

· 基础研究 ·

大鼠蛛网膜下腔出血后早期 ADAMTS-4 的表达与血脑屏障通透性的相关性研究

岳四海, 刘献志[△], 张宏凤

(郑州大学第一附属医院神经外科/郑州市神经病学重点实验室 450000)

摘要:目的 通过建立大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)的动物模型,对 ADAMTS-4 在 SAH 后早期脑损伤中的作用进行初步研究。方法 成年雄性 SD 大鼠 72 只,分对照组和 SAH 组,通过检测大鼠海马 ADAMTS-4 的表达及脑内伊文氏蓝(Evans Blue, EB)的浓度,并通过股静脉注射 ADAMTS-4 抑制剂- α 2 巨球蛋白进行干预等,探讨 ADAMTS-4 的表达与 BBB 通透性的相关性。结果 SAH 后 24 h ADAMTS-4 mRNA 及蛋白表达明显升高,脑内 EB 浓度于出血后 12 h 明显升高,ADAMTS-4 蛋白表达与脑内 EB 浓度成正相关($r=0.917, P<0.05$)。经 α 2 巨球蛋白干预后,SAH 后 48 h ADAMTS-4 蛋白表达较非干预组明显降低($P<0.05$),且干预组脑内 EB 浓度较非干预组亦有显著减少($P<0.05$)。结论 ADAMTS-4 可能参与了 SAH 后早期脑损伤的病理过程。

关键词: ADAMTS-4;蛛网膜下腔出血;脑损伤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.29.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)29-3518-03

Correlation study on the ADAMTS-4 in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage and blood-brain barrier permeability in rats

Yue Sihai, Liu Xianzhi[△], Zhang Hongfeng

(Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University /Key Laboratory of Neurology, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: Objective To establish the rat model of experimental subarachnoid hemorrhage(SAH) and to detect the expression of ADAMTS-4 in early brain injury(EBI) after SAH in rats. **Methods** Totally 72 adult male SD rats were randomly divided into 2 groups, the control group and SAH group. The expression of ADAMTS-4 and the content of brain Evans Blue(EB) were detected. The ADAMTS-4 inhibitor α 2-macroglobulin was used to study the relationship between the expression of ADAMTS-4 and blood-brain barrier permeability. **Results** The expression of the mRNA and protein of ADAMTS-4 increased dramatically at 24 h and the contents of EB increased progressively at 12 h after SAH. The protein expression of ADAMTS-4 and the content of brain EB was positive correlated($r=0.917, P<0.05$). The expression of ADAMTS-4 was inhibited by α 2-macroglobulin($P<0.05$) and the contents of EB decreased dramatically($P<0.05$). **Conclusion** ADAMTS-4 may be involved in the pathological progression of early brain injury after SAH.

Key words: ADAMTS-4; subarachnoid hemorrhage; brain injuries

动脉瘤性蛛网膜下腔出血是一种具有较高病死率与病残率的神经外科急症,近年来大量的基础及临床研究表明早期脑损伤(early brain injury, EBI)可能在蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后的病理进程中起着重要的作用,这使得近年来人们的注意力开始转向 SAH 后的 EBI^[1]。EBI 包含众多病理机制,其中血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的破坏是 EBI 的重要病理机制之一,而导致 BBB 破坏的诸多因素中细胞外基质的损伤非常重要^[2-3]。ADAMTS-4 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs-4)是 ADAMTSs 家族中一员,是一种新发现的金属蛋白酶,ADAMTS-4 可通过降解细胞外基质参与多种病理生理过程^[4],本研究旨在对 ADAMTS-4 在 SAH 后早期脑损伤中的作用进行初步探讨。

1 材料与方

1.1 材料 健康成年雄性 SD 大鼠 72 只,体质量 250~300 g。大鼠随机分为对照组和 SAH 组,其中对照组共 12 只,6 只用于检测 ADAMTS-4 mRNA 及蛋白表达水平,6 只用于血脑屏障通透性检测,且均于术后 72 h 处死。SAH 组(60 只),按

处死时间 6、12、24、48、72 h 分为 5 个亚组。

1.2 方法

1.2.1 SAH 模型的制作 采用改良的 Sheffield 大鼠 SAH 模型^[5],向颈内动脉插入长约 5 cm 前端锐化的 3-0 尼龙线,SAH 组在插入 2.0~2.5 cm 时多感到明显阻力,克服阻力再插入 2 mm 后,迅速退出尼龙线,恢复颈内动脉血流并结扎颈外动脉残端,缝合颈部切口,对照组插入尼龙线约 1.5~2.0 cm 后不再继续插入。

