

中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白 在大鼠脑出血后继发性脑损伤中的作用研究

戴芳¹, 王姗姗², 许宏伟¹

1. 中南大学湘雅医院老年医学科神经内科, 湖南省长沙市 410008

2. 解放军第187中心医院神经内科, 海南省海口市 570100

摘要: **目的** 探讨中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白 (NGAL) 在脑出血 (ICH) 后继发性脑损伤中的作用。 **方法** 采用Ⅶ胶原酶制作 ICH 模型, 将 90 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组: 正常对照组 (10 只)、假手术组 (40 只) 和 ICH 模型组 (40 只)。分别在 ICH 后 6 h、24 h、72 h 和 7 d 四个时间点对大鼠进行神经功能缺损评分; 用免疫组化及 RT-qPCR 来观察不同时间点脑组织 NGAL 及 MMP-9 表达情况。 **结果** 免疫组化及 RT-qPCR 结果显示 ICH 后模型组各时间点均可见大量 NGAL、MMP-9 阳性细胞及 NGAL mRNA 表达, 且明显高于正常组及假手术组 ($P < 0.05$)。ICH 模型组 NGAL 与 MMP-9 蛋白表达呈正相关 ($P < 0.01$)。ICH 模型组 NGAL、MMP-9 蛋白表达均与大鼠神经功能缺损评分呈正相关 ($P < 0.05$)。 **结论** ICH 后 NGAL 表达明显增加, 提示 NGAL 可能参与了脑出血后继发性脑损伤, 并可能通过调节 MMP-9 的活性从而发挥作用, 但 NGAL 是否为 MMP-9 的上游调控因子尚有待进一步研究。

关键词: 脑出血; 中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白; 基质金属蛋白酶-9; 脑损伤; 大鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2016.04.002

Role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in secondary brain injury after intracerebral hemorrhage in rats

DAI Fang, WANG Shan-Shan, XU Hong-Wei. Department of neurology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: XU Hong-Wei, E-mail: xhw_xiangya@sina.com

Abstract: **Objective** To investigate the role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in secondary brain injury after intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** Type VII collagenase was used to establish the model of ICH. A total of 90 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group (10 rats), sham-operation group (40 rats), and ICH model group (40 rats). The neurologic impairment score was obtained at 6, 24, and 72 hours and 7 days after ICH, and immunohistochemistry and RT-qPCR were used to measure the expression of NGAL and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in brain tissue at different time points. **Results** The results of immunohistochemistry and RT-qPCR showed that the model group had a large number of cells with the expression of NGAL and MMP-9, as well as the mRNA expression of NGAL, which were significantly higher than those of the normal control group and sham-operation group ($P < 0.05$). In the ICH model group, the protein expression of NGAL was positively correlated with that of MMP-9 ($P < 0.01$), and the protein expression of NGAL and MMP-9 was also positively correlated with neurologic impairment score in rats ($P < 0.05$). **Conclusions** There is increased expression of NGAL after ICH, which suggests that NGAL may be involved in secondary brain injury after ICH. NGAL may regulate the activity of MMP-9, but further studies are needed to determine whether NGAL is the upstream regulatory factor of MMP-9.

Key words: intracerebral hemorrhage; neutrophil gelatinase-associated lipocalin; matrix metalloproteinase-9; cerebral injury; rat

