对照组水平^[38]。本研究表明, 川芎提取物给药 0.5 h 时 Occludin、ZO-1 表达量降低, P-gp 表达量增高; 给药 2 h 时 Occludin、ZO-1 表达量达到峰值, Occludin、ZO-1 表达量达到谷值; 给药 8 h 时三者恢复至对照组水平。洋川芎内酯 I 给药 0.5 h 后, bEnd.3 细胞中 Occludin、ZO-1、p-ERM/ERM 蛋白表达量降低; 给药 1 h 后均显著高于对照组水平; 给药 8 h 后恢复至对照组水平, 因此推测川芎具有与冰片类似的可逆性调节血脑屏障通透性的性质, 其影响血脑屏障通透性的机制可能与可逆性调节 Occludin、ZO-1、P-gp 及 p-ERM/ERM 蛋白表达水平有关。

综上, 川芎在一定程度上可增加血脑屏障通透性, 且该作用具有时效性, 是紧密连接调节剂的潜在开发对象, 洋川芎内酯 I 是良好的候选成分。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Abbott N J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability [J]. *J Anat*, 2002, 200(6): 629-638.
- [2] Daneman R, Engelhardt B. Brain barriers in health and

- disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 107: 1-3.
- [3] Daneman R, Zhou L, Kebede A A, *et al.* Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis [J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 562-566.
- [4] Bell R D, Winkler E A, Sagare A P, *et al.* Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging [J]. *Neuron*, 2023, 111(19): 3131-3132.
- [5] Sweeney M D, Zhao Z, Montagne A, *et al.* Blood-brain barrier: From physiology to disease and back [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1): 21-78.
- [6] 吴娇, 李中玉, 吴煜. 运用风药治疗癌性疼痛经验 [J]. 环球中医药, 2020, 13(12): 2121-2123.
- [7] 于新, 柴军红, 孔祥文, 等. 基于归经理论指导下川芎治疗头痛的研究进展 [J]. 中医药学报, 2023, 51(2): 8.
- [8] 焦海蕾, 徐冰, 李亚娟. 探析风药对血管性痴呆的精准治疗 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(2): 75-77.
- [9] 祝之友. 川芎名著论选 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(15): 169.
- [10] 王平, 王晨, 楼一层. 冰片、川芎对复方舒郁健脑方剂透过血脑屏障的作用研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(5): 21-23.
- [11] 郑琴, 刘嘉宇, 傅声玲, 等. 川芎对天麻苷元大鼠脑内药动学的影响 [J]. 中国新药与临床杂志, 2012, 31(5): 263-266.
- [12] Zheng Q, Tang Y, Hu P Y, *et al.* The influence and mechanism of ligustilide, senkyunolide I, and senkyunolide A on echinacoside transport through MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(3): 426-435.
- [13] 王强, 沈岚, 梁爽, 等. 川芎对天麻指标成分在偏头痛大鼠体内药动学的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(1): 62-69.
- [14] Liang W Y, Xu W, Zhu J, *et al.* *Ginkgo biloba* extract improves brain uptake of ginsenosides by increasing blood-brain barrier permeability via activating A1 adenosine receptor signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 246: 112243.
- [15] Placone A L, McGuiggan P M, Bergles D E, *et al.* Human astrocytes develop physiological morphology and remain quiescent in a novel 3D matrix [J]. *Biomaterials*, 2015, 42: 134-143.
- [16] Emmrich P, Baumann W, Stechele U. Studies on the kinetics and renal excretion of low and high molecular weight dextrans in preterm babies, newborns and young infants [J]. *Eur J Pediatr*, 1977, 125(3): 181-190.
- [17] Qi H P, Gao X C, Zhang L Q, *et al.* *In vitro* evaluation of enhancing effect of borneol on transcorneal permeation of compounds with different hydrophilicities and molecular sizes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 705(1/2/3): 20-25.
- [18] Tsai P Y, Zhang B K, He W Q, *et al.* IL-22Upregulates epithelial claudin-2 to drive diarrhea and enteric pathogen clearance [J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 21(6): 671-681.
- [19] Shin J A, Oh S, Ahn J H, *et al.* Estrogen receptor-mediated resveratrol actions on blood-brain barrier of ovariectomized mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(2): 993-1006.
- [20] Noorani B, Chowdhury E A, Alqahtani F, *et al.* LC-MS/MS-based *in vitro* and *in vivo* investigation of blood-brain barrier integrity by simultaneous quantitation of mannitol and sucrose [J]. *Fluids Barriers CNS*, 2020, 17(1): 61.
- [21] Nag S. Blood-brain barrier permeability using tracers and immunohistochemistry [J]. *Methods Mol Med*, 2003, 89: 133-144.
- [22] Naik P, Cucullo L. *In vitro* blood-brain barrier models: Current and perspective technologies [J]. *J Pharm Sci*, 2012, 101(4): 1337-1354.
- [23] 查雨锋, 傅晓钟, 张顺, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞与周细胞、星形胶质细胞共培养建立体外血脑屏障模型 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(5): 730-735.
- [24] Deli M A, Abrahám C S, Kataoka Y, *et al.* Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: Physiology, pathology, and pharmacology [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2005, 25(1): 59-127.
- [25] 冯怡, 徐德生, 阮克锋, 等. 洋川芎内酯 H 在制备防治脑卒中药物中的应用: 中国, CN102144999A [P]. 2011-08-10.
- [26] 张昕莹. 药对川芎—香附主要成分的提取及在大鼠体内的药代动力学研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [27] 林竹贞, 姚美村, 蓝明雄, 等. 冰片对阿魏酸钠在小鼠血浆和脑区中分布的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 551-556.
- [28] 张欣, 高增平. 阿魏酸的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 138-147.
- [29] Hu P Y, Liu D, Zheng Q, *et al.* Elucidation of transport mechanism of paeoniflorin and the influence of ligustilide, senkyunolide I and senkyunolide A on paeoniflorin transport through mdck-Mdr1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 300.
- [30] Deli M A. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(4): 892-910.
- [31] Harilal S, Jose J, Parambi D G T, *et al.* Revisiting the blood-brain barrier: A hard nut to crack in the

- transportation of drug molecules [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 160: 121-140.
- [32] Guo C J, Wang H, Liang W Y, *et al*. Bilobalide reversibly modulates blood-brain barrier permeability through promoting adenosine A1 receptor-mediated phosphorylation of actin-binding proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(4): 1077-1084.
- [33] Liebner S, Dijkhuizen R M, Reiss Y, *et al*. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2018, 135(3): 311-336.
- [34] He L Q, Vanlandewijck M, Raschperger E, *et al*. Analysis of the brain mural cell transcriptome [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35108.
- [35] Cording J, Berg J, Käding N, *et al*. In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 2): 554-564.
- [36] Stamatovic S M, Keep R F, Andjelkovic A V. Brain endothelial cell-cell junctions: How to open the blood brain barrier [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2008, 6(3): 179-192.
- [37] Hoshi Y, Uchida Y, Kuroda T, *et al*. Distinct roles of ezrin, radixin and moesin in maintaining the plasma membrane localizations and functions of human blood-brain barrier transporters [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(7): 1533-1545.
- [38] Jin D, Wang F, Qu L, *et al*. The distribution and expression of claudin-5 and occludin at the rat blood-optic nerve barrier after borneol treatment [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 913-920.

[责任编辑 李亚楠]