文章编号:1000-5404(2009)01-0071-04

论著

蛛网膜下腔出血后早期海马 MMP-9 的表达与海马神经元凋亡的相关性研究

郭宗铎,孙晓川,何朝晖,蒋 理,林 斌 (重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

摘 要:目的 观察大鼠蛛网膜下腔出血后早期海马基质金属蛋白酶9(MMP-9)的表达和海马神经细胞凋亡,及两者之间的关系,探讨 MMP-9 参与早期脑损伤的机制。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 108 只,分为假手术组和蛛网膜下腔出血组。采用经额蛛网膜下腔插管至 Willis 环方法建立蛛网膜下腔出血模型,在蛛网膜下腔出血后 6、12、24、48、72 h,应用明胶酶谱法检测大鼠海马 MMP-9 的活性;免疫组化方法检测细胞外基质层粘连蛋白的表达;同时应用原位末端标记法检测海马神经元凋亡。**结果** 明胶酶谱法结果显示:大鼠蛛网膜下腔出血后 12 h 海马 MMP-9 活性明显升高,24 h 达到高峰,并于 48 h 开始下降,72 h 时仍高于假手术组水平($P<0.01$);免疫组化结果显示:大鼠蛛网膜下腔出血后 12 h 海马层粘连蛋白表达开始下降,24 h 降至最低,并于 48 h 表达开始升高,蛛网膜下腔出血后 72 h 海马层粘连蛋白表达仍低于假手术组水平($P<0.01$);原位末端标记法检测显示大鼠蛛网膜下腔出血后 12 h 海马凋亡阳性细胞数开始增加,24 h 达到高峰,并于 48 h 表达开始下降,蛛网膜下腔出血后 72 h 海马凋亡阳性细胞数仍较高($P<0.01$)。**结论** 大鼠蛛网膜下腔出血后 MMP-9 可能通过降解其底物层粘连蛋白,导致海马神经细胞发生失巢凋亡,参与早期脑损伤的病理过程。

关键词: 基质金属蛋白酶 9; 蛛网膜下腔出血;层粘连蛋白;早期脑损伤;失巢凋亡
中图法分类号: R329.25; R338.26; R743.35 **文献标识码**: A

Association between hippocampal MMP-9 expression and neuronal apoptosis in early brain injury in rats after subarachnoid hemorrhage

GUO Zong-duo, SUN Xiao-chuan, HE Zhao-hui, JIANG Li, LIN Bin (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the relation between the expression of MMP-9 and neuronal apoptosis of hippocampus and investigate the mechanism of MMP-9 involved in early brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH). Methods Totally 108 adult male SD rats were randomly divided into 2 groups, the sham-operation group and SAH group. The SAH model was induced by injecting 300 μl of autologous arterial blood into the subarachnoid space near the circle of Willis *via* a cannula in an artificial hole between the olfactory bulb and frontal lobe. Activity of MMP-9 in the hippocampus were examined at 6, 12, 24, 48 and 72 h by gelatin-containing SDS-PAGE zymography. The changes of laminin and the component of extracellular matrix were examined by immunohistochemistry. Meanwhile, the hippocampal neuronal apoptosis were measured by TUNEL. Results (1) The zymography showed the activity of MMP-9 was increased dramatically at 12 h and reached the peak at 24 h, then decreased gradually and to the lowest level at 72 h, but was still higher than that of sham group ($P<0.01$). (2) The immunohistochemical staining indicated that hippocampal laminin began to decrease at 12 h, and to the lowest at 24 h, then increased at 48 h. But compared with the level of sham group, laminin at 72 h after SAH was still lower ($P<0.01$). (3) The number of apoptotic neurons of the hippocampus was increased at 12 h after SAH, reached a peak at 24 h and began to decrease at 48 h. The number of at 72 h after SAH was still higher than that at sham group ($P<0.01$). Conclusion MMP-9 in the hippocampus of rats after SAH may be involved in the pathological progression of early brain injury, through degrading laminin which led to anoikis in rat hippocampal neurons.

