

雷美替胺对脂多糖诱导的血脑屏障模型通透性升高的保护作用及其机制[△]

郑文涛^{1*}, 杨林^{1#}, 王浩² (1. 大理大学第一附属医院神经内科, 云南大理 671000; 2. 昆明医科大学基础医学院, 昆明 650500)

中图分类号 R971⁺.3

文献标志码 A

文章编号 1672-2124(2024)01-0022-08

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2024.01.006



摘要 目的:探讨雷美替胺(Ramelteon)对脂多糖(LPS)诱导的血脑屏障(BBB)模型通透性升高的保护作用及其机制以及与炎症反应、氧化应激反应的关系。方法:将24只健康的C57BL/6雄性小鼠分为对照组(0.9%氯化钠溶液)、Ramelteon组、LPS组和LPS+Ramelteon组,用LPS诱导小鼠血脑屏障损伤,刺激小鼠内皮细胞损伤。采用伊文思蓝染色法测定其脑通透性。采用细胞计数法-8测定细胞的活力。采用免疫染色和蛋白质印迹法来检测脑组织和内皮细胞中人紧密连接蛋白1(ZO-1)和闭合蛋白(Occludin)的表达。采用定量反转录聚合酶链反应和酶联免疫吸附试验检测方法检测炎症因子白细胞介素1 β (IL-1 β)和单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)水平的表达。用硫代巴比妥酸法检测脑组织和内皮细胞中丙二醛(MDA)的浓度。用蛋白质印迹法检测细胞核中人核因子E2相关因子2(Nrf2)和醌氧化还原酶(NQO1)的表达情况。结果:(1)与对照组相比,LPS组小鼠的大脑通透性增加、小鼠神经功能评分显著降低;与LPS组比较,LPS+Ramelteon组小鼠大脑通透性降低、神经功能评分显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(2)与对照组相比,LPS组ZO-1和Occludin表达降低,IL-1 β 和MCP-1表达升高;与LPS组比较,LPS+Ramelteon组ZO-1和Occludin表达升高,IL-1 β 和MCP-1表达降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(3)与对照组相比,LPS组Nrf2和NQO1表达降低,MDA水平升高;与LPS组比较,LPS+Ramelteon组Nrf2和NQO1表达升高,MDA水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(4)与对照组相比,LPS组中bEnd.3内皮细胞活力下降、通透性显著增加,同时ZO-1和Occludin表达水平显著下调,差异均有统计学意义($P<0.05$);与LPS组相比,LPS+Ramelteon组内皮细胞活力升高、内皮细胞的通透性降低,同时ZO-1和Occludin表达水平显著升高,且与Ramelteon剂量成正相关,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(5)与对照组比较,LPS组可显著抑制Nrf2和NQO1的表达水平;与LPS组相比,LPS+Ramelteon组Nrf2表达水平升高,且与Ramelteon剂量成正相关,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(6)Compound C以及si-Nrf2均可以通过抑制山羊磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)-Nrf2信号通路,导致氧化应激,而使Ramelteon对LPS诱导的ZO-1和Occludin减少及内皮单层通透增加的保护作用减弱。结论:Ramelteon可以通过激活AMPK-Nrf2信号通路改善LPS诱导的体外血脑屏障通透性升高,其机制可能与抑制炎症反应和氧化应激反应有关。

关键词 雷美替胺;脂多糖;血脑屏障;氧化应激;炎症反应;AMPK-Nrf2信号通路

Protective Effect and Mechanism of Ramelteon on Lipopolysaccharide-Induced Elevation of Permeability of Blood-Brain Barrier Model[△]

ZHENG Wentao¹, YANG Lin¹, WANG Hao² (1. Dept. of Neurology, the First Affiliated Hospital of Dali University, Yunnan Dali 671000, China; 2. College of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the protective effect and mechanism of Ramelteon on lipopolysaccharide (LPS)-induced increased permeability of blood-brain barrier (BBB) model, as well as its relationship with inflammatory and oxidative stress responses. **METHODS:** Twenty-four healthy C57BL/6 male mice were divided into the control group (0.9% sodium chloride solution), Ramelteon group, LPS group and LPS+Ramelteon group. The blood brain barrier injury of mice was induced by LPS and the endothelial cell injury was stimulated. Brain permeability was assessed by using the Evans blue staining method, while cell viability was determined by utilizing the cell counting kit-8 (CCK-8). Expression of human tight junction protein 1 (ZO-1) and occludin in brain tissue and endothelial cells was evaluated through immunostaining and Western blotting. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay were employed to measure the levels of inflammatory factor interleukin-1 β (IL-1 β) and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1). Malondialdehyde (MDA) concentration in brain tissue and endothelial cells was detected by using the thiobarbituric acid method. Expression of human nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) and quinone oxidoreductase (NQO1) in the cell nucleus

[△] 基金项目:云南省教育厅2022年度科学研究基金项目(No. 云教发[2021]84号)

* 住院医师,硕士。研究方向:神经病学。E-mail: 943577119@qq.com

通信作者:教授,硕士。研究方向:神经病学。E-mail: 1917898455@qq.com

was determined via Western blotting. RESULTS: (1) Compared to the control group, mice in the LPS group showed increased brain permeability and significantly decreased neurological function scores. In comparison to the LPS group, mice in the LPS + Ramelteon group exhibited decreased brain permeability and significantly increased neurological function scores, with statistically significant difference ($P<0.05$). (2) Compared with the control group, the LPS group displayed decreased expression of ZO-1 and Occludin, along with increased expression of IL-1 β and MCP-1; compared with the LPS group, the LPS+Ramelteon group showed increased expression of ZO-1 and Occludin, and decreased expression of IL-1 β and MCP-1, the differences were statistically significant ($P<0.05$). (3) Compared with the control group, the LPS group showed decreased expression of Nrf2 and NQO1, and increased levels of MDA; compared with the LPS group, the expression of Nrf2 and NQO1 in LPS+Ramelteon group increased, while the level of MDA decreased, with statistically significant differences ($P<0.05$). (4) Compared with the control group, bEnd. 3 endothelial cell viability decreased, permeability increased significantly, and expression levels of ZO-1 and Occludin were significantly down regulated in the LPS group, with statistically significant differences ($P<0.05$). Conversely, the LPS + Ramelteon group showed increased endothelial cell viability, decreased permeability, and significantly increased expression levels of ZO-1 and Occludin, which were positively correlated with the dose of Ramelteon, with statistically significant differences ($P<0.05$). (5) Compared with the control group, LPS group significantly inhibited the expression levels of Nrf2 and NQO1; compared with the LPS group, the expression level of Nrf2 increased in the LPS +Ramelteon group, and was positively correlated with the dose of Ramelteon, with statistically significant differences ($P<0.05$). (6) Both Compound C and si-Nrf2 could inhibit the activating AMP-activated protein kinase (AMPK)/Nrf2 signaling pathway, inducing oxidative stress and weakening the protective effect of Ramelteon on the reduction of ZO-1 and Occludin induced by LPS and the increase in endothelial monolayer permeability. CONCLUSIONS: Ramelteon can improve LPS-induced increased permeability of blood-brain barrier *in vitro* by activating AMPK-Nrf2 signaling pathway, and its mechanism may be related to inhibiting inflammatory and oxidative stress responses.

