

## 论著·基础研究

脑卒中后脑血管内皮细胞内质网应激抑制 Wnt7/ $\beta$ -catenin 通路导致血脑屏障损伤的机制研究

董海平, 谢海怡, 马晓晓, 王震虹

上海交通大学医学院附属仁济医院麻醉科, 上海 200120

**[摘要]** **目的**·探讨缺血性脑卒中后脑血管内皮细胞 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号失活是否导致血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 完整性破坏, 并研究内质网应激爆发是否介导了 Wnt7/ $\beta$ -catenin 通路的抑制。**方法**·采用线栓法阻断小鼠大脑中动脉建立大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型, 脑缺血 60 min 后拔除线栓。向 MCAO 模型小鼠腹腔注射内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA) 作为 4-PBA+MCAO 组。并设置假手术组 (Sham 组)。MCAO 后 24 h 用伊文思蓝 (Evans blue, EB) 测定小鼠 BBB 的通透性, 干湿法测定脑组织含水量, 免疫荧光测定小鼠脑血管内皮细胞和周细胞黏附性。对人脑微血管内皮细胞 (human brain microvascular endothelial cells, HBMECs) 进行氧糖剥夺 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 4 h, 加入 4-PBA 培养 24 h。细胞实验分为空白对照组、OGD 组和 OGD+4-PBA 组。采用 CCK-8 测定细胞活力, 通过检测 FITC 标记的牛血清白蛋白 (FITC-BSA) 的通过率来评估细胞通透性; 通过 ELISA 测定 HBMECs 中血小板衍生生长因子  $\beta$  (platelet-derived growth factor  $\beta$ , PDGF- $\beta$ ) 的分泌水平; 采用 Fluo-3 AM 钙离子荧光探针检测细胞的荧光强度并评估细胞内钙离子浓度, 通过 CM-H<sub>2</sub>DCFDA 荧光探针测量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量以明确细胞内质网应激状态; 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测 HBMECs 中的连接蛋白 [紧密连接蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) 和密封蛋白 5 (claudin-5)]、内质网应激蛋白 [CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)、葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)、门冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12 (cysteine-containing aspartate-specific proteases 12, Caspase-12)]、Wnt7 和  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 的表达水平。**结果**·MCAO 模型小鼠脑梗死区含水量较假手术组增加, EB 渗出量明显增多 (均  $P<0.05$ ), 小鼠脑血管内皮细胞和周细胞之间的黏附性下降; 腹腔注射 4-PBA 后 MCAO 模型小鼠脑水肿程度减轻, BBB 的渗透性降低 (均  $P<0.05$ ), 脑血管内皮细胞和周细胞之间的黏附性增加。与空白对照组 HBMECs 比较, 在 OGD 条件下细胞活力下降, 通透性增加 (均  $P<0.05$ ); 同时, OGD 组 HBMECs 中连接蛋白 ZO-1、claudin-5 的表达水平下降, PDGF- $\beta$  的分泌水平减少, 钙离子浓度升高, ROS 含量明显上调, 内质网应激蛋白 CHOP、GRP78、Caspase-12 的表达水平增加, Wnt7 和  $\beta$ -catenin 的表达水平下降 (均  $P<0.05$ )。而当 HBMECs 的 OGD 模型经 4-PBA 处理后, OGD 导致的 HBMECs 损伤减轻, 细胞中连接蛋白的表达水平增加, HBMECs 的通透性降低, PDGF- $\beta$  的分泌水平增加, 并且 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号的活性明显恢复 (均  $P<0.05$ )。**结论**·脑卒中后脑血管内皮细胞内质网应激爆发导致 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号失活引起的内皮细胞损伤, 是 BBB 破坏的关键途径。

**[关键词]** 内质网应激; Wnt7/ $\beta$ -catenin; 血脑屏障; 缺血性脑卒中**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.07.005 **[中图分类号]** R743.33 **[文献标志码]** AMechanism of blood-brain barrier damage caused by the inhibition of Wnt7/ $\beta$ -catenin pathway induced by endoplasmic reticulum stress in cerebrovascular endothelial cells after stroke

DONG Haiping, XIE Haiyi, MA Xiaoxiao, WANG Zhenhong

Department of Anesthesiology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200120, China

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (82071290); 上海市自然科学基金 (20ZR1433400); 上海市卫生健康委员会青年资助项目 (20194Y0072)。**[作者简介]** 董海平 (1988—), 女, 主治医师, 博士生; 电子信箱: 397297461@qq.com。**[通信作者]** 王震虹, 电子信箱: 18621625707@163.com。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (82071290); Shanghai Natural Science Foundation (20ZR1433400); Youth Funding Project of Shanghai Municipal Health Commission (20194Y0072).**[Corresponding Author]** WANG Zhenhong, E-mail: 18621625707@163.com.

**[Abstract]** **Objective** To investigate whether the inactivation of Wnt7/ $\beta$ -catenin signaling causes the destruction of the blood-brain barrier (BBB) in cerebrovascular endothelial cells after ischemic stroke, and investigate whether endoplasmic reticulum stress bursts mediates the inhibition of Wnt7/ $\beta$ -catenin pathway. **Methods** The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) in mice was established by a monofilament nylon suture with a round tip, which was used to temporarily occlude the middle cerebral artery for 60 min. MCAO model mice were intraperitoneally injected with the endoplasmic reticulum stress blocker 4-phenylbutyric acid (4-PBA) as 4-PBA+MCAO group. Sham surgery group (Sham group) was set. Twenty-four hours after MCAO, Evans blue (EB) was used to measure the BBB permeability. The brain water content was calculated by dry-wet weight ratio, and the adhesion of cerebrovascular endothelial cells and pericytes in mice was measured by immunofluorescence. Human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) were used to establish an oxygen and glucose deprivation (OGD) model for 4 h, and then cultured with 4-PBA for 24 h. Cells were divided into blank control group, OGD group, and OGD+4-PBA group for CCK-8 assay to determine the cell viability. FITC-labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) was used to detect the cell permeability. The secretion of platelet-derived growth factor  $\beta$  (PDGF- $\beta$ ) was measured by ELISA. Fluo-3 AM fluorescence probe was used to detect the fluorescence intensity of cells to assess intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, and reactive oxygen species (ROS) content was measured by CM-H2DCFDA fluorescence probe to clarify the endoplasmic reticulum stress state. Western blotting was used to examine the expression of connexins, including zonula occludens-1 (ZO-1) and claudin-5, the expression of endoplasmic reticulum stress proteins, including CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), glucose-regulated protein 78 (GRP78), and cysteine-containing aspartate-specific proteases-12 (Caspase-12), and the expression of Wnt7/ $\beta$ -catenin in HBMECs. **Results** Compared with the Sham group, the brain water content of the infarction area of mice increased after MCAO, and the exudation of EB increased significantly (both  $P < 0.05$ ). The adhesion between cerebrovascular endothelial cells and pericytes in mice was reduced after the occurrence of MCAO. After intraperitoneal injection of 4-PBA in mice with MCAO, the degree of brain edema and the exudation of EB were reduced (both  $P < 0.05$ ), and the adhesion between cerebrovascular endothelial cells and pericytes increased. Compared with the HBMECs of the blank control group, the viability of HBMECs after OGD decreased, and the permeability of HBMECs increased (both  $P < 0.05$ ). OGD condition also led to decreased expression of connexins (ZO-1 and claudin-5), decreased secretion of PDGF- $\beta$  in HBMECs, increased expression of endoplasmic reticulum stress proteins (CHOP, GRP78 and Caspase-12), up-regulated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and ROS content, and decreased expression of Wnt7 and  $\beta$ -catenin in HBMECs (all  $P < 0.05$ ). After HBMECs were cultured with 4-PBA, the damage of HBMECs caused by OGD was reduced, and the expression of connexins increased. The permeability of HBMECs was reduced, and the secretion of PDGF- $\beta$  was promoted (all  $P < 0.05$ ). After 4-PBA treatment, the activity of Wnt7/ $\beta$ -catenin signaling was significantly restored in the OGD model of HBMECs ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Wnt7/ $\beta$ -catenin signaling inactivation caused by endothelial reticulum stress bursts leads to cerebrovascular endothelial cell damage, which is the crucial pathway of BBB destruction after stroke.

