

· 基础研究 ·

实验性脑出血后细胞凋亡与神经损伤的关系

李红玲 赵庆荣 张玉森

【摘要】 目的 探讨脑出血后血肿周围组织细胞凋亡、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达与神经功能损伤的关系。**方法** SD 大鼠 70 只,随机分为实验组和对照组,每组各 35 只。实验组采用胶原酶诱导尾状核脑出血模型,分别于术后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、7 d、14 d 共 7 个时相点(每个时相点 5 只)评测其神经功能缺损情况。之后处死大鼠,采用 TUNEL 法、免疫组化 SP 技术,检测血肿周围脑组织细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。**结果** 脑出血后大鼠出现不同程度的神经功能缺损,以术后 48 h 左右损害严重,出血后 6 h 血肿周围组织出现 TUNEL 阳性细胞,48 h 达高峰。Bcl-2 和 Bax 蛋白表达高峰期分别是脑出血术后 6 h 和 48 h。**结论** 脑出血后细胞凋亡与神经损伤程度一致,细胞凋亡在脑出血后神经功能损伤中起重要作用。

【关键词】 脑出血; 细胞凋亡; 神经损伤; 大鼠; 胶原酶

The relationship between apoptosis and neurological impairment in experimental intracerebral hemorrhage in rats LI Hong-ling, ZHAO Qing-rong, ZHANG Yu-miao. Department of Rehabilitation Medicine, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the apoptosis, expressions of Bcl-2 and Bax protein in perihematomal brain regions of rats and neurologic dysfunctions after intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** Seventy Sprague-Dawley rats were divided randomly into two groups: an experimental group and a control group. A model of ICH was established by injection of 0.5 U bacterial collagenase VII into the caudate nucleus in the rats. Neurological impairment was evaluated at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 d and 14 d after ICH, respectively, before the rats were sacrificed. TUNEL method was used to detect apoptosis, and SP method to detect expressions of Bcl-2 and Bax protein in the perihematomal brain tissues. **Results** Neurological impairment occurred in all the rats after ICH, and peaked at 48 h after ICH. The apoptosis and expressions of Bcl-2 and Bax protein were peaked at 48 h, 6 h and 48 h after ICH, respectively. **Conclusion** The degree of the neurological impairment after ICH is parallel to that of the apoptosis. Apoptosis may play an important role in neurological impairment after ICH.

【Key words】 ICH; Apoptosis; Neurological impairment; Rats; Collagenase

目前,对脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)尚缺乏有效的治疗手段,即使及时清除血肿也不能取得满意的疗效。研究表明,出血性脑损伤除了血肿的占位效应及血肿对周围脑组织的直接破坏外,继发性损伤也是造成脑损伤的原因^[1,2]。研究认为,细胞凋亡参与了脑出血继发性神经细胞的损伤。本研究拟通过实验性脑出血动物模型,研究脑出血后细胞凋亡与神经损伤的关系。

材料与方法

一、实验动物与分组

雄性 SD 大鼠 70 只,体重 280 ~ 300 g,由河北医科大学基础医学院实验动物中心提供。随机分为实验组和对照组,各 35 只,每组又分为术后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、7 d、14 d 共 7 个时相点,每个时相点 5 只。

二、动物模型建立与标本采集

参照 Rosenberg 方法^[3],实验组采用 0.5 U 胶原酶(美国 Sigma 公司)/2.5 μl 生理盐水诱导尾状核位置脑出血模型。对照组的操作方法同实验组,但不注射胶原酶,只注射同等剂量的生理盐水。于不同时间处死动物,取出大脑,去除额极 2 mm 前部脑组织,经脑表面穿刺点冠状切开标本,取穿刺点后约 4 mm 的脑组织,放入 4% 多聚甲醛液中固定,经脱水、透明、石蜡包埋,备用。

三、大鼠行为学评测

1. Bederson 评分^[4]:轻抓大鼠尾巴,提起高于桌面 10 cm,正常大鼠两个前爪伸向桌面。脑损伤大鼠,其损伤对侧前肢屈曲,姿势变化从轻度屈腕、伸肘、肩外展,到严重的腕肘屈曲、肩内旋外展。将大鼠放在一张大、软、有弹性、光滑的记录纸上,利于爪子抓牢。然后提起尾部,用手轻推大鼠肩部,直到前肢滑动几公分。这一动作在不同方向重复数次。正常或轻度功能障碍

的大鼠,会在不同方向以同样的力抵抗推力。0 分:无神经功能缺损;1 分:前肢出现任何屈曲成分(即提尾悬空实验阳性),不伴其他异常;2 分:侧推抵抗力下降(即侧向推力实验阳性),伴前肢屈曲,无转圈行为;3 分:同 2 级行为,伴自发性旋转(自由活动向瘫痪侧划圈)。

