

大鼠脑缺血模型中基质金属蛋白酶2/9活化增加及紧密连接蛋白逐渐降解

梁佳¹, 戚智锋², 师文娟², 刘克建²(¹辽宁医学院科学实验中心, 辽宁省锦州市 121001; ²首都医科大学宣武医院脑血管病研究所, 北京市 100053)

文章亮点:

1 实验所选用的动物模型为经典的大脑中动脉闭塞局部脑缺血模型, 采用改良后的线栓模型, 将颈外动脉分离, 采用经颈外动脉插入线栓进入颈内动脉最终到达大脑中动脉的方法, 较传统的经颈总动脉直接插入线栓方法更能保证动物的再灌注效果。再灌注后从颈总动脉直接通过颈内动脉供血, 而传统的颈总动脉插栓方法, 再灌注后直接结扎颈总动脉, 再灌注供血只能通过侧支循环, 不能达到与临床相似的再灌注效果, 所以本实验方法具有保证再灌注效果的优势。

2 实验所用的线栓为硅胶线栓, 较常规采用的鱼线烧灼成圆头的线栓, 更加可以控制线栓的直径及长度, 并且能够减少除因为鱼线硬度过大引起的血管破裂出血, 提高模型的稳定性, 提高局部脑缺血动物模型的成功率。

关键词:

实验动物; 脑及脊髓损伤动物模型; 脑缺血模型; 基质金属蛋白酶2; 基质金属蛋白酶9; 紧密连接蛋白5; 国家自然科学基金

主题词:

脑缺血; 基质金属蛋白酶2; 基质金属蛋白酶9; 紧密连接蛋白

基金资助:

国家自然科学基金(81171242); 辽宁医学院校长基金项目资助(XZJJ20140105)

缩略语:

基质金属蛋白酶: matrix metalloproteinase, MMPs

摘要

背景: 在脑卒中后急性期脑损伤过程中, 基质金属蛋白酶破坏血管基膜的完整性, 促进中性粒细胞和炎症因子的迁移, 引起继发性脑损伤。

目的: 观察大鼠局部脑缺血模型中不同缺血时间下基质金属蛋白酶2/9活性及紧密连接蛋白的降解规律。

方法: 将39只雄性SD大鼠随机均分为3组, 采用改良线栓法建立大脑中动脉缺血(脑卒中)模型, 即分离颈外动脉, 采用经颈外动脉插入线栓进入颈内动脉最终到达大脑中动脉的方法, 3组缺血时间分别为3, 5, 7 h, 再灌注后2 h, 测试各组 Zea-Longa 和 Ludmila Belayev 神经功能学评分, 脑组织梗死面积、基质金属蛋白酶2/9活性及紧密连接蛋白5的降解。

结果与结论: 随着缺血时间的延长, 脑梗死面积逐渐增大, 组间两两比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 随着缺血时间的延长, 中枢神经系统损伤逐渐加重, 组间两两比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 随着缺血时间的延长, 基质金属蛋白酶2/9的活性逐渐增强, 组间两两比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 随着缺血时间的延长, 紧密连接蛋白5的表达逐渐减少。说明长时间缺血后, 脑组织的进行性损伤引起基质金属蛋白酶2/9活化的逐渐增加及紧密连接蛋白5的逐渐降解。

梁佳, 戚智锋, 师文娟, 刘克建. 大鼠脑缺血模型中基质金属蛋白酶2/9活化增加及紧密连接蛋白逐渐降解[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(27):4322-4327.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.27.011

The increased activation of matrix metalloproteinase 2/9 and gradual degradation of claudin in rat models of middle cerebral artery ischemia

Liang Jia¹, Qi Zhi-feng², Shi Wen-juan², Liu Ke-jian²(¹Science Experimental Center of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ²Cerebrovascular Diseases Research Institute, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China)

Abstract

BACKGROUND: During the process of acute brain injury after stroke, matrix metalloproteinase can undermine the integrity of vascular basement membrane, promote the migration of neutrophils and inflammatory factors, and cause secondary brain injury.

OBJECTIVE: To investigate the activation of matrix metalloproteinase 2/9 and the degradation rule of claudin in rat models of middle cerebral artery ischemia at different ischemic durations.

