

海带多糖干预对放射性脑损伤模型小鼠血脑屏障的保护

https://doi.org/10.12307/2022.614

敖 翩¹, 赵 歆¹, 玉洪荣², 张思琴¹, 张馨月², 谷卫丽², 韦 力^{1, 2}

投稿日期: 2021-02-27

采用日期: 2021-04-10

修回日期: 2021-09-27

在线日期: 2021-11-08

中图分类号:

R459.9; R318; R14

文章编号:

2095-4344(2022)20-03158-06

文献标识码: B

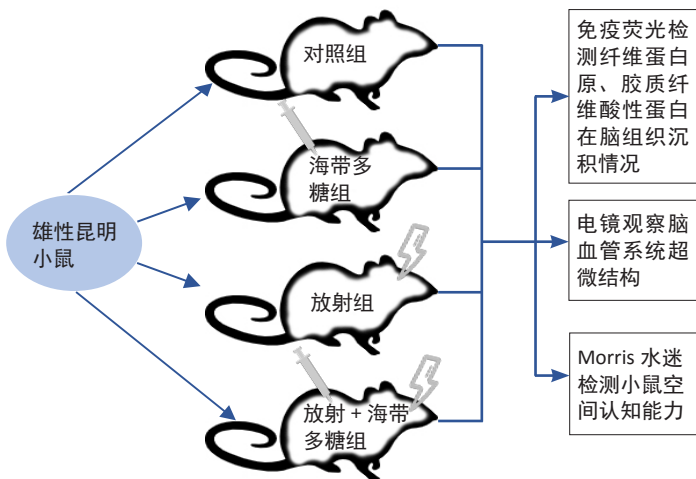
文章快速阅读:

文章亮点一

△放射引起血脑屏障结构及功能损伤, 最终打破中枢神经系统动态平衡, 因此寻求一种有效防护放射诱导的血脑屏障破坏的方法尤为重要。

△海带多糖作为一种天然多糖, 能够有效保护脑胶质细胞及微血管内皮细胞。但其对放射引起的血脑屏障功能失调是否具有保护作用及其机制尚未明晰。

△实验创新发现海带多糖能够维持血脑屏障结构的稳定, 可为临床前期治疗提供有效参考。



文题释义:

血脑屏障: 指脑毛细血管壁与神经胶质细胞形成的血浆与脑细胞之间的屏障和由脉络丛形成的血浆和脑脊液之间的屏障, 这些屏障能够阻止某些物质由血液进入脑组织。

纤维蛋白原: 是由肝细胞合成和分泌的一种糖蛋白, 主要参与凝血和止血过程。高纤维蛋白原是各种血栓性疾病的重要危险因素, 被认为是疾病状态的标志物, 脑组织中大量纤维蛋白原的沉积已被广泛用作血脑屏障破坏的可靠标记物。

摘要

背景: 放射治疗是脑部肿瘤的主要治疗手段之一, 可显著提高临床疗效, 但其对正常脑组织所产生的副反应严重影响了患者的生活质量。因此在提高脑肿瘤组织放射疗效的前提下, 寻求一种能有效预防正常脑组织损伤的方式并对其机制进行研究变得尤为重要。

目的: 探讨海带多糖干预对小鼠放射诱导脑损伤的影响及机制。

方法: 选取96只SPF级雄性昆明小鼠, 随机分为4组($n=24$), 即对照组、海带多糖组、放射组、放射+海带多糖组。放射前7 d连续给药预处理后, 采用总剂量为30 Gy的⁶⁰Co γ 射线对小鼠脑部进行定位照射以建立放射性脑损伤模型。免疫荧光法检测纤维蛋白原、星形胶质细胞在脑组织中的活化及沉积情况, 通过电镜观察脑血管系统超微结构变化, 观察各组小鼠干预前后在Morris水迷宫中的运动轨迹。

结果与结论: ①放射组小鼠纤维蛋白原在脑组织中的沉积明显增加, 星形胶质细胞明显被激活; 而放射+海带多糖组小鼠纤维蛋白原的沉积表达明显得到缓解; ②电镜观察发现, 放射组小鼠脑血管内皮细胞肿胀、基膜断裂脱落、血脑屏障结构发生改变; 放射+海带多糖组小鼠血脑屏障超微结构形态与对照组相似, 未见明显差别; ③水迷宫结果显示, 放射组小鼠穿过平台区的次数和中环活动时间明显减少($P < 0.05$); 而放射+海带多糖组小鼠在中心区及平台区的活动呈增加趋势; ④提示海带多糖对放射性脑损伤的保护作用可能是通过维持血脑屏障结构的稳定及调节其通透性所实现的。

关键词: 海带多糖; 纤维蛋白原; 放射性脑损伤; 星形胶质细胞; 血脑屏障; 认知功能; 紧密连接

缩略语: 胶质纤维酸性蛋白: glial fibrillary acidic protein, GFAP

Laminaria japonica polysaccharide protects radiation-induced brain injury by regulating the blood-brain barrier in mice

Ao Pian¹, Zhao Xin¹, Yu Hongrong², Zhang Siqin¹, Zhang Xinyue², Gu Weili², Wei Li^{1, 2}

