雌激素对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障作用研究

侯进义,沈 霞,孙菊光 (徐州市中医院神经内科,江苏 徐州 221000)

[摘 要] **目的** 观察雌激素对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障(blood-brain barrier,BBB)的通透性、Occludin 表达的影响,探讨雌激素在脑缺血中的作用。**方法** 随机将去势雌性大鼠分为假手术组、模型组、雌激素预处理组,选取缺血再灌后 4 h,24 h,3 d 3 个时间点作为观察点,对各个时间点脑水肿情况、Occludin 蛋白表达、血脑屏障通透性改变进行考察分析,并选取 24 h 和 3 d 作 BBB 超微结构电镜观察,脑水肿改变情况采用脑含水量百分数测定;蛋白质表达采用 western blot 方法;血脑屏障通透性改变采用伊文思蓝(EB)比色法。**结果** 与假手术组比较,局灶性脑缺血再灌 4 h 模型组大鼠脑组织含水量及 EB 含量均增加($P<0.05$),随缺血再灌时间延长,脑组织含水量、脑组织 EB 含量持续增加,至 24 h,达到高峰($P<0.01$),与同时间点模型组比较,各治疗组大鼠脑组织含水量、EB 含量均有不同程度降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),以 24 h 组降低最为显著($P<0.01$)。电镜观察雌激素预处理组较模型组同时间点比较 BBB TJ 开放减轻,星形胶质细胞足突及毛细血管管周水肿较轻,以 3 d 组显著。Western blot 检测 Occludin 蛋白表达,发现模型组 4 h 时 Occludin 蛋白表达较假手术组减弱,但无显著性差异($P>0.05$),24 h 组 Occludin 蛋白表达较假手术组减弱,有显著性差异($P<0.05$),3 d 组 Occludin 蛋白表达进一步减弱,有明显差异($P<0.01$),雌激素组 4 h 时 Occludin 蛋白表达较同时间点模型组比较无显著性差异($P>0.05$),雌激素 24 h 及 3 d 组 Occludin 蛋白表达较同时间点模型组比较均升高,有显著性差异($P<0.05$)。**结论** 局灶性脑缺血大鼠动物血脑屏障超微结构可见紧密连接发生断裂,内皮细胞内小泡数量增加及星形胶质细胞足突肿胀,可能是大鼠局脑缺血时血管源性脑水肿的重要因素。大鼠局灶性脑缺血,随缺血再灌时间延长,紧密连接相关蛋白 occludin 的表达明显下降,提示 occludin 在调节紧密连接通透性变化的过程中有重要作用。雌激素上调紧密连接 Occludin 蛋白的表达,有可能是其维护血脑屏障完整性减轻脑水肿的机制之一。

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201403002

[**收稿日期**] 2014-03-20 [**修回日期**] 2014-04-03

[参考文献]

[1] Greenberg EM, Kaled ES. Thrombocytopenia[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2013, 25(4): 427 – 434.

[2] Wang S, Shen M, Xu Y, et al. Rational and efficient preparation of a chimeric protein containing a tandem dimer of thrombopoietin mimetic peptide fused to human growth hormone in Escherichia coli[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(7): 2885 – 2894.

[3] 王 崧,王军平,陈 默,等. 重组融合蛋白 rTMP-GH 在巴斯德毕赤酵母中表达的研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(21):2037 – 2040

[4] 许 杨,王军平,赵景宏,等. 重组融合蛋白 rTMP-GH 对体外培养巨核细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报,2008,30(1):1 – 4.

[5] 叶祥忠,郭 强,李 朝,等. TPO 模拟肽与人 IgG1 的 Fc 融合蛋白在毕赤酵母中的表达及活性鉴定[J]. 生物工程,2002,18(4):424 – 430.

[6] Tecuceanu N, Dardik R, Rabizadeh E, et al. A family with hereditary thrombocythaemia and normal genes for thrombopoietin and c-Mpl[J]. Br J Haematol, 2006, 135(3): 348 – 351.

[7] Cohn CS, Bussel JB. Romiplostim: a second-generation thrombopoietin agonist[J]. Drugs Today (Barc), 2009, 45(3): 175 – 188.

[8] Sakai R, Nakamura T, Nishino T, et al. Xanthocillins as thrombopoietin mimetic small molecules[J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(23): 6388 – 6393.

