

网络出版时间:2021/12/22 15:43 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211221.1000.010.html

缺血性脑卒中致脑室运动纤毛功能障碍诱发脑水肿

赵玉洁^{1,2}, 张玲^{1,2}, 马兰^{1,2}, 滕增光^{1,2}, 贾金鑫^{1,2}, 曹晓璐^{1,2}

摘要 目的 探讨室管膜细胞上运动纤毛功能对缺血性脑卒中脑水肿的影响。方法 60只SD大鼠随机分为假手术组和模型组。线栓法构建缺血2h再灌注24h模型。Longa's 5分法进行神经功能评分;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色评价脑梗死体积;干湿重法测量脑含水量;苏木精-伊红(HE)染色和扫描电镜(SEM)观察运动纤毛的形态变化;Western blot检测运动纤毛相关蛋白SPAG6表达水平;免疫荧光法检测运动纤毛结构和SPAG6的表达分布。结果 与假手术组相比,模型组的脑梗死体积、神经功能评分明显增加,脑水肿明显($P < 0.05$)。HE染色和SEM结果显示,假手术组脑组织结构紧密、规则,室管膜细胞核圆润饱满,运动纤毛排列整齐、结构完整;模型组脑组织结构松散,室管膜细胞核皱缩浓染,出现大量坏死细胞,运动纤毛数量和密度显著降低、排列杂乱。Western blot结果显示,模型组的SPAG6总蛋白量较假手术组升高,但结果差异无统计学意义。免疫荧光实验结果显示,相比于假手术组,模型组运动纤毛长度明显较短($P < 0.05$);模型组的SPAG6总荧光强度较假手术组增高,但结果差异无统计学意义;模型组室管膜细胞上SPAG6的平均荧光强度与假手术组相比升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);脑缺血再灌注(CIS-R)损伤使纤毛上的SPAG6荧光表达量降低($P < 0.05$)。结论 脑缺血再灌注下调室管膜细胞表面运动纤毛上的SPAG6表达,造成运动纤毛结构和功能障碍,进而继发脑水肿损伤。

关键词 脑缺血/再灌注;脑水肿;室管膜细胞;运动纤毛;SPAG6

中图分类号 R 743.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0047-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.010

缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke, CIS)占脑卒中总数的60%~70%^[1],易发生缺血性脑卒

中/再灌注(cerebral ischemic stroke-reperfusion, CIS/R)损伤,并继发脑水肿,使病死率增加^[2]。已知CIS-R过程伴随血管内大分子物质渗透到脑细胞间隙,最终导致脑实质、脑室脉络丛等部位发生脑水肿^[3]。研究^[4]表明,运动纤毛紊乱会导致原发性纤毛运动障碍,在神经系统表现为脑水肿,敲除纤毛相关基因*Spag6*后,室管膜细胞上运动纤毛出现结构和功能损伤。然而,目前尚未见报道,CIS/R继发脑水肿损伤是否与室管膜细胞运动纤毛的结构功能异常以及运动纤毛相关基因*Spag6*表达异常相关。该研究拟在整体动物水平,检测脑缺血/再灌注继发脑水肿损伤后,脑室管膜细胞运动纤毛的结构和功能变化,以及运动纤毛相关蛋白的表达调控,初步探讨缺血性脑卒中继发的脑水肿与室管膜细胞上运动纤毛功能障碍的调控机制。

1 材料与方法

1.1 动物及处理方法 雄性SPF级SD大鼠60只,6周龄,体质量(260~300)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2019-0010]。分笼饲养于标准环境中,常温、常规大鼠饲料喂养,自由饮水。利用随机数字表法将60只SD大鼠随机分为两组:假手术组(Sham组)和模型组(MACO/R组),30只/组。假手术组仅暴露颈总动脉不做栓塞处理,模型组大鼠采用大脑中动脉栓塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)建立脑缺血2h再灌注24h模型。

1.2 主要试剂和器材 兔抗SPAG6多抗(bs-12291R)、兔抗 β -actin(bs-0061R)、兔抗SPAG6/Cy3(bs12291R-Cy3)购自北京博奥森生物技术有限公司;Ac- α -Tubulin(#5335)购自美国Cell Signaling Technology;山羊抗兔Cy3(125799)、山羊抗兔FITC(133027)和苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自武汉科瑞生物技术有限公司;激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯, FV1000);扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)由中国科学院武汉病毒研究所分析测试中心提供。

