DOI:10.16016/j.1000-5404.201504159

环孢菌素 A 通过 PI3K-Akt 通路保护小鼠脑缺血再灌注后血脑屏障损伤

邓华江[1],张 双[1],明 扬[1],刘洛同[1],万伟峰[1],葛红飞[2],谭 亮[2],陈礼刚[1],冯 华[2] (646000 四川 泸州,泸州医学院附属医院神经外科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科[2])

[**摘要**] **目的** 探讨环孢菌素 A(cyclosporine A, CsA)对小鼠脑缺血再灌注后血脑屏障的影响及其可能机制。**方法** 通过线栓法对 C57BL/6J 及载脂蛋白 E 基因敲除($ApoE^{-/-}$)小鼠建立大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,用不同剂量(10、20 mg/kg)CsA 进行干预,并将两种小鼠各自分为 5 组:假手术组(Sham)、手术组(I/R)、溶剂组(Vehicle)、小剂量组(10 mg/kg CsA)及大剂量组(20 mg/kg CsA)。观察小鼠脑缺血再灌注后神经功能评分、梗死灶体积、脑组织水含量及伊文思蓝漏出量的变化情况,并用 Western blot 检测各组 p-Akt 及 Claudin-5 蛋白表达量的变化。**结果** ①神经功能评分结果显示:MCAO 后小鼠出现严重的神经功能障碍,经 CsA 干预后其损伤情况明显缓解,且大剂量组优于小剂量组($P<0.05$);②小鼠在脑缺血再灌注后表现出现严重的脑水肿、脑梗死及伊文思蓝渗漏,且各组 $ApoE^{-/-}$ 小鼠表现得比 C57 小鼠更为明显($P<0.05$),而 CsA 能缓解这些症状,且大剂量组效果明显优于小剂量组($P<0.05$);③Western blot 检测结果显示:$ApoE^{-/-}$ 小鼠脑组织中 p-Akt 蛋白表达量高于 C57 小鼠,而 Claudin-5 相对较低($P<0.05$)。经 MCAO 处理后各组小鼠均出现 p-Akt 蛋白表达明显增高从而引起 Claudin-5 减少($P<0.05$),CsA 干预后,该效应出现逆转,且大剂量组的效果明显优于小剂量组($P<0.05$)。**结论** CsA 可保护脑缺血再灌注后血脑屏障的损伤,从而起到改善预后的作用,其机制与 PI3K/Akt 信号通路有关,而 $ApoE^{-/-}$ 可通过该途径加重脑梗死。

[**关键词**] 脑缺血;再灌注损伤;环孢菌素 A;血脑屏障
[**中图法分类号**] R743.31; R969; R979.5 [**文献标志码**] A

Cyclosporine A repairs blood-brain barrier damage in mice after cerebral ischemia-reperfusion injury *via* PI3K-Akt pathway

Deng Huajiang[1], Zhang Shuang[1], Ming Yang[1], Liu Luotong[1], Wan Weifeng[1], Ge Hongfei[2], Tan Liang[2], Chen Ligang[1], Feng Hua[2] ([1]Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 646000; [2]Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of cyclosporine A (CsA) on blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury in mice and investigate its possible mechanism. **Methods** Middle cerebral artery occlusion (MCAO) model were established by Longa's method in C57 BL/6J mice and apolipoprotein E knockout ($ApoE^{-/-}$) mice. Then the C57BL/6J mice and $ApoE^{-/-}$ mice were assigned into 5 groups, that is, sham operation group ($n=5$), I/R group ($n=14$), vehicle group ($n=14$), low- and high- dose CsA intervention groups (10 and 20 mg/kg, given intraperitoneally in 15 min, and 24 and 48 h after model establishment, $n=14$). After neurological function was evaluated, the mice were sacrificed in 1, 3, 5 and 7 d after surgery, and the brain tissues were harvested for infarct volume, brain water content, and