[9] Dower WJ, Cwirla SE, Balasubramanian P, et al. Peptide agonists of the thrombopoietin receptor[J]. Stem Cells, 1998, 16(2): 21 – 29.

[10] Cwirla SE, Balasubramanian P, Duffin DJ, et al. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine[J]. Science, 1997, 276(5319): 1696 – 1699.

[11] Kuter DJ. Biology and chemistry of thrombopoietic agents[J]. Semin Hematol, 2010, 47(3): 2743 – 2748. doi: 10.1053/j.seminhematol.2010.02.005.

[12] 袁志宏,奚永志,孔繁华. 细胞因子模拟肽/非肽刺激造血的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志,2002,10(1):73 – 76.

[13] Kratzsch J, Selisko T, Birkenmeier G. Transformed alpha 2-macroglobulin as a low-affinity growth hormone-binding protein[J]. Acta Paediatr Suppl, 1996, 417: 108 – 110.

[14] Lim L, Spencer SA, McKay P, et al. Regulation of growth hormone (GH) bioactivity by a recombinant human GH-binding protein[J]. Endocrinology, 1990, 127(3): 1287 – 1291.

[15] Woods KA, Fraser NC, Postel-Vinay MC, et al. A homozygous splice site mutation affecting the intracellular domain of the growth hormone (GH) receptor resulting in Laron syndrome with elevated GH-binding protein[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(5): 1686 – 1690.

[16] Hanley MB, Napolitano LA, McCune JM. Growth hormone-induced stimulation of multilineage human hematopoiesis[J]. Stem Cells, 2005, 23(8): 1170 – 1179.

[17] Carlo-Stella C, Di Nicola M, Milani R, et al. Age and irradiation-associated loss of bone marrow hematopoietic function in mice is reversed by recombinant human growth hormone[J]. Exp Hematol, 2004, 32(2): 171 – 178.

(编辑:周小林)

[关键词] 雌激素;血脑屏障;紧密连接;闭锁蛋白;局灶性脑缺血再灌注模型
[中图分类号] R322.8;R392.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)03-0224-05

Research on blood-brain barrier of estrogen in rats after cerebral ischemia-reperfusion

HOU Jin-yi, SHEN Xia, SUN Ju-guang (Department of Neurology, Xuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xuzhou Jiangsu, china)

Abstract: Objective To observe the effect of estrogen on BBB permeability, occludin expression after ischemia-reperfusion in rats, and to make a further investigation on the role of estrogen in cerebral ischemia. **Methods** Ovariectomized rats were randomly divided into sham-operated group, model group, and estrogen pretreatment group. 4 h, 24 h, 3 d after ischemia-reperfusion were selected as different observation points, and changes of edema, occluding expression, and blood-brain barrier permeability of the 3 points in time were observed. BBB ultrastructure electron microscope observation was made at 24 h and 3 d after ischemia-reperfusion. Changes in cerebral edema were measured by brain water content percentage; protein expressions were measured by Western blot; and BBB permeability was measured by Evans blue assay. **Results** Compared with the sham group, brain tissue water content and EB content in model group both increased 4 h after ischemia-reperfusion ($P<0.05$), and they keep increasing as time goes by and finally reaching the peak ($P<0.01$). Compared with the model group at the same time point, brain tissue water content and EB content in estrogen pretreatment group decreased in different degrees ($P<0.05$ or $P<0.01$), and it was most significant at the time point of 24 h after ischemia-reperfusion ($P<0.01$). Compared with model group, through electron microscope observation, ia was displayed that BBB TJ's open was reduced in estrogen pretreatment group, astrocyte foot process and capillary tube edema were lighter, and it was significant at the time point of 3 d after ischemia-reperfusion. Western blot detection of occludin protein expression found that it was lower in the model group compared with the sham group at 4 h after ischemia-reperfusion, but there was no significant difference ($P>0.05$). 24 h after ischemia-reperfusion, the occludin expression were weaker than that in the sham surgery group with a significant difference ($P<0.05$), and it keep weakening with a significant difference 3 d after ischemia-reperfusion ($P<0.01$). In estrogen group, there was no significant difference compared with the model group in terms of occludin expression at 4 h after ischemia-reperfusion ($P>0.05$). In estrogen group, there was significant difference in occludin protein expression at 24 h and 3 d after ischemia-reperfusion compared with model group at the same time point ($P<0.05$). **Conclusion** BBB ultrastructure disclose TJ was broke and vesicles within EC was increased and astrocyte cell foot process was swelling in MCAO model, it might be the vasogenic brain edema pathological basis for MCAO. In MCAO animal model, with ischemia-reperfusion time increasing, TJ protein occludin expression significantly decreased, it suggests that occludin plays an important role in the regulation of TJ permeability. Estrogen increases has a very close relationship with occludin expression, and it may be one of the mechanisms of protecting BBB integrity and lessening cerebral edema.

