

星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因对周细胞和血脑屏障的影响

熊颖^a, 张强^b, 潘邓记^b

摘要 目的:探讨 *Adam10* 基因对于星形胶质细胞与周细胞之间信号交流及对血脑屏障(BBB)完整性的影响。**方法:**利用 Cre-loxp 技术得到星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因小鼠(*Gfap^{cre}-Adam10^{lox/lox}*)纳入敲除组,将同胎基因型为 *Adam10^{lox/lox}* 的小鼠纳入对照组。免疫荧光双标技术检测周细胞心肌素(myocardin)蛋白和平滑肌肌动蛋白(SMA)的表达;电镜分析周细胞的变性和凋亡、基底膜和 BBB 的破坏;激光散斑衬比成像技术观察脑组织局部血流灌注的改变。**结果:**特异性敲除星形胶质细胞 *Adam10* 基因后,可影响相邻的星形胶质细胞和周细胞之间的信号交流,导致周细胞表达 myocardin 蛋白和 SMA 蛋白减少;敲除组呈现出更为明显的周细胞变性、凋亡和 BBB 破坏;进而影响血管密度和血流速度。**结论:***Adam10* 基因可能影响星形胶质细胞与周细胞之间的信号交流,并可能因此而影响 BBB 完整性和脑组织的血流灌注。

关键词 星形胶质细胞;周细胞;*Adam10*;血脑屏障;激光散斑衬比成像

中图分类号 R741;R741.02;R743 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.03.001

熊颖,张强,潘邓记.星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因对周细胞和血脑屏障的影响[J].神经损伤与功能重建,2019,14(3):109-112.

Effects of Knockout Astrocytic *Adam10* Gene on Pericytes and Blood Brain Barrier XIONG Ying^a, ZHANG Qiang^b, PAN Deng-ji^b. a. Department of Radiology, b. Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract Objective: To investigate the effect of *Adam10* gene on the cross-talk between astrocyte and pericyte, and on the integrity of blood-brain barrier (BBB). **Methods:** *Adam10* gene knockout mice (*Gfap^{cre}-Adam10^{lox/lox}*) were obtained by Cre-loxp technique. *Adam10^{lox/lox}* mice were used as control. The expression of myocardin and smooth muscular actin (SMA) protein in pericytes was detected by double immunofluorescence labeling technique. The degeneration and apoptosis of pericytes, destruction of basement membrane and BBB were analyzed by electron microscopy. Laser speckle imaging was used to observe the changes of regional cerebral blood perfusion. **Results:** Specific knockout of *Adam10* gene in astrocytes affected the signal exchange between astrocyte and pericyte; decreased the myocardin and SMA protein expression in pericytes; induced pericyte degeneration and apoptosis; damaged BBB; and affected vascular density and blood flow velocity in brain cortex. **Conclusion:** *Adam10* gene may affect the signal exchange between astrocytes and pericytes, thus affecting the integrity of BBB and cerebral blood perfusion.

Key words astrocyte; pericyte; *Adam10*; blood brain barrier; laser speckle imaging

血脑屏障(blood brain barrier, BBB)由星形胶质细胞、周细胞和血管内皮细胞及血管基底膜等组成,维持中枢神经系统的正常生理功能并保护神经血管单元免受缺血、炎症、外伤和肿瘤等病理因素的损伤,是中枢神经系统重要的结构和功能单位^[1-3]。在 BBB 中,星形胶质细胞和周细胞覆盖包绕血管内皮细胞表面,参与神经元和血管之间的营养物质交换、神经递质转运和维持血管内外水和离子平衡;在这个过程中,星形胶质细胞和周细胞以及内皮细胞间存在复杂的信号交流^[4-6]。星形胶质细胞和周细胞之间可通过直接接触、自分泌和旁分泌信号分子

进行信息联系。周细胞的收缩和舒张在局部微血管血流的调控中起关键作用,可改变脑微血管的直径,影响局部的血流灌注和血流再分布^[7-9]。周细胞的持续收缩可导致脑组织缺血缺氧。

本研究借助于 Cre-loxp 技术特异性敲除星形胶质细胞 *Adam10* 基因,观察星形胶质细胞对于周细胞的影响,免疫荧光双标技术检测周细胞心肌素(myocardin)蛋白和平滑肌肌动蛋白(smooth muscular actin, SMA)的表达,电镜分析周细胞的变性和凋亡、基底膜和 BBB 的破坏,并进一步借助激光散斑衬比成像技术观察脑组织局部血流灌注的改变。

