

论著·基础研究

非转移性黑色素瘤糖蛋白 B 对脑缺血再灌注小鼠的神经保护作用[▲]

卢晓微 周智鹏 张辉阳 曾阳东 成戈 蒋宇 苏梦瑶

(桂林医学院附属医院放射科,广西桂林市 541001,电子邮箱:lxwsally@163.com)

【摘要】 目的 探讨非转移性黑色素瘤糖蛋白 B(GPNMB)对脑缺血再灌注小鼠的神经保护作用。**方法** 将20只雄性C57小鼠随机分为磷酸缓冲盐溶液(PBS)组和GPNMB组,每组10只。采用线栓法栓塞大脑中动脉建立脑缺血小鼠模型,栓塞2h后再灌注,GPNMB组经栓塞侧颈内动脉内注射4 μL的50 ng/μL GPNMB,PBS组经颈内动脉给予注射等量的PBS。给予小鼠药物干预并再灌注24h后处死,处死前进行行为学缺陷评分,制作脑组织切片,计算梗死体积。**结果** GPNMB组的脑梗死体积小于PBS组,栓塞再灌注后2h、给药干预再灌注后24h的行为学缺陷评分均低于PBS组(均 $P < 0.05$)。**结论** GPNMB可以减小脑缺血再灌注小鼠的脑梗死体积,并改善其梗死后行为学缺陷。

【关键词】 缺血再灌注;非转移性黑色素瘤糖蛋白 B;行为学缺陷;脑梗死;小鼠**【中图分类号】** R 743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2022)06-0602-04**DOI:**10.11675/j.issn.0253-4304.2022.06.06

Neuroprotective effects of glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B on mice with cerebral ischemia reperfusion

LU Xiao-wei, ZHOU Zhi-peng, ZHANG Hui-yang, ZENG Yang-dong, CHENG Ge, JIANG Yu, SU Meng-yao

(Department of Radiology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China)

【Abstract】 Objective To explore the neuroprotective effects of glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B(GPNMB) on mice with cerebral ischemia reperfusion. **Methods** Twenty male C57 mice were randomly divided into phosphate buffered saline(PBS) group and GPNMB group, with 10 mice in each group. The cerebral ischemia rat model was established by embolizing the middle cerebral artery using the suturing method. Two hours after the embolization followed reperfusion, the GPNMB group was injected with 4 μL of 50 ng/μL GPNMB through the internal carotid artery on the embolic side, and the PBS group was injected with the same amount of PBS through the internal carotid artery. The mice were sacrificed after drug intervention and 24-hour reperfusion, and they were scored for behavioral defects before death. Mice's brain tissue slices were prepared, and the infarcted volume was calculated. **Results** The GPNMB group exhibited a smaller volume of cerebral infarction as well as lower scores for behavioral defects after the 2-hour reperfusion following the embolization, and after the 24-hour reperfusion following the drug intervention, as compared with the PBS group(all $P < 0.05$). **Conclusion** GPNMB can reduce the volume of cerebral infarction and improve the post-infarction behavioral defects in mice with cerebral ischemia reperfusion.

【Key words】 Ischemia reperfusion, Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, Behavioral defect, Cerebral infarction, Mouse

近年来,我国脑血管疾病的发病率逐渐上升,其中以缺血性脑血管病多见,缺血性脑血管病具有发病率高、病死率高的特点,严重危害人类健康^[1]。脑缺血损伤的发生机制复杂,治疗时间窗短,目前临床治

疗效果不佳,脑缺血后神经保护相关药物的研究和开发一直是脑缺血研究领域的热点和难点。近年来,随着医学、药学以及相关学科不断发展,对脑缺血性疾病大规模的研究使得相关的治疗方案和治疗药物

▲基金项目:国家自然科学基金(81760219);广西自然科学基金(2017GXNSFAA198058)