[**基金项目**] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2014CB541600)
[**通信作者**] 陈礼刚,E-mail:chengligang.cool@163.com
冯 华,E-mail:fenghuahua8888@aliyun.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151124.0853.018.html(2015-11-24)

the permeability of blood-brain barrier (Evans blue leakage). Western blotting was used to detect the expression levels of p-Akt and Claudin-5. **Results** (1) Neurological function evaluation showed that MCAO resulted in severe neurological dysfunction in the mice, but CsA intervention obviously attenuated the injury, with the high-dose group superior to the low-dose group ($P<0.05$). (2) Cerebral I/R injury induced severe cerebral edema, cerebral infarction and reduced leakage of blood-brain barrier, and the ApoE$^{-/-}$ mice were injured more heavily than the C57 mice ($P<0.05$). However, CsA alleviated the symptoms, and the effects were more significant in the high- than low-dose intervention group ($P<0.05$). (3) Western blot results showed that the protein level of p-Akt was higher, while that of Claudin-5 was lower in the brain tissue of normal ApoE$^{-/-}$ mice than normal C57BL/6J mice ($P<0.05$). After MCAO, the expression of p-Akt was significantly increased and then Claudin-5 was decreased ($P<0.05$). CsA inhibited the process, and the high-dose group had greater effect than the low-dose group ($P<0.05$). **Conclusion** CsA repairs the blood-brain barrier damage induced by I/R injury, and then improves the prognosis, which is related with PI3K/Akt signal pathway. Besides, ApoE$^{-/-}$ mice have more severe cerebral infarction through this signal pathway.

[**Key words**] cerebral ischemia-reperfusion; cyclosporin A; blood-brain barrier

Supported by the National Key Basic Research Program of China (973 Program, 2014CB541600). Corresponding author: Chen Ligang, E-mail: chengligang.cool@163.com; Feng Hua, E-mail: fenghuahua8888@aliyun.com

缺血性脑卒中(ischemic stroke,IS)是一种以高致死、致残率为特点的神经科学领域常见疾病,严重威胁着人类生命及生活质量,给社会带来了巨大的经济负担[1]。目前,针对缺血性脑卒中的治疗十分有限,不论是内科溶栓、抗凝,还是外科手术处理,均不能有效降低其病死率和致残率,并且已有溶栓治疗与颅内出血的发病率增高有关,可加重脑缺血再灌注后损伤的报道[2-3]。IS 的治疗是医学研究领域的热点和难点,受到科研工作者的广泛关注。

脑缺血再灌注可使血脑屏障(blood-brain barrier,BBB)结构和功能发生改变,进而加重神经细胞缺血、缺氧。BBB 是脑动态平衡的一个重要调节器,其损伤是脑缺血后病理改变的一个重要环节及早期死亡的主要原因,也是影响药物治疗效果的关键因素之一,若早期能控制血脑屏障损伤,从而减轻脑水肿及炎性浸润,就能达到减轻脑梗死症状及神经损伤的目的。

环孢菌素 A(cyclosporin A,CsA)是由 11 个氨基酸组成的环多肽,作为免疫抑制剂广泛应用于防止器官移植时的排斥作用和治疗自身免疫等疾病。近年来,CsA 的应用逐渐广泛,有研究者提出 CsA 能抑制缺血性神经元坏死中发挥关键作用的线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore,MPTP)[4],抵御脑梗死带来的脑损伤[5]。因此,CsA 在脑卒中的治疗中可能有潜在的研究价值,从而为临床转化奠定基础,但其作用机制不明。本研究以脑缺血再灌注为模型,将 CsA 为研究对象,以血脑屏障为切入点,探讨 CsA 对小鼠脑缺血再灌注后血脑屏障的影响及可能机制,为更好地治疗脑梗死提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

1.1.1 实验动物与分组 体质量为 25~30 g,SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠及 ApoE$^{-/-}$ 小鼠各 229 只,分别由第三军医大学实验动物中心和北京华阜康生物科技股份有限公司提供。手术过程及处死方式严格遵循国际通用实验动物使用指南及第三军医大学动物实验管理使用规定。将 C57BL/6J(简称 C57)和 ApoE$^{-/-}$ 小鼠各自分为 5 组:假手术组(Sham,$n=5$)、手术组(I/R,$n=14$)、溶剂组(Vehicle,$n=14$)、小剂量组(10 mg/kg CsA,$n=14$),大剂量组(20 mg/kg CsA,$n=14$)。将 100 mg CsA 溶解于 1 mL DMSO 中,并用无菌生理盐水稀释至 100 mL,分别在术后 15 min、24 h、48 h 按体质量进行腹腔注射[6],于 1、3、5、7 d 取材进行相关检测。