KEYWORDS Ramelteon; Lipopolysaccharide; Blood-brain barrier; Oxidative stress; Inflammatory response; AMPK-Nrf2 signaling pathway

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 是介于脑组织和血液之间的一种天然屏障^[1]。BBB 通过选择性地地在脑实质和血液之间转移物质,在保护脑组织中起着关键作用。BBB 的完整性被破坏是中枢神经病变的重要病理机制之一^[2]。例如:脑组织缺血后可以诱发炎症反应,释放的炎症因子可以增加 BBB 通透性,而 BBB 通透性的增加又可以加剧血液中白细胞在脑组织的浸润,进一步加重炎症反应。有文献报道,抑制氧化应激和炎症反应可能是保护 BBB 完整性和治疗相关神经疾病的潜在靶点^[3]。褪黑素 (MT) 是一种在松果体中合成和释放的神经激素,其在改善睡眠障碍、情绪障碍以及增强学习和记忆等方面有着积极作用^[4]。

MT 通过释放到血液和脑脊液中而发挥重要的生理生化功能^[5]。例如,MT 可以抗氧化应激、抗炎症,还可以作为免疫调节分子,在机体免疫调节中发挥重要作用^[6]。MT 及其代谢产物也能作为清除剂,清除各种自由基。有研究结果显示,在大脑发生缺血损害时,MT 可以通过激活褪黑素受体 (MTs) 发挥神经保护作用,MT 通过与不同的 MTs 结合后激活多个信号传导级联,起到抗氧化、抗炎、抗凋亡及抑制自噬的作用,进而发挥细胞保护的作用^[7]。

雷美替胺 (Ramelteon) 是首个被用于治疗失眠的 MT 受体激动剂^[8]。相比 MT, Ramelteon 对 MTs 具有更高的亲和力和选择性,在临床中具有更好的疗效和更高的安全性^[9]。本研究探讨了 Ramelteon 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠脑损伤炎症反应、BBB 完整性受损的影响,旨在探讨 Ramelteon 对 BBB 的保护作用及其潜在的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物为育龄 6~8 周的健康 C57BL/6 实验小鼠 (SPF 级,雄性),共 24 只,体重 20~25 g。实验小鼠由大理大学动物实验管理处所提供[使用编号:SYXK(滇)2018-0002],研究严格遵照中国国家动物福利法规定。

1.2 仪器

PF5000 型激光多普勒血流仪 (上海然哲仪器设备有限公司);KW-DWY-S 型脑立体定位仪 (南京卡尔文生物科技有限公司);YP-96A 型酶联免疫检测分析仪 (山东优云谱光电科技有限公司);NX50 型冷冻切片机 (美国 Thermo Fisher 公司);WSB-300 型光学显微镜 (广州微域光学仪器有限公司);HM-P16 型荧光免疫 PCR 检测仪 (山东恒美电子科技有限公司)。

1.3 药品与试剂

Ramelteon (武汉普洛夫生物科技有限公司);LPS (美国 Sigma-aldrich 公司);伊文思蓝 (上海创赛科技有限公司);白细胞介素 1 β (IL-1 β ,广州奥瑞达生物科技有限公司);单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1,泉州市九邦生物科技有限公司);山羊磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK,上海科澄维生物科技有限公司);磷酸盐缓冲液 (PBS,上海博湖生物科技有限公司);小鼠脑微血管内皮细胞 (bEnd. 3 内皮细胞,武汉普诺赛生命科技有限公司);人核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 抗体、细胞计数法-8 (CCK-8) 试剂盒 (爱必信上海生物科技有限公司);人紧密连接蛋白 1 (ZO-1) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (天津肽链生物科技有限公司);IL-1 β 抗体、MCP-1,均购自上海联

迈生物工程有限公司);AMPK 抑制剂 Compound C(武汉科斯坦生物科技有限公司);荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖(上海源叶生物科技有限公司);Nrf2 ELISA 试剂盒(上海化邦生物科技有限公司);醌氧化还原酶 1(NQO1)ELISA 试剂盒(上海心语生物科技有限公司);丙二醛(MDA)检测试剂盒-硫代巴比妥酸(TBA)法(上海尚宝生物科技有限公司);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司)。

1.4 分组与给药

对照组(0.9%氯化钠溶液)、Ramelteon 组、LPS 组和 LPS+Ramelteon 组,每组 6 只 C57BL/6 雄性小鼠。其中 Ramelteon 组和 LPS+Ramelteon 组小鼠腹腔注射 Ramelteon[3 mg/(kg·d)],1 日 1 次,连续注射 7 d。对照组小鼠腹腔注射相同剂量的 0.9%氯化钠溶液,1 日 1 次,连续注射 7 d。在第 7 日结束的时候,LPS 组和 LPS+Ramelteon 组在 Ramelteon 注射 2 h 后,向小鼠腹腔内注射 LPS(1 mg/kg),并将老鼠处死,取脑组织以备用。

1.5 小鼠神经功能缺损评分

Ramelteon 组、LPS 组和 LPS+Ramelteon 组注射药物 24 h 后,三组各取 6 只小鼠进行神经功能评分。(1)木条平衡法(木条 1.5 cm 宽):0 分,小鼠失去平衡能力,从木条上跌落;1 分,小鼠紧紧握住木条或用四肢钩住木条>60 s;2 分,小鼠在 60 s 内保持稳定的平衡姿势,但未在木条上移动;3 分,小鼠在木条上自由行走,并可以自由转动。(2)鼠尾悬挂法:0 分,小鼠肢体下垂,不能弯曲;1 分,小鼠前肢在原位挣扎;2 分,小鼠前肢可以弯曲,后肢不能;3 分,小鼠挣扎后后肢可弯曲;4 分,小鼠挣扎后能向尾部弯曲;5 分,小鼠在 15 s 内弯曲到尾部。将 2 种神经功能评估方法的评分相加,得出神经功能评分,评分越高,神经功能缺损程度越轻。

