

·特约综述·

脑微血管炎性损伤病理学意义解析与药物调控研究进展

韩 峰

(浙江大学药学院//药理毒理研究所,浙江 杭州 310058)

作者简介:浙江大学药学院教授。主要围绕危害人类健康的心脑血管疾病与神经精神疾病开展病理分子机制及药物调控研究,通过解析神经血管单元信号组分间通讯规律,推进药物新靶点发现与创新药物研发。获国家自然科学基金重点项目、国家自然科学基金重点国际合作项目、国家重点研发计划重点专项等项目资助。研究成果发表在Cell Res、J Am Chem Soc、Antioxidants & Redox Signaling、J Pineal Res等杂志上。现担任《J Pharmacol Sci》副主编。E-mail: changhuahan@zju.edu.cn。



摘要:脑血管病发病率居高不下,临床尚缺乏有效的治疗方法。通过深入解析脑血管病的发病机制来发现潜在的重要药物靶标,这仍然是目前创新药物研发的重要策略。作为大脑必需的氧气和能量来源的重要通道,脑微血管具有区别于外周微血管系统的专有结构和功能属性。脑微血管是神经血管单元和构成血脑屏障的重要组成部分,也是急、慢性脑血管病的病因源头因素,炎症免疫反应和氧化/硝化应激等因素是造成脑微血管损伤和功能障碍的重要机制。采用能特异性反映临床脑微血管损伤病理过程的体内外疾病模型,结合活体可视化等技术,有助于进一步解析关联分子事件的时空动态变化规律。同时,本综述总结了近年以脑微血管结构和功能保护为目的的药物靶标和候选创新药物研究进展。

关键词:脑微血管;血脑屏障;脑血管病;硝化应激;药物靶标

中图分类号:R743 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2018)02-0161-10

Advances on Pathological Significance of Cerebral Microvascular Inflammatory Injury and Drug Discovery

HAN Feng

(Institute of Pharmacology and Toxicology//College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The incidence of acute and chronic cerebrovascular disease is high, whereas effective treatment in clinical practice is still lacking. The discovery of potential drug targets by further understanding the pathogenesis of cerebrovascular disease remains an important strategy. The brain microvasculature plays an important role as a delivery pipeline of oxygen and energy for the brain. The accumulating evidence indicated that cerebral microvascular system have unique structural and functional features, which are different from peripheral vascular system. Cerebral capillaries are important components of neurovascular units and constitute the blood-brain barrier. The inflammatory responses and oxidative/nitrosative stress are critical mechanisms that cause cerebral microvascular injury and dysfunction. The disease models in combined with in vivo imaging systems can be used to further analyze the spatiotemporal changes of related molecular events. Focusing on how to protect the integrity of brain microvascular structures and functions, this review also summarizes the progress and prospects of drug discovery for acute and chronic cerebrovascular diseases.

Key words: brain microvessels; blood-brain barrier; cerebrovascular diseases; nitrosative stress; drug target

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(2): 161-170]

收稿日期:2018-01-29

基金项目:国家自然科学基金重点项目(81730101),国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项(2016YFE0125400)

聚焦我国社会老龄化背景下心脑血管疾病等重大慢病现状,防治形势依然非常严峻。如何有效解决重大慢病防控中的瓶颈问题,遏制心脑血管疾病发病率、死亡率居高不下的局面,对基础和临床医学来说目前仍是一项挑战。以脑卒中为例,以单独神经保护为策略的一百多个候选药物在临床试验中失败,这引发基础和临床研究专家进一步反思,均认为应该继续对脑血管病的发病机制及规律进行深入解析^[1-4]。中枢神经系统内环境的稳态是维持正常的神经元功能的先决条件,而脑微血管损伤是脑卒中、血管性痴呆及其他神经退行性疾病发生、发展及转归过程中的重要共性病理基础。脑微血管对控制脑内稳态、维持适合神经元存活的最佳脑微环境而言意义重大,其病变多累计内径为100 μm 以内的脑小动脉、微动脉、小静脉和毛细血管。在脑微血管病变患者的临床症状和危险因素的研究表明,不同脑区(皮层下、基底节区、幕下结构)的脑微血管病理损伤,可以导致脑梗死、脑出血、认知功能障碍等诸多临床症状^[5-8]。然而,脑微血管损伤分子机制远未阐明,从发病机制和临床特点到治疗都存在挑战。通过深入解析脑微血管损伤病理规律,从其中发现和确证药物靶标,将为改善患者症状和预后的药物研究提供重要依据。

1 脑微血管的结构与功能

1.1 脑微血管与神经血管单元

脑微血管系统是微动脉,微静脉血管和毛细血管组成的复杂三维网络,在解剖学上与脑实质神经元网络接近,并与胶质细胞、神经元实现功能性耦合^[9-10]。近年对“神经血管单元”的提出,突破了传统的神经元为核心的概念,包含有微血管(内皮细胞-基底层基质-星形胶质细胞末端足细胞和周细胞),星形胶质细胞,神经元及其轴突和其他支持细胞组分,更强调病理生理过程中多种类型细胞间以“功能单位”来协同行使重要作用^[9-13]。随着近年对脑微血管内皮细胞、周细胞的深入研究,发现其特有的结构和功能变化具有高度专业化的特征,与病理过程密切相关。以脑微血管内皮细胞为例,推测它与脑内其他细胞之间存在着双向的信号转导,但分子机制还不清楚。

