

· 论 著 ·

载脂蛋白 J 及补体 C3 在大鼠脑出血模型中表达的实验研究

郑晓梅¹, 刘 亮², 李小刚^{3△}(1. 四川省泸州市人民医院神经内科 646000; 2. 泸州医学院附属医院神经外科 646000;
3. 泸州医学院附属医院神经内科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探索载脂蛋白 J(ApoJ)及补体 C3 在实验性大鼠脑出血(ICH)损伤中的作用机制。方法 将雌雄各半 Sprague-Dawley(SD)大鼠 150 只随机分为正常对照组、假手术组及 ICH 组。通过脑立体定向仪建立大鼠 ICH 模型,于建模后 3、6、12 h 以及 1、3、5、7 d 7 个时间点处死大鼠。用干湿质量法测量脑组织含水量;RT-PCR 检测 *ApoJ* mRNA 及补体 C3 mRNA 的表达水平。结果 ICH 组 *ApoJ*、补体 C3 mRNA 的表达水平高于假手术组和正常对照组($P < 0.05$),补体 C3、*ApoJ* mRNA 的表达分别于 ICH 后 3、6 h 开始增强;ICH 组 *ApoJ*、补体 C3 mRNA 表达水平、脑组织含水量呈正相关($R = 0.758, P < 0.05; R = 0.702, P < 0.05$),*ApoJ* mRNA 与补体 C3 mRNA 表达水平呈正相关($R = 0.908, P < 0.05$)。结论 补体系统参与了大鼠 ICH 后脑水肿的形成及神经元的损伤;ApoJ 可能通过抑制补体激活而发挥 ICH 后机体内源性应激保护作用。

关键词:脑出血;脑水肿;载脂蛋白 J;补体成分 C3;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.17.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)17-1671-04

Experimental study on expression of apolipoprotein J and complement component 3 in
brain tissue of intracerebral hemorrhage model in rats

Zheng Xiaomei¹, Liu Liang², Li Xiaogang^{3△}

(1. Department of Neurology, Luzhou People's Hospital, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

3. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To explore mechanisms of apolipoprotein J(ApoJ) and complement component 3(C3) in experimental injury of intracerebral hemorrhage(ICH) in rats. **Methods** 150 Sprague-Dawley rats, half male and half female, were randomly divided into 3 groups: normal control, sham operation and ICH group. Rats ICH models were established through brain stereotactic instrument. Rats were sacrificed at seven time points after modeling: 3 h, 6 h, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d and 7 d. Dry and wet quality method was employed to measure brain water content and expression level of *ApoJ* and complement C3 mRNA were detected by RT-PCR. **Results** Both expression level of *ApoJ* and complement C3 mRNA in brain tissue in ICH group were higher than that in sham operation and normal control group($P < 0.05$) and the expression of *ApoJ* and complement C3 mRNA started to increase in 3 hours and 6 hours after ICH, respectively; In ICH group, levels of *ApoJ* and complement C3 mRNA expression had positive correlation with brain water content($R = 0.758, P < 0.05; R = 0.702, P < 0.05$), and there was also a positive correlation between expression level of *ApoJ* and complement C3 mRNA($R = 0.908, P < 0.05$). **Conclusion** Complement system may participate in formation of brain edema and the injury of neuron after ICH in rats. ApoJ probably play an endogenous stress protective role after ICH via inhibition of complement activation.

Key words: cerebral hemorrhage; brain edema; apolipoprotein J; complement component 3; rats

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是神经系统多发病,严重威胁人类健康。补体激活所致的炎症反应和细胞凋亡在 ICH 继发性损伤中的作用日益受到重视^[1]。载脂蛋白 J(apolipoprotein J, ApoJ)是一种多功能糖蛋白,参与补体调控、细胞凋亡及 DNA 修复等多种生理功能^[1]。目前,国内外对 ApoJ 在 ICH 过程中所起作用的报道不多。有学者认为在阿尔茨海默病及脑梗死等疾病中, ApoJ 有神经元保护作用, ApoJ 可清除阿尔茨海默病患者脑组织中沉积的 β -淀粉样蛋白而延缓老年性痴呆^[2]。既往研究表明,补体系统参与了 ICH 后的神经元死亡。ApoJ 作为公认的补体调节因子,是否通过抑制 ICH 后的补体激活来阻止补体介导的神经元死亡,是本研究的切入点。本文通过探讨 ApoJ 在 ICH 过程中的作用机

制,为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。WDT-V 型鼠脑立体定向仪购自西安西北光电仪器厂。

