论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2154-04

纳络酮预处理对脑出血大鼠脑组织水通道蛋白4及基质金属蛋白酶9表达的影响

卢 宁[1],刘晓云[2] ([1]遵义医学院第三附属医院神经内科,贵州 遵义 563002;[2]重庆医科大学第二附属医院妇产科,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨纳络酮预处理对脑出血大鼠的保护效应及相关作用机制。**方法** 将30只雄性Sprague-Dawley大鼠(体质量280~350 g)按随机数字表法随机分为假手术对照组(Sham组)、脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)组和纳络酮预处理(Naloxone preconditioning,NP)组,每组10只大鼠。复制上述动物模型之前,NP组大鼠预先给予盐酸纳络酮(2.0 mg/kg),ICH组给予相同体积的生理盐水,随后制备ICH模型。切取并收集大鼠脑出血灶周围脑组织,分别采用RT-PCR和Western blot检测大鼠病变脑组织中水通道蛋白(aquaporin protein 4,AQP4)在转录水平和蛋白水平上的变化情况;同时采用免疫组织化学检测大鼠病变脑组织中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase 9,MMP-9)的阳性表达情况。**结果** 相对于Sham组,ICH组大鼠脑组织中含水量明显增加($P<0.05$),而经过纳络酮预处理后,大鼠脑组织中含水量明显减少($P<0.05$);相对于ICH组,NP可有效降低脑出血大鼠脑组织中AQP4 mRNA和蛋白水平($P<0.01$);同时,NP组大鼠脑组织中MMP-9阳性表达率明显下调($P<0.01$)。**结论** 纳络酮作为脑出血的一种有效的保护措施,其具体作用机制可能与其降低脑组织中AQP4的表达,从而减少脑水肿的发生及下调的MMP-9水平密切相关。

关键词: 脑出血;盐酸纳络酮;预处理;水通道蛋白4;基质金属蛋白酶9

中图法分类号: R793.34; R971.9; R341 **文献标识码:** A

Naloxone hydrochloride preconditioning suppresses expressions of aquaporin protein-4 and matrix metalloproteinase-9 in rat brain tissue around cerebral hemorrhagic focus

LU Ning[1], LIU Xiao-yun[2] ([1]Department of Neurology, Third Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi 563002, Guizhou Province; [2]Department of Gynecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of naloxone preconditioning (NP) for rats with cerebral hemorrhage. **Methods** Totally 30 healthy male Sprague Dawley (SD) rats were randomly separated into Sham operatopm group, intracerebral hemorrhage (ICH) and NP treatment groups ($n=10$). Before the establishment of rat cerebral hemorrhage model, rats in the NP group were given an intraperitoneal injection of naloxone hydrochloride (2.0 mg/kg), and those of ICH group received an injection of normal saline at same volume. Then, the ICH model was made by injecting 0.4 IU collagen Ⅶ into caudate nucleus while. The brain tissue samples around cerebral hemorrhagic focus after ICH were collected. RT-PCR and Western blotting were used to detect the transcriptional level and protein level of aquaporin protein 4 (AQP4) in the brain tissue, respectively. Meanwhile, immunohistochemistry was employed to determine the expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in the rat brain tissue. **Results** Brain water content in ICH group was larger than that in Sham group ($P<0.05$). However, NP preconditioning effectively decreased the brain water content ($P<0.05$) compared with the other 2 groups. Compared with the ICH group, NP group had significantly decreased mRNA and protein levels of AQP4 in brain tissue ($P<0.01$, $P<0.01$). Meanwhile, the positive expression percentage of MMP-9 in the brain tissue was also significantly down-regulated after naloxone hydrochloride preconditioning. **Conclusion** Naloxone hydrochloride preconditioning exerts its effective protective effect by decreasing AQP4 expression at mRNA and protein levels and thus leads to attenuate and down-regulate MMP-9 in the ICH brain tissue.