1.1.2 药品与试剂 Claudin-5 抗体(Abcam,ab53765),p-Akt 抗体(CST,4058),环孢菌素 A(Tocris,1101),GAPDH 抗体(中杉金桥,TA-08),Akt 抗体(CST,4691),TTC(Sigma),伊文思蓝(evans blue,EB,Sigma),DMSO(Sigma),尼龙线栓(广州赛迅生物科技有限公司)。

1.1.3 实验器材 低温离心机(美国 Thermo scientific);Western blot 电泳设备(美国 Bio-Rad);倒置荧光显微镜(日本 Olympus);激光共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠脑缺血再灌注模型的建立 5%水合氯醛 7 mL/kg 腹腔麻醉后,置于 36.5 ~ 37.5 ℃恒温台上,取仰卧位,做颈部前正中切口,钝性分离皮下组织,暴露右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。活结结扎颈总、颈内动脉,颈外动脉远心端穿线系紧,近心端活结结扎后,在颈外动脉两线之间剪一小口,将尼龙线栓[直径 0.126 mm,尖端硅胶直径(0.25 ±0.02)mm]经颈外动脉插入颈内动脉,打开颈内动脉活结,线栓缓慢进入右侧大脑中动脉,感觉有阻塞感后固定线栓,开放颈总动脉活结,缝合皮肤,2 h 后取出线栓。手术过程均保持无菌操作。

1.2.2 神经功能评分 根据 Garcia 评分标准进行评分,最高分 18 分,最低分 3 分,分数越低神经功能损伤越重[7]。

1.2.3 脑组织含水量的测定 小鼠麻醉后,断头取脑,分别将两个大脑半球及小脑快速用电子天平(精确度为 0.1 mg)称量,放置于 100 ℃烤箱中,24 h 后再次称量得干质量,计算脑组织水含量。

脑组织水含量 =(湿质量 - 干质量)/湿质量 ×100%

1.2.4 脑梗死体积的测定 将小鼠处死,快速取脑,并将脑组织切成 5 片(约 1 mm 厚),并放入 2%的 2,3,5,-氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中 37 ℃孵育 18 min,并不时搅动,然后置于 4%多聚甲醛中固定。TTC 染色后正常组织呈红色,梗死区呈白色,梗死体积 = 梗死面积(mm^2) ×厚度(mm)。为了减少脑水肿的影响,半球病灶体积(HLV)百分比由以下公式计算。

HLV =[总的梗死体积 -(完整的患侧半球体积 - 对侧半球体积)]/对侧半球体积 ×100%

1.2.5 血脑屏障通透性的评价 在小鼠处死 1 h 前,经小鼠右侧股静脉注入 EB(浓度 2%,4 mL/kg),麻醉后开胸暴露心脏,剪开右心耳,用生理盐水经左心室灌注清除血管内血液及 EB,直到右心耳流出液体清亮。断头取脑,分别将病灶半球和对侧半球称重后置于甲酰胺溶液(每 100 毫克脑组织加入 1 mL 甲酰胺)中研磨充分,60 ℃水浴 24 h 后取出,5 000 r/min 离心 20 min,取上清液 10 000 r/min 再次离心 10 min,取上清液 200 μL 加入酶标板中,酶标仪 630 nm 测定光密度值[D(630)],根据标准曲线求得 EB 含量,EB 含量(μg/g) = A ×甲酰胺量(mL)/脑湿质量(g),A 为根据标准曲线回归方程求得的样品 EB 含量,单位为 μg/mL。

另一批小鼠在注入 EB 1 h 后麻醉、取脑,在干冰中用 OCT 包埋脑组织,用冰冻切片机将其切为 20 μm 厚贴片,再置于 50 ℃烤箱 1 h,DAPI 染色后用激光共聚焦观察 EB 渗出情况。

1.2.6 Western blot 检测 小鼠在大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)造模后 72 h 处死,在低温条件下迅速提取小鼠脑组织蛋白,并测定其蛋白浓度,然后取 50 μg 蛋白样品进行上样、电泳后转移至 PVDF 膜上;用 3% BSA 封闭 1 h 后,加入相关一抗 4 ℃孵育过夜;以 PBST 洗膜 3 次,每次约 5 min;加入与一抗相对应的二抗,在室温下轻摇孵育2 h;再洗膜 3 次,用 ECL 显影液(Thermo scientific)在 ChemiDocXR + 凝胶成像仪中进行曝光显影,并采集相关信息,以 Image Lab 程序分析条带,检测 p-Akt 和 Claudin-5 蛋白表达变化情况。

