

大鼠脑出血后不同时期神经营养因子受体 p75、神经生长因子前体、酪氨酸激酶 A 的表达及其与细胞凋亡的相关性

邹志斌¹, 郭世文², 邹国荣¹, 鲍刚²

1. 江西省新余市人民医院神经外科, 江西省新余市 338000

2. 西安交通大学第一附属医院神经外科, 陕西省西安市 710061

摘要:目的 研究脑出血后血肿周围组织中神经营养因子受体 p75 (p75NTR)、神经生长因子前体 (proNGF)、酪氨酸激酶 A (TrkA) 的表达及细胞凋亡率, 进一步探讨其在脑出血后的细胞凋亡中所发挥的作用。方法 制作大鼠脑出血模型, 术后 6 h、24 h、72 h、10 d 处死各组大鼠获取所需脑组织标本, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 免疫组化 SP 法检测 p75NTR、TrkA、proNGF 的蛋白表达水平, 实时荧光定量 PCR 检测 p75NTR、TrkA 的基因表达水平。结果 脑出血后 p75NTR、proNGF 表达水平及 p75NTR/TrkA 值与对照组比较显著升高 ($P < 0.01$), 且动态变化规律与脑细胞凋亡率相似; 72 h 后 TrkA 的动态变化规律与细胞凋亡率相反。结论 脑出血后 proNGF 与 p75NTR 的结合可能参与介导脑细胞凋亡, p75NTR/TrkA 值增高时, proNGF 及 p75NTR 以介导细胞凋亡为主; TrkA 在脑出血后 72 h 内神经营养作用被抑制, 72 h 后可能发挥神经营养作用。

关键词: 脑出血; 细胞凋亡; 神经营养因子受体 p75; 神经生长因子前体; 酪氨酸激酶 A; 大鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2019.02.004

Expression of p75 neurotrophin receptor, pro-nerve growth factor, and tyrosine kinase A and their relationship with neuronal apoptosis in different stages of intracerebral hemorrhage in rats

ZOU Zhi-Bin, GUO Shi-Wen, ZOU Guo-Rong, BAO Gang. Department of Neurosurgery, People's Hospital of Xinyu City, Xinyu, Jiangxi 338000, China

Corresponding author: ZOU Zhi-Bin, E-mail: bing-quan@qq.com

Abstract: Objective To study the expression of p75 neurotrophin receptor (p75NTR), pro-nerve growth factor (proNGF), and tyrosine kinase A (TrkA) and neuronal apoptosis rate in the perihematomal brain tissue after intracerebral hemorrhage (ICH), and to further explore their roles in neuronal apoptosis after ICH. **Methods** A rat model of ICH was established. The rats were sacrificed at 6 hours, 24 hours, 72 hours, and 10 days after the procedure. The apoptotic rate of neurons was measured by flow cytometry. The protein expression of p75NTR, TrkA, and proNGF was determined by immunohistochemistry (streptavidin-peroxidase, SP), and the mRNA expression of p75NTR and TrkA was measured by quantitative real-time PCR. **Results** The expression of p75NTR and proNGF and p75NTR/TrkA ratio in the ICH group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). These changes were consistent with the change in neuronal apoptosis rate in different stages of ICH. The change in TrkA at 72 hours was inversely correlated with neuronal apoptosis rate. **Conclusions** The binding of proNGF with p75NTR may be involved in neuronal apoptosis after ICH. When p75NTR/TrkA ratio is increased, proNGF and p75NTR mainly induce neuronal apoptosis. The neurotrophic effect of TrkA is inhibited within 72 hours after ICH, while it may be restored after 72 hours.