METHODS: Thirty-nine male SD rats were randomly divided into three groups according to different ischemic

梁佳, 女, 1981年生, 辽宁省锦州市人, 汉族, 实验师, 辽宁医学院科学实验中心工作, 主要从事脑血管病损伤与治疗方面的研究。

通讯作者: 刘克建, 教授 首都医科大学宣武医院脑血管病研究所, 北京市 100053

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)27-04322-06

稿件接受: 2015-05-20

http://www.crter.org

Liang Jia, Studying for doctorate, Science Experimental Center of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Corresponding author: Liu Ke-jian, Professor, Cerebrovascular Diseases Research Institute, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China

Accepted: 2015-05-20

durations (3, 5 and 7 hours). Middle cerebral artery occlusion (stroke) model was established using modified suture method, *i.e.*, separation of the external carotid artery, inserting the suture into the internal carotid artery through the external carotid artery, and eventually reaching the middle cerebral artery. The ischemic duration in these three groups was respectively 3, 5 and 7 hours. After 2 hours of reperfusion, Zea-Longa score and Ludmila Belayev score, brain infarct area, matrix metalloproteinase 2/9 activities and claudin 5 degradation were determined in each group.

RESULTS AND CONCLUSION: With the extension of ischemic duration, brain infarct area gradually increased, central nervous system damage gradually aggravated, matrix metalloproteinase 2/9 activities gradually increased, and claudin-5 expression gradually decreased. There were significant differences between any two ischemic durations in terms of each of above-mentioned indices. The results indicate that after long duration of ischemia, the progressive damage of brain tissue can cause the gradual increase of activation of matrix metalloproteinase 2/9 and the gradual degradation of claudin 5.

Subject headings: Cerebral Ischemia; Matrix Metalloproteinase 2; Matrix Metalloproteinase 9; Claudin

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81171242; a grant from Principal Foundation of Liaoning Medical University of China, No. XZJJ20140105

Liang J, Qi ZF, Shi WJ, Liu KJ. The increased activation of matrix metalloproteinase 2/9 and gradual degradation of claudin in rat models of middle cerebral artery ischemia. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(27):4322-4327.

0 引言 Introduction

缺血性脑血管病具有高发病、高致残和高死亡率的特点。中国脑卒中发病率排名世界第一,同时,随着中国人口老龄化,脑血管病的发病率更有逐年上升趋势。急性缺血性卒中会导致脑血流量和脑内代谢的不均一改变。人类脑组织和网络结构中约1万亿个神经元占据了静息状态下全身血流量的15%,耗氧量是全身的20%,意味着脑组织对缺氧或缺血状态特别敏感。由于脑组织对缺氧和缺血的敏感性,科学家们一直致力于寻找可以在脑卒中后尽早对抗生理损伤的治疗策略。通过几十年的研究,已发现了1 000多种神经保护剂,包括兴奋性氨基酸拮抗剂^[1]、自由基清除剂^[2-4]、钙离子通道抑制剂和生长因子^[5-8]。临床上对此类疾病治疗的目标是预防和控制并发症,其措施大部分也仅局限于溶栓^[9-11]、抗凝和利用脑保护药物等对症处理^[12-14],尚缺乏有效治疗手段。

目前,研究局灶性缺血性脑血管病的动物模型基本包括两种:一种为线栓法,另一种为血栓模型^[15],两种模型各有利弊,均不能完全模拟临床的脑梗死过程。血栓模型多用来研究溶栓效果,其缺点是再灌注时间不可控制,损伤程度不均一。线栓模型多用来研究与再灌注时间相关的实验,与血栓模型相比,其优点是再灌注时间可以控制,损伤程度相对均一。本课题主要研究不同脑缺血时间对脑组织的损伤,并不是研究其溶栓治疗,线栓模型更容易控制再灌注时间来模拟时间窗,可以更好地排除血栓溶解速度不同等因素的干扰,因此选用线栓模型。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是一组含Zn²⁺并参与降解包括骨在内的全身各种组织细胞外基质的蛋白水解酶家族。作为酶原分泌, MMPs必须被切割后才能完全活化。MMPs被认为是经典的基质降解酶,参与许多生理过程^[16-17],但其在缺血性神经炎症^[18]、多发性硬化症^[19]、感染及脑肿瘤等疾病中部分参与了血脑屏障的开放^[20-21]。脑损伤可引起MMPs的异常调节,通过基质物质的消化中断细胞生存所必须的细胞-细胞或细胞-基质间的相互作用^[22]。尤其, MMP-2和MMP-9(也被称做明胶

酶A和明胶酶B或者IV型胶原)在脑缺血中表达上调,与血脑屏障损伤和脑水肿形成联系紧密^[23-24]。本实验采用大鼠大脑中动脉栓塞模型,研究脑局灶性缺血不同时间点脑梗死面积的变化及MMP-2/9活性的变化规律,以及与血管紧密连接蛋白5降解的关系,探讨脑缺血损伤机制,为临床提供新的治疗靶点。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 造模动物及材料

