

引文格式:

黄晓雯, 朱亚东, 尹美芳, 等. Wnt 信号通路激活蛋白 R-spondin 对血脑屏障功能和卒中后脑损伤的调节作用和分子机制研究 [J]. 集成技术, 2019, 8(6): 39-47.

Huang XW, Zhu YD, Yin MF, et al. Investigation of the regulatory effect and molecular mechanism of a Wnt signaling agonistic protein R-spondin on blood-brain barrier function and post-stroke brain injury [J]. Journal of Integration Technology, 2019, 8(6): 39-47.

Wnt 信号通路激活蛋白 R-spondin 对血脑屏障功能和卒中后脑损伤的调节作用和分子机制研究

黄晓雯^{1,2} 朱亚东¹ 尹美芳¹ 马寅仲¹ 畅君雷¹

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

²(中国科学院大学深圳先进技术学院 深圳 518055)

摘 要 缺血性脑卒中是一种急性脑血管病, 目前主要的治疗手段是及时进行溶栓或取栓治疗以实现血管再通, 但这一过程会对脑血管造成严重的再灌注损伤, 使血脑屏障的结构和功能受到破坏, 增加脑出血的风险。有研究表明 Wnt/ β -catenin 信号通路对血脑屏障的功能起重要调节作用, 但 Wnt/ β -catenin 信号通路激活蛋白 R-spondin 对血脑屏障和脑损伤的调节作用尚不清楚。该文通过体外制备小鼠 R-spondin-1 重组蛋白, 在小鼠原代脑血管内皮细胞中证实了 R-spondin-1 蛋白协同 Wnt3a 蛋白对 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活作用, 并发现 R-spondin-1 能够显著改变血脑屏障功能相关基因 *Cldn3* 和 *Plvap* 的表达水平; 在小鼠脑缺血再灌注模型中, 静脉注射 R-spondin-1 重组蛋白具有降低脑组织梗死和提高小鼠存活率的趋势, 但与生理盐水对照组相比未达到显著性差异。另外, 该文还报道了 R-spondin 蛋白对血脑屏障功能的分子作用机制, 并初步鉴定了其对卒中后脑损伤的治疗效果和临床应用潜力。

关键词 缺血性脑卒中; 血脑屏障; 缺血再灌注损伤; 信号转导; Wnt 通路

中图分类号 R 743.3 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20190729005

收稿日期: 2019-07-29 修回日期: 2019-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81771293); 中国科学院“率先行动”百人计划; 深圳市基础研究自由探索项目(JCYJ20170307170338498); 深圳市基础研究学科布局项目(JCYJ20170413165705083)

作者简介: 黄晓雯, 硕士研究生, 研究方向为脑血管病的分子机制; 朱亚东(共同第一作者), 研究助理, 研究方向为蛋白药物制备与药效鉴定; 尹美芳, 技术员, 研究方向为脑血管病的分子机制与动物模型研究; 马寅仲, 助理研究员, 研究方向为脑血管病的分子机制与动物模型研究; 畅君雷(通讯作者), 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为脑血管疾病的分子机制和药物研发, E-mail: jl.chang@siat.ac.cn。

Investigation of the Regulatory Effect and Molecular Mechanism of a Wnt Signaling Agonistic Protein R-spondin on Blood-Brain Barrier Function and Post-Stroke Brain Injury

HUANG Xiaowen^{1,2} ZHU Yadong¹ YIN Meifang¹ MA Yinzhong¹ CHANG Junlei¹

¹(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(Shenzhen College of Advanced Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract Ischemic stroke is an acute cerebrovascular disease. Currently, it is treated mainly by timely thrombolysis or mechanical thrombectomy to achieve vascular recanalization, but this process causes serious reperfusion injury to cerebrovasculature, damages the structure and function of the blood-brain barrier (BBB), and increases the risk of cerebral hemorrhage. Studies have shown that the Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a critical role in regulating the function of BBB, but whether the R-spondin, an agonistic protein of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, plays a role in regulation of BBB and cerebral injury is unclear. In this study, using mouse recombinant R-spondin-1 protein prepared *in vitro*, we determined the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway induced by combined treatment of the R-spondin-1 protein and Wnt3a protein in mouse primary cerebrovascular endothelial cells, and found that R-spondin1 significantly changed the expression levels of BBB function related genes *Cldn3* and *Plvap*. In a mouse cerebral ischemia/reperfusion model, intravenous injection of recombinant R-spondin-1 protein was inclined to reduce the cerebral infarction and increase mouse survival but did not reach statistical significance compared to phosphate buffer solution controls. Our study reported the molecular mechanisms of BBB function regulation by R-spondin protein, and preliminarily identified its therapeutic effect on cerebral injury following stroke and potential for clinical use.