Key words: intracerebral hemorrhage; neuronal apoptosis; p75 neurotrophin receptor; pro-nerve growth factor; tyrosine kinase A; rat

脑出血 (Intracerebral hemorrhage, ICH) 是一种临床常见的脑血管疾病,具有很高的致死率及致残率。脑出血后血肿的占位效应及对周围脑组织的直接破坏属原发性损伤,但无论手术还是保守治疗,脑出血后的继发性脑损伤作为影响预后的重要因素,越来越引起人们的重视。目前研究已表明细胞凋亡机制参与了出血后脑组织损伤,且与脑出血病程及预后密切相关。有关细胞凋亡调控机制的研究主要集中于 NF- κ B^[1]、凝血酶^[2]、TTP^[3]、AQP-4、MMP-2、MMP-3、caspase-3、bcl-2^[4] 多种相关基因及蛋白,而关于神经营养因子受体 p75 (p75 neurotrophin receptor, p75NTR) 介导的细胞凋亡在脑出血领域鲜有相关动物实验研究报道。本实验将探讨脑出血后不同时期血肿周围组织中 p75NTR、神经生长因子前体 (pro-nerve growth factor, proNGF)、酪氨酸激酶 A (tyrosine kinase A, TrkA) 的表达规律及其与细胞凋亡的关系,以期阐明 p75NTR 相关受体及配体介导的细胞凋亡通路在脑出血后细胞凋亡中所发挥的作用,为探索脑出血后降低致死致残率的治疗方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康成年 SD 大鼠 50 只,雌雄不限。随机分为 5 组,每组 10 只,包括 4 组观察组及 1 组对照组。观察组即 ICH 组,按脑出血后取脑组织标本时间分为 6 h 组、24 h 组、72 h 组及 10 d 组。

1.1.2 主要实验器材与试剂 FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BECTON 公司;显微照相系统购自德国 Leica 公司;BIO-RAD 荧光定量 PCR 仪购自美国 DICKSON 公司;AnnexinV/PI 试剂盒购自珠海健康元生物医药有限公司;兔抗鼠 p75NTR&TrkA 抗体购自北京博奥森生物技术公司;兔抗鼠 proNGF 抗体购自以色列 Alomone 生物科技公司;p75NTR&TrkA 引物及内参 β -actin 购自北京三博远志生物技术有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 建立动物模型及采集标本 采用立体定向自体血注射法制备大鼠脑出血模型,参考张祥建^[5]方法,ICH 组于右侧尾状核头缓慢注射自体血

80 μ l,对照组仅插入空针头。分别于模型建立后 6 h、24 h、72 h 和 10 d 处死 ICH 组大鼠,对照组 10 d 处死。取血肿周围 5 mm 以内的脑组织为标本;对照组取同部位正常脑组织。

1.2.2 检测细胞凋亡 冰上操作制备脑组织单细胞悬液,依次加入 5 μ l AnnexinV-FITC 及 10 μ l PI 在室温下避光反应 15 mins 后直接进行流式细胞仪检测。使用未染色的细胞悬液作为对照进行荧光补偿调节。AnnexinV 染色阳性、PI 染色阴性者为早期凋亡细胞,以早期凋亡细胞作为观察值。

1.2.3 免疫组化 SP 法检测蛋白表达 标本固定后制作石蜡切片,按 SP 法依次进行烘烤、脱蜡、孵育、抗原修复、封闭、孵育、滴加一抗工作液 (兔抗鼠 p75NTR、proNGF、TrkA 多克隆抗体)、二抗工作液、辣根酶标记链霉卵白素工作液、显色、复染、脱水、透明处理后中性树胶封片。高倍显微镜下观察胞浆被染为棕褐色或棕黄色的细胞为阳性细胞,取 3 个视野平均值判定阳性表达率。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测基因表达 依次冰上操作提取总 RNA,逆转录获得 cDNA,在超净台中加入 PCR 反应体系后进行荧光定量 PCR。将内参 β -actin 的表达量设为 1 作为标准校正,计算 p75NTR、TrkA 基因表达的相对值。

1.3 统计学方法

所得数据用 SPSS 软件进行分析,计量数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Kolmogorov-Smirnov (K-S) 法对数据进行正态性检验;两组计量资料间比较采用独立样本的 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 检验,若有显著性差异 ($\alpha < 0.05$),再进行方差同质性检验,若方差齐 ($\alpha > 0.05$),采用 SNK (Student-Newman Keuls) 检验,若方差不齐 ($\alpha < 0.05$),采用 Tamhane's T2 法进行检验;双变量相关性分析采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 血肿周围组织中的细胞凋亡情况

