文章编号:1000-5404(2012)05-0387-04

论著

氧糖剥夺、复氧后损伤星形胶质细胞中MMP-9的表达变化与意义

唐兆华,廖正步,谢延风,石全红,何朝晖,詹 彦 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

[摘要] **目的** 通过观察金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)在氧糖剥夺、复氧培养后损伤星形胶质细胞中基质的表达变化并抑制其活性,探讨其在氧糖剥夺、复氧后细胞损伤中的意义。**方法** 将星形胶质细胞分为正常组、模型组和GM6001组。模型组细胞在无糖DMEM培养基,1% O_2的培养条件下行3、5、7 h时长的氧糖剥夺后复氧至24 h。GM6001组细胞在5 h氧糖剥夺、复氧的过程中加入外源性基质金属蛋白酶抑制剂(GM6001,10 μmol/ml),复氧至24 h。用RT-PCR测定不同时长氧糖剥夺后星形胶质细胞MMP-9 mRNA表达变化,ELISA法测定细胞培养上清液中MMP-9蛋白的浓度变化;用光学显微镜观察各组的细胞形态变化,LDH漏出率、CCK-8法检测细胞的损伤情况及存活率。**结果** ①RT-PCR及ELISA法检测示:与正常组相比,氧糖剥夺、复氧后,模型组细胞MMP-9 mRNA表达量和细胞培养上清液中MMP-9蛋白的浓度均有所增加($P<0.05$),随着氧糖剥夺时间的延长,均呈现不断上升趋势;②与正常组相比,氧糖剥夺、复氧后,模型组细胞明显损伤,随着氧糖剥夺时间的延长,细胞损伤加重,光镜下细胞出现明显肿胀,并有部分细胞呈凝固性坏死,LDH漏出率不断增高($P<0.01$)、存活率则逐渐下降($P<0.05$, $P<0.01$),且培养上清MMP-9蛋白浓度与细胞LDH漏出率的增高程度呈正相关($r=0.693$,$P<0.05$);与模型组相比,5 h氧糖剥夺、复氧后,GM6001组细胞形态学损伤表现明显减轻,LDH漏出率水平也有明显下降($P<0.01$),细胞存活率则显著上升($P<0.05$)。**结论** MMP-9过表达可能是氧糖剥夺、复氧后引起细胞损伤的重要因素之一。

[关键词] 基质金属蛋白酶-9;星形胶质细胞;氧糖剥夺、复氧
[中图法分类号] R329.6; R338.1; R345 [文献标志码] A

Significance of MMP-9 expression in astrocytes after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation *in vitro*

Tang Zhaohua, Liao Zhengbu, Xie Yanfeng, Shi Quanhong, He Zhaohui, Zhan Yan (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in astrocytes after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) *in vitro*. **Methods** Astrocytes were divided into control group, OGD/R group and GM6001 group. Astrocytes in OGD/R group were treated with OGD for 3, 5, and 7 h, respectively, and then reoxygenated for 24 h. In GM6001 group, astroctyes were treated with the inhibitor of matrix metalloproteinase (GM6001, 10 μmol/ml) during 5 hours' OGD/R. The expression of MMP-9 at mRNA and protein levels in the astrocytes were detected after 24 hours' reoxygenation by RT-PCR and ELISA. The morphological alterations of cells in each group were observed by light microscopy. The cell injury was inspected by LDH activity (LDH %) and Cell Counting Kit-8 (CCK-8). **Results** Compared with normal group, as the OGD time prolonged, the expression of MMP-9 at mRNA and protein levels were increased gradually ($P<0.05$) after OGD/R, which were further increase with time elapse. OGD resulted in in significant swelling astrocytes and obviously injured with time prolonged, and some cells seemed to be coagulation necrosis, the LDH % was increased ($P<0.01$) and the survival rate was decreased severely ($P<0.05$, $P<0.01$). Protein level of MMP-9 in the supernatant was positively correlated with LDH % ($r=0.693$, $P<0.05$). Compared with OGD/R group, cell injury following 5 hours' OGD/R was remarkably decreased, as survival rate was raised significantly. **Conclusion** Over-expression of MMP-9 might be a important factor in OGD/R-induced cell injury.