作者单位

华中科技大学同济医学院附属同济医院 a.放射科, b.神经内科

武汉 430030

基金项目

国家自然科学基金(No. 81471230; No. 81601480; No. 81571206)

收稿日期

2018-08-06

通讯作者

张强

zhangqiang_glia@

126.com

潘邓记

pandengji001@

126.com

1 材料与方法

1.1 基因敲除动物的获得与取材

Gfap^{cre} 和 *Adam10^{lox/lox}* 转基因小鼠购买自美国 Jackson Laboratory 公司。在 SPF 级环境下将 *Gfap^{cre}* 转基因鼠和 *Adam10^{lox/lox}* 转基因鼠配对饲养并杂交,得到 *Gfap^{cre}-Adam10^{lox/-}* 转基因鼠;进一步将 *Gfap^{cre}-Adam10^{lox/-}* 鼠与 *Adam10^{lox/lox}* 鼠杂交,获得星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因小鼠 (*Gfap^{cre}-Adam10^{lox/lox}*) (敲除组);利用同胎 *Adam10^{lox/lox}* 基因型的小鼠作为对照 (对照组)。按照 Jackson Laboratory 公司网站说明所示 PCR 引物完成 PCR 扩增和基因型鉴定。

1.2 方法

1.2.1 冰冻切片与免疫荧光双标染色 所有动物麻醉后行 4 °C 预冷的 4% 多聚甲醛 (0.1 mol/L PB 配制, pH=7.4) 心脏置管灌注前固定,继而置于 4% 多聚甲醛溶液 4 °C 过夜后固定;30% 蔗糖脱水沉底;OCT 胶包埋, -80 °C 冰箱冷冻, Leica 冰冻切片机切片,厚度为 10 μm。组织切片置 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液中 (4 °C) 固定 15 min;牛血清封闭 2 h;分别滴加一抗:兔抗人血小板衍生生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor-β, PDGFR-β) 抗体 (1:100) (购于 LSBio 公司)、小鼠抗人 myocardin 抗体 (1:100) (购于 R&D Biotech 公司) 和小鼠抗人 SMA 抗体 (1:100) (购于 R&D Biotech 公司), 4 °C 孵育 24 h;PBS 溶液震荡清洗 3 次;滴加 FITC (1:100) 和 Cy3 (1:100) 标记的二抗,避光室温孵育 1 h;PBS 振荡清洗 3 次;流水冲洗 30 min 后, 50% 甘油封片。Olympus 荧光显微镜 (FITC 绿色荧光激发/发射波长为 488/525 nm; Cy3 红色荧光激发/发射波长为 550/565 nm) 拍照,借助 NIH 图像分析软件分析结果。

1.2.2 电镜样本的制备、切片及观察 小鼠麻醉急性处死后,解剖出脑皮质,用解剖剪剪取一小块脑皮质,1% 锇酸固定液预固定后将其切成 1 mm³ 的小块,逐一放入盛有冷的新鲜 1% 锇酸固定液的 Ep 管里, 4 °C 固定 2 h 以上。0.1 M 磷酸缓冲液漂洗后置入 1% 醋酸铀块染 2 h,梯度丙酮脱水,包埋液浸透后包埋聚合 (45 °C 烘箱 3 h, 65 °C 烘箱 48 h);制备超薄切片后将切片捞在有支持膜的载网上,铅染液染色 10 ~ 20 min,电镜观察照相。

1.2.3 激光散斑衬比成像 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉小鼠,切开头皮暴露颅骨,将动物置于体视显微镜的正下方,调整焦聚至可清晰观察动物大

脑皮质。利用华中科技大学研制的激光散斑成像系统,先用白光,透过颅骨和硬脑膜获得动物大脑皮质血管白光图;再改用激光,透过颅骨和硬脑膜,在不同的时间点 (0 min 和 10 min) 连续采集 20 帧大脑皮质血管的原始散斑图像 (图像分辨率 640 像素×480 像素,放大倍数 1.5 倍,激光照射面积 3 mm×2 mm, CCD 曝光时间 20 ms)。借助 MATLAB 2016 处理原始散斑图像,并获得散斑衬比图和各时间点的伪彩色血流图,以 0 min 时的伪彩色血流图为基准,10 min 时的伪彩色血流图与其相比较,计算得出相对血流速度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用独立样本均数 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因对周细胞 myocardin 蛋白和 SMA 蛋白表达的影响

