

# 脑缺血再灌注动物模型的血脑屏障损伤\*☆

张宇玲, 蔡文杰

## Blood brain barrier injury in animal models after cerebral ischemia-reperfusion

Zhang Yu-ling, Cai Wen-jie

College of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

Zhang Yu-ling☆, Studying for doctorate, Laboratory technician, College of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China  
zhangyuling1982@hotmail.com

Supported by: the Special Science and Technology Research Foundation for Excellent Young Teachers in Shanghai Universities, No. slg07032\*

Received: 2011-09-27  
Accepted: 2011-11-22

上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海市 200093

张宇玲☆, 女, 1982年生, 江苏省海门市人, 汉族, 复旦大学康复医学与理学专业在读博士, 实验师, 主要从事康复医学方面的研究。  
zhangyuling1982@hotmail.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2012)15-02848-03

收稿日期: 2011-09-27  
修回日期: 2011-11-22  
(20110927010W·LX)

### Abstract

**BACKGROUND:** Cerebral ischemia-reperfusion results in the breakdown on blood brain barrier, leading to cerebral hemorrhage, brain edema and the aggravated damage of brain tissue.

**OBJECTIVE:** To summarize and analyze the effects of associated molecules on the blood-brain barrier damage in animal models after cerebral ischemia-reperfusion.

**METHODS:** A computer-based online search of PubMed (2001-01/2011-12) and CNKI (2006-01/2011-12) was performed for related articles with the keywords of "cerebral ischemia-reperfusion injury, blood brain barrier permeability" in English and Chinese, respectively. Researches on cerebral ischemia-reperfusion injury and blood brain barrier permeability were included. Repetitive studies were excluded. A total of 17 articles were retained.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The molecules associated with blood brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion injury were summarized from many aspects, such as inflammatory infiltration, matrix metalloproteinases hydrolysis and aquaporin opening. The blood-brain barrier function is regulated by many factors and many links. The 3-hour time window of the blood brain barrier opening after cerebral ischemia-reperfusion injury is crucial for the emergency treatment of ischemic penumbra. The later repairing effect of matrix metalloproteinase may provide basis for the drug innovation.

Zhang YL, Cai WJ. Blood brain barrier injury in animal models after cerebral ischemia-reperfusion. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(15): 2848-2850. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

背景: 脑缺血再灌注后血脑屏障遭到破坏, 引起脑水肿和脑出血, 组织损伤程度加重。

目的: 总结分析脑缺血再灌注动物模型血脑屏障相关分子, 在脑缺血再灌注后血脑屏障损伤中的作用。

方法: 以 "Cerebral ischemia-reperfusion injury, blood brain barrier permeability," 为检索词, 检索近十年 PubMed 数据库, 文献检索语种限制为英文。以 "脑缺血再灌注, 血脑屏障" 为检索词, 检索 5 年内中国期刊全文数据库, 文献检索语种限制为中文。纳入与脑缺血再灌注及血脑屏障损伤密切相关的研究; 排除重复性研究。选取 17 篇总结分析。

结果与结论: 从炎症因子的浸润, 基质金属蛋白酶的水解以及水通道蛋白的开放等方面总结脑缺血再灌注损伤后血脑屏障相关分子, 提出多因素多环节调控血脑屏障功能。CIR 后血脑屏障开放的 3 h 时间窗为急性期抢救缺血半暗带关键点, 基质金属蛋白酶的后修复作用也可作为新药研发提供依据。

关键词: 脑缺血再灌注; 血脑屏障; 缺血性脑血管病; 炎症因子; 基质金属蛋白酶

缩略语注释: ICVD: ischemic cerebral vascular disease, 缺血性脑血管病; CIR: cerebral ischemia-reperfusion, 脑缺血再灌注; CIRI: cerebral ischemia-reperfusion injury, 脑缺血再灌注损伤; TNF: tumor necrosis factor, 肿瘤坏死因子; MCP-1: monocyte chemoattractant protein -1, 单核细胞趋化蛋白 1; MMPs: matrix metalloproteinase, 基质金属蛋白酶  
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.15.041

