

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2019) 04 - 0307 - 04

脓毒症大鼠基质金属蛋白酶表达与血脑屏障通透性改变的关系

杨 光, 鲁卫华, 曹迎亚, 祁羽鹏

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 重症医学科, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 探讨基质金属蛋白酶-9(MMP-9) 在脓毒症相关性脑病(SAE) 发病机制中的作用。方法: 通过盲肠结扎穿孔(CLP) 制作脓毒症大鼠模型, 取健康雄性 SD 大鼠 72 只, 随机分为对照组(C) 、CLP 24 h 模型组(CLP24 h) 、CLP48 h 模型组(CLP48 h) 和 CLP 72 h 模型组(CLP72 h) , 每组 18 只。每组随机取 6 只大鼠用于伊文思蓝渗透法分析血脑屏障通透性变化, 6 只大鼠用于 ELISA 检测血清 TNF- α 和 Western blot 检测脑皮质紧密连接蛋白 Occludin。另外 6 只用于免疫组化检测皮质区 MMP-9 表达。结果: 与 C 组比较, TNF- α 、血脑屏障通透性在造模后 24 h 升高($P < 0.05$) , 72 h 达到最高; 与 C 组比较, MMP-9 在造模后 72 h 表达增高, Occludin 在造模后 72 h 表达下降($P < 0.05$) 。结论: 脓毒症晚期脑 MMP-9 表达增多, Occludin 表达下降, 血脑屏障通透性改变可能是 SAE 的发病机制。

【关键词】脓毒症相关性脑病; 基质金属蛋白酶; 血脑屏障

【中图分类号】R-332; R 459. 7 **【文献标志码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2019. 04. 001

Matrix metalloproteinases expression and permeability of blood-brain barrier in septic rats

YANG Guang, LU Weihua, CAO Yingya, QI Yupeng

Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To investigate the role of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in the pathogenesis of sepsis-associated encephalopathy. **Methods:** Seventy-two healthy SD rats were used to develop sepsis models by cecal ligation-puncture(CLP) procedure, and then randomized into control group(C) , CLP 24 h model group(CLP24 h) , CLP48 h model group(CLP48 h) and CLP 72 h model group(CLP72 h) ($n = 18$ in each group) , from which 6 rats in each group were randomly selected to undergo examination of the blood-brain barrier permeability using Evans blue infiltration technique. Six rats were used for measurement of the serum TNF- α using ELISA and cerebral cortex tight junctions protein occludin using Western blot, and another 6 rats were used for detecting MMP-9 expression in the cortex using immunohistochemistry. **Results:** TNF- α and blood-brain barrier permeability were increased at 24 h after model establishment($P < 0.05$) and peaked the highest at 72 h as well as up-regulated MMP-9 expression, yet decreased occludin expression at 72 h after model establishment compared to control group(all $P < 0.05$) . **Conclusion:** Increased MMP-9 expression and decreased occludin level were seen in rats in the advanced stage of sepsis, suggesting that blood-brain barrier permeability may be the pathogenesis of sepsis associated encephalopathy.

【Key words】sepsis associated encephalopathy; matrix metalloproteinases; blood-brain barrier

脓毒症相关性脑病(sepsis associated encephalopathy, SAE) 是由脓毒症或全身炎症反应综合征所导致的弥漫性脑功能障碍, 一般缺乏中枢神经系统感染的临床或实验室证据, 同时需要排除肝性脑病、肾性脑病和肺性脑病等代谢性脑病; 通常以谵妄、认知及行为功能障碍等为表现, SAE 是 ICU 常见的神经功能障碍性疾病。SAE 发病机制至今尚未完全阐明, 目前认为血脑屏障(blood-brain barrier, BBB) 损伤、氨基酸的改变和神经递质的改变、线粒体功能障碍和神经细胞凋亡等可能与 SAE 发病有关^[1]。基