1.6 伊文思蓝分析

伊文思蓝是一种非膜的渗透性染料,在神经病学领域,可作为示踪剂观察 BBB 的完整性。正常生理条件下血浆蛋白是无法透过 BBB 的,由于其与血浆蛋白有很强的亲和力,所以与血浆蛋白结合的伊文思蓝也无法透过 BBB,通过观察伊文思蓝泄露可以了解 BBB 完整性的损伤情况^[10]。经 Ramelteon 治疗后,将伊文思蓝溶液(2 mg,1%溶于 0.9%氯化钠溶液)经小鼠尾静脉注射,循环 30 min 后将小鼠斩首,然后在冰上快速分离脑组织并保存。

1.7 bEnd.3 内皮细胞培养

将 bEnd.3 细胞置于 DMEM 培养基中生长,并在培养基中添加 4.5 g/L 葡萄糖、3.7 g/L 碳酸氢钠、4 g/L 谷氨酰胺、10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素,所有细胞培养物均在 37 ℃和 5% CO₂/95%室内空气的潮湿培养箱中保存。需要经过药物处理的 Ramelteon 组和 LPS+Ramelteon 组,将细胞以 1.0×10⁴ 个/cm² 的密度接种于组织培养皿中,分别在 Ramelteon 药物浓度梯度为 30、60 nmol/L 的情况下,使用 LPS(1 μg/mL)处理细胞。然后,将部分细胞加入六孔板中,培养 24 h 后,等待细胞快铺满六孔板后,加入 1 mmol/L 的二甲双胍处理细胞 1 d,促进 AMPK 磷酸化的激活。最后,为了敲除 bEnd.3 细胞中的 Nrf2,用完全不含抗菌药物的培养基继续培养细胞并用 LPS 和 Ramelteon 处理,检测 Nrf2 的含量以评估 Nrf2 的敲除效率。

1.8 CCK-8 细胞活力的测定

使用 CCK-8 试剂盒评估细胞活力。将 20 000 个 bEnd.3 细胞接种在 96 孔板中,并在 LPS 和 Ramelteon 处理之前温育 24 h。为了确定存活力,分别于 0、24、48、72 和 96 h 后在每个孔位中加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,在(37 ℃,5%CO₂)恒温箱中下培养小鼠,最后使用全自动定量绘图酶标仪在 450 nm 处测量吸光度。

1.9 BBB 通透性的测定

荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖是由荧光素异硫氰酸酯偶联葡聚糖形成的一种标志物,是由不同长度的支链葡萄糖分子组成的被标记的多糖,可根据所使用的葡聚糖的大小来测定 BBB 的溶质、离子和蛋白质渗透性。将 100 μL 含有 500 μg/mL 荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖的溶液涂于细胞单层顶端表面并在 PBS 中继续培养 24 h,然后从细胞基底外侧室取出约 20 μL 样品,并按 1:5 的比例用 PBS 缓冲液稀释。随后,在 490/520 nm 处进行荧光光谱法测定。

1.10 其他常规生物学及组织学方法

采用免疫染色和蛋白质印迹法检测脑组织和内皮细胞中 ZO-1 和闭合蛋白(Occludin)的表达。采用定量反转录聚合酶链反应和酶联免疫吸附试验法检测炎症因子 IL-1β 和 MCP-1 水平的表达。用硫代巴比妥酸法检测脑组织和内皮细胞中 MDA 的浓度。用蛋白质印迹法检测细胞核中 Nrf2 和 NQO1 的表达情况。

1.11 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 统计软件对统计结果进行分析及绘图,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验及方差分析;不符合正态分布的计量资料,采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用非参数检验;计数资料用率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ramelteon 对 LPS 诱导小鼠大脑通透性的影响

采用伊文思蓝法检测 BBB 的通透性,结果见图 1。与对照组的 16.1 μg/g 相比,LPS 组小鼠大脑通透性显著升至 36.6 μg/g;而相比于 LPS 组,LPS+Ramelteon 组小鼠大脑通透性显著下降为 25.6 μg/g,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 Ramelteon 对 LPS 诱导小鼠神经功能的影响

模型制备后 6、12 h,与对照组比较,LPS 组小鼠神经功能评分显著降低;与 LPS 组比较,LPS+Ramelteon 组小鼠神经功能评分明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

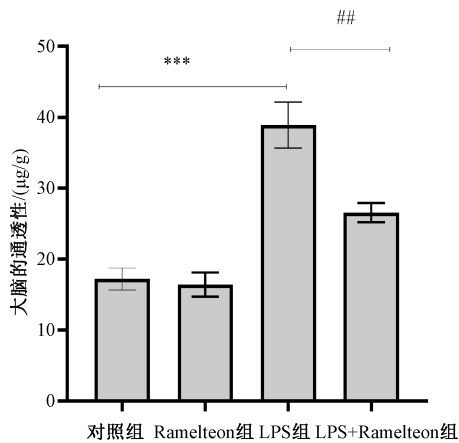
表 1 各组小鼠神经功能评分比较($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	模型制备后 6 h	模型制备后 12 h
对照组	7.63±1.03	6.36±1.83
Ramelteon 组	7.12±0.89	5.92±0.67
LPS 组	5.11±0.36 ^a	4.01±0.63 ^a
LPS+Ramelteon 组	6.12±0.73 ^{ab}	5.12±0.66 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 Ramelteon 对 LPS 诱导小鼠 ZO-1 和 Occludin 的影响

与对照组相比,Ramelteon 组小鼠 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平显著上调,LPS 组表达水平显著下调;与 LPS 组相比,LPS+Ramelteon 组小鼠 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平有所升



