

· 基础研究 ·

高压氧对缺血再灌注小鼠脑组织 MMP-9、MMP-2 mRNA 的表达及血脑屏障通透性的影响

赵红 朱丽娜 武剑华 张海鹏 陈学新

【摘要】目的 探讨高压氧(HBO)对缺血再灌注小鼠脑组织中基质金属蛋白酶(MMPs)MMP-9、MMP-2 mRNA 的表达及血脑屏障通透性的影响。**方法** 复制清醒小鼠脑缺血再灌注模型,并于再灌注期间行 0.25 MPa HBO 治疗 5 次,在处死动物前 1h 经尾静脉注射 2% 伊文蓝(EB),采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)方法及比色法分别检测脑组织中 MMP-9、MMP-2 mRNA 的表达及 EB 的含量。**结果** 脑缺血再灌注组 MMP-9、MMP-2 mRNA 的表达及 EB 的含量明显高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.01$),高压氧组与假手术组比较,脑组织中 MMP-9、MMP-2 mRNA 的表达及 EB 的含量相近($P > 0.05$),HBO + 脑缺血再灌注组脑组织中基质金属蛋白酶 MMP-9、MMP-2 mRNA 的表达及 EB 的含量明显低于脑缺血再灌注组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 高压氧可明显减少脑缺血再灌注脑组织中基质金属蛋白酶 MMP-9、MMP-2 的表达,具有降低血脑屏障通透性的作用。

【关键词】 高压氧; 血脑屏障; 缺血再灌注; 基质金属蛋白酶

Effects of hyperbaric oxygen on the expression of MMP-9 and MMP-2 mRNA in the brain tissues and on the permeability of the blood brain barrier after cerebral ischemia and reperfusion ZHAO Hong*, ZHU Li-na, WU Jian-hua, ZHANG Hai-peng, CHEN Xue-xin. * Centre for Functional Experimentation, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of hyperbaric oxygen (HBO) on the expression of MMP-9 and MMP-2 mRNA in the brain tissues after cerebral ischemia and reperfusion, and the permeability of blood brain barrier (BBB). **Methods** Using cerebral ischemia-reperfusion models with conscious mice, 0.25 MPa (atmosphere absolutus, ATA) HBO was applied 5 times during the reperfusion period, and 2% Evan's blue (EB) was injected into the tail vein 1 hour before the animals were sacrificed. The expression of MMP-9 and MMP-2 mRNA and EB content were determined by RT-PCR and spectrophotometry. **Results** The expression of MMP-9 and MMP-2 mRNA as well as EB content significantly increased in the ischemia-reperfusion group as compared with a sham surgery group. The expression of MMP-9 and MMP-2 mRNA, and EB levels in the HBO group were similar to those in the sham surgery group. The expression of MMP-9 and MMP-2 mRNA and EB levels in the group given HBO plus reperfusion group were significantly decreased as compared with those in the group receiving reperfusion alone. **Conclusion** HBO can significantly reduce the expression of MMP-9 and MMP-2 mRNA and the permeability of the BBB.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Blood-brain barrier; Ischemia-reperfusion; Metalloproteinases

脑毛细血管基底层是维持血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)完整性的重要结构基础,主要由 IV 型胶原、层粘连蛋白和纤维连接蛋白等构成。脑缺血再灌注时伴随炎症细胞因子、粘附分子的表达,白细胞浸润并产生大量的蛋白水解酶,特别是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)中的明胶酶(MMP-9、MMP-2)等代谢产物,严重破坏脑毛细血管基底层,导致 BBB 的直接破坏^[1]。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)作为临床上治疗脑血管疾病的一种重要手段已被