作者简介:卢晓微(1995~),女,硕士,住院医师,研究方向:中枢神经系统影像。

通信作者:周智鹏(1976~),男,博士,主任医师,研究方向:脑血管病、心胸疾病和肝胆疾病影像,电子邮箱:

bigbird_zhou@hotmail.com。



不断涌现,不过从目前的研究结果来看,很多药物在动物实验中有效,但是在临床试验中却不成功^[2-4]。寻找新的作用靶点和药物对脑缺血的临床治疗有重要意义。非转移性黑色素瘤糖蛋白 B (glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, GPNMB) 在恶性黑色素瘤细胞等多种肿瘤细胞中表达,属于一种肿瘤生长因子。有学者发现,脑缺血后小鼠的神经细胞和胶质细胞分泌的 GPNMB 增多,该蛋白可能具有减少神经细胞凋亡、保护神经细胞的作用^[5]。本研究进一步探讨 GPNMB 对脑缺血再灌注小鼠的神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 C57 小鼠 20 只,由桂林医学院动物饲养中心提供(SYXK 桂 2020-0005),体重 200 ~ 250 g,采用普通小鼠饲料喂养,自由饮水,饲养环境为屏障级动物实验室。

1.2 药剂与仪器 主要药物有:异丙酚(AstraZeneca 公司,批号:CL738)、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS;北京生物制品研究所,国药准字 S10850002)。主要仪器和设备有:美国 Intramedic 公司 PE-50 管,Phillip 公司 INTEGRIS CV 型数字血管造影系统。

1.3 动物分组与模型建立 按照随机数字表法将 20 只小鼠分成 PBS 组和 GPNMB 组,每组 10 只。两组小鼠均于术前 24 h 禁食,适量食水。使用 10% 的水合氯醛(350 mg/kg)进行腹腔麻醉后,送入介入手术室,将小鼠仰卧位固定在手术台上,鼻饲给氧,给予常规心电、呼吸和血压监护,使用微量泵静脉注射异丙酚 0.13 mL/h 维持麻醉状态。于麻醉状态下建立大脑中动脉栓塞模型:常规消毒颈部皮肤、备皮,切开皮肤,分离皮下组织和肌肉,暴露颈总动脉。结扎颈总动脉和颈外动脉,动脉夹夹闭颈内动脉,将准备好的 7-0 尼龙线从颈外动脉切口插入颈内动脉,松开动脉夹,将丝线头端进一步插至大脑中动脉开口处,建立大脑中动脉阻塞模型。恢复灌注后,行大脑中动脉正侧位造影确认栓塞成功,造影剂为优维显,浓度为 300 mg/mL,购自拜耳医药保健公司,经颈外动脉注入。术前、术中和术后 24 h 监测小鼠的呼吸、体温、血压和血气等生理指标。

1.4 干预方法 栓塞成功 2 h 后撤出尼龙线进行再灌注 2 h, GPNMB 组经栓塞侧颈内动脉注射 4 μ L 的 GPNMB(浓度为 50 ng/ μ L), PBS 组经栓塞侧颈动脉注射等量的 PBS 后拔管、缝合包扎,再灌注 24 h。

1.5 观察指标

1.5.1 梗死体积:给药干预再灌注 24 h 后,按照随机数字表法每组取 5 只小鼠,处死小鼠后取脑组织行冠状位切片,每片厚度为 2 cm。然后行 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色。将 4 g TTC(美国, Sigma 公司)粉末溶于 200 mL 的 PBS 溶液,染色 15 min,翻面再染 10 ~ 15 min。甲醛溶液固定后测量梗死面积。正常脑组织呈红色,梗死组织呈苍白,通过病理图文分析系统进行图像分析,测量每张切片的总面积和梗死面积,每层梗死体积为该层梗死面积和层厚的乘积,各层的梗死体积之和为总的梗死体积。计算梗死体积和对侧正常脑组织的体积,其比值即为梗死率。

1.5.2 行为学观察:取每组剩下的 5 只小鼠,进行行为学观察。分别于栓塞成功 2 h 后撤出尼龙线进行再灌注 2 h 时与给药干预再灌注 24 h 时,对小鼠进行行为学缺陷评分。评价标准参考相关文献^[6-7],评分为 5 分制,0 分为无功能障碍,1 分为不能伸展前肢,2 分为向一侧旋转,3 分为向一侧倾倒,4 分为无自主活动伴意识抑制,5 分为死亡。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠脑梗死体积的比较 干预再灌注 24 h 后, PBS 组的脑梗死体积为 (116.2 ± 32.5) mm³, 脑梗死率为 37.98%, GPNMB 组的脑梗死体积为 (67.3 ± 21.3) mm³, 梗死率为 16.97%, GPNMB 组的脑梗死体积小于 PBS 组($t = 2.471, P = 0.025$)。见图 1。