与对照组比较,*** $P<0.05$;与 LPS+Ramelteon 组比较,## $P<0.05$ 。

图 1 Ramelteon 对 LPS 诱导小鼠大脑通透性的影响

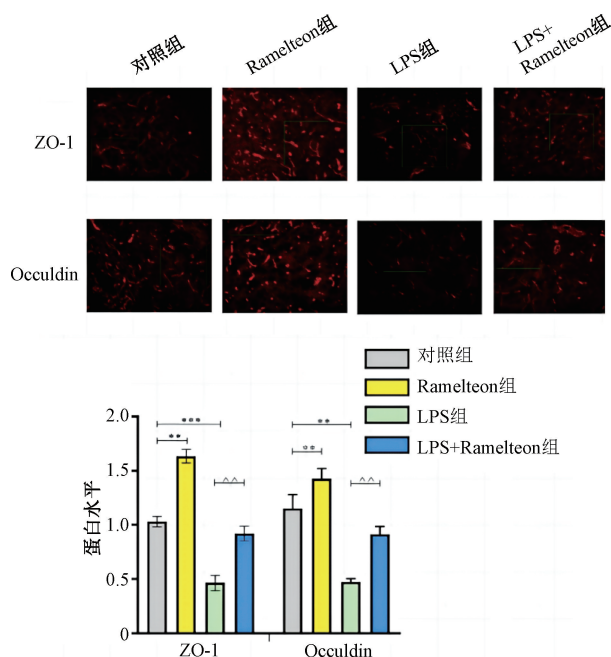
高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

2.4 Ramelteon 对 LPS 诱导小鼠血管 IL-1 β 和 MCP-1 的影响

与对照组相比,LPS 组小鼠 IL-1 β 、MCP-1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与 LPS 组相比,LPS+Ramelteon 组 IL-1 β 、MCP-1 mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),差异均有统计学意义,见图 3。

2.5 Ramelteon 对 LPS 诱导小鼠氧化应激的影响

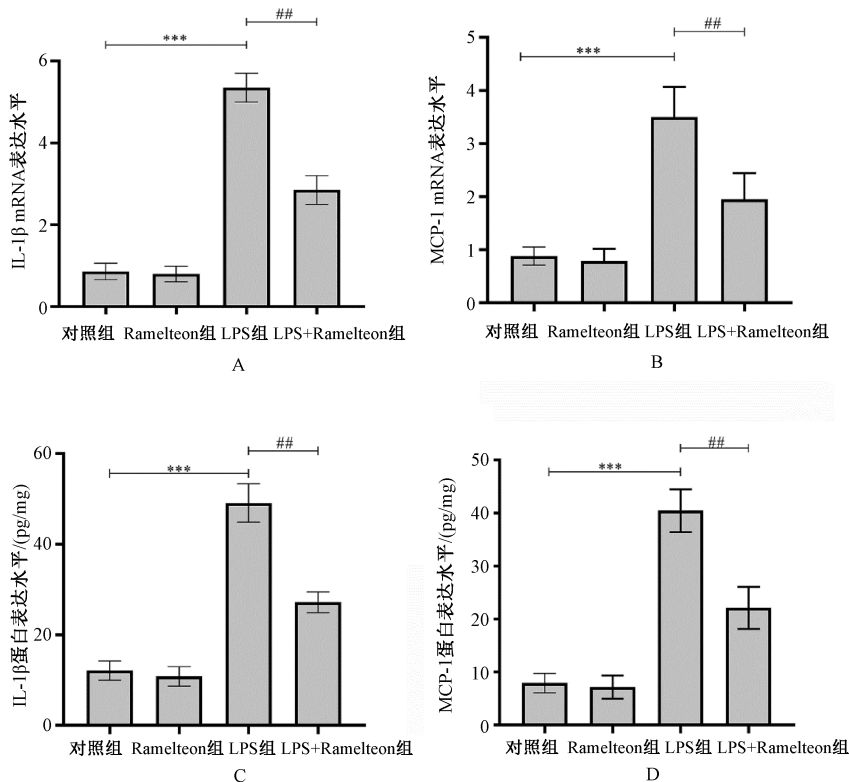
与对照组相比,Ramelteon 组小鼠 Nrf2 和 NQO1 表达显著上调($P<0.05$),而 LPS 组小鼠 Nrf2 和 NQO1 表达显著下调($P<0.05$);与 Ramelteon 组比较,LPS 组小鼠 Nrf2 和 NQO1 表达显著下调($P<0.05$);与 LPS 组相比,LPS+Ramelteon 组小鼠



与对照组比较,** $P<0.05$,*** $P<0.01$;与 LPS 组比较,* $P<0.05$ 。

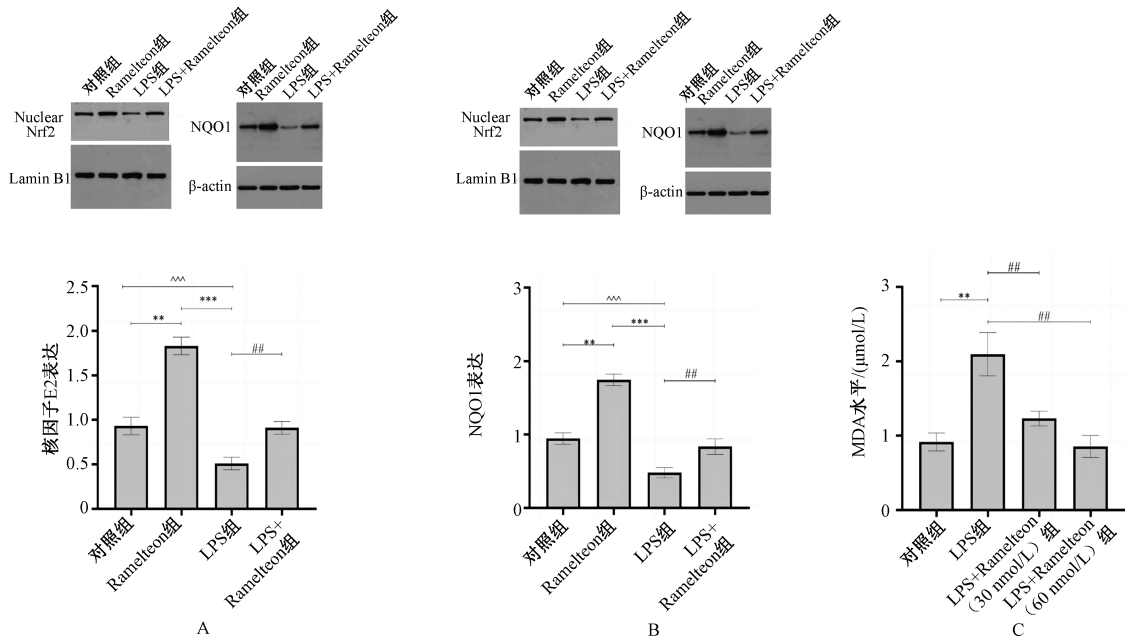
图 2 Ramelteon 对 LPS 诱导的小鼠 ZO-1 和 Occludin 的影响