[**Key words**] matrix metalloproteinase-9; astrocyte; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

Support by the National Nature Science Foundation of China(30801182). Corresponding author: Liao Zhengbu, Tel:86-23-89011150,E-mail: liaozhengbu@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30801182)
[通信作者] 廖正步,电话:(023)89011150,E-mail: liaozhengbu@hotmail.com

脑的缺血再灌注损伤是众多中枢神经系统疾病共同的重要病理过程,它的发生、发展会引起神经细胞的死亡、脑水肿、脑疝,甚至于患者死亡等严重后果[1],但是其具体的机制及临床治疗仍是一个难题。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)是脑内最重要的基质金属蛋白酶[2]。最新研究表明,MMP-9参与了脑卒中、颅脑创伤等众多神经系统疾病的发生、发展[3],它在病理情况下的过表达,能够破坏血脑屏障,引发脑水肿和脑出血等继发性脑损害[2,4-6],同时可以通过降解细胞外基质成分,造成细胞外微环境的破坏,导致神经细胞的死亡[7-8]。中枢神经系统疾病中,缺血再灌注这一重要病理过程是否是会引起MMP-9高表达,而缺血再灌注损伤神经细胞是否有MMP-9参与,这在国内外尚少见报道。所以本研究拟通过观察在不同时长体外氧糖剥夺、复氧后损伤星形胶质细胞表达MMP-9水平的变化,抑制MMP-9活性是否可以减轻细胞的损伤程度,探讨MMP-9是否参与缺血再灌引起细胞损伤。

1 材料与方法

1.1 材料

新生2 d内SD乳鼠30只,雌雄不拘(由重庆医科大学实验动物中心提供),无糖DMEM培养基(中国钮因华信),GM6001(美国Glycomed),胎牛血清(美国Gibco),神经胶质原纤维酸性蛋白(美国Sigma),细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8,CCK-8,日本同仁化学研究所),RT-PCR试剂盒(美国Ferments),蛋白测定试剂盒(碧云天),蛋白裂解试剂盒(碧云天),羊来源MMP-9体(美国Santa Cruz),兔抗羊IgG抗体(美国KPL)。

1.2 星形胶质细胞的原代培养及鉴定

取新生2 d内的SD大鼠大脑皮层,剪碎后通过200目网筛,用消化5 min,加入含10%的胎牛血清DMEM/F12培养基和D-Hanks液,离心,去除上清液,加入正常培养基吹打并接种到有多聚赖氨酸涂底的培养瓶,置于37 ℃,20% O_2,5% CO_2的孵箱1 h后,将细胞悬液换至另一培养瓶,每隔2~3 d换液1次,至第7天后,37 ℃,200 r/min水平振荡18 h,换液,待细胞长满90%~95%瓶底后传代,至第3代时得到成熟的原代星形胶质细胞[9],用神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)免疫荧光对细胞进行鉴定。

1.3 氧糖剥夺、复氧模型的复制及实验分组

氧糖剥夺、复氧模型的复制[10]:先去掉星形胶质细胞的含10%胎牛血清DMEM/F12培养基,PBS冲洗3次,换为不含血清的无糖DMEM培养基,置于1% O_2,5% CO_2的孵箱(美国Thermo)缺氧条件下,在不同时长的氧糖剥夺后,再换回含血清的DMEM/F12培养基,置于20% O_2,5% CO_2的孵箱常氧条件下,复氧培养至24 h时,进行后续的实验。

将成原代熟纯化的星形胶质细胞分为正常组、模型组和GM6001组。正常组:细胞未行氧糖剥夺、复氧及GM6001处理。模型组:细胞分别行3、5、7 h时长的氧糖剥夺后至24 h。GM6001组:细胞在5 h氧糖剥夺、复氧的过程中加入外源性基质金属蛋白酶抑制剂(GM6001,10 μmol/ml),并复氧至24 h。

