

· 实验研究 ·

紧密连接蛋白 ZO-1、occludin 和 actin 参与缺氧缺血诱导的血脑屏障通透性增加

吴丽文, 尹飞, 彭镜, 王卫东, 甘娜

(中南大学湘雅医院儿科教研室, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 探讨血脑屏障紧密连接(blood-brain barrier-tight junction, BBB-TJ)蛋白 ZO-1、occludin 和 actin 在缺氧缺血诱导的血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)通透性增加中的变化及其机制。方法 利用人脐静脉内皮细胞系 ECV304 与星形胶质细胞(astrocytes, AS)共培养建立体外 BBB 模型,模型随机分为正常对照组和缺氧缺血两组。透射电镜观察两组间 BBB-TJ 的变化,直接免疫荧光观察细胞骨架蛋白 actin 分布的改变。 γ 计数器检测大分子物质 ^{125}I -牛血清白蛋白(^{125}I -BSA)通透曲线观察 BBB 通透性的改变, Western blot 检测细胞骨架蛋白 actin, 胞浆附着蛋白 ZO-1, 跨膜蛋白 occludin 的表达量的改变。结果 透射电镜观察培养第 10 天的体外 BBB 模型,可见内皮细胞连接紧密,细胞间形成光滑、连续、较高密度的紧密连接。缺氧缺血后 5 h, 内皮细胞间连接开放,形成裂隙。直接免疫荧光下检测可见周边 Actin 丝带模糊,部分断裂,形成细胞间裂隙。缺氧缺血组 ^{125}I -BSA 的通透量增加,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。同时 ZO-1 的表达量显著减少,而 occludin 和 actin 的表达量无明显改变。结论 缺氧缺血诱导 occludin 的位置分布改变和 ZO-1 的表达量减少进而促使 actin 蛋白发生重排,是导致缺氧缺血后 BBB 通透性增加的可能机制之一。 [中国当代儿科杂志, 2008, 10(4): 513-516]

[关键词] 血脑屏障;紧密连接蛋白;Actin;ZO-1;Occludin;通透性;细胞培养

[中图分类号] R-331 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)04-0513-04

The tight junction proteins ZO-1, occludin and actin participate in the permeability increasing of blood-brain barrier induced by hypoxia-ischemia

WU Li-Wen, YIN Fei, PENG Jing, WANG Wei-Dong, GAN Na. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Yin F, Email: yf3079@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the changes of blood-brain barrier-tight junction (BBB-TJ) proteins ZO-1, occludin and actin following hypoxia-ischemia (HI) in order to explore the possible mechanism of permeability increasing of blood-brain barrier (BBB) induced by HI. **Methods** BBB models were established by co-culture of cell ECV304 and astrocytes (AS) *in vitro*, then randomly assigned to control and HI groups. Transmission electron microscope was used to observe the changes of BBB-TJ. The distribution of actin was determined by direct-immunofluorescence microscope. Definite permeability of BBB models by ^{125}I -BSA was detected by γ events-per-unit-time meter. Expression of actin, ZO-1 and occludin was detected by Western blot. **Results** After 10-day culture, endothelial cells connected tightly, with plenty of TJ which was smooth, continuous and of high density, in the BBB models. After 5 hrs of HI, the TJ was opened with intercellular gaps formation. The direct immunofluorescence showed that the peripheral filament bands became blurred, the cell-cell junction loosed and fissure appeared in the HI group. The permeability of ^{125}I -BSA in the HI group increased significantly compared with the control group ($P < 0.01$). Expression of ZO-1 decreased markedly, while expression of actin and occludin was not different in the HI group compared with the control group. **Conclusions** The changes in occludin distribution and decreased expression of ZO-1 lead the reorganization of BBB-actin protein, which may be one of the mechanisms of permeability increasing of BBB following HI. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(4): 513-516]

Key words: Blood-brain barrier; Tight junction protein; Actin; ZO-1; Occludin; Permeability; Culture

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是造成新生儿伤残的重要原因之一,其

发病机制尚不完全清楚。早期病理改变之一为血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)通透性增加所引起的

