

### 【基础研究】

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, ELISA)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 ± 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 ± 0.052	0.126 ± 0.013	0.139 ± 0.017	0.135 ± 0.027
模型组	1.845 ± 0.322 <sup>a</sup>	6.552 ± 0.524 <sup>ac</sup>	6.823 ± 0.351 <sup>acd</sup>	5.723 ± 0.142 <sup>acde</sup>
UTI 组	1.166 ± 0.139 <sup>ab</sup>	5.067 ± 0.509 <sup>abc</sup>	5.095 ± 0.348 <sup>abc</sup>	5.113 ± 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 ± 0.830	28.976 ± 0.601	28.921 ± 0.403	29.003 ± 0.159
模型组	20.554 ± 0.591 <sup>a</sup>	16.757 ± 0.469 <sup>ac</sup>	15.719 ± 0.538 <sup>acd</sup>	15.609 ± 0.519 <sup>acde</sup>
UTI 组	21.186 ± 0.053 <sup>ab</sup>	19.096 ± 0.198 <sup>abc</sup>	19.121 ± 0.106 <sup>abcd</sup>	19.031 ± 0.453 <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> $P < 0.05$ 。

**2.3 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 ± 0.051	1.927 ± 0.056	1.914 ± 0.065	1.906 ± 0.032
模型组	0.901 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.685 ± 0.046 <sup>ac</sup>	0.603 ± 0.041 <sup>acd</sup>	0.592 ± 0.014 <sup>acde</sup>
UTI 组	1.012 ± 0.011 <sup>ab</sup>	0.961 ± 0.049 <sup>abc</sup>	0.882 ± 0.017 <sup>abcd</sup>	0.814 ± 0.013 <sup>abcde</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,猿脑缺血再灌注 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,其具有抑制炎症因子释放、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>、降低炎症因子浸润<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, FITTRIDGE R, et al. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion[J]. *Stroke*, 1995, 26:2120-2126.
- [8] BAETEN K M, AKASSOGLU 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)