1.4 星形胶质细胞的形态观察

直接在观察光学显微镜(德国Leica)下不同时长氧糖剥夺、复氧24 h时星形胶质细胞的形态变化,并予照相(德国Leica)。

1.5 乳酸脱氢酶(LDH)漏出率测定

各组星形胶质细胞按说明书进行LDH活性测定,用乳酸脱氢酶-L试剂测试待测样品中LDH漏出率,LDH漏出率=培养基LDH漏出率×100%/(细胞质LDH漏出率+培养基LDH漏出率)。

1.6 CCK-8法检测细胞的存活率

采用CCK-8试剂盒,按试剂盒说明书进行操作,最后用酶标仪检测各实验组96孔板中各孔的光密度值[D(490)]。细胞存活率=(模型组光密度值-空白组光密度值)×100%/(正常组光密度值-空白组光密度值)。

1.7 RT-PCR检测MMP-9 mRNA的表达

按照Trizol试剂说明提取各组细胞的总RNA,采用MMLV逆转录试剂盒按操作说明逆转录为cDNA,产物进行PCR。MMP-9引物:上游:5′-CCGCTAGGTTACACTCG-3′,下游:5′-GTTATGATGGTGCCACTTGA-3′,β-actin上游:5′-GCAAGTTCAACGGCACAG-3′,下游:5′-CAGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3′。产物长度分别为212、402 bp。反应体系25 μl,PCR扩增条件:94 ℃预变性5 min;94 ℃变性25 s,58 ℃退火45 s,72 ℃延伸1 min,循环30次,最后72 ℃再延伸10 min。PCR的产物以1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,结果以Quantity One系统进行电泳条带光密度值分析,MMP-9/β-actin积分光密度比值为MMP-9 mRNA表达水平。

1.8 ELISA检测培养上清MMP-9蛋白的浓度

按照ELISA试剂盒的操作说明书步骤,每个样本取细胞培养上清液100 μl,检测各组星形胶质细胞氧糖剥夺、复氧后培养上清中MMP-9蛋白的浓度。

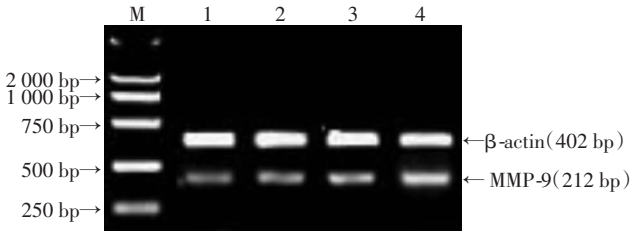
1.9 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件进行组间比较的单因素方差分析,两两比较均采用Turkey法。

2 结果

2.1 氧糖剥夺、复氧后MMP-9的表达变化

2.1.1 RT-PCR法检测MMP-9 mRNA的表达 正常组有一定量MMP-9 mRNA的表达(0.32±0.03);与正常组相比,模型组MMP-9 mRNA在3 h氧糖剥夺、复氧24 h时表达明显增加[(0.43±0.05),$P<0.05$],在5 h氧糖剥夺、复氧24 h时进一步增高[(0.57±0.07),$P<0.01$],7 h氧糖剥夺、复氧24 h时增加达最高值[(0.74±0.09),$P<0.01$,图1]。



M:DNA 标准(DL 2000);1:正常组;2-4:分别为 3、5 和 7 h 氧糖剥夺模型组

图 1　星形胶质细胞在不同时长氧糖剥夺、复氧 24 h 时 MMP-9 mRNA 的表达变化

2.1.2　ELISA 法检测培养上清中 MMP-9 蛋白的浓度　　正常组细胞培养上清液中有一定浓度的 MMP-9 蛋白(316 ± 38)pg/ml;与正常组相比,模型组培养上清液中 MMP-9 蛋白的浓度在 3 h 氧糖剥夺、复氧 24 h 时的明显增加[(403 ± 51) pg/ml, $P < 0.01$],在 5 h 氧糖剥夺、复氧 24 h 时进一步增高[(553 ± 65) pg/ml, $P < 0.01$],7 h 氧糖剥夺、复氧 24 h 时增加达最高值[(663 ± 83) pg/ml, $P < 0.01$]。