质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs) 是一种锌依赖的蛋白水解酶, MMPs 受多层次调控, 以酶原形式存在, 激活过程中受丝氨酸蛋白酶或纤维蛋白酶的介导, 也可自主催化激活。生理状态下 MMPs 参与组织发育、转录水平调控、伤口愈合、酶原的激活及血管生成等; 病理情况下 MMPs 作为脑组织重要的蛋白水解酶, 可降解紧密连接蛋白和血管基底膜, 导致血脑屏障结构破坏, 增加血脑屏障通透性。在脑创伤、脑缺血和脑出血动物模型上发现 MMPs 表达升高和紧密连接蛋白降低, 但关于脓毒

基金项目: 安徽省科技计划公益性技术应用研究联动计划项目(16040804043) ; 安徽省学术和技术带头人后备人选科研活动经费资助项目(2017H145)

收稿日期: 2018-12-29

作者简介: 杨 光(1992-) , 男, 2016 级硕士研究生, (电话) 18355318101, (电子信箱) yangguang199009@163. com;

鲁卫华, 男, 主任医师, 硕士生导师, (电子信箱) lwh683@126. com, 通信作者。

症大鼠 MMPs 的研究报道甚少^[2-3]。本研究通过盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP) 制作脓毒症大鼠模型,探讨 MMP-9 在脓毒症大鼠皮质区域血脑屏障通透性改变的作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 TNF-α ELISA 试剂盒(批号: 02/2018) 购于上海酶联生物公司, MMP-9、Occludin 和 β-actin 抗体(批号: 10375-2, 13409-1, 10904-1) 均购于武汉三鹰生物技术公司。

1.2 实验动物与分组 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 72 只, 体质量 200 ~ 260 g(南京市青龙山动物繁殖场)。按随机数字表随机分为 4 组: 对照组(C)、CLP 24 h 模型组(CLP24 h)、CLP 48 h 模型组(CLP48 h)、CLP 72 h 模型组(CLP72 h), 每组 18 只。每组随机取 6 只用于检测血脑屏障通透性, 6 只用于 ELISA 和 Western blot 检测, 6 只用于免疫组化检测。

1.3 模型制备 本研究通过 CLP 制作脓毒症大鼠模型, 各组大鼠术前禁食 12 h, 用 10% 水合氯醛, 按 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉。腹中线做长约 1.5 cm 切口, 暴露盲肠后, 在盲肠末端 1/3 处结扎, 使用 22 号针头贯穿末端盲肠两次, 并轻轻挤压少许肠内容物, 后逐层缝合关闭腹腔, 术后大鼠予以皮下注射 30 mL/kg 生理盐水并自由进水进食, 空白对照组不进行任何处理。

1.4 炎症因子测定 C 组大鼠腹主动脉取血后处死大鼠, CLP 24 h 组、48 h 组和 72 h 组分别在 CLP 术后 24 h、48 h 和 72 h 腹主动脉取血后处死大鼠, 分离血清后据 ELISA 检测试剂盒说明书, 测定血清 TNF-α 含量。

1.5 免疫组化检测 各组大鼠腹主动脉取血后迅速断头取脑, 切除小脑, 4% 多聚甲醛固定液 4℃ 固定 2 d, 石蜡包埋, 蜡块做连续切片, 贴片于防脱载玻片上, 烤片 5 h 后, 将组织切片脱蜡, 用中性树脂封片, 光学显微镜下观察 MMP-9 在皮质区域的表达。

1.6 Western blot 检测 各组大鼠腹主动脉取血后迅速断头取脑, 切除小脑, 冰上分离皮质海马。无菌小剪刀将皮质剪碎, 加入适量 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min 后, 4℃ 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度的测定。然后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗孵育 4℃ 过夜, 洗膜, 室温下与相应二抗孵育 1 h, 加入 ECL 显影剂曝光。使用 Image J 软件对

曝光条带进行灰度值分析。

1.7 BBB 通透性的测定 伊文思蓝(Evans blue, EB) 渗透法分析 BBB 通透性变化^[4], 大鼠处死 1.5 h 前 2% EB 按 3 mL/kg 股静脉注射, 1.5 h 后打开胸腔, 心内灌注生理盐水至右心耳流出无色液体时停止, 立即断头取脑, 每 100 mg 脑皮质加入 1 mL 甲酰胺溶液, 60℃ 避光水浴 24 h, 离心后取上清在酶标仪上(620 nm) 进行比色, 同时制作标准曲线。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 TNF-α 含量及血脑屏障通透性变化的比较 脓毒症可导致炎症因子增高和血脑屏障通透性增加, 与 C 组比较, TNF-α、血脑屏障通透性在造模后 24 h 升高(P < 0.05), 72 h 达到最高。见表 1。