临床广泛应用,但其相关的理论和机制还有待于进一步的研究。本研究旨在从基因水平上进一步探讨高压氧在脑缺血再灌注损伤中对血脑屏障通透性的影响。

材料与方法

一、主要试剂

小鼠 MMP-9、MMP-2 mRNA RT-PCR 一步法试剂盒(美国 Promega 公司),DNA 引物(上海生工有限公司),DNA marker(华美生物公司);生化试剂 Trizol Reagent(美国 Promega 公司)。

二、主要实验设备

Wellscan MK2 型酶标仪(芬兰 labssystem 公司); Wellwash2 型洗板机(芬兰 labssystem 公司);K30 离心

基金项目:辽宁省教育厅高校科研基金资助项目(20051456)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学基础医学院机能实验中心(赵红、朱丽娜),病理生理教研室(张海鹏);中国医科大学 91 期七年制学生(武剑华);中国医科大学附属第一临床医院高压氧科(陈学新)

机(美国 Sigma 公司);PCR 扩增仪(美国 Sigma 公司);自动电泳凝胶成像分析仪(Alpha Innotech Corporation);电泳仪;高压氧舱(浙江产)。

三、实验动物及分组

健康昆明种小鼠 250 只,雌、雄各半,体重(20 ± 0.5)g,由中国医科大学动物部提供。动物随机分为假手术组($n=60$)、HBO 组($n=60$)、HBO + 脑缺血再灌注组($n=60$)、脑缺血再灌注组($n=70$)。

四、脑缺血再灌注动物模型的制备

参照岑德意等^[2]的方法进行改良。采用清醒小鼠颈部手术分离双侧颈总动脉,用橡皮泥固定拉紧丝线阻断双侧颈总动脉 30 min,松线后无菌缝合颈部皮肤。假手术组与 HBO 组只作颈部手术,不阻断颈总动脉血流。

五、实验鼠的高压氧处理

HBO 组与 HBO + 脑缺血再灌注组均于术后 2 h、9 h、21 h、45 h、69 h 进入 HBO 舱内,待动物进舱后,先用纯氧洗舱 10 min,使舱内 O_2 浓度 $>90\%$,加压速率为 0.0125 MPa/min,加压至 0.25 MPa,停留 60 min(其间用纯氧通气 10 min)。停留毕,以 20 min 匀速减至常压。假手术组和脑缺血再灌注组不进行高压氧治疗,其它处理方法同以上 2 组。

六、脑组织伊文蓝测定

参考郝洪军等^[3]用甲酰胺测定皮肤伊文蓝(Evan's Blue, EB)含量的方法加以改进。4 组小鼠均于处死前 1 h 经尾静脉注射 2% EB 生理盐水(1 ml/kg 体重),在摘取脑组织前 20 min 经心脏灌注生理盐水(以流出清亮的液体为准)。处死小鼠冰盘取脑组织用电子天平精确称其湿重后,投入中试管中,分别加入 3 ml 甲酰胺,加盖后于 45°C 水浴箱孵育 48 h 轻轻摇匀,离心 15 min(3000 r/min),取上清液在分光光度计比色(波长为 623 nm)。

七、逆转录聚合酶链式反应法检测脑组织中基质金属蛋白酶 MMP-9、MMP-2 mRNA 的表达

(一)引物合成

各种细胞因子引物根据 GENBANK 小鼠基因库设计,由上海生工有限公司合成,引物序列如下。

1. MMP-9:上游引物——P1($5'$ -CAG ATT GAC CTC AGC GCT AG- $3'$);下游引物——P2($5'$ -ACC CTC

ACA CTC AGA TCA TC - $3'$),产物长度 413 bp。

2. MMP-2:上游引物——P1($5'$ -CTG CTT TGT CCT TTG ATG CA - $3'$);下游引物——P2($5'$ -TGA GTC AAT CCC TGG AAA GT- $3'$),产物长度 402 bp。

3. β -actin 内参照:上游引物——P1($5'$ -GTG GGC CGG TGT AGG CAC CA- $3'$),下游引物——P2($5'$ -GGT TCG CCT TAG GGT TCA GG- $3'$),产物长度 238 bp。