Key words: matrix metalloproteinase 9; subarachnoid hemorrhage; laminin; early brain injury; anoikis

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组具有蛋白水解活性的半胱氨酸蛋白酶,有相似的功能特性。MMP-9 是 MMPs 家族中明胶酶的一种,目前研究表明 MMP-9 参与多种神经系统疾病的发生、发展[1-3]。活化的 MMP-9 能够降解细胞外基质层粘连蛋白(laminin),导致海马神经元发生失巢凋

基金项目:重庆医科大学优秀博士学位论文资助基金(0200101174)
Supported by the Foundation for Excellent Doctoral Dissertation of Chongqing Medical University(0200101174)
作者简介:郭宗铎,男,山东省高密市人,博士研究生,医师,主要从事脑血管疾病方面的研究。电话:(023)67262540,E-mail:stonegzd@gmail.com
通信作者:孙晓川,E-mail:sunxch1445@gmail.com
收稿日期:2008-07-11;修回日期:2008-07-22

亡。本研究拟通过检测 MMP-9 及 laminin 的表达与海马神经元凋亡的关系,探讨 MMP-9 在蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)后早期脑损伤(early brain injury,EBI)中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与材料

健康成年雄性 SD 大鼠 108 只,体质量 250 ~ 300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。采用随机数字表法将大鼠分为假手术组(sham 组,18 只,其中 6 只用于检测 MMP-9 蛋白活性,6 只用于检测 laminin 的表达,6 只用于凋亡检测)和蛛网膜下腔出血(SAH)组(90 只),其中 SAH 组根据处理时间分为 6、12、24、48、72 h 5 个亚组,每亚组各 18 只大鼠(其中每组 6 只用于检测 MMP-9 蛋白活性,6 只用于检测 laminin 的表达,6 只用于凋亡检测)。明胶购于美国 Sigma 公司,laminin 一抗购自 Labvision 公司,TUNEL 检测试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 SAH 模型的制作

采用改良的经额插管注血法建立大鼠 SAH 模型[4]。以 35 g/L 的水合氯醛按 1 ml/100 g 腹腔麻醉大鼠后,经右侧股动脉插管监测大鼠动脉血压;持续检测直肠稳定,以电热毯加热,维持大鼠体温在(37.0 ± 0.5)℃。沿大鼠颅顶正中矢状线切开皮肤,分离肌肉及骨膜,于冠状缝前 5.0 mm,中线旁开 3.0 mm 处钻孔。显露额极,挑破脑膜,见脑脊液流出时,将 PE10 导管尖端从额极紧贴前颅窝底蛛网膜下腔向双耳连线中点送入,进入深度为 10 mm;以骨腊封闭骨孔以防止脑脊液漏出。连接注射器回抽,见清凉脑脊液,证实未造成脑组织损伤。从股动脉插管抽取自体动脉血 300 μl,经导管在 12 s 内匀速注入蛛网膜下腔。拔出导管,封闭骨孔,缝合头皮,并维持头低位 30 min。

Sham 组动物按上述方法操作,但蛛网膜下腔置管后不注血。

1.3 实验方法

1.3.1 海马组织蛋白的提取和定量 Sham 组大鼠于 72 h,其他各组大鼠分别在相应时间点迅速断头取脑,分离出双侧海马,并置于液氮保存。之后,取出海马组织,置于匀浆器中,加入蛋白裂解液后冰上匀浆 30 min,然后 4 ℃下 12 000 × *g* 离心 5 min,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度后,收集上清液 - 80 ℃冰箱保存备用。

1.3.2 MMP-9 活性检测 采用明胶酶谱法检测 MMP-9 活性:将组织上清液与 5 × 上样缓冲液按 4∶1混匀,于含 1% 明胶蛋白的 10% 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳槽中电泳。电泳结束后,凝胶用含 2.5% Triton X-100 的洗脱液振荡洗涤 45 min × 2 次后,加入孵育液 37℃孵育过夜。0.25% 考马斯亮蓝 G-250 染色 1 h,脱色液脱色 1 ~ 2 h 直至蓝色的背景上出现明显、清晰的负染带。以凝胶图像处理系统扫描后使用图像分析软件计算每一条带的密度值[条带面积 ×(灰度 - 背景灰度)],表示酶活性相对大小。

