论著

文章编号:1000-5404(2014)13-1386-04

过表达 Fibulin-5 对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的保护作用

程 创,秦新月,郭 佳,燕伟平,徐广会,白永生 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨过表达 Fibulin-5 对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的保护作用及其可能的机制。**方法** 将112只成年雄性SD大鼠分成4组:假手术组(S)、脑缺血组(I/R)、脑缺血加过表达Fibulin-5腺病毒载体干预组(I/R + Ad-FBLN)以及脑缺血加空腺病毒载体干预组(I/R + Ad-HK)。大鼠在大脑中动脉阻塞前7 d接受腺病毒注射,再灌注后24 h,采用Western blot、RT-PCR和免疫荧光检测各组大鼠脑组织Fibulin-5和紧密连接蛋白occludin的表达;伊文思蓝漏出评估血脑屏障的通透性;TTC染色检测脑梗死体积并进行神经功能缺损评分。**结果** 脑缺血再灌注24 h,与S组比较,I/R组大鼠伊文思蓝明显漏出($P<0.01$),伴有紧密连接蛋白occludin表达降低($P<0.01$)。I/R + Ad-FBLN组Fibulin-5的mRNA水平和蛋白水平明显高于其他3组($P<0.01$),伊文思蓝漏出明显减少($P<0.01$),occludin的表达明显增高($P<0.01$),TTC梗死灶明显缩小($P<0.01$),神经功能缺损明显减轻($P<0.01$)。而I/R + Ad-HK组与I/R组之间差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 过表达Fibulin-5减轻大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的损害,Fibulin-5促进紧密连接蛋白occludin的表达可能是其保护作用的机制之一。

[关键词] Fibulin-5;脑缺血再灌注;血脑屏障;occludin
[中图法分类号] R-332; R363.22; R743.31 [文献标志码] A

Fibulin-5 over-expression protects blood brain barrier in rats after cerebral ischemia/reperfusion injury

Cheng Chuang, Qin Xinyue, Guo Jia, Yan Weiping, Xu Guanghui, Bai Yongsheng (Department of Neurology, Chongqing Key Laboratory of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of adenovirus mediated over-expression of Fibulin-5 on blood brain barrier leakage in rats after cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury and investigate the possible underlying potential mechanism. **Methods** A total of 112 adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group, cerebral I/R group, I/R plus AD-Fibulin-5 group, and I/R plus AD-HK group. Adenovirus carrying fibulin-5 gene (AD-Fibulin-5) or blank adenovirus (AD-HK) were injected into the right cortex and hippocampus of the rats from the latter 2 groups. In 7 d after gene transfer, the rats, except for those of the sham operation group, underwent 90 min of ischemia and then were reperfused for 24 h. The expression of fibulin-5 and occluding in the brain tissue were detected by Western blotting, RT-PCR and immunohistochemical assay. Evan-blue extravasation was used to measure the permeability of blood brain barrier. TTC staining was employed to observe the cerebral infarct volume. Neurological function was also evaluated. **Results** Intervention of AD-Fibulin-5 resulted in significantly increased expression of fibulin-5 at protein and mRNA levels ($P<0.01$), smaller amount of Even-blue leakage ($P<0.01$), enhanced expression of occludin ($P<0.01$), obviously decreased infarct volumes ($P<0.01$), obviously milder neurological impairment ($P<0.01$) when compared to the other groups. **Conclusion** Over-expression of Fibulin-5 attenuates blood brain barrier leakage in rats after cerebral I/R injury, which might be due to its enhancing the expression of occludin.

[**Key words**] Fibulin-5; cerebral ischemia/reperfusion; blood brain barrier; occludin

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271307). Corresponding author: Qin Xinyue, Tel: 86-23-89012008, E-mail: qinxinyue@yahoo.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271307)
[通信作者] 秦新月,电话:(023)89012008,E-mail:qinxinyue@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140116.1056.007.html(2014-01-16)