1.2 动物分组与建模 Sprague-Dawley(SD)大鼠 150 只(鼠龄 3~4 个月、体质量 250~350 g)购自泸州医学院动物中心,合格证号:川医动字 2401115。将 SD 大鼠随机分为 3 组:正常对照组($n = 10$)、假手术组($n = 70$)及 ICH 组($n = 70$);假手术组与 ICH 组(出血量为 50 μ L)分别按假手术术后时间及出血后时间分为 3、6、12 h 以及 1、3、5、7 d 等 7 个亚组($n = 10$)。采用参考文献[3]的实验方法,通过脑立体定向仪将自体血注入

△ 通讯作者, Tel:15348216516; E-mail:lixiaogangst@tom.com。

尾状核,制作大鼠 ICH 模型。根据 Bederson 等^[4]的评定方法将神经功能缺损程度分为 4 级,将手术后 2 h 大鼠神经功能缺损程度达 1、2、3 级判断为建模成功。假手术组穿刺留针后取出,穿刺留针过程与手术组相同。

1.3 脑组织含水量测定 采用干湿质量法,各组在规定时间内点处死大鼠,收集血肿周围的脑组织,质量约 200 mg,100 °C 烘烤 24 h,烘烤前、后用天平称量。含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

表 1 *ApoJ*、补体 C3 及 β actin mRNA 的引物序列

目的基因	片段长度(bp)	引物序列
<i>ApoJ</i>	378	5'-AGC ACA TAA AGA CCC TCA TA-3'
		5'-AGC TGT CCT GCA TAG CAT-3'
补体 C3	272	5'-GAC CTG CGA CTG CCC TAC TCT-3'
		5'-CTG ATG AAG TGG TTG AAG ACG G-3'
β actin	475	5'-GAA ATC GTG CGT GAC ATT A-3'
		5'-ACT CAT CGT ACT CCT GCT TG-3'

表 2 各组大鼠不同时间点脑组织含水量比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	假手术后或出血后时间						
	3 h	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d
ICH 组	77.96±1.52* Δ	78.83±0.56* Δ	79.28±0.35* Δ	80.43±0.44* Δ	81.95±0.31*	79.18±0.35* Δ	78.02±0.20* Δ
假手术组	73.90±0.46	74.06±0.71	74.78±0.92	74.86±0.51	74.30±0.49	73.90±0.51	73.80±0.39
正常对照组	73.47±0.33	—	—	—	—	—	—

*: $P<0.05$,与假手术组及正常对照组比较; Δ : $P<0.05$,与 ICH 3 d 组比较;—:表示此项无数据。

表 3 各组大鼠不同时间点脑组织补体 C3 mRNA 的表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

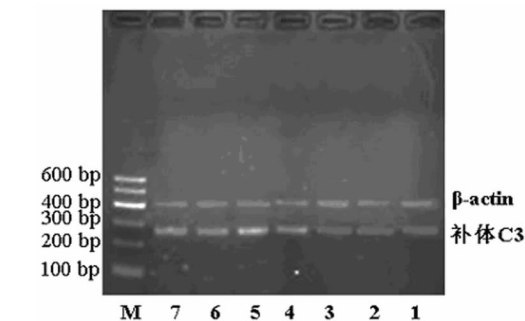
组别	假手术后或出血后时间						
	3 h	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d
ICH 组	0.19±0.01 Δ	0.24±0.05* Δ	0.36±0.08* Δ	0.52±0.05* Δ	0.71±0.05*	0.52±0.04* Δ	0.34±0.05* Δ
假手术组	0.18±0.01	0.18±0.01	0.19±0.01	0.19±0.01	0.19±0.01	0.18±0.01	0.18±0.01
正常对照组	0.18±0.01	—	—	—	—	—	—

*: $P<0.05$,与假手术组及正常对照组比较; Δ : $P<0.05$,与 ICH 3 d 组比较;—:表示此项无数据。

表 4 各组大鼠不同时间点脑组织 *ApoJ* mRNA 的表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	假手术后或出血后时间						
	3 h	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d
ICH 组	0.50±0.03* Δ	0.54±0.04* Δ	0.65±0.04* Δ	0.72±0.04* Δ	0.97±0.02*	0.82±0.03* Δ	0.66±0.03* Δ
假手术组	0.42±0.02	0.42±0.02	0.43±0.02	0.43±0.03	0.45±0.02	0.43±0.01	0.43±0.01
正常对照组	0.41±0.02	—	—	—	—	—	—

*: $P<0.05$,与假手术组及正常对照组比较; Δ : $P<0.05$,与 ICH 3 d 组比较;—:表示此项无数据。



M: Marker; 1: 3 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 1 d; 5: 3 d; 6: 5 d; 7: 7 d.

