

本文引用:李青,白宏英,徐志秀,等.乌司他丁对脑缺血再灌注大鼠脑组织中基质金属蛋白酶-9活性和细胞外基质表达的影响[J].新乡医学院学报,2020,37(10):912-915. DOI:10.7683/xxxyxb.2020.10.003.

## 【基础研究】

# 乌司他丁对脑缺血再灌注大鼠脑组织中基质金属蛋白酶-9活性和细胞外基质表达的影响

李青<sup>1</sup>,白宏英<sup>2</sup>,徐志秀<sup>1</sup>,赵盼盼<sup>1</sup>,赵建华<sup>1</sup>,袁彬<sup>1</sup>,吉四辈<sup>1</sup>

(1.新乡医学院第一附属医院神经内科 河南省老年性痴呆神经修复国际联合实验室,河南 卫辉 453100;2.郑州大学第二附属医院神经内科,河南 郑州 450014)

**摘要:** 目的 观察乌司他丁(UTI)对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)活性、细胞外基质成分层粘连蛋白(LN)和IV型胶原(Col IV)表达的影响。方法 采用随机数字表法将72只无特定病原级雄性Sprague Dawley大鼠分为假手术组、模型组和UTI组,每组24只。模型组和UTI组大鼠采用改进的Zea Longa线栓法制备局部脑缺血再灌注损伤模型,假手术组大鼠步骤同模型组,但不插入鱼线。缺血2 h后进行再灌注。UTI组大鼠于再灌注5 min内腹腔注射UTI( $10 \text{ kU} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),每日1次,直至处死为止;模型组大鼠腹腔注射等体积的生理盐水,假手术组大鼠不给予任何干预措施。各组大鼠分别于缺血2 h再灌注6、24、48、72 h处死大鼠。采用明胶酶谱法测定大鼠缺血侧脑组织中MMP-9活性,酶联免疫吸附法检测脑组织中LN和Col IV水平。结果 模型组和UTI组各时间点大鼠脑组织中MMP-9活性均显著高于假手术组( $P < 0.05$ ),UTI组各时间点大鼠脑组织中MMP-9活性均显著低于模型组( $P < 0.05$ );模型组和UTI组各时间点大鼠脑组织中LN和Col IV水平均显著低于假手术组( $P < 0.05$ )。UTI组大鼠脑组织中LN和Col IV水平均显著高于模型组( $P < 0.05$ )。结论 UTI可抑制大鼠脑缺血再灌注后脑组织中MMP-9活性,减少LN和Col IV的降解,从而减轻血脑屏障破坏,发挥脑组织保护作用。

**关键词:** 乌司他丁;脑缺血再灌注;基质金属蛋白酶-9;层粘连蛋白;IV型胶原;明胶酶谱

中图分类号:R743.3 文献标志码:A 文章编号:1004-7239(2020)10-0912-04

## Effect of ulinastatin on the activity of matrix metalloproteinase-9 and the expression of extracellular matrix in brain tissues of rats with cerebral ischemia-reperfusion

LI Qing<sup>1</sup>, BAI Hongying<sup>2</sup>, XU Zhixiu<sup>1</sup>, ZHAO Panpan<sup>1</sup>, ZHAO Jianhua<sup>1</sup>, YUAN Bin<sup>1</sup>, JI Sibei<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan Joint International Research Laboratory of Neurorestoratology For Senile Dementia, Weihui 453100, Henan Province, China; 2. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of ulinastatin (UTI) on the activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and the expression of extracellular matrix component laminin (LN) and type IV collagen (Col IV) in brain tissues of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** Seventy-two male Sprague Dawley rats without specific pathogens were randomly divided into the sham operation group, model group and UTI group, with 24 rats in each group. The rats in the model group and UTI group were made the local cerebral ischemia-reperfusion injury model by using the improved Zea Longa suture method. The procedure of the rats in the sham operation group was the same as that in the model group, but no fishing line was inserted. Rats in the UTI group were intraperitoneally injected with UTI ( $10 \text{ kU} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) within 5 minutes of reperfusion, once a day until sacrificed; rats in the model group were intraperitoneally injected with a corresponding volume of normal saline, and the rats in the sham operation group was not given any intervention. Rats in each group were sacrificed at reperfusion 6, 24, 48, 72 h after ischemia for 2 h. Gelatin zymography was used to determine the activity of MMP-9 in the ischemic brain tissue of rats, and the expression levels of LN and Col IV in the brain tissue were determined by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The activity of MMP-9 in the brain tissue of rats in the model group and UTI group at each time point was significantly higher than that in the sham operation group ( $P < 0.05$ ). The activity of MMP-9 in the brain tissue of rats in the UTI group was significantly lower than that in the model group at each time point ( $P < 0.05$ ). The levels of LN and Col IV in the brain tissue of rats in the model group and UTI group at each time point were significantly lower than those in the sham operation group ( $P < 0.05$ ). The content of LN and Col IV in the brain tissue in the UTI group was significantly higher than that in the model group ( $P < 0.05$ ).