**[Key words]** endoplasmic reticulum stress; Wnt7/ $\beta$ -catenin pathway; blood-brain barrier (BBB); ischemic stroke

脑卒中当前已成为威胁我国居民健康的主要原因之一,是造成我国减寿年数高的首位病因<sup>[1]</sup>。高达67.3%~80.5%的脑卒中为缺血性脑卒中(脑梗死)<sup>[2]</sup>,可能遗留严重残疾和肢体、语言等功能障碍,给患者和家庭均带来巨大的精神和经济压力,也给整个社会造成负担。血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是维持脑组织代谢稳态的保障。研究<sup>[3]</sup>发现脑卒中后BBB的破坏对脑损伤起到了关键作用。血管内皮细胞是BBB的核心组成部分,其结构被破坏能引起脑卒中后脑水肿<sup>[4]</sup>。因此针对缺血性脑卒中后BBB特别是血管内皮细胞的损伤机制研究有望为治疗干预这一疾病提供可能的突破点。

内质网的主要功能是细胞内蛋白的加工、修饰以及合成,并为其他细胞器供给脂质,稳定细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度<sup>[5]</sup>。缺血缺氧等不良刺激可以引起细胞内质网伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)的表达增加;GRP78与蛋白激酶R样内质网激酶[protein kinase R (PKR)-like

endoplasmic reticulum kinase, PERK]、转录激活因子6(activating transcription factor 6, ATF6)和真核翻译起始因子2 $\alpha$ (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ )分离后,PERK激活GRP78和CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP),促进非折叠蛋白积聚,内质网应激过度导致细胞损伤<sup>[6]</sup>。内质网应激还可以促进细胞氧化应激爆发,诱发过氧化损伤<sup>[7-8]</sup>。我们以往的研究<sup>[9]</sup>证实,脑卒中能诱导脑血管内皮细胞内质网应激的发生,并加重细胞损伤。因此,脑卒中后内质网应激是血管内皮细胞损伤和BBB破坏的重要环节。

Wnt蛋白是一组保守的分泌型蛋白,可以激活下游 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin);Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在细胞生物功能中发挥重要的作用<sup>[10-11]</sup>。近来一些研究<sup>[4,12]</sup>已证实Wnt/ $\beta$ -catenin通路的失活是脑卒中后BBB功能损害的重要因素。其中Wnt7主要存在于血管系统中,特别是脑血管内皮细胞中,是神经系统

调节 BBB 的形成和维持其通透性的关键分子<sup>[13-14]</sup>, 但 Wnt7 在脑卒中后脑血管内皮细胞中发挥的作用及机制还有待阐明。

研究<sup>[15]</sup>发现, 抑制人胚肾 293 细胞中内质网应激相关蛋白 eIF2 $\alpha$  和 CHOP 的上调可以降低  $\beta$ -catenin 的表达水平。也有研究<sup>[16-17]</sup>证实内质网应激和 Wnt 通路的抑制密切相关, 但脑卒中后内质网应激对 Wnt7/ $\beta$ -catenin 通路的影响还未阐明。因此本研究在小鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型和人脑血管内皮细胞糖氧剥夺 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 模型中探讨脑卒中后内质网应激对 Wnt7/ $\beta$ -catenin 通路的调控作用, 并阐明脑卒中后内质网应激爆发抑制 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号通路从而导致脑血管内皮细胞和 BBB 损伤的关键机制, 以期为临床减轻脑卒中后脑水肿的形成提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 野生型小鼠, 性别不限, 6~8 周龄, 购于上海南方模式生物科技有限公司。实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2017-0010。实验动物使用许可证号: SYXK (沪) 2017-0012。小鼠饲养于上海交通大学医学院附属仁济医院实验动物中心, 饲养环境 12 h 光照与 12 h 黑暗交替, 自由饮食。

### 1.2 实验细胞

人脑微细血管内皮细胞 (human brain microvascular endothelial cell, HBMEC) 购自美国 ScienCell 公司。

### 1.3 主要试剂及仪器

4-苯基丁酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA)、戊巴比妥钠、伊文思蓝 (Evans blue, EB)、FITC 标记的牛血清白蛋白 (FITC-BSA) 均购自 Sigma (美国); cell counting kit-8 (CCK-8) 试剂盒 (Dojindo, 日本), 紧密连接蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) 一抗 (Proteintech, 美国), CCAAT/CHOP、门冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12 (cysteine-containing aspartate-specific proteases 12, Caspase-12)、GPR78、密封蛋白 5 (claudin-5)、Wnt7、 $\beta$ -catenin、CD31、CD13、actin 一抗以及血小板衍生生长因子  $\beta$

(platelet-derived growth factor  $\beta$ , PDGF- $\beta$ ) ELISA 试剂盒 (Abcam, 英国), 二抗和 DAPI (北京中杉金桥生物技术有限公司), CM-H2DCFDA 活性氧荧光探针 (Invitrogen, 美国), Fluo-3 AM 钙离子荧光探针 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 小鼠线栓 (北京西浓科技有限公司); BS110S 化学天平 (Sartorius, 德国), 细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国), Ti2E 荧光显微镜 (Nikon, 日本), SP8 激光共聚焦显微镜 (Leica, 德国), Chemidoc XRS+ 化学发光成像系统、多功能酶标仪 (Bio-Rad Laboratories, 美国)。