1.3.3 Laminin 蛋白的检测 Sham 组大鼠于 72 h,其他各组大鼠分别在相应时间点给予腹腔麻醉,迅速开胸暴露心脏,经左心室置管至升主动脉,剪破右心耳,以等渗盐水快速冲洗,而后以 40 g/L 多聚甲醛灌注 400 ml。灌毕后断头,开颅取脑,切取视交叉后 1 ~ 5 mm 处脑组织,放入 40 g/L 多聚甲醛 4 ℃冰箱固定 24 h。标本制成蜡块后,切取视交叉后 2 ~ 3 mm 处的脑冠状切面,片厚 5 μm。采用 S-P 法进行免疫组化染色。以 CCD 摄像系统采集图像,采用 Image-Pro Plus 5.0 软件分析图像,计算平均光密度值。

1.3.4 原位末端标记法(TUNEL)检测海马细胞凋亡 各组大鼠按上述方法制成石蜡切片后,切片常规脱蜡至水,按试剂盒说明书进行操作。光镜下凋亡细胞呈棕黄色,于高倍镜(×400)下随机观察 10 个视野(来自不同切片),计数海马凋亡细胞数。

1.4 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析及相关分析。

2 结果

2.1 Sham 组及 SAH 后各时间点大鼠海马组织 MMP-9 活性变化

Sham 组及 SAH 后 6 h 组大鼠海马组织未检测到 MMP-9 蛋白活性表达[sham 组为(0.46 ± 0.25),SAH 后 6 h 组为(0.53 ± 0.24)]。SAH 后 12 h 大鼠海马组织 MMP-9 活性开始增高(112.21 ± 5.63,与 sham 组相比,$P < 0.01$),24 h 达到高峰(214.05 ± 5.05,与其他各组相比,$P < 0.01$),48 h MMP-9 活性较 24 h 开始下降(177.28 ± 3.87,$P < 0.01$),72 h MMP-9 活性仍高于 sham 组水平(109.47 ± 5.63,$P < 0.01$)。见图 1。



1:sham 组;2 ~ 6:SAH 后 6、12、24、48、72 h

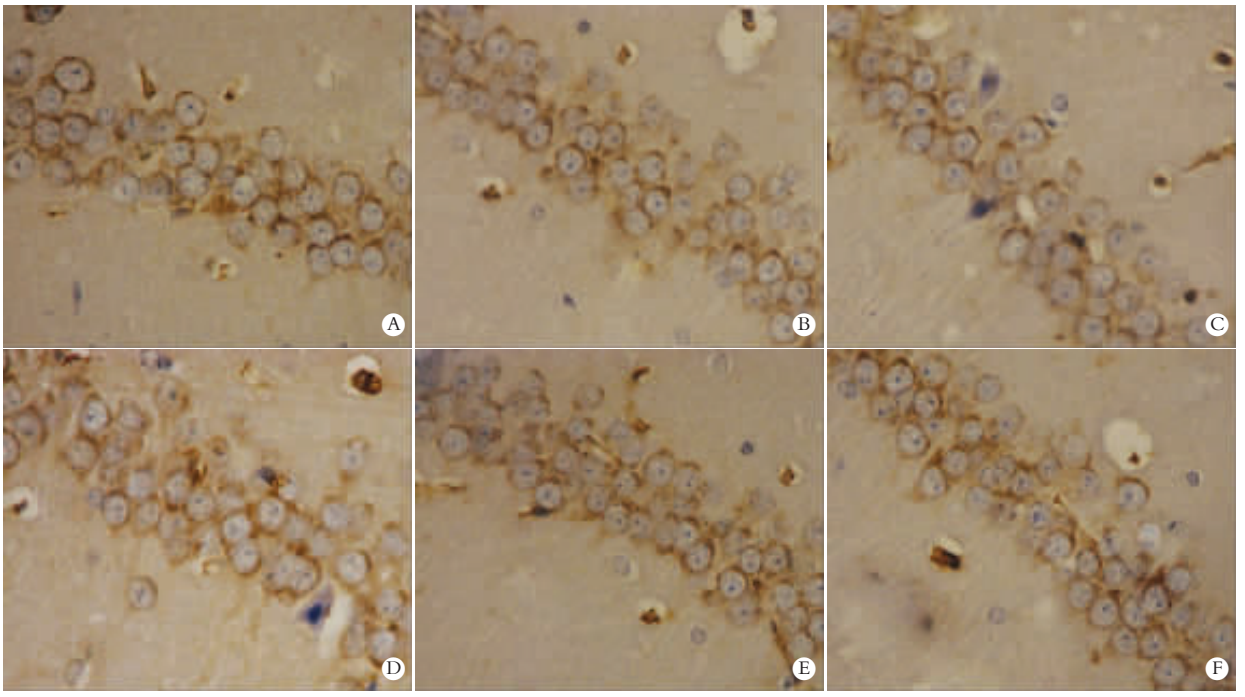
图 1 明胶酶谱显示 sham 组及 SAH 后各时间点大鼠海马组织 MMP-9 活性