张宇玲, 蔡文杰. 脑缺血再灌注动物模型的血脑屏障损伤[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15): 2848-2850.  
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

缺血性脑血管病 (ischemic cerebral vascular disease, ICVD) 尚无有效疗法。目前临床上多用早期溶栓治疗, 但同时带来的脑缺血再灌注损伤则是目前最受关注的前沿问题。溶栓治疗引起的脑出血和脑水肿的主要原因是血脑屏障的开放, 导致脑组织继发性损伤<sup>[1-2]</sup>。文章就脑缺血再灌注 (cerebral ischemia-reperfusion, CIR) 后血脑屏障损伤机制方面的研究进行综述。

## 1 资料和方法

1.1 资料来源 第一作者以 "Cerebral

ischemia-reperfusion injury, blood brain barrier permeability," 为检索词, 检索 PubMed 数据库 (2001-01/2011-12); 以 "脑缺血再灌注, 血脑屏障" 为检索词, 检索中国期刊全文数据库 (2006-01/2011-12)。检索到文献 243 篇, 筛选后保留 17 篇文献进行综述。

1.2 检索方法: ①纳入标准: 文献内容与脑缺血再灌注损伤及其血脑屏障通透性开放机制研究密切相关。②排除标准: 排除与本文目的无关的文献或重复性研究。

## 2 结果

2.1 脑缺血再灌注后对血脑屏障结构功能的影响 脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-

reperfusion injury, CIRI)是指遭受一定时间缺血的脑组织恢复供血后,组织损伤程度加重的病理现象。脑血流中断和再灌注使脑的细胞产生损伤是一个快速的级联反应。包括能量障碍、炎症反应、兴奋性氨基酸释放增加、细胞内钙失稳态、自由基生成、蛋白酶的激活、凋亡基因激活等多个环节<sup>[3]</sup>,它们相互影响,相互作用,恶性循环,最终导致内皮细胞凋亡或坏死,脑血管结构改变,血脑屏障功能破坏。

吴松迪等<sup>[4]</sup>观察 CIRI 后缺血区血脑屏障结构受损变化,缺血再灌注 0.5 h 起缺血区脑组织轻微变化;缺血再灌注 2 h 和 6 h,缺血区脑组织肿胀明显加重,星形胶质细胞的足突与毛细血管基底膜开始分离,间隙明显扩大;血管内皮细胞肿胀和空泡化明显;神经纤维微管排列紊乱;再灌注 12 h 和 24 h,脑组织损伤更加明显,结构疏松,许多神经细胞和胶质细胞变性坏死,细胞核溶解;毛细血管基底膜的连续性被破坏,脑实质受损。再灌注 48 h,缺血区脑组织正常形态结构基本消失,大量的神经细胞和胶质细胞坏死、崩解,并可见脑组织中大量的小胶质细胞,其胞质内充满吞噬的脂滴和其他坏死组织;多数血管内皮细胞形态不完整。从再灌注 72 h 损伤开始减弱,毛细血管变形程度减轻。

脑缺血再灌注后血脑屏障的功能也因此改变。袁毅等<sup>[5]</sup>采用改良线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞再灌注模型,通过测定脑组织中伊文氏蓝含量研究血脑屏障通透性的改变,发现血脑屏障的通透性改变与缺血后再灌注的时间密切相关,缺血再灌注 3 h,血脑屏障的通透性开始增加;再灌注 6~12 h,血脑屏障通透性逐渐增加;再灌注 24 h,血脑屏障的通透性升至高峰,维持至 48 h;再灌注 72 h 以后血脑屏障的通透性逐渐减小。结果与 Yang 和 Rosenberg<sup>[6]</sup>CIRI 后血脑屏障通透性研究的结果一致。提示在脑缺血再灌注损伤中,抓住血脑屏障开放的 3 h 治疗窗,对临床应用研究意义深远。