1.3 方法

2021-09-13接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81801307);武汉科技大学科技创新团队培育项目(编号:2018TDZ03);湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(编号:T2020003)

作者单位:武汉科技大学医学院¹公共卫生学院环境卫生与职业医学教研室、²职业危害识别与控制湖北省重点实验室,武汉 430081

作者简介:赵玉洁,女,硕士;

曹晓璐,女,硕士,高级实验师,硕士生导师,责任作者, E-mail: caoxiaolu1126@163.com

1.3.1 MCAO/R 模型的构建 将长 4 cm 的鱼线一端浸入熔化的石蜡中并迅速提起,反复几次,待鱼线表面石蜡凝固后即作为线栓备用。大鼠术前禁食不禁水,称重后用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(350 mg/kg),固定于手术台上,以颈正中线行纵向切口,剥离筋膜,钝性分离两侧组织,暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)并分离,之后分离右侧颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA),结扎 ECA,动脉夹夹住 CCA 和 ICA,在 ECA 距离与 ICA 分叉处 4 mm 处,用眼科剪剪一小口,夹持线栓插入 ECA,经由 CCA 插入 ICA,插入深度为 16 ~ 18 mm 为止。将线栓与 ECA 结扎固定,最后缝合筋膜、皮肤。线栓插入成功后,记录缺血时间,2 h 后拔出线栓,结扎 ECA 近心端。

1.3.2 神经功能评分 缺血/再灌注 24 h 后采用 Longa's 评分标准对大鼠神经功能进行评分。0 分:活动正常,无神经功能缺损;1 分:左前肢不能完全伸展;2 分:爬行时向左侧转圈;3 分:爬行时向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。选取评分为 1 ~ 4 分的大鼠进行实验。

1.3.3 脑水肿测定 再灌注 24 h 后,将大鼠麻醉,取新鲜脑组织,去掉小脑后,用滤纸吸干表面血渍,分开左右脑,置于电子分析天平测右脑湿重,之后放入 110 °C 恒温箱中连续烘烤 48 h,称量右脑干重。按 Elliot 公式计算脑含水量,脑含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

1.3.4 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色 将大鼠麻醉,断颈取脑, -20 °C 冷冻 30 min 后行冠状切片(厚度约 2 mm),置入 1% TTC 溶液中,37 °C 避光孵育约 20 min,之后置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,拍照,正常脑组织呈鲜红色,梗死脑组织呈白色。ImageJ 软件测定梗死区域面积,每层梗死体积 = 梗死面积 × 层厚,总梗死体积为各层梗死体积之和。梗死体积百分比 = (梗死区域面积 / 脑片总面积) × 100%。

1.3.5 HE 染色 多聚甲醛固定的脑组织用石蜡包埋、切片,经过脱蜡、水化后,苏木精染色约 10 min,自来水冲洗,再放入 1% 盐酸乙醇中分化数秒,自来水冲洗,乙醇梯度脱水;0.5% 伊红染色约 20 s,乙醇梯度脱水,封片,显微镜下观察并拍照。

1.3.6 SEM 观察纤毛形态 取大鼠右侧第三脑室室管膜细胞周围组织,切片约 1.5 mm 厚,0.9% 氯化钠溶液清洗,2.5% 戊二醛二甲砷酸钠固定液固定

(2 ~ 3) h,乙醇梯度脱水各 20 min,CO₂ 临界点干燥,镀膜,SEM 观察纤毛结构,并拍照。

1.3.7 Western blot 检测 SPAG6 表达 取大鼠右脑皮层组织,RIPA 裂解液提取蛋白,BCA 试剂盒测蛋白浓度。配置 12% 的 SDS-PAGE 分离胶,5% 浓缩胶,40 μg 蛋白变性后上样,电泳、电转,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,孵育一抗(SPAG6, 1 : 1 000, β-actin, 1 : 10 000),4 °C 冰箱过夜,TBST 洗膜后孵育二抗 2 h, TBST 洗膜后加 ECL 显影液进行显影,Image J 软件进行灰度值分析。