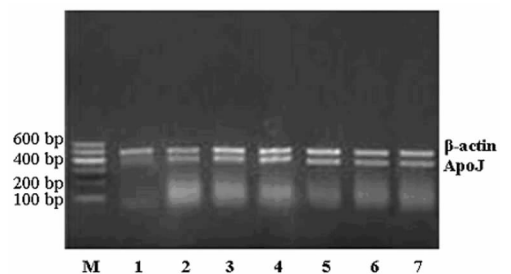
图 1 ICH 组大鼠脑组织补体 C3 mRNA 的电泳图

1.4 RT-PCR 检测 分别取各组脑组织匀浆,按一步法总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,合成 cDNA,然后用 PTC 220 型 PCR 热循环仪扩增 cDNA,引物序列见表 1。 β actin mRNA 作为内参。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,应用 Eagle Eye II 型图像分析处理系统对电泳带进行扫描,根据各条带光密度值,计算 *ApoJ*、补体 C3 mRNA 表达的相对水平。

1.5 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行方差分析和相关性分析,计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA) 多个样本均数的两两比较法,组内各时间点比较采用 t 检验,相关分析应用 Pearson 相关系数法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脑组织含水量的动态变化 在 3 h 至 7 d 各时间点,ICH 组的脑组织含水量明显高于相应时间点的正常对照组及假手术组($P<0.05$),其中以 ICH 3 d 组的脑组织含水量最高,见表 2。



M: Marker; 1: 3 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 1 d; 5: 3 d; 6: 5 d; 7: 7 d.

图 2 ICH 组大鼠脑组织 *ApoJ* mRNA 的电泳图

2.2 补体 C3 mRNA 的表达 在各时间点,正常对照组及假手术组大鼠脑组织的补体 C3 mRNA 呈低水平表达;除 ICH 3 h 组,ICH 组各时间点补体 C3 mRNA 表达明显高于相应时间点的正常对照组及假手术组($P < 0.05$);ICH 3 d 组补体 C3 mRNA 的表达水平最高,见表 3、图 1。

2.3 ApoJ mRNA 的表达 在各时间点,正常对照组及假手术组大鼠脑组织 ApoJ mRNA 呈低水平表达;ICH 组 ApoJ mRNA 表达明显高于正常对照组及假手术组($P < 0.05$),ICH 3 d 组 ApoJ mRNA 的表达水平最高,见表 4、图 2。

2.4 相关性分析 应用 Pearson 相关系数法分析 ICH 组各检测指标间的相关性。补体 C3、ApoJ mRNA 的表达水平与血肿周围脑组织含水量呈正相关($R = 0.758, P < 0.05; R = 0.702, P < 0.05$),提示 ICH 后脑水肿与补体系统有关,ApoJ 蛋白可能间接参与脑水肿的形成,见图 3、4;ApoJ mRNA 与补体 C3 mRNA 的表达水平呈正相关($R = 0.908, P < 0.05$),提示 ICH 后 ApoJ 参与了补体调控,见图 5。

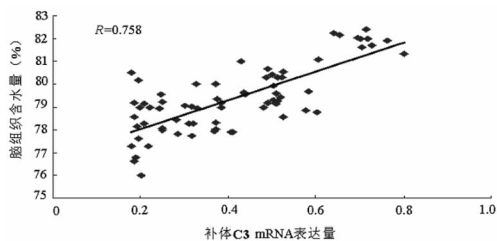


图 3 补体 C3 mRNA 表达水平与血肿周围脑组织含水量的关系

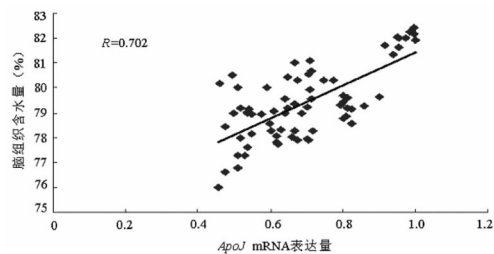


图 4 ApoJ mRNA 表达水平与血肿周围脑组织含水量的关系

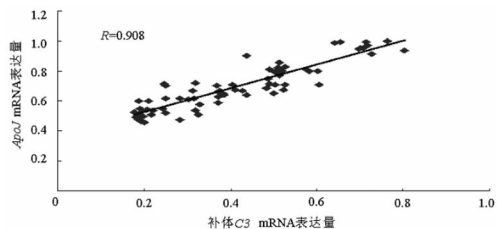


图 5 ApoJ mRNA 与补体 C3 mRNA 表达水平的关系

3 讨论

ICH 是神经内科常见病,血肿周围脑组织水肿是影响患者病情及预后的重要因素^[5],炎症和细胞凋亡是脑出血性疾病的重要病理生理机制,抑制炎症和细胞凋亡成为治疗 ICH 的新策略^[6]。近年来的研究表明,补体系统在出血性脑损伤的炎症和细胞凋亡过程中扮演了重要角色^[7]。补体是机体免疫系统的重要组成部分,在杀灭入侵病原菌和清除免疫复合物方面发挥重要作用^[8]。补体的激活主要有 3 条途径:抗体依赖性补