2.2 大鼠海马组织 laminin 蛋白表达变化

Sham 组大鼠海马区可见细胞外基质呈棕黄色着染,有较多的 laminin 表达,神经细胞表面有棕黄色的 laminin 阳性着染,且与 SAH 后 6 h 相比无明显差异[sham 组为(0.32 ± 0.01),6 h 组为(0.30 ± 0.01)]。图像分析结果表明,大鼠 SAH 后 12 h 海马 laminin 表达开始下降(0.23 ± 0.01,与 sham 组相比,$P < 0.01$),24 h 降至最低(0.17 ± 0.01,与其他各组相比,$P < 0.01$),48 h 海马 laminin 表达较 24 h 开始升高(0.22 ± 0.01,$P < 0.01$),72 h 海马 laminin 表达仍低于 sham 组水平(0.24 ± 0.01,$P < 0.01$)。见图 2。

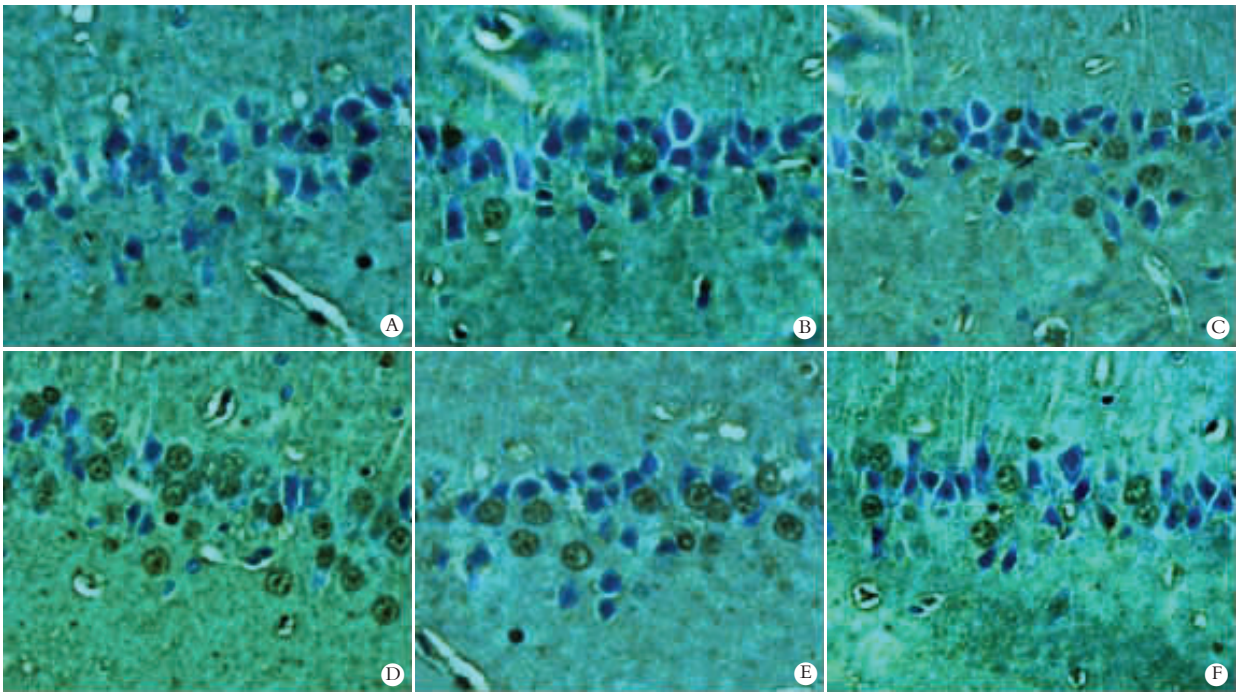
2.3 大鼠海马组织细胞凋亡

TUNEL 阳性细胞核染色呈棕黄色,核固缩呈圆形或不规则形,高倍镜下可见染色质深染聚集成块或碎裂、核边聚等,有的可见凋亡小体。Sham 组大鼠海马区未见 TUNEL 阳性细胞。SAH 后 12 h 海马凋亡阳性细胞数开始增加(52.17 ± 9.15,与 sham 组相比,$P < 0.01$),24 h 凋亡细胞数最多(191.67 ± 22.06,与其他各组相比,$P < 0.01$),48 h 凋亡细胞数仍较多,但较 24 h 开始下降(84.67 ± 11.14,$P < 0.01$),SAH 后 72 h 海马凋亡阳性细胞数仍多于 sham 组水平(61.17 ± 8.26,$P < 0.01$)。见图 3。



A：sham 组；B：SAH 后 6 h 组；C：SAH 后 12 h 组；D：SAH 后 24 h 组；E：SAH 后 48 h 组；F：SAH 后 72 h 组

图 2　免疫组化方法检测各组大鼠海马 laminin 的表达　（S-P ×400）



A：sham 组；B：SAH 后 6 h 组；C：SAH 后 12 h 组；D：SAH 后 24 h 组；E：SAH 后 48 h 组；F：SAH 后 72 h 组