Key words: cerebral hemorrhage; naloxone hydrochloride; preconditioning; aquaporin protein 4; matrix metalloproteinase 9

作者简介: 卢 宁,男,江苏省徐州市人,副主任医师,主要从事脑血管疾病方面的研究。E-mail: luning123456789@yahoo.com.cn

通信作者: 刘晓云,E-mail:zyyycklxy@163.com

收稿日期: 2009-09-22;**修回日期:** 2009-10-22

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH) 是老年患者的常见病及多发病,目前仍缺少有效的治疗方法,即使完全清除脑血肿也不能取得满意的疗效治疗效果,其病死率和致残率依然很高。近来研究发现,水通道蛋白(aquaporin protein 4, AQP4)[1,2] 及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)[3-5] 参与了脑水肿的发生及发展过程,且在其中发挥着重要的作用。

纳络酮临床应用广泛,因对 3 种阿片受体发挥拮抗作用而作为吗啡戒毒的药物。同时,纳络酮可抑制花生四烯酸代谢,刺激超氧化物歧化酶生成;减轻钙离子超载,稳定溶酶体膜;改善微循环, 纠正脑缺血缺氧,增加脑缺血区血流量。实验及临床研究表明,纳络酮对脑缺血损伤具有预防作用[6,7]。基于此,我们选择其预处理措施, 随后向大鼠尾状核区注入Ⅶ胶原酶制备 ICH 模型,观察其对脑出血后病变局部脑组织中 AQP4 及 MMP-9 的影响,探讨纳络酮预处理对 ICH 可能的保护机制,以期为纳络酮临床治疗 ICH 提供一定的实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验动物　　雄性 Sprague-Dawley 大鼠(6 个月龄,体质量 280 ~ 350 g),由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2　主要试剂　　盐酸纳络酮注射液购于北京四环制药有限公司,规格:每瓶 1 mg/1 ml, 国药准字 H20055759;本实验中所用到的 PCR 引物均由上海英骏生物技术公司合成;*Taq* 酶、DNase Ⅰ(RNase free)购自 TaKaRa 公司; RNA 提取试剂为天根公司产品; M-Mulv Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司,兔抗大鼠 AQP4 单克隆抗体 (美国 Chemicon 公司);兔抗大鼠 MMP-9 (武汉博士德,编号:BA2202)。

1.1.3　主要仪器　　PTC0200 型 PCR 仪由美国 Bio-Rad 公司提供;Bio-Rad 核酸蛋白测定仪、PowerPac Basic 电泳仪、192 型 Sub-Cell 电泳槽和全自动凝胶成像系统均由美国 Bio-Rad 公司提供。

1.2　方法

1.2.1　动物模型制备　　造模前,预处理组大鼠腹腔注射盐酸纳络酮(2.0 mg/kg);模型组大鼠腹腔注射相同体积的生理盐水。大鼠脑出血模型的制备如下:采用 10% 水合氯醛(400 mg/kg)将大鼠麻醉后腹卧位固定在鼠脑立体定位仪上,暴露颅骨,于前囟后 1.2 mm,矢状缝右侧 3.0 mm 处打开颅窗,用微量进样器沿钻孔向大鼠尾状核部位内(进针约 6.0 mm 处)注射含有含有 0.4 IU Ⅶ胶原酶的 2 μl 生理盐水,缓慢匀速注入,留针 10 min 后缓慢退针,制备脑出血模型。假手术组除注入为生理盐水外,其余步骤同模型组和纳络酮预处理组。对所有大鼠进行神经功能缺损评分,评分标准如下:0 分,无任何神经功能缺失;1 分,左前肢不能伸展;2 分,向左侧行走;3 分,向左侧转圈,成追尾状。评分为 1 ~ 3 分的动物即为造模成功,纳入本研究。

1.2.2　大鼠脑组织含水量测定　　术后 24 h, 采用 10% 水合氯醛麻醉并处死各组动物, 低温下迅速断头取脑。将取出的脑组织放在 1 个盛有 0.9% 生理盐水湿润的定性滤纸上,以防水分蒸发。迅速完成操作(约 5 min 内),称取湿质量,然后置于 90 ℃烤箱中连续烘烤至恒量后称取干质量,按以下计算公式计算脑组织含水量。脑组织含水量 = (湿质量 - 干质量)/湿质量 × 100% 。

