文章编号:1000-5404(2013)13-1323-04

论著

人 CR1-SCR1-3 蛋白对急性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

杨绍俊, 张 璇, 路延之,汪正清 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室)

[摘要] **目的** 探讨补体活化在大鼠急性脑缺血再灌注中的作用及人补体受体1型SCR1-3蛋白(CR1-SCR1-3)的保护作用。**方法** 健康雄性SD大鼠75只,采用完全随机设计分组法分为假手术组($n=15$)、CI/R组($n=30$)及CI/R+CR1-SCR1-3组($n=30$)。线栓法建立大鼠大脑中动脉栓塞模型,缺血1 h,再灌注24 h,对大鼠进行行为学检测,记录神经功能缺陷评分;TTC染色法测定脑梗死体积;制作脑匀浆测定大脑皮层髓过氧化物酶(MPO)活性、丙二醇(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性;制备切片观察大脑皮质区补体C4b沉积及病理改变。**结果** 缺血再灌注24 h后,CR1-SCR1-3蛋白可明显改善CI/R+CR1-SCR1-3组大鼠神经功能($P<0.05$);脑梗死体积亦明显减少($P<0.01$);与CI/R组比较,CI/R+CR1-SCR1-3组MPO活力、MDA含量显著降低($P<0.01$),而SOD活性显著增高($P<0.01$);缺血脑组织皮质区原位补体C4b沉积显著减少($P<0.01$),病理损伤亦明显减轻。**结论** 补体活化参与了脑缺血再灌注损伤过程,CR1-SCR1-3蛋白对大鼠急性CI/R损伤具有保护作用。

[关键词] 补体;人补体受体1型;短同源重复1-3;大脑中动脉栓塞;脑缺血再灌注损伤;炎症
[中图法分类号] R392.32; R743.31 [文献标志码] A

Protective effect of CR1-SCR1-3 protein on acute cerebral ischemia and reperfusion injury in rats

Yang Shaojun, Zhang Xuan, Lu Yanzhi, Wang Zhengqing (Department of Microbiology, Chongqing Laboratory of Microbial Engineering, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of complements on acute cerebral ischemia and reperfusion (CI/R) injury and the protective effect of complement receptor 1 (CR1)-SCR1-3 protein. **Methods** A total of 75 adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups including a sham operation group ($n=15$), a CI/R injury group ($n=30$) and a CI/R injury + CR1-SCR1-3 group ($n=30$). Transient focal cerebral ischemia was induced by intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) method. After MCAO for 1 h and reperfusion for 24 h, the effects of CR1-SCR1-3 protein on neurological deficits and cerebral infarct size were detected by neurofunctional deficit score and TTC staining, respectively. The activities of myeloperoxidase (MPO) and superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in cerebral cortex were determined. The deposition of C4b in cerebral cortex and the pathological changes were also assessed. **Results** After CI/R injury for 24 h, CR1-SCR1-3 could significantly improve rat neurological functions ($P<0.05$) and lead to a reduction in cerebral infarct size ($P<0.01$). Pretreatment with CR1-SCR1-3 could decrease the MPO activity ($P<0.01$) and the content of MDA ($P<0.05$), and increase the SOD activity in cerebral cortex ($P<0.01$). Decreased C4b deposition as well as improved pathological changes were also observed in the CI/R injury + CR1-SCR1-3 group ($P<0.01$). **Conclusion** Complement activation plays a critical role in CI/R injury, and CR1-SCR1-3 possesses a protective effect by inhibiting the over-activation of complement system.