血管内皮间致密的紧密连接蛋白是血脑屏障发挥其“选择性通透屏障”的关键因素[1]。研究发现紧密连接蛋白的表达主要受血脑屏障周围环境和血脑屏障结构改变的影响[2]。脑缺血再灌注发生后局部脑组织缺氧,内皮细胞凋亡,细胞外基质降解,血脑屏障完整结构瓦解,因而紧密连接蛋白表达减少,血脑屏障通透性增加。Fibulin-5 是细胞外基质家族 Fibulin 中的一员[3],可以通过整合素受体增强内皮细胞与细胞外基质的黏附[4],维持血脑屏障结构单元的完整。鉴于内皮细胞与细胞外基质的黏附能促进紧密连接蛋白的表达[5],Fibulin-5 可能通过整合素促进内皮细胞间紧密连接蛋白的表达。此外 Fibulin-5 还能与其他细胞外基质竞争性结合整合素受体,干预整合素信号通路的传导,从而增强内皮细胞对体内环境变化(例如缺氧)的适应,稳定内皮细胞的存活[6],并减少整合素通路信号传导引起的活性氧族(reactive oxygen species, ROS)释放[7]。因此,我们推测 Fibulin-5 可能是一个潜在的具有血脑屏障保护作用的蛋白。本实验采用过表达 Fibulin-5 腺病毒载体颅内立体定位注射的方式,使大鼠局部脑组织过表达 Fibulin-5,观察 Fibulin-5 对大鼠脑缺血再灌注损伤后紧密连接蛋白 occludin 及血脑屏障通透性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

成年雄性 SD 大鼠 112 只,体质量 200 ~ 250 g,购于重庆医科大学实验动物中心。过表达 Fibulin-5 腺病毒(上海纽恩生物公司),兔抗 Fibulin-5(美国 Minipore 公司),兔抗 occludin(美国 Invitrogen 公司),小鼠抗大鼠内皮细胞抗原(RECA1,用于标记内皮细胞,美国 AbD 公司),伊文思蓝染料(美国 Sigma 公司),总蛋白及膜蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技公司),RNA 提取,逆转录及扩增试剂盒(TaKaRa 公司),山羊抗兔二抗(北京四正柏公司),抗鼠 dylight649 荧光二抗(碧云天公司),抗兔 TRITC 荧光二抗(武汉博士德公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 112 只大鼠分成 4 组,即假手术组(S)、脑缺血组(I/R)、脑缺血加过表达 Fibulin-5 腺病毒载体干预组(I/R + Ad-FBLN)以及脑缺血加空腺病毒载体干预组(I/R + Ad-HK),每组 28 只,其中 Western blot 检测 8 只(4 只用于膜蛋白,4 只用于总蛋白),免疫荧光、TTC、伊文思蓝、RT-PCR、绿色荧光蛋白检测各 4 只,所有大鼠在处死前进行神经功能评分。I/R + Ad-FBLN 组及 I/R + Ad-HK 组的大鼠在脑缺血前 7 d 接受腺病毒或空腺病毒注射,各组大鼠在脑缺血再灌注后 24 h 检测 Fibulin-5 表达、血脑屏障的通透性、脑梗死面积、紧密连接蛋白的表达及神经功能缺损情况。

1.2.2 腺病毒立体定位注射 以前囟为坐标原点,右侧两点皮质:(2,1, -1.5) mm;(2, -3.0, -1.5) mm,以及一点海马:(2.5, -3.5, -3.5) mm 作为靶点[8]。过表达 Fibulin-5 腺病毒(6.3×10^{10} TU/mL)或者空载体腺病毒(7.6×10^{10} TU/mL)分别注射到以上 3 点,每个点注射腺病毒 2 μL,注射速度:0.2 μL/min,注射完毕后保持注射针在原位 5 min。

1.2.3 大脑中动脉阻塞模型建立 采用本课题组前期的实验方法[8],并结合 Longa 评分[9],1 ~ 3 分的大鼠纳入实验,0 分与 4 分以及在取材时发现有蛛网膜下腔出血者剔除实验组,并从同批次实验大鼠中随机抽取补齐。

1.2.4 Western blot 检测 按照蛋白提取说明书提取出总蛋白及膜蛋白分别用于 Fibulin-5 及 occludin 的检测。蛋白样品在 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中分离后,转移至 PVDF 膜上,Fibulin-5 一抗(1∶900),occludin 一抗(1∶100)4 ℃孵育过夜,二抗(1∶3 000)室温孵育 2 h 后,Bio-Rad 凝胶扫描成像。