¹The Affiliated Stomatological Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Department of Human Anatomy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Ao Pian, Master, Physician, The Affiliated Stomatological Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

¹广西医科大学附属口腔医院, 广西壮族自治区南宁市 530021; ²广西医科大学人体解剖学教研室, 广西壮族自治区南宁市 530021

第一作者: 敖翩, 女, 1995年生, 湖南省湘潭市人, 汉族, 2018年长沙医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事放射损伤方面的研究。

通讯作者: 韦力, 硕士, 教授, 广西医科大学附属口腔医院, 广西壮族自治区南宁市 530021; 广西医科大学基础医学院人体解剖学教研室, 广西壮族自治区南宁市 530021

https://orcid.org/0000-0002-9856-583X (敖翩)

基金资助: 国家自然科学基金(81460479), 项目负责人: 韦力; 广西自然科学基金(2018JJA140600), 项目负责人: 韦力

引用本文: 敖翩, 赵歆, 玉洪荣, 张思琴, 张馨月, 谷卫丽, 韦力. 海带多糖干预对放射性脑损伤模型小鼠血脑屏障的保护 [J].

中国组织工程研究, 2022, 26(20):3158-3163.



Corresponding author: Wei Li, Master, Professor, The Affiliated Stomatological Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; Department of Human Anatomy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Radiotherapy is one of the main methods for the treatment of brain tumors, which significantly improves the clinical efficacy. However, its side effects on normal brain tissue seriously affect the quality of life of patients. Therefore, it is particularly important to find a way to effectively prevent the damage of normal brain tissue and to study its mechanism.

OBJECTIVE: To explore the effect and mechanism of *Laminaria japonica* polysaccharide intervention on radiation-induced brain injury in mice.

METHODS: Ninety-six male Kunming mice, SPF grade, were randomly divided into four groups ($n=24$ per group): a control group, an irradiation group, a *Laminaria japonica* polysaccharide (LJP) group, and an irradiation+LJP group. All mice were given 7-day continuous administration before radiation, and then ^{60}Co γ -rays (30 Gy) were used to establish a radiation brain injury model in mice. Immunofluorescence method was used to detect the expression of fibrinogen and activation and deposition of astrocytes in the brain tissue. The ultrastructural changes of the cerebrovascular system were investigated under transmission electron microscope. The motion trails of the mice in the Morris water maze were observed before and after treatment.

RESULTS AND CONCLUSION: After radiotherapy, the expression of fibrinogen in brain tissue was significantly increased, and astrocytes were obviously activated, while the radiation plus LJP intervention significantly relieved the deposition of fibrinogen in mice. Under the electron microscope, the brain vascular endothelial cells swelled, the basement membrane was broken and shed, and the blood-brain barrier structure changed after radiation. However, the ultrastructural morphology of the mouse blood-brain barrier in the radiation+LJP group was similar to that of the control group. After radiation, the number of times and activity time of the mice passing through the platform area was significantly reduced in the Morris water maze test ($P < 0.05$), while the activities of the radiation mice in the platform area showed an increasing trend after the LJP intervention. These results suggest that the protective effect of LJP on radiation-induced brain injury may be mainly achieved by maintaining the stability of the blood-brain barrier structure and regulating its permeability.

Key words: *Laminaria japonica* polysaccharide; fibrinogen; radiation-induced brain injury; astrocyte; blood-brain barrier; cognitive function; tight junction

Funding: The National Natural Science Foundation of China, No. 81460479 (to WL); The Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 2018JJA140600 (to WL)

How to cite this article: AO P, ZHAO X, YU HR, ZHANG SQ, ZHANG XY, GU WL, WEI L. *Laminaria japonica* polysaccharide protects radiation-induced brain injury by regulating the blood-brain barrier in mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(20):3158-3163.

0 引言 Introduction

放射性脑病是脑部肿瘤放射治疗后严重的并发症, 接受放射治疗后约有 50% 的患者存在迟发性的放射性脑损伤^[1-2], 可引起头疼、恶心、嗜睡及神经损伤等症状^[3], 严重影响患者的生活生存质量。目前其发病机制尚未完全明确, 作者所在课题组前期研究成果显示, 放射引起血脑屏障结构及功能明显损伤, 直接或间接引起血脑屏障通透性增加^[4], 其机制可能是通过引起血管内皮细胞损伤、炎症反应增强从而引起血脑屏障功能失调^[5-6], 最终破坏中枢神经系统的化学组成和血液成分的动态平衡, 与文献报道一致^[7]。此外, 也有学者认为放射导致血脑屏障通透性改变可能主要与内皮细胞间的紧密连接结构改变、DNA 链永久断裂及微环境毒性相关^[8-10], 血脑屏障不仅可以通过对中枢神经系统稳态的精确控制以保证神经元功能, 还可以保护神经组织免受毒素和病原体的侵害。因此其特性的改变是病理学和不同神经疾病进展的重要提示, 了解血脑屏障的重要组成部分以及屏障的调节特性对于有效把握大脑疾病的发生发展至关重要。目前对于放射性脑损伤的治疗方法各异, 但尚未有报道证实其确切的临床疗效, 因此寻求一种能够最大限度减少放射性脑损伤发生及有效的干预手段是目前的研究重点。