脑出血后 6 h 细胞凋亡率即上升,24 h 继续升高,72 h 达高峰,至 10 d 仍维持较高水平。ICH 组分别与对照组进行比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。ICH 组组间进行 SNK 检验,均存在明显差异。见表 1。

表1 各组细胞凋亡率以及与对照组比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数(n)	凋亡细胞百分率(%)	P
ICH 6 h 组	10	13.34 ± 2.51	0.001
ICH 24 h 组	10	20.50 ± 2.14	0.000
ICH 72 h 组	10	37.76 ± 4.05	0.000
ICH 10 d 组	10	30.03 ± 3.69	0.000
对照组	10	8.37 ± 3.13	

2.2 免疫组化 SP 法染色观察结果

免疫组化 SP 法染色观察结果见图 1。

2.3 免疫组化半定量分析

免疫组化半定量分析结果比较。见表 2。

2.3.1 p75NTR 阳性表达率 各 ICH 组分别与对照组进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。ICH 组组间进行 SNK 检验:24 h 组与 10 d 组之间无明显差异,其余各组间有明显差异。其与细胞凋亡率变化规律完全一致;Pearson 相关分析: $r = 0.855$, $P = 0.000$ 。

2.3.2 TrkA 阳性表达率 6 h 组与对照组比较,存在明显差异($P < 0.05$),其余 ICH 组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。其与细胞凋亡率的变化规律 72 h 前一致,与 72 h 后相反;Pearson 相关分析: $r = 0.399$, $P = 0.004$ 。

表2 免疫组化半定量分析结果及与对照组比较 ($\bar{x} \pm s$)

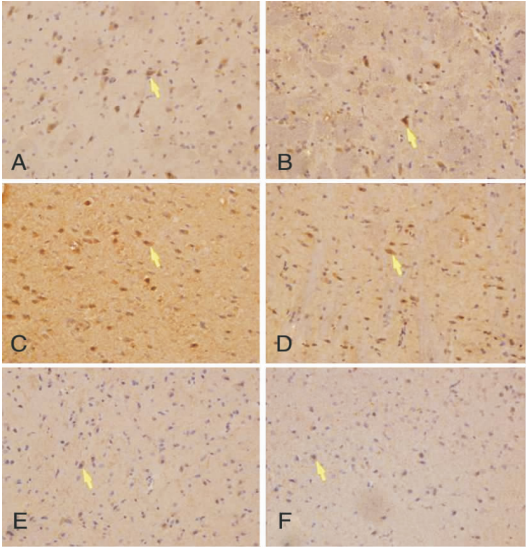
分组	例数(n)	p75NTR 阳性表达率(%)	TrkA 阳性表达率(%)	proNGF 阳性表达率(%)	蛋白表达水平 p75NTR/TrkA
6 h 组	10	31.31 ± 3.65 ^a	35.64 ± 5.61 ^b	26.91 ± 2.40 ^a	0.90 ± 0.17 ^c
24 h 组	10	44.19 ± 6.53 ^a	38.19 ± 5.51 ^c	40.40 ± 4.69 ^a	1.18 ± 0.28 ^a
72 h 组	10	55.60 ± 6.42 ^a	36.79 ± 3.17 ^d	35.34 ± 3.31 ^a	1.51 ± 0.13 ^a
10 d 组	10	46.15 ± 6.60 ^a	41.60 ± 4.23 ^a	30.45 ± 2.68 ^a	1.12 ± 0.17 ^a
对照组	10	18.55 ± 2.41	30.39 ± 3.95	20.49 ± 2.07	0.63 ± 0.17