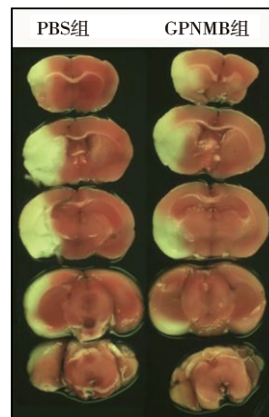


图 1 两组小鼠脑梗死体积的比较(TTC 染色, $\times 5$)

2.2 两组小鼠行为学缺陷评分的比较 栓塞再灌注后 2 h 与给药干预再灌注后 24 h 时, PBS 组的行为学缺陷评分均高于 GPNMB 组(均 $P < 0.05$)。见表 1。

表1 两组小鼠行为学缺陷评分的比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	n	再灌注后 2 h	给药干预再灌注后 24 h
GPNMB 组	5	1.4 ± 0.5	0.6 ± 0.5
PBS 组	5	2.8 ± 0.4	2.4 ± 0.5
t 值		-4.427	-5.196
P 值		0.002	0.001

3 讨论

急性缺血性脑卒中是一种因局限性脑缺血而突发的神经功能障碍性疾病,以脑组织缺血及缺血性损伤症状为主要临床表现,是全球人类致残的首要病因,也是全球第二大死因,现已成为我国首要死因^[1]。

GPNMB 是一种由 572 个氨基酸组成的 I 型跨膜蛋白,是一种肿瘤生长因子,又被称为骨活素、树突细胞肝素整合素配体、造血干细胞生长因子诱导神经肽 I 型^[8],在多种细胞中都有表达,如皮肤基层细胞、免疫细胞、成骨细胞、视网膜色素上皮细胞、神经细胞和胶质细胞^[9-10]。GPNMB 具有多种作用,其在肿瘤细胞中表达,可以调节肿瘤的侵犯和转移能力,抑制免疫系统,减少细胞凋亡,并有诱导血管再生,增强细胞黏附等作用,从而参与黑色素瘤、胶质瘤、乳腺癌、肝癌等多种恶性肿瘤的生长^[5,11-13]。外源性的重组 GPNMB 可以增加小鼠成纤维细胞中基质金属蛋白酶 3 的表达,其机制可能是激活了细胞外信号调节酶途径,参与细胞保护和炎症调节^[14]。有学者发现,正常小鼠尿液中 GPNMB 表达水平极低,但肾缺血模型小鼠尿液中 GPNMB 的表达水平升高,且主要表达于巨噬细胞和上皮细胞内,参与细胞吞噬和炎症反应^[15]。还有研究表明,GPNMB 阳性表达的巨噬细胞具有更强的吞噬作用,以及清除坏死细胞碎片的能力,同时还分泌一些组织因子,对坏死组织的再生有明显促进作用^[16-17]。以上研究表明,GPNMB 可以通过参与炎症反应的调控、减少细胞死亡,参与肾缺血后的细胞保护机制。

Huang 等^[18]研究发现,GPNMB 除了存在于胶质瘤细胞外,在正常神经系统的细胞内也有表达,其主要由小胶质细胞和巨噬细胞合成和分泌,可通过激活 T 淋巴细胞、促进其增殖;GPNMB 可促进巨噬细胞浸润和吞噬细胞碎片,从而促进细胞的自噬参与免疫与炎症反应;GPNMB 可能是神经系统疾病一个新的治疗靶点。还有研究结果显示,GPNMB 可以刺激巨噬细胞表达炎症相关基因,发挥抗炎作用,从而起到神经保护作用,由此可以推测 GPNMB 可作为神经保护