1.2.5 RT-PCR 检测 收集标本的工具灭酶处理,其他类似于 Western blot。参照 RNA 提取及逆转录试剂盒说明书萃取组织 DNA 于 -20 ℃保存。Fibulin-5 上游(21 bp):5′-TCGTCTG-CGAGGAGCCTTATC-3′,下游(20 bp):5′-AGGGTATCGGGTC-GTTGCTT-3′;occludin 上游(22 bp):5′-TGAACTCTCAGGAAAC-CCAAGG-3′,下游(24 bp):5′-CACTT CTCTGCTTGTGTGTCCG-3′;β-actin 上游(20 bp):5′-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3′,下游(20 bp):5′-CCCATACCCACCATCACACC-3′。按照 SYBR Prime Scripttm RT-PCR 试剂盒说明书,进行聚合酶链反应。

1.2.6 免疫荧光检测 为检测腺病毒的扩散,再灌注后 24 h,激光共聚焦观察 GFP 荧光。为行免疫荧光双标记,冰冻切片分别与 RECA1 和 occludin 一抗及相应的荧光二抗孵育,共聚集显微镜观察。

1.2.7 血脑屏障通透性检测 4% 的伊文思蓝按照 3 mL/kg 从大鼠尾静脉注入,2 h 后从左心室灌流冰生理盐水 200 mL,断头取脑并称量,脑组织与甲酰胺匀浆后 60 ℃孵育 24 h,离心后取上清液并测量其在 630 nm 波长下的光密度值,参照伊文思蓝的标准曲线计算出脑组织中伊文思蓝的含量。

1.2.8 TTC 染色及神经功能评估 TTC 染色参照文献[9]的方法,利用软件测定脑梗死体积百分比。神经功能评估采用评分者单盲的方法,参照 Shen 等[10]的评分标准进行评分,最低 3 分,最高 18 分,得分越低表明神经功能缺损越严重。

1.3 统计学分析

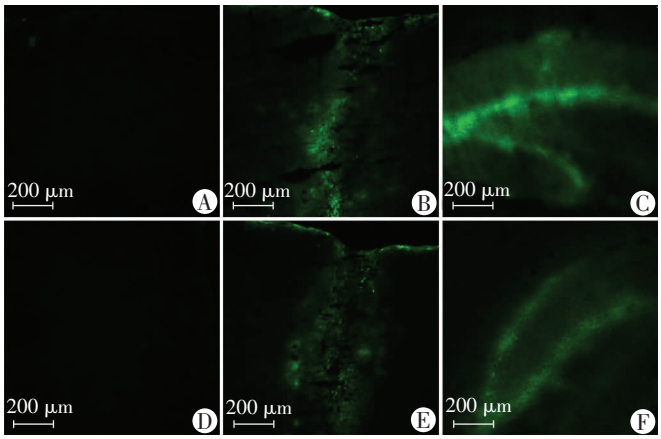
采用 SSPS 16.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析,方差齐时两两比较行 LSD 检验,方差不齐时行 Tamhane 检验。

2 结果

2.1 腺病毒转染后脑组织中 Fibulin-5 的表达

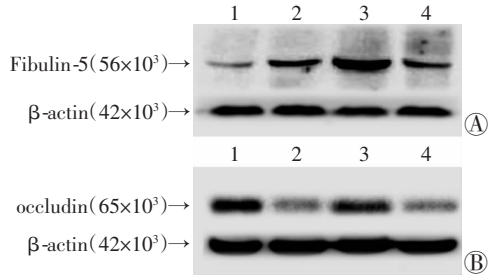
共聚焦结果显示:再灌注后 24 h,在注射点周围皮质区及海马 CA1 ~ CA3、齿状回区可见绿色荧光信号,对侧脑组织未见明显绿色荧光信号。Western blot 及 RT-PCR 检测结果显示,I/R + Ad-FBLN 组大鼠缺血侧脑组织 Fibulin-5 的蛋白及 mRNA 水平均明显高于其他实验组($P < 0.01$)。此外,I/R 组大鼠缺