注:与对应对照组比较,a: $P = 0.000$;b: $P = 0.028$;c: $P = 0.002$;d: $P = 0.001$ 。

2.3.3 proNGF 阳性表达率 各 ICH 组分别与对照组进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。ICH 组组间进行 SNK 检验,均存在明显差异。其与细胞凋亡率的变化规律完全一致;Pearson 相关分析: $r = 0.781$, $P = 0.000$ 。

2.3.4 蛋白表达水平 p75NTR/TrkA 值 各 ICH 组分别与对照组进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。ICH 组组间进行 SNK 检验:24 h 组与 10 d 组之间无明显差异,其余各组间有明显差异。其与细胞凋亡率的变化规律完全一致;Pearson 相关分析: $r = 0.781$, $P = 0.000$ 。

2.3.5 proNGF 阳性表达率与 p75NTR 阳性表达率的关系 二者的变化规律相似,前者达峰时间早于后者;Pearson 相关分析: $r = 0.670$, $P = 0.000$ 。



注:A:ICH 组 p75NTR 的阳性表达细胞,主要为神经细胞;B:对照组 p75NTR 的阳性表达细胞,其阳性率低于 ICH 组;C:ICH 组 TrkA 的阳性表达细胞,神经细胞及胶质细胞中均可见表达;D:对照组 TrkA 的阳性表达细胞,其阳性率低于 ICH 组;E:ICH 组 proNGF 的阳性表达细胞,神经细胞及胶质细胞中均可见表达;F 对照组 proNGF 的阳性表达细胞,其阳性率低于 ICH 组。

图1 免疫组化染色观察阳性细胞(400 ×)

2.4 p75NTR、TrkA 基因的相对表达量

p75NTR、TrkA 基因的相对表达量见表 3。

表3 各基因的相对表达量分析结果及与对照组比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数(n)	p75NTR 基因 相对表达量	TrkA 基因 相对表达量	基因表达水平 p75NTR/TrkA
6 h 组	10	1.17 ± 0.29 ^a	1.87 ± 0.72 ^c	0.73 ± 0.39 ^e
24 h 组	10	2.36 ± 0.70 ^b	1.75 ± 0.57 ^d	1.50 ± 0.88 ^f
72 h 组	10	5.04 ± 1.52 ^b	3.02 ± 0.77 ^b	1.74 ± 0.54 ^b
10 d 组	10	4.39 ± 1.50 ^b	3.66 ± 0.59 ^b	1.22 ± 0.43 ^b
对照组	10	0.83 ± 0.35	1.82 ± 0.42	0.45 ± 0.18

注:与对应对照组比较,a: $P = 0.028$;b: $P = 0.000$;c: $P = 0.856$;d: $P = 0.727$;e: $P = 0.054$;f: $P = 0.002$ 。

2.4.1 p75NTR 基因相对表达量 各 ICH 组分别与对照组进行比较,差异均有统计学意义($P <$

0.01)。ICH 组组间进行 Tamhane's T2 检验:72 h 组与 10 d 组之间无明显差异,其余各组间有明显差异。其与细胞凋亡率变化规律完全一致;Pearson 相关分析: $r = 0.816$, $P = 0.000$ 。

2.4.2 TrkA 基因相对表达量 6 h 组及 24 h 组与对照组比较,无明显差异,72 h 组及 10 d 组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。其与细胞凋亡率的变化规律 72 h 前无明显关系,与 72 h 后相反;Pearson 相关分析: $r = 0.595$, $P = 0.000$ 。

2.4.3 基因表达水平 p75NTR/TrkA 值 6 h 组与对照组比较无明显差异,其余 ICH 组与对照组间进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。ICH 组组间进行 SNK 检验:24 h 组与 10 d 组之间无明显差异,其余各组间有明显差异。其与细胞凋亡率的变化规律完全一致;Pearson 相关分析: $r = 0.585$, $P = 0.000$ 。