实验动物: 选用健康成年雄性SD大鼠41只, SPF级, 体质量280-320 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证: SCXK(京)2008-0001。恒温条件下饲养, 术前禁食12 h, 不禁水, 将造模成功动物按照随机分组的原则分为缺血3 h组、缺血5 h组和缺血7 h组, 每组13只。

试剂与仪器: 伊文思蓝、明胶、2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑蓝(TTC)(Sigma); 手术显微镜(Carl Zeiss); 紧密连接蛋白5(Invitrogen); 凝胶成像系统(Bio-Rad); 多功能酶标仪(Thermo); 荧光显微镜(Leica公司, Germany); 小动物麻醉机。

1.2 造模方法 大鼠大脑中动脉栓塞模型制作参考改良的Zea Longa的方法, 用体积分数30%O₂、体积分数70%N₂O混合5%恩氟烷于麻醉诱导盒中对动物进行诱导麻醉, 待动物出现麻醉体征后迅速从诱导盒中取出固定, 并进行气管插管, 连接呼吸机后使用体积分数30%O₂、体积分数70%N₂O混合2%恩氟烷维持动物麻醉状态。使用反馈式保温毯维持动物体温在37℃左右。取大鼠右后腹股沟部位备皮消毒后纵向切开皮肤约1.5 cm, 分离皮下脂肪及肌肉, 暴露股动脉, 永久结扎股动脉远心端, 临时结扎股动脉近心端, 于二者之间剪一斜行小口, 将PE-50导管插入股动脉并固定后开放股动脉近心端血流, 连接BIOPAC 150多导生理记录仪, 持续记录股动脉平均动脉压。颈部正中备皮消毒后切开皮肤, 分离皮下腺体, 暴露胸锁乳突肌、胸骨舌骨肌、二腹肌, 于三者之间找到颈动脉

鞘, 小心分离颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉, 用电凝阻断甲状腺上动脉、枕动脉后, 永久结扎颈外动脉远心端, 临时结扎颈总动脉及颈内动脉, 后剪短颈外动脉, 于颈外动脉残端处备1个活结以固定线栓, 后于颈外动脉残端处剪一小口。麻醉药物30 min后, 将线栓于颈外动脉残端剪口处插入颈总动脉, 稍微系紧固定线栓的活结后反转将线栓插入颈内动脉, 松开临时结扎的颈总动脉及颈内动脉, 将线栓经颈内动脉缓慢插入大脑中动脉, 线栓插入约2.0 cm, 感到阻力后将颈外动脉残端上的活结系紧以固定线栓。梗死3, 5, 7 h后, 小心将线栓拔出进行再灌注。梗死过程中观察记录血压、肛温变化, 及时调整麻醉深度及保暖措施, 使各组动物均在生命体征正常情况下接受手术及梗死过程。随后缝合颈部及腹股沟处的皮肤切口, 待动物清醒可自由活动后将动物放回笼具内观察饲养。

1.3 造模成功的检测标准 动物清醒后, 根据Zea-Longa评分(5分法)进行神经功能评分, 评分标准为: 0分, 无神经功能缺损症状; 1分, 不能伸展对侧前爪; 2分, 身体向对侧转圈; 3分, 身体向对侧倾倒; 4分, 意识丧失, 不能自发行走; 5分, 动物死亡。评分为3时入选, 证明造模成功。

1.4 神经功能评分 各组再灌注2 h, 处死前用Zea-Longa评分法及Ludmila Belayev评分法进行神经评分。

Ludmila Belayev评分: 参照Ludmila Belayev提出的12分评分法: ①姿势反射测验, 即提尾悬空实验: 无明显神经功能缺失为0分, 梗死对侧肢体屈曲为1分, 侧推实验阳性为2分。②肢体放置实验, 包括视觉亚实验、触觉亚实验及本体觉亚实验, 动物前肢放置实验总分范围为0-10分, 功能损伤越重得分越高。

1.5 大鼠脑梗死面积的计算 再灌注2 h后, 在水合氯醛的麻醉下, 将每组4只成活的大鼠用250 mL预冷的PBS经心脏灌流, 取脑组织进行检测, 于大鼠脑切片模具作冠状切片, 切取5片。将第1, 3, 5片脑片置于2% TTC染色液室温下染色10 min, 缺血脑组织呈白色, 正常脑组织染成红色。梗死面积百分数=(梗死侧大脑半球面积-梗死侧非梗死区脑组织面积)/正常侧大脑半球面积×100%。