体经典途径、替代途径和甘露糖结合凝集素激活途径,3 条途径最后都形成膜攻击复合物(membrane attack complex, MAC) C_5-9 。有研究表明补体在 ICH 后经受损血脑屏障进入脑组织并被激活,补体系统的激活以及 MAC 的形成可加剧 ICH 后脑水肿^[9]。补体 C3 在补体中的含量最高,是 3 条途径的交汇点及补体发挥生物学作用的枢纽,补体 C3 mRNA 高表达提示补体 C3 的消耗及补体系统的激活^[2]。本研究发现,ICH 组补体 C3 mRNA 表达水平在 3 h 时与正常对照组和假手术组无明显差异,6 h 后开始增加,3 d 达到峰值,5、7 d 后逐渐下降,与脑损伤规律基本一致,提示 ICH 过程中存在补体系统的激活。同时,本研究还显示 ICH 组补体 C3 mRNA 表达水平与脑组织含水量呈正相关,提示补体激活可能加重脑组织损害。Homeister 和 Lucchesi^[10]认为 ICH 后补体级联反应的激活可能是补体成分与活性氧、自由基相互作用的结果,过氧化氢水解补体 C3 形成具有催化作用的轻自由基 C_{3b} 分子,而轻自由基使补体 C5 转化成具有功能活性的 C_{5b} 类似物,参与形成 MAC。

ApoJ 是杂二聚体糖蛋白,由 α, β 链组成,分布于血浆高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)2 及 HDL3 中,与含 Apo-AI 和胆固醇转移蛋白活性的 HDL 亚型关系密切。ApoJ 与 Apo-AI 一起形成 HDL 复合物,参与脂质转运、补体功能调节等多种生理功能^[11]。正常中枢神经系统的神经元及星形胶质细胞可低水平表达 ApoJ mRNA^[12],而当细胞受损时,其表达可能增加。Nuutinen 等^[13]认为位于细胞核的 ApoJ 可诱导细胞凋亡,而当促凋亡蛋白 Bax 表达增加时,位于细胞线粒体的 ApoJ 表达增加,呈聚集状态,发挥保护细胞的作用。Kim 等^[14]认为分泌型 ApoJ 通过抑制 DNA 合成而阻止受损血管平滑肌细胞的过度增殖,减少 TNF- α 诱导的凋亡,促进内皮细胞一氧化氮合酶的表达。李艳玲和何志义^[15]认为,在大鼠脑梗死后,ApoJ 的表达代偿性增加以抑制补体活性,从而抑制补体介导的神经元死亡,发挥神经元保护作用。然而,Hakkoum 等^[16]发现在脑缺血的体外模型中,ApoJ 可加重受损细胞死亡。

本研究结果显示,ICH 组大鼠病灶周围 ApoJ mRNA 表达水平与脑损伤,尤其是脑水肿的变化规律一致,提示 ApoJ 参与了 ICH 的病理生理过程。ICH 组大鼠病灶周围脑组织中的 ApoJ mRNA 表达水平与脑含水量、补体 C3 mRNA 表达水平的相关性分析提示,ApoJ 可能随着 ICH 病理生理性损伤的进展,在病灶周围表达逐渐增加以保护濒临凋亡的神经细胞,ApoJ 这种神经细胞保护机制目前尚未明确,calero 等^[17]认为 ApoJ 的保护作用可能存在以下 4 种机制:(1)抑制补体蛋白形成 MAC,从而抑制炎症;(2)具有抗氧化作用;(3)作为抗凋亡信号;(4)与炎症相关蛋白结合,抑制蛋白质介导的炎症反应。ApoJ 的 β 链中有一段 23 个氨基酸残基的区域与补体成分 C7、C8 及 C9 的相应片段具有高度同源性。它能在 3 个位点上与补体 C9 竞争,抑制 C9 与 C_{5b-8} 、 C_{5b-9} 及 C_{5b-7} 的结合,形成水溶性的亚溶解细胞活性的复合物,从而阻止 MAC 的形成。推测 ApoJ 对 ICH 后脑组织的保护作用是通过抑制补体激活,阻止补体介导的神经细胞损伤而实现的。