1.2.3　PCR 检测大鼠脑组织 AQP4 mRNA 表达水平　　所用引物: AQP4 正义链:5′-CCTCATCTCCCTCTGCTT-3′,反义链:5′-GTTGTCCTCCACCTCCAT-3′,扩增片段为 637 bp;β-actin 正义链: 5′-TTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3′,反义链:5′-AGTAACAGTCCGCCTAGAAGCAT-3′,扩增片段为 874 bp。

PCR 反应体系:2.0 μl 10 × PCR 缓冲液、1.2 μl dNTP Mix (2.5 mmol/L)、0.5 μl AQP4 上游引物(10 μmol/L)、0.5 μl AQP4 下游引物(10 μmol/L)、β-actin 上游引物(10 μmol/L)、β-actin 下游引物(10 μmol/L)、0.2 μl *Taq* 酶、0.5 μl 第 1 链 cDNA,补足 ddH_2O 至 20.0 μl。

PCR 反应条件: 94 ℃预变性 1 min; 94 ℃变性 30 s; 55 ℃退火 30 s; 72 ℃延伸 45 s,共计 33 个循环, 最后 72 ℃10 min。PCR 扩增结束后,取 10 μl PCR 产物与 2 μl 6 × Buffer 上样混合后上样,1.0% 琼脂糖凝胶 150 V 条件下电泳 15 min, 紫外透析灯对凝胶成像分析。结果判断:以 AQP4 的灰度值与 β-actin 的灰度值的比值 AQP4/β-actin 表示 AQP4 mRNA 的相对表达水平。

1.2.4　Western blot 检测大鼠脑组织 AQP4 蛋白表达水平　　取约 200 mg 脑组织置于玻璃匀浆器内,立即加入 150 μl 预冷的蛋白裂解液 (Pierce 公司,剧烈振荡 15 s, 冰浴 10 min。随后超声破碎细胞, 80 W, 3 次,每次约 5 s。接着 12 000 × *g*,4 ℃离心 10 min。按 Pierce 蛋白测定试剂盒说明进行蛋白质定量,样本分装于 - 80 ℃冰箱中保存备用。将提取液的蛋白浓度调整一致,各取 50 μg 蛋白经 10% 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)后, 半干电转移法(20 V, 20 min) 转至 PVDF 膜上。

转膜结束后用含 5% 脱脂奶粉封闭 6 h, TBS 洗膜 3 次,每次 5 min。随后分别加入兔抗大鼠 AQP4 单克隆抗体(34 × 10^3)(1∶1 000)和 β-actin 单克隆抗体(43 × 10^3) (1∶800) (Santa Cruz 公司), 4 ℃孵育 12 h。TBS 洗膜 2 次, 每次 5 min。然后再加入辣根过氧化物(HRP)标记羊抗兔 IgG (1∶3 000), 4 ℃ 孵育 2 h。TBS 洗膜 2 次, 每次 5 min。化学发光试剂盒显色, 曝光, 对胶片进行扫描,然后用 UVP 凝胶图象处理系统分析目的条带的灰度值。结果判断:以 AQP4 的灰度值与 β-actin 的灰度值的比值表示 AQP4 蛋白相对表达水平。

1.2.5　免疫组织化学检测大鼠脑组织 MMP-9 阳性表达情况

取大鼠尾状核区脑组织置于 4 % 多聚甲醛后固定 12 h。常规脱水、浸蜡及石蜡包埋标本制成 5 μm 厚的切片,二甲苯脱蜡水化后,3% H_2O_2 灭活内源性酶, 枸橼酸盐缓冲液行微波抗原修复,正常山羊血清封闭。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。随后与一抗兔抗大鼠单克隆抗体(1∶1 500)、二抗生物素标记羊抗兔 IgG(1∶2 500)及辣根过氧化物酶标记的链霉素亲和素复合物(1∶400)孵育。PBS 洗 3 次,每次 5 min。二氨基联苯胺显色,苏木精复染 5 ~ 10 min。水洗、分化、蓝化、脱水、透明并封