海带多糖是一种从海带中提取出的天然有效植物多糖, 拥有独特的硫酸化结构及多种生物活性, 具有抗血栓、抗炎、抗氧化、抗辐射、改善免疫系统等作用^[11-13]。前期研究证明, 海带多糖能够有效调节脑组织皮质中小胶质细胞的活化并对微血管内皮细胞产生保护作用^[14-16], 但是海带多糖对放射引起的血脑屏障功能失调是否具有保护作用尚未明晰。此次研究通过观察脑血管系统的超微结构及相关标志指标变化, 来

探寻海带多糖对放射诱导脑损伤的保护作用及可能机制, 以期为临床前期治疗方案的设计提供有效参考。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机区组设计动物实验, 组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 9 月至 2021 年 1 月在广西医科大学 104 馆神经解剖实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 96 只 2 月龄 SPF 级雄性昆明小鼠, 体质量 (30 ± 2) g, 购于广西医科大学动物实验中心, 动物许可证号: SYXK(桂)2020-0004。饲养环境 12 h 明暗交替、自由饮水与摄食。动物实验经广西医科大学动物伦理委员会批准, 并按照《国家卫生研究院实验动物关爱与使用指南》进行。

1.3.2 试剂与设备 海带多糖, 纯度大于 98%(美国 Sigma 公司); 抗 Fibrinogen 抗体(美国 Thermofisher 公司); 山羊抗胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体(英国 Abcam 公司); CWXJ80 型 ^{60}Co γ 照射源(烟台), 由广西医科大学第二附属医院提供, 照射参数 1 250 cGy/min; HM500 冰冻切片机(德国 Leica 公司); Morris 水迷宫(中国科学研究院); 荧光显微镜(德国 Leica 公司); H-7650 透射电子显微镜(日本日立公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 96 只小鼠参照随机数表法分为 4 组: 对照组、海带多糖组、放射组、放射 + 海带多糖组, 每组 24 只。

1.4.2 药物干预 将海带多糖与生理盐水配制成浓度为 0.1% 的海带多糖溶液, 于放射前 7 d 连续腹腔注射给药, 注射剂

量按小鼠体质量计算 (100 mg/kg), 对照组及放射组同等条件下注射生理盐水。

1.4.3 放射性脑损伤模型建立 所有动物适应性喂养 1 周, 海带多糖或生理盐水于放射前 7 d 连续给药干预后进行放射造模。采用 1% 戊巴比妥钠 (80 mg/kg) 对小鼠进行腹腔注射麻醉, 将其置于自制模具内并固定于放射治疗台上, 采用预先订制铅板遮挡双眼、鼻腔和口腔等区域, 采用 ^{60}Co γ 射线进行照射, 源皮距 80 cm。放射组及放射 + 海带多糖组小鼠照射剂量 15 Gy/次, 隔日照射, 共 2 次计 30 Gy; 对照组及海带多糖组小鼠在同等条件下进行 0 Gy 照射。

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的	建立放射诱导脑损伤模型, 进一步研究放射及药物干预对脑组织损伤的作用及其机制
选择动物的条件	①选择 SPF 级健康正常无病的小鼠; ②选择昆明小鼠均为雄性、体质量控制在 (30±2) g, 以保证统一性; ③均选择大约 2 月龄小鼠, 以保证体内机能代谢等因素近一致
模型与所研究疾病的关系	对小鼠建立放射性脑损伤模型以模拟临床脑部肿瘤接受放射治疗后所引起脑组织的病理状态, 该模型的建立为疾病机制的深入研究及对其防治提供了参照依据
动物来源及品系	SPF 级雄性昆明小鼠购于广西医科大学动物实验中心, 动物许可证号: SYXK(桂)2020-0004
造模技术描述	将小鼠置于自制模具内并固定于放射治疗台上, 采用预先订制铅板阻挡避开双眼、鼻腔和口腔等区域, 采用总剂量为 30 Gy 的 ^{60}Co γ 射线定位脑部进行全脑照射, 源皮距 80 cm
动物数量及分组方法	将 96 只小鼠随机分为 4 组, 即对照组、海带多糖组、放射组、放射 + 海带多糖组, 每组 24 只
造模成功评价指标	通过放射后小鼠体质量改变、水迷宫实验结果、脑组织苏木精-伊红染色结果及超微结构改变以确定造模是否成功
造模后观察指标	免疫荧光检测纤维蛋白原、GFAP 蛋白的表达; 电镜观察小鼠血脑屏障结构变化
造模后动物处理	造模后小鼠在深度麻醉下颈椎脱臼处死后取材
伦理委员会批准	动物实验方法经广西医科大学动物伦理委员会批准, 批准号: 202009015