Nrf2 和 NQO1 的表达显著上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,LPS 组小鼠 MDA 水平升高;与 LPS 组相比,LPS+Ramelteon (30 nmol/L, 60 nmol/L) 组小鼠 MDA 水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 4。



A. IL-1 β mRNA 表达;B. MCP-1 mRNA 表达;C. IL-1 β 蛋白表达;D. MCP-1 蛋白表达;与对照组比较,*** $P<0.05$;与 LPS 组比较,## $P<0.05$ 。

图 3 Ramelteon 对 LPS 诱导的小鼠脑血管中 IL-1 β 和 MCP-1 表达的影响



A. 小鼠脑血管中 Nrf2 表达;B. 小鼠脑血管中 NQO1 的表达;C. 小鼠脑血管中 MDA 水平;
与对照组比较, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$;与 Ramelteon 组比较, *** $P<0.01$;与 LPS 组比较, ## $P<0.01$ 。

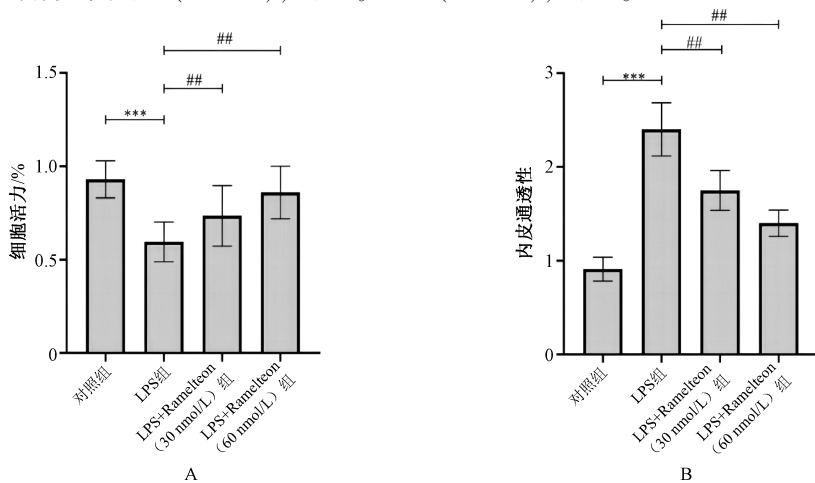
图 4 Ramelteon 对小鼠脑血管氧化应激的影响

2.6 Ramelteon 对 LPS 诱导的 bEnd.3 脑内皮细胞通透性和细胞活力影响

LPS 组 bEnd.3 细胞存活率的仅为 67%;LPS+Ramelteon (30 nmol/L、60 nmol/L) 组 bEnd.3 细胞存活率分别达到了 85%和 96%,相较 LPS 组差异均有统计学意义 ($P<0.05$);与 LPS 组相比,LPS+Ramelteon (30 nmol/L、60 nmol/L) 组内皮细胞通透性明显降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见图 5。

2.7 Ramelteon 对 LPS 诱导的 bEnd.3 脑内皮细胞中 ZO-1 和 Occludin 降低的影响

改为 LPS 组内皮细胞 ZO-1 和 Occludin 的 mRNA、蛋白水平较对照组显著下降,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);LPS+Ramelteon (30、60 nmol/L) 组内皮细胞 ZO-1 和 Occludin 的 mRNA、蛋白水平较 LPS 组显著提升,且差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见图 6。



A. 细胞活力;B. 内皮通透性;与对照组比较, *** $P<0.01$;与 LPS 组比较, ## $P<0.05$ 。

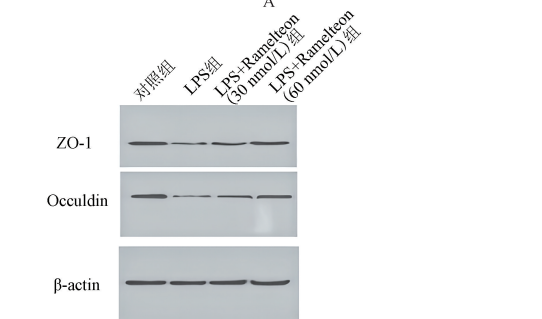
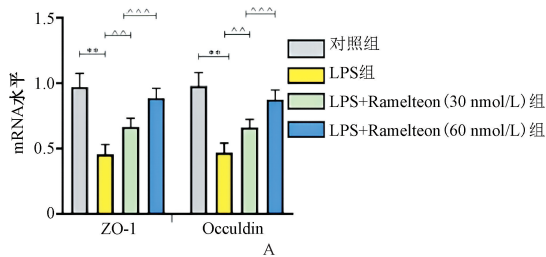
图 5 Ramelteon 对 LPS 诱导的 bEnd.3 脑内皮细胞内皮单层通透性增加的影响

2.8 Ramelteon 对 LPS 诱导的 bEnd.3 脑内皮细胞氧化应激影响

LPS 组 Nrf2 和 NQO1 在 bEnd.3 脑内皮细胞的表达水平较对照组显著降低 ($P<0.05$);LPS+Ramelteon (30、60 nmol/L) 组 Nrf2 和 NQO1 在 bEnd.3 脑内皮细胞中的表达水平较 LPS 组显著升高,且差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见图 7。