1.3.8 免疫荧光分析纤毛形态及 SPAG6 表达 脑片脱蜡水化后,置于 100 °C 10 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液中 10 min,冷却后透膜、封闭,湿盒中孵育一抗(SPAG6, 1 : 100; Ac-α-tubulin, 1 : 400)放入 4 °C 冰箱过夜;室温避光孵育二抗(Cy3, 1 : 200; FITC, 1 : 100),DAPI 核染 5 min,甘油封片,激光共聚焦观察并拍照。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 26.0 统计学软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本均数比较用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑缺血/再灌注后神经功能评分、梗死体积及脑含水量的变化 模型组大鼠成功 27 只,死亡 2 只,神经功能评分为 0 分的 1 只大鼠除去,造模成功率为 90%。Sham 组大鼠神经功能评分和脑梗死体积为 0;MACO/R 组神经功能评分为(2.71 ± 1.05),梗死体积为(19.33 ± 9.55)%,与 Sham 组相比结果差异均有统计学意义(*P* < 0.05),说明建模成功。见图 1A ~ C。与 Sham 组相比,差异有统计学意义(*P* < 0.05),说明构建脑缺血再灌注模型成功诱导了脑水肿症状。见图 1D、E。

2.2 脑缺血/再灌注对脑室管膜细胞运动纤毛的形态学影响 HE 染色结果显示,Sham 组大鼠脑组织结构紧密规则,室管膜细胞的细胞核圆润饱满,未见坏死细胞,运动纤毛排列整齐、结构完整、生长浓密,见图 2A;MACO/R 模型组脑组织结构松散,室管膜细胞的细胞核皱缩浓染,生成大量坏死细胞,运动纤毛结构紊乱、数量减少、密度降低,且均有统计学意义,见图 2B。SEM 结果与 HE 染色结果一致,显示假手术组脑室管膜细胞表面纤毛排列密集、活性高,摆动方向规律一致,见图 2C;模型组纤毛数量减少、密度降低,差异有统计学意义,而且活性较差,排列方向杂乱无章,见图 2D。