DOI:10.7683/xxxyxb.2020.10.003

收稿日期:2019-12-26

基金项目:河南省自然科学基金项目(编号:182300410389);新乡医学院第一附属医院青年培育基金项目(编号:QN-2019-B06)。

作者简介:李青(1984-),女,河南长垣人,硕士,主治医师,研究方向:脑血管疾病,帕金森及运动障碍疾病。

通信作者:赵建华(1977-),男,河南驻马店人,博士,副主任医师,研究方向:脑小血管病、认知障碍疾病;E-mail:zjh0913@163.com。

**Conclusion** UTI can inhibit the activity of MMP-9 in the brain tissue of rats after cerebral ischemia-reperfusion, reduce the degradation of LN and Col IV, thereby reducing the damage of the blood-brain barrier and exerting a protective effect on brain tissue.

**Key words:** ulinastatin; cerebral ischemia-reperfusion; matrix metalloproteinase-9; laminin; collagen IV; gelatin zymography

超早期溶栓恢复缺血半暗带血流是急性缺血性脑卒中最有效的治疗方法,但随之可能出现的再灌注损伤可使病情恶化<sup>[1]</sup>,因此,减轻和改善脑缺血后的继发性脑损伤是目前的研究热点。研究表明,缺血性脑卒中患者脑缺血再灌注损伤后血浆中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9表达增加<sup>[2]</sup>。MMP-9的作用底物层粘连蛋白(laminin, LN)和IV型胶原(collagen IV, Col IV)是构成血脑屏障(blood brain-barrier, BBB)基底膜细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要成分,其随缺血再灌注时间延长表达下降,与BBB损伤密切相关<sup>[3]</sup>。作者前期研究发现,乌司他丁(ulinastatin, UTI)可保护BBB完整性,发挥脑保护作用,但具体机制尚不清楚<sup>[4]</sup>。因此,本实验在前期研究基础上,观察UTI对缺血再灌注损伤大鼠脑组织中MMP-9活性及ECM中LN、Col IV水平的影响,以深入探讨UTI对脑组织保护可能的分子生物学机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 同批次健康无特定病原级雄性Sprague Dawley大鼠72只,3~4月龄,体质量250~300 g,由郑州大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(豫)2010-0002。

**1.2 主要试剂** 明胶(猪皮来源)购自美国Sigma公司,UTI购自广东天普生化医药股份有限公司,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度定量试剂盒购自上海觅拓生物技术公司,预染蛋白质Marker III购自北京天根生物技术公司,大鼠LN和Col IV酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELASA)试剂盒购自上海森雄生物公司。酶标仪购自美国伯乐生命医学产品有限公司。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 实验分组及干预措施** 将72只大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组和UTI组,每组24只。模型组和UTI组大鼠根据改进的Zea Longa线栓法制备大鼠局灶性大脑中动脉脑缺血再灌注损伤模型<sup>[5]</sup>,具体造模方法为:以100 g·L<sup>-1</sup>水合氯醛(300 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉大鼠,四肢、头部仰卧固定于手术台,碘附常规消毒颈部后切皮,无齿镊钝性分离皮下肌膜、肌肉,充分暴露左颈总动脉(left common carotid artery, LCCA)、左颈内动脉及左颈外动脉,避免伤及迷走神经。结扎LCCA及左颈外动脉根部,于LCCA分叉处插入直径为0.26 mm的鱼