Keywords ischemic stroke; blood-brain barrier; ischemia/reperfusion injury; signal transduction; Wnt signaling

1 引 言

脑卒中又称中风、脑血管意外，是一种急性脑血管疾病，是由于脑部血管突然阻塞或破裂导致血液不能流入大脑而引起脑组织损伤的一组疾病，包括缺血性和出血性卒中^[1]。其中，缺血性卒中的发病率高于出血性卒中，占脑卒中总数的 60%~70%。我国每年新发脑卒中约 270 万人，且以每年近 9% 的速度上升，是我国成年居民第一致死和致残病因^[2-3]。目前临床上的脑卒中治疗手段有限，主要以一级预防和二级预防

为主^[4-5]。当前唯一批准用于治疗急性期脑卒中的药物是血栓溶解蛋白 rt-PA (recombinant tissue Plasminogen Activator)，然而它的有效溶栓时间窗仅有 3.5~4.5 h。如果合并机械取栓，治疗窗也不能超过 6 h。这导致了仅有不到 5% 的患者入院时具备接受溶栓或取栓治疗的条件^[6-7]。如果超时间窗用药，极易造成血脑屏障损伤，引起脑出血，从而大幅增加患者死亡率^[8]。因此，阐明血脑屏障的调节机制，研发保护血脑屏障的治疗新药物，具有重要临床意义和社会价值。

血脑屏障 (Blood-Brain Barrier) 是保持中

枢神经系统微环境和正常生理功能的重要结构, 它可以使血液中的成分有选择性地进入脑实质^[9]。血脑屏障由血管内皮细胞 (endothelial cell) 和周围的血管周细胞 (pericyte)、胞外基质膜 (extracellular basement membrane) 以及星形胶质细胞 (astrocyte) 等共同构成。这些细胞和基质一起被称为神经血管单元 (neurovascular unit)。当缺血性脑卒中发生时, 伴随着缺血时间的延长, 无论是溶栓还是取栓治疗, 都会对缺血血管和组织造成严重的再灌注损伤, 如氧化应激 (oxidative stress) 和神经兴奋毒性 (excitotoxicity) 等, 这些因素会直接导致神经细胞的大量死亡^[10]。此外, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase) 的大量释放会降解内皮细胞之间的紧密连接蛋白和血管周围的胞外基质膜, 并破坏血管周细胞和星形胶质细胞与内皮细胞的连接, 导致血脑屏障破坏、脑水肿和出血, 加剧脑炎症反应和神经细胞死亡^[11]。目前研发中的缺血性脑卒中的治疗药物, 主要分为自由基清除剂、钙离子通道拮抗剂、脱水及抗炎药物等几类。这些治疗药物在动物实验中能够较好地改善卒中后并发症, 如脑水肿和神经炎症等, 但缺少针对性保护血脑屏障的治疗药物。

研究表明, Wnt/ β -catenin 信号通路对成年小鼠的血脑屏障功能具有重要调节作用^[12-13]。Wnt/ β -catenin 信号通路又叫经典 Wnt 信号通路, 是能够在中枢神经系统发育或遭受损伤时调节细胞增殖与分化的重要通路^[14]。在没有 Wnt 蛋白存在的静息状态下, 胞浆内磷酸化的 β -catenin 与 Axin/APC/GSK-3/CK-1 α 等构成复合物并通过泛素化的方式被蛋白酶体系统降解。当 Wnt 蛋白与细胞膜上的受体卷曲蛋白 (Frizzled, Fzd) 和低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和 6 (LDL-Receptor-Related Protein 5/6, LRP5/6) 结合时, β -catenin 的降解途径会被阻断, 从而使之在胞浆内积累, 并进入细胞核与转录因子 T 细胞因子 (T Cell Factor/

Lymphoid Enhancer Factor, TCF/LEF) 形成转录复合物, 最终调节靶基因表达。

有研究发现, 脑血管内皮细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路功能的缺陷特异性影响脑血管发育和血脑屏障功能, 但不会影响其他组织器官的血管发育与功能^[15]。然而在成体脑血管内皮细胞中, 由于受到多种共受体 (Lgr4/5/6、Znrf3/Rnf43 和 Gpr124 等) 的调节, Wnt 蛋白的受体 Fzd 和 Lrp5/6 始终处于不断被泛素化降解的动态平衡中, 从而使 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性处于较低水平。R-spondin (Rspo) 是一种机体细胞内源性表达的分泌性、水溶性小分子蛋白 (约 250 个氨基酸), 它可以与其膜受体 Lgr4/5/6、Znrf3/Rnf43 结合, 解除后者对 Fzd 和 Lrp5/6 的抑制作用, 从而与 Wnt 蛋白协同激活 Wnt/ β -catenin 信号通路^[16]。其中, R-spondin 蛋白有四个亚型 (R-spondin-1-4), 其功能和结构类似, 仅活性不同^[17]。有研究表明, R-spondin 可以在小肠干细胞以及一些肿瘤细胞中, 通过与 Wnt 蛋白协同作用而显著增加 Wnt/ β -catenin 信号通路活性, 促进细胞的增殖。在周围神经系统中, R-spondin-2 对视神经或嗅球神经分化具有重要作用。但在中枢神经系统中, 特别是对脑血管内皮细胞的调节作用还没有相关研究。本研究首次报道了重组 R-spondin-1 蛋白可以协同 Wnt3a 蛋白, 显著增强小鼠原代脑血管内皮细胞中的 Wnt/ β -catenin 信号通路活性, 并在小鼠模型中对缺血性脑卒中起到一定的治疗作用。