## 2.2 脑缺血再灌注后血脑屏障损伤机制

**2.2.1 炎症因子** 脑缺血再灌注损伤时,中性粒细胞、星形胶质细胞等炎症细胞释放各类炎症因子,使白细胞介素、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、细胞间黏附因子、血管细胞黏附分子、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein -1, MCP-1)表达上调,促使白细胞跨内皮细胞迁移,破坏血脑屏障。

白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6、TNF- $\alpha$  是 3 类主要的具有多种生物活性的细胞因子,也是机体炎症反应和免疫应答的重要炎症因子,可加重脑缺血再灌注部位的炎症反应,增加血脑屏障通透性。白细胞介素 1 $\beta$  可诱导内皮细胞上调黏附分子的表达,促进白细胞黏附微血管,加重血脑屏障损伤。Diana Amantea 等<sup>[7]</sup>发现白细胞介素 1 $\beta$  在脑缺血 1 h 时,在缺血区免疫反应加强;缺血 2 h 再灌注 2 h 时,在缺血区和半暗带的表达均明

显增加,参与脑缺血急性期血脑屏障的破坏和脑水肿。白细胞介素 6 是一种多功能的单糖链蛋白,其在脑组织损伤过程中发挥着双重作用,正常生理浓度或低水平表达的白细胞介素 6 对神经元具有保护和促进修复的作用,但快速白细胞介素 6 含量增高则加剧神经元胶质细胞及内皮细胞的损伤。患者血清中白细胞介素 6 和 TNF- $\alpha$  水平与缺血性脑卒中预后相关<sup>[8]</sup>。

最近研究发现 T 淋巴细胞分泌的白细胞介素 17 和白细胞介素 23 参与脑缺血再灌注损伤。CIR 后 1 d,白细胞介素 23 表达增加; CIR 后 3 d,白细胞介素 17 上调; T 淋巴细胞缺失模型中, CIR 损伤明显减缓。提示白细胞介素 23 参与了 CIR 损伤急性期损伤反应,而白细胞介素 17 则在 CIR 损伤后期缺血半暗带神经元损伤中起作用<sup>[9]</sup>。MCP-1 和白细胞介素 8 在脑缺血再灌注后的炎症反应中的重要作用被关注。MCP-1 主要促使内皮细胞表面的黏附分子表达增加,也有实验证实白细胞介素 8 参与白细胞的积聚,从而参与缺血性脑损伤, MCP-1、白细胞介素 8 与抗体结合后可促进白细胞迁移,应用相应拮抗剂后可减少脑梗死范围<sup>[10]</sup>。

脑组织中 TNF- $\alpha$  主要两个来源:脑组织及其毛细血管各种细胞在激活后的表达;外周性 TNF- $\alpha$  透过血脑屏障进入中枢。 CIR 后, TNF- $\alpha$  存在于损伤区域发挥其生物学活性已被证实,一般情况下适量 TNF- $\alpha$  参与免疫细胞的激活和炎症反应,具有抗染、抗病毒和抗肿瘤等作用。TNF- $\alpha$  的体内效应与剂量相关,它对中枢神经系统的影响,可通过多种机制调节神经内分泌功能、介质释放、抗原呈递等。蔡红星等<sup>[11]</sup>发现从缺血再灌注 12 h 开始升高, 24 h 达到最高值,随即逐步下降。在脑缺血损伤过程中 TNF- $\alpha$  含量在早期明显升高,从而促进损伤作用;在中、后期含量有所下降但仍高于正常,有可能发挥保护与损伤的双重作用。临床研究中, TNF- $\alpha$ 、白细胞介素 1 在急性卒中发生后 24 h 内其在患者的脑脊液和血清中的水平即显著升高,且与病情严重程度呈正相关<sup>[12]</sup>,说明其在卒中早期炎症损伤中发挥作用。