### 1.4 动物实验方法

**1.4.1 动物分组** 小鼠共 45 只, 分为 3 组, 分别为假手术组 (Sham 组)、MCAO 组、4-PBA+MCAO 组, 每组 15 只。Sham 组小鼠进行解剖和血管分离, 不放置线栓; MCAO 组小鼠放置线栓阻塞大脑中动脉 60 min 后拔除线栓; 4-PBA+MCAO 组小鼠放置线栓阻塞大脑中动脉即刻腹腔注射内质网应激抑制剂 4-PBA (3 mg/kg), 药物的用法用量与课题组前期报道的实验方法一致<sup>[9]</sup>。

**1.4.2 小鼠 MCAO 模型制备** 腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠 (0.2 mL/10 g) 麻醉小鼠。颈部正中切口, 分离右侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA)、颈内动脉 (internal carotid artery, ICA) 和颈外动脉 (external carotid artery, ECA)。将具有圆形尖端的单丝尼龙缝合线通过 ECA 残端插入 ICA, 并轻轻插入, 以达到 Willis 环, 阻塞大脑中动脉; 闭塞 60 min 后, 取出缝合线并开始再灌注。对 Sham 组小鼠进行手术操作但未阻断血流。在整个手术过程中, 使用加热毯保持小鼠直肠温度在 36.5~37.5 °C。

**1.4.3 BBB 通透性检测** MCAO 后 24 h, 每组小鼠各取 5 只, 经尾静脉注射 0.5% EB, 剂量为 0.1 mL/10 g。循环 1 h 后, 用 0.9% 生理盐水经心脏灌注处死小鼠, 直到右心房流出的液体清澈为止。取脑组织, 加入 1 mL PBS, 迅速匀浆, 1 000 $\times$ g 离心 15 min。取上清液, 使用酶标仪在波长 632 nm 条件下检测。根据标准曲线, 测定 EB 渗出量。

**1.4.4 水含量测定** MCAO 后 24 h, 每组小鼠各取 5 只, 断颈处死后使用生理盐水冲洗采集的大脑, 再用中性滤纸吸干表面的水分。取缺血侧脑半球, 使用天平测定其湿质量, 之后将组织在 110 °C 的烘箱中烘烤



24 h, 并测定干质量。根据以下公式计算大脑的增水量: 大脑增水量 (%) = (湿质量 - 干质量) / 湿质量 × 100%。

**1.4.5 免疫荧光检测内皮细胞和周细胞之间的黏附情况** MCAO后24 h, 麻醉小鼠, 用生理盐水通过左心室冲洗血液后, 用4%多聚甲醛灌注固定; 随后取出全脑, 继续用4%多聚甲醛固定6~12 h并采用高糖溶液脱水; 使用组织包埋剂包埋后切片, 并用1%山羊血清封闭, CD31、CD13、actin一抗(均为1:1 000)分别孵育过夜后, 二抗(1:5 000)孵育, 封片后显微镜下观察。CD31标记血管内皮细胞, CD13标记周细胞。显微镜下观察CD31和CD13的标记情况以明确血管内皮细胞和周细胞之间的关系。

## 1.5 细胞实验方法

**1.5.1 HBMEC培养** HBMEC接种在100 mm培养皿(10<sup>6</sup>个/皿), 用含有10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素溶液的DMEM培养基在37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养。用1 mL胰蛋白酶消化细胞2~3 min, 300×g离心5 min, 之后传代到新的培养皿中, 消化后将细胞以300×g离心5 min, 去除上清液, 冷冻保存。

**1.5.2 OGD模型建立** 弃去HBMEC培养皿中的完全培养液, 更换平衡盐溶液, 置于37℃、85% N<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>+0.02%~0.2% O<sub>2</sub>密闭缺氧的培养箱中培养4 h; 改用DMEM培养基, 将细胞移入CO<sub>2</sub>培养箱中复氧(5% CO<sub>2</sub>+95%空气)24 h。

**1.5.3 细胞实验分组** 细胞实验分为空白对照组(Blank组)、OGD组和OGD+4-PBA组。Blank组正常培养不做任何干预; OGD组HBMEC培养后OGD处理4 h; OGD+4-PBA组HBMEC在OGD处理4 h后即刻加入内质网应激抑制剂4-PBA(10 mmol/L)。

**1.5.4 细胞活性和通透性检测** 使用CCK-8试剂测定细胞增殖。CCK-8溶液孵育细胞2 h后, 用多功能酶标仪在450 nm波长下测量吸光度值。采用Transwell实验检测细胞通透性。每个迁移小室内加入100 μL含1×10<sup>5</sup>个细胞的培养基, 下室加入600 μL培养基; 24 h后按照Sham组、OGD组和OGD+4-PBA组的要求分别对3组细胞进行处理, 之后每个迁移小室加入10 μL FITC-BSA(1 mg/mL), 继续培养

2 h。取100 μL下室中的培养基, 使用多功能酶标仪在495 nm的激发波长和525 nm的发射波长下测量荧光发射光谱。

**1.5.5 细胞内ROS水平测定** 活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平通过CM-H2DCFDA荧光探针测定。细胞以1×10<sup>4</sup>个/孔的密度接种在96孔板中。PBS洗涤后在37℃下用20 μmol/L CM-H2DCFDA孵育30 min, 使用多功能酶标仪在495 nm的激发波长和525 nm的发射波长下测量荧光发射光谱。

**1.5.6 细胞内钙离子水平测定** 按5×10<sup>5</sup>个/孔将细胞接种到6孔板。培养24~36 h, OGD处理4 h后再培养24 h, PBS洗涤2次, 加入Hank's平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)稀释的Fluo-3 AM工作液(1:200), 30℃孵育20 min; 弃工作液, HBSS洗涤2次充分去除残留的工作液, 加入HBSS在培养箱内继续孵育20 min, 激光共聚焦显微镜拍照并使用Image J软件分析荧光强度。

**1.5.7 蛋白质印迹法检测连接蛋白和内质网应激蛋白的表达水平** 收集细胞样本, 裂解后使用BCA测定样本中蛋白的浓度。根据目标蛋白分子量大小选择浓度合适的蛋白电泳凝胶, 进行蛋白电泳、转膜, 然后封闭1 h。分别使用CHOP(1:200)、Caspase-12(1:2 000)、GPR78(1:500)、ZO-1(1:1 000)、claudin-5(1:5 000)、Wnt7(1:1 000)、β-catenin(1:1 000)、actin(1:1 000)一抗孵育, 放入4℃摇床过夜; 二抗(1:5 000)孵育后显影, 用Bio-Rad Chemidoc XRS+成像系统记录, 使用Image J软件进行灰度分析计算蛋白的表达水平。

