

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01258

• 短篇论著 •

# 脑缺血再灌注损伤对大鼠血脑屏障内皮屏障抗原及通透性的影响

## Effects of ischemia/reperfusion injury on endothelial barrier antigen expression and blood-brain barrier permeability in rats

刘式威<sup>1\*</sup>, 刘政华<sup>2</sup>, 吕霞<sup>2</sup>, 刘志刚<sup>1</sup>, 尹岭<sup>3</sup>

- 1. 解放军 211 医院神经内科, 哈尔滨 150080
- 2. 解放军 65426 部队医院, 哈尔滨 150086
- 3. 解放军总医院, 北京 100837

**[摘要]** **目的** 探讨大鼠脑缺血再灌注损伤对血脑屏障内皮屏障抗原(EBA)及通透性的影响。**方法** 20只雄性SD大鼠随机分成缺血再灌注组和假手术组,采用阻断大鼠一侧大脑中动脉(MCA)血流2h,再灌注24h制成局灶性脑缺血模型。24h后断头取脑,制作冰冻切片,免疫组化染色检测血脑屏障EBA和Fibrinogen的表达。**结果** 缺血再灌注组EBA免疫反应阳性血管数 $5.30 \pm 1.24$ ,假手术组EBA免疫反应阳性血管数 $15.20 \pm 1.02$ ,两组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。缺血再灌注组Fibrinogen免疫反应阳性血管数 $8.60 \pm 3.12$ ,假手术组Fibrinogen免疫反应阳性血管数 $1.30 \pm 0.46$ ,两组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 脑缺血再灌注损伤能显著减少血脑屏障EBA表达,增加血脑屏障通透性。

**[关键词]** 血脑屏障;脑缺血;再灌注损伤;内皮屏障抗原;免疫组织化学

**[中图分类号]** R 743 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1258-03

在脑缺血引起中枢神经病变的病理过程中,血脑屏障破坏是重要的标志<sup>[1]</sup>。血脑屏障微血管内皮细胞膜上存在一种蛋白标记物——内皮屏障抗原(endothelial barrier antigen, EBA)<sup>[2]</sup>。EBA被认为是血脑屏障内皮细胞紧密连接的主要成分<sup>[3-4]</sup>,研究发现如实验性变态反应性脑脊髓炎<sup>[5]</sup>、脑外伤<sup>[6]</sup>、糖尿病<sup>[7]</sup>等疾病可引起EBA减少,提示EBA减少可作为血脑屏障损伤的一个敏感和特异性标记物。本实验运用血脑屏障内皮细胞膜特异性标记物EBA及内源性通透性示踪剂Fibrinogen,从分子水平观察脑缺血损伤对EBA表达和血脑屏障通透性的影响,为进一步研究脑缺血性疾病以及观察治疗缺血性药物的疗效提供理论依据。

### 1 材料和方法

**1.1 主要试剂与药品** 小鼠抗大鼠EBA单克隆抗体(Sigma),兔抗鼠Fibrinogen多克隆抗体(Sigma),SABC免疫组化试剂盒(友谊中联生物科技有限公司),DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),TTC(上海化学试剂公司)。

**1.2 实验动物及分组** 健康雄性SD大鼠20只,清洁级,体质量230~250g,由哈尔滨医科大学附属二院动物实验中心提供。20只大鼠随机分成缺血再灌注组和假手术组,每组10只。所有大鼠均参照Takaba等<sup>[8]</sup>线栓法建立大鼠局灶性脑缺血2h再灌注24h损伤模型,假手术组不结扎动脉。

**1.3 冰冻切片制备** 再灌注24h后麻醉大鼠,断头选取额叶缺血区脑组织立即放入小冻存管中,投入液氮罐中速冻,OCT包埋。用冷冻切片机冠状切片,片厚10 $\mu$ m,连续取3张为一组,其中1张行EBA,1张行Fibrinogen免疫组化染色,1张行TTC染色,共取5组。

**1.4 TTC染色** 切片置于2% TTC磷酸盐缓冲液中,37 $^{\circ}$ C避光温浴30min。TTC被线粒体过氧化氢酶还原,可使正常脑组织染色呈红色,梗死组织呈白色。

**1.5 免疫组化染色** 按SABC法进行,一抗(EBA,1:400; Fibrinogen,1:1000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗滴加生物素结合的羊抗兔、鼠抗鼠IgG,DAB氧化酶法显色,苏木精复染,脱水、透明、封片,光镜观察。

**1.6 超微形态学研究** 额叶缺血区脑组织修成1.0mm $\times$ 1.0mm $\times$ 0.5mm的组织块。3%戊二醛固定过夜后,四氧化锇重固定,环氧树脂包埋。观察定位后行超薄切片,片厚50~70nm,轴、钴双重染色。日立透射电镜观察。

**1.7 阳性细胞计数及统计学分析** 每只大鼠取5张切片,每张切片在100倍光镜下随机选取5个缺血半暗带视野区域,用MIAS医学图像分析软件计算免疫反应阳性血管数。所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用成组t检验进行统计学处理。检验水平( $\alpha$ )为0.05。