收稿日期: 2016-06-03; 修回日期: 2016-08-12

作者简介: 戴芳 (1988-), 女, 硕士, 技师, 主要从事脑血管疾病的研究。

通讯作者: 许宏伟 (1965-), 男, 博士, 教授, 主要从事脑血管疾病的研究。E-mail: xhw_xiangya@sina.com。

脑出血 (intracerebral Hemorrhage, ICH) 发病急剧、凶险, 发病率、致残率及病死率均较高^[1]。研究发现 ICH 后脑损伤主要由由血肿的占位效应、机械压迫及继发性脑损伤所致, 其中血肿周围组织的继发性脑损伤可能在 ICH 后脑损伤中起到了更为重要的作用。继发性脑损伤可能与炎症反应、氧化应激、补体系统激活、细胞凋亡等病理生理机制相关^[2-5]。大量研究证实基质金属蛋白酶-9 (matrix metallo proteinase-9, MMP-9) 参与了 ICH 后的炎症反应, 导致血脑屏障破坏, 脑水肿形成, 并对神经元有不同程度的毒性作用^[6]。中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白 (neutrophil gelatinase associated lipocalin, NGAL) 是 Kjeldsen 等于 1993 年在中性粒细胞的特殊颗粒中首先发现的 25 kD 的糖蛋白。研究发现 NGAL 可以通过二硫键与 MMP-9 结合, 调节保护 MMP-9 酶活性。鉴于 MMP-9 在 ICH 后继发性脑损伤中表达上调, 而 NGAL 又有调节保护 MMP-9 活性的功能, 那么 NGAL 是否也在 ICH 后继发性脑损伤中发挥了一定的作用呢? 目前国内外尚未有相关方面的研究报道。本实验旨在通过大鼠 ICH 模型, 观察不同时间点 NGAL、MMP-9 蛋白和 NGAL mRNA 的表达变化及大鼠神经功能缺损情况, 以探讨 NGAL 在 ICH 后继发性脑损伤中的作用及其与 MMP-9 相关性, 为进一步的临床治疗提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 90 只, 体重 200 ~ 250 g, 清洁级 (购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司)。

1.1.2 试剂与仪器

兔抗 MMP-9 单克隆抗体	Abcom 公司
兔抗 NGAL 多克隆抗体	GeneTex 公司
辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG	联科生物公司
山羊血清封闭液	索莱宝公司
DAB 试剂盒	中杉金桥
逆转录试剂盒	Takara 公司
VII 型胶原酶	Sigma 公司

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将大鼠随机分为 3 组: 正常对照组 10 只; 假手术组和 ICH 模型组各 40 只, 在脑出血后 6 h、24 h、72 h 和 7 d 四个时间点进行神经功能缺损评分后处死大鼠, 每个时间点随机抽取 10 只。

1.2.2 造模 模型组按 Rosenberg 等^[7]的方法建立 ICH 模型, 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后 (400 mg/kg), 固定头部于鼠脑立体定位仪上, 行头皮正中切口, 暴露前囟, 以前囟为中心向后 1.4 mm, 向右旁开 3.2 mm, 钻孔, 以微量注射器在此处垂直进针 5.60 mm, 定位于苍白球内, 缓慢匀速地注入 2.5 μ l VII 型胶原酶 (0.2 U/ μ l), 留针 5 min 后缓慢退针。假手术组在颅内相同部位注射 2.5 μ l 灭菌生理盐水。

1.2.3 神经功能缺损评分 采用 Longa 评分法^[8]筛选造模成功的大鼠, 然后参照 Mayne 等^[9]的方法在造模后 6 h、24 h、72 h 和 7 d 四个时间点分别从前爪抓力、向出血侧旋转、爬竿能力 3 个方面对大鼠的神经功能缺损情况进行评估。分数越高, 神经功能障碍越重。

1.2.4 免疫组化测定 NGAL 及 MMP-9 各组分别取脑组织制成石蜡切片, 石蜡切片按 SABC 试剂盒说明书操作: I 抗浓度分别为 NGAL 1:50, MMP-9 1:100, 37℃ 烤箱孵育 30 min 后 4℃ 过夜。每只大鼠选取 3 张切片, 在 200 倍镜下取 3 个完整而不重叠视野。用 Image pro plus 6.0 图像处理软件对所有图片进行半定量分析, 测定 NGAL 及 MMP-9 免疫组化反应阳性细胞的平均光密度 (MOD)。