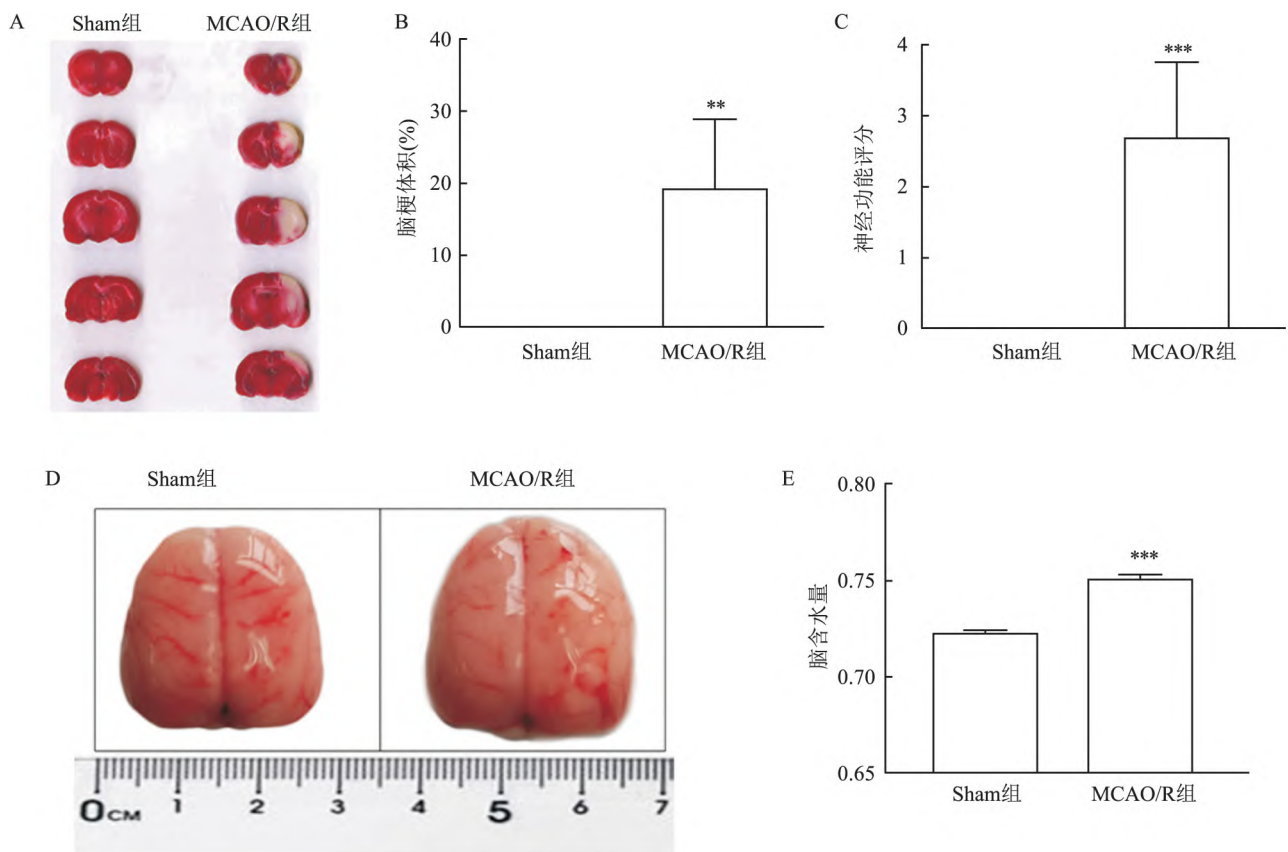


图1 脑缺血/再灌注对大脑形态的影响

A: TTC 染色; B: 脑梗死体积; C: 神经功能评分; D: 大脑体积; E: 脑含水量测定; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

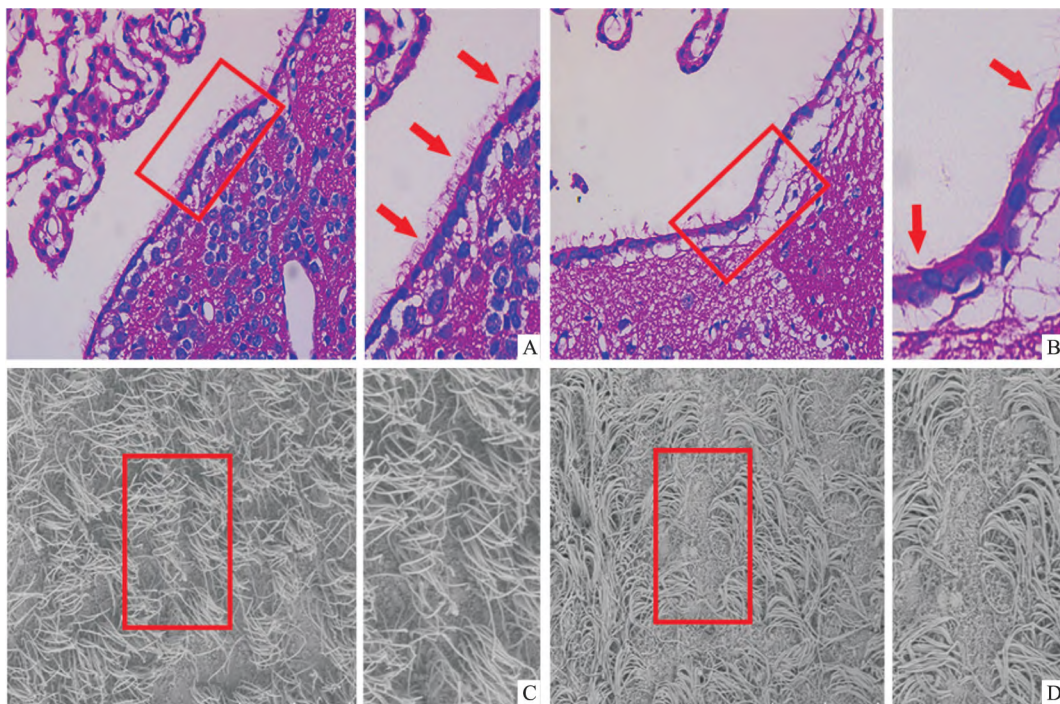


图2 脑缺血/再灌注对大脑第三脑室运动纤毛的影响

A: Sham 组 HE 染色 $\times 400$ 结果图; B: MCAO/R 组 HE 染色 $\times 400$ 结果图; C: Sham 组扫描电镜 $\times 20\,000$ 结果图; D: MCAO/R 组扫描电镜 $\times 20\,000$ 结果图; 图中红色箭头指向室管膜细胞上运动纤毛

2.3 脑缺血/再灌注对运动纤毛相关基因 SPAG6 表达的影响 Western blot 结果显示,与 Sham 组相比,MCAO/R 组的 SPAG6 总蛋白表达量略有升高,但结果无统计学差异,见图 3A、B。在免疫荧光实验中,通过分析脑室切片每 10 mm² 区域的平均荧光强度显示,见图 3C 白色方框,MCAO/R 组的 SPAG6 蛋白荧光表达强度比 Sham 组略有升高,但结果差异无统计学意义,此结果与 Western blot 结果一致(图 3D);分别对该区域的室管膜细胞和运动纤毛