**1.5.8 ELISA检测HBMEC分泌PDGF-β的情况** 收集细胞后用冷PBS洗涤3次, 通过反复冻融裂解细胞标本后1 500×g离心10 min, 收集上清液。在空白对照孔、待测样品孔及标准品孔中均加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的PDGF-β抗体和底物液, 37℃避光放置3~5 min; 每孔加入50 μL终止液终止反应, 加终止液后20 min内使用酶标仪在450 nm波长测量各孔的吸光度值, 计算样品中PDGF-β含量。

## 1.6 统计学分析

用GraphPad Prism 8.3软件进行统计分析。定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。2组数据之间比较采用Tukey多重

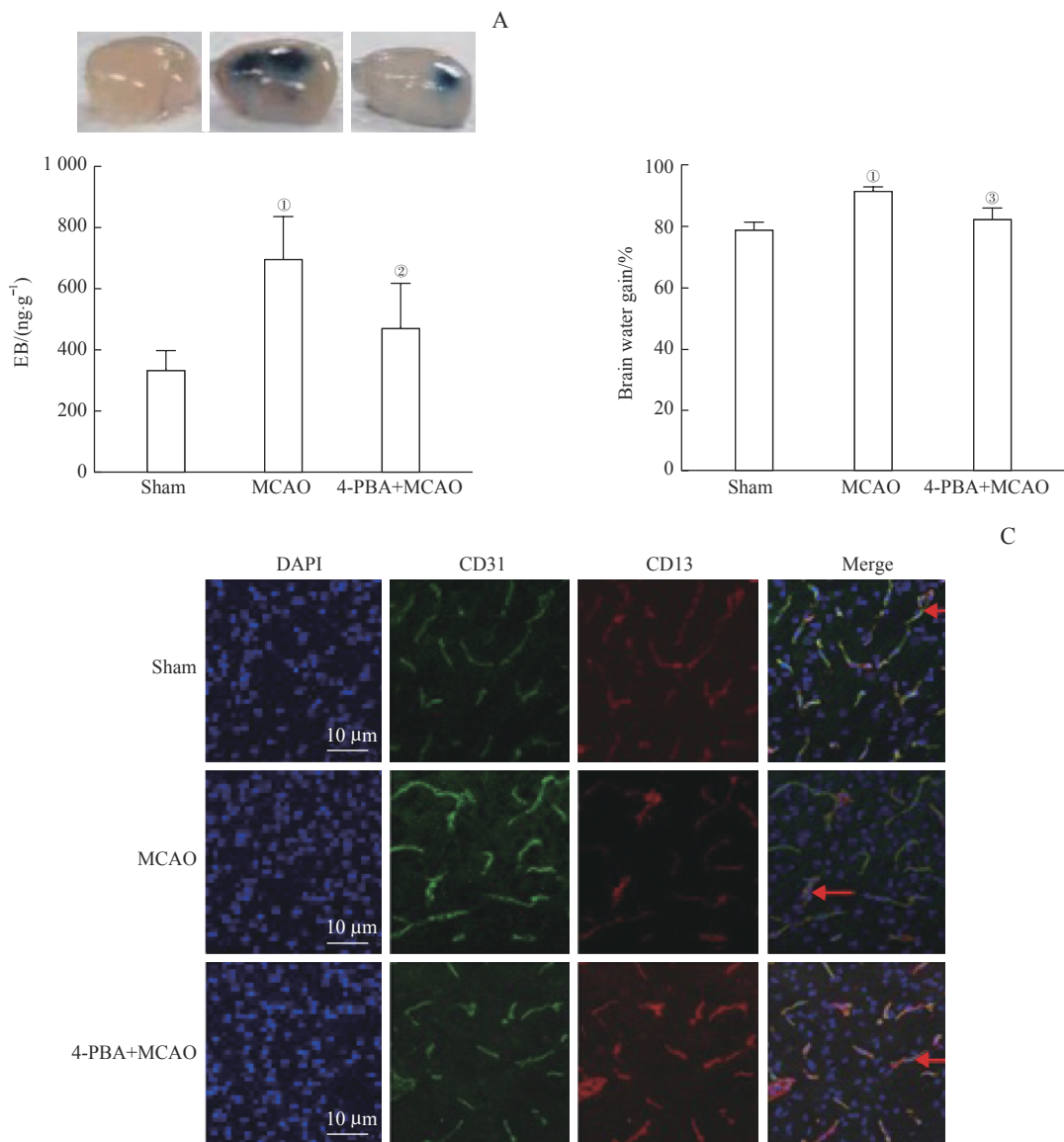
比较检验,3组数据之间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠脑卒中后阻断内质网应激可减轻BBB的损伤

与 Sham 组比较,小鼠 MCAO 24 h 后,脑缺血区 EB 渗出量明显增加 ( $P=0.000$ ),表明 BBB 通透性显著增加, BBB 功能被破坏 (图 1A)。同时发现,与 Sham 组比较,脑缺血后脑水含量明显增加 ( $P=0.000$ , 图 1B)。我们还关注了 BBB 关键结构脑

血管内皮细胞和周细胞之间的黏附状态。免疫荧光检测结果 (图 1C) 显示, MCAO 发生后脑血管内皮细胞和周细胞的标记蛋白 CD31 和 CD13 的重叠显著减少,表明周细胞从脑血管内皮细胞上脱离下来, BBB 的完整性被破坏。为了探讨内质网应激在 MCAO 破坏 BBB 功能中的作用,我们在脑缺血即刻向小鼠腹腔注射内质网应激抑制剂 4-PBA,发现 4-PBA+MCAO 组脑缺血区 EB 渗出量较 MCAO 组明显减少 ( $P=0.011$ , 图 1A),脑水肿程度也减轻 ( $P=0.000$ , 图 1B);并且 CD31 和 CD13 的重叠明显增加,提示脑血管内皮细胞和周细胞之间的黏附性提高 (图 1C)。以上结果证实了 MCAO 导致 BBB 功能



**Note:** A. EB exudation in the brain of mice. B. Water content of mice brain. C. Adhesion of cerebrovascular endothelial cells and pericytes in mice. Red arrows indicate overlap of CD31 and CD13. ① $P=0.000$ , compared with the Sham group; ② $P=0.011$ , ③ $P=0.000$ , compared with the MCAO group.