Keywords: estrogen; BBB; tight junction; occludin; focal cerebral ischemia-reperfusion model

脑缺血后组织损伤涉及多方面的机制,如细胞凋亡、缺血区局部脑血流的减少、毛细血管通透性增加、自由基的形成、p 淀粉样蛋白的神经毒性、钙离子超载及神经兴奋毒效应等多种因素, 所有这些反应的中心都是微血管,所以对于血脑屏障在脑缺血中作用的研究就显得越来越重要 。紧密连接(TJ)是保持 BBB 完整性的重要因素[1]。1993 年,Furuse 等[2]分离出第一个 TJ 跨膜蛋白,称为 Occludin。大量研究表明,缺血性中风存在 BBB 的损伤,并影响 Occludin 等 BBB 相关蛋白的表达[3-4]。随着对雌激素治疗缺血性脑血管病基础研究的进一步深入,发现雌激素对缺血后神经元及内皮细胞均有保护作用。能够在缺血级联反应中对抗各种炎症因子的损害,减轻大鼠脑缺血再灌注引起的皮层损伤,拮抗大鼠脑缺血后的神经细胞凋亡,改善缺血区神经元的能量代谢和蛋白合成,在多环节多靶点发挥作用[5-6]。本实验在前人研究的基础上,探讨雌激素对大鼠脑缺血再灌注后 BBB 的通透性、occludin 的影响,进一步探讨雌激素在脑缺血中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雌性清洁级 SD 大鼠,鼠龄 3 个月,体质量 240 ~ 300 g,由徐州医学院动物实验中心提供;动物自由饮食,室温 22 ℃,昼夜节律下饲养;一抗(occludin 兔源性多克隆抗体)购自 Santa Cruz 公司,二抗(抗兔 IgG/AP) 购自北京中杉金桥生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 去卵巢手术 测定大鼠体质量并记录,手术切除大鼠双侧卵巢后单笼放置。术后禁水 2 h,禁食 4 h。手术后 10 d 大鼠进入实验。

1.2.2 大脑中动脉闭塞(MCAO)局灶性脑缺血 - 再灌注模型

动物室温饲养,室内采光、通风。实验前 24 h 禁食、2 h 禁水。采用 Longa 线栓改良法[7] 建立大鼠右侧大脑中动脉缺血(MCAO)模型。

1.2.3 分组及给药 健康雌性去势 SD 大鼠 139 只随机分为 3 组,即假手术组、模型组、雌激素预处理组,每组又分为再灌 4 h、24 h、3 d 亚组。BBB 通透性和脑组织含水量的检测:每亚组取 6 只大鼠;电镜观察:取模型组、雌激素预处理组 24 h、3 d亚组, 每亚组取 2 只大鼠;免疫印迹检测:每亚组取 3 只大鼠。雌激素预处理组于术前 30 min 肌肉注射苯甲酸雌二醇(1 mg/kg), 假手术组、模型组于术前肌肉注射生理盐水。

1.2.4 实验方法及检测指标 神经功能缺损依据 Longa 的 5 分制评分标准进行评分。取 EB 混合甲酰胺,共做 7 管,其浓度分别为 8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 ug/mL,60 ℃避光水浴 24 h,于紫外分光光度仪上(波长 632 nm)进行比色,蒸馏水作空白对照,制作出标准曲线[8]。脑缺血再灌注后各时间点前1 h 将动物麻醉,经左侧股静脉注射 2% EB 生理盐水(2 mL/kg),可见注入后大鼠四肢末端很快变蓝,1 h 后断头取脑。取脑前行生理盐水心脏灌注,直至右心耳流出清亮液体,以减少血管残留部分 EB 的影响。然后迅速取右半球缺血区脑组织和左侧对应区域脑组织,称取湿重后置于等量体积甲酰胺(1 mL/100 mg)的试管中,放入 60 ℃恒温水浴箱,加盖遮光水浴 24 h,然后 1 000 r/min 离心 5 min,取上清液,置可见分光光度计(波长 632 nm)测光密度(optical density,OD)值,以蒸馏水作空白比色。根据标准曲线求得 EB 含量(μg/mL 湿重)。