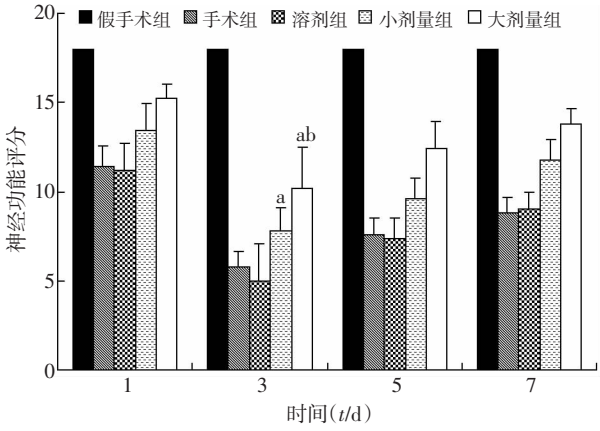
1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 MCAO 模型的建立

参照 Garcia 评分法对术后小鼠进行神经功能评价,模型成功者术后活动减少,病灶对侧肢体瘫痪,转圈等,并且断头取脑可见线栓在血管内。结果显示,小鼠经脑缺血再灌注后出现不同程度的神经功能损伤症状,并呈加重趋势,以术后第 3 天最严重,经 CsA 干预后小鼠神经功能损伤症状得到缓解($P < 0.05$),且大剂量组优于小剂量组($P < 0.05$,图 1)。



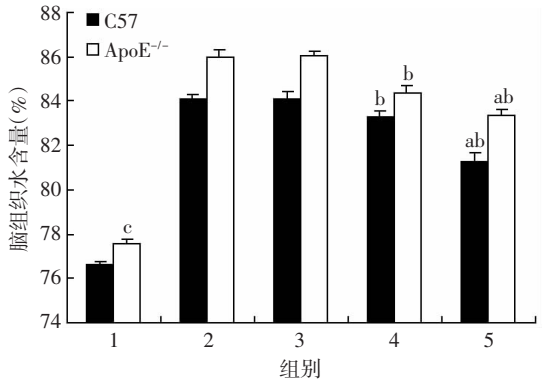
a:$P < 0.05$,与手术组比较;b:$P < 0.05$,与小剂量组比较

图 1 各组 C57 小鼠脑缺血再灌注后各时间点神经功能评分变化趋势($n = 5$)

2.2 CsA 对脑水肿的影响

MCAO 后小鼠均出现不同程度的脑水肿,且随时间变化呈增长趋势,于 3 d 达到高峰,之后逐渐减少。溶剂组各时间点与手术组相比较差异无统计学意义($P > 0.05$),证实溶剂对该实验无干扰作用。而经腹腔注入 CsA 后,其脑水肿情况较溶剂组均有所减轻($P < 0.05$),且大剂量组脑组织水含量比小剂量组少

($P<0.05$),同时,ApoE$^{-/-}$小鼠脑水肿程度较C57小鼠重($P<0.05$,图2)。



1:假手术组;2:手术组;3:溶剂组;4:小剂量组;5:大剂量组
a:$P<0.05$,与小剂量组比较;b:$P<0.05$,与溶剂组比较;
c:$P<0.05$,与C57比较

图2　MCAO后3 d两种小鼠各组脑组织含水量比较($n=5$)

2.3　CsA对梗死灶体积的影响

MCAO后各组小鼠均出现不同程度的脑梗死,其中手术组与溶剂组梗死体积相近,经CsA干预后的小鼠脑梗死体积相对减小,且大剂量组梗死体积小于小剂量组($P<0.05$)。此外,ApoE$^{-/-}$小鼠各组梗死程度均大于C57小鼠($P<0.05$,图3、4)。

