论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0928-04

载脂蛋白E基因多态性与星形胶质细胞损伤后兴奋性氨基酸变化的关系

武明明,孙晓川,吴海涛,殷 成,周 帅 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

【摘要】 **目的** 探讨载脂蛋白E(apolipoprotein E,蛋白:ApoE,基因:APOE)基因多态性与星形胶质细胞损伤后兴奋性氨基酸(excitatory amino acids,EAAs)变化的关系。**方法** 提取APOE敲除鼠新生2 d内乳鼠大脑皮层星形胶质细胞,并以GFAP-FITC免疫荧光法对所获细胞进行鉴定。脂质体介导重组体pEGFP-N1-APOEε2、pEGFP-N1-APOEε3、pEGFP-N1-APOEε4分别转染入星形胶质细胞中,RT-PCR鉴定该基因在转染后的细胞中的表达,荧光显微镜观察该基因的亚细胞定位及转染效率。制备3种基因型星形胶质细胞划伤模型,采用氨基酸分析仪分别测其中氨基酸的含量,流式细胞仪检测细胞凋亡。**结果** 星形胶质细胞划伤后谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)的释放较早,在划伤后30 min即达到高峰,在伤后30、60 min APOEε4型显著高于APOEε2、APOEε3型($P<0.05$)。细胞早期凋亡率在24 h达到高峰,在伤后12、24 h APOEε4型显著高于APOEε2、APOEε3型($P<0.05$)。**结论** APOE以亚型特异性的方式影响星形胶质细胞创伤后EAAs的释放,APOEε4携带体可能通过EAAs毒性作用导致创伤性脑损伤急性期伤情加重及不良预后。

【关键词】 脑损伤;兴奋性氨基酸;星形胶质细胞;凋亡;质粒
【中图法分类号】 R651.15;R394.3;R363.27 【文献标志码】 A

In vitro relationship of apolipoprotein E polymorphisms and excitatory amino acids in astrocyte injury

Wu Mingming, Sun Xiaochuan, Wu Haitao, Yin Cheng, Zhou Shuai (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To identify the relationship between the polymorphisms of apolipoprotein E gene (APOE) and the changes of excitatory amino acids (EAAs) in injured astrocytes. **Methods** Astrocytes were separated from APOE gene-knockout newborn rat cerebral cortex and then identified by GFAP-FITC immunofluorescence staining. The recombinant plasmids pEGFP-N1-APOEε2, pEGFP-N1-APOEε3, and pEGFP-N1-APOEε4 were respectively transfected into the isolated astrocytes with Lipofectamine 2000. Subcellular localization of APOE and transfection efficiency were observed by fluorescent microscopy. RT-PCR was applied to detect the expression of APOE in the astrocytes after transfection. Scratched models of the 3 genotypes astrocytes were produced, and the content of amino acids were measured by amino acid analyzer. Cell apoptosis was detected by flow cytometry (FCM). **Results** The level of Glu and Asp in the astrocytes after scratching injury reached a peak at 30 min. APOEε4 transfected astrocytes released higher levels of Glu and Asp compared with those in the other 2 groups at 30 and 60 min after injury ($P<0.05$). FCM showed that the apoptotic rate reached a peak at 24 h. APOEε4 group had significantly higher apoptotic rate than the other 2 groups at 12 and 24 h after injury ($P<0.05$). **Conclusion** APOE affects the contents of EAAs released from the astrocytes after injury in an isoform-specific manner. APOEε4 carriers may induce more severe deterioration and poorer prognosis because of EAAs toxicity.