图1 小鼠脑卒中对BBB的损伤以及抑制内质网应激对该损伤的缓解

Fig 1 Injury of BBB after stroke in mice and the alleviating effect of endoplasmic reticulum stress inhibition on the injury

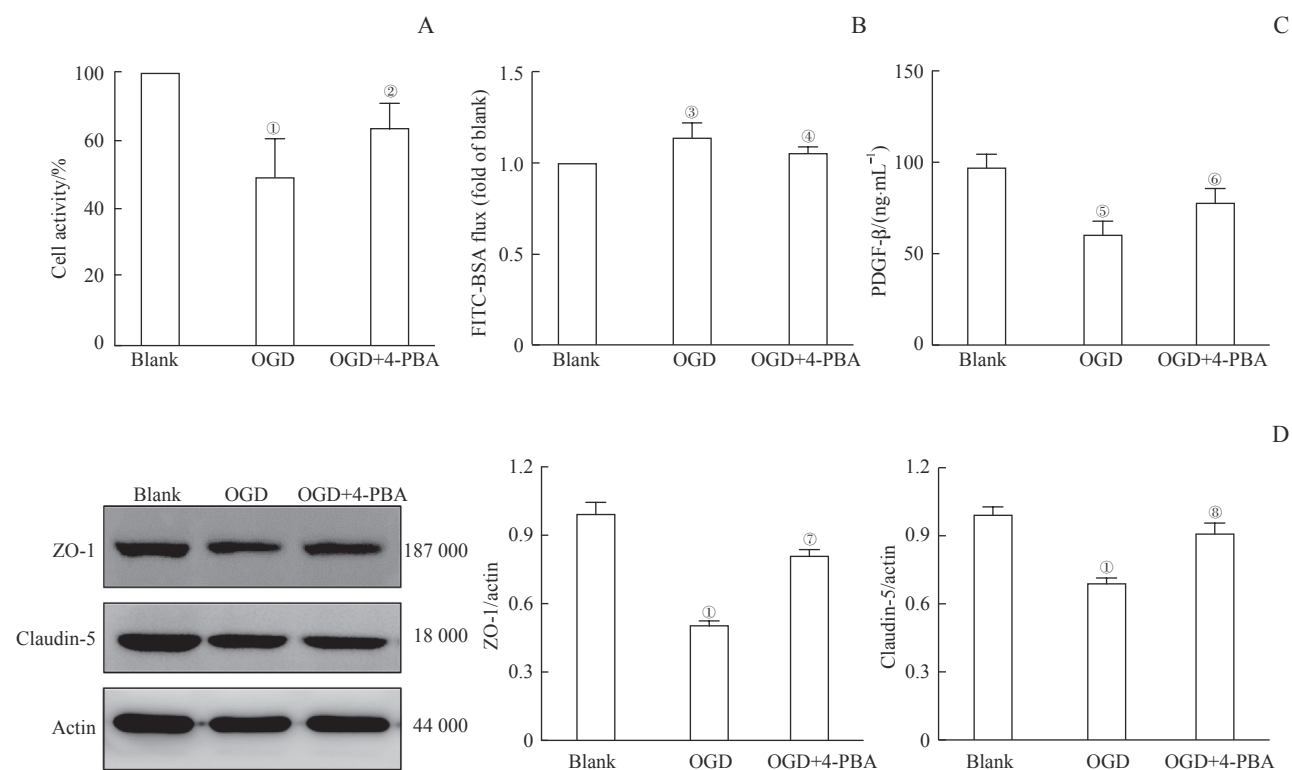
和结构明显受损,而阻断内质网应激可能可以有效减轻BBB的破坏程度。

## 2.2 抑制内质网应激可减轻OGD对HBMEC的损伤

为探讨缺血缺氧对脑血管内皮细胞的作用,我们构建HBMEC的OGD模型进行进一步研究。如图2A和2B所示,与Blank组比较,经过4 h的OGD处理并24 h的复氧后,CCK-8实验测定的细胞活力明显下降( $P=0.000$ ),并且HBMEC对FITC-BSA的透过率显著增加( $P=0.002$ )。内皮细胞分泌的PDGF- $\beta$ 是对周细胞产生黏附的主要因子。因此我们观察了HBMEC分泌的PDGF- $\beta$ 水平。ELISA结果(图2C)显示,OGD后HBMEC分泌PDGF- $\beta$ 的水平下降( $P=0.001$ ),提示血管内皮细胞的分泌功能也受损,对周细胞的黏附

功能削弱。蛋白质印迹法(Western blotting)检测结果(图2D)显示,OGD后HBMEC中的ZO-1和claudin-5的表达受到明显抑制( $P=0.000$ ),提示血管内皮细胞之间的紧密连接性降低。

HBMEC复氧即刻使用抑制剂4-PBA阻断内质网应激后,发现与OGD组比较,OGD+4-PBA组HBMEC的细胞活力明显提高,HBMEC对FITC-BSA的透过率得到改善(图2A、B)。4-PBA同样可以明显提高HBMEC分泌PDGF- $\beta$ 的水平(图2C),提示血管内皮细胞的PDGF- $\beta$ 分泌功能也得到改善,增强了对周细胞的黏附。4-PBA作用后ZO-1和claudin-5的表达水平明显增加(均 $P<0.05$ ,图2D),表明缓解内质网应激可以有效减轻OGD对脑血管内皮细胞的损伤,改善通透性,加强血管内皮细胞间的紧密度(图2)。



**Note:** A. Determination of activity of HBMECs by CCK-8 assay. B. The cell permeability of HBMECs analyzed with FITC-BSA leakage. C. Determination of the PDGF- $\beta$  secretion of HBMECs by ELISA. D. Determination of the expression of ZO-1 and claudin-5 in HBMECs by Western blotting. ① $P=0.000$ , ③ $P=0.002$ , ⑤ $P=0.001$ , compared with the Blank group; ② $P=0.026$ , ④ $P=0.005$ , ⑥ $P=0.042$ , ⑦ $P=0.000$ , ⑧ $P=0.001$ , compared with the OGD group.