1.4.4 免疫荧光检测 照射后 7, 30 d 从各组随机抽取 5 只小鼠, 采用 1% 戊巴比妥钠 (80 mg/kg) 腹腔注射麻醉后灌注取脑, 置于 40 g/L 多聚甲醛中固定 24 h, 一半组织脱水包埋制作石蜡切片 (4 μm), 另一半液氮中保存, 使用冰冻切片进行冠状位连续切片 (25 μm)。按照免疫荧光标准步骤进行, 一抗分别选用山羊抗纤维蛋白原抗体 (1 : 100)、山羊抗 GFAP 抗体 (1 : 500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜孵育 (12-14 h), 复温后滴加对应荧光二抗 (1 h), DAPI 染色后防淬灭荧光封固剂进行封固, 倒置式荧光显微镜观察, 并采用 Image J 图像处理软件测量、计算纤维蛋白原、GFAP 阳性表达的面密度, 对其进行定量分析。

1.4.5 电镜观察 照射后 7, 30 d 从各组随机抽取 5 只小鼠, 1%

戊巴比妥钠 (80 mg/kg) 腹腔注射深度麻醉后, 进行灌注固定。在体式显微镜下取出小鼠脑组织, 立即浸入电镜液中保存固定 4-6 h, 制备超薄切片 (60 nm), 在 H-7650 型透射电镜进行观察。

1.4.6 Morris 水迷宫空间认知功能检测 Morris 水迷宫主要由一个不锈钢喷塑圆柱形水池和图像采集分析系统两部分组成。按东南西北分为 I, II, III, IV 4 个象限, 池内温度维持在 25 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 有一个直径为 10 cm 的黑色平台。在药物干预前、放射前 1 天 (药物干预后) 及放射后第 6 天, 对每组小鼠进行 Morris 水迷宫学习训练, 训练结束后撤去平台, 从同一个入水点放入水中, 测其第一次到达原平台位置的时间、穿越原平台的次数。

1.5 主要观察指标 免疫荧光检测纤维蛋白原、GFAP 的表达; 电镜观察小鼠血脑屏障结构变化。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

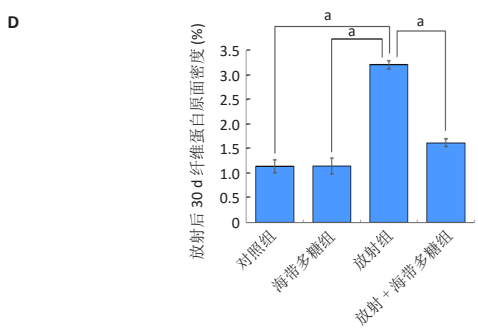
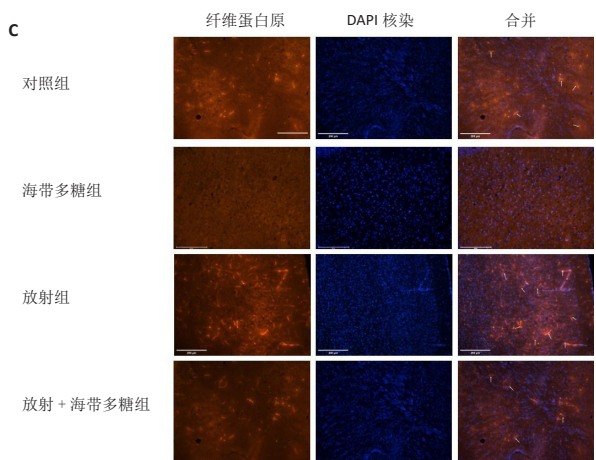
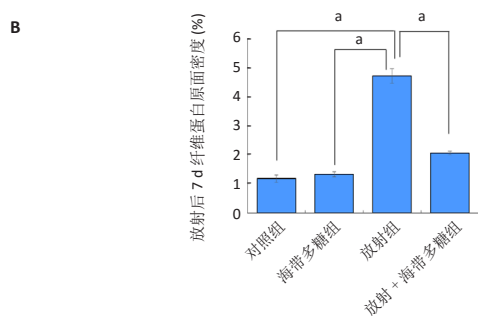
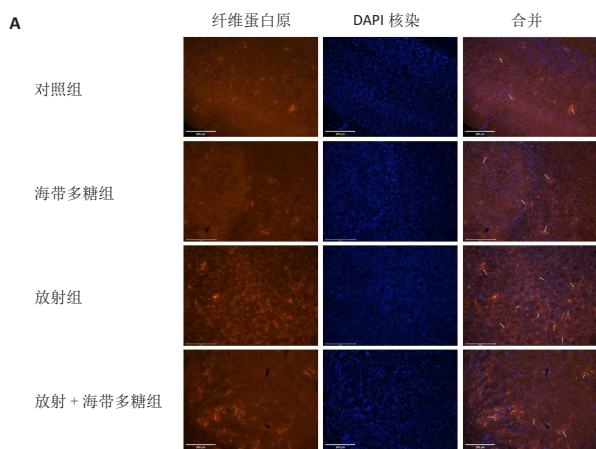
2.1 实验动物数量分析 实验共纳入 96 只小鼠, 随机分为 4 组, 全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 海带多糖干预对纤维蛋白原表达的影响 与对照组相比, 放射后 7, 30 d 纤维蛋白原在脑组织中沉积表达明显增多, 分布密集; 而经海带多糖干预后放射小鼠纤维蛋白原的表达得到明显缓解, 沉积减少; 随着放射后时间的增加, 放射 30 d 纤维蛋白原在脑组织中的沉积情况较放射 7 d 更为明显, 见图 1。