1.2 脑微血管与血脑屏障

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是一种高度选择性的生物渗透膜屏障,在外周循环与中枢神经系统之间的复杂网络间构成物理障碍。脑微血管内皮细胞紧密连接构成了血脑屏障的核心部位,其主要功能是氧气和营养物质运输、微循环灌注、血管舒缩调节、细胞间液生成及回流,限制血液携带的物质进入大脑,还参与诸如信号传导或免疫调节在内的其他多种关键的生理功能^[14-15]。脑微血管内皮细胞之间的接合复合物是由紧密连接和黏附连接分子沿着细胞间裂缝混合组成,其动力学的改变与BBB功能以及急慢性脑血管病进展密切关联。黏附连接维持内皮间细胞与细胞的接触并促进它们的成熟。紧密连接通过调节溶质和离子通过细胞裂隙的通道建立屏障功能。BBB上相邻脑微血管内皮细胞之间高度复杂的紧密连接具有约1800-2000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 的高电阻,主要限制内皮细胞之间的细胞旁扩散途径。除了屏障功能之外,紧密连接还通过限制脂质和蛋白质在顶端和基底外侧细胞表面之间的运动来维持BBB内皮细胞极性^[16-18]。在缺血性卒中条件下,BBB紧密连接完整性降低,导致血管内皮细胞间通透性增加,引起脑血管源性水肿,出血性转化和死亡率增加^[19-21]。脑微血管内皮细胞紧密连接的完整性随着疾病进程发生结构与功能变化,这主要取决于局部微环境的变化(离子浓度失调,炎症,氧化和亚硝化应激,酶活性和血管生成)^[22-26]。

2 脑微血管损伤炎性分子机制研究

在众多血管源性危险因素作用下,脑微血管损伤是在神经元丢失的终点分子事件发生之前值得关注的早期环节,因为它是感知和调控脑血流“生命线”的直接参与者。缺血损伤条件下脑微血管内皮细胞在多个细胞信号传导模块存在变化规律。例如,脑微血管内皮细胞在危险因素暴露状态时内源性抗氧化应答分子事件与应激损伤分子事件之间的对决,最终决定脑损伤结局^[2,27],此间的关键节点蛋白可能是潜在的脑血管保护药物靶点。关于脑微血管保护的药物靶点发现需要关注的问题包括:何种早期分子事件参与介导脑微血管细胞损伤?如何从级联因果关系分子事件中识别关键节点?脑微血管内皮细胞与其他神经血管

单元组分如何通讯来启动快速反应来保护脆弱的神经元? 如何从上述复杂分子事件中挖掘潜在的脑微血管药物治疗靶点? 近年, 研究证据显示炎症免疫学分子事件, 氧化/硝化应激等炎性因素可能是造成脑微血管功能障碍的主要原因。

2.1 氧化/硝化应激损伤炎性信号激活

氧化应激(oxidative stress)是指机体在遭受各种有害刺激时, 体内产生过量活性自由基, 诱发氧化元件和抗氧化元件稳态失衡, 最终当内部防御机制不能控制氧化活性物质的浓度时, 会引发脑血管损伤^[28-30]。氧化应激的标志物包括活性氧族(reactive oxygen species, ROS)如: 超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$)和过氧化氢(H_2O_2)等。此外, 当暴露于脑血管损伤危险因素下时, 生物体内也产生诸如一氧化氮(NO)、二氧化氮(NO_2)、过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$)等活性氮族(reactive nitrogen species, RNS)^[31-32]。区别于一般意义上的氧化应激, 硝化应激(Nitrosative stress)特指活性氮族介导的生物机体高应激性, 主要表现为病理过程中过氧亚硝基阴离子(peroxynitrite, $ONOO^-$)等过量生成, 由于其在生物体中的高度化学活性, 通过与肽链中各种氨基酸的反应和与含有过渡金属中心的蛋白质直接反应, 引起酶的催化活性的改变, 细胞骨架组织的改变以及细胞信号传导的异常, 并最终导致血管内皮细胞损伤或凋亡级联反应^[2, 33-34]。

研究发现, 缺血缺氧损伤导致大量 $ONOO^-$ 生成, 继而发生蛋白质酪氨酸硝化效应, 该分子事件可在脑微血管损伤的早期阶段被检测到。实际上, $ONOO^-$ 是一个强硝化剂和氧化剂, 其氧化性强于 H_2O_2 千倍以上。此外, $ONOO^-$ 具有在细胞间快速扩散的特点(影响半径在 $5\sim 20\ \mu m$), 其产生的次级氧化基团($\cdot OH$ 、 $CO_3^{\cdot-}$ 、金属氧复合物、过氧化的脂质自由基、 $\cdot NO_2$)进一步促进了蛋白酪氨酸的氧化和硝基化。主要通过脂质, 硫醇, 氨基酸残基, DNA 碱基和低分子质量抗氧化剂等生物靶标反应, 损伤细胞膜、DNA 及多种细胞器, 触发细胞凋亡损伤级联反应^[35]。我们近期研究发现, Keap1 蛋白发生胞浆-胞核转移改变及 Nrf2/Keap1 稳态失衡归因于 $ONOO^-$ 介导的 Keap1 酪氨酸残基(Y473)硝基化修饰, 提示硝化应激分子事件介导脑血管内皮细胞损伤的病理性意义^[36]。酪氨酸残基被硝基化修饰的 Keap1 协同 Nrf2 入核并持续抑制其转录活性, 导致脑微血管内源性 peroxiredoxin1

蛋白生成受阻及抗氧化作用显著减弱。进而, 硝化应激激活脑血管内皮细胞 E_3 泛素结合酶 E6AP, 加速血管内皮细胞缺血缺氧损伤过程中 peroxiredoxin1 泛素化降解^[20]。此外, 用 $ONOO^-$ ($1\sim 50\ \mu m$) 处理后, 内皮细胞线粒体 HtrA2 浓度依赖性释放并伴随 PED 降解。值得注意的是, HtrA2 活化与微球栓塞后大鼠微血管中的硝基酪氨酸免疫反应性增加一致, 提示硝化应激可通过干预线粒体呼吸链重要酶类来介导线微血管损伤^[34]。我们进一步验证了抑制 $ONOO^-$ 生成或特异性对 E6AP、HtrA2 进行药理学调控, 可以有效减轻神经血管单元损伤, 为治疗急慢性脑血管病药物调控提供了新思路。