图2 OGD引起的HBMEC损伤以及抑制内质网应激对该损伤的缓解作用

Fig 2 OGD-induced HBMEC damage and the alleviating effect of inhibiting endoplasmic reticulum stress on this injury

## 2.3 4-PBA可缓解OGD引起的HBMEC内质网应激爆发

为了探讨缺血缺氧对脑血管内皮细胞中内质网应激的影响,我们进一步检测OGD后的HBMEC

内质网应激情况。如图3A和3B所示,与Blank组比较,OGD组细胞内Ca<sup>2+</sup>水平明显增加,出现了钙超载,并且细胞的ROS水平也显著增加(均 $P<0.05$ );使用了4-PBA后细胞内Ca<sup>2+</sup>及ROS水平较

OGD 组明显下降 (均  $P<0.05$ )。Western blotting 测定 OGD 后 HBMEC 内质网应激相关蛋白的表达 (图 3C), 结果显示: 与 Blank 组比较, OGD 组内质网应激相关蛋白 CHOP、Caspase-12 和 GPR78 的表达水平显著增加 (均  $P<0.05$ ); 加入了 4-PBA 之

后各蛋白的表达水平均较 OGD 组明显下降 (均  $P<0.05$ )。以上结果提示, HBMEC 的 OGD 模型中内质网应激爆发, 4-PBA 可阻断 OGD 条件下的内质网应激爆发。

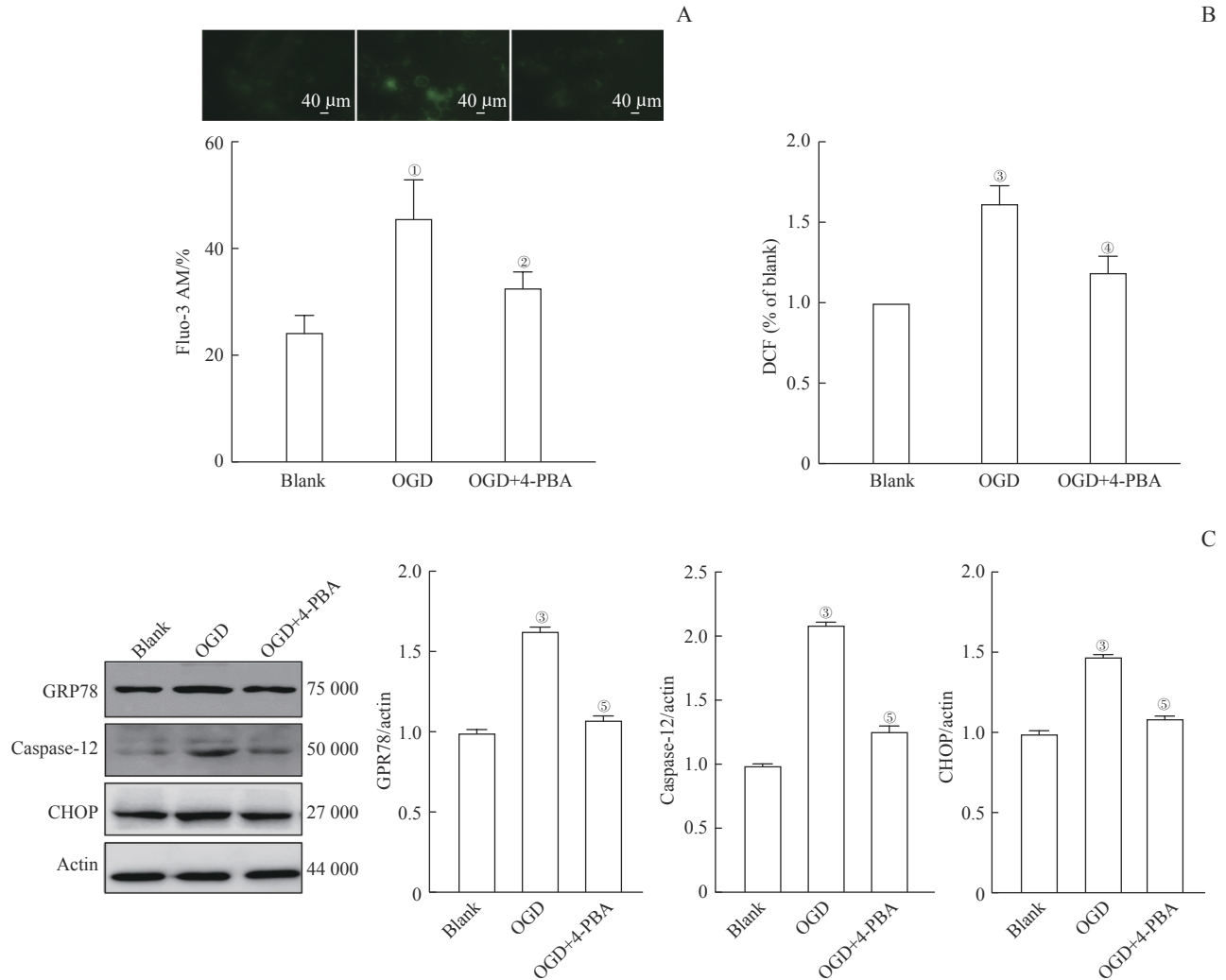


图3 OGD 以及 4-PBA 处理对 HBMEC 内质网应激的影响

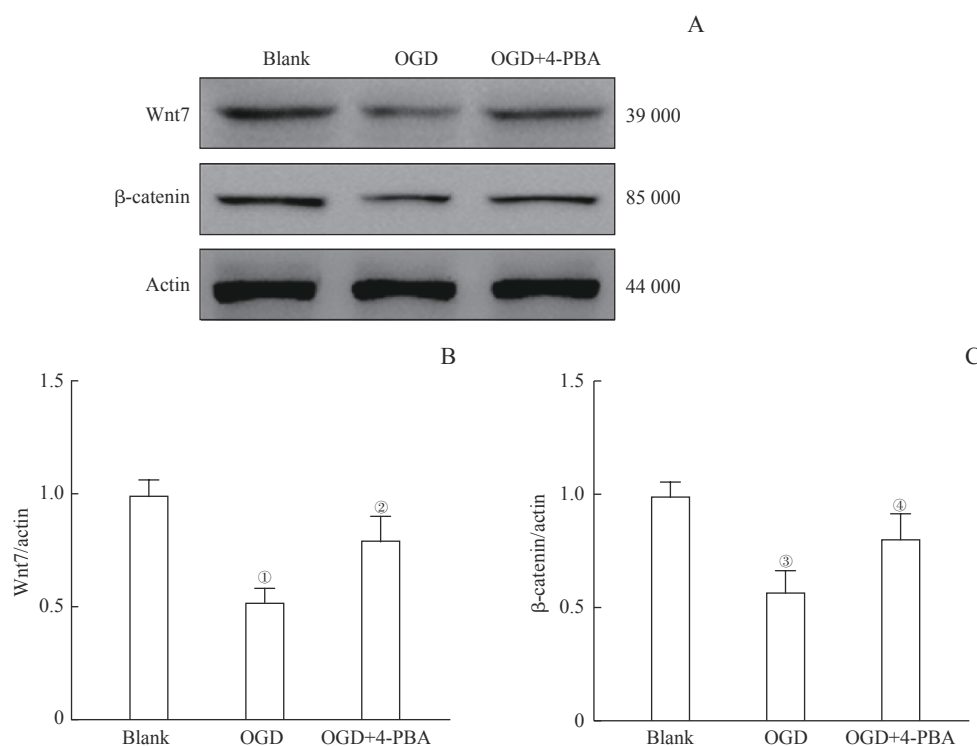
Fig 3 Effects of OGD and 4-PBA treatment on HBMEC endoplasmic reticulum stress