1.2.5 RT-qPCR 测定 NGAL 基因的相对表达 提取各组大鼠基底节区脑组织 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书操作。NGAL 引物上游序列为 5'-GTC ACT TCC ATC CTC GTC AGG-3'; 下游序列为 5'-AGT CAG TGT CGG CCA CTT GC-3'; 片段长度为 148 bp。内参 GAPDH 上游序列为 5'-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC-3'; 下游序列为 5'-TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT-3'。运用 $\Delta\Delta C_t$ 法分析 NGAL 基因的相对表达情况。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 两样本间比较, 选用 t 检验。多样本间比较选用单因素方差分析法, 两变量间的相关性分析采用双侧 Pearson 相关检验。当 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分

正常组及假手术组均无明显神经功能缺损, ICH 模型组 24 h 亚组神经功能评分显著高于其他各时间点 ($P < 0.05$), 而随着时间的延长逐渐降低,

说明神经功能逐步恢复。

2.2 免疫组化检测

正常组及假手术组只有极少量 NGAL 阳性表达。ICH 后 6 h 模型组即可在血肿周围发现大量 NGAL 阳性细胞,在 24 ~ 72 h 达高峰(24 h、72 h 亚组显著高于 6 h 及 7 d 亚组, $P < 0.05$;24 h 亚组与 72 h 亚组比较差异无统计学意义, $P > 0.05$),之后逐渐降低,持续 7 d 后仍高于正常组及假手术组, $P < 0.05$ (表 1、图 2、图 3)。

正常组和假手术组均可见少量 MMP-9 阳性细胞,模型组各时点可见大量 MMP-9 阳性细胞,并在 24 h 达高峰(见图 4)。

表 1 造模后各时间点 NGAL 阳性细胞表达情况 (n=5; $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	24 h	72 h	7 d
正常组	0.107 ± 0.0126			
假手术组	0.099 9 ± 0.0079	0.096 ± 0.016	0.1076 ± 0.0128	0.1122 ± 0.0158
ICH 模型组	0.5784 ± 0.0274 *	1.0771 ± 0.0498 *	1.0062 ± 0.0456 *	0.4366 ± 0.0205 *

注: * 为相应时间点 ICH 模型组与正常组及假手术组对比, $P < 0.05$ 。

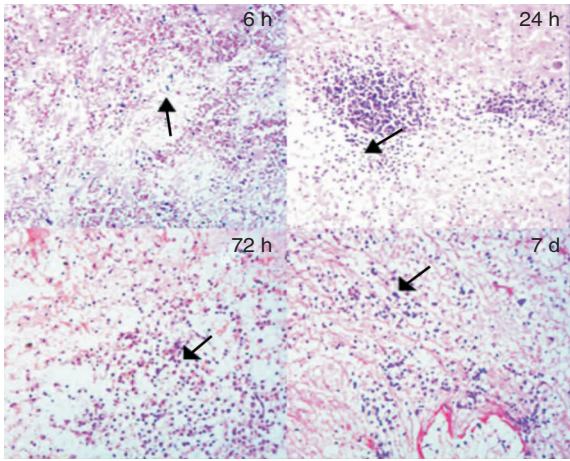


图 1 ICH 后血肿组织 HE 染色(100 ×)。ICH 后 6 h、24 h、72 h 和 7 d 血肿组织中可见大量炎性细胞浸润(大箭头)

2.3 RT-qPCR

NGAL mRNA 在正常组、假手术组中均有少量表达,两组间无显著差异($P > 0.05$)。ICH 模型组各时点 NGAL mRNA 表达均明显高于正常组及假手术组($P < 0.01$),且在 24 ~ 72 h 达高峰;24 h 亚组及 72 h 亚组的 NGAL mRNA 表达量显著高于 6 h 亚组及 7 d 亚组($P < 0.05$);24 h 亚组与 72 h 亚组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2、图 5。