2 材料和方法

2.1 重组 R-spondin-1 蛋白的表达与纯化

稳定表达带有血凝素 (HA) 和小鼠免疫球蛋白 G (IgG) Fc 片段标签的小鼠 R-Spondin-1 蛋白的人肾上皮细胞 (HEK 293T) 来自于美国斯坦福大学 Calvin J. Kuo 教授实验室馈赠。该细胞首

先在筛选培养基(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin、10% 胎牛血清、90% DMEM 高糖培养基)中培养 5 天,待细胞长至约 90% 满的时候传代转入三层培养瓶中培养,并将培养基更换为表达培养基(4 mmol/L L-Glutamine、CD293 培养基),连续培养 10 天。然后,收取全部细胞培养上清,以 3 000 r/min 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 以去掉残留的细胞和碎片,将离心后的上清通过 0.22 μm 聚偏二氟乙烯(PVDF)滤膜过滤。最后,调节过滤后的细胞培养上清 pH 到约 7.4,并使用 HitTrap Protein A HP 凝胶柱纯化蛋白,具体流程为:(1)使用约 40 mL pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗纯化管路;(2)以约 2 mL/min 的速度上样,样品全部通过凝胶柱之后用约 20 mL PBS 冲洗以去除凝胶柱的非特异性结合;(3)使用 pH 为 3.2 的柠檬酸缓冲液洗脱,并收集洗脱液;(4)最后使用超滤对洗脱的蛋白进行溶剂替换并浓缩。

2.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)考马斯亮蓝染色

蛋白于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳完成分离后,首先将凝胶浸泡在 100 mL 染色液(0.1% Coomassie R-250、40% 乙醇、10% 乙酸、50% 去离子水)中,并在微波炉中加热约 1 min 后,置于摇床上摇晃孵育 30 min,移去染色液,并用去离子水将凝胶清洗一次;然后,将凝胶置于 100 mL 脱色液(10% 乙醇、7.5% 乙酸、82.5% 去离子水)中,在微波炉中加热 1 min 后,置于脱色摇床上摇晃孵育约 1 h,重复脱色步骤以获得干净的背景。

2.3 蛋白质印迹法(Western Blotting)

使用试剂盒分别提取细胞上清的总蛋白,并做以下处理:首先,蛋白样品通过 SDS-聚丙烯酰胺胶电泳分离并转移至 PVDF 膜上;然后,通过辣根过氧化物酶标记的 Donkey Anti-Mouse IgG (Jackson, #715-035-150)室温孵育 1 h;最后,使用 ECL plus 结合放射自显影的方式获取

mRspo-1-Fc 融合蛋白印记的图片。

2.4 TOP-Flash 实验

通过将带有萤火虫荧光素酶(Firefly Luciferase)的 TOP-Flash 载体以及海肾荧光素酶(Renilla Luciferase, 内参)载体的慢病毒(QIAGEN、#336891 和 #336851)同时转染原代脑微血管内皮细胞 48 h,构建双荧光素酶报告基因检测系统。之后对细胞进行裂解,取上清按荧光素酶活性检测试剂盒说明(Promega, #E1910)加入在 Glomax 酶标仪上进行检测。

2.5 小鼠原代脑血管内皮细胞取材与培养

深度麻醉小鼠后,首先在无菌环境下使用 PBS 对小鼠进行心脏灌流,并取出脑组织放入含有 Collagenase IV(400 U/mL)、Dispase(1.2 U/mL)和 DNase I(32 U/mL)的 DPBS/ Ca^{2+} / Mg^{2+} 溶液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 h;然后,使用冷磷酸盐缓冲液(DPBS)和胎牛血清(FBS)终止消化后轻轻吹打,细胞悬液过 40 μm 细胞筛,重悬到 20% 牛血清白蛋白(BSA)后离心(1 000 r/min、20 min、37 $^{\circ}\text{C}$)去除髓磷脂;最后,将重悬细胞于 EGM-2 MV/5% FBS/Puromycin (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)培养基中培养 3 天,接着再换成 EGM-2 MV/5% FBS 培养基,隔日换液,7 天后进行相关实验。