1.2.2 大鼠海马组织 ADAMTS-1 的 Western blotting 分析 提取含 30 μ g 蛋白的样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳。加入 Anti-ADAMTS-4 (1:1 000, Abcam, 美国)并 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,羊抗鼠 IgG-HRP (1:2 000, 中杉金桥, 中国)室温孵育 2 h,显色后由 quantity-one 软件系统计算 ADAMTS-4 和 β -actin 的光密度值,二者比值作为该样品 ADAMTS-1 蛋白的表达量。

1.2.3 ADAMTS-4 的 mRNA 的检测 按 Trizol 试剂盒说明提取海马组织总 RNA。根据 RNA 浓度(μ g/mL)=OD206 \times 40 μ g/mL \times 稀释倍数,计算 RNA 浓度。采用两步法逆转录-

PCR(RT-PCR)试剂盒配置反应体系。ADAMTS-4 上游引物: 5'-GTG AAT ACA CGC TGA TGC C-3' 下游引物: 5' -AGC CGG GAC AGT GAG GTT-3' 扩增片断为 312 bp。内参 GAPDH 上游引物: 5'-GTG CTG AGT ATG TCG TGG AGT CT-3', 下游引物: 5'-GTG GAA GAA TGG GAG TTG CTG T-3' 扩增片段 610 bp。RT-PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 采用 quantity-one 图像处理系统分析比较电泳条带相对光密度值。

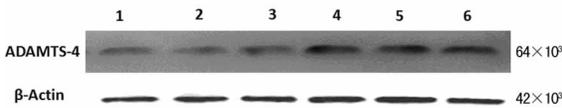
1.2.4 脑伊文氏蓝 (Evans blue, EB) 浓度的检测 经股静脉注射向已麻醉大鼠注射 2% EB (5 mL/kg), 1 h 后经左心室注入 37 °C 生理盐水, 待流出液清亮后迅速断头取脑, 置 37 °C 恒温水箱中, 48 h 后离心取上清液, 紫外分光光度计波长 632 nm 比色测定吸光度 (OD) 值, 根据标准曲线计算脑组织 EB 浓度 (mg/g 脑湿重)。

1.2.5 α2 巨球蛋白抑制 ADAMTS-4 表达在 EBI 病理过程中的作用 此部分研究共分为 3 个组, 分别为: 假手术组、药物干预组和非干预组, 每组各 6 只 SD 大鼠, 模型制作方法同上, 药物干预组为: 术后股静脉注射 ADAMTS-4 抑制剂 α2 巨球蛋白每次 120 mg, 每 12 小时 1 次。各组大鼠均于术后 48 h 后处死, 分别进行蛋白提取测定及 EB 浓度检测, 方法同上。比较 3 组的蛋白表达及 EB 浓度, 进一步检测 ADAMTS-4 在 SAH 后的 EBI 过程中对血脑屏障的作用。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数的比较采用单因素方差分析, 用 LSD-t 检验比较两组间的差异, 变量之间采用 pearson 相关分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠海马组织 ADAMTS-4 蛋白表达水平变化 SAH 后 6、12 h 组与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); SAH 后 24 h ADAMTS-4 蛋白与对照组相比表达显著增高 ($P < 0.05$); SAH 后 72 h ADAMTS-4 蛋白活性仍然维持在较高水平, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1、表 1。



1: 对照组; 2~6: SAH 后 6、12、24、48、72 h 组。

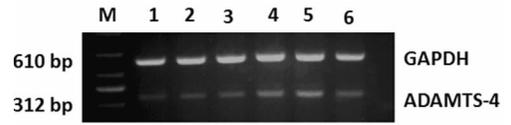
图 1 Western blotting 检测各组 ADAMTS-4 及 β-Actin 的表达

2.2 大鼠海马组织 ADAMTS-4 mRNA 表达变化 SAH 后 6、12 h 组大鼠海马组织 ADAMTS-4 mRNA 表达与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); SAH 后 24 h ADAMTS-4 mRNA 表达开始增高, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SAH 后 48 h ADAMTS-4 mRNA 表达达到高峰; 72 h ADAMTS-4 mRNA 表达较 48 h 开始下降, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2、表 1。

2.3 SAH 后大鼠血脑屏障通透性改变 SAH 后 12 h EB 浓度较对照组开始显著增加 ($P < 0.05$); SAH 后 48 h EB 浓度最高, 72 h EB 浓度较 48 h 有所降低但仍维持在较高水平, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.4 大鼠海马 ADAMTS-4 蛋白表达与脑内 EB 浓度的相关性 SAH 后 ADAMTS-4 蛋白表达与脑内 EB 浓度整体呈正