#### 2.4 OGD 后 HBMEC 的内质网应激造成 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号失活

为了探讨内质网应激损伤脑血管内皮细胞的机制, 我们观察 HBMEC 在 OGD 后 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号通路的变化。Western blotting 测定 Wnt7 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达水平 (图 4), 结果显示, 与 Blank 组比较, OGD 组内皮细胞在缺氧缺氧 4 h 后 Wnt7 和

$\beta$ -catenin 的表达水平明显下调 (均  $P<0.05$ ), 提示 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号通路被抑制。为阐明内质网应激是否可以对 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号通路发挥调控作用, HBMEC 复氧后采用抑制剂 4-PBA 阻断内质网应激, 结果发现 OGD+4-PBA 组中 Wnt7 和  $\beta$ -catenin 的表达水平较 OGD 组上调 (均  $P<0.05$ ), 提示 4-PBA 处理后 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号的活性明显恢复。





**Note:** A. Wnt7 and  $\beta$ -catenin protein expression bands. B. Analysis of Wnt7 protein expression in HBMECs. C. Analysis of  $\beta$ -catenin protein expression in HBMECs. ① $P=0.000$ , ③ $P=0.002$ , compared with the Blank group; ② $P=0.000$ , ④ $P=0.023$ , compared with the OGD group.

**图4** 抑制内质网应激对 OGD 后 HBMEC 内 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号的影响

**Fig 4** Effect of inhibiting endoplasmic reticulum stress on Wnt7/ $\beta$ -catenin signaling in HBMECs after OGD

### 3 讨论

流行病学调查<sup>[18]</sup>显示,在我国脑卒中和缺血性心脏病是死亡和残疾的两大主要原因。BBB 的破坏在治疗导致的继发性脑出血中发挥重要作用。脑卒中 24 h 时 BBB 的破坏程度达到了高峰<sup>[17]</sup>。磁共振成像 (MRI) 显示, BBB 的破坏程度与脑卒中急性期血管内治疗后颅内出血的风险和严重程度有关<sup>[19]</sup>。近年来,相关的临床证据越来越多,但目前针对脑卒中造成 BBB 功能脆弱的机制还有待进一步阐明。本研究在小鼠 MCAO 模型中观察到脑卒中后 BBB 被破坏,通透性显著增加,并伴随着脑水肿的出现。通过免疫荧光双标记技术观察脑血管内皮细胞和周细胞之间的黏附关系,发现脑卒中 24 h 后脑血管内皮细胞和周细胞之间出现了明显的剥离,推测两者之间黏附性降低造成的结构性破坏是导致 BBB 功能障碍的基础。我们还采用腹腔注射内质网应激抑制剂 4-PBA 探讨内质网应激在 BBB 破坏中的作用,发现 4-PBA 能有效减轻 EB 从脑血管中渗出,降低脑水肿的程度,并能有效改善脑血管内皮细胞和周细胞的紧密度,证实了脑卒中诱发的内质网应激确实在 BBB 损伤和功能障碍中

起到了关键作用。课题组前期的研究<sup>[9]</sup>也证实了在大鼠脑卒中后采用 4-PBA 抑制内质网应激,减轻了 BBB 的损伤,改善脑卒中的预后。

FRANCIS 等<sup>[11]</sup>的研究表明脑血管内皮细胞在脑卒中后出现损伤,紧密连接被破坏,细胞通透性增加,并且脑血管内皮细胞和周细胞覆盖度的减少可直接导致脑血管结构破坏和通透性增加。我们在 OGD 模型中也证实缺血缺氧 4 h 后 HBMEC 出现明显的活力下降和细胞损伤,细胞通透性遭到破坏,并且细胞表达的紧密连接蛋白 ZO-1 和 claudin-5 的水平也受到抑制,表明细胞的屏障功能受损。PDGF- $\beta$ 作为一种细胞表面黏附分子,可特异性识别表达于周细胞上的血小板衍生生长因子受体  $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ , PDGFR- $\beta$ ),将周细胞募集在内皮细胞周围<sup>[20]</sup>。文献<sup>[16]</sup>显示在内皮细胞和周细胞之间众多交互影响的因子中,PDGF 在脑卒中后内皮细胞对周细胞的调控起到了关键的作用。OGD 后 HBMEC 分泌的 PDGF- $\beta$  水平明显下降。结合小鼠 OGD 模型的结果,推测脑卒中后脑血管内皮细胞分泌 PDGF- $\beta$  减少,可导致脑血管内皮细胞对周细胞吸附功能削弱,使得周细胞由内皮细胞上脱离,启动了



脑卒中早期 BBB 的破坏。

研究<sup>[21]</sup>表明内质网应激爆发会加重 BBB 的破坏。OGD 条件下 HBMEC 中内质网应激相关蛋白 CHOP、Caspase-12、GPR78 表达水平均显著增加,钙离子水平明显增高,ROS 水平也升高,表明 OGD 确实诱发了 HBMEC 的内质网应激。在 OGD 处理后加入内质网应激抑制剂 4-PBA,HBMEC 的损伤程度明显减轻。因此,我们认为 OGD 诱发的内质网应激爆发导致 HBMEC 损伤是引起 BBB 破坏的原因之一。

近年来,Wnt 信号通路已被证明在维持脑血管和神经细胞功能方面发挥重要的调节作用。在神经系统中 Wnt7 能调节 BBB 的形成并维持其通透性。研究<sup>[22]</sup>表明,脑血管内皮细胞 Wnt7 蛋白的表达减少会导致内皮细胞通透性增加,且内皮细胞中  $\beta$ -catenin 的存在也非常重要,其通过与其他基因的相互作用来维持 BBB 的完整性。以往有研究<sup>[23]</sup>探索了 Wnt/ $\beta$ -catenin 在脑卒中后 BBB 功能维护中的作用。本研究同样发现 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号通路在 OGD 后的内皮细胞中被抑制,Wnt7 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达水平显著下降。有研究<sup>[24]</sup>发现缺氧导致的内质网应激和 Wnt 通路之间存在密切关系:低氧诱导内质网应激,并下调 Wnt 受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (low-density lipoprotein receptor related protein 6, LRP6) 以及  $\beta$ -catenin 的表达来抑制 Wnt 下游信号。我们在小鼠体内和 HBMEC 体外实验中均证实,脑缺血缺氧导致的脑血管内皮细胞内质网应激爆发,可能是内皮细胞损伤和 BBB 功能障碍的重要机制。基于 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号通路在病理生理状态下对 BBB 和脑血管内皮细胞的重要作用,我们在 HBMEC 中用抑制剂 4-PBA 阻断 OGD 后的内质网应激;研究结果显示内皮细胞 Wnt7 和  $\beta$ -catenin 的蛋白表达水平均显著提高,

表明减轻内质网应激可以促进 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号通路的活化。

综上所述,本研究阐明了内质网应激导致脑血管内皮细胞的损伤可能是脑卒中 BBB 功能紊乱的关键,其中 Wnt7/ $\beta$ -catenin 信号通路的抑制是内质网应激损伤作用的机制之一。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

本研究作者均声明不存在利益冲突。  
All authors declare no conflict of interest.