2.6 小鼠脑缺血再灌注模型的构建

本研究使用线栓法小鼠脑卒中模型,具体方法简述如下:(1)通过小鼠呼吸面罩,使用含有 2% 异氟烷的空气混合气进行诱导麻醉,并使用 1.5% 异氟烷的空气混合气维持麻醉效果,小鼠体温在手术全程维持 37 $^{\circ}\text{C}$;(2)结扎颈外动脉远心端,在颈外动脉远心端做切口插入 1 根造模专用线栓(北京西浓科技有限公司, #A2-162350);(3)剪断远心端颈内动脉,将线栓沿颈内动脉,向一侧中动脉插入并维持 1 h;(4)到时间后拔出线栓,结扎颈外动脉近心端,缝合皮肤。

2.7 TTC(2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑)染色

小鼠麻醉后脱颈处死,取全脑迅速于-20 $^{\circ}\text{C}$

冷冻并切片。其中, 第一刀在脑前极与视交叉连线中点处; 第二刀在视交叉部位; 第三刀在漏斗柄部位; 第四刀在漏斗柄与后叶尾极之间, 每片厚度为 2 mm。脑组织切片使用 0.2% TTC 溶液于 37 °C 孵育 15 min 后, 换以 4% 多聚甲醛孵育 20 min, 随后按顺序摆放切片并拍摄照片。

数据处理时, 应用图像分析软件 Image J 处理并分别计算每张脑片的梗塞面积, 再乘以每片脑片的厚度 1 mm, 最终每只动物所有脑片梗塞面积乘以厚度, 其相加之和即为脑梗塞体积。梗塞体积以所占大脑半球的百分率来表示。

2.8 数据统计

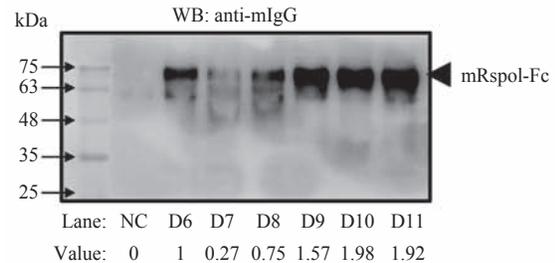
采用 SPSS 17.0 统计软件, 进行正态性检验。所有数据以平均值 ± 标准误差表示, 如是正态分布的数据, 使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA): 若方差齐, 两两比较采用最小显著性差异法 (Least Significant Difference, LSD); 若方差不齐, 则采用 Dunnett's T3 检验。不符合正态分布的数据采用非参数检验进行统计。统计差异设定为 * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 和 *** $P < 0.001$ 。

3 实验结果

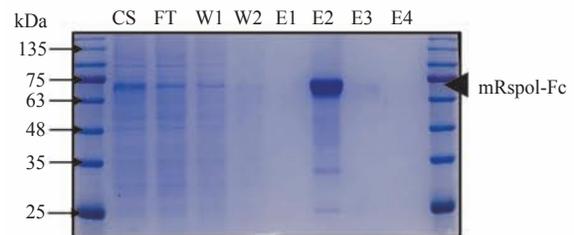
3.1 R-spondin-1 重组蛋白的表达与纯化

本实验采用稳定表达 HA-R-Spondin-1-Fc 的 HEK 293T 细胞进行蛋白的表达。每日取培养基上清, 利用抗小鼠 IgG 抗体检测 R-spondin-1 蛋白表达过程中的第 6~11 天蛋白含量。图 1(a) 显示, 蛋白表达量随培养时间延长而逐渐升高, 第 11 天的细胞上清中 R-spondin-1 蛋白含量约为第 6 天的 1.92 倍。因此, 采用培养 10~11 天的细胞上清进行蛋白纯化。如图 1(b) 所示, 在通过纯化柱前后, 对 PBS 清洗后以及洗脱回收后的各部分蛋白含量 (20 倍稀释) 进行了检测。结果显示, 第二个洗脱液 (E2) 部分的蛋白质含量最高。为了进一步验证图 1(b) 中的蛋白就是本文所需要的

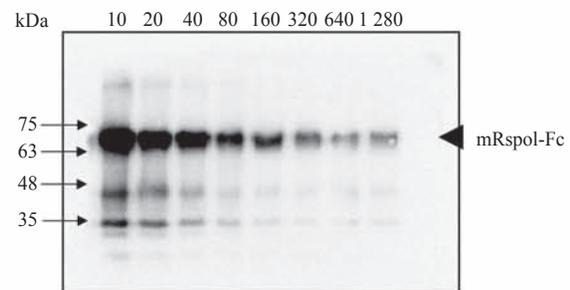
R-spondin-1 蛋白, 对 E2 部分的原液进行 10~1 280 倍的稀释, 结果确认所得蛋白为 R-spondin-1 蛋白。



(a) R-spondin1 蛋白表达过程中第 6~11 天的表达量变化



(b) 纯化过程中每一步骤的纯化效率



(c) 免疫印迹法鉴定 R-spondin1 蛋白的纯度

注: NC 为对照; D6~D11 为第 6~11 天; CS 为待纯化的细胞培养上清; FT 为通过纯化柱的流出部分; W1、W2 为用 PBS 清洗后的流出部分; E1~E4 为洗脱回收液