固镜下观察。

结果判定标准:阳性 MMP-9 蛋白免疫组化染色位于细胞质,呈棕黄色。高倍镜下随机观察血肿周围不重复的 3 个视野,以阳性细胞百分率和染色强度为判定标准。深棕色,阳性细胞数占 50% 以上为(+++);棕色颗粒较深,阳性细胞占 26% ~50% 为(++);阳性细胞占 10% ~25% 为(+);棕色颗粒量多,阳性细胞数少于 10% 为阴性。

1.3 统计学处理

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件, 行单因素方差分析。

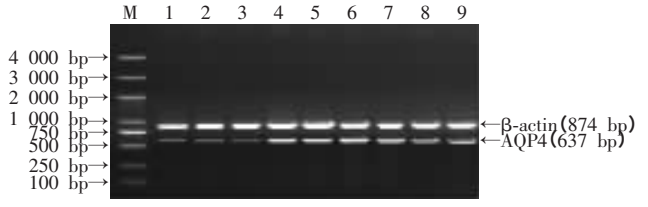
2 结果

2.1 脑组织含水量变化

术后 24 h 取大鼠脑组织测定含水量,结果显示,脑出血组大鼠脑组织含水量[(83.741 ±7.080)%]明显多于假手术组[(76.385 ±5.624)%,$P<0.05$];而经纳络酮预处理后,脑组织含水量[(78.016 ±5.359)%]明显降低,与脑出血组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 纳络酮预处理对大鼠脑组织 AQP4 mRNA 的影响

在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳图上可见 637 bp 和 874 bp 位置的目的条带和内参照条带, 与设计结果一致。并且相对于脑出血组大鼠脑组织 AQP4 mRNA 相对表达水平,纳络酮预处理组大鼠脑组织 AQP4 mRNA 相对表达水平明显减少($P<0.05$)(图 1,表 1)。



M: 标准;1 ~3: 假手术组;4 ~6: 脑出血组;7 ~9:纳络酮预处理组

图 1 各组大鼠脑组织 AQP4 mRNA 的表达

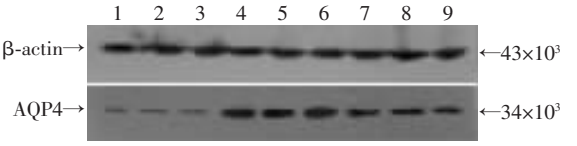
表 1 各组大鼠脑组织中 AQP4 mRNA 和蛋白相对表达水平 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	AQP4 mRNA	AQP4 蛋白
假手术组	0.177 ±0.006	0.293 ±0.032
脑出血组	1.023 ±0.040[a]	0.876 ±0.058[a]
纳络酮预处理组	0.596 ±0.038[ab]	0.552 ±0.044[ab]

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与脑出血组比较

2.3 纳络酮预处理对大鼠脑组织 AQP4 蛋白表达的影响

各组随机抽取 3 个样本进行 Western blot 检测。结果显示,相对于脑出血组大鼠脑组织 AQP4 蛋白相对表达水平,纳络酮预处理组大鼠脑组织 AQP4 蛋白相对表达水平明显下调,差异具有统计学意义($P<0.01$)(图 2,表 1)。