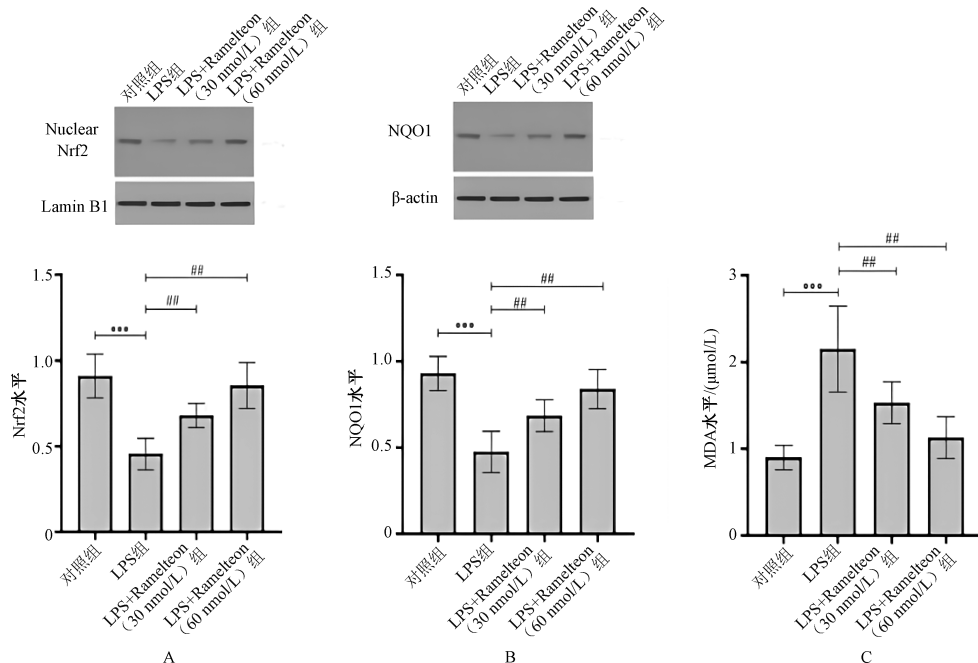
2.9 Nrf2 基因敲除对 Ramelteon 对 bEnd.3 内皮细胞的保护作用影响

在转染 Nrf2-siRNA 细胞中 Nrf2 的表达显著降低,建立 Nrf2 基因沉默细胞成功,见图 8 (A)。与对照组相比,LPS 组 bEnd.3 内皮细胞通透性明显增加 ($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+Ramelteon (60 nmol/L) 组内皮细胞通透性明显降低 ($P<0.05$),见图 9。



A. ZO-1 和 Occludin mRNA 表达; B. ZO-1 和 Occludin 蛋白表达;
与对照组比较, ** $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^ $P < 0.05$;
与 LPS+Ramelteon (30 nmol/L) 组比较, ^^^ $P < 0.05$ 。

图6 Ramelteon 对 LPS 诱导的 bEnd.3 脑内皮细胞中 ZO-1 和 Occludin 降低的影响



A. bEnd.3 脑内皮细胞 Nrf2 水平; B. bEnd.3 脑内皮细胞 NQO1 水平; C. bEnd.3 脑内皮细胞 MDA 水平;
与对照组比较, *** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ## $P < 0.05$ 。

图7 Ramelteon 对 bEnd.3 脑内皮细胞氧化应激的影响

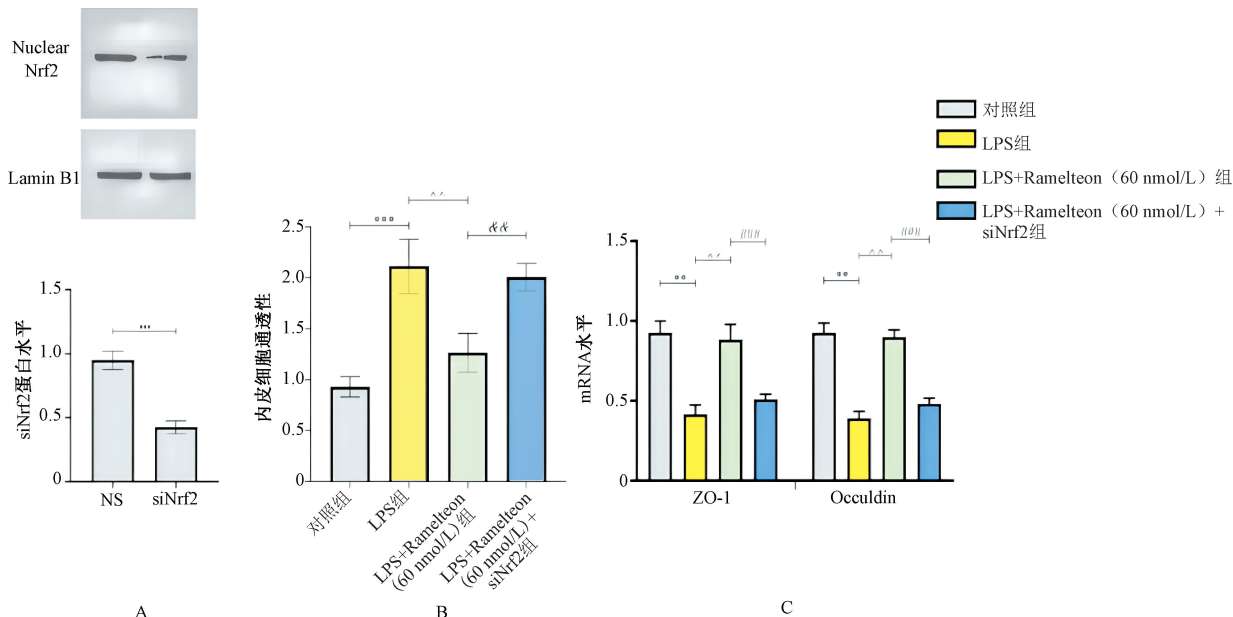
0.05); 在 Nrf2 基因敲除后, 相比 Ramelteon (60 nmol/L) 组, LPS+Ramelteon (60 nmol/L)+siNrf2 组内皮细胞通透性明显升高 ($P < 0.05$), 上述差异均有统计学意义。与对照组相比, LPS 组 ZO-1 和 Occludin 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, LPS+Ramelteon (60 nmol/L) 组 ZO-1 和 Occludin 表达水平升高 ($P < 0.05$); 在 Nrf2 基因敲除后, 相比于 LPS+Ramelteon (60 nmol/L) 组, LPS+Ramelteon (60 nmol/L) + siNrf2 组 ZO-1 和 Occludin 表达水平降低 ($P < 0.05$), 上述差异均有统计学意义, 见图 8。