2.2　氧糖剥夺、复氧后星形胶质细胞的损伤情况

2.2.1　氧糖剥夺、复氧后细胞形态学变化　　培养成熟的原代星形胶质细胞用 GFAP 荧光染色鉴定,细胞纯度 > 95%(图 2)。光镜下:正常组:星形胶质细胞有细长突起,细胞间连接紧密(图 3A);模型组:3 h 氧糖剥夺、复氧 24 h 时细胞形态未见明显变化,细胞内有少量颗粒样物质出现(图 3B);在 5 h 氧糖剥夺、复氧 24 h 时,星形胶质细胞突起缩短,细胞肿胀变圆(图 3C);7 h 氧糖剥夺、复氧 24 h 时部分细胞已出现凝固性坏死(图 3D);与模型组 5 h 氧糖剥夺、复氧相比,GM6001 组细胞在 5 h 氧糖剥夺、复氧后 24 h 时细胞形态学损伤表现明显减轻,细胞未出现明显肿胀回缩及凝固性坏死(图 3E)。

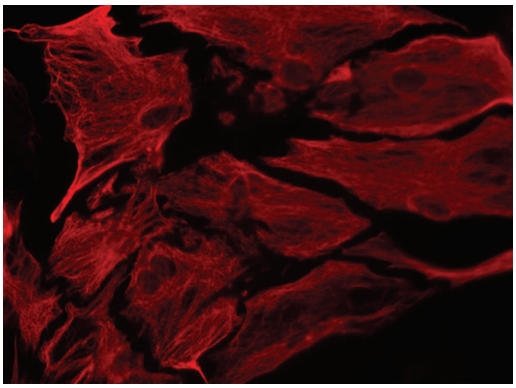


图 2　GFAP 免疫荧光染色鉴定星形胶质细胞　(荧光显微镜 ×400)

2.2.2　氧糖剥夺后星形胶质细胞 LDH 漏出率的变化　　与正常组相比,模型组细胞在不同时长的氧糖剥夺、复氧 24 h 后,LDH 漏出率均明显上升($P < 0.01$),且随着氧糖剥夺时间的延长而不断增高;与模型组 5 h 氧糖剥夺、复氧相比,GM6001 组细胞在 5 h 氧糖剥夺、复氧后 24 h 时 LDH 漏出率水平有明显下降($P < 0.05$);且 LDH 漏出率的增高程度与培养上清 MMP-9 蛋白浓度呈正相关($r = 0.693$, $P < 0.05$)。

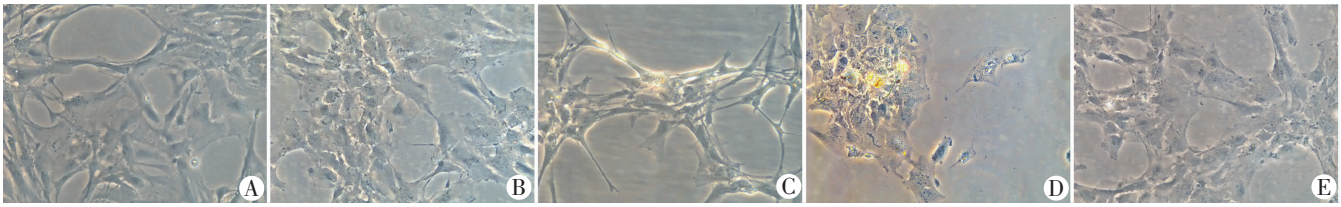
2.2.3　CCK-8 法检测星形胶质细胞的存活率　　与正常组相比,模型组细胞在不同时长的氧糖剥夺、复氧 24 h 后,细胞的存活率均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),且存活率随着氧糖剥夺时间的延长而不断降低;与模型组 5 h 氧糖剥夺、复氧相比,GM6001 组在 5 h 氧糖剥夺、复氧后 24 h 时细胞存活率明显升高($P < 0.05$)。