虽然近年来对于氧化/硝化应激损伤在心脑血管病中的病理生理学意义有了较多了解, 但是还有一些科学问题需要进一步探索。譬如, 氧化/硝化应激引起脑微血管内皮细胞损伤时, 胶质细胞、周细胞、神经元等组分如何启动代偿效应, 内在耦联规律如何; $ONOO^-$ 损伤线粒体、内质网等细胞器的毒性浓度阈值及效应的可逆性; 硝化应激预适应是否具有重要的临床意义; 以氧化/硝化应激为靶点的脑血管病防治药物的最佳治疗时间窗如何判定, 其是否可以延长溶栓药物(tPA等)治疗时间窗。综上所述, 通过对氧化/硝化应激与脑微血管损伤机制的进一步深入研究, 将有助于发现新的候选药物靶点, 为预防和治疗脑血管疾病提供新的思路。

2.2 炎症免疫学机制

由于多种脑血管损伤危险因素(血压、血糖、血脂、感染等)的持续刺激, 造成脑微血管功能的受损, 发生炎症反应, 诱发各种炎性因子如血管细胞黏附分子(VCAM)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等的分泌, 启动了脑微血管损伤病理过程^[37-38]。氧化应激可激活核因子 κB (NF- κB) 从而介导多种炎症因子表达并诱发炎症。TNF- α 、IL-1 可激活细胞内 NADPH 氧化酶, 形成氧化应激与炎症相互促进的恶性循环, 造成血管内皮细胞损伤、细胞凋亡等脑缺血损伤事件^[39-40]。以脑卒中为例, 细胞因子产生和分子黏附是脑缺血后的早期分子事件, 这是从缺血损伤到炎性分子事件激活和神经元死亡转变的基础。涉及脑微血管腔内和紧邻周围脑实质细胞群的继发性事件, 包括缺血脑实质中释放 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 PAF 等细胞因子, 其

也可促进内皮细胞表达P-选择素, ICAM-1和E-选择蛋白生成^[41-43]。其他整合蛋白异二聚体也参与早期微血管对缺血的反应。基底膜以及细胞外基质的病理反应发生略迟。此外, 脑微血管结构和功能的改变引起星形胶质细胞激活, 促进红细胞外渗和出血, 导致脑组织损伤。然而, 参与其中的关联酶类和黏附受体表达的调控机制尚不完全清楚^[44-46]。补体3的敲除减弱了RPA诱导的微血管渗透性和白细胞黏附, 表明免疫复合物能够在脑微血管系统中迅速诱导炎症反应, 补体途径在微血管功能障碍中起关键作用^[47-49]。

我们最近的研究表明, 外周性炎损伤通过激活内皮细胞P2RX₇增加了脑内皮细胞趋化因子CXCL1的水平, 最终增强了Mac-1(CD11b/CD18)表达的白细胞与内皮细胞间黏附分子-1结合。此外, 白细胞黏附上调脑血管内皮细胞CX3CL1, 从而招募小胶质细胞迁移至损伤区域。外周性炎性损伤诱导的内皮细胞CX3CL1的增加在CD18突变小鼠中减轻。P2RX₇途径的抑制不仅降低了内皮细胞ICAM-1表达和白细胞黏附, 而且还防止了小胶质细胞过度活化, 减少了大脑神经元损伤, 并且使脓毒症炎症损伤小鼠的存活率增加了一倍。这些结果证明了神经血管P2RX₇炎症途径参与介导脑损伤, 并提供了靶向脑微血管P2RX₇炎症信号进而保护神经血管单元的研究思路^[26]。

基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases)在BBB的破坏过程中发挥重要作用。急慢性脑血管病的病理过程中, 血脑屏障通透性的增加与脑微血管中MMP-9和MMP-2的增加有关^[50-51]。Cuadrado等^[52]采用蛋白组学方法结合激光显微切割技术评估脑卒中后患者脑中MMP-家族蛋白的表达情况并确定了其细胞起源。他们发现MMP-9和TIMP-2在脑微血管中表达丰度很高, 而MMP-10在缺血的神经元中显著增加。通过比较原代培养的大鼠脑微血管内皮细胞, 星形胶质细胞和周细胞的凝血酶诱导MMP-9释放研究, 发现大脑周细胞在脑出血急性期对凝血酶刺激表现为高度敏感性, 释放大量MMP-9, 而选择性PAR1抑制剂SCH79797阻断凝血酶诱导的周细胞的MMP-9释放。这些发现证明了MMP分泌具有细胞选择性, 为选择性靶向特定MMP来保护神经血管单元提供了重要依据^[52]。

3 脑微血管损伤研究技术与方法进展

脑微循环局部与神经系统整体的联系已得到许多学者的关注, 脑微血管损伤是多种脑病病理生理变化的核心过程。由于脑微血管结构与功能的特殊性, 需要构建和完善体内外脑微血管损伤实验模型, 能更接近人急慢性脑血管损伤发病机理并能精确反映药物疗效。

3.1 体内外脑微血管损伤模型

主要包括定量微栓法脑微血管内皮细胞损伤模型、脓毒性脑病模型、活性氮内皮细胞损伤模型、体外缺氧缺糖模型等。为我们开展为解决以脑微血管损伤为病变基础的脑系疾病研究领域的共性科学问题提供崭新的平台, 并为以脑微血管靶向的创新药物开发提供崭新的研究思路和途径。