[收稿日期]2007-12-01; [修回日期]2008-01-10

[基金项目]教育部回国人员启动资金(教外司:2005,383号)和湖南省自然科学基金(05JJ30173)。

[作者简介]吴丽文,女,博士生。主攻方向:小儿神经系统疾病。

[通讯作者]尹飞,博士,主任医师,博士生导师,中南大学湘雅医院儿科教研室。邮编:410008

脑水肿,脑水肿的发生又会进一步加重脑组织的缺氧缺血,从而形成恶性循环^[1],最终造成脑组织不可逆的损伤。但目前,有关缺氧缺血导致 BBB 通透性增加的机制尚不完全清楚,因而阐明此变化的机制有可能为临床治疗 HIBD 提供新的思路。

BBB 的基础结构是脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cell, BMEC), BMEC 及 BMEC 间广泛的紧密连接 (tight junction, TJ) 构成了 BBB 的第一道屏障,有助于维护脑组织微环境的稳定^[2]。TJ 由跨膜蛋白 (occludin 等)、胞浆附着蛋白 (ZO-1 等) 与细胞骨架蛋白相连而组成。TJ 是细胞间的通透屏障,通过细胞旁路径调控水、离子和大分子物质的跨膜转运^[3]。有多项研究表明^[4,5], TJ 蛋白表达量的改变,位置分布的变化和/或结构功能的异常均可能破坏 TJ 的完整性,引起细胞间连接的开放,导致 BBB 通透性的改变。

当前的研究表明 BMEC 上 TJ 蛋白和细胞骨架的改变是引起 BBB 通透性增高的主要原因之一。但目前有关 HIBD 的研究大多数以在体为主,而系统性体外 BBB 模型在缺氧缺血时改变的报道尚不多见,尤其是缺氧缺血导致离体 BBB 通透性改变的机制研究较少。为此我们想通过本研究来探讨在缺氧缺血条件下体外 BBB 通透性改变时 TJ 蛋白 actin、ZO-1 和 occludin 蛋白的变化以及他们之间的相互关系,以期进一步阐明缺氧缺血导致的 BBB 通透性增加的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康新生 2 日内 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (清洁级),雌雄不限,由中南大学湘雅医学院动物部提供。ECV304 人脐静脉内皮细胞系由中南大学湘雅医学院基础部细胞培养中心提供。Phalloidin、actin 兔抗人多克隆抗体、ZO-1 兔抗人多克隆抗体和 occludin 兔抗人多克隆抗体购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 离体 BBB 缺氧缺血性损伤模型的建立

取新生 1~2 d SD 大鼠,无菌条件下断头取脑,参照 McCarthy 方法^[6]分离纯化培养大鼠 AS。参照彭镜方法^[7]建立体外 BBB 模型,将 ECV304 及第 3~5 代的 AS 分别接种至细胞培养插,共培养至第 10 天。随机分为两组:正常对照组 (CON 组) 和缺氧缺血组 (H/I 组)。去除原培养液后,CON 组用含糖 Earle's 液 (NaCl 116.4, KCl 5.4, CaCl 1.8, MgSO₄

0.8, NaH₂ PO₄ 2.6, NaHCO₃ 26.2, 葡萄糖 5.6, HEPES 20.1, pH 7.4) 洗 2 次,再加入含糖液 Earle's 置于 37℃,95% 空气和 5% CO₂ 培养箱中继续培养。缺氧缺血组用无糖 Earle's 液 (不含葡萄糖,其他成分同含糖 Earle's 液) 洗 2 次,再加入无糖 Earle's 液置于 37℃,95% N₂ 和 5% CO₂ 的密闭缺氧室中,在缺氧状态下培养 5 h。

1.2.2 透射电镜观察细胞间 TJ 的变化

将一孔培养插多孔滤膜剪下,2.5% 戊二醛固定 24 h 以上;2% 的锇酸固定 2 h;丙酮梯度脱水;环氧树脂混合液 37℃ 浸泡 24 h;包埋时将明胶束注满包埋剂,反盖在单层细胞上,用 EPON812 (Epoxyequivalentgewicht 145-160)、DDSA (Dodeceny succinic Anhydride)、MNA (Methyl Nadic Anhydride)、DMP30 (Dimethylaminomethyl phenol) 60℃ 固化 24 h,将多孔滤膜与包埋块一同放入液氮中分离;修块、定位后制出超薄切片;用醋酸铀、硝酸铅双重染色;透射电镜观察、照相。