[**Key words**] complement; CR1; SCR1-3; MCAO; CI/R; inflammation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30471723) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5011). Corresponding author: Wang Zhengqing, Tel: 86-23-68752744, E-mail: wangzhengqing1953@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30471723);重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5011)
[通信作者] 汪正清,电话:(023)68752744,E-mail:wangzhengqing1953@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130329.1016.014.html(2013-03-29)

缺血性脑血管病具有很高的发病率、致残率及致死率,是目前严重威胁人类健康的主要疾病之一。脑缺血发生后,血流恢复供应时会引发脑内强烈的免疫应答,继发缺血后第2次炎症损伤,即脑缺血再灌注(cerebral ischemia and reperfusion, CI/R)损伤[1]。研究证实:补体系统过度激活所产生的效应片段是引起脑缺血再灌注炎症损伤的主要因素[2]。目前尚无特异有效的补体抑制剂能满足临床应用的需要。补体受体1型SCR1-3功能域具有结合C4b的能力,从而抑制C3/C5转化酶,对经典、MBL及旁路3条补体活化途径均有不同程度的抑制作用,减少炎症效应片段C3a、C5a及C5b-9等的产生,抑制CI/R损伤的发生与发展。我们研究发现,CR1-SCR15-18蛋白可以通过抑制补体经旁路活化,减轻大鼠大脑I/R的炎症损伤,但保护作用不完全[3]。本室前期成功克隆了CR1-SCR1-3蛋白,并证实具有良好的体外抑制补体生物学活性[4]。本研究拟采用线栓法构建大鼠中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,进一步证实补体在大鼠急性脑缺血再灌注损伤中的作用,并观察CR1-SCR1-3蛋白对脑缺血再灌注损伤的保护效应。

1 材料与方法

1.1 材料

重组酵母菌pPIC9k-CR1-SCR1-3由本室保存,成年健康雄性SD大鼠75只,体质量(250±20)g,由第三军医大学实验动物中心提供。TTC染液、MPO、MDA以及SOD检测试剂盒购自南京建成生物公司,兔抗人C4b抗体购自Santa Cruz,生物素标记山羊抗兔IgG购自Sigma公司,SABC试剂盒购自Vector公司,中性树胶、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥,苏木精及伊红染液购自碧云天生物技术研究所。

1.2 CR1-SCR1-3蛋白的制备

参照我室方法[5]对重组酵母菌pPIC9k-CR1-SCR1-3进行复苏,1%无水甲醇诱导表达,收集96 h诱导表达上清,镍柱亲和层析纯化,体外CH50溶血实验测定蛋白抑制补体的生物学活性。

1.3 动物分组及CI/R模型构建

75只健康雄性SD大鼠完全随机设计分组法分为3组:假手术组15只,CI/R组30只,CI/R+CR1-SCR1-3组30只。于术前1 h,CI/R+CR1-SCR1-3组经尾静脉注射含1% CR1-SCR1-3的0.01 mol/L PBS(依据文献[3]及预实验结果确定剂量为15 mg/kg),假手术及CI/R组注射同剂量的0.01 mol/L PBS。具体手术操作参见本室前期文献[6]。

1.4 实验指标观测

1.4.1 神经功能缺失评分 按改良Zea Longa 5分制[7]对术后1 h及24 h的3组大鼠进行神经功能缺失评分。评分标准:0分=无神经缺损体征;1分=向左不能充分屈曲对侧前爪;2分=向左麻痹侧打转;3分=向左麻痹侧倾倒;4分=不能自发行走,意识丧失;5分=死亡。

1.4.2 脑梗死体积测定 采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色法。大鼠(假手术组随机取5只,CI/R组和CR1-SCR1-3组随机取10只)于缺血再灌注24 h后断头取脑速冻20 min,行2 mm冠状切片,置于2% TTC溶液中37 ℃孵育30 min。正常脑组织着红色,梗死脑组织不着色。根据苍白区和红色区,计算梗死体积。计算公式:梗死体积V=t(A1+A2+…+An)-t(A1+An),其中t为切片的厚度,A为每个纵切面的梗死体积。

1.4.3 髓过氧化物酶(MPO)活性、丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 缺血再灌注24 h后,断头处死迅速取大鼠缺血侧大脑皮层组织(假手术组随机取5只,CI/R组和CI/R+CR1-SCR1-3组各随机取10只),预冷的生理盐水漂洗,制备10%大脑组织匀浆。严格按照试剂盒说明测定MPO活性,MDA含量以及SOD活性。