【**Key words**】 traumatic brain injury; excitatory amino acid; astrocytes; apoptosis; plasmid

Corresponding author: Sun Xiaochuan, Tel: 86-23-89011151, E-mail: sunxch1445@gmail.com

创伤性脑损伤(traumatic brain injury,TBI)是神经外科常见病、多发病,病死率及致残率高。近年来的研究发现,载脂蛋白E(apolipoprotein E,蛋白:ApoE,基因:APOE)多态性与创伤性脑损伤预后密切相关,APOEε4是早期脑外伤病情加重和不佳预后的危险因素[1-2]。脑损伤后兴奋性氨基酸(excitatory amino

【通信作者】 孙晓川,电话:(023) 89011151,E-mail:sunxch1445@gmail.com

acids,EAAs)水平明显升高,并引起继发性脑损伤,导致预后不良[3]。本实验通过建立体外培养大鼠皮质星形胶质细胞机械性损伤模型,以APOE多态性与EAAs的关系作为切入点,初步探讨APOE影响继发性脑损伤可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

APOE敲除鼠新生2 d内乳鼠,雌雄乳鼠各50只,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及仪器

一抗兔抗鼠GFAP多克隆抗体、二抗羊抗兔FITC-IgG均购自武汉博士德生物技术公司,Lipofectamine2000(Invitrogen公司),Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物科技发展有限公司),日立L-8800型氨基酸分析仪(日本),流式细胞仪(美国)。

1.3 星形胶质细胞原代培养

大鼠AST原代培养参考McCarthy、王雪莹的方法[4-5]并加以改良,取出生1 d内乳鼠,取出脑组织并分离出两侧大脑半球皮质,去除脑膜并剪碎,加入无菌1 ml 0.25%胰蛋白酶,置37 ℃水浴振荡消化20 min后终止消化,过滤、离心(1 000 r/min)、差速粘附处理(去除成纤维细胞成分)、种于预先涂有多聚赖氨酸的塑料培养瓶中。待细胞融合后,置于37 ℃摇床,收集贴壁细胞,即可得纯度较高的星形胶质细胞。

1.4 细胞的传代培养

待原代培养细胞长满培养瓶壁时传代,加少许0.25%胰蛋白酶液消化,待细胞形态变圆时终止消化,离心,按3×10^5/ml密度继续培养,传代细胞5~7 d融合。

1.5 神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫荧光检测

传代后细胞接种于含盖玻片的24孔板,长满后,每孔分别加入少许4%多聚甲醛,室温固定30 min,以含10%羊血清、0.3% TritonX-100的PBS液在37 ℃条件下孵育封闭10 min。加一抗(兔抗鼠GFAP IgG1,按1∶100稀释),放入4 ℃冰箱过夜。PBS漂洗后加入二抗(FITC标记的羊抗兔IgG,按1∶100稀释),避光,在37 ℃水浴箱内孵育30 min。甘油封片,荧光显微镜观察并摄像记录。

1.6 重组质粒转染星形胶质细胞,并筛选稳定表达的细胞

本课题组前期构建的质粒经测序正确后,脂质体介导将3种质粒(pEGFP-N1-APOEε2、pEGFP-N1-APOEε3、pEGFP-N1-APOEε4)转染星形胶质细胞,采用G418筛选系统,筛选出3种基因型的星形胶质细胞。

1.7 PT-PCR检测3种APOE基因在星形胶质细胞中的表达

采用Trizol一步法提取3种基因型总RNA,然后反转录为cDNA,进行PCR反应,琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统拍照并进行电泳条带分析。引物序列:上游:5′-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3′,下游:5′-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3′,扩增片段长度为250 bp,反应条件:94 ℃预变性4 min;94 ℃变性30 s,67 ℃复性30 s,72 ℃延伸1 min,共35个循环;72 ℃延伸10 min。

1.8 Western blot检测ApoE蛋白在星形胶质细胞中的表达

提取转染pEGFP-N1-ApoE星形胶质细胞的总蛋白,BCA法定量蛋白浓度,取30 μg上样于SDS-PAGE中电泳2 h,转移到PVDF膜,室温封闭2 h;加一抗(兔抗人apoE抗体)4 ℃过夜,加二抗(辣根酶标记的羊抗兔IgG)37 ℃孵育1 h,加ECL试剂显色,凝胶成像系统照相。