上 SPAG6 蛋白表达进行荧光强度分析显示,与 Sham 组对比,MCAO/R 组的室管膜细胞的平均荧光强度升高,见图 3E;运动纤毛上 SPAG6 蛋白表达量减少,见图 3F,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。通过分析运动纤毛指示蛋白 Ac- α -tubulin 显示,与 Sham 组相比,MCAO/R 组纤毛较数量少,排列杂乱无序,这一结果与 HE 染色结果一致。MCAO/R 组的运动纤毛长度较 Sham 组明显缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3G。

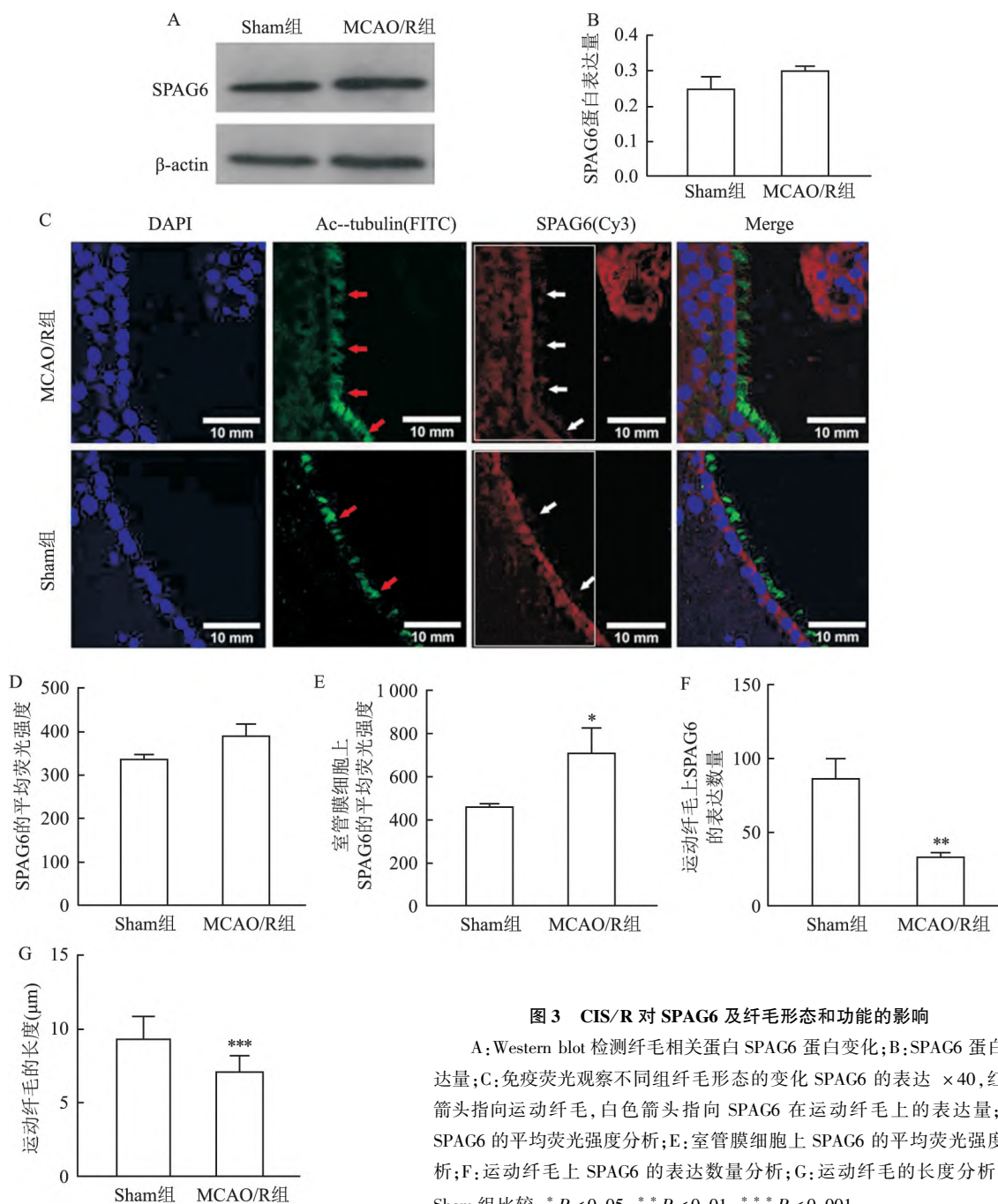


图3 CIS/R 对 SPAG6 及纤毛形态和功能的影响

A: Western blot 检测纤毛相关蛋白 SPAG6 蛋白变化; B: SPAG6 蛋白表达量; C: 免疫荧光观察不同组纤毛形态的变化 SPAG6 的表达 × 40, 红色箭头指向运动纤毛, 白色箭头指向 SPAG6 在运动纤毛上的表达量; D: SPAG6 的平均荧光强度分析; E: 室管膜细胞上 SPAG6 的平均荧光强度分析; F: 运动纤毛上 SPAG6 的表达数量分析; G: 运动纤毛的长度分析; 与 Sham 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

运动纤毛是细胞游离面伸出的能摆动的较长突起,广泛分布在脑室管膜细胞^[5]、支气管上皮细胞^[6]等组织。纤毛的摆动不仅有利于脑脊液在中央管内的动态混合,同时对脑脊液与脊髓间物质流、能量流、信息流的交换运输和碎片清除,起到积极的配合推动作用^[7],以此来维持脑内动态平衡。