我们采用碳素微栓可阻塞啮齿类动物脑微血管, 又能更准确地反映临床病理特征。实验表明, 栓子(15~50 μm)在脑内的分布主要为大脑中动脉血流支配区域。该模型将特异性地阻塞脑微血管并引起脑微循环障碍, 能为正确评价药物抗脑血管损伤作用及解析其分子机制提供了很好的实验方法。除了可检测模型动物的神经症状评分, 脑葡萄糖代谢量改变, 梗死面积, 脑含水量等指标外, 还可检测该模型导致的脑微血管损伤的超微结构的动态病理变化^[27, 33, 53]。

离体血管内皮细胞培养是常用的研究脑血管内皮损伤的体外模型, 而且离体实验避免了诸种体内因素的干扰, 非常便于开展药理分子机制研究, 作为体内实验的补充, 可采用永生化的小鼠或人脑微血管内皮细胞系开展关联研究。采用活性氮供体(如ONOO⁻, 3-morpholinopyrrolidine等)可建立活性氮致血管内皮细胞损伤模型, 可通过模拟病理浓度NO与内生活性氧O₂⁻反应生成ONOO⁻, 诱发关键功能蛋白酪氨酸硝基化及细胞损伤。体外缺氧缺糖(oxygen/glucose deprivation, OGD)血管内皮细胞损伤模型, 主要模拟缺血性脑卒中患者的缺氧及缺糖病理过程, 广泛用于药物筛选和机制研究^[33-34, 54]。利用血管内皮单层细胞通透性模型模拟体外血脑屏障模型, 在Transwell Inserts中加入FITC-Conjugated Dextran, 危险因素刺激后不同时间点取下腔液体, 在荧光检测仪上

测定其荧光含量,以时间-示踪剂透过百分率来间接反映BBB破坏情况^[55-56]。

3.2 脑微血管损伤可视化研究

近年,随着双光子激光显微镜(two-photon laser microscope)技术的出现,为解析脑微血管功能变化提供了新方法。双光子激发方式具有较小光漂白性和光毒性的优点。同时,由于采用长波长进行激发,其成像深度大大提升。如果结合TIE2-GFP等转基因小鼠或荧光探针,可以开展荧光活体成像,获得脑微血管直径、血流、灌注量等连续性动态参数。例如,采用内皮细胞荧光标记的*Rag1^{tm1Mom}Tg*(TIE2GFP)287Sato/J转基因小鼠可开展急慢性脑微血管损伤病理条件下脑微血管损伤的活体双光子成像及药理学调控研究^[3,26,57]。利用双光子激光显微镜,我们发现脑微血管内皮细胞-白细胞黏附与脑内小胶质炎性反映密切相关。在血管源性炎性损伤的*Cx3cr1^{GFP/+}*小鼠,观察到脑微血管内皮细胞CX3CL1趋化因子增加与小胶质细胞的活化和迁移密切相关,揭示了炎性损伤危险因素下脑内不同血管内皮细胞与脑内小胶质细胞之间的通讯“对话”规律,对关联药物靶标发现提供了新的研究方法和线索^[26]。进一步,结合能识别脑内特异硝化应激分子事件的小分子荧光探针NP3,实现了血管内皮细胞损伤过程的实时监测,并且结合双光子活体成像技术,成功实现了活体小鼠脑卒中(缺血或出血)病理过程中硝化应激分子事件的时空动态示踪,为脑血管病分子机制研究及药物筛选提供了先进技术手段^[58]。

4 微血管药物保护与功能修复

4.1 基于硝化应激的药物治理

尽管在抗缺血性脑卒中方面进行了数十年的神经元保护剂研究,但尚未取得重要突破。基于脑血管源性损伤分子事件,从其中挖掘潜在药物靶标,以脑保护(神经血管单元保护)为重要目标,是研发新型脑血管疾病防治药物的关键环节。近年的基础和临床研究证据显示,调控硝化应激分子事件,通过阻断与ONOO⁻生成相关的上游信号通路,或者清除/分解过量的脑内ONOO⁻,可以起到保护BBB和改善神经功能的作用。主要包括钙调素拮抗剂、ONOO⁻清除剂和

ONOO⁻分解催化剂及天然产物等。

4.1.1 钙调素抑制剂 脑血管损伤危险因素下钙离子/钙调素(Ca^{2+} /Calmodulin)激活的级联反应是硝化应激损伤病理过程的上游分子事件。所以,通过有效干预 Ca^{2+} /CaM可以调控一氧化氮合酶(eNOS, nNOS)及NO水平,减少ONOO⁻过量生成。钙调素抑制剂DY-9760e治疗不仅可缩小缺血大鼠脑梗死面积,同时以剂量依赖性方式抑制calpastatin和fodrin的降解。其神经血管单元的保护作用主要与抑制大脑皮质和纹状体中Caspase-3诱导的calpastatin降解和钙蛋白酶诱导的fodrin分解相关^[59]。进一步,钙调素抑制剂可以减少脑微血管损伤的大鼠脑内蛋白质酪氨酸硝基化,降低脑微血管内皮细胞PARP-1表达,从而保护脑缺血区微血管,降低BBB破坏^[53]。Shirakura等^[60]采用大鼠碳素微栓损伤模型结合脑微透析技术研究了DY-9760e对梗死脑区NO水平影响,发现其脑保护作用与抑制脑微血管过量NO生成和蛋白质酪氨酸硝基化损伤关联,推测其机制主要是减少eNOS脱偶联。