相关 ($r = 0.917, P < 0.05$)。



M: Marker; 1: 对照组; 2~6: SAH 后 6、12、24、48、72 h 组。

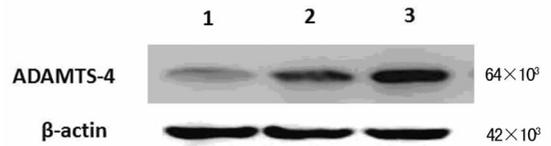
图 2 RT-PCR 检测每组 ADAMTS-4 及 GAPDH 的 mRNA 的表达

表 1 ADAMTS-4 mRNA 和蛋白的表达变化及大鼠脑内 EB 浓度的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mRNA	蛋白浓度	EB 浓度
对照组	6	0.197 ± 0.049	0.189 ± 0.041	8.091 ± 0.198
SAH 组				
6 h	6	0.228 ± 0.040 ^a	0.216 ± 0.046 ^a	7.815 ± 0.153 ^a
12 h	6	0.249 ± 0.035 ^a	0.202 ± 0.043 ^a	18.336 ± 0.316 ^b
24 h	6	0.712 ± 0.094 ^b	0.634 ± 0.069 ^b	23.122 ± 0.584 ^b
48 h	6	0.833 ± 0.068 ^b	0.824 ± 0.074 ^b	29.753 ± 0.249 ^b
72 h	6	0.556 ± 0.059 ^b	0.755 ± 0.047 ^b	17.462 ± 0.631 ^b

^a: $P < 0.05$, 与 SAH 后 24 h 相比; ^b: $P < 0.05$, 与对照组相比。

2.5 α2 巨球蛋白干预后 ADAMTS-4 的蛋白表达及 EB 浓度的变化 经 α2 巨球蛋白干预后, SAH 后 48 h ADAMTS-4 蛋白表达较非干预组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。且干预组脑内 EB 浓度较非干预组亦有显著减少 ($P < 0.05$)。见图 3、表 2。



1: 假手术组; 2: 药物干预组; 3: 非干预组。

图 3 Western blotting 检测各组 ADAMTS-4 及 β-Actin 的表达

表 2 ADAMTS-4 蛋白的表达变化及大鼠脑内 EB 浓度的变化

组别	蛋白浓度	EB 浓度
假手术组	0.191 ± 0.056 ^a	7.726 ± 0.415 ^a
药物干预组	0.437 ± 0.042 ^a	18.329 ± 0.274 ^a
非干预组	0.816 ± 0.041	29.627 ± 0.382

^a: $P < 0.05$, 与非干预组相比。

3 讨 论

自发性 SAH 是一种严重的神经外科急症, 颅内动脉瘤破裂是自发性 SAH 的最主要原因^[6]。近年来 SAH 后 EBI 越来越引起人们的重视, 并认为其在 SAH 后的病理进程中起着重要的作用, EBI 指的是 SAH 后 72 h 以内脑内所发生的病理改变, 其包含众多复杂病理机制, 如包括颅内压升高、脑灌注压低、血脑屏障破坏、血管收缩、细胞死亡途径的激活、坏死、凋亡及自噬性死亡离子稳态的失衡、NO/NOS 途径的活化、氧化应激、炎症因子释放等^[7-9], 其中 BBB 的破坏是 EBI 的重要组成部分, 其早期功能障碍促进了脑水肿的发生, 而细胞外基质的

降解是导致 BBB 破坏的重要原因^[10]。ADAMTS 意为含 I 型血小板结合蛋白基序(TSP)的解聚蛋白样金属蛋白酶,是继基质金属蛋白酶 MMPs 后新发现的一类 Zn²⁺ 依赖的分泌型金属蛋白酶,ADAMTS-4 的功能是 ADAMTSs 中研究较为透彻的成员之一,可以特异性降解 aggrecan, brivican 和 versican^[11-13]。目前已知的 ADAMTS 酶系的调节机制是它可以被金属蛋白酶抑制剂调节,其中金属蛋白酶抑制剂(TIMP)是内源性的,且金属蛋白酶抑制剂 TIMP-3 及 $\alpha 2$ 巨球蛋白是 ADAMTS-4 和-5 的重要的抑制剂^[17]。有研究显示在恶性胶质瘤中,ADAMTS-4 的表达水平明显升高,通过降解 brivican,介导了神经胶质瘤的侵袭与转移^[14-15]。Cross 等^[16] 研究显示早期脑梗死时 ADAMTS-4 表达上调,并参与破坏了 BBB 的完整性。但有关 SAH 后 EBI 中 ADAMTS-4 与 BBB 的关系尚未见报道。