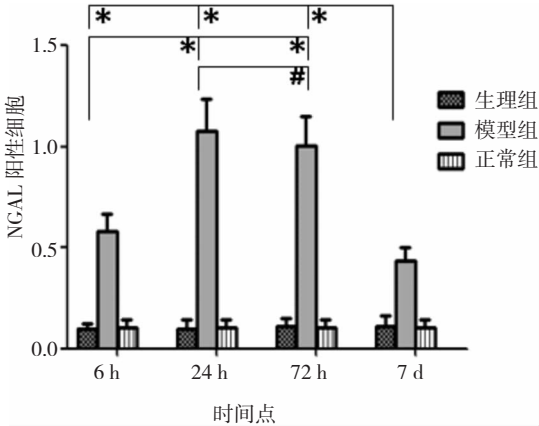


图 2 血肿周围组织 NGAL 蛋白表达情况。注: * 为 24 h、72 h 亚组与 6 h 及 7 d 亚组比较, $P < 0.05$;#为 24 h 亚组与 72 h 亚组比较, $P > 0.05$ 。

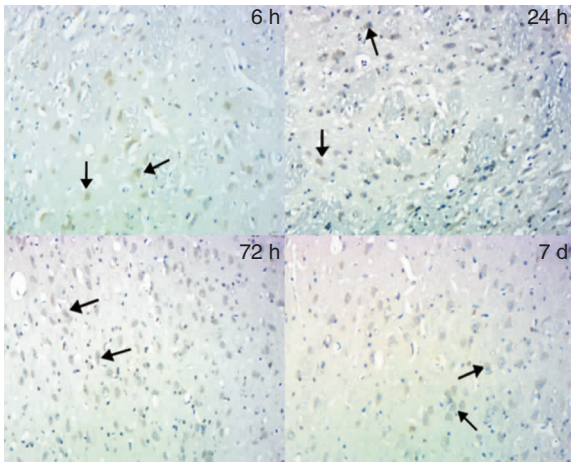


图 3 ICH 模型组 NGAL 阳性细胞表达(200 ×)。ICH 后 6 h、24 h、72 h 和 7 d 血肿周围组织均可见大量 NGAL 阳性细胞,呈棕色(小箭头)。

2.4 相关性分析

ICH 模型组中 MMP-9 与 NGAL 蛋白表达呈正相关,相关系数($R = 0.739$, $P < 0.01$)。ICH 模型组中 NGAL、MMP-9 蛋白表达均与大鼠神经功能评分呈正相关,相关系数分别为($R = 0.703$, $P < 0.01$; $R = 0.38$, $P < 0.05$)。

表 2 各组各时间点 NGAL mRNA 表达情况 (n=5; $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	24 h	72 h	7 d
正常组	1	1	1	1
假手术组	1.40 ± 0.22	2.95 ± 0.11	4.26 ± 0.62	1.59 ± 0.33
ICH 模型组	46.47 ± 3.12 *	106.84 ± 10.32 *	89.99 ± 9.55 *	17.54 ± 2.45 *

注: * 为相应时间点 ICH 模型组与正常组及假手术组比较, $P < 0.05$ 。

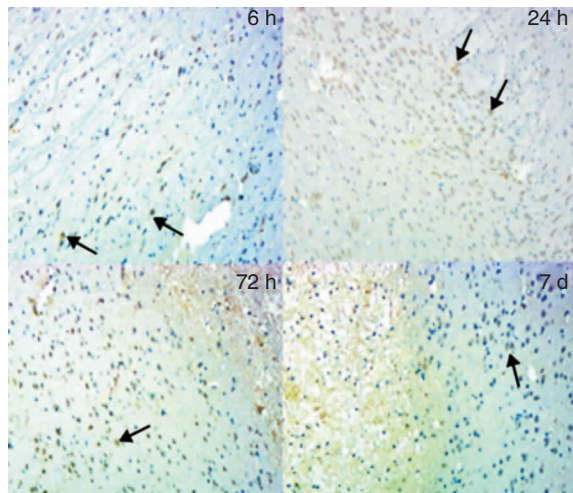


图 4 ICH 模型组 MMP-9 阳性细胞表达 (200 ×)。ICH 后 6 h、24 h、72 h 和 7 d 血肿周围组织均可见大量 MMP-9 阳性细胞,呈棕色(小箭头)。