1.9 细胞损伤模型制备

参照阙海萍等[6]方法,并加以改进,取培养有星形胶质细胞的35 mm培养皿,直视下用锋利的无菌刀片严格沿着模板的线条均匀用力地做成纵向与横向的切割以损伤胶质细胞。

1.10 兴奋性氨基酸的测定

参考文献[7],碳酸氢盐缓冲液作氨基酸测定,分别于划伤后5、30 mim,1 h,收集细胞上清液,日立L-8800型氨基酸分析仪测定3种基因型兴奋性氨基酸的含量。

1.11 细胞凋亡的测定

分别收集贴壁的星形胶质细胞,参考文献[8]于建模后6、12、24 h用流式细胞仪检测,Annexin V-FITC用绿色荧光FITC通道(FL1)检测;PI用红色荧光通道(FL2或FL3)检测。

1.12 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 星形胶质细胞鉴定

对培养的胶质细胞进行倒置显微镜形态学观察(图1)及GFAP免疫荧光检测(图2)显示绝大多数细胞为GFAP阳性,说明培养的细胞是星形胶质细胞。

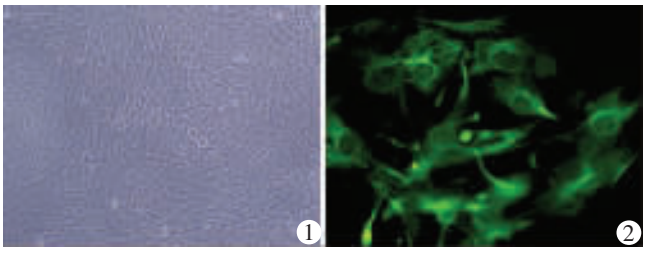


图1 星形胶质细胞原代培养 (倒置显微镜 ×100)
图2 星形胶质细胞免疫荧光鉴定 (荧光显微镜 ×400)

2.2 荧光显微镜及PT-PCR鉴定3种APOE基因在星形胶质细胞中的表达

瞬时转染24 h后,荧光显微镜下观察,转染成功的细胞表达绿色荧光蛋白,可以观察到绿色荧光(图3)。

PT-PCR分析表明:扩增条带清晰,大小(250 bp)正确,说明3种APOE基因已经成功转入星形胶质细胞中(图4)。

2.3 Western blot检测重组质粒转染星形胶质细胞后ApoE表达

星形胶质细胞转染pEGFP-N1-ApoE后,Western blot检测可见特异性条带(图5)。

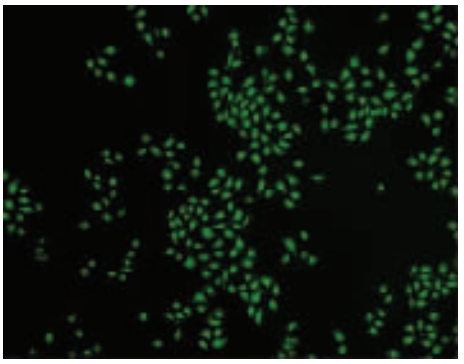
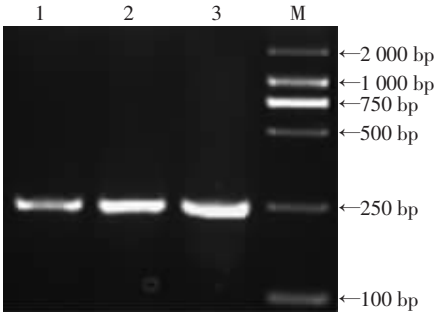
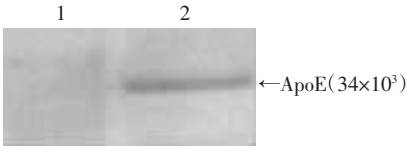