表 1 四组大鼠血清 TNF-α 含量及脑 EB 含量的比较(n = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α/(ng/L)	EB/(μg/g)
C	151.18 ± 12.63	0.41 ± 0.10
CLP24 h	173.56 ± 7.71 ^a	0.63 ± 0.08 ^a
CLP48 h	204.88 ± 22.08 ^{ab}	1.77 ± 0.39 ^{ab}
CLP72 h	221.79 ± 10.87 ^{ab}	2.33 ± 0.65 ^{ab}
F	29.015	34.137
P	0.000	0.000

注: 与 C 组比较 ^a P < 0.05; 与 CLP24 h 组比较 ^b P < 0.05。

2.2 各组大鼠脑皮质 MMP-9 表达变化 免疫组化染色结果显示, 脓毒症可引起 MMP-9 阳性染色增强, 但在造模后 24、48 h 无明显增强, 造模后 72 h 增强明显。如图 1 所示。

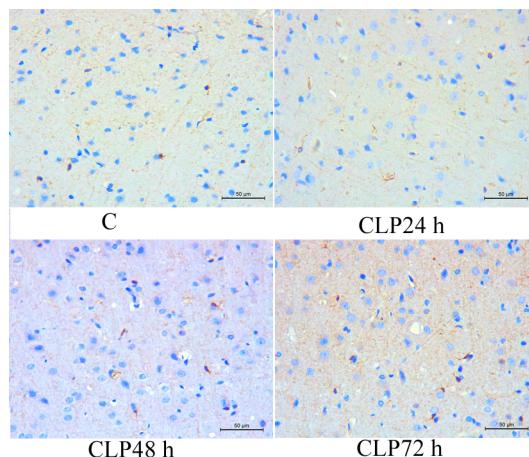


图1 各组大鼠脑皮质 MMP-9 表达(×100)

2.3 各组大鼠脑皮质 Occludin 表达变化 结果显示(如图2) ,与C组比较 ,Occludin 在造模后 24 h、48 h 表达降低不明显 ,但在 72 h 表达下降($P < 0.05$) 。如表 2 所示。

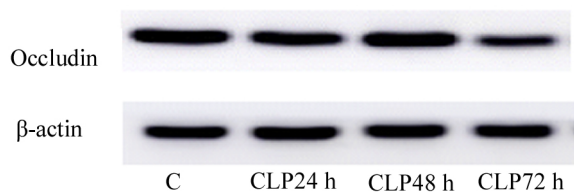


图2 Western blot 检测 Occludin 表达

表2 四组大鼠脑皮质 Occludin/β-actin 比较($n=3 \bar{x} \pm s$)

组别	Occludin/β-actin
C	1.33 ± 0.09
CLP24 h	1.17 ± 0.03
CLP48 h	1.13 ± 0.11
CLP72 h	0.93 ± 0.04 ^a
<i>F</i>	14.308
<i>P</i>	0.001

注: 与 C 组比较 ^a $P < 0.05$ 。

3 讨论

SAE 发病机制尚未明确 ,BBB 受损可能是 SAE 发病的重要机制之一^[5] ,BBB 是由脑内的血管内皮细胞通过各种连接蛋白彼此紧密相连 ,并与周细胞和星形胶质细胞相互作用形成的特殊屏障系统 ,BBB 严格限制血液中的神经毒性物质、炎症因子、免疫细胞等进入中枢神经系统 ,进而维持大脑微环境的稳态 ,保证神经系统功能的正常发挥^[3]。

Michels 等^[4] 研究发现脓毒症大鼠海马区域 BBB 通透性增加 ,并且脓毒症大鼠出现认知功能改变。由于血脑屏障的通透性增加 ,各类炎症因子、细胞因子和假性神经递质可较易进入脑实质 ,进而影响脑组织的循环灌注 ,物质代谢 ,信号传递等过程 ,从而加重 SAE^[6-7]。