血侧脑组织 Fibulin-5 的蛋白及 mRNA 水平较 S 组也有明显升高($P<0.01$)。结果见图1、图2A、表1。



A～C：I/R + Ad-FBLN 组缺血对侧、缺血侧皮质、缺血侧海马；D～F：I/R + AD-HK 组缺血对侧、缺血侧皮质、缺血侧海马

图1 腺病毒及空腺病毒载体在大鼠颅内的转染情况



1：S 组；2：I/R 组；3：I/R + Ad-FBLN 组；4：I/R + Ad-HK 组

图2 脑缺血再灌注后 24 h 各组大鼠脑组织 Fibulin-5（A）及 occludin（B）蛋白的表达

表1 脑缺血再灌注后 24 h 各组大鼠脑组织 Fibulin-5 及 occludin 的蛋白和 mRNA 水平（$n=4, \bar{x}\pm s$）

组别	Fibulin-5 蛋白灰度比值	occludin 蛋白灰度比值	Fibulin-5 mRNA 水平($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	occludin mRNA 水平($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
S 组	0.296±0.006	1.340±0.045	1.000±0.000	1.000±0.000
I/R 组	0.751±0.008[a]	0.612±0.016[a]	3.725±0.275[a]	0.738±0.070[a]
I/R + Ad-FBLN 组	1.868±0.046[ab]	1.040±0.042[ab]	24.025±0.699[ab]	3.390±0.247[ab]
I/R + Ad-HK 组	0.742±0.012[ac]	0.585±0.044[ac]	3.225±0.568[ac]	0.684±0.051[ac]

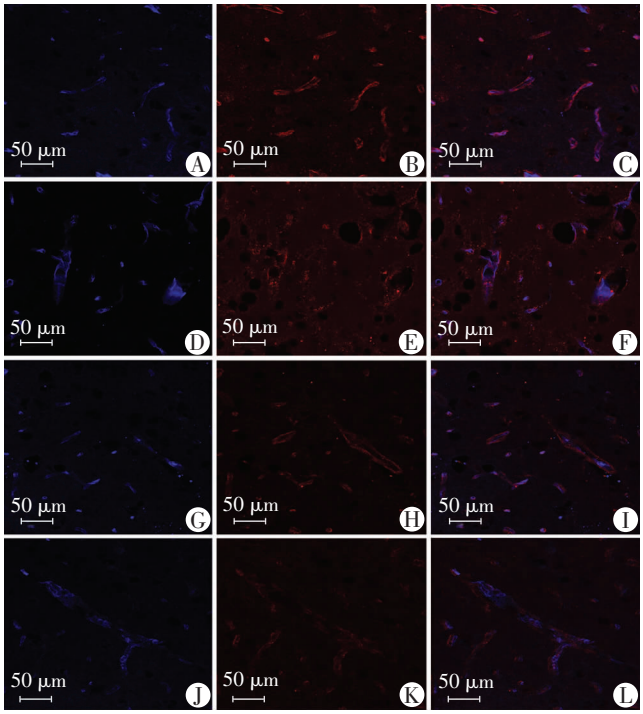
a：$P<0.01$，与 S 组比较；b：$P<0.01$，与 I/R 组比较；c：$P<0.01$，与 I/R + Ad-FBLN 组比较

2.2 紧密连接蛋白的表达

在正常情况下，occludin 连续的表达在血管内皮细胞 RECA1 之间。缺血再灌注后 24 h，紧密连接蛋白降解呈断续状，荧光强度也有所减弱。腺病毒使缺血侧脑组织 Fibulin-5 过表达后，occludin 的表达升高。I/R + Ad-FBLN 组 occludin 的蛋白及 mRNA 表达水平较 I/R 组明显升高($P<0.01$)。结果见图2B、图3、表1。

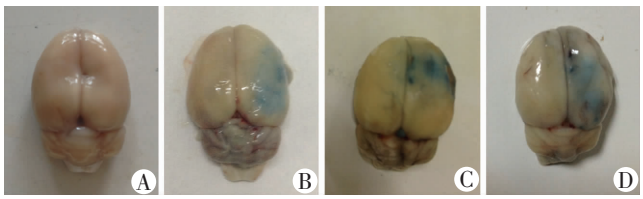
2.3 血脑屏障通透性

与 S 组相比，再灌注后 24 h，I/R 组大鼠缺血侧脑组织可见明显的伊文思蓝漏出。I/R + Ad-HK 组大鼠的伊文思蓝漏出与 I/R 组大鼠之间无明显差异($P>0.05$)。而用过表达 Fibulin-5 的腺病毒干预后，伊文思蓝漏出明显减少($P<0.01$)。结果见图4、表2。