图 1 小鼠 R-spondin-1 重组蛋白的表达与纯化

Fig. 1 Expression and purification of recombinant mouse R-spondin-1 protein

3.2 R-spondin1 重组蛋白对 Wnt 信号通路活性的激活作用

TOP-Flash 实验是一种测定细胞内 β -catenin 介导的转录活性的经典方法。通过将带有萤火虫荧光素酶的 TOP-Flash 载体以及海肾荧光素酶 (内参) 的载体慢病毒同时转染不同类型细胞, 来构建双荧光素酶报告基因检测系统。通

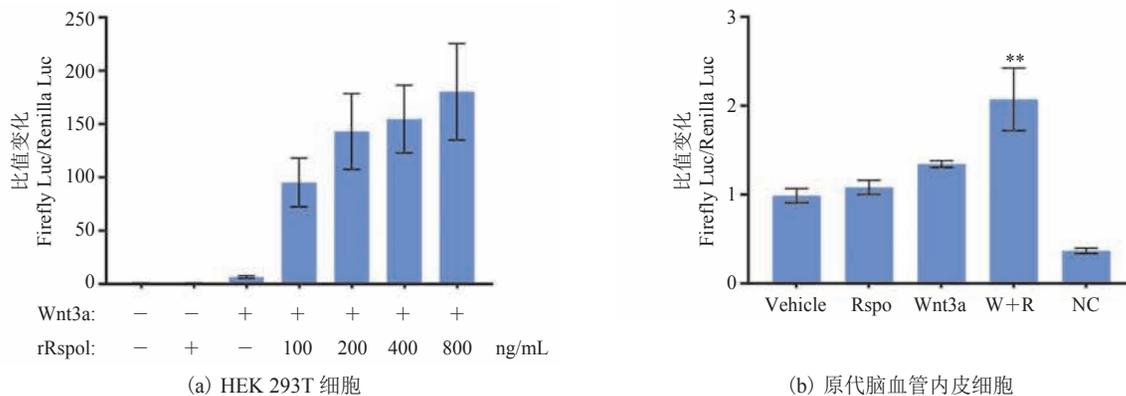
过 R-spondin 和 Wnt 蛋白的处理, 仅需要检测荧光素酶的活性, 便可以精确检测出 β -catenin 介导的转录活性强弱。如图 2(a) 所示, 在 293T 细胞中同时加入 100 ng/mL Wnt3a 蛋白以及不同浓度的 R-spondin-1 蛋白, 结果显示 100 ng/mL 的 R-spondin-1 已经可以协同 Wnt3a 蛋白显著激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。为了进一步验证 R-spondin-1 能否对血脑屏障中的细胞具有调节作用, 本文使用小鼠原代脑微血管内皮细胞进行体外培养。图 2(b) 结果显示, 100 ng/mL Wnt3a 蛋白与 100 ng/mL 的 R-spondin-1 蛋白同时刺激可显著提升细胞内 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性。

3.3 R-spondin-1 重组蛋白对脑血管血脑屏障功能相关基因表达水平的调节作用

紧密连接是形成上皮细胞或内皮细胞间黏附的方式之一。作为一种物理屏障, 紧密连接蛋白防止溶质和水自由地通过细胞外空间。Claudin 蛋白是脑血管内皮细胞紧密连接区相关的转膜蛋白, 在构成紧密连接的完整血脑屏障中发挥着一定作用, 而质膜膜泡关联蛋白(Plasmalemma Vesicle Associated Protein, PLVAP)是脑血管内

皮细胞膜形成膜开窗(fenestration)的必要组成蛋白。为了进一步探索 R-spondin-1 蛋白对脑血管内皮细胞血脑屏障功能的影响, 选择紧密连接蛋白基因 *Cldn3* 以及 PLVAP(内皮细胞膜孔结构标记物)的基因 *Plvap*, 使用定量聚合酶链式反应(qPCR)法观察在接受 Wnt3a 蛋白及 R-spondin-1 蛋白刺激后二者的表达情况。在单独给予 Wnt3a 蛋白进行梯度实验中发现(图 3(a、b)), 当 Wnt3a 蛋白浓度达到 100 ng/mL 时, 可以显著提高 *Cldn3* 的表达; 而当与 R-spondin-1 (100 ng/mL) 共同作用时, 仅需 20 ng/mL 的 Wnt3a 蛋白即可显著性提高 *Cldn3* 的表达; 但 100 ng/mL 的 Wnt3a 与 R-spondin-1 (100 ng/mL) 共同作用时, *Cldn3* 表达量的增加反而没有单独给予 100 ng/mL Wnt3a 蛋白时明显。这提示高浓度的 Wnt 蛋白与高浓度的 R-spondin-1 共同作用时可能激活负反馈调节, 导致 *Cldn3* 表达量的增加反而没有单独给予 Wnt3a 蛋白时明显。