1.6 明胶酶谱法分析脑组织中MMP-2/9的活化 取2, 4片脑片裂解液加入到含有1 g/L明胶的10%SDS-PAGE中, 电泳结束后2.5% Triton-X100洗3次, 37 °C 孵育24 h, 考马斯亮蓝染胶, 以人源MMP-9作为标准品。

1.7 免疫组织荧光分析紧密连接蛋白 claudin-5 的表达 取各组剩余9只动物, 灌流后取脑组织, 制备冰冻切片, 用于紧密连接蛋白5的检测。冰冻切片固定后, BSA 20-25 °C 封闭1 h, 加入一抗兔抗claudin-5(1:500)4 °C 过夜。次日, FITC-标记的山羊抗兔的二抗孵育2 h, PBS漂洗后, 封固, 在荧光显微镜拍照。

1.8 统计学分析 用SPSS 16.0软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对 t 检验, 变量分析ANOVA进行分析, $P < 0.05$ 表明差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 造模成功动物数量及过程 动物在手术过程中, 肛温、平均动脉压平稳, 数据间无明显差异。生理指标检测显示, 各组动物是在生理状况正常、状态一致的情况下接受造模过程, 排除因温度、血压对脑缺血后脑组织损伤程度的影响。除2只动物没有向对侧转圈以外, 其余动物都模型成功, 造模成功率为94%。

2.2 造模过程中对材料的改进 实验所用的线栓为硅胶线栓, 较常规应用的鱼线烧灼成圆头的线栓, 可以更加精确控制线栓的直径及长度, 并且能够减少因为鱼线硬度过大引起的血管破裂出血, 提高模型的稳定性, 提高局部脑缺血动物模型的成功率。

2.3 模型更接近临床实践 改良后的线栓模型, 将颈外动脉分离, 采用经颈外动脉插入线栓进入颈内动脉最终到达大脑中动脉的方法, 较传统的经颈总动脉直接插入线栓的方法更能保证动物的再灌注效果, 更加能够模拟临床上的血管再通。

2.4 脑缺血进程中脑梗死面积的变化 脑缺血损伤区域主要累及皮质和基底节。TTC结果显示, 随着缺血时间的延长, 脑梗死面积逐渐增大(图1), 缺血3 h组与缺血5 h组、缺血5 h组与缺血7 h组脑梗死面积比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$), 见图2。

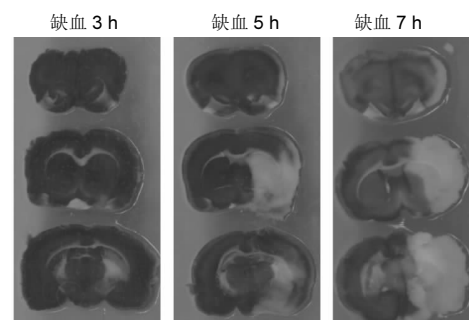


图1 SD大鼠大脑中动脉缺血进程中TTC染色图

Figure 1 TTC staining pattern of brain slices of rat models of middle cerebral artery ischemia with ischemia time

图注: 由上至下为同一只动物不同位置的脑片, 脑冠状切片2 mm。

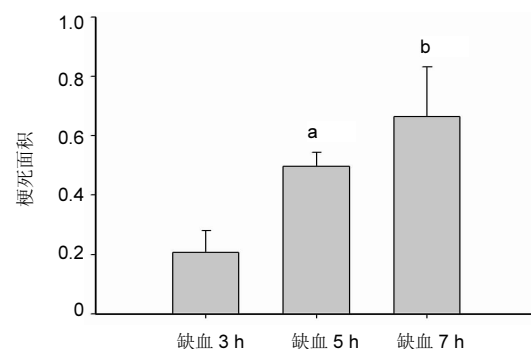


图2 SD大鼠大脑中动脉缺血进程中脑梗死面积的变化

Figure 2 The variation of brain infarct area of SD rat models of middle cerebral artery ischemia with ischemia time