(二)脑组织总 RNA 提取

同异硫氰酸胍“一步法”提取。取海马区脑组织 0.1 g/ml TRIzol 中于冰上匀浆后,放置 10 min,取上清加氯仿 200 μl ,轻摇混匀, 4°C 离心 15 min(10000 r/min)后,取上清液加 500 μl 异丙醇,室温下放置 15 min, 4°C 离心 15 min(12000 r/min),弃上清加 75% 乙醇 1 ml, 4°C 离心 15 min(12000 r/min)。室温干燥,加无 RNA 酶水溶解。电泳扫描检测 RNA 含量,置 -70°C 条件下保存。

(三)逆转录聚合酶链式反应

逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)总反应体积为 25 μl ,细胞因子的复性温度:MMP-9 为 50°C ,MMP-2 为 55°C 。

(四)RT-PCR 检测结果的凝胶图像分析

以 β -actin 为内参对照,对 RT-PCR 结果进行分析。扩增的产物在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,凝胶图像输入自动电泳凝胶成像分析仪,应用 Chemi Imager 5500 Analysis Software 进行表达强度分析。结果判断以同时扩增的内参照 β -actin 的表达强度为基准,基质金属蛋白酶的相对含量按下式计算:相对含量 = (基质金属蛋白酶的基因表达密度/ β -actinA 表达密度) $\times 100\%$ 。

八、统计学分析

应用 SPSS 11.0 版本的统计学软件进行统计学分析,所有数据用($\bar{x} \pm s$)表示,2 组均数间的比较采用 t 检验。

结 果

一、HBO 对脑缺血再灌注小鼠不同时间脑组织中 EB 含量的影响

4 组大鼠不同时段脑组织中 EB 的含量变化情况见表 1。

表 1 4 组大鼠不同时段脑组织中 EB 的含量变化($\mu\text{g}/\text{mg prot}$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	再灌注时间				
		4 h	11 h	23 h	48 h	72 h
假手术组	60	10.14 ± 3.87	10.21 ± 3.18	10.09 ± 3.02	10.06 ± 3.10	10.12 ± 3.04
脑缺血再灌注组	70	114.77 ± 12.99^a	78.99 ± 6.17^a	69.48 ± 9.97^a	53.38 ± 4.58^a	38.19 ± 9.08^a
HBO 组	60	9.97 ± 4.06^b	10.14 ± 3.36^b	10.22 ± 3.86^b	10.55 ± 3.37^b	10.59 ± 3.27^b
HBO + 脑缺血再灌注组	60	114.52 ± 12.74^c	72.13 ± 7.38^c	60.34 ± 4.76^c	44.82 ± 2.07^c	33.62 ± 8.38^c

注:与假手术组同时段比较,^a $P < 0.01$,^b $P > 0.05$;与脑缺血再灌注组同时段比较,^c $P < 0.01$

二、HBO 对脑缺血再灌注 72 h 小鼠脑组织 MMP-9、MMP-2 mRNA 表达的影响

脑缺血再灌注 72 h 后 4 组小鼠 MMP-9、MMP-2 mRNA 表达的情况见表 2。

表 2 脑缺血再灌注 72 h 后 4 组小鼠 MMP-9、MMP-2 mRNA 表达的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	MMP-9	MMP-2
假手术组	60	52.43 ± 21.56	43.12 ± 17.56
脑缺血再灌注组	70	87.52 ± 26.12 ^a	67.56 ± 21.12 ^a
HBO 组	60	51.47 ± 18.56 ^b	42.14 ± 15.67 ^b
HBO + 脑缺血再灌注组	60	63.12 ± 16.52 ^c	30.24 ± 11.42 ^c

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$,^b $P > 0.05$;与脑缺血再灌注组比较,^c $P < 0.01$