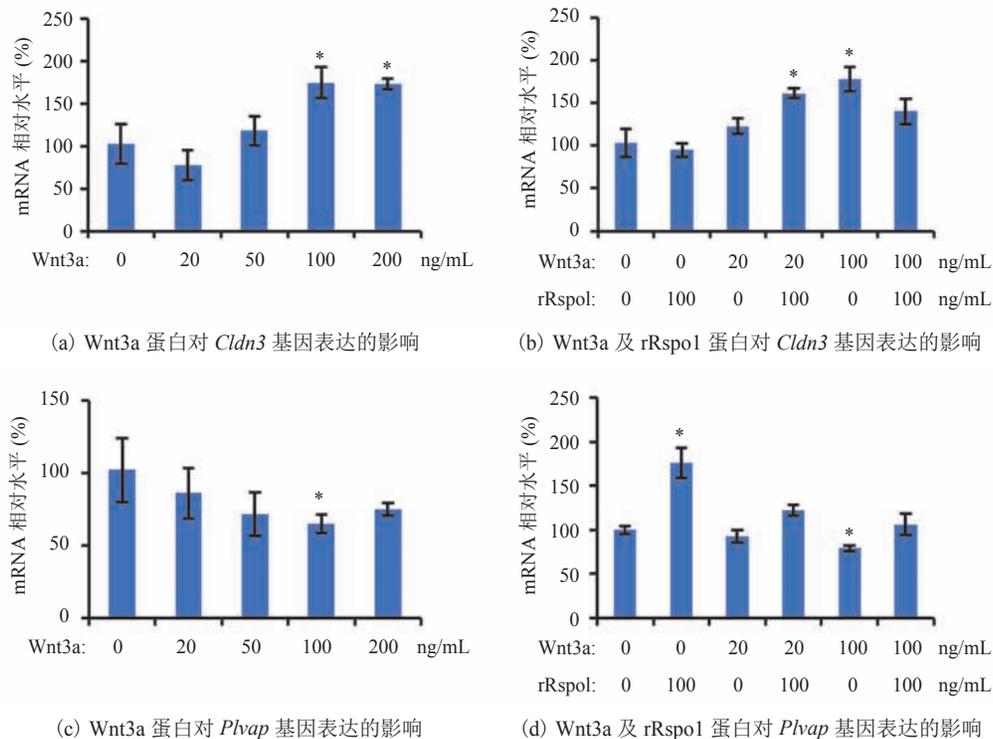
如图 3(c、d) 所示, 单独使用 Wnt3a 蛋白处理细胞, 会在 100 ng/mL 显著降低 *Plvap* 的表达, 而当与 R-spondin-1 协同作用时, 并不能显著降低 *Plvap* 的表达。上述结果提示,



注: 横坐标代表 Wnt3a 和 R-spondin 蛋白的处理方式及处理浓度

图 2 TOP-Flash 法检测 rRspo1 协同 Wnt3a 蛋白在 293T 细胞(a)与小鼠原代脑血管内皮细胞(b)中对 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活作用

Fig. 2 The activation effect of rRspo1 combined with Wnt3a protein on Wnt/ β -catenin signaling pathway activity was detected in (a) 293T cells and (b) primary mouse cerebrovascular endothelial cells by TOP-Flash



注: 横坐标代表 Wnt3a 或/和 R-spondin 蛋白的处理浓度

图 3 Wnt3a 和 R-spondin-1 蛋白对脑血管血脑屏障功能相关基因 *Cldn3* 及 *Plvap* 的影响

Fig. 3 Effects of Wnt3a and R-spondin-1 recombinant protein on cerebrovascular blood-brain barrier function related gene *Cldn3* and *Plvap*

R-spondin-1 蛋白可能具有与 Wnt3a 蛋白协同作用, 进而调节血脑屏障完整性的功能。

3.4 R-spondin-1 重组蛋白对小鼠缺血性脑卒中后脑损伤的治疗作用

动物实验方案如图 4(a) 所示, 本文通过线栓法对 C57 野生型小鼠制造脑缺血再灌注模型, 栓塞 1 h 后拔栓缝合。在造模 5 h 及 24 h 后对每只小鼠注射生理盐水或 200 μ g 的 R-spondin-1 重组蛋白, 并在注射 5 天后利用 TTC 染色法检测小鼠脑组织梗死情况。如图 4(b-c) 所示, R-spondin-1 蛋白治疗组小鼠脑组织梗死体积出现了一定程度的降低, 小鼠的生存率有增加的趋势, 但与生理盐水对照组相比均未达到显著性差异。该结果提示 R-spondin-1 蛋白对缺血性脑卒中具有一定的治疗作用, 但给药方案、剂量和频次还有待进一步研究和优化。