1.4.4 脑组织原位补体C4b检测 常规石蜡切片免疫组织化学染色法观察各组大鼠(假手术组随机取5只,CI/R组和CI/R+CR1-SCR1-3组各随机取10只)大脑皮质区补体C4b的沉积。一抗为兔抗人C4b抗体,二抗为生物素标记山羊抗兔IgG,SABC孵育1 h,DAB显色,苏木精染液复染胞核。

1.4.5 病理学检查 常规石蜡切片HE染色后光镜下观察各组大鼠缺血侧大脑皮质区的病理学改变。

1.5 统计学处理

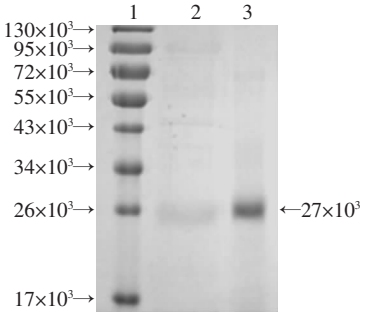
结果以$\bar{x}\pm s$表示,神经功能缺陷评分数据采用SPSS 17.0软件进行单因素非参数方差分析,脑梗死体积、MPO活性、MDA含量以及SOD活性数据行单因素方差分析。

2 结果

2.1 CR1-SCR1-3蛋白的表达、纯化及活性鉴定

目的蛋白CR1-SCR1-3经硫酸铵浓缩沉淀,透析除盐,采用镍柱亲和层析纯化,低浓度咪唑洗脱杂蛋白,高浓度咪唑洗脱目的蛋白,取目的蛋白峰行SDS-PAGE电泳(图1),结果显示经镍柱一步纯化可得到纯度较高的CR1-SCR1-3蛋白。

采用CH50法,测定不同浓度梯度下(0、1、5、25、50、125、250 μg/mL) CR1-SCR1-3的补体抑制活性。结果显示50 μg/mL的CR1-SCR1-3即能抑制50%左右的总补体活性,并在测定浓度范围之内,随着蛋白浓度的增加,补体抑制活性不断升高,当蛋白浓度为250 μg/mL时,补体抑制活性比可达80%。



1:标准;2:纯化前;3:纯化后

图1 CR-SCR1-3蛋白的表达纯化结果

2.2 CR1-SCR1-3 蛋白对大鼠神经功能及梗死体积的影响

缺血再灌注 1 h 后,假手术组评分结果有轻微影响,CI/R + CR1-SCR1-3 组与 CI/R 组评分无显著性差异($P>0.05$);而术后 24 h 假手术组评分结果为 0,CI/R 组神经功能缺失评分极显著高于 CI/R + CR1-SCR1-3 组($P<0.01$,表 1)。

表 1 CR1-SCR1-3 蛋白对各组大鼠神经功能的影响(分,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	术后 1 h	术后 24 h
假手术组	15	0.33 ± 0.48	0
CI/R 组	30	2.65 ± 0.30[a]	3.58 ± 0.30[a]
CI/R + CR1-SCR1-3 组	30	2.38 ± 0.23[a]	2.62 ± 0.21[ab]

a: $P<0.01$,与假手术组比较;b: $P<0.05$,与 CI/R 组比较

采用 TTC 染色法对各组别大鼠大脑切片进行染色处理,结果发现 CI/R 组大脑缺血侧有明显梗死迹象,灰白色区域明显,而 CI/R + CR1-SCR1-3 组大脑梗死体积明显下降,经统计分析处理结果显示,CI/R + CR1-SCR1-3 组大脑梗死体积显著低于 CI/R 组($P<0.01$,表 2)。