线至大脑中动脉,于深度18~20 mm处扎紧、固定、局部缝合,阻断血供2 h后拔出栓线至LCCA恢复血流达到再灌注。注意在缺血期和再灌注后2 h内均维持体温在(37.0±0.5)℃。选择苏醒后右侧肢体瘫痪、行走时向右侧旋转、右上肢屈曲的大鼠继续实验。假手术组步骤同模型组,但不插入鱼线。UTI组大鼠于再灌注5 min内腹腔注射UTI(10 kU·kg<sup>-1</sup>),每日1次,直至处死为止;模型组大鼠则腹腔注射等体积的生理盐水,假手术组不给予任何干预措施<sup>[4]</sup>。

**1.3.2 脑组织标本采集** 各组大鼠分别于再灌注6、24、48、72 h,采用脊椎脱臼法处死大鼠(每个时间点每组6只大鼠),立刻经右心室注入生理盐水,至心脏流出清亮液停止,剪开颅骨取脑组织,梗死侧脑组织迅速于冰块上去掉额叶、枕叶约2 mm,标记后置于-80℃冰箱贮存备用。

**1.3.3 脑组织蛋白提取及浓度测定** 脑组织标本分别测定重量,迅速剪碎置于预冷玻璃匀浆器,100 mg脑组织加入1 mL匀浆缓冲液和0.1 mg苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF),低温匀浆,静置20 min,离心20 min,取组织上清液小管分装(至少40 μL),留1管置-20℃下保存,用BCA法测定蛋白浓度(按照试剂盒说明书操作步骤进行),余-80℃保存备用。

**1.3.4 明胶酶谱法检测各组大鼠脑组织中MMP-9活性** 配制含明胶(10 mg·L<sup>-1</sup>)底物的体积分数10%聚丙烯酰胺凝胶,取20 μL组织上清液与5 mL上样缓冲液(5×)混匀,等蛋白量上样、电泳(125 V, 90 min);将凝胶转移至25 mg·L<sup>-1</sup>Triton-X100溶液中,震荡洗涤3次(20、20、30 min),期间双蒸馏水漂洗,37℃孵育72 h后,将凝胶置于染色液中震荡30 min,脱色液脱色,直至凝胶可以看到蓝色背景下的目标透明条带MMP-9。扫描凝胶后,采用Gel-Pro Analyzer生物电泳图像分析系统进行吸光度定量,结果以透明条带的吸光度值表示。为方便比较,每次平行上样MMP-9标准品和蓝色预染蛋白marker作为参照<sup>[4]</sup>。

**1.3.5 ELISA法检测各组大鼠脑组织中LN和Col IV水平** 取组织上清液标本,采用ELISA法检测各组大鼠脑组织中LN和Col IV含量,严格按照试剂盒说明书进行操作,酶标仪检测450 nm波长处吸光度值,建立标准曲线,依据样品吸光度值计算LN和Col IV水平。

**1.4 统计学处理** 应用SPSS22.0软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 3组大鼠脑组织中MMP-9活性比较** 结果见表1。假手术组大鼠脑组织中MMP-9活性在各时间点间差异无统计学意义( $F = 0.417, P > 0.05$ )。模型组和UTI组大鼠脑组织缺血再灌注24、48、72 h时脑组织中MMP-9活性均高于6 h时,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组大鼠脑组织缺血再灌注48 h和72 h时脑组织中MMP-9活性高于24 h时,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组大鼠脑组织缺血再灌注72 h时脑组织中MMP-9活性低于48 h时( $P < 0.05$ )。与假手术组各时间点比较,模型组和UTI组大鼠脑组织中MMP-9活性均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组各时间点比较,UTI组大鼠脑组织中MMP-9活性均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表1 3组大鼠脑组织中MMP-9活性比较