4 讨论

脑卒中的治疗研究已进行了几十年, 目前临床上缺血性脑卒中的主要治疗手段是药物溶栓或机械取栓、疏通血管, 使脑缺血区域实现再灌注。然而再灌注虽然可以使受损脑组织重新获得血液供应, 但也会对血管及脑组织造成损伤, 破坏血脑屏障的结构与功能。对于再灌注损伤的机制, 学者们提出了能量代谢障碍、兴奋性氨基酸毒性、氧化应激损伤、钙超载、细胞因子与炎症等损伤机制, 相应的靶向干预药物也应运而生^[18]。这些药物在临床试验中能够很好地改善卒中后并发症, 如抑郁和神经炎症等, 但对于脑卒中发病急性期的血脑屏障损伤, 这些药物的药理作用往往缺乏针对性, 以至于无

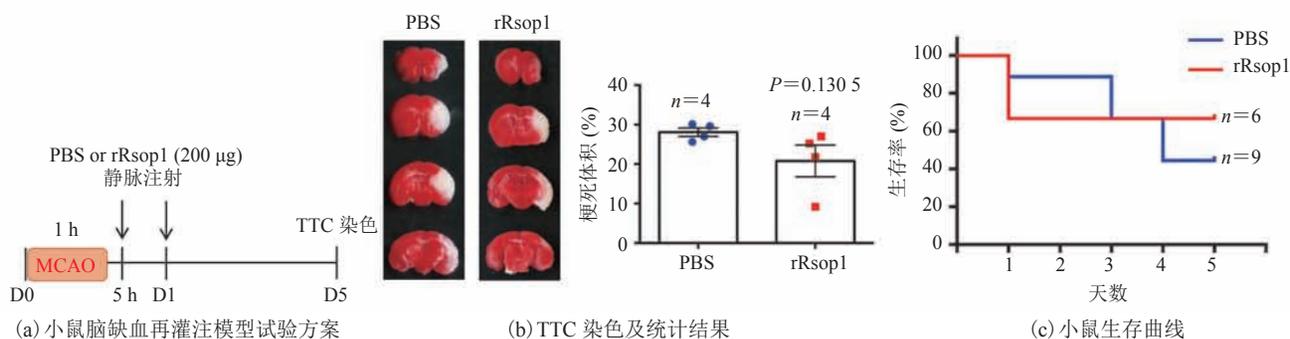


图4 静脉注射 rRspo1 重组蛋白对小鼠缺血性脑卒中的治疗作用

Fig. 4 Therapeutic effect of intravenous injection of rRspo1 recombinant protein on mouse ischemic stroke

法产生足够的治疗效果。

再灌注过程中的血脑屏障损伤是造成目前溶栓治疗时间窗狭窄的重要原因。Rt-PA 是临床上唯一用于脑卒中的溶栓药物，但其有效治疗窗仅为 3.5~4.5 h，超过这一时间使用极易引发脑出血，从而使病人死亡率大大升高。因此，研发对血脑屏障具有保护作用的药物，对脑卒中的治疗具有重要意义。新近研究发现，血管内皮细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性降低会引起小鼠血脑屏障功能异常，进而引发炎症和脑水肿等症状^[19-20]。而较高的 Wnt/ β -catenin 信号通路活性则具有维持血脑屏障通透性，保护来自溶栓药物损伤的作用^[12,21]，提示 Wnt/ β -catenin 信号通路可能对成年人血脑屏障功能的维持起关键作用。本文作者课题组前期工作也表明，增强 Wnt/ β -catenin 信号通路可以显著提高卒中后血脑屏障功能，减少小鼠脑梗死体积并提高生存率^[22]。

由于 Wnt/ β -catenin 信号通路的受体 Fzd4 与 Lrp5/6 会受到一些共受体(如 Lgr4-6、Znrf3/Rnf43)的调节而持续泛素化降解，从而难以通过直接给予大量 Wnt 蛋白的方式激活信号通路。此外，天然 Wnt 蛋白本身由于侧链脂修饰，几乎不溶于水，难以表达和纯化，这使它很难被制备成为蛋白药物直接使用^[23]。从生理意义上讲，Wnt/ β -catenin 信号通路的这种共受体调节机制有助于维持细胞稳态，但在信号激活时，Wnt 蛋白往

往需要一些配体的协同才能完成。R-spondin 作为分泌性的小分子蛋白，在一些肿瘤或小肠干细胞中可与其膜受体 Lgr4-6 和 Znrf3/Rnf43 结合，间接上调细胞膜上 Fzd 和 Lrp5/6 受体的蛋白水平，从而放大 Wnt 蛋白介导的 β -catenin 信号通路活性^[24-25]。本研究首次报导了 R-spondin 在脑血管内皮细胞中对 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活以及对血脑屏障功能相关基因的调节作用。在小鼠脑卒中后 5 h 和 24 h 分别注射 200 μ g R-spondin1 蛋白可以在一定程度降低小鼠脑梗死体积，提示脑内或许有更多细胞类型可以受到 R-spondin 的调节，在未来的工作中我们将验证这一假说。