讨 论

血脑屏障是存在于脑组织与血液之间的一层屏障系统,它能控制血循环中某些物质向中枢神经组织转运,从而保证中枢神经组织内环境的稳定。血脑屏障主要包括三层结构:脑血管内皮细胞、基底膜和星形细胞终足。脑血管内皮细胞依靠紧密连接构成一个连续密封的网,是大分子物质经内皮细胞间转运的屏障。由星形细胞的足突组成的一层坚韧的胶质膜覆盖在脑毛细血管周围对于 BBB 的完整性有诱导和维持的作用。基底膜主要由 IV 型胶原和纤维连接蛋白构成,能起到支持作用,防止由于静水压和渗透压改变引起的血管变形。BBB 结构与功能变化在脑缺血再灌注病理进程中具有独特的意义。本实验通过观察脑组织中 EB 的渗出来评价血脑屏障的通透性。EB 属于一种常见的染料制剂,因其分子量大小与血液中的蛋白相接近,在血液中与白蛋白结合,在神经科学研究中常被用作示踪剂,来观察 BBB 的完整性。实验观察到脑缺血再灌注后 4 h EB 的渗出量最多,说明此时 BBB 受损最严重。再灌注后 11 h、23 h、48 h、72 h EB 的含量逐渐减少与报道相一致^[4]。

基质金属蛋白酶是一类 Zn^{2+} 依赖的金属蛋白内切酶家族,与人类有关的目前发现 17 个成员^[5],分为 4 组:①胶原酶;②明胶酶;③基质溶解素;④膜型金属蛋白酶。在生理条件下,MMPs 主要以无活性的酶原形式存在,脑缺血再灌注损伤时,在炎性介质作用下转化为

活性成分,其中与 BBB 关系最为密切的是明胶酶。明胶酶包括明胶酶-A/MMP-2 和明胶酶-B/MMP-9。本实验观察到脑缺血再灌注组 MMP-9、MMP-2 mRNA 的表达于再灌注 72 h 明显增加并与脑内 EB 的含量增多相一致。脑损伤时 MMP-9、MMP-2 表达增加机制可能为:①缺血再灌注诱发炎症反应,炎性介质肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 等的表达增加,通过信号转导途径作用于激活蛋白,再与 MMPs 的 mRNA 调节位点结合而调节 MMP-9、MMP-2 的表达^[6];②再灌注后氧自由基的表达在 MMP-9 的诱导方面有一定的作用。MMP-9、MMP-2 通过降解 IV 型胶原、层粘连蛋白和纤维粘连蛋白破坏 BBB 的重要结构基底膜,导致 BBB 的通透性改变。

高压氧在临床上治疗脑血管疾病的机制已经进行了一些相关方面的研究^[7]。此次实验从基因水平进一步探讨 HBO 的作用机理,发现 HBO 能够降低脑缺血再灌注时 MMP-9、MMP-2 mRNA 的表达,从而在缺血再灌注损伤中对 BBB 具有保护作用,其相关方面的机理有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Stains inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23:769-775.
- [2] 岑德意,周兰兰,明亮,等. 清醒小鼠反复脑缺血再灌注法致学习记忆障碍模型的建立. *中国药理学通报*, 2000, 16:220-223.
- [3] 郝洪军,项俊,高枫,等. 中枢神经感染患者脑脊液免疫指标分析. *中国现代医学杂志*, 2006: 55-57.
- [4] Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinases expression in tumor invasion. *FASEB J*, 1999, 13:781-792.
- [5] 徐群,张毅. 缺血再灌注大鼠脑内基质金属蛋白酶的动态变化. *上海第二医科大学学报*, 2004, 24:814-817.
- [6] Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19: 1020-1028.
- [7] Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, et al. Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats. *Stroke*, 2004, 35:578-583.

(修回日期:2008-05-11)

(本文编辑:阮仕衡)

《中华物理医学与康复杂志》编辑部

沉痛悼念四川汶川大地震遇难同胞