图 3　TUNEL 法检测各组大鼠海马神经元凋亡　（×400）

2.4　大鼠海马 MMP-9 活性与海马组织细胞凋亡的相关性

大鼠海马组织 MMP-9 活性与海马凋亡细胞数成正相关（$r=0.906$，$P<0.01$）。

3　讨论

SAH 后早期脑损伤（EBI）由 Broderick 等[5]最早提出，他们认为 EBI 可能是 SAH 患者死亡率较高的首要原因。Kusaka等[6]认为 EBI 是 SAH 后 72 h 以内整个脑组织发生的直接损伤，即 EBI 涉及到脑血管痉挛发生之前脑组织内，包括脑组织细胞凋亡在内的多种病理生理事件。但目前国内外关于 EBI 的深入研究较少，尤其是 EBI 的病理机制尚未阐明。

SAH 后早期，在海马、血脑屏障和脉管组织中可

以观察到细胞凋亡的发生[7,8]。本实验采用经额蛛网膜下腔注血方法制作 SAH 模型,TUNEL 染色发现 SAH 后 12 h 海马神经元凋亡阳性细胞数开始增加,24 h 最多;48 h 凋亡细胞数开始下降,但 72 h 海马凋亡阳性细胞数仍多于 sham 组水平,提示神经元凋亡是 EBI 病理过程中常见的病理变化之一[9]。而且,Park 等[10]研究发现应用凋亡抑制剂,保护海马神经元,减少其凋亡能有效减轻 SAH 后 EBI,并且可能改善 SAH 动物的神经功能状况。目前对 SAH 后凋亡通路的研究大多集中于细胞内机制,如死亡受体通路、依赖或不依赖于 caspase 通路及线粒体通路等。最近有研究表明,在脑缺血病理过程中,脑组织细胞外基质 laminin 发生降解,导致神经细胞发生失巢凋亡[11]。Laminin 是细胞外基质的主要成分,对细胞存活及防止凋亡发生具有重要作用,能够阻止细胞从细胞外基质解脱,即失巢凋亡现象。研究表明,破坏细胞与 laminin 的关系可以导致细胞凋亡发生,因此 laminin 是防止细胞凋亡、维持细胞存活的重要因子[12]。本实验通过免疫组化方法检测 laminin 的表达,观察到 SAH 后 12 h 海马 laminin 表达开始下降,24 h 降至最低;48 h 海马laminin 表达开始升高,但 72 h 时仍低于 sham 组水平。其表达时程与海马神经细胞凋亡时程相吻合,提示海马 laminin 降解导致海马神经元发生失巢凋亡。