1.2.5 脑组织含水量 大鼠处死后,取大鼠右侧缺血区及对侧大脑称湿重,置 90 ℃恒温干燥箱内,干燥 72 h,称其干重,按 Elltot 公式计算脑含水量:脑组织含水量(%) = 100 ×(湿重 - 干重)/湿重。

1.2.6 BBB 的超微结构 大鼠处死后,取右侧大脑额顶叶脑皮质组织,大小为 1 mm × 1 mm × 1 mm,立即放入 2.5% 戊二醛中固定 24 h,1% 的四氧化锇后固定,乙醇逐级脱水,Epon618 环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀 - 柠檬酸铅染色,透射电镜观察并摄像。

1.2.7 Occludin 蛋白的 Western blot 分析 将样品置于 0.5 mL匀浆液中,于机械粉碎机下将组织粉碎,操作过程在冰上进行。离心,1 000 转,4 ℃,15 min,取上清液放于新的 Eppendorf 管中。取 20 ul 蛋白样品加入 380 ul Folin 甲溶液中 30 ℃水浴 15 min,加入 Folin 乙溶液中混匀 30 ℃水浴 30 min,标准 BSA 试剂做空白对照。在波长 650 nm 处进行比色测 OD 值,用标准蛋白浓度曲线进行定量。Western blot 分析;将蛋白样品用匀浆液调成相同浓度,加入相同体积上样缓冲液,沸水煮 5 min 进行蛋白变性。取 100 ug 总蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳,浓缩胶 100 v 分离胶 200 v ,65 min。电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜上,电流 40 mA,共计 1 h。将膜用脱脂奶粉封闭 1 h,加入兔源性多克隆 occludin 抗体(1∶400 稀释), 4 ℃,过夜。washing buffer 洗 5 min,3 次。加人碱性磷酸酶标记的兔抗 IgG 抗体(1∶1 000稀释),室温,2 h, washing buffer 洗 5 min,3 次,加人 NBT/BCIP 显色液显色,约 15 min,用蒸馏水终止反应。结果通过天能图像分析系统进行分析。

1.3 统计学处理

数据用均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS 10.0 统计软件处理,各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),然后用 Student-Newman-Keuls Test 进行每两组间比较,显著性差异水平以 0.05 和 0.01 为标准。

2 结果

2.1 雌激素对脑缺血大鼠 BBB 通透性的影响

与假手术组比较,局灶性脑缺血 4 h,模型组大鼠脑组织 EB 含量增加($P < 0.05$),随缺血时间延长,脑组织 EB 含量持续增加,至 24 h 达到高峰($P < 0.01$)。与同时间点模型组比较,各治疗组大鼠 EB 含量均有不同程度降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),以 24 h 组降低最为显著($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各时间点脑组织 EB 含量测定结果($\bar{x} \pm s$, μg/mL)

组别	n	4 h	24 h	3 d
假手术组	6	0.45 ± 0.15 *	0.58 ± 0.43 #	0.47 ± 0.32 #
模型组	6	1.52 ± 0.18	5.58 ± 1.23	2.42 ± 0.27
雌激素预处理组	6	1.15 ± 0.19 *	3.80 ± 1.10 #	1.35 ± 0.27 #

*:与模型组比较,$P < 0.05$;#:与模型组比较,$P < 0.01$

2.2 雌激素对脑缺血大鼠脑组织含水量的影响

与假手术组比较,局灶性脑缺血 4 h 模型组大鼠脑组织含水量增加($P < 0.05$),随缺血时间延长,脑组织含水量持续增加,至 24 h 达到高峰($P < 0.01$)。与同时间点模型组比较,各治疗组大鼠脑含水量均有不同程度降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),以 24 h 组降低最为显著($P < 0.01$),见表 2。