本实验还发现,ApoJ mRNA 表达上调在 ICH 后先于补体 C3 mRNA 的表达上调,这可能源于机体因 ICH 损伤而产生

生的内源性应激反应,其机制还有待进一步阐明。

综上所述, ApoJ 作为 MAC 抑制剂,在 ICH 过程中,通过抑制补体系统的激活而减轻脑水肿、保护神经元。根据 ApoJ 在 ICH 后的变化规律以及 ApoJ 作为内源性补体抑制剂,它能否成为临床上监测脑水肿程度的间接指标、在治疗脑损伤过程中发挥重要作用还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Shannan B, Seifert M, Leskov K, et al. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(1): 12-19.
- [2] Lambert J C, Heath S, Even G, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(10): 1094-1099.
- [3] Xue M, Del Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rat: time course of inflammation and cell death [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 283(3): 230-232.
- [4] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [5] 崔洁, 王景周, 宋钦, 等. 脑出血大鼠脑水肿与血浆肿瘤坏死因子关系的研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(13): 1244-1245.
- [6] 周志强, 赵立波, 王凤英, 等. rh EPO 抑制大鼠脑出血后炎症反应与增强 LIVIN 的表达[J]. *重庆医学*, 2009, 38(9): 1067-1070.
- [7] 孟凡超, 姜季宇, 杨宵鹏, 等. 实验性脑出血大鼠脑水肿的动态变化[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2006, 9(3): 67-69.
- [8] 张军, 张国华, 林杰. 补体 C3 和 C4 在脑出血后血肿周围组织水肿形成过程中的作用[J]. *中国全科医学*, 2008, 11(5A): 741-743.
- [9] Xi G, Hua Y, Keep RF, et al. Systemic complement depletion diminishes perihematomal brain edema in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(1): 162-167.
- [10] Homeister JW, Lucchesi BR. Complement activation and inhibition in myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1994, 34: 17-40.
- [11] 陈海峰, 浦晓东. 载脂蛋白 J 在心血管疾病中的研究进展 [J]. *国外医学心血管疾病分册*, 2005, 32(6): 332-334.
- [12] Wiggins A, Shen P, Gundlach A. Delayed, but prolonged increases in astrocytic clusterin(ApoJ) mRNA expression following acute cortical spreading depression in the rat: evidence for a role of clusterin in ischemic tolerance[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, 114(1): 20-30.
- [13] Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, et al. Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease [J]. *Brain Res Rev*, 2009, 61(2): 89-104.
- [14] Kim HJ, Yoo EK, Kim JY, et al. Protective role of clusterin /apolipoprotein J against neointimal hyperplasia via antiproliferative effect on vascular smooth muscle cells and cytoprotective effect on endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(10): 1558-1564.
- [15] 李艳玲, 何志义. 大鼠脑梗死模型中载脂蛋白 J mRNA 表达的研究[J]. *辽宁医学院学报*, 2008, 29(4): 308-310.
- [16] Hakkoum D, Imhof A, Vallet PG, et al. Clusterin increases post-ischemic damages in organotypic hippocampal slice cultures[J]. *J Neurochem*, 2008, 106(4): 1791-1803.
- [17] Calero M, Rostagno A, Matsubara E, et al. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease [J]. *Microsc Res Tech*, 2000, 50(4): 305-315.

(收稿日期: 2010-12-11 修回日期: 2011-02-17)

(上接第 1670 页)

- [10] Bakshi VP, Kalin NH. Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: gene-environment interactions [J]. *Biol Psychiatry*, 2000, 48(12): 1175-1198.
- [11] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 2 版. 成都: 四川科学技术出版社, 2001: 28-39.
- [12] Gerlai R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model [J]. *Behav Genet*, 2003, 33(5): 461-468.
- [13] Fülöp AK, Foldes A, Buzás E, et al. Hyperleptinemia, visceral adiposity, and decreased glucose tolerance in mice with a targeted disruption of the histidine decarboxylase gene[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(10): 4306-4314.
- [14] Harris RB. Leptin responsiveness of mice deficient in corticotrophin-releasing hormone receptor type 2 [J]. *Neuroendocrinology*, 2010, 92(3): 198-206.
- [15] Shinahara M, Nishiyama M, Iwasaki Y, et al. Plasma adiponectin levels are increased despite insulin resistance in corticotropin-releasing hormone transgenic mice, an animal model of Cushing syndrome [J]. *Endocr J*, 2009, 56(7): 879-886.

(收稿日期: 2010-12-31 修回日期: 2011-04-03)