1 ~3: 假手术组;4 ~6: 脑出血组;7 ~9: 纳络酮预处理组

图 2 各组大鼠脑组织 AQP4 蛋白的表达

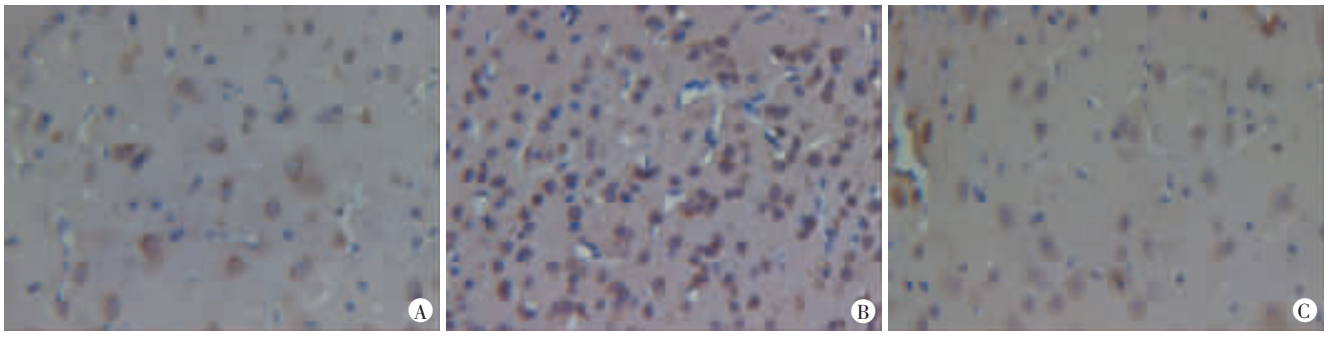
2.4 纳络酮预处理对大鼠脑组织 MMP-9 表达的影响

免疫组织化学结果显示,阳性 MMP-9 颗粒主要定位于细胞质中。相对于假手术组(图 3A),脑出血组脑组织中 MMP-9 阳性颗粒明显增加,着色明显加深(图 3B);而经纳络酮预处理后,MMP-9 阳性颗粒显著减少,着色明显变淡(图 3C)。

3 讨论

近年来发现,水通道蛋白在水分子的跨膜转运方面起着关键性作用。迄今为止,发现的脑水通道蛋白亚型共有 7 种。包括 AQP1、AQP3、AQP4、AQP5、AQP8、AQP9 和 AQP11。分布于中枢神经系统的水通道蛋白主要是 AQP4 和 AQP1,其中以 AQP4 分布最为广泛。目前对脑内水通道蛋白家族的研究主要集中于 AQP4。

AQP4 为 6 次跨膜的四异聚体,其主要分布于蛛网膜下腔、脑室系统的室管膜及血管周围的星形胶质细胞,同时在渗透压感受区也可见,这种分布特点是胶质细胞与脑脊液以及血管之间的水调节和运输的重要结构基础[8,9]。研究表明,AQP4 参与脑出血后脑水肿的形成[10,11]。Badaut 等[10]研究发现,在蛛网膜下腔出血后,水通道蛋白 AQP1 和 AQP4 在出血部位周围大量表达。在随后相关机制的研究中,有学者发现,在结扎大脑中动脉后,可通过上调星形胶质细胞中 AQP4 的表达水平而使内皮素-1(ET-1)过表达[11],而 ET-1 是脑水肿发生过程中重要的一个环节。在相关



A:假手术组;B:脑出血组;C:纳络酮预处理组

图 3 各组大鼠尾状核区脑组织 MMP-9 蛋白的表达 (S-P ×400)

调节机制的研究中 Amiry-Moghaddam 等[12]发现 AQP4 C 端中存在两个独立的以双亮氨酸、酪氨酸为基础的基序,并且该基序并通过酪蛋白激酶Ⅱ(CK)的磷酸化调节 AQP4。

在本研究中,我们首先采用盐酸纳络酮预处理动物,随后复制了脑出血大鼠动物模型。纳络酮已广泛应用于临床,研究已证实纳络酮可有效改善微循环,纠正脑缺血缺氧,增加脑缺血区灌注量。在纳络酮预处理后对 AQP4 mRNA 和蛋白表达水平的检测发现,盐酸纳络酮预处理可降低 AQP4 在 mRNA 和蛋白上的水平,其最终效应在于减少脑出血后脑组织的含水量,从而减轻脑水肿。

事实上,AQP4 参与了脑水肿整个发生、发展过程。在本研究中,我们仅检测了脑出血 24 h 后 AQP4 蛋白和 mRNA 的表达水平,虽然所得到的结果与一些研究报道基本上一致,但因而也无法动态观察到纳络酮预处理在整个保护作用过程中对 AQP4 的作用情况。在随后研究中,我们也探讨了纳络酮预处理对脑组织中 MMP-9 表达的影响。

基质金属蛋白酶是一组与锌有关的金属蛋白酶,其主要功能是降解和再塑造细胞外基质。在正常情况下,MMPs 在脑组织中很少表达;当脑组织发生损伤后,大量细胞包括小胶质细胞、少突胶质细胞、血管内皮细胞、神经细胞等均可高表达 MMP-2 和 MMP-9[13]。MMP-9 除可破坏血脑屏障外,还可通过诱导神经细胞变性死亡[14]及降解髓鞘碱性蛋白,导致髓鞘脱失,从而加重脑组织损伤。同样,脑出血后 6 ~ 72 h 脑水肿程度与 MMP-9 水平呈现一致性,即具有正相关,提示 MMP-9 的过表达可能有助于急性期脑水肿的形成。