脓毒症不同时期 BBB 破坏的机制尚未明确 ,本研究通过脓毒症大鼠模型发现脓毒症大鼠脑皮质区 MMP-9 表达增加 ,与空白对照组比较 ,MMP-9 在造模后 24 h、48 h 表达增加不明显 ,但在 72 h 表达明显增高。同时在造模后 72 h 紧密连接蛋白 Occludin 表达降低最为明显 ,BBB 通透性最高 ,从而提示 MMP-9 可能与脓毒症晚期皮质区域 BBB 通透性改变有关。

Higashida T 等^[8] 发现脑创伤大鼠模型建立 24

h 后即出现 MMP-9 表达增加 ,紧密连接蛋白 Occludin 及 ZO-1 表达降低 ,血脑屏障破坏及脑组织水肿 ,使用米诺环素治疗脑创伤大鼠后 ,MMP-9 表达降低 ,同时紧密连接蛋白 Occludin 及 ZO-1 表达增高 ,血脑屏障破坏及脑组织水肿减轻 ,从而提示 MMP-9 可能与早期脑创伤大鼠血脑屏障的破坏有关。本研究中脓毒症大鼠造模 24 h、48 h 后 MMP-9 表达增加不明显 ,但在 72 h 表达明显增高 ,同时 BBB 破坏最严重。可能是由于 SAE 继发于脓毒症或全身炎症反应综合征 ,待炎症反应达到一定程度后引起 MMP-9 表达明显增高。

本研究中随着造模时间的延长 ,血清中 TNF-α 含量逐渐增高 ,与空白对照组比较 ,在造模后 24 h 差异即具有统计学意义 ;同时随着造模时间的延长 ,脓毒症大鼠少动、动作迟缓及团缩等表现逐渐明显。TNF-α 被认为是脓毒症时最重要的炎症介质 ,TNF-α 可诱导中性粒细胞浸润脑组织、中性粒细胞凋亡和脑水肿的发生 ,同时也影响中枢神经系统介质多巴胺、去甲肾上腺素及血清素的神经传递功能 ,引起认知功能减退^[9]。此外 ,Tsuge M 等^[10] 发现增加血清中 TNF-α 含量能够激活脑组织中 MMP-9 ,进而增加 BBB 通透性。

综上所述 ,脓毒症时 MMP-9 表达增多 ,紧密连接蛋白减少 ,可能是 SAE 的发病机制之一 ,不同时期 BBB 通透性破坏的机制目前尚不十分清楚 ,有待进一步的研究。

【参考文献】

[1] DENG S ,AI Y ,GONG H *et al.* Neuroglobin protects rats from sepsis-associated encephalopathy via a pi3k/akt/bax-dependent mechanism [J]. *J Mol Neurosci* 2017 ,63(1) : 1 - 8.

[2] YANG Y ,SALAYANDIA VM ,THOMPSON JF *et al.* Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood-brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery [J]. *J Neuroinflammation* 2015 ,12: 26.

[3] OBERMEIER B ,DANEMAN R ,RANSOHOFF R M. Development ,maintenance and disruption of the blood-brain barrier [J]. *Nat Med* 2013 ,19(12) : 1584 - 1596.

[4] MICHELS M ,VIEIRA AS ,VUOLO F *et al.* The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment [J]. *Brain Behav Immun* 2015 ,43: 54 - 59.

[5] ANDONEGUI G ,ZELINSKI EL ,SCHUBERT CL *et al.* Targeting inflammatory monocytes in sepsis-associated encephalopathy and long-term cognitive impairment [J]. *JCI Insight* ,2018 ,3(9) : e99364.

[6] 王雪飞 ,周坤鹏 ,岳源 ,等. BDNF 对脓毒症相关性脑病大鼠学习记忆功能的改善作用 [J]. 皖南医学院学报 ,2017 ,36(4) : 311 - 313 ,321.