2.4　CsA对血脑屏障的影响

定量仪检测MCAO后3 d小鼠脑组织EB漏出量,结果显示:小鼠在脑梗死后出EB漏出量明显增加,溶剂组与手术组相比差异无统计学意义($P>0.05$),而CsA干预的各组EB光密度值均明显减少,且大剂量组漏出量显著小于小剂量组($P<0.05$)。同时,ApoE$^{-/-}$小鼠EB漏出程度大于C57小鼠($P<0.05$)。激光共聚焦成像进一步证明了这一结果(图5、6)。

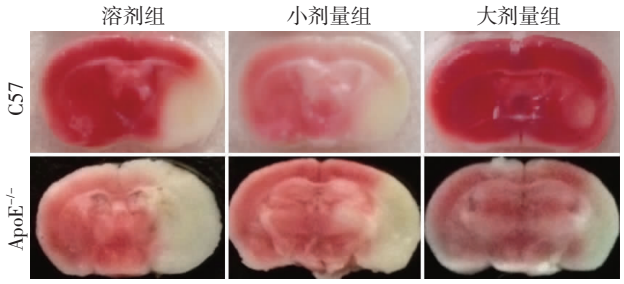
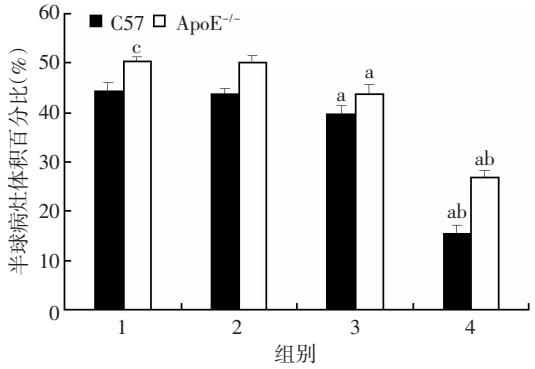
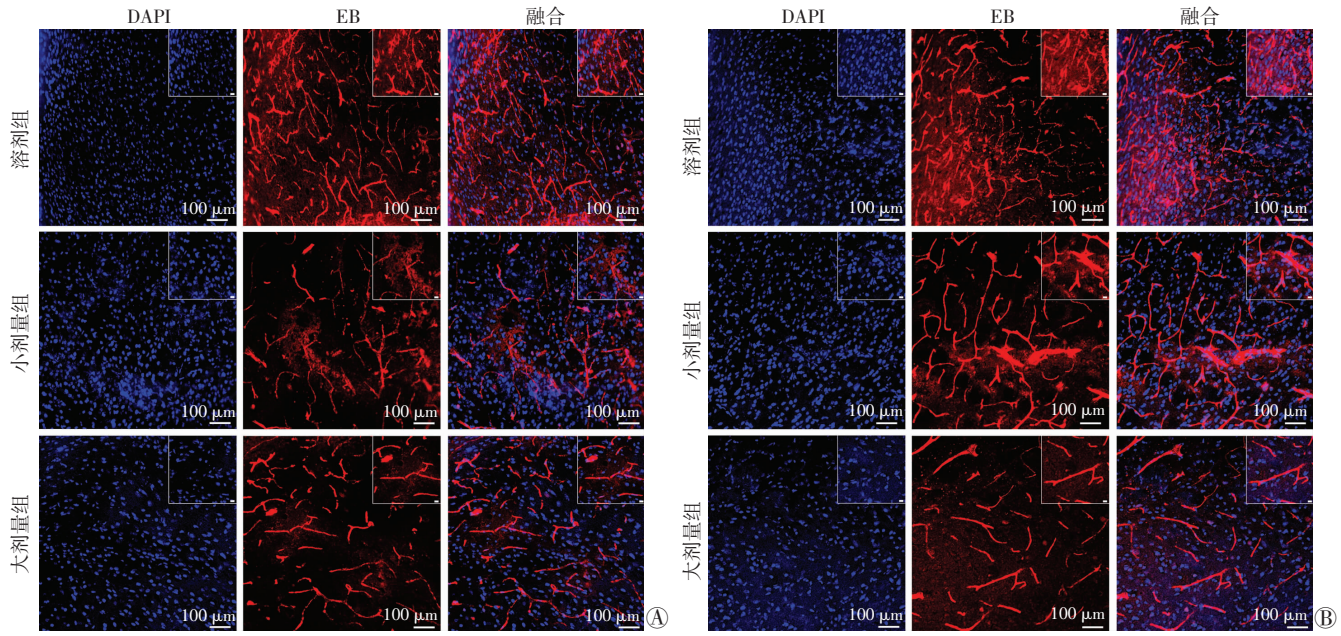