3 讨论

p75NTR 为肿瘤坏死因子受体超家族成员之一,在 CNS 中存在广泛的表达,在神经细胞的生存、分化、凋亡中发挥着举足轻重的作用。一方面,p75NTR 可与 proNGF 结合而介导细胞凋亡,如 Hempstead 等^[6]发现,proNGF 是 p75NTR 的高亲和力配体,二者结合可介导细胞凋亡,与 NGF 结合 TrkA 促进细胞存活的作用相反;另一方面,p75NTR 可与 TrkA 协作,提高 NGF 与 TrkA 的亲和力,促进细胞存活和分化。在病理条件下,p75NTR 的表达可明显增加,导致细胞凋亡,如 Beattie 等^[7]发现大鼠脊髓损伤后 p75NTR 的表达明显增加。

TrkA 在几乎所有的 CNS 胆碱能神经元中均有表达,它能够与 NGF 以高亲和力结合而发挥促生长、抗凋亡的神经保护作用。在损伤等病理条件下,TrkA 的表达可增加,从而维持脑细胞的存活以及促进损伤的修复,如 Bai 等^[8]发现在视网膜损伤后 TrkA 的表达上调,TrkA 受体被 NGF 激活后可起神经保护作用。

proNGF 广泛分布于 CNS 中,可表现为促凋亡作用,但也可表现为促生长作用,在特定细胞中究竟表现为何种作用可能与 p75NTR/TrkA 值大小有关。Clewes 等^[9]指出 p75NTR 及 proNGF 是介导神经凋亡作用还是神经营养作用可能与 p75NTR/TrkA 值有关,当这个比值增加时,凋亡作用占主导,当其下降时,营养作用占主导。Maria 等^[10]研究表

明,正常情况下,proNGF 起营养神经作用,但在神经退行性疾病或损伤等情况下,TrkA 减少以及 p75NTR 表达增加,proNGF 转而诱导细胞凋亡。在损伤等病理条件下,proNGF 的表达可明显增加,并诱导其高亲和力受体 p75NTR 介导细胞凋亡。如 Harrington 等^[11]建立大鼠脑创伤模型后,检测到 proNGF 的分泌增加并诱导细胞发生凋亡,鞘内注射特异性抗体阻断 proNGF 与 p75NTR 的结合后,神经细胞的死亡数量明显减少;此外,他们还发现在神经损伤后 proNGF 分泌的增加与 p75NTR 表达的增加存在时间上的一致性,这提示 proNGF 和 p75NTR 诱导凋亡可能是通过二者的结合来实现的。

综上所述,p75NTR 能够介导神经细胞发生凋亡,其介导的细胞凋亡是通过与其特异性配体 proNGF 结合而启动,TrkA 受体具有神经保护作用。此外,p75NTR 及 proNGF 除介导细胞凋亡外,还可介导营养作用,而二者在特定细胞中究竟表现为促凋亡还是促生长可能与 p75NTR/TrkA 值的大小有关。然而,上述研究均未涉及到脑出血,在脑出血领域,是否能得到同样的结论呢?

本实验发现,ICH 后 p75NTR 蛋白及基因表达的动态变化规律与细胞凋亡率完全一致,两者之间呈极强正相关,这提示 p75NTR 很可能参与了 ICH 后的细胞凋亡;proNGF 蛋白表达的动态变化规律与细胞凋亡率相似,前者达峰时间早于后者,两者之间呈中等程度正相关,提示 proNGF 可能参与了 ICH 后的细胞凋亡(因转录 proNGF 的 mRNA 翻译后能够生成多种 NGF 前体及 NGF 成熟体,估仅从蛋白表达水平进行检测)。proNGF 介导细胞凋亡是通过作为 p75NTR 的配体而激活 p75NTR 通路来实现的。而本实验也分析发现 ICH 后 proNGF 与 p75NTR 的变化规律相似,两者之间呈强正相关,说明 proNGF 与 p75NTR 的结合可能共同介导了细胞的凋亡。proNGF 的达峰时间早于细胞凋亡可能说明 proNGF 表达的增加到其与 p75NTR 结合从而诱导凋亡需要一段时间,损伤因素首先诱发了 proNGF 表达的增加,而其与 p75NTR 结合诱导的凋亡稍有滞后,因而其达峰后短期内的下降也并没有减少细胞的凋亡。p75NTR/TrkA 值的动态变化规律与细胞凋亡率完全一致,两者之间呈中强程度正相关,说明 p75NTR/TrkA 值的大小与细胞凋亡的多少是有关联的。在正常脑组织中

p75NTR/TrkA 数值较低,此时 p75NTR 及 proNGF 表现的是促存活作用,而在 ICH 后,p75NTR/TrkA 值开始升高,这个比值越高,对应的细胞凋亡越明显,此时 p75NTR 及 proNGF 表现的是促凋亡作用。