小鼠运动纤毛存在一个剪接位点 *Ccdc39*,在脉络丛和室管膜细胞中选择性表达。当 *Ccdc39* 发生突变,室管膜细胞运动纤毛变短、微管混乱、缺乏动力蛋白,从而导致脑水肿^[8]。而临床发生脑水肿是缺血性脑卒中急性期死亡的主要原因^[9]。本研究通过构建脑缺血/再灌注模型引发脑水肿症状,结果显示大鼠脑室运动纤毛的正常结构被破坏,并出现脑水肿,说明 CIS 继发脑水肿可能与运动纤毛结构和功能异常相关。

哺乳动物的精子相关抗原 6 (sperm associated antigen 6, SPAG6) 是衣藻 PF16 的同源基因,调节纤毛的运动,在大脑、支气管等多个组织表达^[10]。本研究中,当 CIS/R 发生后,SPAG6 蛋白表达有所升高,说明 SPAG6 参与了缺血性脑卒中/再灌注损伤的发生发展过程。而且 SPAG6 在室管膜细胞上荧光表达增加,提示 CIS/R 损伤介导的 SPAG6 蛋白表达升高主要集中在室管膜细胞部位,这一现象可能是由于急性缺血使得 SPAG6 在脑室管膜细胞的表达应激性增加,导致荧光强度增大。

既往的研究^[11]显示,在缺失 *Spag6* 的小鼠中,脑室管膜细胞上的运动纤毛的结构形态出现病理性改变,这说明 *Spag6* 对运动纤毛的结构具有重要的调控功能。而本研究 CIS/R 继发脑水肿的同时,脑室管膜细胞的运动纤毛上 *Spag6* 表达显著降低,运动纤毛结构受损。这一现象可能就是因为运动纤毛相关基因 *Spag6* 表达异常导致运动纤毛功能障碍,从而抑制了运动纤毛对脑脊液动态混合、能量交换、信息运输的作用,最终导致脑水肿的发生。Sapiro et al^[12] 的研究也证实,敲除 *Spag6* 基因的小鼠约有 50% 死于脑水肿,表明 *Spag6* 与大脑发生脑水肿症状有直接关联。

综上所述,该研究确定了 CIS/R 下调大脑脑室运动纤毛上 SPAG6 蛋白表达,影响运动纤毛结构功

能,从而发生脑水肿损伤。这为进一步揭示缺血性脑卒中的病理机制,以及临床治疗和相关药物研发提供了可靠依据。大脑脑室运动纤毛的结构和功能是由多个基因来调控和维系的,在缺血性脑卒中继发脑水肿损伤过程中,是否还有其他纤毛相关基因参与,其中的具体分子调控机制如何,仍需进一步探究。