A～C：S 组；D～F：I/R 组；G～I：I/R + Ad-FBLN 组；J～L：I/R + Ad-HK 组；A、D、G、J：RECA1；B、E、H、K：occludin；C、F、I、L：RECA1 + occludin

图3 脑缺血再灌注后 24 h 各组大鼠免疫荧光双标记 occludin 与 RECA1 观察



A：S 组；B：I/R 组；C：I/R + Ad-FBLN 组；D：I/R + Ad-HK 组

图4 脑缺血再灌注后 24 h 各组大鼠脑组织伊文思蓝漏出情况

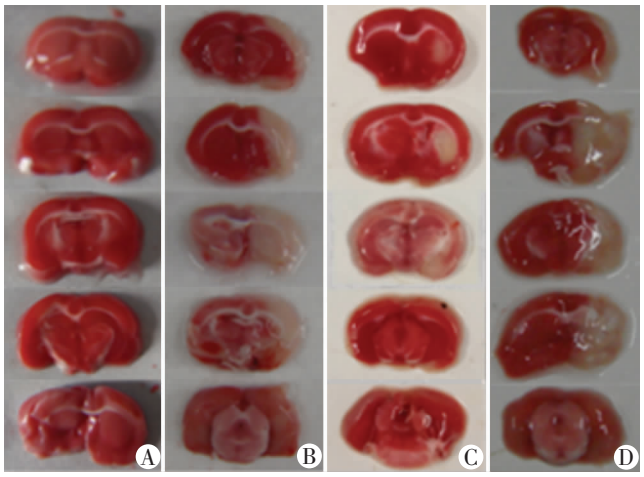
表2 脑缺血再灌注后 24 h 各组大鼠脑组织伊文思蓝漏出、脑梗死体积及神经功能评分（$n=4, \bar{x}\pm s$）

组别	伊文思蓝漏出（μg/g）	脑梗死体积百分比（%）	神经功能评分（分）
S 组	1.654±0.220	0.00±0.00	14.63±0.48
I/R 组	6.846±0.130[a]	36.14±1.26[a]	6.00±0.41[a]
I/R + Ad-FBLN 组	3.565±0.234[ab]	20.97±0.80[ab]	10.50±0.41[ab]
I/R + Ad-HK 组	7.070±0.148[ac]	36.28±0.66[ac]	5.75±0.65[ac]

a：$P<0.01$，与 S 组比较；b：$P<0.01$，与 I/R 组比较；c：$P<0.01$，与 I/R + Ad-FBLN 组比较

2.4 脑梗死体积及神经功能评估

再灌注后 24 h，I/R 组及 I/R + Ad-HK 组大鼠缺血侧大脑可见明显的梗死灶，I/R + Ad-FBLN 组大鼠的脑梗死灶明显缩小($P<0.01$)。与 S 组相比，I/R 组大鼠出现严重的神经功能缺损($P<0.01$)，过表达 Fibulin-5 干预后，I/R + Ad-FBLN 组大鼠的功能缺损明显减轻（$P<0.01$），然而 I/R + Ad-HK 组大鼠神经功能缺损较 I/R 组未见明显变化($P>0.05$)。结果见表2、图5。