图3 星形胶质细胞转染后24 h绿色荧光蛋白的表达（荧光显微镜 ×100）



1：APOEε2组 2：APOEε3组 3：APOEε4组 M：DNA标准

图4 RT-PCR检测转染星形胶质细胞后APOE基因表达



1：转染空质粒pEGFP-N1 2：转染pEGFP-N1-APOE

图5 Western blot检测ApoE蛋白的表达

2.4 成功制备星形胶质细胞损伤模型

星形胶质细胞机械划伤后，可见划伤区域细胞胞体及突起结构完全消失，呈现一空白划痕区（图6）。

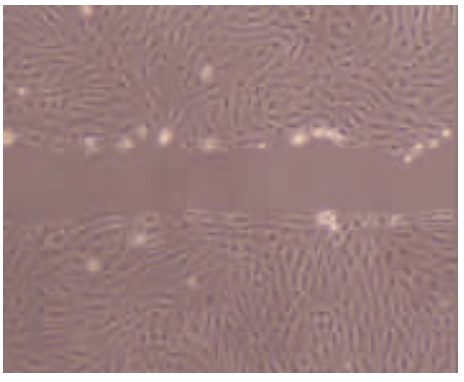


图6 星形胶质细胞划痕模型（倒置显微镜 ×100）

2.5 氨基酸浓度的测定

划伤后随着时间的延长各组细胞上清液的谷氨酸（glutamate，Glu）和天冬氨酸（aspartate，Asp）浓度明显增加，到30 min达到高峰，之后有所下降。划伤后5 min，各组细胞上清液的Glu和Asp浓度无明显差异（$P>0.05$），划伤后30、60 min，APOEε4组细胞上清液的Glu和Asp浓度显著高于APOEε2、APOEε3组（$P<0.05$）。见表1。

表1 各组细胞在不同时间内Glu和Asp含量的变化（μmol/L，$n=30$，$\bar{x}\pm s$）

组别	5 min		30 min		60 min	
	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Asp
APOEε2组	2.73±0.35	0.81±0.12	12.56±0.35[a]	3.95±0.12[a]	10.01±0.31[a]	2.25±0.13[a]
APOEε3组	2.69±0.30	0.79±0.19	12.35±0.30[a]	3.98±0.10[a]	10.21±0.32[a]	2.24±0.11[a]
APOEε4组	2.80±0.34	0.80±0.15	16.21±0.32	4.50±0.13	14.02±0.35	3.80±0.10

a：$P<0.05$，与APOEε4组比较

2.6 细胞凋亡的测定

划伤后随着时间的延长各组细胞早期凋亡率逐渐增高。划伤后6 h各组细胞的凋亡率无明显差异（$P>0.05$），划伤后12、24 h，APOEε4组细胞的凋亡率显著高于APOEε2、APOEε3组（$P<0.05$）。见表2。

表2 各组细胞在不同时间内细胞凋亡率［$n=30$，($\bar{x}\pm s$)%］

组别	6 h	12 h	24 h
APOEε2组	2.55±0.20	6.18±0.23[a]	10.11±0.29[a]
APOEε3组	2.41±0.25	6.00±0.21[a]	10.37±0.21[a]
APOEε4组	2.43±0.23	8.56±0.28	20.50±0.25

a：$P<0.05$，与APOEε4组比较

3 讨论

人类apoE主要在肝脏和脑组织合成，脑是合成apoE的第二大器官，脑中的apoE主要由星形胶质细胞和小胶质细胞合成。ApoE基因共有3个等位基因，分别为ε2、ε3和ε4，并由此产生6种基因型即apoEε2/2、ε3/3、ε4/4三种纯合子型和ε2/3、ε2/4、ε3/4三种杂合子型。脑组织中生成的apoE参与脂类/胆固醇的运送与清除，可维持脑环境中的胆固醇平衡，并在维持细胞膜和神经网络中发挥作用，在细胞膜的修复过程中，调控脂质和胆固醇的分布，对受损神经元维持其树突的可塑性至关重要，在外周神经损坏修复过程中，能以亚型特异的方式影响神经元的生长，参与骨髓鞘脂代谢及神经损伤的修复[1,9]。