药物的作用靶点^[13,15,18-20]。Murata 等^[21]研究发现,GPNMB 基因携带小鼠的记忆力优于非携带小鼠,而且其海马区域的离子型谷氨酸受体水平升高,这提示 GPNMB 可以促进海马区离子型谷氨酸受体的表达,达到增强记忆的作用,故其认为 GPNMB 与神经细胞代谢及脑功能有关。还有研究结果显示,GPNMB 在运动神经元和胶质细胞中均有表达,在肌萎缩性侧索硬化症患者脑脊液中的表达增高,高水平的 GPNMB 可以减轻运动神经元的变性和萎缩,其作用机制与磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶和丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase,ERK)信号通路的激活有关,而该信号通路可以抑制神经细胞凋亡,保护神经细胞^[22]。Nakano 等^[5]研究发现,脑缺血后,小鼠神经细胞和胶质细胞分泌的 GPNMB 增多,GPNMB 可以激活 ERK1/2 和蛋白激酶 B 信号通路,从而减少神经细胞凋亡、保护神经细胞,缩小缺血后的脑梗死体积,这提示 GPNMB 可以作为脑缺血治疗的新靶点。

本研究结果显示,GPNMB 组小鼠脑梗死体积小于 PBS 组,且栓塞再灌注后 2 h、给药干预再灌注后 24 h 时小鼠的行为学缺陷评分均低于 PBS 组(均 $P < 0.05$),这提示 GPNMB 可以改善脑缺血再灌注小鼠的神经功能缺血的症状。这一结果为 GPNMB 应用于脑缺血治疗提供更多的理论基础,但 GPNMB 神经保护作用机制如何,其通过哪些信号通路发挥作用,还有待进一步研究。

综上所述,GPNMB 可以缩小脑缺血再灌注小鼠的脑梗死体积,并改善其梗死后行为学缺陷,但其具体的作用机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J].中华神经科杂志,2018,51(9):666-682.
- [2] Berkhemer OA,Fransen PS,Beumer D,et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke[J]. N Engl J Med,2015,372(1):11-20.
- [3] Campbell BC,Mitchell PJ,Kleinig TJ,et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection[J]. N Engl J Med,2015,372(11):1009-1018.
- [4] Abe K,Yamashita T,Takizawa S,et al. Stem cell therapy for cerebral ischemia:from basic science to clinical applications[J]. J Cereb Blood Flow Metab,2012,32(7):1317-1331.
- [5] Nakano Y,Suzuki Y,Takagi T,et al. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B(GPNMB) as a novel neuroprotective factor in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Neuroscience,2014,277:123-131.