1.2.3 直接免疫荧光检测 actin 连接与分布的变化

取分组处理后待用模型,PBS 洗 3 min,4% 多聚甲醛 (pH 7.4) 固定 15 min。用 PBS 洗 5 min,以 0.1% TritonX-100 透明处理 10 min。PBS 洗 1 遍后滴加 6% 正常山羊血清,室温下 1 h。弃去山羊血清后,滴加 Phalloidin (用 PBS 稀释成 125:1),置于室温下 30 min。PBS 振洗 1 min × 10 次,荧光显微镜下观察 actin 在细胞内的分布。

1.2.4 γ 计数仪检测 ¹²⁵I-BSA 通过量评价 BBB 通透性

取分组处理后待用模型,吸出培养液反复冲洗内外池,重新向内外池内加入不含血清的 DMEM 培养基,并向培养插内加入 ¹²⁵I-BSA 200 μ L,置二氧化碳培养箱中培养,于 5 h 时从外池中取液 20 μ L, γ 计数仪检测其 30 s 放射强度计数,计算出其 Bake 值。

1.2.5 Western 印迹法分析

参考《分子克隆实验指南》的方法^[8]。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组样本间均数比较采用方差分析,两组样本间均数比较采用成组 *t* 检验。*P* < 0.05 被认为有统计学差异。全部资料用 SPSS 12.0 软件包统计软件处理。

2 结果

2.1 透射电镜观察细胞间 TJ 的变化

透射电镜观察培养第 10 天的 ECV304 细胞显示,CON 组 ECV304 细胞间可见较为光滑、连续、较

高密度的紧密连接;H/I组细胞间连接开放,形成裂隙(图1)。

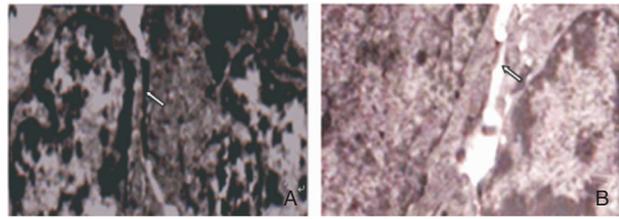


图1 透射电镜观察($\times 10\ 000$) A: CON组, ECV304细胞间可见较为光滑、连续、较高密度的紧密连接(箭头所示)。 B: H/I组, 可见细胞间连接开放, 形成裂隙(箭头所示)。

2.2 免疫荧光检测 actin 连接与分布的变化

正常培养条件下, actin 主要分布在细胞膜及细胞核周边, 形成肌动蛋白丝带, 细胞间连接紧密; 缺氧缺血, 周边肌动蛋白丝带模糊、部分断裂, 细胞间裂隙5 h后形成(图2)。

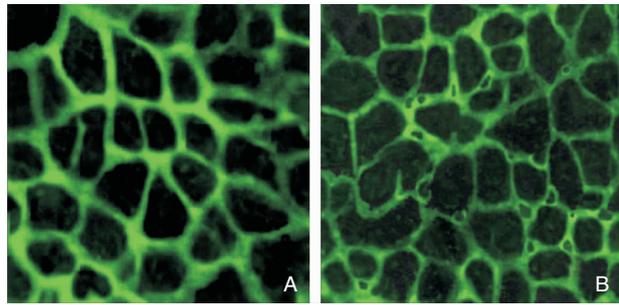


图2 免疫荧光染色(FITC $\times 400$) A: CON组, 可见 actin 主要分布在细胞膜和细胞核周边, 形成肌动蛋白丝带, 细胞间连接紧密。 B: H/I组, 肌动蛋白丝带模糊, 部分断裂, 细胞间连接松散, 可见细胞间裂隙形成。

2.3 BBB 通透性实验

经缺氧缺血干预5 h后, CON组、H/I组的Bake均数分别为: 201.77 ± 9.64 、 480.36 ± 8.72 。H/I组与CON组比较其通透性显著增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 Western blot 检测 ECV304 中 actin、ZO-1 和 occludin 的表达