本研究采用改良的血管内穿刺法建立大鼠 SAH 的动物模型,定量检测了 ADAMTS-4 在 SAH 后 72 h 内多个时间点的表达,同时与之对应的检测了大鼠脑内 EB 浓度以衡量其 BBB 的变化。结果显示 ADAMTS-4 的 mRNA 和蛋白表达高峰均出现在出血后 48 h,且此时 EB 浓度亦达到最大值。统计分析证实,SAH 后早期大鼠脑内 EB 浓度与 ADAMTS-4 蛋白活性呈正相关,提示 SAH 后大鼠 BBB 损害可能与 ADAMTS-4 降解细胞外基质,导致 BBB 结构破坏有关。随后通过应用 ADAMTS-4 抑制剂 $\alpha 2$ 巨球蛋白进行干预,并检测干预后 ADAMTS-4 的蛋白表达与脑内 EB 浓度变化,进一步证实 ADAMTS-4 可能参与了 SAH 后 BBB 的损害这一病理过程。

ADAMTSs 底物谱相对基质金属蛋白酶 MMPs 选择性较高、特异性较强,所以进一步深入研究 ADAMTS-4 在 SAH 后 EBI 及整个病理过程中的相关机制,可能为 SAH 的治疗提供新的方向。

参考文献:

- [1] Luo C, Yi B, Tao G, et al. Adenosine a3 receptor agonist reduces early brain injury in subarachnoid haemorrhage [J]. *Neuroreport*, 2010, 21(13): 892-896.
- [2] Duris K, Manaenko A, Suzuki H, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 attenuates early brain injury in a perforation model of subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Stroke*, 2011, 42(12): 3530-3536.
- [3] Lee JY, Keep RF, Hua Y, et al. Deferoxamine reduces early brain injury following subarachnoid hemorrhage [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 112: 101-106.
- [4] Haddock G, Cross AK, Plumb J, et al. Expression of ADAMTS-1, -4, -5 and TIMP-3 in normal and multiple sclerosis CNS white matter [J]. *Mult Scler*, 2006, 12(4): 386-396.
- [5] Ansar S, Svendgaard NA, Edvinsson L. Neurokinin-1 receptor antagonism in a rat model of subarachnoid hemorrhage: prevention of upregulation of contractile ETB and 5-HT1B receptors and cerebral blood flow reduction [J]. *J Neurosurg*, 2007, 106(5): 881-886.
- [6] Velat GJ, Kimball MM, Mocco JD, et al. Vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: review of randomized controlled trials and meta-analyses in the literature [J]. *World Neurosurg*, 2011, 76(5): 446-454.
- [7] Wan H, Loch Macdonald R. Circulatory and vascular changes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. *J Neurosurg Sci*, 2011, 55(4): 329-341.
- [8] Sehba FA, Bederson JB. Nitric oxide in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 110(Pt 1): 99-103.
- [9] Hasegawa Y, Suzuki H, Sherchan P, et al. Tyrosine phosphatase inhibition attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 110(Pt 1): 67-70.
- [10] Loftspring MC. Iron and early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(11): 1791-1792.
- [11] Moncada-Pazos A, Obaya AJ, Vilorio CG, et al. The nutraceutical flavonoid luteolin inhibits ADAMTS-4 and ADAMTS-5 aggrecanase activities [J]. *J Mol Med*, 2011, 89(6): 611-619.
- [12] Wayne GJ, Deng SJ, Amour A, et al. TIMP-3 inhibition of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) is modulated by interactions between aggrecan and the C-terminal domain of ADAMTS-4 [J]. *Biol Chem*, 2007, 282(29): 20991-20998.
- [13] Liacini A, Zafarullah M. Induction of ADAMTS-4 by interleukin-1: comment on the article by Pratta et al [J]. *Arthritis rheum*, 2004, 50(6): 2038-2039.
- [14] Tortorella MD, Arner EC, Hills R, et al. Alpha2-macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor of these enzymes [J]. *Biol Chem*, 2004, 279(17): 17554-17561.
- [15] Cudic M, Burstein GD, Fields GB, et al. Analysis of flavonoid-based pharmacophores that inhibit aggrecanases (ADAMTS-4 and ADAMTS-5) and matrix metalloproteinases through the use of topologically constrained peptide substrates [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2009, 74(5): 473-482.
- [16] Cross AK, Haddock G, Stock CJ, et al. ADAMTS-1 and -4 are up-regulated following transient middle cerebral artery occlusion in the rat and their expression is modulated by TNF in cultured astrocytes [J]. *Brain Res*, 2006, 1088(1): 19-30.
- [17] Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis [J]. *Nature*, 2005, 434(7033): 644-648.