2.3 海带多糖干预对神经胶质细胞的影响 在室管膜下区, 对照组及海带多糖组中 GFAP 阳性表达较少, 胞体小, 纤维分支纤细且分布稀疏。经照射后的星形胶质细胞面密度显著增加 ($P < 0.01$), 纤维排列密集、胞体增大、突起增大变粗。而经海带多糖干预后, 与单纯照射小鼠相比, GFAP 面密度降低 ($P < 0.05$), 照射后 30 d 相比 7 d 而言, GFAP 的表达有所下调, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 2。

2.4 海带多糖干预对血脑屏障超微结构的影响 相比对照组而言, 放射后脑血管相邻内皮细胞间连接疏松, 血管内皮细胞核突入管腔, 导致管腔极度狭窄, 且基膜厚薄不均、断裂脱落; 细胞间紧密连接增宽甚至开放, 基膜外星形胶质细胞及其足板出现水肿, 足突胶质膜破溃, 结构模糊。而放射 + 海带多糖组小鼠血管管壁较闭合, 相邻内皮细胞间可见明显的紧密连接, 基膜厚薄均匀, 见图 3。

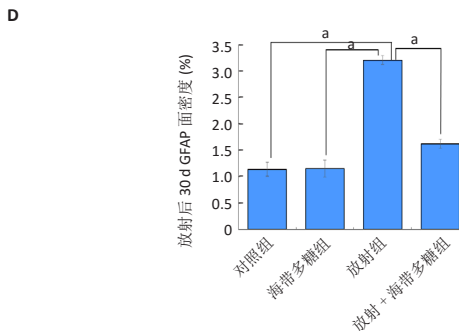
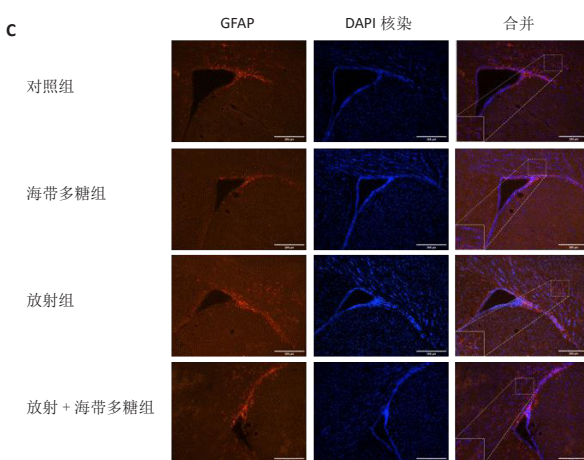
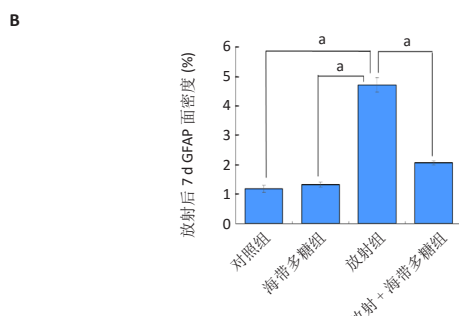
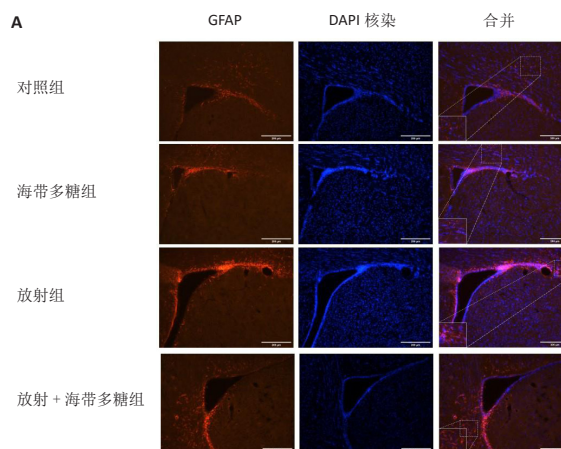
2.5 海带多糖干预对认知功能的影响 放射后放射组小鼠穿过平台区的次数明显减少, 且差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 且放射后小鼠在中环活动时间明显减少, 在外环活动时间增多; 而予海带多糖干预后放射小鼠中心区及平台区活动呈增加趋势。对照组和单纯海带多糖组小鼠干预前、后的空间探索策略、平台区和各环活动时间未见明显变化, 见图 4。



图注：图 A, B 为照射后 7 d 定位及定量结果；图 C, D 为照射后 30 d 定位及定量结果。照射后 7, 30 d, 与对照组相比, 照射后纤维蛋白原在脑组织中的沉积明显增加 (图 A, C 中白色箭头所示), 对纤维蛋白原面密度的分析也发现差异有显著性意义 (图 B, D 中, $^aP < 0.01$); 而经海带多糖干预后, 纤维蛋白原的表达得到明显缓解