图注: 与缺血3 h组比较, $^a P < 0.05$; 与缺血5 h组比较, $^b P < 0.05$ 。

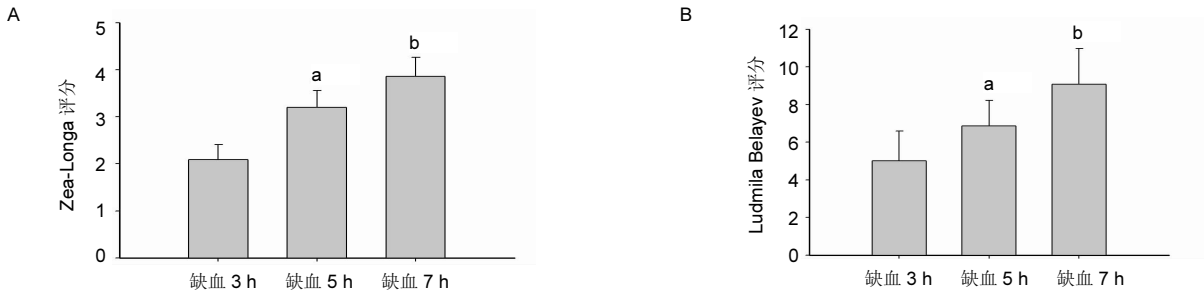


图 3 SD 大鼠大脑中动脉缺血进程中神经功能学评分的变化

Figure 3 The variation of neurological scores of SD rat models of middle cerebral artery ischemia with ischemia time

图注: 图中 A 为 Zea-Longa 评分, B 为 Ludmila Belayev 评分。与缺血 3 h 组比较, ^a $P < 0.05$; 与缺血 5 h 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

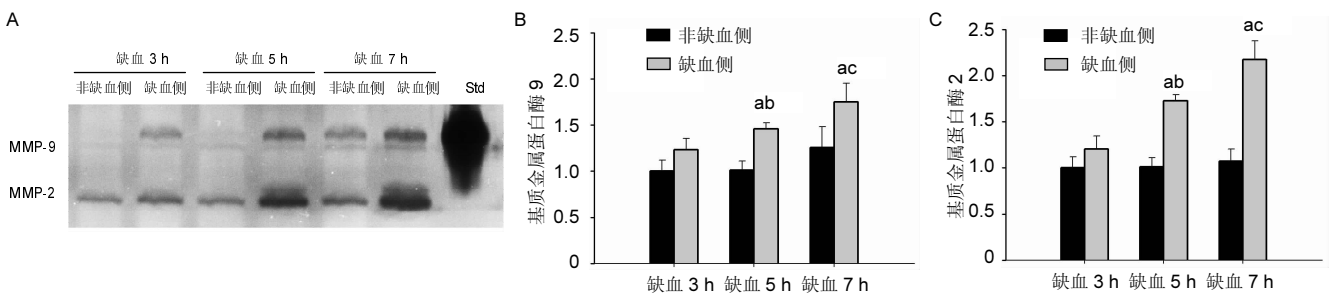


图 4 SD 大鼠大脑中动脉缺血进程中脑组织基质金属蛋白酶(MMP)2/9 活性的变化

Figure 4 The variation of matrix metalloproteinase 2/9 activities in brain tissue of SD rat models of middle cerebral artery ischemia with ischemia time

图注: 图中 A 为电泳图, Std 代表基质金属蛋白酶 9 标准品; B 为基质金属蛋白酶 9 相对表达量; C 为基质金属蛋白酶 2 相对表达量。与非缺血侧比较, ^a $P < 0.05$; 与缺血 3 h 组比较, ^b $P < 0.05$; 与缺血 5 h 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

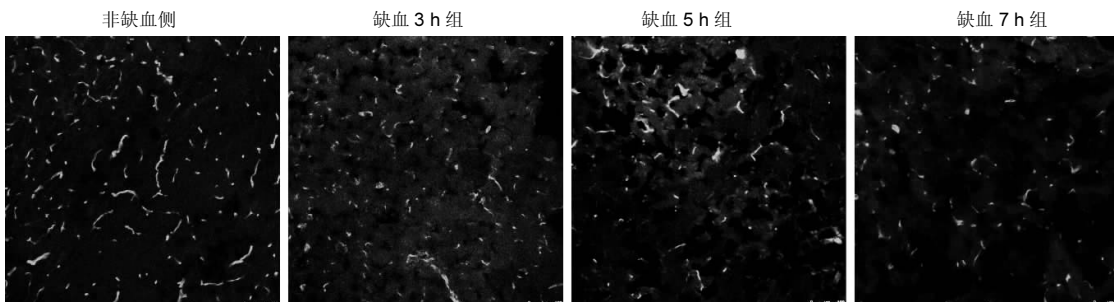


图 5 SD 大鼠大脑中动脉缺血进程中脑组织紧密连接蛋白 5 含量的变化(免疫荧光染色, $\times 20$)

Figure 5 The variation of claudin-5 expression in brain tissue of SD rat models of middle cerebral artery ischemia with ischemia time (immunofluorescence staining, $\times 20$)