4.1.2 ONOO⁻清除剂 近期URICO-ICTUS报道了来自临床的研究试验结果,尿酸与重组组织纤溶酶原激活物(rtPA)联用明显增强了rtPA对血栓栓塞型缺血性卒中的脑保护作用,推测其改善脑微血管侧支循环作用可增强其神经保护作用^[61-62]。尿酸是天然存在的嘌呤代谢产物,作为内源性抗氧化剂,具有很强的ONOO⁻清除效应。循环低水平尿酸与中枢神经系统的一些神经变性和炎症疾病的患病率增加和预后不良有关。尿酸有效减轻蛋白质硝基化、中性粒细胞浸润和炎症反应作用与其减少梗死体积和改善神经功能障碍评分相关联^[63-64]。尿酸治疗急性缺血性卒中提供了令人鼓舞的脑保护作用,需要进一步结合其对体内ONOO⁻的清除作用开展广泛临床试验。美乐托宁(Melatonin, MLT)是松果体的主要内分泌产物,与它的代谢物发挥其抗氧化活性和自由基清除剂的作用。MLT与ONOO⁻以一级动力学反应;然而,该反应的速率常数比MLT/ONO[•]H反应的速率常数小得多。过氧亚硝酸盐/ CO_2 反应也产生 $\text{CO}_3^{\cdot-}$ 和 NO_2 ,可以将MLT氧化成羟基吡咯并^[2,3-b]吡啶产物。MLT主要在肝脏代谢为6-羟基褪黑素,6-羟基褪黑素可能是一种比MLT更好的抗氧化剂,这种代谢物可能有助于MLT发挥其体内生物

学效应。另外,MLT通过CaM抑制和清除ONOO⁻的双重调控作用,起到抗缺血性脑损伤药理作用^[16,33,36]。我们发现,MLT可通过有效抑制缺氧低糖条件下ONOO⁻介导的线粒体HtrA2释放及BBB破坏^[34]。

4.1.3 ONOO⁻分解催化剂四磺基苯基铁卟啉(FeTPPS)是一种ONOO⁻的分解催化剂,能减轻脑缺血再灌注损伤后丙二醛水平和末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)阳性细胞数量,推测通过催化异构化引起过氧化亚硝酸盐的分解而产生硝酸盐,从而减少高活性的中间产物如二氧化氮和羟基的生成,起到脑血管保护作用^[65-66]。此外,FeTMPyP是一种水溶性的金属卟啉类ONOO⁻分解催化剂。在缺血后再灌注之前使用FeTMPyP抑制了皮质中MMP-9活化和总MMP-2的增加,并且减少了纹状体中活性MMP-9和活性MMP-2的总量,降低了长时间脑缺血后血脑屏障破坏和神经血管损伤。此外,FeTMPyP可以有效降低SHRSP的出血发生率^[67]。除了金属卟啉类ONOO⁻分解催化剂外,还有许多其他结构的分解催化剂,如FP15,INO-4885等^[68-69]。

除了上述药物,许多天然药物也被发现具有抗氧化/硝化应激作用,包括姜黄素(curcumin)、丹参酮(Tanshinone)等。已有研究证明,姜黄素在体外稳定抗氧化系统酶系,可以很好地清除ROS和RNS,可能因其是1,2-二羟基基团的酚类物质^[70-71]。丹参酮(Tanshinone)是脂溶性二萜类化合物,其抗氧化作用主要表现在其具有清除超氧阴离子、羟自由基的功能。此外,丹参可显著降低脑梗死大鼠缺血再灌注后脑内的NO含量^[72]。

4.2 抗炎

急慢性脑血管病理过程中,患者预后与其脑损伤局部的炎症反应和全身炎症反应均有重要关联性。全身炎症标志物如IL-6或C反应蛋白升高的血液水平与不良预后和中风后死亡率增加有关。关联机制包括大脑皮层中性粒细胞浸润增加,血脑屏障破坏,组织再灌注受损,血小板活化增加,微血管凝固和补体依赖性脑损伤。通过非选择性药物(例如通过他汀类药物)或选择性药物(例如通过抑制IL-6)实现对炎症的抑制,或增强全身抗炎反应(例如通过输注IL-1受体拮抗剂),最终起到预防系统性炎症或抑制触发炎症反应的

信号途径是脑血管患者的潜在治疗策略^[73-75]。

缺血性卒中和其他神经系统疾病病理过程中脑微血管和BBB损伤扰乱了神经血管单元的结构和功能,并导致患者预后不良。脑血管炎症导致局部缺血后继发性脑损伤。最近研究已经表明,分泌蛋白的Slit家族可以对化学引诱物对白细胞募集起到抑制作用。利用活体显微镜发现系统给予Slit可显著减弱TNF α 处置4h或全脑缺血24h后脑微血管白细胞-内皮黏附。RoboN(Slit的可溶性受体)的使用加剧了急性炎症条件下TNF α 的趋化反应。Slit连续3d持续全身给药,显著减弱了海马CA1锥体细胞的迟发性神经元死亡。由此表明Slit可减少脑缺血后脑血管内免疫细胞炎性募集,继而减轻迟发性神经元死亡^[76]。

NLRP3介导的神经血管损伤与NLRP3介导的白细胞介素-1 β (IL-1 β)自分泌/旁分泌模式释放相关,进而促进脑微血管内皮细胞渗透性和小胶质细胞介导的神经毒性。NLRP3敲除可减少梗死和BBB损伤,改善了缺血性中风后小鼠的神经元损伤。进一步表明,NLRP3作为重要的靶分子将NOX2介导的氧化应激与卒中病理过程中神经血管损伤联系起来^[77]。由此,基于缺血性脑损伤病理过程中免疫调节因子NLRP3介导的级联炎症反应,可以提供药理学靶标来帮助设计开发用于防治脑血管病的创新药物。

此外,某些药物通过间接的抑制炎症信号通路关键分子起到保护脑微血管和BBB的作用。 γ -分泌酶阻断剂DAPT通过降低永久性脑缺血期间occludin的泛素化降解来保护BBB^[50]。在血管内皮细胞特异性靶向过表达HSP27可提高脑微血管中的HSP27水平并改善了缺血再灌注诱导的BBB破坏和随后的神经元损伤,这可能归因于内皮细胞特异性HSP27过表达减弱嗜中性粒细胞和巨噬细胞向脑实质的破坏性迁移,由此改善卒中结局^[78]。自由基清除剂依达拉奉可减少小鼠脑灌注不足模型中基质金属蛋白酶-9并减少脑白质BBB损伤^[79]。此外,非瑟酮、芹菜素和木犀草素分别剂量依赖性地拮抗佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯诱导的人脑微血管内皮细胞COX-2和MMP-9基因和蛋白表达,并抑制MMP-9和COX-2表达调控的共同途径NF- κ B信号通路^[80]。