脑缺血再灌注时,早期细胞因子和黏附分子的表达,促发炎症级联反应,导致白细胞黏附、聚集和迁移,这是血脑屏障损伤的基础。细胞因子刺激炎性细胞聚集,对白细胞有趋化作用,促使白细胞和内皮细胞表达黏附分子。黏附分子的选择素、整合素和免疫球蛋白超家族之间复杂的相互作用导致白细胞的黏附、聚集,促进 CIRI 的发生和发展,产生大量蛋白水解酶,特别是基质金属蛋白酶、氧自由基和花生四烯酸代谢产物,导致了血脑屏障的直接破坏。

**2.2.2 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)** MMPs 是一组锌依赖的蛋白水解酶,钙离子参与时活性最大,能降解几乎所有细胞外基质,在生理和病理过程中发挥着重要作用。在 MMPs 中明胶酶

A(MMP-2)和明胶酶 B(MMP-9)能降解脑血管内皮细胞基底膜, 导致血脑屏障开放、脑水肿发生。明胶酶作为体内最重要的细胞外基质降解酶, 与血脑屏障损伤关系最为密切<sup>[13]</sup>。

最近研究发现 ZO-1, claudin-5 和 occludin 作为构成紧密连接的主要成分, 也可被 MMP-2 和 MMP-9 降解<sup>[14]</sup>。Yang 等<sup>[15]</sup>在大鼠脑缺血模型研究中发现, CIR 24 h 后, 在损伤区用免疫荧光检测不到紧密连接, 当使用 MMP 抑制剂 BB-1101 时可测到紧密连接。因此, MMP-2 和 MMP-9 可使血脑屏障血管基膜和紧密连接破坏, 导致血脑屏障通透性增加, 结果一方面加重脑水肿, 另一方面有利于炎性细胞和炎性因子通过血脑屏障, 导致脑组织的进一步损伤。Yang 和 Rosenberg<sup>[6]</sup>研究发现脑缺血 2 h 再灌注 3 h 和 48 h, 血脑屏障均开放, 其中 MMP-2 水平增高与血脑屏障首次开放有关, 在 5 d 表达高峰, 提示 MMP-2 可能与 CIR1 后神经修复有关; 而 MMP-9 的表达上调直至 48 h 的血脑屏障开放。

**2.2.3 水通道蛋白 4** 水通道蛋白 4 是中枢神经系统分布最广泛的水通道蛋白, 具有高度选择性, 对维持脑内水平衡起着非常重要的作用。水通道蛋白 4 主要分布于血脑屏障星形胶质细胞膜表面, 是介导水进出脑组织的主要蛋白。当血脑屏障破坏时表达异常, 导致脑组织水的吸收或清除障碍, 进而导致脑水肿的发生, 水通道蛋白 4 在脑水肿形成过程中表达水平的高低与血脑屏障完整性密切相关。血脑屏障破坏, 血管源性脑水肿发生, 水通道蛋白 4 表达增加; 而发生细胞毒性脑水肿时, 其表达并无变化<sup>[16]</sup>。Ribeiro 等<sup>[17]</sup>在小鼠 MCAO 30 min 再灌注损伤模型中显示再灌注 48 h 时梗死周边脑组织水通道蛋白 4 表达明显增高, 7 d 时降至正常水平, 与脑水肿发生、进展和消退的时间进程基本一致, 结果表明水通道蛋白 4 表达上调, 水通道开放, 大量水分子流入细胞内形成细胞内水肿。随后, 缺血区毛细血管内皮细胞及周围胶质细胞开始肿胀, 引起血脑屏障破坏, 毛细血管通透性增加, 血浆成分外渗, 产生显著的脑水肿。