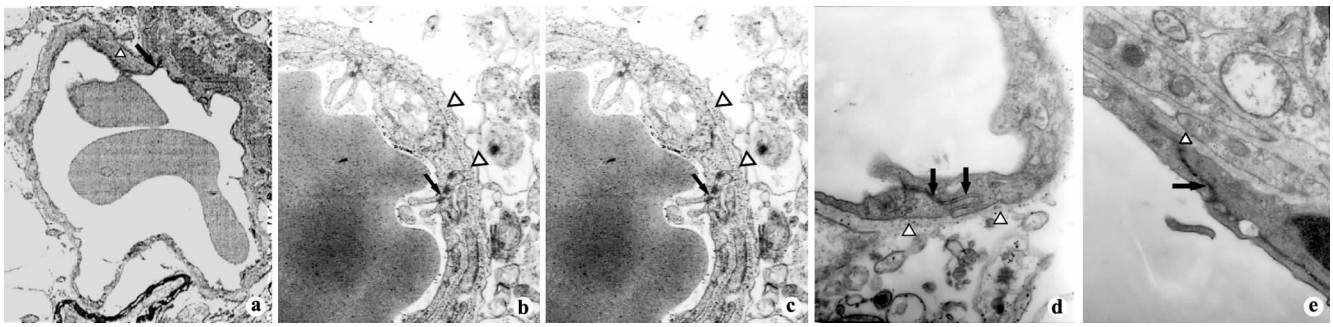
表 2 各时间点脑组织含水量测定结果($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	4 h	24 h	3 d
假手术组	6	77.47 ± 0.43 *	77.51 ± 0.73 #	77.42 ± 0.52 *
模型组	6	79.35 ± 0.69	83.45 ± 0.53	82.15 ± 0.62
雌激素预处理组	6	78.55 ± 0.31 *	81.31 ± 0.53 #	80.54 ± 0.40 #

*:与模型组比较,$P < 0.05$;#:与模型组比较,$P < 0.01$

2.3 雌激素对 MCAO 大鼠 BBB 超微结构的影响

假手术组血管内皮细胞结构完整,细胞间 TJ 存在,表现为细胞间深染的致密条带,内皮细胞外双层血管基膜连续(图 1a)。24 h 模型组毛细血管周围水肿,管腔内有少量的细长突触,基膜稍增厚,基膜外可见血管周细胞细胞核,内皮细胞内线粒体数目减少,部分核膜融合消失,BBB TJ 部分开放,胶质疏松,内皮细胞中吞饮小泡明显增多(图 1b)。24 h 雌激素组与同时间点模型组相比,雌激素组超微结构表现明显改善,毛细血管周围水肿减轻,管腔内突触增多,基膜基本正常,血管内皮细胞结构较完整,可见较多的线粒体,细胞间 TJ 存在(图 1c)。3 d 模型组:BBB TJ 多处开放,表现为电子深染物质减少,星形胶质细胞足突及毛细血管管周出现严重水肿(图 1d)。3 d 雌激素组 BBB TJ 开放较同时间点模型组减轻,星形胶质细胞足突及毛细血管管周水肿较轻(图 1e)。

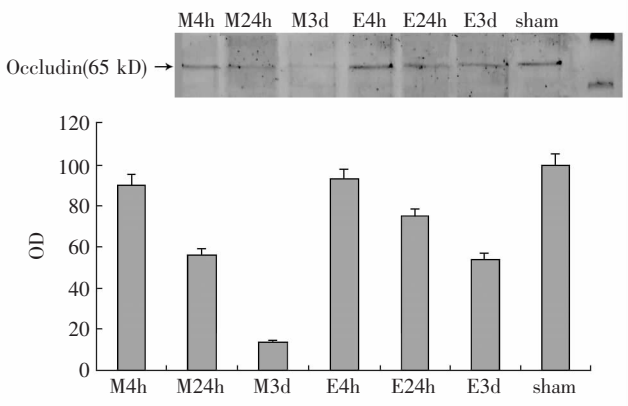


a:假手术组,血管内皮细胞结构完整,细胞间 TJ 存在,表现为细胞间深染的致密条带(↑),内皮细胞外双层血管基膜连续(△),(×8 000);b:24 h 模型组,BBB TJ 部分开放(↑),毛细血管周围水肿,基膜稍增厚(△),(×15 000);c:24 h 雌激素组,毛细血管周围水肿减轻,基膜基本正常(△),血管内皮细胞结构较完整,可见较多的线粒体,细胞间 TJ 存在(↑),(×15 000);d:3 d 模型组,BBB TJ 多处开放(↑),表现为电子深染物质减少,毛细血管管周出现严重水肿(△),(×20 000);e:3 d 雌激素组,BBB TJ 开放较同时间点模型组减轻(↑),毛细血管管周水肿较轻(△),(×20 000)