在本研究中,免疫组织化学结果提示,脑出血组大鼠脑组织中 MMP-9 的阳性表达水平显著升高,这表明脑出血后,活化的 MMP-9 通过对富含基膜的毛细血管床过度降解而使血脑屏障过度开放、增加渗透性,促进血管源性脑水肿的形成。而纳络酮预处理有效地降低了脑出血脑组织中 MMP-9 的阳性表达水平,从而保护血脑屏障,减少渗透性及脑出血后脑组织的损伤。

总之,纳络酮预处理作为脑出血后一种有效的保护措施,可有效地减轻脑出血后的脑水肿,降低脑组织中水含量,其相关作用机制可能与降低脑组织中 AQP4 及 MMP-9 的表达水平,减少渗透性有关。事实上,纳络酮预处理对于 AQP4 及 MMP-9 表达水平的时效影响不是很清楚,同时,纳络酮预处理是如何作用于 AQP4 及 MMP-9,是直接作用还是通过作用于其他信号通路和调控分子发挥作用,也值得我们进一步研究。

参考文献

[1] Fu X, Li Q, Feng Z, *et al*. The roles of aquaporin-4 in brain edema following neonatal hypoxia ischemia and reoxygenation in a cultured rat astrocyte model[J]. Glia, 2007, 55(9): 935 - 941.

[2] Guo Q, Sayeed I, Baronne L M, *et al*. Progesterone administration modulates AQP4 expression and edema after traumatic brain injury in male rats[J]. Exp Neurol, 2006, 198(2): 469 - 478.

[3] Bonoiu A, Mahajan S D, Ye L, *et al*. MMP-9 gene silencing by a quantum dot-siRNA nanoplex delivery to maintain the integrity of the blood brain barrier[J]. Brain Res, 2009, 1282: 142 - 155.

[4] Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, *et al*. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type Ⅳ collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke [J]. Stroke, 2008, 39(4): 1121 - 1126.

[5] Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, *et al*. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke[J]. Stroke, 2006, 37(6): 1399 - 1406.

[6] 吴国平, 饶　平, 黄晓辉. 大剂量纳洛酮对脑出血的疗效及其对免疫调节的作用[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(15): 1372.

[7] 胡　胜, 王　峻, 竺永健, 等. 纳洛酮血肿腔内注射对高血压脑出血患者脑脊液内皮素-1 和一氧化氮的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(1): 97 - 98.

[8] Lee M, Lee S J, Choi H J, *et al*. Regulation of AQP4 protein expression in rat brain astrocytes: role of P2X7 receptor activation[J]. Brain Res, 2008, 1195: 1 - 11.

[9] Zhang H, Verkman A S. Aquaporin-4 independent Kir4.1 K^+ channel function in brain glial cells[J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 37(1): 1 - 10.

[10] Badaut J, Brunet J F, Grollimund L, *et al*. Aquaporin 1 and aquaporin 4 expression in human brain after subarachnoid hemorrhage and in peritumoral tissue[J]. Acta Neurochir Suppl, 2003, 86: 495 - 498.

[11] 楚燕飞, 李兵仓, 陈　菁, 等. 水通道蛋白 4 RNA 干扰对爆炸伤后脑水肿的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(8): 709 - 713.

[12] Amiry-Moghaddam M, Frydenlund D S. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport [J]. Neuroscience, 2004, 129(4): 999 - 1010.

[13] Wang X, Mori T, Jung J C, *et al*. Secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after mechanical trauma injury in rat cortical cultures and involvement of MAP kinase[J]. J Neurotrauma, 2002, 19(5): 615 - 625.

[14] Chen Z L, Indyk J A, Strickland S. The hippocampal laminin matrix is dynamic and critical for neuronal survival[J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(7): 2665 - 2676.

(编辑　王小寒)