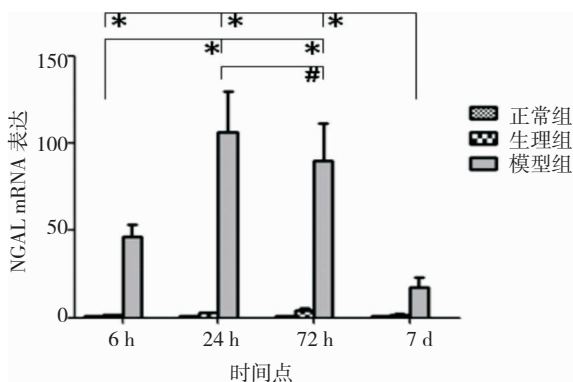


图 5 血肿周围组织 NGAL mRNA 表达情况。注: * 为 24 h 和 72 h 亚组与 6 h 及 7 d 亚组比较, $P < 0.05$; # 为 24 h 亚组与 72 h 亚组比较, $P > 0.05$ 。

3 讨论

MMP-9 是 MMPs 家族的最主要成员之一,能降解全身各种组织的细胞外基质 (ECM),与脑血管壁破坏和 ICH 关系密切。Tejima 等^[10]利用自体血脑出血模型证实 MMP-9 在 ICH 后发生了激活并参与了脑水肿的形成。我们的前期研究也发现大鼠 ICH 早期可诱导血肿周围组织 MMP-2、MMP-9 的表达上调,导致血脑屏障破坏和血管源性脑水肿形成^[11]。MMP-9 还具有促炎症作用,可增加炎症因子的活性,是炎症反应重要的“调节剂”^[12]。

NGAL 是研究 MMP-9 在细胞内的存在形式时被发现,主要存在于中性粒细胞中的过氧化物酶阴性颗粒中^[13]。NGAL 参与了免疫炎症反应、肿瘤的发生发展及肾脏发育与损伤修复,并具有调节保

护 MMP-9 活性的作用^[14-16]。通常 MMP-9 以前体形式 (pro-MMP-9) 被分泌到细胞外,当其 N-端的一段序列被切去后才表现活性。NGAL 可与 pro-MMP-9 通过二硫键结合形成二聚体即 NGAL/pro-MMP-9,此二聚体可进一步与金属蛋白酶组织抑制因子 (TIMP-1) 结合形成三元或四元复合物。当复合物中的 pro-MMP-9 被激活成 MMP-9 时,其活性要比原来高出许多倍^[17]。这说明 NGAL 能够调控上述复合物的活性并抵消 TIMP-1 对 MMP-9 活性的抑制作用。Yan 等^[18]和 Tschesche 等^[20]研究发现 NGAL 可通过与 MMP-9 形成复合物促进侵袭性胆管细胞型肝癌细胞的形成及其侵袭转移。一般来说,肿瘤细胞需要借助 MMP-9 和其它相关酶来降解 ECM,才能顺利地进行浸润和远处转移,而 NGAL 可通过保护 MMP-9 活性参与肿瘤细胞的浸润及转移。

本研究发现 ICH 后血肿周围组织 NGAL 蛋白及 mRNA 表达均升高;且 ICH 模型组 NGAL 蛋白表达与神经功能缺损程度呈正相关;提示 NGAL 可能在 ICH 后继发性脑损伤发挥了重要作用。既往有研究发现,生理状态下 NGAL 在脑组织、心脏、周围神经、血管等组织细胞中表达呈阴性^[21],本课题首次证实了 NGAL 在 ICH 血肿周围组织中有广泛表达。NGAL 表达增加可能与 ICH 导致的免疫炎症反应及氧化应激有关。同时我们发现血肿周围组织中 NGAL 主要来源于中性粒细胞、神经元及小胶质细胞,既往无小胶质细胞及神经元分泌 NGAL 的相关报道。我们推测,在疾病状态下,氧化应激可能诱导了神经元及小胶质细胞分泌 NGAL,其具体机制尚有待进一步研究。ICH 模型组 NGAL 与 MMP-9 蛋白表达呈正相关,表明 ICH 后 NGAL 表达的增多伴有 MMP-9 的激活,但并不能从本质上说明 NGAL 激活了 MMP-9。既往的研究发现 NGAL 可以通过调节 MMP-9 活性,促进肿瘤的侵袭转移。因此,我们推测 ICH 后 NGAL 有可能通过调节保护 MMP-9 活性,攻击脑血管的基底膜,破坏血-脑屏障,导致脑水肿加重及神经细胞凋亡,从而在 ICH 后继发性脑损伤中发挥作用,但 NGAL 是否为 MMP-9 的上游调控因子尚有待进一步研究。本实验仅为初步研究,后期我们将利用 NGAL 敲除鼠对 NGAL 在 ICH 后继发性脑损伤中的作用机制进行深入研究,以期对 ICH 提供新的治疗方向及方法。