图 1 | 纤维蛋白原在脑组织中免疫荧光染色定位及定量情况 (标尺 = 200 μm)

Figure 1 | The location and quantification of fibrinogen in mouse brain tissue by immunofluorescence staining (scale bar=200 μm)



图注：图 A, B 为照射后 7 d 定位及定量；图 C, D 为照射后 30 d 定位及定量。照射后 7, 30 d, 与对照组相比, 照射后 GFAP 的表达明显增加, 分支增粗变大 (合并列所示), 对 GFAP 面密度的分析发现差异也有显著性意义, 图 B, D 中, $^aP < 0.01$ 。而经海带多糖干预后, GFAP 的表达得到明显缓解, 且分支形态也得以恢复。GFAP: 胶质纤维酸性蛋白

图 2 | 室管膜下区中 GFAP 免疫荧光染色定位及定量情况 (标尺 = 200 μm)

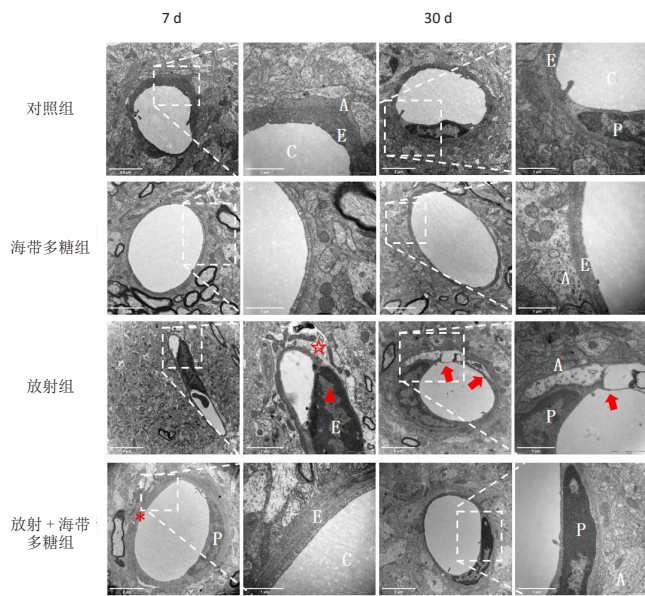
Figure 2 | The location and quantification of glial fibrillary acidic protein in mouse subventricular zone by immunofluorescence staining (scale bar=200 μm)

3 讨论 Discussion

血脑屏障主要由血管内皮细胞、基膜、周细胞、星形胶质细胞终足共同组成，对于维持脑组织稳态、调节内流外排运输及保护脑组织免受伤害具有重要作用^[17-18]，也是中枢神经系统的重要组成结构核单位^[19-21]。目前，在人体组织和相关动物模型中，纤维蛋白原已被广泛用作血脑屏障破坏的可靠标记物^[22]。一般情况下，纤维蛋白原在健康的中枢神经系统中检测不到或极少量存在，但在与血脑屏障破坏相关的神经系统疾病和创伤性损伤中可沉积^[23]。此次研究通过对纤维蛋白原的表达与沉积进行示踪观察，发现放射后纤维蛋白原在脑组织中的表达显著升高，而经海带多糖干预后纤维蛋白原沉积明显改善，这提示放射引起小鼠血脑屏障破坏，而海带多糖的干预可能对血脑屏障具有保护作用。同步电镜显示经海带多糖预处理的放射小鼠内皮细胞核肿胀得到有效改善且内皮细胞间紧密连接得以恢复，血脑屏障结构趋向正常，这也印证了以上观点，即海带多糖对小鼠血脑屏障结构具有保护作用，其保护机制可能是通过维持脑内皮细胞间紧密连接以维持血脑屏障的结构与功能，在一定程度上也可能与抑制纤维蛋白原向不溶性纤维蛋白转化，阻止其在中枢神经系统持续存在有关。

星形胶质细胞的终足作为血脑屏障的重要组成结构，具有诱导屏障内皮细胞的分化及细胞间紧密连接的形成等功能^[24]。而 GFAP 作为成熟星形胶质细胞的特征性蛋白标志物，是成人脑组织中主要的中间丝蛋白，在星形胶质细胞发育过程中参与构成细胞骨架，它的表达受脑疾病或损伤等多种因素调控^[25]。GFAP 免疫反应性增加是神经元损伤的敏感指标，其增加被认为是反应性星形细胞增多的决定因素。在此次研究中，放射后 GFAP 明显激活、表达显著增加，相反经海带多糖干预后的放射小鼠其表达明显降低。可认为 GFAP 在中枢神经系统损伤中的显著上调表明其在损伤控制中的重要作用，但其聚集体大量沉积并长期高水平的表达可能会引起致命性的神经退行性疾病，并且也可能会抑制神经突生长和神经元补给，降低对血脑屏障的保护作用^[26]。而此次研究显示海带多糖可以有效调节 GFAP 的蛋白表达水平，这也进一步印证了海带多糖对放射所引起的血脑屏障功能失调具有保护作用，其保护机制可能与调节 GFAP 的表达以降低其长期高水平的沉积有关。