- [6] Li M, Zhou ZP, Sun M, et al. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, a pentose phosphate pathway product, might be a novel drug candidate for ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2016, 47(1): 187 - 195.
- [7] Eikermann-Haerter K, Lee JH, Yuzawa I, et al. Migraine mutations increase stroke vulnerability by facilitating ischemic depolarizations [J]. *Circulation*, 2012, 125(2): 335 - 345.
- [8] Ripoll VM, Irvine KM, Ravasi T, et al. *Gpnmb* is induced in macrophages by IFN- γ and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses [J]. *J Immunol*, 2007, 178(10): 6557 - 6566.
- [9] Ripoll VM, Meadows NA, Raggatt LJ, et al. Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB [J]. *Gene*, 2008, 413(1/2): 32 - 41.
- [10] Tanaka H, Shimazawa M, Kimura M, et al. The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 573.
- [11] Maric G, Rose AA, Annis MG, et al. Glycoprotein non-metastatic b(GPNMB): a metastatic mediator and emerging therapeutic target in cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6: 839 - 852.
- [12] Fiorentini C, Bodei S, Bedussi F, et al. GPNMB/OA protein increases the invasiveness of human metastatic prostate cancer cell lines DU145 and PC3 through MMP-2 and MMP-9 activity [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 323(1): 100 - 111.
- [13] Maric G, Annis MG, Dong Z, et al. GPNMB cooperates with neuropilin-1 to promote mammary tumor growth and engages integrin $\alpha 5 \beta 1$ for efficient breast cancer metastasis [J]. *Oncogene*, 2015, 34(43): 5494 - 5504.
- [14] Furochi H, Tamura S, Mameoka M, et al. Osteoactivin fragments produced by ectodomain shedding induce MMP-3 expression via ERK pathway in mouse NIH-3T3 fibroblasts [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(30): 5743 - 5750.
- [15] 周乐天, 刘伏友. 非转移性黑色素瘤糖蛋白 B 在急性肾缺血再灌注损伤中的表达及与巨噬细胞表型的关系 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2013, 29(7): 509 - 514.
- [16] Li B, Castano AP, Hudson TE, et al. The melanoma-associated transmembrane glycoprotein Gpnmb controls trafficking of cellular debris for degradation and is essential for tissue repair [J]. *FASEB J*, 2010, 24(12): 4767 - 4781.
- [17] 周乐天, 刘伏友. 非转移性黑色素瘤糖蛋白 B 在急性肾缺血再灌注损伤中的表达及与巨噬细胞表型的关系 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2013, 29(7): 509 - 514.
- [18] Huang JJ, Ma WJ, Yokoyama S. Expression and immunolocalization of Gpnmb, a glioma-associated glycoprotein, in normal and inflamed central nervous systems of adult rats [J]. *Brain Behav*, 2012, 2(2): 85 - 96.
- [19] Buga AM, Di Napoli M, Popa-Wagner A. Preclinical models of stroke in aged animals with or without comorbidities: role of neuroinflammation [J]. *Biogerontology*, 2013, 14(6): 651 - 662.
- [20] Sieber MW, Guenther M, Jaenisch N, et al. Age-specific transcriptional response to stroke [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(7): 1744 - 1754.
- [21] Murata K, Yoshino Y, Tsuruma K, et al. The extracellular fragment of GPNMB (glycoprotein nonmelanosoma protein B, osteoactivin) improves memory and increases hippocampal GluA1 levels in mice [J]. *J Neurochem*, 2015, 132(5): 583 - 594.
- [22] Tanaka H, Shimazawa M, Kimura M, et al. The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 573.

(收稿日期: 2021-12-12 修回日期: 2022-02-23)

(上接第 601 页)

- [9] 尤建权, 于情, 戴佳文, 等. 限制性液体复苏在创伤失血性休克中的临床应用 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2016, 25(10): 1301 - 1303.
- [10] 车海江, 王晓明, 冯磊. 不同液体限制性复苏对重度颅脑损伤合并创伤性休克的影响 [J]. *中国地方病防治杂志*, 2016, 31(8): 944.
- [11] 陶广华, 李卫, 刘文值. 右美托咪定围术期应用的研究进展 [J]. *中国药房*, 2017, 28(5): 706 - 710.
- [12] 罗建民, 魏磊, 吴学东, 等. 右美托咪定对经皮冠状动脉介入治疗患者氧化应激的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(7): 668 - 670.
- [13] 盛福庭, 彭卫东, 徐建立, 等. 不同维持剂量右美托咪定对颅脑损伤手术患者脑组织的保护作用 [J]. *广西医学*, 2018, 40(7): 778 - 782.
- [14] 肖高华, 陈钢, 陈峥, 等. 急性颅脑损伤外周血垂体前叶激素及脑脊液硫化氢水平变化 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2017, 22(5): 310 - 312.
- [15] Yue JK, Burke JF, Upadhyayula PS, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors for treating neurocognitive and neuropsychiatric disorders following traumatic brain injury: an evaluation of current evidence [J]. *Brain Sci*, 2017, 7(8): 93.
- [16] 代自烽, 黄其林, 刘海鹏, 等. 呼唤刺激对重型颅脑损伤昏迷患者促醒的临床研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2016, 15(4): 397 - 402.
- [17] 万孟宁, 田泽丹, 陈玉培. 右美托咪定发挥脑保护作用的研究进展 [J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(5): 533 - 536.
- [18] 陆柳明, 陆俊福, 阮海英, 等. 失血性休克并发急性肾损伤的危险因素分析 [J]. *解放军医学杂志*, 2019, 44(1): 51 - 56.
- [19] 杨国旺, 李立志. 右美托咪定肾脏保护作用研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(8): 1369 - 1371.
- [20] 赵伟红, 冯运林, 罗佛全, 等. 右美托咪定对失血性休克患者肾功能的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(7): 642 - 646.

(收稿日期: 2021-12-25 修回日期: 2022-03-01)