图注: 非缺血侧紧密连接蛋白 5 的含量很多, 而缺血侧紧密连接蛋白 5 的含量随着缺血时间的延长逐渐减少, 并出现血管断裂现象。

2.5 不同缺血时间神经功能学评分的改变 采用两种方法评价不同缺血时间大鼠神经功能学的改变, 结果发现中枢神经系统损伤是随着缺血时间的延长逐渐加重, 缺血 3 h 组与缺血 5 h 组、缺血 5 h 组与缺血 7 h 组评分比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$), 见图 3。

2.6 不同缺血时间引起的明胶酶 MMP-2/9 的活性变化 在非缺血侧 3 个缺血时间点 MMP-2/9 的活性均很低, 而缺血侧 MMP-2/9 的活性随着缺血时间的延长逐渐增多(图 4)。同一缺血时间点, 缺血侧和非缺血侧 MMP-2/9 活性比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 缺血侧不同时间比较, 缺血 3 h 组与缺血 5 h 组、缺血 5 h 组与缺血 7 h 组明胶酶活性比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

2.7 不同缺血时间引起紧密连接蛋白 5 的变化 在非缺血

侧紧密连接蛋白 5 的含量很多, 而缺血侧紧密连接蛋白 5 的含量随着缺血时间的延长逐渐减少, 并出现血管断裂现象(图 5)。

3 讨论 Discussion

脑缺血后的溶栓治疗是目前急性脑缺血的治疗措施之一^[9], 但溶栓治疗长期以来受到质疑的一个主要原因是, 在溶栓时间窗外溶栓会增加继发性脑出血的风险。MMPs 在脑卒中后急性期的脑损伤过程中破坏血管基膜的完整性, 促进中性粒细胞和炎症因子的迁移, 引起继发性脑损伤^[25]。动物和人体实验已为缺血性脑卒中 MMP-9 诱导和 tPA 诱导出血性转化提供了强有力的证据^[26-27]。在啮齿类动物实验中, tPA 加剧了缺血诱导血脑屏障损伤, 增强了

MMP-9的蛋白水解酶活性^[28-29]。MMPs抑制剂可以减少动物模型中tPA治疗导致出血和死亡率的发生^[30]。人体实验显示在溶栓治疗后, 脑卒中患者血浆中高水平的MMP-9容易导致脑出血并发症^[25]。这些数据都表明tPA加重缺血后的血脑屏障损伤, 通过上调MMP-9的表达引起出血性转化并发症。

由于溶栓治疗具有严格的溶栓时间窗, 在发病后3 h内。因此本实验选择以缺血3 h为对照, 观察在溶栓时间窗外5 h和7 h后脑组织的损伤、神经功能学评分、MMP-2/9的活性和紧密连接蛋白5的变化。本实验所选用的动物模型为经典的大脑中动脉闭塞局部脑缺血模型, 采用改良后的线栓模型, 将颈外动脉分离, 采用经颈外动脉插入线栓进入颈内动脉最终到达大脑中动脉的方法, 较传统的经颈总动脉直接插入线栓方法更能保证动物的再灌注效果。再灌注后从颈总动脉直接通过颈内动脉供血, 而传统的颈总动脉插栓方法, 再灌注后直接结扎颈总动脉, 再灌注供血只能通过侧支循环, 不能达到与临床相似的再灌注效果, 所以本实验方法具有保证再灌注效果的优势。而且实验所用的线栓为硅胶线栓, 较常规采用的鱼线烧灼成圆头的线栓, 更加可以控制线栓的直径及长度, 并且能够减少因为鱼线硬度过大引起的血管破裂出血, 提高模型的稳定性, 提高局部脑缺血动物模型的成功率。本实验应用这一模型, 制作41只动物模型, 除了2只行为学没有出现向对侧转圈没有入组以外, 其余均造模成功, 并且非常稳定。

基础实验显示, 动物脑缺血后MMP-2和9表达显著增加, 与血脑屏障的破坏、水肿的形成及出血密切相关。MMP-9基因敲除大鼠脑梗死体积较野生型明显减小, 且血脑屏障的通透性降低^[31]。缺血再灌注促进MMP-2和9活性增强, 破坏了神经血管基质, 从而破坏了血脑屏障的完整性^[32]。除此之外, MMP-2, 9也能增加具有生物活性肿瘤坏死因子 α 的产生, 造成血脑屏障损害。提示干预缺血后产生的MMPs, 可以减轻缺血引起的血脑屏障基底膜的水解, 可以最大限度地降低对血脑屏障的破坏, 从而降低tPA引起的出血^[27]。