CON组和H/I组的 actin 表达量都没有显著变化。同时光密度值检测也显示两组间细胞骨架蛋白 actin 的表达量差异无显著性(表1和图3)。

CON组可检测到ZO-1蛋白的表达; H/I组ZO-1的表达量与CON组比较明显减弱, 差异有显著性($P < 0.01$), (表1, 图4)。

CON组和H/I组的 occludin 蛋白表达量没有显著变化。同时光密度值检测也显示两组间的 occludin 的表达量差异无显著性(表1和图5)。

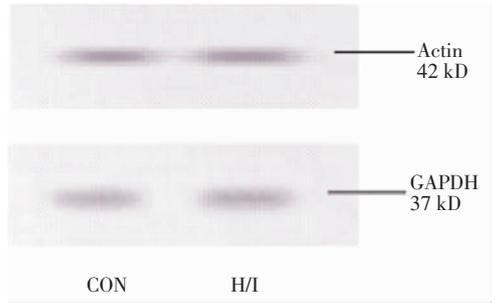


图3 ECV304 骨架蛋白 actin 表达 Western 印迹分析, 可见两组间 actin 表达量差异无显著性(GAPDH 为内参)

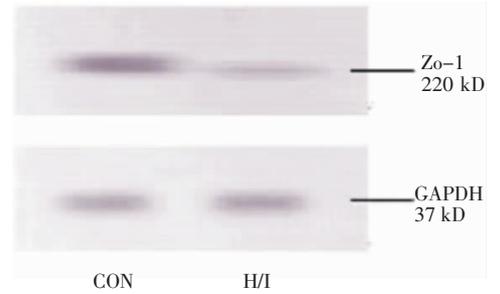


图4 ECV304 胞浆附着蛋白 ZO-1 表达 Western 印迹分析, 可见 H/I 组 ZO-1 表达明显减弱

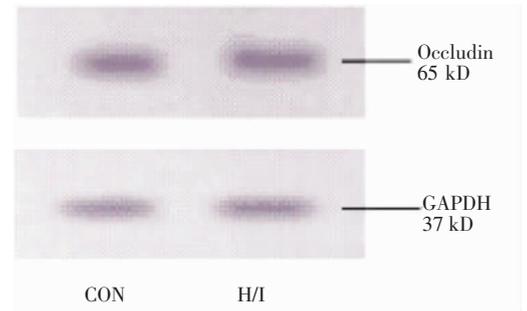


图5 ECV304 跨膜蛋白 occludin 表达 Western 印迹分析, 可见两组间 occludin 表达量无显著差异。

表1 ZO-1、occludin、actin 蛋白的表达 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

分组	actin 表达量	ZO-1 表达量	occludin 表达量
CON 组	158 ± 15.1	196 ± 13.3^a	166 ± 16.2
H/I 组	167 ± 16.4	165 ± 12.9	161 ± 16.8

注: 经 VDS 图像分析系统对 NC 膜图像处理量化后, 以光密度强度参数做比较, 进行统计学处理。a: 与 H/I 组比较 $P < 0.01$

3 讨论

本实验采用给体外培养的细胞充以惰性气体和 CO_2 的混合气体来造成低氧或无氧环境的物理性缺氧合并培养基缺糖模型, 从而模拟体内缺氧缺血病理改变。结果显示, 缺氧缺血后5 h, BBB对大分子物质 ^{125}I -BSA通透性明显增高, 与正常模型组的通

透性比较差异有显著性意义($P < 0.01$),说明缺氧缺血使 BBB 屏障功能受损。

BMEC 的细胞骨架有三种结构:微丝、微管和中间丝,维持着细胞的形态和运动功能,以微丝在维持 BMEC 细胞形态和完整性中所起的作用最重要。微丝主要由肌动蛋白 actin 组成,actin 在细胞连接和细胞屏障功能上发挥着重要的作用,TJ 的完整性取决于 actin 结构组装和功能状态。actin 由跨膜蛋白和胞质附着蛋白组成的连接复合物固定在细胞内,维持 TJ 的稳定^[9]。Brown^[10]在缺氧/低糖对内皮细胞的刺激实验中发现有骨架蛋白 actin 结构的改变。我们的研究发现缺氧缺血 5 h 后,H/I 组对¹²⁵I-BSA 的通透量明显增高,透射电镜及免疫荧光显示内皮细胞胞膜及胞核周边肌动蛋白丝带模糊、部分断裂,细胞间连接松散,出现细胞间裂隙。而 Western blot 结果显示,CON 组、H/I 组 actin 的表达量差异无显著性($P > 0.05$),提示缺氧缺血刺激对 actin 总体表达水平无明显影响。上述结果说明缺氧缺血导致 BBB 通透性改变可能与 actin 发生重排有关,而与 actin 的表达量无关。