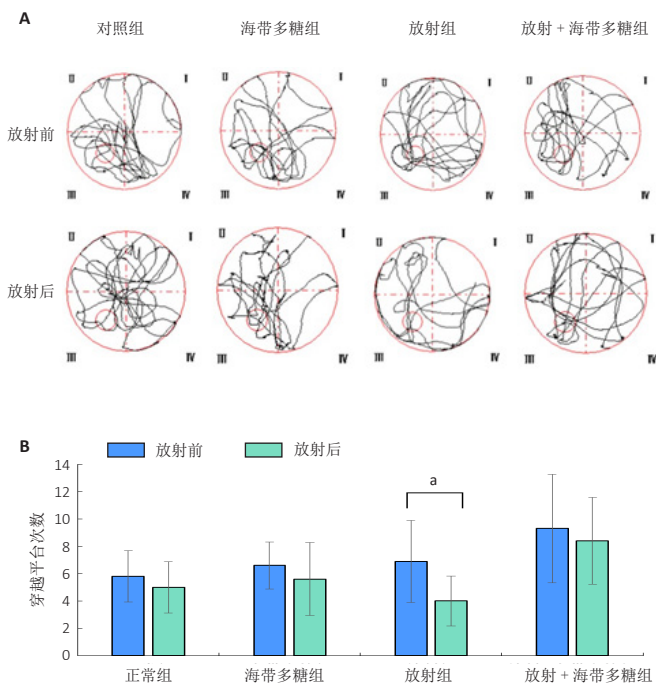
此外，认知功能障碍也是放射性脑损伤的主要临床症状之一^[27]，而血脑屏障的破坏被认为是认知功能障碍的早期生物学表现^[28-29]。作者所在课题组通过 Morris 水迷宫检测小鼠学习空间记忆能力，发现放射后小鼠穿过平台区的次数和中环活动时间明显减少；而经海带多糖干预后，穿越平台的时间与次数呈增加趋势，在外环活动时间明显减少；这表明海带多糖可改善脑组织照射后认知功能的损伤，其机制可能与海带多糖对小鼠血脑屏障功能失调的保护作用有关。血脑屏障结构及功能的改变可引起纤维蛋白原在脑血管外的大量沉积，导致其与 Aβ42 大量结合，激活小胶质细胞，最终导致



图注：与对照组相比，照射后脑血管内皮细胞核突入管腔，导致管腔极度狭窄（如▲所示），且基膜厚薄不均、断裂脱落（如→所示）；基膜外星形胶质细胞及其足板出现水肿，足突胶质膜破溃，结构模糊（如☆所示）。而放射+海带多糖组小鼠血管管壁较闭合，相邻内皮细胞间可见明显的紧密连（如*所示），基膜厚薄均匀。C为毛细血管腔，A为星形胶质细胞，E为内皮细胞，P为周细胞

图3 | 放射7, 30 d各小组小鼠血脑屏障电镜图片 (标尺2 μm, 放大倍率为×20 000; 标尺示1 μm, 放大倍率为×40 000)

Figure 3 | Electron micrograph of the mouse blood-brain barrier at 7 and 30 days after radiation (scale bar=2 μm, ×20 000; scale bar=1 μm, ×40 000)



图注：图A为小鼠在水迷宫中的运动轨迹；B为小鼠穿越平台的次数。放射后小鼠穿过平台区的次数明显减少，且其运动轨迹主要集中于外环；而经海带多糖干预后放射小鼠中心区及平台区活动呈增加趋势，^aP < 0.05

图4 | 各组放射干预前后 Morris 水迷宫检测结果
Figure 4 | Morris water maze test of mice before and after radiation

中枢神经系统发生神经性变性^[30]。A β 与纤维蛋白原的结合具有更强的致病性,会使认知功能恶化,还可能会导致小鼠的脑血流量不足,而低灌注会导致认知功能下降。

综上所述,海带多糖对放射性脑损伤具有保护作用,其作用机制可能是通过维持血脑屏障稳定及调节其通透性来实现的。此次研究中海带多糖作为一种天然植物多糖为放射性脑损伤的治疗方式提供了补充,也为海带多糖在其他疾病中的应用提供参考。然而,仍需更多深入的研究,以揭示这些生物学作用的潜在分子途径及其涉及的分子机制。此次研究主要从血脑屏障的基本组成结构及相关标志物出发来探讨海带多糖作用的可能机制,是否通过调节其他结构及通路对放射性脑损伤产生保护作用仍需进一步研究。