表 2 CR1-SCR1-3 蛋白对各组大鼠脑梗死体积及 MPO、MDA 及 SOD 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	脑梗死体积 (mm^3)	MPO (U/g)	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)
假手术组	5	8.51 ± 5.00	0.36 ± 0.08	6.73 ± 0.34	300.11 ± 3.51
CI/R 组	10	235.31 ± 32.53[b]	1.46 ± 0.09[b]	16.24 ± 1.52[b]	136.05 ± 3.55[b]
CI/R + CR1-SCR1-3 组	10	85.40 ± 38.62[bc]	0.92 ± 0.07[bc]	8.48 ± 0.68[ac]	238.98 ± 10.83[bc]

a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与假手术组比较;c: $P<0.01$,与 CI/R 组比较

2.3 CR1-SCR1-3 蛋白对大鼠 MPO、MDA 水平及 SOD 活力的影响

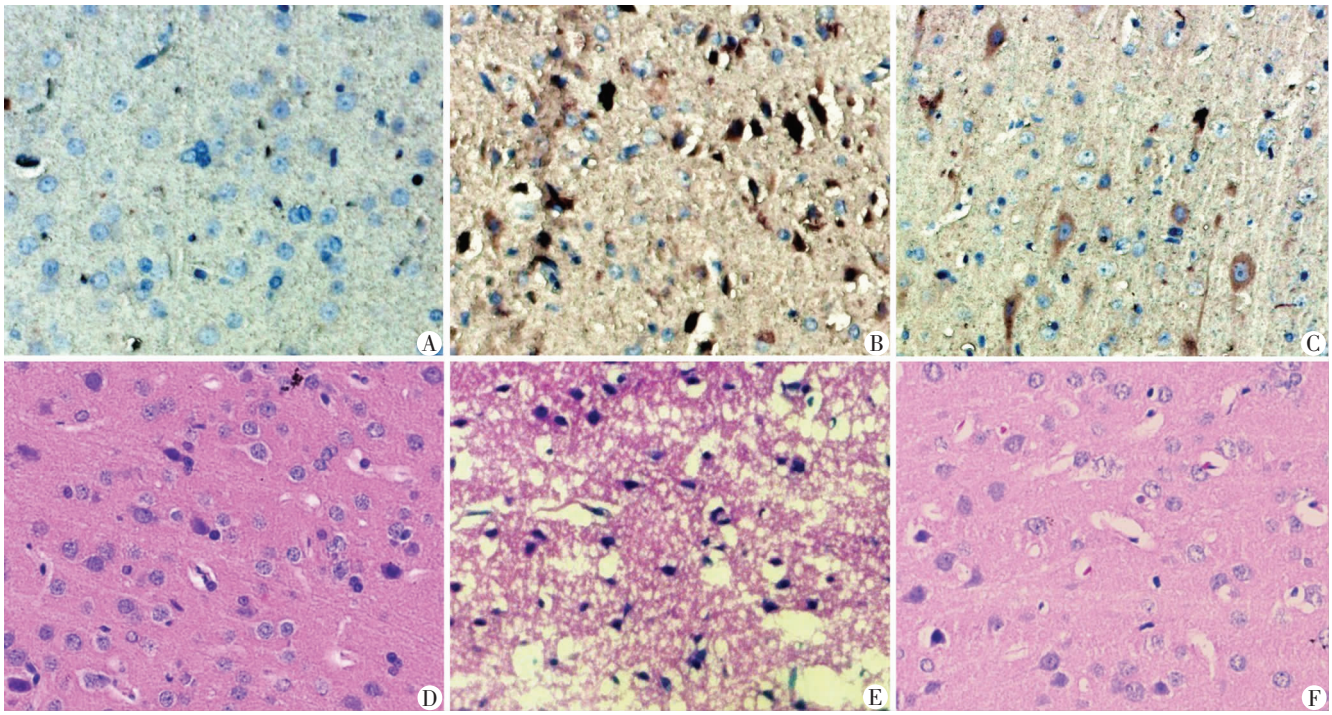
手术 24 h 后,试剂盒检测各组别大脑皮层组织 MPO 水平,假手术组 MPO 水平较低,CI/R 组和 CI/R + CR1-SCR1-3 组 MPO 水平都有所升高($P<0.01$),但 CI/R 组 MPO 水平显著高于 CI/R + CR1-SCR1-3 组($P<0.01$,表 2)。