在 TJ 的组成中,occludin 通过胞膜外部分与相邻细胞发生结合而产生细胞旁封闭,对 BBB 跨膜电阻及细胞间水通道的形成发挥一定的作用。而 ZO-1 则在连接 occludin 和 actin 中起桥梁作用,它不仅起着 TJ 形成的装配平台作用,同时又是 occludin 与细胞内骨架系统连接及信号传导机制中的一个重要结构^[11]。Kago 等^[12]研究发现脑缺血导致 occludin 的酪氨酸磷酸化,且 ZO-1 的表达显著减少,从而引起 BBB 的功能紊乱。另外有研究^[13]证实氧化剂诱导的内皮细胞屏障功能的破坏过程中,ZO-1 的表达显著减少,occludin 在细胞中的位置分布发生改变。本实验通过 Western blot 测定其蛋白表达,发现缺氧缺血的作用对跨膜蛋白 occludin 的表达量无显著改变,而 ZO-1 的表达则显著减少,与正常对照组 ZO-1 的表达量比较差异有显著意义($P < 0.01$),说明缺氧缺血性刺激后可能通过改变 occludin 在细胞中的位置分布,减少 ZO-1 的表达,进而导致 BBB-TJ 的开放,引起 BBB 通透性增高。

综上所述,缺氧缺血可以促使 BBB-TJ 开放从而导致体外 BBB 模型通透性增加,其 TJ 的开放可能与 occludin 的分布改变,ZO-1 的表达减少及 actin 的重组密切相关。对这一问题的深入研究,将为临床防治缺氧缺血性脑损伤提供新的思路^[13]。

[参 考 文 献]

- [1] 金汉珍,黄德珉,官希吉. 实用新生儿学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,2003,762.
- [2] Persidsky Y, Heilman D, Haorah J, Zelivyanskaya M, Persidsky R, Weber GA, et al. Rho-mediated regulation of tight junction during monocyte migration across blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE)[J]. Blood, 2006, 107(12):4770-4880.
- [3] González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2003, 81(1):1-44.
- [4] Ng I, Yap E, Tan WL, Kong NY. Blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: roles of tight junction proteins [J]. Ann Acad Med Singapore, 2003, 32 (5 Suppl):63-66.
- [5] Kis B, Snipes JA, Deli MA, Abrahám CS, Yamashita H, Ueta Y, et al. Chronic adrenomedullin treatment improves blood-brain barrier function but has no effects on expression of tight junction proteins[J]. Acta Neurochir Suppl, 2003, 86:565-568.
- [6] McCarthy KD, Vellis JD. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. J Cell Biol, 1980, 85 (3): 890-902.
- [7] 彭镜,尹飞,甘娜,张红媛. 体外血脑屏障模型的建立[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(6): 526-529.
- [8] 萨姆布鲁克 J 著,黄培堂等译. 分子克隆实验指南[M]. 下册,第3版. 北京:人民卫生出版社,2002,1474-1480.
- [9] Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, et al. Tight junctions are membrane microdomains [M]. J Cell Sci, 2000, 113 (Pt 10): 1771-1778.
- [10] Brown RC, Thomas P. Hypoxia/aglycemia altersexpression of occludin and actin in brain endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res, 2005, 327(4): 1114-1123.
- [11] Hartwig W, Andrea L. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation [J]. Vascul Pharmacol, 2002, 38 (6):323-337.
- [12] Kago T, Takagi N, Date I, Takenaga Y, Takagi K, Takeo S. Cerebral ischemia enhances tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339 (4):1197-1203.
- [13] Mark WM, Margaret MW, Eugene BC. Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290 (2): 222-231.

(本文编辑:吉耕中)