近年来的研究发现，APOEε4是成人早中期AD及脑外伤不佳预后的危险因素[1]。本课题组前期研究表明APOEε4等位基因是轻、中型脑损伤患者急性期脑电图以及病情加重的危险因素[2,10]；APOEε4携带体可能通过早期创伤性炎症反应及抑制延迟整流钾电流（I_D）导致急性期伤情加重及不良预后[8,11]。

EAAs主要指谷氨酸（glutamate，Glu）和天门冬氨酸（aspartic acid，Asp），是中枢神经系统中兴奋性突触的主要神经递质。谷氨酸不仅具有营养神经、促使神经元生长发育及轴突生长等重要生理作用，同时也是一种神经毒素。EAAs通过两种机制引起细胞损伤。

一方面使 Na^+ 和 Ca^{2+} 大量内流可直接导致神经细胞水肿，与此同时重新建立细胞内外的 Na^+/K^+ 梯度又进一步消耗了能量储备。另一方面使细胞内 Ca^{2+} 的大量增加不仅可通过加强细胞氧化应激造成细胞损伤，还会激活各种脂肪酶，蛋白酶和核酸内切酶，损伤DNA、细胞蛋白和脂质，最后导致细胞死亡。此外AMPA 和天冬氨酸受体激活也可导致膜的去极化，同样会导致兴奋毒性损伤[12-13]。

目前认为脑创伤后继发性脑损害因素涉及：Glu的兴奋性神经毒性、自由基生成和脂质过氧化、Ca^{2+} 超载、炎性因子刺激及细胞凋亡等；其中 Glu 的兴奋性神经毒性是 TBI 病理生理过程中一个重要组成环节，并且伤后几天 Glu 增高在很大程度上影响着 TBI 患者的预后[14]。脑损伤后兴奋性氨基酸水平明显升高，并引起继发性脑损伤，导致预后不良[3]。

基于上述认识，本课题通过建立体外脑外伤模型，探讨氨基酸释放及其毒性是否与 APOE 具有相关性，结果表明星形胶质细胞划伤后 Glu 和 Asp 的释放较快，在划伤后 30 min 即达到高峰，且具有 APOE 亚型特异性，APOEε4 型显著高于 APOEε2、APOEε3 型。细胞早期凋亡率在 24 h 达到高峰，且 APOEε4 型显著高于 APOEε2、APOEε3 型。研究也表明 ApoE3 对兴奋性毒素（红藻氨酸）介导的神经元损伤具有保护作用，ApoE4 没有这种作用，这种 ApoE 亚型的不同作用可能与脑损伤的预后具有相关性[15]。本课题组前期研究表明：伤后早期星形胶质细胞内 Ca^{2+} 变化具有APOE 多态性，APOEε4 型星形胶质细胞 Ca^{2+} 显著高于 APOEε2、APOEε3 型[16]。Hua 等[17] 认为星形胶质细胞受到机械损伤时，导致了细胞内钙离子的升高以及 Glu 的释放，应用钙通道拮抗剂可以明显减少 Glu 的释放，进一步证明了这是一种依赖于 Ca^{2+} 的释放过程。APOEε4 增加 Glu 和 Asp 的释放，并导致细胞内 Ca^{2+} 超载较 APOEε2、APOEε3 严重，正反馈使 EAAs 释放进一步增加，进而导致 APOEε4 组细胞凋亡率较高。这可能是其影响 TBI 后病情转归及预后的机制之一。Kerr 等[18] 研究了 91 例脑外伤病人，表明含 ApoE4 等位基因病人的脑脊液中有较高浓度的天冬氨酸，且与病情的严重性呈正相关。本研究为 APOE 多态性影响脑损伤后的伤情演变和预后提供了新的实验依据，但是通过何种机制影响 EAAs 的释放仍需深入研究。

参考文献：

[1] Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy [J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(5): 333-344.