图 1 雌激素对 MCAO 大鼠 BBB 超微结构的影响

2.4 Occludin 蛋白的半定量分析

Western blot 检测 Occludin 蛋白表达,发现 4 h 模型组 Occludin 蛋白表达较假手术组减弱,但无统计学意义($P>0.05$)。24 h 模型组 Occludin 蛋白表达较假手术组减弱,有统计学意义($P<0.05$)。3 d 模型组 Occludin 蛋白表达进一步减弱,有统计学意义($P<0.01$)。4 h 雌激素组 Occludin 蛋白表达较同时间点模型组比较无统计学意义($P>0.05$),24 h 及 3 d 雌激素组 Occludin 蛋白表达较同时间点模型组比较均升高,有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



M:模型组;E:雌激素组;*:与同时间点模型组比较,$P<0.05$;#:与同时间点模型组比较,$P<0.01$

图 2 Western blot 检测 Occludin 蛋白表达

3 讨论

BBB 通透性改变是脑缺血再灌注损伤的重要途径之一,在脑缺血再灌注损伤的病理生理过程中,BBB 的损害明显加重。研究表明 TJ 是保持 BBB 完整性的重要因素,外伤、缺血、缺氧、感染、免疫及理化因素等均可能引起 TJ 结构及功能发生改变造成 BBB 损害,从而导致 BBB 的通透性升高引起脑水肿[9]。已知的研究表明雌激素有多方面的脑保护作用,如减轻脑缺血区脑灌注量的减少、降低兴奋性氨基酸(EAA)的释放、自由基的形成、钙通道的开放、细胞骨架的破坏、缺血再灌注损伤,改善记忆功能,增加胶质细胞的活性及脑的反应性修复能力等。

本实验主要通过雌激素预处理对去势大鼠 MCAO 后不同时间点血脑屏障通透性的影响来进一步阐述雌激素的脑保护作用。我们选择了脑含水量作为观察脑缺血再灌注后水肿程度的指标,以脑内伊文氏蓝(EB)含量作为指示血脑屏障损伤的指标,并结合电镜观察,发现大鼠局灶性脑缺血 4 h,出现明显脑水肿,随缺血时间延长,脑水肿逐渐进展,至 24 h,水肿达到高峰,与模型组比较,各治疗组脑水肿均有不同程度降低,以 24 h 组降低最为显著,说明雌激素能有效维护 BBB 的完整性,减轻脑水肿。我们通过检查 EB 含量发现,大鼠局灶性脑缺血 4 h,模型组大鼠脑组织 EB 含量增加,随缺血时间延长,脑组织 EB 含量持续增加,至 24 h,达到高峰,BBB 通透性的变化与脑水肿变化一致。与同时点模型组比较,治疗组大鼠 EB 含量均有不同程度降低,以 24 h 组降低最为显著,说明雌激素可以通过维护 BBB 完整性,减轻脑水肿。

我们通过透射电镜观察显示,大鼠局灶性脑缺血 24 h,雌激素组超微结构表现明显要好于模型组,毛细血管周围水肿相对较轻,管腔内突触增多,基膜基本正常,血管内皮细胞结构较完整,可见较多的线粒体,细胞间 TJ 存在。缺血 3 d,雌激素组 BBB TJ 开放较模型组要少,星形胶质细胞足突及毛细血管管周水肿较轻。从以上结果来看,雌激素确实减轻了 MCAO 大鼠各时间点 EB 的渗透,减轻 BBB 内皮细胞间 TJ 的开放,维护了 BBB 的完整性,有效减轻了脑水肿。

有研究证实内皮细胞间紧密连接上的闭锁蛋白表达水平存在组织分布的不均一性,在脑内皮细胞,闭锁蛋白呈高表达[10],而在非神经组织的内皮细胞为低表达[11]。在本实验中,我们发现模型组 24 h 组、3 d 组 Occludin 蛋白表达较假手术组减弱,有显著性差异,雌激素组 24 h 及 3 d 组 Occludin 蛋白表达较同时间点模型组比较均升高,有显著性差异。说明随缺血再灌注时间的延长,Occludin 蛋白表达逐渐减少,而雌激素可上调 Occludin 蛋白的表达,这与 Han S. Kang 等的研究结果相一致[12]。以上结果提示缺血再灌早期可能主要为细胞源性水肿,紧密连接尚未开放,随缺血再灌注时间的延长,紧密连接大量开放,血脑屏障完整性被破坏,血管源性脑水肿占主导地位。