3　讨论

在颅脑创伤、脑卒中众多神经系统疾病中,脑的缺血再灌注损伤能引起脑出血和脑水肿和神经细胞损伤等严重继发性脑损害[11],是影响患者预后的关键病理因素,但其临床防疗和分子机制的研究都是目前的难题。

MMP-9 是金属蛋白酶家族的成员,MMP-9 在脑组织中主要由星形胶质细胞、海马神经元和小胶质细胞等细胞分泌。最新研究报道表明,MMP-9 与颅脑创伤、脑卒中和脑缺血等众多神经系统疾病都与关系密切[4-6]。MMP-9 能够破坏血脑屏障,引发脑水肿和脑出血等继发性脑损害[2, 4-6],同时可以通过降解细胞外基质成分,造成细胞外微环境的破坏,导致神经元的死亡[7-8]。但在脑的缺血再灌注损伤机制中是否有 MMP-9 的参与,目前国内外尚少见到相关报道。而体外星形胶质细胞氧糖剥夺、复氧模型可模拟众多神经系统疾病中因缺血再灌注引起的星形胶质细胞损伤,为神经细胞损伤、血脑屏障破坏和脑水肿机制的探讨,提供了重要的实验模型。所以本实验建立星形胶质细胞氧糖剥夺、复氧模型,观察氧糖剥夺、复氧后 MMP-9 与细胞损伤的相关性,并探讨其意义。

本实验中,在不同时长氧糖剥夺、复氧 24 h 后,星形胶质细胞 MMP-9 mRNA 和培养上清液中细胞分泌的 MMP-9 蛋白水平出现明显增高,随着氧糖剥夺时长的延长,表达水平也呈不断上升趋势。与此同时,光镜



A:正常组;B:模型组 3 h 时长氧糖剥夺处理;C:模型组 5 h 时长氧糖剥夺处理;D:模型组 7 h 时长氧糖剥夺处理;E:GM6001 组 5 h 时长氧糖剥压处理

图 3　各组星形胶质细胞在不同时长氧糖剥夺、复氧 24 h 时的形态学变化(LM ×200)

下可以观察到,体外氧糖剥夺、复氧模型引起了星形胶质细胞损伤,随着氧糖剥夺时间的延长,细胞损伤加重,出现明显肿胀、足突和细胞间紧密连接的破坏,甚至细胞的死亡。LDH 漏出率和 CCK-8 法检测的细胞损伤程度和细胞存活率都可以很好的反应细胞的严重形态学变化,结果显示:氧糖剥夺、复氧 24 h 后,星形胶质细胞的损伤严重,存活率降低,且氧糖剥夺的时间越长,细胞损伤加重,存活率继续下降。并且细胞损伤的严重程度与培养上清中 MMP-9 蛋白浓度呈正相关。GM6001 是外源性基质金属蛋白酶的活性抑制剂,可有效阻断 MMP-9 的活性,加入 GM6001 明显减轻了小鼠缺血性卒中后 MMP-9 过表达引起的脑组织损伤[7]。同样在本实验中加入 GM6001 后,可明显减轻 5 h 氧糖剥夺、复氧引起的星形胶质细胞形态的改变和 LDH 漏出率的升高,并能显著提高细胞的存活率。

病理状况下,MMP-9 的过度分泌和活性的增加可通过降解细胞外基质使血脑屏障受损、通透性增加,引起脑毛细血管内的水分及血浆蛋白外渗,细胞间隙内水分增多,使细胞外微环境的改变,导致细胞的死亡和水肿,以及血管源性水肿和脑出血[2,7]。Gu 等[8]在动物的体内及体外实验中均发现,MMP-9 在病理条件下的激活可以通过降解细胞外基质,诱发神经元的死亡。Chen 等[7]研究发现,体外 MMP-9 的活性阻滞剂 GM6001 可减轻高糖导致的原代神经元及少突胶质细胞的坏死及凋亡。MMP-9 敲除鼠在颅脑创伤、局灶脑缺血和短暂性全脑缺血造模型中,则有明显的保护作用[12]。本实验中氧糖剥夺、复氧后引起 MMP-9 高表达的水平与星形胶质细胞损伤的严重程度密切相关,阻断其活性可减轻细胞的损伤程度,提示 MMP-9 表达增加后可过度破坏细胞外微环境,成为氧糖剥夺、复氧后导致星形胶质细胞损伤的重要相关因素之一。已有研究发现 MMP-9 的表达变化在病理情况下受 MAPKs、NF-κB 等信号通路的调节,且星形胶质细胞在氧糖剥夺、复氧后可导致其 MAPKs 信号通路的磷酸化[13],提示了 MMP-9 在本实验氧糖剥夺、复氧后的高表达,可能是通过活化 MAPK 等信号通路后实现的[14],但病理情况下调节 MMP-9 表达及作用的具体分子信号途径仍有待于我们进一步的研究来揭示。