FOXO4 和 nNOS 在星型胶质细胞瘤中的表达及意义

齐 敏¹ 刘溪林² 赵 健³ 吴 锋³ 孙乐安² 郑兰荣⁴

(皖南医学院 1. 人体解剖学实验实训中心; 2. 研究生学院; 3. 人体解剖学教研室; 4. 病理解剖学教研室, 安徽 芜湖 241002)

【摘 要】目的: 观察转录因子叉头框蛋白 O4(FOXO4) 和神经型一氧化氮合酶(nNOS) 在星型胶质细胞瘤中的表达, 探讨星型胶质细胞瘤恶性程度发生发展的机制, 进而寻找可能的药物治疗靶点。方法: 从弋矶山医院病理科调取星形胶质细胞瘤 27 例蜡块标本。运用双盲法进行免疫组织化学和免疫荧光染色, 检测各例星型胶质细胞瘤组织中 FOXO4、nNOS 的表达。结果: FOXO4 在 I ~ IV 级星形胶质细胞瘤组织中的阳性表达, 随着肿瘤级别的升高而逐渐降低($P < 0.05$)。而随着星形胶质细胞瘤级别升高, nNOS 的阳性表达也越来越高($P < 0.05$)。结论: FOXO4 阳性表达的减少, nNOS 阳性表达的增强, 可能与星形胶质细胞瘤恶性程度发生发展有关; 调控 FOXO4、nNOS 的异常表达可能是新的治疗药物靶点之一。

【关键词】星型胶质细胞瘤; 转录因子叉头框蛋白 O4; 神经型一氧化氮合酶; 胶质瘤

【中图分类号】R 739. 4; R 361. 3 **【文献标志码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2019. 04. 002

Expression and significance of FOXO4 and nNOS in astroglioma

QI Min, LIU Xilin, ZHAO Jian, WU Feng, SUN Lean, ZHENG Lanrong

Anatomy Experimental Center, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe the expression of forkhead transcription factor 4(FOXO4) and neuronal nitric oxide synthase(nNOS) in astroglioma and investigate the mechanism of malignant degree of astrocytoma for potential target in following drug therapy. **Methods:** Twenty-seven wax specimens of astroglioma were obtained from the pathology department of the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College. Immunohistochemistry and immunofluorescence were performed using double-blind method to detect the expression of FOXO4 and nNOS in astroglioma tissues. **Results:** FOXO4 was positively expressed in astroglioma of grade I - IV and gradually down-regulated with increase of tumor grade($P < 0.05$). Contrarily, positive expression of nNOS tended to be higher with increased grade of astrocytoma($P < 0.05$). **Conclusion:** Decreased positive FOXO4 expression, yet increased positive nNOS expression may be related to malignant degree of astrocytoma. Regulating abnormal expression of FOXO4 and nNOS might be one of the new therapeutic targets.

【Key words】 astroglioma; FOXO4; nNOS; glioma

星型胶质细胞瘤在胶质瘤(Glioma) 中占绝大多数, 具有高侵袭性、高致死率特点^[1]。传统治疗方法(手术、化疗和放疗) 并没有完全解决胶质瘤侵袭

性生长所致的高复发率的难题^[2]。越来越多的研究者从基因水平研究肿瘤侵袭性、血管生成及肿瘤发生率。转录因子叉头框蛋白 O4(Forkhead box

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金重点项目(KJ2014A263); 皖南医学院大学生科研资助基金项目(WK2018S57)

收稿日期: 2019-01-09

作者简介: 齐 敏(1993-), 女, 2017 级硕士研究生, 助理实验师, (电话) 18355350102, (电子信箱) 870559964@qq.com;

郑兰荣, 女, 教授, 博士, (电子信箱) zhenglanrong@qq.com, 通信作者。

[7] COMIM CM, VILELA MC, CONSTANTINO LS, et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis[J]. Intensive Care Med, 2011, 37(4): 711 - 718.

[8] HIGASHIDA T, KREIPKE CW, RAFOLS JA, et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury[J]. Journal of Neurosurgery, 2011, 114(1): 92 - 101.

[9] ERBAS O, TASKIRAN D. Sepsis-induced changes in behavioral stereotypy in rats; involvement of tumor necrosis factor-alpha, oxidative stress, and dopamine turnover[J]. J Surg Res, 2014, 186(1): 262 - 268.

[10] TSUGE M, YASUI K, ICHIYAWA T, et al. Increase of tumor necrosis factor- α in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain[J]. Microbiology & Immunology, 2010, 54(7): 417 - 424.