2.10 Ramelteon 对 LPS 诱导的 BBB 损伤的影响

与对照组比较, LPS 组 Nrf2 相对蛋白表达量降低 ($P < 0.01$); 与 LPS 组相比, LPS+Ramelteon (60 nmol/L) 组 Nrf2 相对蛋白表达量升高 ($P < 0.05$); 而 LPS+Ramelteon (60 nmol/L) + siNrf2 组、LPS+Ramelteon (60 nmol/L) + Compound C+Nrf2 组相较于 LPS+Ramelteon (60 nmol/L) 组 Nrf2 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$), 上述差异均有统计学意义。与对照组比较, LPS 组检测到活性氧 (ROS) 相对生成量明显升高 ($P < 0.01$); 与 LPS 组相比, LPS+Ramelteon (60 nmol/L) 组 ROS 相对生成量降低 ($P < 0.05$); LPS+Ramelteon (60 nmol/L) + siNrf2 组、LPS+Ramelteon (60 nmol/L) + Compound C+Nrf2 组相较于 LPS+Ramelteon (60 nmol/L) 组 ROS 相对生成量升高 ($P < 0.05$), 上述差异均有统计学意义。LPS 组细胞活力较对照组显著降低 ($P < 0.01$); 与 LPS 组相比, LPS+Ramelteon (60 nmol/L) 组细胞活力升高; LPS+Ramelteon (60 nmol/L) + siNrf2 组、LPS+Ramelteon (60 nmol/L) + Compound C+Nrf2 组相较于 LPS+Ramelteon (60 nmol/L) 组细胞活力降低 ($P < 0.05$), 上述差异均有统计学意义, 见图 9。

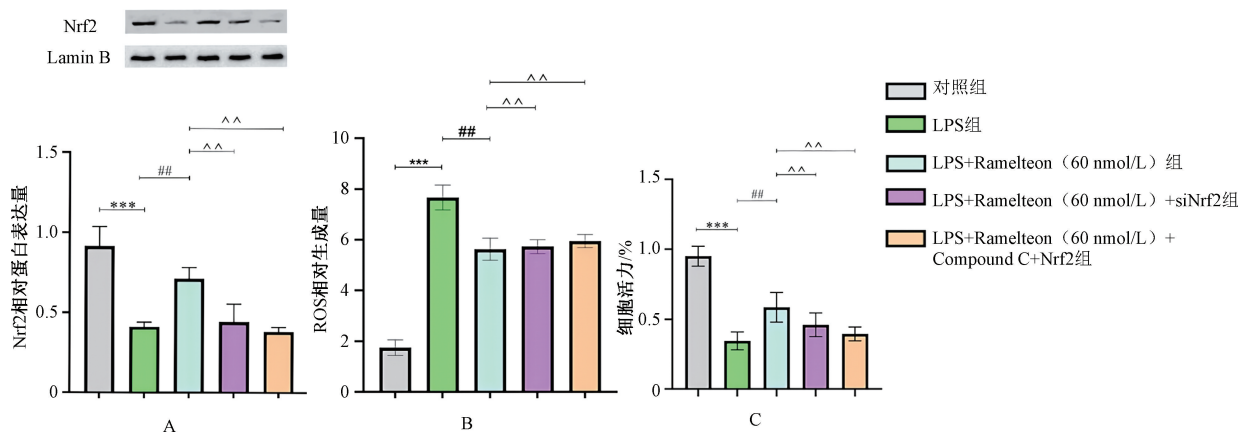
3 讨论

本研究旨在探讨 Ramelteon 对 LPS 诱导的体外 BBB 模型通透性升高的保护作用及其机制。研究结果表明, 加入



A. Nrf2 蛋白水平;B. 内皮细胞通透性;C. ZO-1 和 Occludin 的 mRNA 水平;与对照组比较, ** $P < 0.05$;与 LPS 组比较, ^ $P < 0.05$;与 LPS+Ramelteon (60 nmol/L) 组比较, ^^^ $P < 0.05$ 。

图 8 Nrf2 基因敲除对 Ramelteon 对内皮细胞的保护作用影响



A. Nrf2 相对蛋白表达量;B. ROS 相对生成量;C. 细胞活力;与对照组比较, *** $P < 0.01$;与 LPS 组比较, ^ $P < 0.05$;与 LPS+Ramelteon 组 (60 nmol/L) 比较, ~ $P < 0.05$ 。

图 9 Ramelteon 对 LPS 诱导的 BBB 损伤的影响

Ramelteon 治疗后受 LPS 影响的小鼠神经功能评分有所提高。同时,本研究观察到 Ramelteon 改善了 LPS 诱导小鼠大脑通透性升高,且降低了炎症相关因子 IL-1 β 和 MCP-1 的表达,提示 Ramelteon 对 LPS 诱导的脑血管炎症反应有抑制作用,这表明 Ramelteon 对 BBB 的损伤具有一定的保护作用。

BBB 的主要功能是维持中枢内环境的稳定,为神经系统信号传导提供一个稳定的离子空间,以确保大脑正常的工作^[11]。BBB 由内皮细胞及其细胞间的紧密连接、完整的基膜、周细胞、小胶质细胞及星形胶质细胞以及围成的神经胶质膜构成^[12]。目前,尚不了解 BBB 完整性的损伤是否与 MT 水平下降有关,但有研究报道,MT 能够改善 LPS 诱导的 BBB 损伤^[13],通过阻止 LPS 引起的 Occludin 以及 claudin-5 降解实现。本研究发现,在 LPS 的刺激下,小鼠大脑和体外 bEnd. 3

内皮细胞的 BBB 通透性均显著增加,同时伴有 ZO-1、Occludin 的下调。这些数据表明 BBB 的完整性受到 LPS 刺激的损害,通过 Ramelteon 治疗可显著逆转 LPS 诱导 BBB 通透性增加和 ZO-1、Occludin 表达降低,提示 Ramelteon 对 LPS 诱导的 BBB 损伤具有保护作用。

有文献报道,炎症反应可参与脑损伤的过程^[14]。大脑缺血缺氧后会激活炎症细胞,增加炎症因子的表达,如 MCP-1、IL-1 β 等,激活的炎症细胞进入脑组织再次释放更多的炎症因子,形成级联反应从而破坏 BBB。本研究观察到,在受到 LPS 刺激后脑血管炎症因子的释放显著升高,但在经过 Ramelteon 治疗,明显抑制了 LPS 诱导的脑血管炎症反应,提示 Ramelteon 对 LPS 诱导的脑血管炎症反应具有抑制作用。