本研究发现氧糖剥夺、复氧后损伤星形胶质细胞中 MMP-9 表达明显升高,且细胞损伤的严重程度与细胞分泌 MMP-9 的量呈正相关,加入 GM6001 抑制其活性可减轻细胞的损伤程度,这一研究结果提示氧糖剥夺、复氧引起的 MMP-9 高表达可能是参与细胞损伤的重要因素之一。本研究结果为进一步研究中枢神经系统疾病中,缺血再灌注损伤病理过程的分子机制研究和寻找临床治疗靶点,提供了新思路。

参考文献:

[1] 袁野, 杨俊卿, 周岐新. 脑缺血再灌注致小鼠神经元退行性变进程中自由基水平和 SOD-1 表达的变化[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(12): 1211-1215.

[2] Rosenberg G A. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases[J]. Lancet Neurol, 2009, 8(2): 205-216.

[3] 陈佳琳, 姚声涛, 陈良勇, 等. 米诺环素对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(17): 1847-1850.

[4] Akamatsu Y, Saito A, Fujimura M, *et al*. Stachybotrys microspora triprenyl phenol-7, a novel fibrinolytic agent, suppresses superoxide production, matrix metalloproteinase-9 expression, and thereby attenuates ischemia/reperfusion injury in rat brain[J]. Neurosci Lett, 2011, 503(2): 110-114.

[5] Higashida T, Kreipke C W, Rafols J A, *et al*. The role of hypoxia-inducible factor-1α, aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2011, 114(1): 92-101.

[6] Switzer J A, Hess D C, Ergul A, *et al*. Matrix metalloproteinase-9 in an exploratory trial of intravenous minocycline for acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2011, 42(9): 2633-2635.

[7] Chen J, Cui X, Zacharek A, *et al*. White matter damage and the effect of matrix metalloproteinases in type 2 diabetic mice after stroke[J]. Stroke, 2011, 42(2): 445-452.

[8] Gu Z, Kaul M, Yan B, *et al*. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death[J]. Science, 2002, 297(5584): 1186-1190.

[9] Rao K V, Reddy P V, Curtis K M, *et al*. Aquaporin-4 expression in cultured astrocytes after fluid percussion injury[J]. J Neurotrauma, 2011, 28(3): 371-381.

[10] Panickar K S, Polansky M M, Anderson R A. Cinnamon polyphenols attenuate cell swelling and mitochondrial dysfunction following oxygen-glucose deprivation in glial cells[J]. Exp Neurol, 2009, 216(2): 420-427.

[11] 唐兆华, 廖正步, 蒋光元, 等. 水通道蛋白 4 在缺氧缺糖后水肿星形胶质细胞中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(13): 1387-1390.

[12] Lee S R, Tsuji K, Lee S R, *et al*. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 2004, 24(3): 671-678.

[13] Dong Y, Liu H D, Zhao R, *et al*. Ischemia activates JNK/c-Jun/AP-1 pathway to up-regulate 14-3-3gamma in astrocyte[J]. J Neurochem, 2009, 109 Suppl 1: 182-188.

[14] Ranaivo H R, Zunich S M, Choi N, *et al*. Mild stretch-induced injury increases susceptibility to interleukin-1β-induced release of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes[J]. J Neurotrauma, 2011, 28(9): 1757-1766.

(**收稿**:2011-10-05;**修回**:2011-11-23)

(编辑 王小宴)