图3　MCAO后3 d小鼠患侧脑组织出现梗死灶　(经TTC染色后正常组织呈红色,梗死灶呈白色)



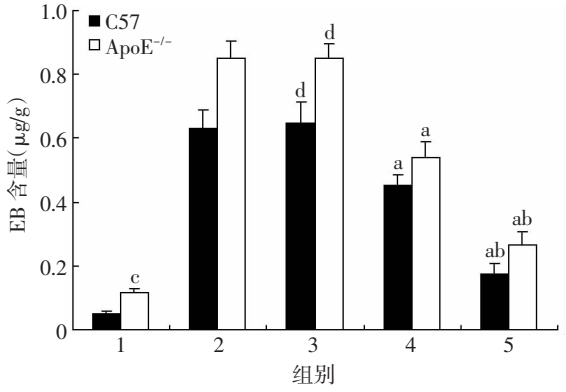
1:手术组;2:溶剂组;3:小剂量组;4:大剂量组
a:$P<0.05$,与溶剂组比较;b:$P<0.05$,与小剂量组比较;
c:$P<0.05$,与C57比较

图4　MCAO后3 d各组小鼠脑组织半球病灶体积百分比($n=5$)



A:C57小鼠;B:ApoE$^{-/-}$小鼠

图5　激光共聚焦成像观察两种小鼠各组EB漏出情况　(蓝色为细胞核,红色为EB)

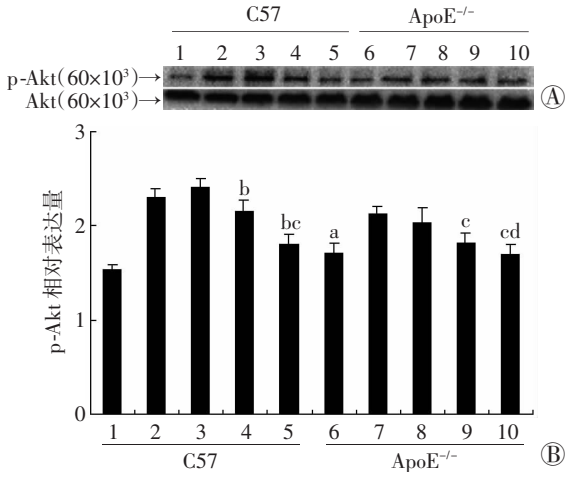


1:假手术组;2:手术组;3:溶剂组;4:小剂量组;5:大剂量组
a:$P<0.05$,与溶剂组比较;b:$P<0.05$,与小剂量组比较;
c:$P<0.05$,与 C57 比较;d:$P<0.01$,与假手术组比较

图 6 各组脑组织 EB 含量光密度值($n=5$)

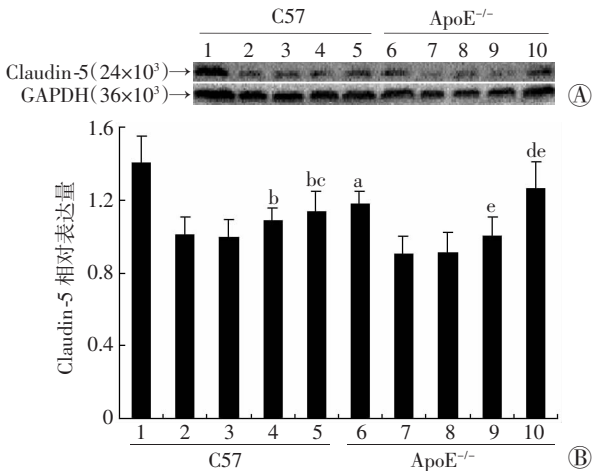
2.5 CsA 对 Akt 及 Claudin-5 的影响

Western blot 检测结果显示:正常 ApoE$^{-/-}$小鼠脑组织中 p-Akt 蛋白表达量高于 C57 小鼠,而 Claudin-5 相对较低($P<0.05$)。经 MCAO 处理后各组小鼠均出现 p-Akt 蛋白表达量明显增高而 Claudin-5 减少($P<0.05$),但当加入 CsA 干预后 Claudin-5 表达水平不同程度的上调,而 p-Akt 呈现下调趋势,且大剂量组调节程度大于小剂量组($P<0.05$)。此结果说明 CsA 在小鼠 MCAO 模型中能抑制 Akt 磷酸化并上调 Claudin-5 的表达(图 7、8)。