MDA 统计结果(表 2)显示:CI/R 组 MDA 水平显著高于 CI/R + CR1-SCR1-3 组和假手术组($P<0.01$),而假手术组与 CI/R + CR1-SCR1-3 组 MDA 水平无显著差异($P>0.05$)。SOD 活性统计结果表明 CI/R 组和 CI/R + CR1-SCR1-3 组 SOD 活性均有所下降($P<0.01$),但 CI/R 组 SOD 活力极显著低于 CI/R + CR1-SCR1-3 组($P<0.01$,表 2)。

2.4 C4b 免疫组织化学染色检测大脑皮层 C4b 沉积及组织病理学改变

免疫组织化学染色结果显示:与假手术组(SO)相比(图 2A),CI/R 组大脑皮质区可见大量 C4b 沉积(图 2B),而 CI/R + CR1-SCR1-3 组仅见少量 C4b 沉积(图 2C),沉积量明显少于 CI/R 手术组($P<0.05$)。

HE 染色结果显示:假手术组(SO)大脑皮层实质致密,神经元形态正常,未见病理改变(图 2D);CI/R 组大脑皮层实质水肿,组织疏松、间隙增大,可见大量神经细胞核染色质凝集,呈固缩状态,胞体缩小变性,胶质细胞增生(图 2E);CI/R + CR1-SCR1-3 组见个别细胞间隙增大,大脑皮层有轻微水肿,上述病理改变明显减轻(图 2F)。



A、D:假手术组;B、E:CI/R 组;C、F:CI/R + CR1-SCR1-3 组;A ~ C:SABC;D ~ F:HE

图 2 各组大鼠大脑皮层 C4b 免疫组织化学染色与 HE 染色结果 (×200)

3 讨论

补体是广泛分布于正常人血清,组织液以及多种细胞表面的一组活化后具有酶活性的蛋白质。研究表明补体系统的过度活化介导了机体一系列的病理生理反应:如毛细血管扩张,通透性增加,中性粒细胞的吸附积聚,细胞因子及血管活性介质的释放,细胞毒作用以及组织的炎症损伤等[8]。缺血再灌注炎症损伤的发病机制十分复杂,1971年Hill等[9]首次报道补体与缺血再灌注损伤密切相关。近年来研究[8,10]亦表明补体活化所产生的炎症效应片段(如C3a、C4a、C5a等)是引起脑缺血再灌注炎症损伤的主要始动因子。当CI/R发生后,它们之间共同作用,可加重对脑组织炎症损伤。

CR1是广泛分布于多种细胞表面的膜糖蛋白,由胞内区、跨膜区及胞外区3部分组成,它拥有2个结合C3b和1个结合C4b的活性中心功能域:C3b结合域为CR1-SCR8-10和CR1-SCR15-17,C4b的结合域为CR1-SCR1-3[11-12]。前期实验我们观察到CR1-SCR15-18对心肌和脑缺血再灌注损伤[6,13]的确具有保护作用,但其保护作用不完全,CR1-SCR1-3可结合C4b,对C3/C5转化酶均有抑制作用,理论上是一种优于CR1-SCR15-18蛋白的有效小分子补体抑制剂。本室制备了可结合C4b的CR1-SCR1-3蛋白,它可抑制C3/C5转化酶,使C3a、C5a及C5b-9等炎症片段的生成减少,结果表明它可显著改善CI/R大鼠神经功能,并减少大鼠大脑梗死体积。