本实验结果发现, 在缺血3 h时脑梗死面积很小, 缺血5 h和7 h组的脑梗死面积随着缺血时间的延长逐渐增大, 神经功能学评分结果与TTC染色结果相似, 说明神经系统的损伤随着缺血时间的延长进行性加重。本实验采用明胶酶谱法检测MMP-2/9活性, 结果发现MMP-2/9的活性在脑缺血侧随着时间的延长逐渐增高, 同时还发现纤维连接蛋白5作为一种紧密连接蛋白与血脑屏障的通透性直接相关。很多研究表明, MMPs可以直接降解紧密连接蛋白, 引起血脑屏障损伤。本实验结果中发现紧密连接蛋白5的表达也随时间逐渐降低, 这一结果进一步证实MMP-9的活化不但引起脑组织损伤, 而且可以降解紧密连接蛋白, 引起血脑屏障的损伤。

综上, 本实验结果采用了改良后的大鼠大脑中动脉栓

塞模型模型, 保证了局部脑缺血再灌注模型的稳定性, 得出的结果更加能够反映临床上的缺血再灌注情况, 实验数据显示长时间缺血后脑组织的进行性损伤引起MMP-2/9的活化增加, MMP-2/9的活性增加不仅会引起神经损伤, 还可以引起血脑屏障损伤。MMP-2/9介导的脑组织损伤将为缺血性脑卒中靶点治疗提供实验依据。

致谢: 感谢国家自然科学基金委和辽宁医学院院长基金的基金资助!

作者贡献: 梁佳、刘克建进行实验设计, 实验实施为梁佳, 实验评估为戚智锋, 资料收集为师文娟, 梁佳成文, 刘克建审核, 刘克建对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 符合实验动物伦理要求。

学术术语: 大脑中动脉闭塞局部脑缺血模型-采用改良后的线栓模型, 将颈外动脉分离, 采用经颈外动脉插入线栓进入颈内动脉最终到达大脑中动脉的方法, 较传统的经颈总动脉直接插入线栓方法更能保证动物的再灌注效果。再灌注后从颈总动脉直接通过颈内动脉供血, 而传统的颈总动脉插栓方法, 再灌注后直接结扎颈总动脉, 再灌注供血只能通过侧支循环, 不能达到与临床相似的再灌注效果, 所以本实验方法具有保证再灌注效果的优势。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Banerjee P, Jana S, Chakraborty S, et al. Inflammation and MMPs in alcohol-induced liver diseases and protective action of antioxidants. *Indian J Biochem Biophys.* 2013; 50(5): 377-386.
- [2] Cavdar Z, Ozbal S, Celik A, et al. The effects of alpha-lipoic acid on MMP-2 and MMP-9 activities in a rat renal ischemia and re-perfusion model. *Biotech Histochem.* 2014; 89(4):304-314.
- [3] Tang X, Zhong W, Tu Q, et al. NADPH oxidase mediates the expression of MMP-9 in cerebral tissue after ischemia-reperfusion damage. *Neurol Res.* 2014; 36(2):118-125.
- [4] Li M, Ma RN, Li LH, et al. Astragaloside IV reduces cerebral edema post-ischemia/reperfusion correlating the suppression of MMP-9 and AQP4. *Eur J Pharmacol.* 2013; 715(1-3): 189-195.
- [5] Cao J, Geng L, Wu Q, et al. Spatiotemporal expression of matrix metalloproteinases (MMPs) is regulated by the Ca^{2+} -signal transducer S100A4 in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm. *PLoS One.* 2013; 8(7):e70057.
- [6] Moniche F, Montaner J, Gonzalez-Marcos JR, et al. Intra-arterial bone marrow mononuclear cell transplantation correlates with GM-CSF, PDGF-BB, and MMP-2 serum levels in stroke patients: results from a clinical trial. *Cell Transplant.* 2014; 23 Suppl 1:S57-S64.
- [7] Bai X, Zhang X, Chen L, et al. Protective effect of naringenin in experimental ischemic stroke: down-regulated NOD2, RIP2, NF-kappaB, MMP-9 and up-regulated claudin-5 expression. *Neurochem Res.* 2014; 39(8):1405-1415.