参 考 文 献

- [1] van Asch CJJ, Luitse MJA, Rinkel GE, et al. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage overtime, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 2010, 9(2): 167-176.
- [2] 潘新发,万曙,詹仁雅. 脑出血后血肿周围组织炎症反应的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(3): 263-267.
- [3] 吴晓光,李蒙蒙,仇志富,等. 补阳还五汤对脑出血大鼠 PI3K/AKT 信号通路的影响及其神经保护作用的机制. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016, 43(2): 119-123.
- [4] Xi G, Keep RF and Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet. Neurol*, 2006, 5(1): 53-63.
- [5] Duan X, Wen Z, Shen H, et al. Intracerebral Hemorrhage, Oxidative Stress, and Antioxidant Therapy. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1203285.
- [6] Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*, 2009, 8(2): 205-216.
- [7] Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*, 1990, 21(5): 801-807.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] Mayne M, Ni W, Yan HJ, et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor- α expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 2001, 32(1): 240-248.
- [10] Tejima E, Zhao BQ, Tsuji K, et al. Astrocytic induction of matrix metalloproteinase-9 and edema in brain hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(3): 460-468.
- [11] 许宏伟,杨期东,刘晓英,等. MMP-2/9 与脑出血后脑水肿的关系探讨. *中风与神经疾病杂志*, 2004, 21(4): 7-9.
- [12] Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(2): H558-H568.
- [13] Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1482(1-2): 272-283.
- [14] Bouchet S, Bauvois B. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), Pro-Matrix Metalloproteinase-9 (pro-MMP-9) and Their Complex Pro-MMP-9/NGAL in Leukaemias. *Cancers*, 2014, 6(2): 796-812.
- [15] Tarazi YH, Khalifeh MS, Abu Al-Kebash MM, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and insulin-like growth factor (IGF)-1 association with a Mannheimia haemolytica infection in sheep. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014, 161(3-4): 151-160.
- [16] de Geus HRH, Ronco C, Haase M, et al. The cardiac surgery-associated neutrophil gelatinase-associated lipocalin (CSA-NGAL) score: A potential tool to monitor acute tubular damage. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 151(6): 1476-1481.
- [17] Zhang H, Xu L, Xiao D, et al. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumour invasion. *J Clin Pathol*, 2007, 60(5): 555-561.
- [18] Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, et al. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem*, 2001, 276(40): 37258-37265.
- [19] Tschesche H, Zolzer V, Triebel S, et al. The human neutrophil lipocalin supports the allosteric activation of matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem*, 2001, 268(7): 1918-1928.
- [20] Nuntagawat C, Leelawat K and Tohtong R. NGAL knockdown by siRNA in human cholangiocarcinoma cells suppressed invasion by reducing NGAL/MMP-9 complex formation. *Clin Exp Metastasis*, 2010, 27(5): 295-305.
- [21] Moreno-Navarrete JM, Manco M, Ibanez J, et al. Metabolic endotoxemia and saturated fat contribute to circulating NGAL concentrations in subjects with insulin resistance. *Int J Obesity (Lond)*, 2010, 34(2): 240-249.