参考文献

- [1] Mokdad A H, Forouzanfar M H, Daoud F, et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990 - 2013; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. Lancet, 2016, 387 (10036): 2383 - 401.
- [2] Cassella C R, Jagoda A. Ischemic stroke: advances in diagnosis and management [J]. Emerg Med Clin North Am, 2017, 35 (4): 911 - 30.
- [3] Johnson S E, McKnight C D, Lants S K, et al. Choroid plexus perfusion and intracranial cerebrospinal fluid changes after angiogenesis [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 40 (8): 1658 - 71.
- [4] Dhar R, Chen Y, Hamzehloo A, et al. Reduction in cerebrospinal fluid volume as an early quantitative biomarker of cerebral edema after ischemic stroke [J]. Stroke, 2020, 51 (2): 462 - 7.
- [5] Xing L, Anbarchian T, Tsai J M, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates ependymal cell development and adult homeostasis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115 (26): E5954 - 62.
- [6] Reiter J F, Leroux M R. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18 (9): 533 - 47.
- [7] Bustamante-Marin X M, Ostrowski L E. Cilia and mucociliary clearance [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9 (4): a028241.
- [8] Abdelhamed Z, Vuong S M, Hill L, et al. A mutation in *Ccdc39* causes neonatal hydrocephalus with abnormal motile cilia development in mice [J]. Development, 2018, 145 (1): dev154500.
- [9] 韩春赓, 杨莹, 傅佳. 大鼠局灶性脑缺血/再灌注后血管源性脑水肿的时相变化 [J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45 (2): 143 - 6.
- [10] Teves M E, Sears P R, Li W, et al. Sperm-associated antigen 6 (SPAG6) deficiency and defects in ciliogenesis and cilia function: polarity, density, and beat [J]. PLoS One, 2014, 9 (10): e107271.
- [11] Li W, Mukherjee A, Wu J H, et al. Sperm associated antigen 6 (SPAG6) regulates fibroblast cell growth, morphology, migration and ciliogenesis [J]. Sci Rep, 2015, 20 (5): 16506.
- [12] Sapiro R, Kostetskii I, Olds-Clarke P, et al. Male infertility, impaired sperm motility, and hydrocephalus in mice deficient in sperm-associated antigen 6 [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22 (17):

Ischemic stroke causes dysfunction of ventricular motile cilia and induces cerebral edema

Zhao Yujie^{1,2}, Zhang Ling^{1,2}, Ma Lan^{1,2}, Teng Zengguang^{1,2}, Jia Jinxin^{1,2}, Cao Xiaolu^{1,2}

(¹Dept of Environmental Health and Occupational Medicine, ²Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control in Hubei Province, School of Public Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081)

Abstract Objective To investigate the effect of motile cilia of ependymal cells on cerebral edema induced by ischemic stroke. **Methods** SD rats ($n = 60$) were randomly divided into sham group and ischemia-reperfusion model group. In the model group, a 2 h reperfusion 24 h model of ischemia was constructed by the method of suture. The Longa's-5 point method and the 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining were used to assess neurological function and the cerebral infarction volume, respectively. The dry and wet weight method was used to measure brain water content. The morphological changes of motile cilia were observed by HE staining and scanning electron microscope (SEM). The level of SPAG6 expressed in tissues with motile cilia was measured by Western blot. Immunofluorescence was used to detect the structure of motile cilia and the expression distribution of SPAG6 in brain.

Results Compared with the sham group, the infarct volume and neurological function score of the model group increased significantly, and the brain edema was obvious ($P < 0.05$). HE staining and SEM results showed that the brain tissue structure of the sham group was tight and regular and the ependymal cell nucleus was round and full. The motile cilia in sham group were arranged orderly and the structure was complete. The brain tissue structure of the model group was loose and the ependymal cell nucleus was wrinkled, condensed and dyed. A large number of necrotic cells were generated, and the structure of motile cilia was disordered. The number and density of motile cilia were significantly reduced, and the arrangement was disordered. Western blot results showed that the total protein content of SPAG6 in the model group was higher than that in the sham group, but the results were not statistically different. Immunofluorescence results showed that compared with the sham group, the length of motile cilia in the model group was significantly shorter ($P < 0.05$). The fluorescence intensity of SPAG6 in the model group was higher than that in the sham group, but the results were not statistically different. Compared with the sham group, the average fluorescence intensity of SPAG6 in ependymal cells of the model group significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); and cerebral ischemia-reperfusion injury reduced the expression of SPAG6 fluorescence in the cilia ($P < 0.05$). **Conclusion** Cerebral ischemia-reperfusion down-regulates the expression of SPAG6 in motile cilia of ependymal cells, resulting in abnormal structure and dysfunction of motile cilia, and subsequent brain edema injury.

Key words cerebral ischemia-reperfusion; cerebral edema; ependymal cells; motile cilia; SPAG6