#### 伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究所涉及的动物实验伦理已通过上海交通大学医学院附属仁济医院实验动物饲养管理与使用委员会批准(文件号:RJ-2017-10-10)。本研究涉及的所有动物实验均遵照上海交通大学医学院附属仁济医院实验动物饲养管理与使用委员会制定的实验动物标准操作规程进行。

Ethical approval for this study was provided by the Animal Care and Use Committee of Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Permit Number: RJ-2017-10-10). All animal experiments were carried out by following the guidelines of the Animal Care and Use Committee, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

王震虹负责课题指导;董海平、谢海怡、马晓晓参与了实验设计;董海平、谢海怡参与了实验操作;谢海怡、马晓晓参与了数据分析、论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was instructed by WANG Zhenhong, and designed by DONG Haiping, XIE Haiyi and MA Xiaoxiao. Experimental operation was conducted by DONG Haiping and XIE Haiyi. The data was analyzed by XIE Haiyi and MA Xiaoxiao. The manuscript was drafted and revised by XIE Haiyi and MA Xiaoxiao. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-01-29
- Accepted: 2023-04-20
- Published online: 2023-07-28

#### 参·考·文·献

- [1] GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *Lancet*, 2017, 390(10100): 1151-1210.
- [2] FANG Z Y, ZHANG Y Y, ZHAO X X, et al. The role of PKC and HIF-1 and the effect of traditional Chinese medicinal compounds on cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 1835898.
- [3] HARRIS W J, ASSELIN M C, HINZ R, et al. *In vivo* methods for imaging blood-brain barrier function and dysfunction[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2023, 50(4): 1051-1083.
- [4] FETSKO A R, SEBO D J, TAYLOR M R. Brain endothelial cells acquire blood-brain barrier properties in the absence of Vegf-dependent CNS angiogenesis[J]. *Dev Biol*, 2023, 494: 46-59.
- [5] MAO H, CHEN W, CHEN L, et al. Potential role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane proteins in diseases[J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 199: 115011.
- [6] QIU J, WANG X, WU F, et al. Low dose of apelin-36 attenuates ER stress-associated apoptosis in rats with ischemic stroke[J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 556.
- [7] SHI Y Y, LIU Y, WANG S J, et al. Endoplasmic reticulum-targeted inhibition of CYP2E1 with vitamin E nanoemulsions alleviates hepatocyte oxidative stress and reverses alcoholic liver disease[J]. *Biomaterials*, 2022, 288: 121720.



- [8] CANTONI O, ZITO E, FIORANI M, et al. Arsenite impinges on endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk to elicit mitochondrial ROS formation and downstream toxicity[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 76: 132-138.
- [9] Xin J H, Ma X X, Chen W Y, et al. Regulation of blood-brain barrier permeability by salvinorin A *via* alleviating endoplasmic reticulum stress in brain endothelial cell after ischemia stroke[J]. *Neurochem Int*, 2021, 149: 105093.
- [10] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [11] FRANCIS K R, TON A N, XIN Y, et al. Modeling Smith-Lemli-Opitz syndrome with induced pluripotent stem cells reveals a causal role for Wnt/ $\beta$ -catenin defects in neuronal cholesterol synthesis phenotypes[J]. *Nat Med*, 2016, 22(4): 388-396.
- [12] MO Z Z, ZENG Z Y, LIU Y X, et al. Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway as a promising therapeutic candidate for cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 914537.
- [13] CHO C, WANG Y S, SMALLWOOD P M, et al. Molecular determinants in Frizzled, Reck, and Wnt7a for ligand-specific signaling in neurovascular development[J]. *eLife*, 2019, 8: e47300.
- [14] HÜBNER K, CABOCHETTE P, DIÉGUEZ-HURTADO R, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates VE-cadherin-mediated anastomosis of brain capillaries by counteracting S1pr1 signaling[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4860.
- [15] COSTA R, PERUZZO R, BACHMANN M, et al. Impaired mitochondrial ATP production downregulates Wnt signaling *via* ER stress induction[J]. *Cell Rep*, 2019, 28(8): 1949-1960. e6.
- [16] NAN J N, HU X G, GUO B B, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates triple-negative breast cancer cell viability, migration, and invasion by Syntenin/SOX4/Wnt/ $\beta$ -catenin pathway *via* regulation of heat shock protein A4[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10564-10577.
- [17] SHI Z S, DUCKWILER G R, JAHAN R, et al. Early blood-brain barrier disruption after mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke[J]. *J Neuroimaging*, 2018, 28(3): 283-288.
- [18] LI Y P, YIN L, SHEN Y, et al. Distribution of risk factors differs from coronary heart disease and stroke in China: a national population survey[J]. *BMJ Open*, 2022, 12(11): e065970.
- [19] NG F C, CHURILLOV L, YASSI N, et al. Microvascular dysfunction in blood-brain barrier disruption and hypoperfusion within the infarct posttreatment are associated with cerebral edema[J]. *Stroke*, 2022, 53(5): 1597-1605.
- [20] CHENG S L, SHAO J S, BEHRMANN A, et al. Dkk1 and MSX2-Wnt7b signaling reciprocally regulate the endothelial-mesenchymal transition in aortic endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1679-1689.
- [21] DĄBROWSKA-BOUTA B, SULKOWSKI G, GEWARTOWSKA M, et al. Endoplasmic reticulum stress underlies nanosilver-induced neurotoxicity in immature rat brain[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13013.
- [22] BOYÉ K, GERALDO L H, FURTADO J, et al. Endothelial Unc5B controls blood-brain barrier integrity[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1169.
- [23] SONG D P, JI Y B, HUANG X W, et al. Lithium attenuates blood-brain barrier damage and brain edema following intracerebral hemorrhage *via* an endothelial Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-dependent mechanism in mice[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(6): 862-872.
- [24] XIA Z X, WU S Y, WEI X, et al. Hypoxic ER stress suppresses  $\beta$ -catenin expression and promotes cooperation between the transcription factors XBP1 and HIF1 $\alpha$  for cell survival[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(37): 13811-13821.

[本文编辑] 崔黎明