TrkA 受体的表达水平在 ICH 后有不同程度的增加,其动态变化规律在 72 h 前与细胞凋亡相似或无明显关系,而在 72 h 后,变化规律明显相反。笔者认为:在 ICH 后 72 h 内,TrkA 受体的表达是有一定程度上调的,但是仍不足以拮抗 proNGF 及 p75NTR 诱导的凋亡,细胞凋亡处于上升趋势,而在 72 h 以后,随着 TrkA 受体继续上调,逐渐发挥出其神经保护作用,从而使得细胞凋亡得以降低。

从脑出血后各种损伤因素的出现到最终的不可逆性神经细胞凋亡的出现,存在着一个凋亡细胞可修复时间窗,如在这一时间窗内进行有效地干预,将有可能改善脑出血患者的预后。细胞凋亡高峰出现在 ICH 后 72 h,10 d 仍处于较高水平,说明 ICH 后 72 h 内是干预的最佳时机,10 d 内干预仍有意义。脑出血后的抗凋亡治疗有望成为减轻继发性脑损伤的重要手段之一,如吴晓光等^[12]应用中药补阳还五汤后能通过上调 p-AKT、bcl-2 蛋白表达及下调 bax 蛋白表达来抑制神经元凋亡,从而明显提高大鼠脑出血后神经功能学评分。

综上所述,NGF 可与其高亲和力受体 TrkA 结合从而发挥神经保护作用;ICH 后包含有 proNGF 及 p75NTR 介导的细胞凋亡机制,提示下调 p75NTR 的表达及阻断 proNGF 与 p75NTR 的结合,有望降低脑出血后的细胞凋亡,从而改善预后。

参 考 文 献

- [1] 冯路,薛跃华,徐正保,等. NF- κ B 抑制制对脑出血大鼠神经损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(12): 2278-2282.
- [2] 周燕利,聂琼芳,吴晓兰. 硝普钠与尼莫地平治疗大鼠脑出血损伤的疗效及与凝血酶受体-1 表达的相关研究[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(15): 29-33.
- [3] 陈朝晖,洪溪屏,兰频,等. TTP 减轻大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(2): 287-293.
- [4] 潘强,朱琳,张帅,等. siRNA 干扰技术联合高压氧对大鼠脑出血后脑水肿及凋亡的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2017, 36(9): 1010-1014.
- [5] 张祥建. 大鼠自体动脉血脑出血动物模型的建立[J]. 脑与神经疾病杂志, 2003, 11(6): 341-344.
- [6] Hempstead BL. Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins[J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(1): 19-24.
- [7] Beattie MS, Harrington AW, Lee R, et al. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury[J]. Neuron, 2002, 36(3): 375-386.
- [8] Bai Y, Dergham P, Nedev H, et al. Chronic and acute models of retinal neurodegeneration TrkA activity are neuroprotective whereas p75NTR activity is neurotoxic through a paracrine mechanism[J]. J Biol Chem, 2010, 285(50): 39392-39400.
- [9] Clewes O, Fahey MS, Tyler SJ, et al. Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin[J]. J Neurochem, 2008, 107(4): 1124-1135.
- [10] Ioannou MS, Fahnestock M. ProNGF, but Not NGF, Switches from Neurotrophic to Apoptotic Activity in Response to Reductions in TrkA Receptor Levels[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): E599.
- [11] Harrington AW, Leiner B, Blechmitt C, et al. Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(16): 6226-6230.
- [12] 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[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2016, 43(2): 119-123.