免疫荧光双标染色显示,敲除组 PDGFR-β⁺、myocardin⁺ 双标阳性细胞比率为 (18.2±2.01)%, 明显低于对照组的 (35.6±1.75)% ($P < 0.05$);敲除组 PDGFR-β⁺、SMA⁺ 双标阳性细胞比率为 (13.7±0.76)%, 明显低于对照组的 (28.5±0.98)% ($P < 0.05$);提示星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因可抑制周细胞 myocardin 蛋白和 SMA 蛋白的表达,见图 1。

2.2 星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因对 BBB 的影响

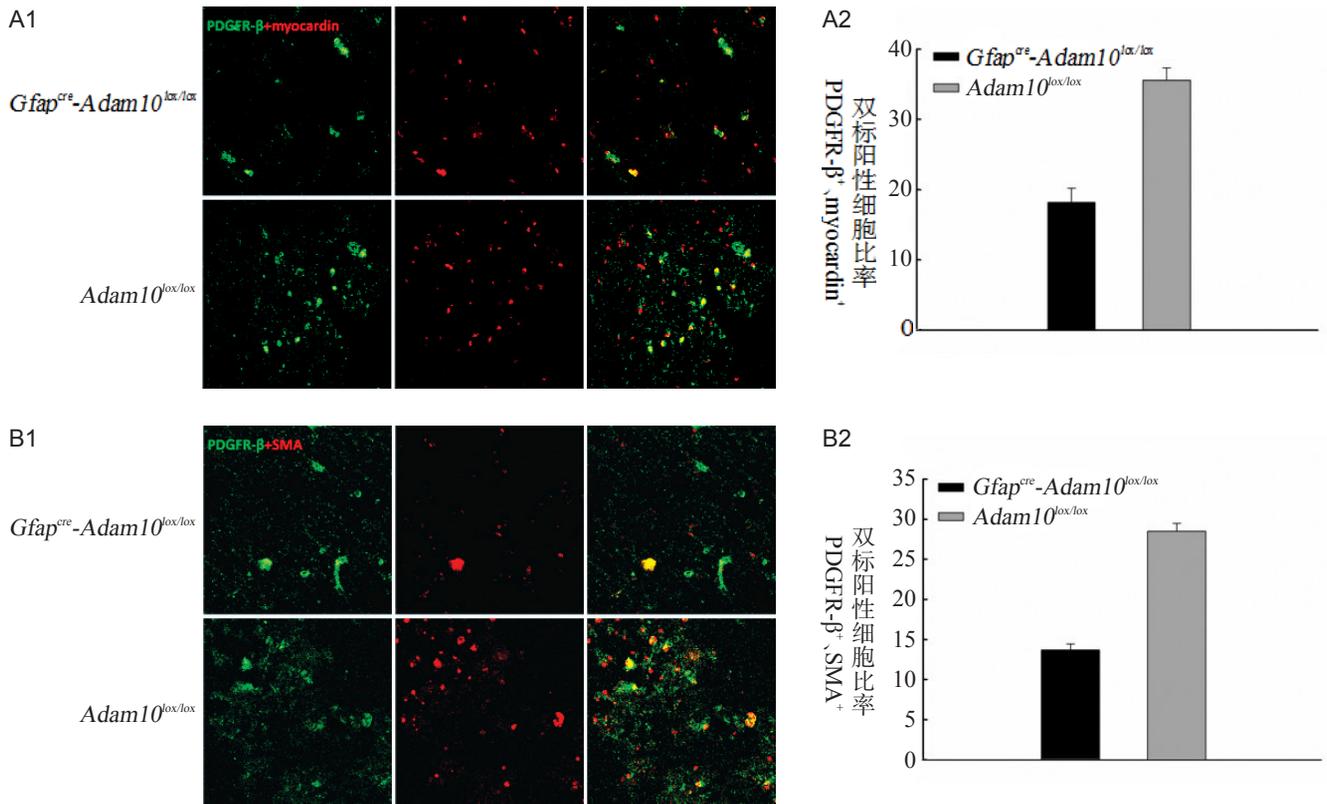
扫描电镜结果显示,与对照组相比,敲除组呈现出更为明显的周细胞变性,甚至可见周细胞凋亡;血管基底膜不完整,可见红细胞位于 BBB 外侧,提示敲除组存在明显的 BBB 破坏,见图 2。