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1、6:假手术组;2、7:手术组;3、8:溶剂组;4、9:小剂量组;5、10:大剂量组
a:$P<0.05$,与 C57 比较;b:$P<0.05$,与溶剂组比较;
c:$P<0.05$,与小剂量组比较

图 7 Western blot 检测各组 p-Akt 蛋白的表达



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1、6:假手术组;2、7:手术组;3、8:溶剂组;4、9:小剂量组;5、10:大剂量组
a:$P<0.05$,与 C57 比较;b:$P<0.05$,与溶剂组比较;
c:$P<0.05$,与小剂量组比较

图 8 Western blot 检测各组 Claudin-5 蛋白的表达

3 讨论

随着社会的发展和人们生活水平的提高,各种不良的生活习惯成为脑卒中的重要危险因素,使得脑卒中在疾病谱中居高不下。脑卒中在我国年发病率为 110~180/10 万,而病死率为 80~120/10 万;其中脑梗死比例高达 75%~85%。目前,针对脑梗死的治疗仍停留在溶栓、抗凝和神经营养及手术处理,但其治疗效果仍未让人满意,急需一种新的治疗策略以缓解脑梗死带来的危害。

脑梗死早期主要为神经元缺血、缺氧导致神经功能损伤,但往往随后的继发性反应更为重要,如炎症、脑水肿等,导致病情加重甚至造成患者死亡。BBB 作为神经系统的一道重要防线,维系脑组织结构和功能正常运行。脑梗死后炎性细胞浸润及炎性介质的释放,导致 BBB 破坏通透性增高,从而加重脑梗死损伤。因此,在脑缺血早期保护 BBB 损伤是一个有吸引力的治疗策略。CsA 是从真菌代谢产物中提取的一种环多肽,广泛应用于免疫相关性疾病的治疗,且效果显著。随着对 CsA 的了解逐渐加深,其应用也越来越广泛,Kawano 等[8]第 1 次在肝脏中发现 CsA 对缺血再灌注损伤的保护作用。本实验以脑缺血为研究对象,采用不同剂量的 CsA 对小鼠 MCAO 模型进行干预,结果显示:小鼠脑缺血再灌注后经 CsA 治疗,其神经功能障碍、脑水肿及 BBB 的损伤均出现不同程度的缓解,且大剂量组优于小剂量组,证实了 CsA 在脑缺血再灌注治疗中的作用。

CsA 主要通过抑制细胞内亲环素 A(cyclophilin A,CypA)的活性而发挥作用。Bell 等[9]在 ApoE 基因敲除小鼠中发现,小鼠 ApoE$^{-/-}$能促进 CypA 的蛋白表达,最终导致 BBB 结构和功能的破坏。CypA 作为一种能与 CsA 高亲和度结合的肽基-脯氨酰基顺-反异构酶,在细胞中高表达,参与细胞各种信号通路的调节。最新研究发现,CypA 可通过 PI3K/Akt 通路促进血小板粘附和血栓的形成[10]。Kitagawa 等[11]首次在大鼠 MCAO 模型中证明 PI3K/Akt 信号通路参与脑缺血损伤的病理过程,且与损伤程度相关。随后,Seko 等[12]研究发现,心肌细胞在缺氧/复氧过程中分泌 CpyA 激活 Akt 起到保护心肌细胞的作用。同时,Di-Lorenzo 等[13]研究表明,Akt1 是在急性炎症中必不可少的成分,主要通过调节血管通透性的发挥作用,导致水肿和白细胞外渗。本实验根据 ApoE$^{-/-}$和 CsA 对 CypA 的不同作用,加用 ApoE$^{-/-}$小鼠与 CsA 对照,并检测相关蛋白的表达,进一步探索 CsA 在修复 BBB 损伤过程中的可能机制。本研究表明,正常 ApoE$^{-/-}$小鼠的脑含水量及 EB 渗透量均高于 C57 小鼠,且在脑缺血再灌注后其损伤程度大于 C57 小鼠,提示 ApoE$^{-/-}$可增加 BBB 通透性并加重脑缺血损伤,与 Bell 等[9]研究相一致。在经 CsA 干预后上诉症状明显缓解,初步确认 CsA 可通过抑制 CypA 发挥保护 BBB 的作用,Western blot 检测 PI3K/Akt 相关蛋白 p-Akt 及 BBB 标志蛋白 Claudin-5 的表达水平,结果显示 ApoE$^{-/-}$小鼠脑组织中 p-Akt 表达量均高于 C57 小鼠,而 Claudin-5 蛋白相对较低,而 CsA 可逆转该过程,促使 p-Akt 表达下调、Claudin-5 上调,证实了 CsA 可通过抑制 CypA 从而抑制 PI3K-Akt 通路中 Akt 磷酸化进而增加 Claudin-5 的蛋白表达,以达到保护 BBB 目的,而 ApoE$^{-/-}$却可通过该途径加重 BBB 损伤。但本实验尚未探讨 CsA 的长期疗效及副作用,需在接下来的研究中进一步探索。