Tab. 1 Comparison of the MMP-9 activity in brain tissue of rats among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MMP-9活性(吸光度值)			
	6 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	0.121 $\pm$ 0.052	0.126 $\pm$ 0.013	0.139 $\pm$ 0.017	0.135 $\pm$ 0.027
模型组	1.845 $\pm$ 0.322 <sup>a</sup>	6.552 $\pm$ 0.524 <sup>ac</sup>	6.823 $\pm$ 0.351 <sup>acd</sup>	5.723 $\pm$ 0.142 <sup>acde</sup>
UTI组	1.166 $\pm$ 0.139 <sup>ab</sup>	5.067 $\pm$ 0.509 <sup>abc</sup>	5.095 $\pm$ 0.348 <sup>abc</sup>	5.113 $\pm$ 0.140 <sup>abc</sup>

注:与假手术组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与同组6 h比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与同组24 h比较<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与同组48 h比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

**2.2 3组大鼠脑组织中LN水平比较** 结果见表2。假手术组大鼠脑组织中LN水平在各时间点间比较差异无统计学意义( $F = 0.372, P > 0.05$ )。模型组和UTI组大鼠脑组织缺血再灌注24、48、72 h时脑组织中LN水平均低于6 h,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组大鼠脑组织缺血再灌注48 h和72 h时脑组织中LN水平均低于24 h,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组大鼠脑组织缺血再灌注72 h时脑组织中LN水平低于48 h,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。UTI组大鼠脑组织缺血再灌注48 h时脑组织中LN水平高于24 h,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。UTI组大鼠脑组织缺血再灌注72 h时脑组织中LN水平低于48 h,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与假手术组各时间点相比,模型组和UTI组大鼠脑组织中LN水平均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组各时间点相比,UTI组大鼠脑组织中LN水平均显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表2 3组大鼠脑组织中LN水平比较

Tab. 2 Comparison of LN level in brain tissues of rats among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	LN/( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )			
	6 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	29.235 $\pm$ 0.830	28.976 $\pm$ 0.601	28.921 $\pm$ 0.403	29.003 $\pm$ 0.159
模型组	20.554 $\pm$ 0.591 <sup>a</sup>	16.757 $\pm$ 0.469 <sup>ac</sup>	15.719 $\pm$ 0.538 <sup>acd</sup>	15.609 $\pm$ 0.519 <sup>acde</sup>
UTI组	21.186 $\pm$ 0.053 <sup>ab</sup>	19.096 $\pm$ 0.198 <sup>abc</sup>	19.121 $\pm$ 0.106 <sup>abcd</sup>	19.031 $\pm$ 0.453 <sup>abce</sup>

注:与假手术组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与同组6 h比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与同组24 h比较<sup>d</sup> $P < 0.05$ ,与同组48 h比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

**2.3 3组大鼠脑组织中Col IV水平比较** 结果见表3。假手术组大鼠脑组织中Col IV水平各时间点间比较差异无统计学意义( $F = 0.677, P > 0.05$ )。模型组和UTI组大鼠脑组织缺血再灌注24、48、72 h时脑组织中Col IV水平均低于6 h,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组和UTI组大鼠脑组织缺血再灌注48 h和72 h时脑组织中Col IV水平均低于24 h,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组和UTI组大鼠脑组织缺血再灌注72 h时脑组织中Col IV水平均低于48 h,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与假手术组各时间点相比,模型组和UTI组大鼠脑组织中Col IV水平均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组各时间点相比,UTI组大鼠脑组织中Col IV水平均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表3 各组大鼠脑组织中Col IV水平比较

Tab. 3 Comparison of Col IV level in brain tissues of rats among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Col IV/( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )			
	6 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	1.885 $\pm$ 0.051	1.927 $\pm$ 0.056	1.914 $\pm$ 0.065	1.906 $\pm$ 0.032
模型组	0.901 $\pm$ 0.024 <sup>a</sup>	0.685 $\pm$ 0.046 <sup>ac</sup>	0.603 $\pm$ 0.041 <sup>acd</sup>	0.592 $\pm$ 0.014 <sup>acde</sup>
UTI组	1.012 $\pm$ 0.011 <sup>ab</sup>	0.961 $\pm$ 0.049 <sup>abc</sup>	0.882 $\pm$ 0.017 <sup>abcd</sup>	0.814 $\pm$ 0.013 <sup>abde</sup>