5 结论

本研究初步证实了 R-spondin 蛋白可以协同 Wnt3a 蛋白在脑血管内皮细胞中激活 Wnt/ β -catenin 信号通路，进而调节血脑屏障功能相关基因的表达并最终对脑卒中发挥一定的治疗作用。然而，本研究中的体内研究部分仅设置一组剂量、两次给药，虽然可以从结果中观察到一定治疗效果，但与生理盐水对照组相比未达到显著性差异。未来在可以获得更多 R-spondin 重组蛋白的基础上，将设置不同剂量和更多次的给药，进一步探索 R-spondin 蛋白对缺血性脑卒中的治疗作用。

参 考 文 献

- [1] Hankey GJ. Stroke [J]. *Lancet*, 2017, 389(10069): 641-654.
- [2] 王拥军. 中国脑血管病防治面临的特殊问题 [J]. *科学通报*, 2016(18): 2020-2026.
- [3] Dong Q, Dong Y, Liu LP, et al. The Chinese Stroke Association scientific statement: intravenous thrombolysis in acute ischaemic stroke [J]. *Stroke and Vascular Neurology*, 2017, 2(3): 147-159.
- [4] 杜科涛, 谢辉. 脑卒中早期康复介入研究进展 [J]. *中国伤残医学*, 2013(11): 456-457.
- [5] Richards CL, Malouin F, Nadeau S. Stroke rehabilitation: clinical picture, assessment, and therapeutic challenge [J]. *Progress in Brain Research*, 2015, 218: 253-280.
- [6] Phan K, Zhao DF, Phan S, et al. Endovascular therapy including thrombectomy for acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis [J]. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2016, 29: 38-45.
- [7] Goyal M, Yu AY, Menon BK, et al. Endovascular therapy in acute ischemic stroke: challenges and transition from trials to bedside [J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 548-553.
- [8] Yaghi S, Willey JZ, Cucchiara B, et al. Treatment and outcome of hemorrhagic transformation after intravenous alteplase in acute ischemic stroke: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association [J]. *Stroke*, 2017, 48(12): e343-e361.
- [9] Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, et al. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier [J]. *Cell*, 2015, 163(5): 1064-1078.
- [10] Zhang JH, Badaut J, Tang JP, et al. The vascular neural network—a new paradigm in stroke pathophysiology [J]. *Nature Reviews Neurology*, 2012, 8(12): 711-716.
- [11] Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier [J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(12): 1584-1596.
- [12] Jean LeBlanc N, Menet R, Picard K, et al. Canonical Wnt pathway maintains blood-brain barrier integrity upon ischemic stroke and its activation ameliorates tissue plasminogen activator therapy [J]. *Molecular Neurobiology*, 2019, 56(9): 6521-6538.
- [13] Cho C, Smallwood PM, Nathans J. Reck and Gpr124 are essential receptor cofactors for Wnt7a/Wnt7b-specific signaling in mammalian CNS angiogenesis and blood-brain barrier regulation [J]. *Neuron*, 2017, 95(5): 1056-1073.e5.
- [14] Schulte G, Bryja V. Wnt signalling: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *British Journal Pharmacology*, 2017, 174(24): 4543-4546.
- [15] Daneman R, Agalliu D, Zhou L, et al. Wnt/ β -catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(2): 641-646.
- [16] De Lau W, Peng WC, Gros P, et al. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength [J]. *Genes and Development*, 2014, 28(4): 305-316.
- [17] De Lau WB, Snel B, Clevers HC. The R-spondin protein family [J]. *Genome Biology*, 2012, 13(3): 242.
- [18] Zhou ZH, Lu JF, Liu WW, et al. Advances in stroke pharmacology [J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 2018, 191: 23-42.
- [19] Benz F, Wichitnaowarat V, Lehmann M, et al. Low Wnt/ β -catenin signaling determines leaky vessels in the subfornical organ and affects water homeostasis in mice [J]. *eLife*, 2019, 8: e43818.
- [20] Niu JQ, Tsai HH, Hoi KK, et al. Aberrant oligodendroglial-vascular interactions disrupt the blood-brain barrier, triggering CNS inflammation [J]. *Nature Neuroscience*, 2019, 22(5): 709-718.
- [21] Corada M, Orsenigo F, Bhat GP, et al. Fine-tuning of Sox17 and canonical Wnt coordinates the permeability properties of the blood-brain barrier [J]. *Circulation Research*, 2019, 124(4): 511-525.
- [22] Chang JL, Mancuso MR, Maier C, et al. Gpr124 is essential for blood-brain barrier integrity in central nervous system disease [J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(4): 450-460.
- [23] Niehrs C. The complex world of Wnt receptor signalling [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(12): 767-779.
- [24] Kriz V, Korinek V. Wnt, RSPO and Hippo signalling in the intestine and intestinal stem cells [J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9(1): 20.
- [25] Koo BK, Spit M, Jordens I, et al. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors [J]. *Nature*, 2012, 488(7413): 665-669.