雌激素可以减少紧密连接开放,改善血脑屏障完整性,我们分析可能原因有:①减少钙通道的开放。钙离子参与了各种细胞间连接的形成,并且对 TJ 正常功能的维持起了重要作用[13],无论是细胞内的钙还是细胞外的钙离子都能够对 TJ 的活性进行调节。而雌激素可减少细胞外钙离子的内流,维持线粒体的钙负荷及其正常功能[14]。②TJ 破坏后,其形成或再形成与 Occludin 磷酸化升高有关,尤其是发生在丝氨酸和酪氨酸残基上的磷酸化,谷氨酸增加 Occludin 蛋白酪氨酸的磷酸化,减少苏氨酸的磷酸化,而雌激素能降低脑缺血时细胞外谷氨酸的含量,抑制 NMDA 受体的过度激活,促进星形胶质细胞对谷氨酸的摄取,从而减少 TJ 的破坏。③胶质细胞对内皮细胞间 TJ 的形成有着重要影响,它在一定程度上加强、支持了屏障功能。④研究发现单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)除了对单核白细胞具有趋化活性以外,还能够下调 TJ 蛋白 occludin 的表达[15]。而雌激素能抑制 MCP-1 的表达及一些炎性因子表达[16]。

综上所述,通过实验,我们观察到雌激素可改善 BBB 超微结构,上调 TJ occludin 蛋白的表达,维护 BBB 的完整性,有效减轻脑水肿,进一步探讨了雌激素作为神经元保护剂可有效改善微血管的结构,但其具体机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Kniesel U, Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier[J]. Cell Mol Neurobiol, 2000, 20(1): 57 – 76.

[2] Furuse M, Itoh M, Hirase T, et al. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occluding at tight junctions[J]. J Cell Biol, 1994, 127(6 Pt 1): 1617 – 1626.

[3] Yu H, Wang P, An P, et al. Recombinant human angiopoietin-1 ameliorates the expressions of ZO-1, occludin, VE-cadherin, and PKCα sinnaling afer focal cerebral aschuemia/reperfusion in rats[J]. J Mol Neurosci, 2012, 46(1): 236 – 247.

[4] Chen D, Wei XT, Guan JH, et al. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase preents blood-brain barrier dieruption and normalizes the expression of tight junction proteins clautin-5 and ZO-1 in a rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Neurochir (Wien), 2012, 154(8): 1469 – 1476.

[5] Yang LC, Zhang QG, Zhou CF, et al. Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus[J]. PLoS One, 2010, 5(5): e9851.

[7] Zhang QC, Han D, Wang RM, et, al. C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)-mediated degradation of hippocampal estrogen receptor-alpha and the critical period hypothesis of estrogen neuroprotection[J]. Proc Natl Acad Sci U. S. A, 2011, 108(35): e617 – 624.

[8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 – 91.

[9] 李东亮,赵红岗,齐 伟,等. 孕酮对局灶脑缺血再灌注大鼠血 – 脑脊液屏障变化的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2001, 18(2): 73 – 74.

[9] Hawkins BT, Abbruscato TJ, Egleton RD, et al. Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution[J]. Brain Res, 2004, 1027(1 – 2): 48 – 58.

[10] Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view[J]. Brain Res Rev, 2003, 42(3): 221 – 242.

[11] Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood – brain barrier microvessels[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2004, 42(2): 67 – 75.

[12] Kang HS, Ahn HS, Kang HJ, et al. Effect of estrogen on the expression of occludin in ovariectomized mouse brain[J]. Neurosci Lett, 2006, 402(1 – 2): 30 – 34.

[13] Fukuhara A, Irie K, Yamada A, et al. Role of nectin in organization of tight junctions in epithelial Cells[J]. Genes Cells, 2002, 7(10): 1059 – 1072.

[14] Chen J, Xu W, Jiang H. 17 beta-estrodial protects neurons from ischermic damage and attenuates accumulation of ectracellular excitatory amino acids[J]. Anesth Analg, 2001, 92(6): 1520-1523.

[15] Song L, Pachter JS. Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells[J]. Microvasc Res, 2004, 67(1), 67: 78 – 89.

[16] Inadera H, Sekiya T, Yoshimura T, et al. Molecular analysis of the inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression by estrogens and xenoestrogens in MCF-7 cells[J]. Endocrinology 2000, 141(1): 50 – 59.

(编辑:左艳芳)