- [8] Sapojnikova N, Kartvelishvili T, Asatiani N, et al. Correlation between MMP-9 and extracellular cytokine HMGB1 in prediction of human ischemic stroke outcome. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842(9):1379-1384.
- [9] Tsuji K, Aoki T, Tejima E, et al. Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2005; 36(9):1954-1959.
- [10] Zhao H, Wang R, Wu X, et al. Erythropoietin delivered via intra-arterial infusion reduces endoplasmic reticulum stress in brain microvessels of rats following cerebral ischemia and reperfusion. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2015; 10(1): 153-161.
- [11] Wang R, Wu X, Liang J et al. Intra-artery infusion of recombinant human erythropoietin reduces blood-brain barrier disruption in rats following cerebral ischemia and reperfusion. *Int J Neurosci*. 2014. [Epub ahead of print]
- [12] Won S, Lee JH, Wali B, et al. Progesterone attenuates hemorrhagic transformation after delayed tPA treatment in an experimental model of stroke in rats: involvement of the VEGF-MMP pathway. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014; 34(1): 72-80.
- [13] Wang L, Li Z, Zhang X, et al. Protective effect of shikonin in experimental ischemic stroke: attenuated TLR4, p-p38MAPK, NF-kappaB, TNF-alpha and MMP-9 expression, up-regulated claudin-5 expression, ameliorated BBB permeability. *Neurochem Res*. 2014; 39(1):97-106.
- [14] Dong W, Qi Z, Liang J, et al. Reduction of zinc accumulation in mitochondria contributes to decreased cerebral ischemic injury by normobaric hyperoxia treatment in an experimental stroke model. *Exp Neurol*. 2015. [Epub ahead of print]
- [15] Marinescu M, Bouley J, Chueh J, et al. Clot injection technique affects thrombolytic efficacy in a rat embolic stroke model: implications for translaboratory collaborations. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014; 34(4):677-682.
- [16] Bai X, Zhang X, Chen L, et al. Protective effect of naringenin in experimental ischemic stroke: down-regulated NOD2, RIP2, NF-kappaB, MMP-9 and up-regulated claudin-5 expression. *Neurochem Res*. 2014; 39(8):1405-1415.
- [17] Golab P, Boguszewska-Czubara A, Kielbus M, et al. The rtPA increases MMP-9 activity in serum during ischaemic stroke. *Neurol Neurochir Pol*. 2014; 48(5):309-314.
- [18] Maradni A, Khoshnevisan A, Mousavi SH, et al. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) and MMP inhibitors on intracranial aneurysms: a review article. *Med J Islam Repub Iran*. 2013; 27(4):249-254.
- [19] Lukaszewicz-Zajac M, Mroczo B, Slowik A. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neural Transm*. 2014; 121(11):1387-1397.
- [20] Chao HM, Chuang MJ, Liu JH, et al. Baicalein protects against retinal ischemia by antioxidation, antiapoptosis, downregulation of HIF-1alpha, VEGF, and MMP-9 and upregulation of HO-1. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2013; 29(6): 539-549.
- [21] Lukaszewicz-Zajac M, Mroczo B, Kornhuber J, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in the tumors of central nervous system (CNS). *J Neural Transm*. 2014; 121(5):469-477.
- [22] Rosell A, Ortega-Aznar A, varez-Sabin J, et al. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*. 2006; 37(6):1399-1406.
- [23] Liang J, Qi Z, Liu W, et al. Normobaric hyperoxia slows blood-brain barrier damage and expands the therapeutic time window for tissue-type plasminogen activator treatment in cerebral ischemia. *Stroke*. 2015; 46(5):1344-1351.
- [24] Zhao H, Wang R, Wu X, et al. Erythropoietin delivered via intra-arterial infusion reduces endoplasmic reticulum stress in brain microvessels of rats following cerebral ischemia and reperfusion. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2015; 10(1):153-161.
- [25] Inzitari D, Giusti B, Nencini P, et al. MMP9 variation after thrombolysis is associated with hemorrhagic transformation of lesion and death. *Stroke*. 2013; 44(10):2901-2903.
- [26] Jin X, Liu J, Yang Y, et al. Spatiotemporal evolution of blood brain barrier damage and tissue infarction within the first 3h after ischemia onset. *Neurobiol Dis*. 2012; 48(3):309-316.
- [27] Liu J, Jin X, Liu KJ, et al. Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage. *J Neurosci*. 2012; 32(9):3044-3057.
- [28] 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 Flow Metab*. 2007; 27(4):697-709.
- [29] Latour LL, Kang DW, Ezzeddine MA, et al. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol*. 2004; 56(4):468-477.
- [30] Yang Y, Thompson JF, Taheri S, et al. Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis during recovery. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013; 33(7):1104-1114.
- [31] Asahi M, Asahi K, Jung JC, et al. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000; 20(12):1681-1689.
- [32] Wang X, Tsuji K, Lee SR, et al. Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. *Stroke*. 2004; 35(11 Suppl 1): 2726-2730.