注:与假手术组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与同组6 h比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与同组24 h比较<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与同组48 h比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

脑缺血再灌注损伤与基底膜成分降解、微血管结构受损有关,使BBB遭到破坏<sup>[3]</sup>。BBB是位于中枢神经组织和血液之间具有渗透特异性的屏障,由微血管内皮细胞、ECM和星形胶质细胞终足紧密连接组成;LN和Col IV是ECM的主要成分,在特定位点两者结合形成复杂立体结构,对内皮细胞壁提供结构支持,维持BBB的完整性<sup>[6]</sup>。HAMANN等<sup>[7]</sup>研究发现,猴脑缺血再灌注24 h后,LN和Col IV的表达均明显降低,基底膜抗原也同步消失,说明脑缺血再灌注后存在脑微血管壁损坏。因此,寻找抑制LN和Col IV降解的方法,以维持BBB的稳定结构和正常功能,可保护脑细胞<sup>[8]</sup>。

MMPs是一组降解ECM的锌离子依赖性蛋白酶,研究发现,脑缺血再灌注后由于各种因素如炎症介质肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-1 $\beta$ 、氧自由基等的刺激,使MMP-9表达增加,而MMP-9与BBB通透性密切相关<sup>[9]</sup>;HAMANN等<sup>[7]</sup>和GU等<sup>[10]</sup>研究认为,MMP-9可降解血管基底膜的ECM,主要是LN和Col IV,导致二次损伤的发生。本研究发现,模型组MMP-9活性于缺血再灌注24 h开始升高,48 h达高峰,72 h有所下降,这与BBB的二次开放时间一致,证实MMP-9参与BBB通透性的破坏;模型组大鼠脑组织中各时间点LN和Col IV的含量均较假手术组明显下降,于再灌注后24 h,LN和Col IV的含量均开始降低,且随再灌注时间延长持续减少,表明缺血再灌注后LN和Col IV表达减少,这与MMP-9活性变化相反。以上结果提示,脑缺血再灌注后,MMP-9表达增加,进而降解基底膜ECM的LN和Col IV,使微血管壁结构受损,BBB通透性增加,血液成分外渗,继发血管源性水肿和内环境紊乱,进而加重再灌注损伤。

UTI是具有蛋白酶抑制作用的一种糖蛋白,其具有抑制炎性因子释放、减轻自由基损伤、抑制蛋白质分解等药理作用。UTI不仅用于早期急性胰腺炎治疗,还可用于休克期间改善微循环状态<sup>[11]</sup>。目前研究发现,UTI在肝脏、心脏等多种脏器缺血再灌注损伤中具有细胞保护作用,但其对脑组织缺血再灌注损伤的保护机制尚未完全阐明<sup>[12]</sup>。CHEN等<sup>[13]</sup>和CHO等<sup>[14]</sup>通过大鼠脑缺血模型研究发现,UTI能缩小脑梗死组织含水量,抑制海马细胞凋亡,发挥脑保护作用。目前研究认为,UTI亦可通过清除氧自由基<sup>[15]</sup>、降低炎性因子浸润<sup>[16]</sup>、减少紧密连接蛋白和闭合蛋白的降解<sup>[17]</sup>等途径减轻脑缺血再灌注损伤,发挥脑保护作用。作者前期研究提示,UTI可通过抑制MMP-9活性减轻BBB的破坏,但具体保护机制仍未完全阐明<sup>[4]</sup>。本研究结果表明,与模型组对比,UTI组各时间点大鼠损伤侧脑组织中MMP-9活性均降低,LN和Col IV含量显著增加,提示脑缺血再灌注损伤后早期给予UTI干预,能上调缺血侧LN和Col IV含量,其机制可能与UTI抑制MMP-9活性,减轻对LN和Col IV的降解,保护BBB完整性有关。