2.3 星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因对局部脑皮质血管密度及血流灌注的影响

激光散斑衬比成像结果显示,与对照组相比,敲除组皮质局部血管密度明显减少,血流速度明显下降,提示星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因会影响脑组织血流动力学,见图 3。

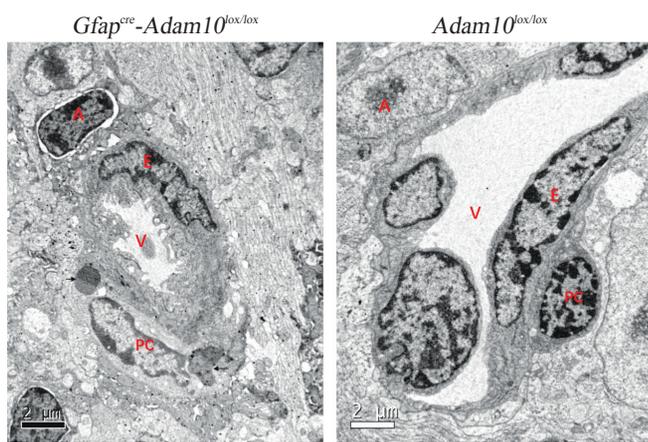
3 讨论

本研究通过 Cre-loxp 技术特异性敲除星形胶质细胞 *Adam10* 基因,发现相邻星形胶质细胞和周细胞之间的信号交流受到影响,周细胞表达 myocardin 蛋白和 SMA 蛋白减少;敲除组呈现出更为明显的周细胞变



注:(A1)星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因对周细胞 myocardin 蛋白表达的影响;(A2)myocardin 阳性周细胞比率;(B1)星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因对周细胞 SMA 蛋白表达的影响;(B2)SMA 阳性周细胞比率

图1 星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因对周细胞 myocardin 蛋白和 SMA 蛋白表达的影响

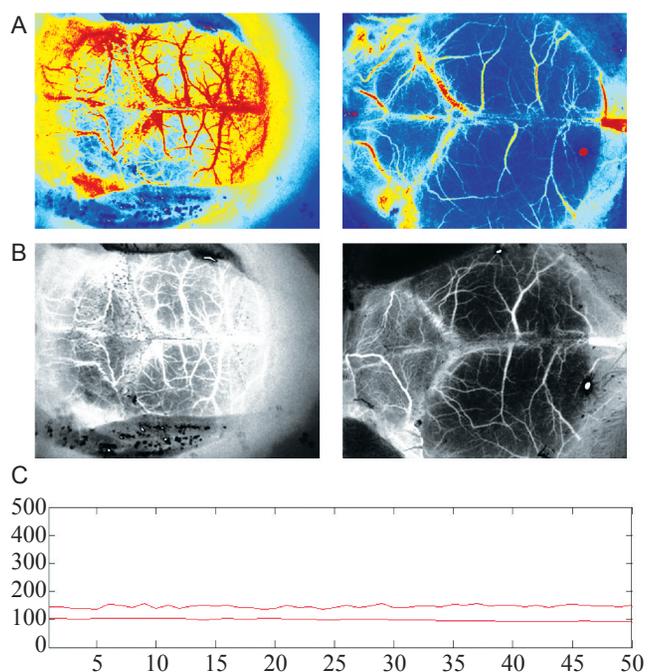


注:A:星形胶质细胞;PC:周细胞;E:血管内皮细胞;V:血管;黑色箭头所示为血管外的红细胞被周细胞吞噬

图2 星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因对 BBB 的影响(电镜)

性、凋亡和 BBB 破坏;血管密度和血流速度受到影响。

作为血清应答因子 (serum response factor, SRF) 的辅助因子, Myocardin 通过 Q-rich 功能区与 SRF 结合, 绑定相关基因启动子 DNA CarG box [CC(A/T)6GG box], 激活包括心肌钙离子通道基因、心脏发育相关基因、结构基因和应激诱导的肥厚特异性基因等重要基因的转录^[10]。大量研究也证实了周细胞的收缩受钙离