5 展 望

急慢性脑血管病的病理过程具有“多病因、多细胞、复交互”的特点,涉及神经血管单元的多种细胞组分,需要进一步利用新技术、新方法建

立模拟临床病理过程的新型脑微血管损伤动物模型,研究脑微血管损伤的发生发展机理,并探索脑微血管结构与功能动态变化规律。我们期望,最终通过解析病理条件下多层面、立体的、交互的网络调控状态,将有助于脑血管病生物标志物和药物靶标发现。

参考文献

- [1] Hu XM, De Silva TM, Chen J, et al. Cerebral vascular disease and neurovascular injury in ischemic stroke[J]. *Circ Res*, 2017, 120(3):449-471.
- [2] Tao RR, Ji YL, Lu YM, et al. Targeting nitrosative stress for neurovascular protection: new implications in brain diseases [J]. *Current Drug Targets*, 2012, 13(2):272-284.
- [3] Huang JY, Li LT, Wang H, et al. In vivo two-photon fluorescence microscopy reveals disturbed cerebral capillary blood flow and increased susceptibility to ischemic insults in diabetic mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(9):816-822.
- [4] Yan H, Zhang X, Hu W, et al. Histamine H3 receptors aggravate cerebral ischaemic injury by histamine-independent mechanisms [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1):3334-3345.
- [5] Seth L, Scott MJ. Small vessel disease, neurovascular regulation and cognitive impairment: post-mortem studies reveal a complex relationship, still poorly understood [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(14):1579-1589.
- [6] Leithner C, Royl G. The oxygen paradox of neurovascular coupling [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(1):19-29.
- [7] Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: A journey through neurovascular coupling in health and disease [J]. *Neuron*, 2017, 96(1):17-42.
- [8] Jackman K, Iadecola C. Neurovascular Regulation in the Ischemic Brain [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 22(2):149-160.
- [9] Lo EH, Broderick JP, Moskowitz MA. tPA and Proteolysis in the Neurovascular Unit [J]. *Stroke*, 2004, 35(9):354-356.
- [10] Brian T, Hawkins D, Thomas P, et al. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(2):173-185.
- [11] Posada-Duque RA, Barreto GE, Cardona-Gomez GP. Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8(1):231-245.
- [12] Lake EMR, Bazzigaluppi P, Mester J, et al. Neurovascular unit remodelling in the subacute stage of stroke recovery [J]. *Neuroimage*, 2017, 146(6):869-882.
- [13] Lo EH, Rosenberg GA. The neurovascular unit in health and disease: introduction [J]. *Stroke*, 2009, 40(3 Suppl):S2-3.
- [14] Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, et al. Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 38(5):2-6.
- [15] de Senna PN, Xavier LL, Bagatini PB, et al. Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the blood brain barrier in diabetic rats [J]. *Brain Res*, 2015, 1618(9):75-82.
- [16] Wang C, Ahmed MM, Jiang Q, et al. Melatonin ameliorates hypoglycemic stress-induced brain endothelial tight junction injury by inhibiting protein nitration of TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator [J]. *J Pineal Res*, 2017, 63(4):e12440.
- [17] Ye WF, Tao RR, Jiang Q, et al. Peroxiredoxin 1 participates in ischemia-triggered endothelial polarization [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(8):791-793.
- [18] Zhang Q, Fisher K. Tight junction-related barrier contributes to the electrophysiological asymmetry across vocal fold epithelium [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e34017.
- [19] Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease [J]. *Stroke*, 2011, 42(11):3323-3328.
- [20] Tao RR, Wang H, Hong LJ, et al. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(1):1-16.