MPO是中性白细胞中所特有的一种胞内酶,每个细胞酶含量一定,其酶活性可间接反映组织中PMN的数量,指示炎症反应的程度。此外,机体组织可通过酶系统和非酶系统产生氧自由基,攻击生物膜中多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化。MDA含量结合SOD活力的高低可很好反映出组织细胞受炎症损伤的严重程度。检测结果显示:CR1-SCR1-3蛋白可降低CI/R+CR1-SCR1-3组中性白细胞浸润程度,减轻炎症反应。同时CR1-SCR1-3蛋白还可保护机体免受过氧化作用,过氧化脂质及氧自由基明显减少,提示CR1-SCR1-3蛋白可能参与了机体氧化应激损伤的调控作用,其机制有待进一步实验证实。

免疫组化检测C4b沉积结果显示:CI/R组补体C4b表达明显升高,说明补体系统被过度活化,提示补体活化参与了脑缺血再灌注炎症损伤过程。HE染色发现CI/R组大量细胞核固缩,染色质聚集,组织间隙明显增大,形态异常,有较多胶质细胞增生,大脑皮层出现实质性水肿并伴有细胞坏死迹象;而CI/R+CR1-SCR1-3组大脑皮层补体C4b沉积显著减少,表明CR1-SCR1-3参与了补体活化的调节,其病理损伤亦明显减轻。

综上所述:补体活化是引起脑缺血再灌注炎症损伤的重要原因之一,CR1-SCR1-3蛋白可结合缺血侧大脑皮层补体C4b,抑制C3/C5转化酶,调节补体系统过度活化,同时CR1-SCR1-3蛋白还可抑制中性白细胞的浸润积聚,防止活性氧等自由基对脑组织细胞造成严重炎症损伤,减轻炎症反应程度,对急性脑缺血再灌注损伤起到一定的保护作用。

参考文献:

[1] Arumugam T V, Magnus T, Woodruff T M, *et al*. Complement mediators in ischemia-reperfusion injury[J]. Clin Chim Acta, 2006, 374(1/2): 33-45.

[2] Saver J L. Improving reperfusion therapy for acute ischaemic stroke[J]. J Thromb Haemost, 2011, 9(Suppl 1): 333-343.

[3] 何莉, 杨永涛, 郭金光, 等. sCR1-SCR15-18蛋白减轻补体介导的大鼠脑缺血/再灌注损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(12): 2436-2440.

[4] 杨绍俊, 张璇, 汪正清. 人补体受体1型SCR1-3功能域基因的克隆表达及生物活性鉴定[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(1): 64-68.

[5] 刘高科, 何莉, 杨永涛, 等. 人补体受体1型活性片段SCR15-18在毕赤酵母中的表达、纯化及活性鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(6): 470-473.

[6] Li S, Xian J, He L, *et al*. The protective effect of SCR(15-18) on cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Neurol Res, 2011, 33(8): 866-874.

[7] Costa C, Zhao L, Shen Y, *et al*. Role of complement component C5 in cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Brain Res, 2006, 1100(1): 142-151.

[8] Ducruet A F, Zacharia B E, Hickman Z L, *et al*. The complement cascade as a therapeutic target in intracerebral hemorrhage[J]. Exp Neurol, 2009, 219(2): 398-403.

[9] Hill J H, Ward P A. The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats[J]. J Exp Med, 1971, 133(4): 885-900.

[10] Komotar R J, Starke R M, Arias E J, *et al*. The complement cascade: new avenues in stroke therapy[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2009, 7(3): 287-292.

[11] Furtado P B, Huang C Y, Ihyembe D, *et al*. The partly folded back solution structure arrangement of the 30 SCR domains in human complement receptor type 1 (CR1) permits access to its C3b and C4b ligands[J]. J Mol Biol, 2008, 375(1): 102-118.

[12] Liu D, Niu Z X. The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35)[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2009, 31(4): 524-535.

[13] 谭兵, 兰阳军, 张德纯, 等. 重组人可溶性补体受体1型SCR15-18片段对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(11): 1037-1040.

(**收稿**:2012-12-04;**修回**:2013-03-20)

(编辑 邓强庭)