### 2 结果

**2.1 TTC染色结果** TTC染色中,缺血再灌注组缺血坏死

**[收稿日期]** 2010-05-16 **[接受日期]** 2010-08-23

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(“973”计划,2004CB720302)。Supported by National Program on Key Basic Research Projects (“973” Program, 2004CB720302)。

**[作者简介]** 刘式威,博士,副主任医师。

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0451-57752216, E-mail: abcd9622@163.com

区域表现为白色, 而正常组织呈现鲜红色(图 1A), 假手术组正常组织呈现鲜红色(图 1B)。

2.2 缺血再灌注组和假手术组 EBA 表达 见图 2A、2B。结果显示缺血再灌注组 EBA 免疫反应阳性血管数为  $5.30 \pm 1.24$ , 假手术组 EBA 免疫反应阳性血管数为  $15.20 \pm 1.02$ , 缺血再灌注组与假手术组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

2.3 缺血再灌注组和假手术组 Fibrinogen 表达 见图 3A、3B。结果显示缺血再灌注组 Fibrinogen 免疫反应阳性血管数为  $8.60 \pm 3.12$ , 假手术组 Fibrinogen 免疫反应阳性血管数为  $1.30 \pm 0.46$ , 缺血再灌注组与假手术组比较有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。

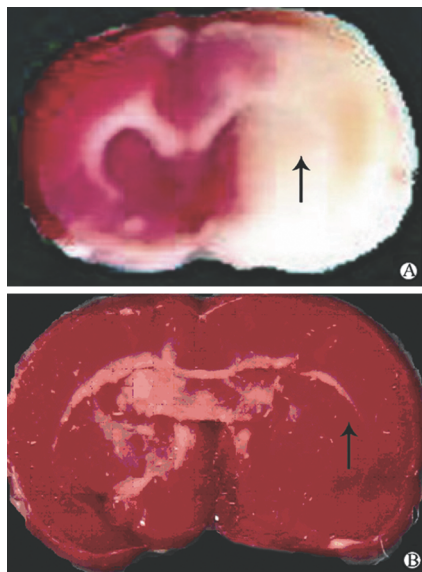


图 1 缺血再灌注组(A)和假手术组(B)TTC 染色

A: 缺血再灌注组, 梗死区域为白色(↑); B: 假手术组, TTC 染色正常(↑)

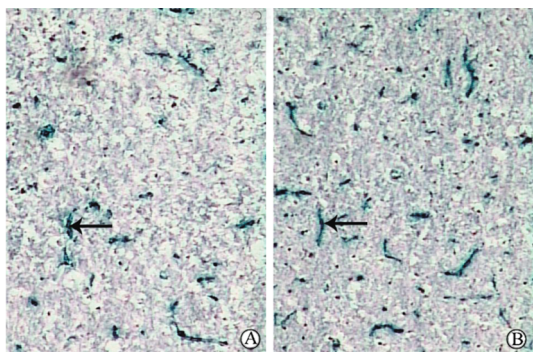


图 2 缺血再灌注组(A)和假手术组(B)EBA 表达

↑: EBA 阳性表达. Original magnification:  $\times 100$

2.4 缺血再灌注组和假手术组电镜结果 缺血再灌注组电镜可见微血管内皮细胞紧密连接破坏加重, 可见内皮窗孔, 细胞间裂隙增多, 质膜囊泡增多(图 4A)。假手术组电镜可见微血管内皮细胞紧密连接, 内皮细胞形态完整(图 4B)。

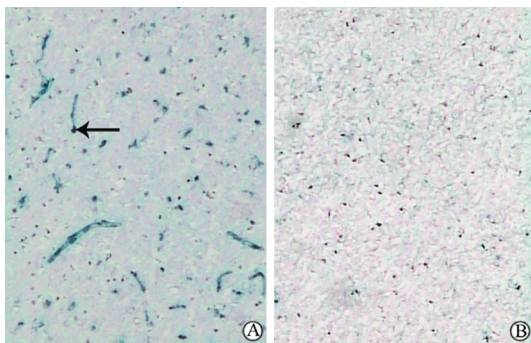


图 3 缺血再灌注组(A)和假手术组(B)Fibrinogen 表达

↑: Fibrinogen 阳性表达. Original magnification:  $\times 100$

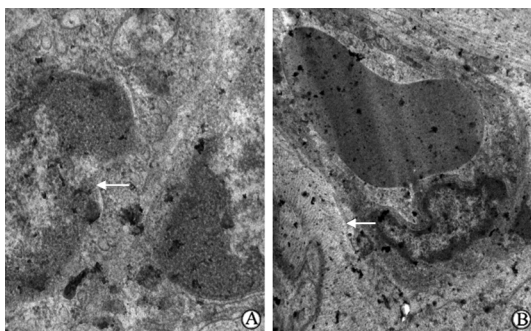


图 4 缺血再灌注组(A)和假手术组(B)电镜所见

A: 缺血再灌注组, 内皮细胞紧密连接破坏(↑); B: 假手术组, 内皮细胞紧密连接正常(↑). Original magnification:  $\times 30\ 000$