氧化应激与中枢神经系统疾病的发病机制相关,当机体

ROS 成分与抗氧化系统之间的平衡被打破时,氧化应激将会发生一系列的适应性反应^[15]。氧化应激主要是由于过量的 ROS 分泌产生的,当 ROS 的活性高于抗氧化防御时即可引起氧化应激反应^[16]。LPS 在激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶后会诱导机体产生过多的 ROS,ROS 过度积累引起氧化应激,从而导致 BBB 完整性的损伤^[17-19]。因此,ROS 的过度积累诱发氧化应激反应与 BBB 完整性受损诱发的疾病发病机制有关。据相关研究报道,ROS 是受 Nrf2 信号通路调控的^[20]。本研究观察到,LPS 能引起 BBB 模型血管内皮中的 Nrf2 和 NQO1 表达显著下降,同时 MDA 产生增加,提示 LPS 可以激活氧化应激;在加入了 Ramelteon 后,氧化应激反应被明显抑制。

为了进一步证实 Ramelteon 在对 LPS 诱导脑血管的保护作用,我们研究了 Ramelteon 在体外 bEnd. 3 内皮细胞通透性的作用。Nrf2 基因沉默后,Ramelteon 失去了对 LPS 诱导的 ZO-1 和 Occludin 减少以及内皮细胞单层通透性增加的保护作用,提示 Ramelteon 对 BBB 的保护作用可能是通过激活 Nrf2 信号通路介导的。

MT 除了具有催眠的药理作用,MT 还具有一定的抗炎作用^[21]。MT 及其代谢物能清除各种氧自由基,且能够通过激活 AMPK 以及抑制 gp91 phox 蛋白表达,改善 LPS 诱导的 BBB 损伤^[22]。因此,本研究加入了 AMPK 的抑制剂 Compound C,结果显示,在加入了 Compound C 后,Nrf2 蛋白表达有所下调。与 LPS+Ramelteon 组相比,加入 Compound C 后检测到 ROS 的含量有所增加,细胞活力也显著下调。因此,本研究结果表明,Ramelteon 可能通过激活 AMPK-Nrf2 信号通路改善 LPS 诱导的 BBB 通透性升高。

参考文献

[1] 李想,何志义. 病毒性脑炎继发自身免疫性脑炎的研究进展[J]. 中国临床神经科学, 2020, 28(5): 584-589, 594.

[2] HUANG Y Y, CHEN S P, LUO Y M, et al. Crosstalk between inflammation and the BBB in stroke[J]. Curr Neuroparmacol, 2020, 18(12): 1227-1236.

[3] GU Y, ZHENG G Q, XU M J, et al. Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury[J]. J Neurochem, 2012, 120(1): 147-156.

[4] REITER R J, TAN D X, KIM S J, et al. Delivery of pineal melatonin to the brain and SCN: role of canaliculi, cerebrospinal fluid, tanyocytes and Virchow-Robin perivascular spaces[J]. Brain Struct Funct, 2014, 219(6): 1873-1887.

[5] GALANO A, MEDINA M E, TAN D X, et al. Melatonin and its metabolites as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: a physicochemical analysis[J]. J Pineal Res, 2015, 58(1): 107-116.

[6] LIU J B, CLOUGH S J, HUTCHINSON A J, et al. MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2016, 56: 361-383.

[7] LECLERC V, ETTAOUSSI M, RAMI M, et al. Design and synthesis of naphthalenic derivatives as new ligands at the melatonin

binding site MT3[J]. Eur J Med Chem, 2011, 46(5): 1622-1629.

[8] DEVI V, SHANKAR P K. Ramelteon: a melatonin receptor agonist for the treatment of insomnia[J]. J Postgrad Med, 2008, 54(1): 45-48.

[9] SAYAN H, OZACMAK V H, OZEN O A, et al. Beneficial effects of melatonin on reperfusion injury in rat sciatic nerve. J Pineal Res. 2004. 37(3): 143-8.

[10] XU Y, HE Q, WANG M, et al. Quantifying blood-brain-barrier leakage using a combination of evans blue and high molecular weight FITC-Dextran[J]. J Neurosci Methods, 2019, 325: 108349.

[11] ABBOTT N J, PATABENDIGE A A, DOLMAN D E, et al. Structure and function of the blood-brain barrier[J]. Neurobiol Dis, 2010, 37(1): 13-25.

[12] REESE T S, KARNOVSKY M J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase[J]. J Cell Biol, 1967, 34(1): 207-217.

[13] HU Y Y, WANG Z G, PAN S L, et al. Melatonin protects against blood-brain barrier damage by inhibiting the TLR4/ NF-κB signaling pathway after LPS treatment in neonatal rats [J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 31638-31654.

[14] BOURGEOIS-TARDIF S, DE BEAUMONT L, RIVERA J C, et al. Role of innate inflammation in traumatic brain injury[J]. Neurol Sci, 2021, 42(4): 1287-1299.

[15] LI Z F, BI R T, SUN S, et al. The role of oxidative stress in acute ischemic stroke-related thrombosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8418820.

[16] REMIGANTE A, MORABITO R. Cellular and Molecular Mechanisms in Oxidative Stress-Related Diseases[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(14): 8017.

[17] XIE J Y, HONG E H, DING B Y, et al. Inhibition of NOX4/ROS suppresses neuronal and blood-brain barrier injury by attenuating oxidative stress after intracerebral hemorrhage [J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 578060.

[18] MAGNANI F, MATTEVI A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases[J]. Curr Opin Struct Biol, 2019, 59: 91-97.

[19] AL AHMAD A, GASSMANN M, OGUNSHOLA O O. Involvement of oxidative stress in hypoxia-induced blood-brain barrier breakdown [J]. Microvasc Res, 2012,84(2):222-225.

[20] UDONO H, NISHIDA M. Metformin-ROS-Nrf2 connection in the host defense mechanism against oxidative stress, apoptosis, cancers, and ageing[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2022, 1866(8): 130171.

[21] SU Z D Z, WEI X B, FU Y B, et al. Melatonin alleviates lipopolysaccharide-induced myocardial injury by inhibiting inflammation and pyroptosis in cardiomyocytes [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(5): 413.

[22] WANG X N, XUE G X, LIU W C, et al. Melatonin alleviates lipopolysaccharide-compromised integrity of blood-brain barrier through activating AMP-activated protein kinase in old mice[J]. Aging Cell, 2017, 16(2): 414-421.

(收稿日期:2023-02-22 修回日期:2023-07-19)