- [21] Nahirney PC, Reeson P, Brown CE. Ultrastructural analysis of blood-brain barrier breakdown in the peri-infarct zone in young adult and aged mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(2):413-425.
- [22] Sifat AE, Vaidya B, Abbruscato TJ. Blood-Brain Barrier Protection as a therapeutic strategy for acute ischemic stroke [J]. *AAPS J*, 2017, 19(4):957-972.
- [23] Huang Q, Sun M, Li M, et al. Combination of NAD⁺ and NADPH offers greater neuroprotection in ischemic stroke models by relieving metabolic stress [J]. *Mol Neurobiol*, 2017. doi: 10.1007/s12035-017-0809-7. [Epub ahead of print]
- [24] Wang R, Yin YX, Mahmood Q, et al. Calmodulin inhibitor ameliorates cognitive dysfunction via inhibiting nitrosative stress and NLRP3 signaling in mice with bilateral carotid artery stenosis [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2017, 23(10):818-826.
- [25] Mahmood Q, Wang GF, Wu G, et al. Salvianolic acid A inhibits calpain activation and eNOS uncoupling during focal cerebral ischemia in mice [J]. *Phytomedicine*, 2017, 25(6):8-14.
- [26] Wang H, Hong LJ, Huang JY, et al. P2RX7 sensitizes Mac-1/ICAM-1-dependent leukocyte-endothelial adhesion and promotes neurovascular injury during septic encephalopathy [J]. *Cell Res*, 2015, 25(6):674-690.
- [27] Lu Y, Tao RR, Huang JY, et al. P2X7 signaling promotes microsphere embolism-triggered microglia activation by maintaining elevation of Fas ligand [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9(7):172-179.
- [28] Gibson CL, Srivastava K, Sprigg N, et al. Inhibition of Rho-kinase protects cerebral barrier from ischaemia-evoked injury through modulations of endothelial cell oxidative stress and tight junctions [J]. *J Neurochem*, 2014, 129(5):816-826.
- [29] Al Ahmad A, Gassmann M, Ogunshola OO. Involvement of oxidative stress in hypoxia-induced blood-brain barrier breakdown [J]. *Microvasc Res*, 2012, 84(2):222-225.
- [30] Zhang DD, Zou MJ, Zhang YT, et al. A novel IL-1RA-PEP fusion protein with enhanced brain penetration ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibition of oxidative stress and neuroinflammation [J]. *Exp Neurol*, 2017, 297(1):1-13.
- [31] Ferrer-Sueta G, Radi R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals [J]. *ACS Chem Biol*, 2009, 4(3):161-177.
- [32] Ramdial K, Franco MC, Estevez AG. Cellular mechanisms of peroxynitrite-induced neuronal death [J]. *Brain Res Bull*, 2017, 133(1):4-11.
- [33] Han F, Chen YX, Lu YM, et al. Regulation of the ischemia-induced autophagy-lysosome processes by nitrosative stress in endothelial cells [J]. *J Pineal Res*, 2011, 51(1):124-135.
- [34] Han F, Tao RR, Zhang GS, et al. Melatonin ameliorates ischemic-like injury-evoked nitrosative stress: Involvement of HtrA2/PED pathways in endothelial cells [J]. *J Pineal Res*, 2011, 50(3):281-291.
- [35] Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(8):662-680.
- [36] Tao RR, Huang JY, Shao XJ, et al. Ischemic injury promotes Keap1 nitration and disturbance of antioxidative responses in endothelial cells: A potential vasoprotective effect of melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2013, 54(3):271-281.
- [37] Andjelkovic AV, Pachter JS. Characterization of binding sites for chemokines MCP-1 and MIP-1 α on human brain microvessels [J]. *J Neurochem*, 2000, 75(5):1898-1906.
- [38] Rochfort KD, Cummins PM. Cytokine-mediated dysregulation of zonula occludens-1 properties in human brain microvascular endothelium [J]. *Microvasc Res*, 2015, 100(1):48-53.
- [39] Pan W, Yu C, Hsueh H, et al. The role of cerebral vascular NF κ B in LPS-induced inflammation: differential regulation of efflux transporter and transporting cytokine receptors [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 25(6):623-630.
- [40] Siao CJ, Lorentz CU, Kermani P, et al. ProNGF, a cytokine induced after myocardial infarction in humans, targets pericytes to promote microvascular damage and activation [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(12):2291-2305.
- [41] Yang YF, Chen Z, Hu SL, et al. Interleukin-1 receptor associated kinases-1/4 inhibition protects against acute hypoxia/ischemia-induced neuronal injury in vivo and in vitro [J]. *Neuroscience*, 2011, 196(8):25-34.
- [42] Vaibhav K, Shrivastava P, Javed H, et al. Piperine suppresses cerebral ischemia-reperfusion-induced

- inflammation through the repression of COX-2, NOS-2, and NF- κ B in middle cerebral artery occlusion rat model[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 367(1-2):73-84.
- [43] Lehmborg J, Beck J, Baethmann A, et al. Effect of P-selectin inhibition on leukocyte-endothelium interaction and survival after global cerebral ischemia [J]. *J Neurol*, 2006, 253(3):357-363.
- [44] Sladojevic N, Stamatovic SM, Keep RF, et al. Inhibition of junctional adhesion molecule-A/LFA interaction attenuates leukocyte trafficking and inflammation in brain ischemia/reperfusion injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 67(8):57-70.
- [45] Huang Q, Chen B, Wang F, et al. The temporal expression patterns of fibronectin and its receptors- α 5 β 1 and α v β 3 integrins on blood vessels after cerebral ischemia[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2015, 33(4):493-507.
- [46] Huang H, Huang Q, Wang F, et al. Cerebral ischemia-induced angiogenesis is dependent on tumor necrosis factor receptor 1-mediated upregulation of α 5 β 1 and α v β 3 integrins[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1):227-238.
- [47] Lister KJ, Hickey MJ. Immune complexes alter cerebral microvessel permeability: roles of complement and leukocyte adhesion [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(2):H694-704.
- [48] Mocco J, Mack WJ, Ducruet AF, et al. Complement component C3 mediates inflammatory injury following focal cerebral ischemia [J]. *Circ Res*, 2006, 99(2):209-217.
- [49] Yang J, Ahn H, Chang M, et al. Complement component 3 inhibition by an antioxidant is neuroprotective after cerebral ischemia and reperfusion in mice [J]. *J Neurochem*, 2013, 124(4):523-535.
- [50] Zhang GS, Tian Y, Huang JY, et al. The Y-secretase blocker DAPT reduces the permeability of the blood-brain barrier by decreasing the ubiquitination and degradation of occludin during permanent brain ischemia[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(1):53-60.
- [51] Dal-Pizzol F, Rojas HA, dos Santos EM, et al. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(1):62-70.
- [52] Cuadrado E, Rosell A, Penalba A, et al. Vascular MMP-9/TIMP-2 and neuronal MMP-10 up-regulation in human brain after stroke: a combined laser microdissection and protein array study [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(6):3191-3197.
- [53] Han F, Shirasaki Y, Fukunaga K. Microsphere embolism-induced endothelial nitric oxide synthase expression mediates disruption of the blood-brain barrier in rat brain [J]. *J Neurochem*, 2006, 99(1):97-106.
- [54] Jiang Q, Gao Y, Wang C, et al. Nitration of TRPM2 as a molecular switch induces autophagy during brain pericyte injury[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(16):1297-1316.
- [55] Spampinato SF, Merlo S, Sano Y, et al. Astrocytes contribute to A β -induced blood-brain barrier damage through activation of endothelial MMP9 [J]. *J Neurochem*, 2017, 142(3):464-477.
- [56] Ryou MG, Choudhury GR, Winters A, et al. Pyruvate minimizes rtPA toxicity from in vitro oxygen-glucose deprivation and reoxygenation [J]. *Brain res*, 2013, 1530(9):66-75.
- [57] Huang JY, Lu YM, Wang H, et al. The effect of lipid nanoparticle PEGylation on neuroinflammatory response in mouse brain [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(32):7960-7970.
- [58] Li X, Tao RR, Hong LJ, et al. Visualizing peroxynitrite fluxes in endothelial cells reveals the dynamic progression of brain vascular injury [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(38):12296-12303.
- [59] Han F, Shirasaki Y, Fukunaga K. 3-[2-[4-(3-Chloro-2-methylphenylmethyl)-1-piperazinyl]ethyl]-5,6-dimethoxy-1-(4-imidazolylmethyl)-1H-indazole dihydrochloride 3.5 hydrate (DY-9760e) is neuroprotective in rat microsphere embolism: role of the cross-talk between calpain and caspase-3 through calpastatin [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 317(2):529-536.
- [60] Shirakura T, Han F, Shiota N, et al. Inhibition of nitric oxide production and protein tyrosine nitration contribute to neuroprotection by a novel calmodulin antagonist, DY-9760e, in the rat microsphere embolism [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(9):1658-1661.
- [61] Amaro S, Laredo C, Renú A, et al. Uric acid therapy prevent early ischemic stroke progression: A tertiary analysis of the URICO-ICTUS trial (efficacy