A:S 组;B:I/R 组;C:I/R + Ad-FBLN 组;D:I/R + Ad-HK 组

图 5　脑缺血再灌注后 24 h 各组大鼠脑组织 TTC 染色

3　讨论

脑缺血再灌注损伤后,处理血脑屏障开放,减轻脑水肿一直是脑卒中后的重要治疗手段和研究热点。紧密连接蛋白的降解是引起血脑屏障损害的重要原因[2]。Fibulin-5 能增强内皮细胞与细胞外基质的黏附[4],这种黏附有助于促进紧密连接蛋白的表达[5]。本研究将过表达 Fibulin-5 的腺病毒转染到大鼠颅内,探讨 Fibulin-5 对脑缺血再灌注损伤后紧密连接蛋白表达及血脑屏障漏出的影响。结果表明:脑缺血再灌注后 24 h,过表达 Fibulin-5 使大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障漏出减少,内皮细胞间紧密连接蛋白 occludin 表达升高。此外过表达 Fibulin-5 还使脑梗死面积缩小,神经功能缺损减轻。研究表明,腺病毒介导的目的基因过表达一般在腺病毒注射后 7 d 达高峰[10]。本研究证实在病毒注射后 8 d,干预组 Fibulin-5 的表达显著高于其他各组($P<0.01$)。这表明腺病毒干预组大鼠缺血侧脑组织 Fibulin-5 成功的高表达。紧密连接蛋白的降解被认为是脑缺血后血脑屏障破坏的决定性因素,有研究者将脑血管内皮细胞与 β1 整合素受体特异性抗体共培养发现,紧密连接蛋白表达减少,血脑屏障通透性增加,因此推测内皮细胞表面的 β1 整合素受体介导的内皮细胞与细胞外基质的黏附能促进紧密连接蛋白的表达[5],而过表达 Fibulin-5 能通过细胞表面的 β1 整合素显著增强体外内皮细胞对细胞外基质的黏附力[4]。因此,我们推测 Fibulin-5 促进紧密连接蛋白 occludin 的表达可能是通过整合素受体增强内皮细胞与细胞外基质的黏附引起的。脑缺血后有大量的 ROS 产生,ROS 激活 Rho 酶介导血管内皮细胞损伤,从而使血脑屏障通透性增加[11]。Schluterman 等[7]发现 Fibulin-5 基因敲出大鼠的肿瘤内 ROS 水平明显增高,伴随有肿瘤血管内皮细胞损伤增加,体外实验进一步发现,Fibulin-5 是通过与纤连蛋白竞争性结合整合素受体从而抑制整合素通路介导的 ROS 产生[7],因此 Fibulin-5 通过干预整合素通路抑制 ROS 的产生,也是减少血脑屏障损害的原因之一。除了减少血脑屏障漏出,过表达 Fibulin-5 还使脑梗死面积缩小,神经功能缺损减轻,这可能是因为血脑屏障通漏出减少后,脑水肿减轻,从而使局部脑血流及能量供应增加,有利于减轻脑部损害。

综上所述,过表达 Fibulin-5 减轻了大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的损害,这与 Fibulin-5 促进紧密连接蛋白 occludin 的表达有关,同时 Fibulin-5 还能缩小脑缺血后的脑梗死面积,促进神经功能恢复。

参考文献:

[1] Daneman R, Barres B A. The blood-brain barrier – lessons from moody flies[J]. Cell, 2005, 123(1): 9 – 12.

[2] Liu W Y, Wang Z B, Zhang L C, *et al*. Tight junction in blood-brain barrier: an overview of structure, regulation, and regulator substances [J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(8): 609 – 615.

[3] Yanagisawa H, Schluterman M K, Brekken R A. Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease[J]. J Cell Commun Signal, 2009, 3(3/4): 337 – 347.

[4] Preis M, Cohen T, Sarnatzki Y, *et al*. Effects of fibulin-5 on attachment, adhesion, and proliferation of primary human endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 348(3): 1024 – 1033.

[5] Engelhardt B. β1-integrin/matrix interactions support blood-brain barrier integrity[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(10): 1969 – 1971.

[6] Guadall A, Orriols M, Rodriguez-Calvo R, *et al*. Fibulin-5 is up-regulated by hypoxia in endothelial cells through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1alpha)-dependent mechanism[J]. J Biol Chem, 2011, 286 (9): 7093 – 7103.

[7] Schluterman M K, Chapman S L, Korpanty G, *et al*. Loss of fibulin-5 binding to beta1 integrins inhibits tumor growth by increasing the level of ROS[J]. Dis Model Mech, 2010, 3(5/6): 333 – 342.

[8] Wang T, Wang J, Yin C, *et al*. Down-regulation of Nogo receptor promotes functional recovery by enhancing axonal connectivity after experimental stroke in rats[J]. Brain research, 2010, 1360: 147 – 158.

[9] Liu F, Schafer D P, McCullough L D. TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion[J]. J Neurosci Methods, 2009, 179(1): 1 – 8.

[10] Shen L, Miao J, Yuan F, *et al*. Overexpression of adiponectin promotes focal angiogenesis in the mouse brain following middle cerebral artery occlusion[J]. Gene Ther, 2013, 20(1): 93 – 101.

[11] Kahles T, Luedike P, Endres M, *et al*. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke[J]. Stroke, 2007, 38(11): 3000 – 3006.

(**收稿**:2013-11-04;**修回**:2013-12-31)

(编辑　王小寒)