作者贡献: 教翮、韦力负责实验设计和安排;教翮、赵歆负责实验实施;玉洪荣、张思琴负责实验评估;张馨月负责收集资料;教翮、谷卫丽负责数据整理和分析;教翮、玉洪荣、韦力负责文章撰写和修改。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81460479)及广西自然科学基金(2018JJA140600)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验严格遵循国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》,动物实验方法经广西医科大学动物伦理委员会批准,并按照《国家卫生研究院实验动物关爱与使用指南》进行。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经广西医科大学公共卫生学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] BELTRAN C, NAIK M, MERCHANT TE. Dosimetric effect of target expansion and setup uncertainty during radiation therapy in pediatric craniopharyngioma. *Radiother Oncol*. 2010;97(3):399-403.
- [2] ALI FS, AREVALO O, ZOROFCHIAN S, et al. Cerebral Radiation Necrosis: Incidence, Pathogenesis, Diagnostic Challenges, and Future Opportunities. *Curr Oncol Rep*. 2019;21(8):66.
- [3] 张海博,梁海乾,徐悦,等.放射性脑损伤的研究现状[J].*山东医药*, 2014,54(26):95-97.
- [4] 阮林,韦力,廉春蓉,等.全脑照射后血脑屏障改变对放射性脑损伤的影响[J].*中国神经精神疾病杂志*, 2011,37(10):591-595.
- [5] MAINPRIZE T, LIPSMAN N, HUANG Y, et al. Blood-Brain Barrier Opening in Primary Brain Tumors with Non-invasive MR-Guided Focused Ultrasound: A Clinical Safety and Feasibility Study. *Sci Rep*. 2019;9(1):321.
- [6] REZAI AR, RANJAN M, D'HAESE PF, et al. Noninvasive hippocampal blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease with focused ultrasound. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(17):9180-9182.

- [7] SANDOR N, WALTER FR, BOCSIK A, et al. Low dose cranial irradiation-induced cerebrovascular damage is reversible in mice. *PLoS One*. 2014;9(11):e112397.
- [8] LUMNICZYK K, SZATMÁRI T, SÁFRÁNY G. Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain. *Front Immunol*. 2017;8:517.
- [9] ARVANITIS CD, FERRARO GB, JAIN RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(1):26-41.
- [10] TIETZ S, ENGELHARDT B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol*. 2015;209(4):493-506.
- [11] ZHAO X, GUO F, HU J, et al. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. *Thromb Res*. 2016;144:46-52.
- [12] ZENG M, WU X, LI F, et al. *Laminaria Japonica* Polysaccharides effectively inhibited the growth of nasopharyngeal carcinoma cells in vivo and in vitro study. *Exp Toxicol Pathol*. 2017;69(7):527-532.
- [13] 张思琴.海带多糖通过激活 Nrf2 通路保护放射诱导下颌下腺氧化应激损伤[D].南宁:广西医科大学,2019.
- [14] 陈晨,张思琴,韦力,等.海带多糖调节小鼠小胶质细胞活化保护放射损伤后的海马记忆功能[J].*神经解剖学杂志*, 2018,34(3):327-333.
- [15] 符楨琳.海带多糖对放射诱导损伤的神经细胞、内皮细胞影响的体外研究[D].南宁:广西医科大学,2018.
- [16] 柴溶,张思琴,刘文其,等.海带多糖对受照小鼠脑血管损伤的保护作用[J].*辐射防护*, 2019,39(3):249-253.
- [17] OBERMEIER B, DANEMAN R, RANSOHOFF RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013;19(12):1584-1596.
- [18] SWEENEY MD, ZHAO Z, MONTAGNE A, et al. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*. 2019;99(1):21-78.
- [19] LANGEN UH, AYLOO S, GU C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2019;35:591-613.
- [20] IADECOLA C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*. 2017;96(1):17-42.
- [21] ACHAR A, GHOSH C. Multiple hurdle mechanism and blood-brain barrier in epilepsy: glucocorticoid receptor-heat shock proteins on drug regulation. *Neural Regen Res*. 2021;16(12):2427-2428.
- [22] DAVALOS D, MAHAJAN KR, TRAPP BD. Brain fibrinogen deposition plays a key role in MS pathophysiology- Yes. *Mult Scler*. 2019;25(11):1434-1435.
- [23] PETERSEN MA, RYU JK, AKASSOGLU K. Fibrinogen in neurological diseases: mechanisms, imaging and therapeutics. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(5):283-301.
- [24] MORITA M, IKESHIMA-KATAOKA H, KREFT M, et al. Metabolic Plasticity of Astrocytes and Aging of the Brain. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):941.
- [25] MIDDELDORP J, HOL EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011;93(3):421-43.
- [26] BRENNER M. Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett*. 2014;565:7-13.
- [27] MCGINNIS GJ, FRIEDMAN D, YOUNG KH, et al. Neuroinflammatory and cognitive consequences of combined radiation and immunotherapy in a novel preclinical model. *Oncotarget*. 2017;8(6):9155-9173.
- [28] NATION DA, SWEENEY MD, MONTAGNE A, et al. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med*. 2019;25(2):270-276.
- [29] MONTAGNE A, NATION DA, SAGARE AP, et al. APOE4 leads to blood-brain barrier dysfunction predicting cognitive decline. *Nature*. 2020;581(7806):71-76.
- [30] AHN HJ, ZAMOLODCHIKOV D, CORTES-CANTELI M, et al. Alzheimer's disease peptide beta-amyloid interacts with fibrinogen and induces its oligomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21812-21817.

(责任编辑: GD, ZN, SX)