- study of combined treatment with uric acid and r-tpa in acute ischemic stroke) [J]. *Stroke*, 2016, 47(11):2874-2876.
- [62] Chamorro A, Amaro S, Castellanos M, et al. Safety and efficacy of uric acid in patients with acute stroke (URICO-ICTUS): A randomised, double-blind phase 2b/3 trial [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(5):453-460.
- [63] Amaro S, Llull L, Renú A, et al. Uric acid improves glucose-driven oxidative stress in human ischemic stroke [J]. *Ann Neurol*, 2015, 77(5):775-783.
- [64] Li R, Huang C, Chen J, et al. The role of uric acid as a potential neuroprotectant in acute ischemic stroke: A review of literature [J]. *Neurol Sci*, 2015, 36(7):1097-1103.
- [65] Al-Gayyar MM, Abdelsaid MA, Matragoon S, et al. Neurovascular protective effect of FeTPPs in N-methyl-D-aspartate model: Similarities to diabetes [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(3):1187-1197.
- [66] Bolton C, Scott GS, Smith T, et al. The acute and chronic phases of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CR EAE) are ameliorated by the peroxynitrite decomposition catalyst, 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinatoiron (III) chloride, (FeTPPS) [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 601(1-3):88-93.
- [67] Cipolla MJ, Sweet JG, Chan SL. Effect of hypertension and peroxynitrite decomposition with FeTMPyP on CBF and stroke outcome [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(4):1276-1285.
- [68] Radovits T, Seres L, Gero D, et al. The peroxynitrite decomposition catalyst FP15 improves ageing-associated cardiac and vascular dysfunction [J]. *Mech Ageing Dev*, 2007, 128(2):173-181.
- [69] Jiao XY, Gao E, Yuan Y, et al. INO-4885 [5, 10, 15, 20-Tetra [N-(benzyl-4'-carboxylate)-2-pyridinium]-21H, 23H-porphine Iron(III) Chloride], a peroxynitrite decomposition catalyst, protects the heart against reperfusion injury in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 328(3):777-784.
- [70] Jiang J, Wang W, Sun YJ, et al. Neuroprotective effect of curcumin on focal cerebral ischemic rats by preventing blood-brain barrier damage [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 561(1-3):54-62.
- [71] Dohare P, Garg P, Jain V, et al. Dose dependence and therapeutic window for the neuroprotective effects of curcumin in thromboembolic model of rat [J]. *Behav Brain Res*, 2008, 193(2):289-297.
- [72] Tang Q, Han R, Xiao H, et al. Protective effect of tanshinone IIA on the brain and its therapeutic time window in rat models of cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(5):1616-1622.
- [73] Del Zoppo GJ. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3):972-982.
- [74] Zechariah A, ElAli A, Doepfner TR, et al. Vascular endothelial growth factor promotes pericyte coverage of brain capillaries, improves cerebral blood flow during subsequent focal cerebral ischemia, and preserves the metabolic penumbra [J]. *Stroke*, 2013, 44(6):1690-1697.
- [75] Selvaraj UM, Ortega SB, Hu R, et al. Preconditioning-induced CXCL12 upregulation minimizes leukocyte infiltration after stroke in ischemia-tolerant mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(3):801-813.
- [76] Altay T, McLaughlin B, Wu JY, et al. Slit modulates cerebrovascular inflammation and mediates neuroprotection against global cerebral ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2007, 207(2):186-194.
- [77] Yang F, Wang Z, Wei X, et al. NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(4):660-667.
- [78] Shi Y, Jiang X, Zhang L, et al. Endothelium-targeted overexpression of heat shock protein 27 ameliorates blood-brain barrier disruption after ischemic brain injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(7):E1243-E1252.
- [79] Miyamoto N, Pham L-DD, Maki T, et al. A radical scavenger edaravone inhibits matrix metalloproteinase-9 upregulation and blood-brain barrier breakdown in a mouse model of prolonged cerebral hypoperfusion [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 573(9):40-45.
- [80] Tahanian E, Sanchez LA, Shiao TC, et al. Flavonoids targeting of I κ B phosphorylation abrogates carcinogen-induced MMP-9 and COX-2 expression in human brain endothelial cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2011, 5(1):299-309.

(编辑 刘清海)