综上所述,本研究初步阐述了 CsA 对小鼠脑缺血再灌注后 BBB 的保护作用及可能机制,为 CsA 向临床转化提供了基础实验依据。同时,本研究也为脑缺血的治疗提供了新的治疗靶点和策略,拓展了 CsA 在脑缺血治疗领域的应用前景。

参考文献:

[1] Andres R H, Choi R, Steinberg G K, *et al*. Potential of adult neural stem cells in stroke therapy[J]. Regen Med, 2008, 3(6): 893-905. DOI: 10.2217/17460751.3.6.893

[2] Sandercock P, Berge E, Dennis M, *et al*. Cost-effectiveness of thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke assessed by a model based on UK NHS costs[J]. Stroke 2004, 35(6): 1490-1497. DOI: 10.1161/01.STR.0000126871.98801.6E

[3] Thomalla G, Sobesky J, Kohrmann M, *et al*. Two tales: hemorrhagic transformation but not parenchymal hemorrhage after thrombolysis is related to severity and duration of ischemia: MRI study of acute stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator within 6 hours[J]. Stroke, 2007, 38(2): 313-318. DOI: 10.1161/01.STR.0000254565.51807.22

[4] Schinzel A C, Takeuchi O, Huang Z, *et al*. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(34): 12005-12010.

[5] Leger P L, De-Paulis D, Branco S, *et al*. Evaluation of cyclosporin A in a stroke model in the immature rat brain[J]. Exp Neurol, 2011, 230(1): 58-66. DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.06.009

[6] Sullivan P G, Rabchevsky A G, Hicks R R, *et al*. Dose-response curve and optional dosing regimen of cyclosporine A after traumatic brain injury in rats[J]. Neuroscience, 2000, 101(2): 289-295.

[7] Garcia J H, Wagner S, Liu K F, *et al*. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. Stroke, 1995, 26(4): 627-635.

[8] Kawano K, Kim Y I, Kaketani K, *et al*. The beneficial effect of cyclosporine on liver ischemia in rats[J]. Transplantation, 1989, 48(5): 759-764.

[9] Bell R D, Winkler E A, Singh I, *et al*. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity *via* cyclophilin A[J]. Nature, 2012, 485(7399): 512-516. DOI: 10.1038/nature11087

[10] Seizer P, Ungern-Sternberg S N, Schonberger T, *et al*. Extracellular cyclophilin A activates platelets via EMMPRIN (CD147) and PI3K/Akt signaling, which promotes platelet adhesion and thrombus formation *in vitro* and *in vivo*[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(3): 655-663. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.305112

[11] Kitagawa H, Arita H, Sasaki C, *et al*. Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain[J]. Neurosci Lett, 1999, 274(1): 45-48.

[12] Seko Y, Fujimura T, Taka H, *et al*. Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 317(1): 162-168. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.03.021

[13] Di-Lorenzo A, Fernandez-Hernando C, Cirino G, *et al*. Akt1 is critical for acute inflammation and histamine-mediated vascular leakage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(34): 14552-14557.

(**收稿**:2015-04-29;**修回**:2015-06-08)

(编辑 王小寒)