**2.2.4 其他** 氧自由基和一氧化氮、血管内皮生长因子、紧密连接蛋白、凝血酶等多种因子相应变化, 改变毛细血管通透性, 促使血管源性脑水肿发生。

### 3 讨论

脑缺血再灌注后, 目前的研究多集中在单因子对血脑屏障的影响, 而血脑屏障结构和功能的改变可能是多因素多环节, 在不同时相相互作用, 导致血脑屏障损伤和脑水肿; 也有可能某些因子, 如 MMP-2、水通道蛋白 4 在血脑屏障损伤进程中表达时高时低, 提示它们在损伤不同时期有着不同作用。因此, 多途径多因子研究保护血脑屏障结构和功能是临床治疗缺血性脑血管病

的重要措施。

### 4 参考文献

- [1] 桑洁, 刘萍, 赵宝全. 血脑屏障分子组成研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(3): 201-205.
- [2] Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.*2002;57(2): 173-185.
- [3] 朱贤富, 王振华. 脑缺血/再灌注损伤机制的研究现状[J]. 医学综述, 2010, 16(18):2786-2789.
- [4] 吴松迪, 方琪, 夏峰, 等. 大鼠急性脑缺血再灌注后血脑屏障通透性的超微结构与血清 S100B 蛋白水平的动态变化[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(10):902-904.
- [5] 袁毅, 雷立芳, 涂秋云, 等. 大鼠脑缺血再灌注中血脑屏障通透性的改变与基质金属蛋白酶 9 表达的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(7):510-512.
- [6] Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke.*2011;42(11):3323-3328.
- [7] Amantea D, Bagetta G, Tassorelli C, et al. Identification of distinct cellular pools of interleukin-1 $\beta$  during the evolution of the neuroinflammatory response induced by transient middle cerebral artery occlusion in the brain of rat. *Brain Res.* 2010;1313:259-69.
- [8] Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, et al. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des.* 2008;14(33): 3574-89.
- [9] Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gamma delta T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med.* 2009;15(8):946-50.
- [10] McColl BW, Allan S M, Rothwell NJ. Systemic infection, inflammation and acute ischemic stroke. *Neuro-science.*2009; 158(3): 1049-1461.
- [11] 蔡红星, 李周儒, 程言博, 等. 脑缺血再灌注损伤后大鼠脑皮质 TNF- $\alpha$  及其 mRNA 的时程变化[J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(6): 647-650.
- [12] 刘皖生, 唐乙, 郑余银, 等. 脑缺血再灌注的炎症损伤分子机制及吡啶美辛的保护作用[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(10):1051-1053.
- [13] Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* 2009;8(2):205-16.
- [14] Feng S, Cen J, Huang Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. *PLoS One.* 2011;6(8):e20599.
- [15] Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, et al. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flo w Metab.*2007; 27(4): 697-709.
- [16] Ke C, Poon WS, Ng HK, et al. Heterogeneous response of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci Lett.*2001;301(1): 21-24.
- [17] Ribeiro MC, Hirt L, Bogousslavsky J, et al. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res.*2006, 83(7): 1231-1240.

**基金声明:** 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(slg08032)。

**作者贡献:** 第一作者构思完成本综述并对本文负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 无涉及伦理冲突的内容。

**此问题的已知信息:** 脑缺血再灌注后发生多个环节级联反应, 最终导致内皮细胞凋亡或坏死, 脑血管结构改变, BBB 功能破坏。

**本综述增加的新信息:** 从炎症因子的浸润, 基质金属蛋白酶的水解以及水通道蛋白的开放等方面总结脑缺血再灌注损伤后血脑屏障相关分子机制, 提出多因素多环节调控血脑屏障功能。

**临床应用的意义:** 脑缺血再灌注后血脑屏障损伤分子机制为临床药物治疗缺血性脑卒中提供了新的靶标, CIR 后 BBB 开放的 3 h 时间窗为急性期抢救缺血半暗带关键点, MMPs 的后期修复作用可为新药研发提供依据。