[2] Jiang Y, Sun X, Xia Y, *et al*. Effect of APOE polymorphisms on early responses to traumatic brain injury [J]. Neurosci Lett, 2006, 408(2): 155-158.

[3] 雷鹏，王钰，杨锦峰，等. 亚低温结合镁制剂对脑损伤后血清兴奋性氨基酸水平的影响 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志，2003，2(1)：51-53.

[4] McCarthy K D, de-Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue [J]. J Cell Biol, 1980, 85(3): 890-902.

[5] 王雪莹，黄绍平，陈小聪，等. SD 大鼠脑皮层星形胶质细胞的原代培养及纯化方法改良 [J]. 陕西医学杂志，2009，38(9)：1107-1110.

[6] 阙海萍，唐宁，刘少君. 原代培养大鼠脊髓神经元损伤前后 Fos、TH 及 PNMT 表达变化的研究 [J]. 神经解剖学杂志，2009，25(2)：191-195.

[7] Ye Z C, Ransom B R, Sontheimer H. (1R, 3S)-1-Aminocyclopentane-1, 3-dicarboxylic acid (RS-ACPD) reduces intracellular glutamate levels in astrocytes [J]. J Neurochem, 2001, 79(4): 756-766.

[8] Jiang Y, Sun X, Feng M, *et al*. ApoE isoforms affect early apoptosis of neuron and gial cells *via* delayed rectifying K^+ channel after experimental traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2008, 25(7): 918.

[9] Brichtova E, Kozak L. Apolipoprotein E genotype and traumatic brain injury in children--association with neurological outcome [J]. Childs Nerv Syst, 2008, 24(3): 349-356.

[10] 贺绪智，孙晓川，但炜，等. 载脂蛋白 E 基因多态性与轻-中型脑损伤急性期脑电图改变的相关性 [J]. 中华创伤杂志，2008，24(8)：619-623.

[11] 吴海涛，江涌，张晓冬，等. 载脂蛋白 E 基因多态性影响星形胶质细胞损伤后早期 NF-κB 表达的实验研究 [J]. 第三军医大学学报，2010，32(2)：103-106.

[12] Marshall L F. Head injury: Recent past, present, and future [J]. Neurosurgery, 2000, 47(3): 546-561.

[13] Leker R R, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2002, 39(1): 55-73.

[14] Shutter L, Tong K A, Holshouser B A. Proton MRS in acute traumatic brain injury: role for glutamate/glutamine and choline for outcome prediction [J]. J Neurotrauma, 2004, 21(12): 1693-1705.

[15] Buttini M, Orth M, Bellosta S, *et al*. Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe-/- mice: isoform-specific effects on neurodegeneration [J]. J Neurosci, 1999, 19(12): 4867-4880.

[16] 吴海涛，江涌，张晓冬，等. 载脂蛋白 E 基因多态性对星形胶质细胞损伤早期胞内 Ca^{2+} 浓度的影响 [J]. 中华创伤杂志，2010，26(8)：761-765.

[17] Hua X, Malarkey E B, Sunjara V, *et al*. Ca^{2+}-dependent glutamate release involves two classes of endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores in astrocytes [J]. J Neurosci Res, 2004, 76(1): 86-97.

[18] Kerr M E, Ilyas-Kamboh M, Yookyung K, *et al*. Relationship between apoE4 allele and excitatory amino acid levels after traumatic brain injury [J]. Crit Care Med, 2003, 31(9): 2371-2379.

（收稿 2010-11-08 修回 2010-12-27）

（编辑 吴培红）