### 3 讨论

在脑缺血引起中枢神经病变的病理过程中, 血-脑屏障破坏是重要的标志<sup>[1]</sup>。但以往对血脑屏障破坏的研究, 通常运用静脉注射外源性和内源性示踪剂的方法, 通过观察示踪剂外渗情况判定血脑屏障的破坏, 不能够对血脑屏障破坏位点提供直接信息。最近研究发现, 血-脑屏障微血管内皮细胞膜上存在一种蛋白标记物 EBA, 它是一种相对分子质量分别为 32 000、25 000 和 23 500 的蛋白三聚体, 主要在具有血-脑屏障特性的毛细血管内皮细胞特异性表达<sup>[2]</sup>。文献<sup>[4]</sup>通过静脉注射单克隆抗体(抗-EBA), 发现内皮细胞 EBA 表达减少, 并且血-脑屏障急性和广泛开放, 内源性示踪剂 Fibrinogen 外渗, 推测 EBA 是内皮细胞紧密连接的成分。另外一些实验发现, 在实验性变态反应性脑脊髓炎<sup>[5]</sup>、脑外伤<sup>[6]</sup>、糖尿病<sup>[7]</sup>等疾病中, 亦伴随内皮细胞 EBA 表达减少; 而随着这些疾病的恢复, 均伴随 EBA 重新表达。上述研究证实内皮细胞 EBA 减少与血-脑屏障开放具有相关性, 提示内皮细胞 EBA 是血脑屏障屏障功能完整的可靠指标。内源性示踪剂 Fibrinogen 为正常血浆蛋白成分, 对细胞无毒性副作用, 不受浓度、电荷及巨噬细胞的影响, 更接近地反映在体情况, 更能真实、准确地反映微血管的通透状态。

王社军等<sup>[9]</sup>研究认为 BBB 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, BBB 通透性开始增加; 再灌注 6~12 h, BBB 通透性逐渐增加; 再灌注 24 h, BBB 的通

透性明显增加,且达高峰;待再灌注 72 h 及 120 h, BBB 的通透性逐渐减小。为此本研究主要选取缺血再灌注 24 h 作为时间观测点,利用 EBA、Fibrinogen 免疫组化染色检测脑缺血再灌注对血脑屏障 EBA 表达和通透性的影响。

本研究结果显示缺血再灌注组 EBA 表达明显减少, Fibrinogen 表达显著增加,而正常脑组织 EBA 表达正常,未见 Fibrinogen 外渗。电镜结果显示缺血再灌注组微血管内皮细胞紧密连接破坏加重,可见内皮窗孔,细胞间裂隙增多,质膜囊泡增多。假手术组微血管内皮细胞紧密连接,内皮细胞形态完整。可见 EBA 表达减少与血脑屏障损伤、通透性增加具有相关性。本实验进一步证实 EBA 减少可作为脑缺血性血脑屏障损伤的一个敏感和特异性标记物,可为研究脑缺血性疾病的严重程度提供参考。

#### [参考文献]

- [1] Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Benetti E, Gallicchio M, Dianzani C, et al. Oxidative stress and inflammatory response evoked by transient cerebral ischemia/reperfusion: effects of the PPAR-alpha agonist WY14643[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41: 579-589.
- [2] Maaloud N, Meister B. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the brainstem area postrema-nucleus tractus solitarius region[J]. *J Chem Neuroanat*, 2009, 37: 182-195.
- [3] Ghabriel M N, Zhu C, Leigh C. Electron microscope study of blood-brain barrier opening induced by immunological targeting of the endothelial barrier antigen[J]. *Brain Res*, 2002, 934: 140-151.
- [4] N Ghabriel M, J Lu J, Tadros R, Hermanis G. A narrow time-window for access to the brain by exogenous protein after immunological targeting of a blood-brain barrier antigen[J]. *J Comp Pathol*, 2004, 131: 52-60.
- [5] Natah S S, Srinivasan S, Pittman Q, Zhao Z, Dunn J F. Effects of acute hypoxia and hyperthermia on the permeability of the blood-brain barrier in adult rats[J]. *J Appl Physiol*, 2009, 107: 1348-1356.
- [6] Lin B, Ginsberg M D, Zhao W, Alonso O F, Belayev L, Busto R. Quantitative analysis of microvascular alterations in traumatic brain injury by endothelial barrier antigen immunohistochemistry[J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18: 389-397.
- [7] 刘式威, 尹岭, 吕霞, 张梅奎, 杜侃. 动态观察糖尿病对大鼠内皮屏障抗原和血脑屏障通透性的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2007, 33: 298-300.
- [8] Takaba H, Fukuda K, Yao H. Substrain differences, gender, and age of spontaneously hypertensive rats critically determine infarct size produced by distal middle cerebral artery occlusion[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2004, 24: 589-598.
- [9] 王社军, 杜长生, 唐红, 李钟铭, 冯兴军, 张欣健, 等. 大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障通透性的改变[J]. *武警医学*, 2005, 16: 745-747.

[本文编辑] 孙岩