目前研究表明脑内多种细胞,包括海马神经元,星形胶质细胞,小胶质细胞,少突胶质细胞及炎症细胞等均可以酶原形式分泌 MMP-9[13,14]。活化的 MMP-9 能够降解细胞外基质 laminin,在体内多种病理生理条件下发挥作用[15]。本研究通过明胶酶谱法检测 MMP-9 的活性,观察到 SAH 后 12 h 大鼠海马组织 MMP-9 活性开始增高,24 h 达到高峰;SAH 后 48 h MMP-9 活性较 24 h 开始下降,72 h MMP-9 活性仍较高。上述结果显示 MMP-9 活性与其底物 laminin 的表达趋势相反。同时,经相关性分析,SAH 后海马神经元 TUNEL 阳性细胞数与 MMP-9 活性呈明显正相关。本研究显示 SAH 后随着 MMP-9 活性升高,其底物 laminin 发生降解,从而导致神经细胞从细胞外基质解脱,即发生失巢凋亡。

因此,我们认为 SAH 后 MMP-9 可能通过降解细胞外基质 laminin 引起海马神经元发生失巢凋亡,参与 SAH 后 EBI 的病理过程,为今后更加深入研究 EBI 奠定了实验基础,同时也为临床治疗 SAH 后 EBI 提供理论依据。本研究结果还显示 SAH 后 72 h MMP-9 活性仍维持在较高水平,TUNEL 阳性细胞仍较多,提示 MMP-9 也可能参与 SAH 后 EBI 迟发性神经功能缺损的发生、发展。因此,进一步深入研究 MMP-9 参与 SAH 后 EBI 整个病理过程的相关机制将可能为 SAH 的治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] Yamaguchi M, Jadhav V, Obenaus A, *et al*. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates brain edema in an *in vivo* model of surgically-induced brain injury[J]. Neurosurgery, 2007, 61(5): 1067 – 1076.

[2] Liu X, Han Q, Sun R, *et al*. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in experimental pneumococcal meningitis[J]. Brain Res, 2008, 1207: 237 – 243.

[3] Caird J, Napoli C, Taggart C, *et al*. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in human atherosclerotic and non-atherosclerotic cerebral aneurysms [J]. Eur J Neurol, 2006, 13(10): 1098 – 1105.

[4] Prunell G F, Mathiesen T, Diemer N H, *et al*. Experimental subarachnoid heinorrhage; subaraehnoid blood vopume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three differentract models. Neurosurgery, 2003, 52(1): 165 – 175.

[5] Broderick J P, Brott T G, Duldner J E, *et al*. Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 1994, 25(7): 1342 – 1347.

[6] Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, *et al*. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(8): 916 – 925.

[7] Yatsushige H, Ostrowski R P, Tsubokawa T, *et al*. Role of c-Jun N-terminal kinase in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosci Res, 2007, 85(7): 1436 – 1448.

[8] Cahill J, Calvert J W, Solaroglu I, *et al*. Vasospasm and p53-induced apoptosis in an experimental model of subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2006, 37(7): 1868 – 1874.

[9] Ostrowski R P, Colohan A R, Zhang J H. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Neurol Res, 2006, 28(4): 399 – 414.

[10] Park S, Yamaguchi M, Zhou C, *et al*. Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2004, 35(10): 2412 – 2417.

[11] Gu Z, Cui J, Brown S, *et al*. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 2005, 25 (27): 6401 – 6408.

[12] Davis G E, Senger D R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization[J]. Circ Res, 2005, 97(11): 1093 – 1107.

[13] Cunningham L A, Wetzel M, Rosenberg G A. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia[J]. Glia, 2005, 50(4): 329 – 339.

[14] 王玉萍,宋 波,徐 岷. 丁咯地尔对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 MMP-9 与 TIMP-1 的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2007, 42(1): 154 – 156.

[15] Hrabec E, Naduk J, Strek M, *et al*. Type Ⅳ collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates--intracellular proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors[J]. Postepy Biochem, 2007, 53(1): 37 – 45.

(编辑 龙 亮)