注:(A)激光散斑衬比成像伪彩图;(B)黑白图;(C)血流速度

图3 星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因对局部脑皮质血管密度及血流灌注的影响

子浓度的影响。缺血再灌注后, 脑组织局部产生大量的活性氧自由基, 显著影响胞内钙离子水平^[11,12], 激活

收缩蛋白SMA的磷酸化,导致周细胞收缩蛋白的过度收缩^[13]。本研究显示星形胶质细胞敲除 *Adam10* 基因,可减少myocardin蛋白在周细胞的表达,进而可能通过影响周细胞钙离子的浓度,减少周细胞SMA蛋白表达,最终影响周细胞的收缩功能。

周细胞包绕于微血管周围,周细胞的聚集和覆盖影响BBB的形成和通透性。星形胶质细胞 *Adam10* 敲除后,可能通过影响周细胞钙离子浓度的改变,导致周细胞变性、凋亡;还可能影响周细胞分泌血管基底膜蛋白,导致基底膜损伤,最终破坏BBB。

周细胞参与控制大脑血流灌注。通过周细胞的收缩和松弛,可调节脑组织小血管的管径并影响脑组织血流灌注;当周细胞表达高浓度的收缩蛋白时,周细胞收缩,毛细血管收缩,脑组织血流灌注减少;反之周细胞松弛引起毛细血管扩张,脑组织血流灌注增加^[14,15]。本研究显示星形胶质细胞特异性敲除 *Adam10* 基因后,脑组织血管密度减低,血流速度减慢,可能是由于周细胞SMA蛋白减少,周细胞松弛,毛细血管管径扩大,同时周细胞破坏造成血管发育障碍,引起血管密度下降。

作为调控脑组织小动脉、毛细血管和小静脉等微血管收缩和舒张作用的关键细胞,周细胞还影响微血管的发育;作为神经血管单元的一员,周细胞和神经血管单元各成员细胞之间也存在着复杂的信号交流。研究周细胞对于神经血管单元各组分的作用,对于阐明脑血流灌注的具体分子机制具有重要的意义,有助于说明缺血性、变性等神经系统疾病的发病机制,寻找新的有效治疗措施。

参考文献

- [1] Zlokovic BV. Neurodegeneration and the neurovascular unit[J]. *Nat Med*, 2010, 12: 1370-1371.
- [2] Engelhardt B. Neuroscience. Blood-brain barrier differentiation[J]. *Science*, 2011, 6063: 1652-1653.
- [3] Wardlaw JM, Doubal FN, Valdes-Hernandez M, et al. Blood-brain barrier permeability and long-term clinical and imaging outcomes in cerebral small vessel disease[J]. *Stroke*, 2013, 44: 525-527.
- [4] Nuriya M, Shinotsuka T, Yasui M. Diffusion properties of molecules at the blood-brain interface: potential contributions of astrocyte endfeet to diffusion barrier functions[J]. *Cereb Cortex*, 2013, 23: 2118-2126.
- [5] He QW, Xia YP, Chen SC, et al. Astrocyte-derived sonic hedgehog contributes to angiogenesis in brain microvascular endothelial cells via RhoA/ROCK pathway after oxygen-glucose deprivation[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47: 976-987.
- [6] Haj-Yasein NN, Vindedal GF, Eilert-Olsen M, et al. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 43: 17815-17820.
- [7] Kisler K, Nelson AR, Rege SV, et al. Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20: 406-416.
- [8] Montagne A, Nikolakopoulou AM, Zhao Z, et al. Pericyte degeneration causes white matter dysfunction in the mouse central nervous system[J]. *Nat Med*, 2018, 24: 326-337.
- [9] Sagare AP, Bell RD, Zhao Z, et al. Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2932.
- [10] Wang D, Chang PS, Wang Z, et al. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor[J]. *Cell*, 2001, 105: 851-862.
- [11] Hall CN, Reynell C, Gesslein B, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease[J]. *Nature*, 2014, 508: 55-60.
- [12] Greif DM, Eichmann A. Vascular biology: Brain vessels squeezed to death[J]. *Nature*, 2014, 508: 50-51.
- [13] Gertz K, Kronenberg G, Uhlemann R, et al. Partial loss of VE-cadherin improves long-term outcome and cerebral blood flow after transient brain ischemia in mice[J]. *BMC Neurol*, 2016, 16: 144.
- [14] Dohgu S, Takata F, Kataoka Y. Brain pericytes regulate the blood-brain barrier function[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2015, 146: 63-65.
- [15] Luissint AC, Artus C, Glacial F, et al. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2012, 9: 23.

(本文编辑:唐颖馨)