综上所述,脑缺血再灌注后各种刺激因素使MMP-9活性增加,进而使LN和Col IV降解增加,导致BBB被破坏,而早期给予UTI干预可使MMP-9活性下降,LN和Col IV降解减少,从而减轻微血管结构破坏,保护BBB的完整性。但脑缺血再灌注后BBB破坏的机制十分复杂,UTI是否可以通过直接刺激LN和Col IV的表达增加,抑或协同其他因素如细胞因子、黏附因子、自由基、一氧化氮、MMPs等诸多因素发挥脑保护作用,仍需进一步探索。

## 参考文献:

- [1] GAUBERTI M, LAPERGUE B, MARTINEZ DE LIZARRONDO S, et al. Ischemia-reperfusion injury after endovascular thrombectomy for ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2018, 49(12): 3071-3074.
- [2] SIFAT A E, VAIDYA B, ABBRUSCATO T J. Blood-brain barrier protection as a therapeutic strategy for acute ischemic stroke [J]. *AAPS J*, 2017, 19(4): 957-972.
- [3] LIU X R, LUO M, YAN F, et al. Ischemic postconditioning diminishes matrix metalloproteinase 9 expression and attenuates loss of the extracellular matrix proteins in rats following middle cerebral artery occlusion and reperfusion [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(10): 855-863.
- [4] 李青,白宏英,曾志磊,等.乌司他丁对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性和MMP-9活性的影响[J].中风与神经疾病杂志,2011,28(2):123-125.
- [5] 谢惠芳,徐如祥,陈中灿.线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的改进[J].中华神经医学杂志,2007,6(4):340-342.
- [6] COELHO N M, LLOPIS-HERNÁNDEZ V, SALMERÓN-SANCHEZ M, et al. Dynamic reorganization and enzymatic remodeling of type IV collagen at cell-biomaterial interface [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2016, 105: 81-104.
- [7] HAMANN G F, OKADA Y, FITRIDGE R, et al. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion [J]. *Stroke*, 1995, 26: 2120-2126.
- [8] BAETEN K M, AKASSOGLOU K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke [J]. *Dev Neurobiol*, 2011, 71(11): 1018-1039.
- [9] TANG X, ZHONG W, TU Q, et al. NADPH oxidase mediates the expression of MMP-9 in cerebral tissue after ischemia-reperfusion damage [J]. *Neurol Res*, 2014, 36: 118-125.
- [10] GU Z, CUI J, BROWN S, et al. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(27): 6401-6408.
- [11] XU C E, ZHANG M Y, ZOU C W, et al. Evaluation of the pharmacological function of ulinastatin in experimental animals [J]. *Molecules*, 2012, 17(8): 9070-9080.
- [12] LIU M, SHEN J, ZOU F, et al. Effect of ulinastatin on the permeability of the blood-brain barrier on rats with global cerebral ischemia/reperfusion injury as assessed by MRI [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 412-417.
- [13] CHEN H M, HUANG H S, RUAN L, et al. Ulinastatin attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(5): 1483-1489.
- [14] CHO Y S, SHIN M S, KO I G, et al. Ulinastatin inhibits cerebral ischemia-induced apoptosis in the hippocampus of gerbils [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 1796-1802.
- [15] HU H X, XU D H, JU W N, et al. Neuroprotection of ulinastatin on transient cerebral ischemia via antioxidative mechanisms [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2018, 32(2): 283-288.
- [16] LI X, SU L, ZHANG X, et al. Ulinastatin downregulates TLR4 and NF- $\kappa$ B expression and protects mouse brains against ischemia/reperfusion injury [J]. *Neurol Res*, 2017, 39(4): 367-373.
- [17] LI X F, ZHANG X J, ZHANG C, et al. Ulinastatin protects brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting MMP-9 and alleviating loss of ZO-1 and occludin proteins in mice [J]. *Exp Neurol*, 2018, 302: 68-74.

(本文编辑:郭潇)