2. 平衡木行走试验^[5]:测定运动整合及协调能力,平衡木长 80 cm,宽 2.5 cm,平放在距离地面高 10 cm 处,按 Feeney 的计分标准:0 分:穿过平衡木,不会跌倒;1 分:穿过平衡木,跌倒机会少于 50%;2 分:穿过平衡木,跌倒机会大于 50%;3 分:能穿过平衡木,但受累的瘫痪侧后肢不能帮助向前移动;4 分:不能穿过平衡木,但可坐在上面;5 分:将大鼠放在平衡木上会掉下来。

3. 肌力测验^[6]:直径 0.15 mm 铁丝绳,长 46 cm,置于距地面 70 cm 高度,其下放高 3.5 cm 泡沫箱。将大鼠两个前爪放在绳上,放开,记录大鼠在绳上的时间。0 分:挂在绳上 0~2 s;1 分:挂在绳上 3~4 s;2 分:挂在绳上 5 s;3 分:挂在绳上 5 s,将后腿放在绳上。

4. 前肢放置检测(measurement of forelimb placing)^[7]:检查者手持大鼠背部皮肤使四肢悬空,将胡须刷触桌面角边缘,测试同侧前肢的活动情况,未受损者可前肢迅速放到桌面,脑损伤时此动作受到不同程度的影响。大鼠每侧受测 10 次,前肢触及桌面角边缘次数的百分率即为该侧得分。注意:抓握大鼠要轻柔,前肢自由悬垂,测试前轻轻上下活动大鼠,尽量让其放松,如大鼠挣扎,肌肉紧张或肢体放在测试者手上不记在内。

5. Bcl-2、Bax 蛋白及细胞凋亡检测:Bcl-2 和 Bax(北京中杉试剂公司)蛋白检测采用免疫组化 SP 法,细胞凋亡采用 TUNEL(美国 Sigma 公司)法。具体步骤按试剂盒说明书进行,其中鼠抗 Bcl-2 和 Bax 单克隆抗体,工作浓度 1:100。Bcl-2 和 Bax 蛋白以细胞胞浆呈棕黄色着色为阳性细胞。凋亡细胞以细胞胞核呈棕黄色着色为阳性细胞。随机选择 5 个视野,然后算出每高倍(400×)镜下阳性细胞数。

四、统计学分析

采用 State 统计软件进行数据处理,样本均数两两比较采用单因素方差分析(one-way-ANOVA),检测数据用($\bar{x} \pm s$)表示,检验水准为 $P=0.05$ 。

结 果

一、行为学改变

脑出血(ICH)后 6 h 出现行为学改变,24~72 h 表现明显,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$),部分神经缺损持续存在至 ICH 后 7~14 d。对

照组 ICH 后 6 h 出现部分功能缺损,24 h 后恢复正常,考虑可能与麻醉剂和手术创伤有关。见表 1。

表 1 实验组和对照组大鼠术后不同时间的行为学测评变化(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	Bederson 评分	平衡木行走试验	肌力测验	前肢放置检测
实验组	35				
6 h	5	2.8±0.5 ^b	4.0±0.0 ^b	0.0±0.0	4.0±5.5
12 h	5	2.6±0.6 ^b	3.6±0.6 ^b	0.4±0.55 ^a	12.5±8.4 ^b
24 h	5	2.0±0.0 ^b	3.0±0.0 ^b	0.6±0.55 ^b	40.0±10.0 ^b
48 h	5	2.4±0.6 ^b	2.6±0.6 ^b	0.8±0.84 ^b	50.0±12.5 ^b
72 h	5	1.4±0.6 ^b	2.0±1.0 ^b	1.1±0.78 ^b	62.0±11.0 ^b
7 d	5	0.8±1.3	0.8±1.3	2.1±0.9 ^a	72.0±29.4 ^a
14 d	5	0.0±0.0	0.0±0.0	3.0±0.0	86.0±11.4
对照组	35				
6 h	5	1.4±0.6	2.6±0.6	0.4±0.6	15.0±7.1
12 h	5	0.4±0.6	0.2±0.6	1.4±0.6	80.0±8.4
24 h	5	0.0±0.0	0.2±0.5	2.6±0.6	92.0±8.6
48 h	5	0.0±0.0	0.0±0.0	3.0±0.0	94.0±5.5
72 h	5	0.0±0.0	0.0±0.0	3.0±0.0	96.5±5.0
7 d	5	0.0±0.0	0.0±0.0	3.0±0.0	98.0±5.5
14 d	5	0.0±0.0	0.0±0.0	3.0±0.0	98.0±5.5

注:与对照组比,^a $P<0.05$;^b $P<0.01$

二、ICH 后血肿周边组织中 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达
对照组各视野偶见 TUNEL 阳性细胞和散在的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。实验组,6 h 血肿周边 TUNEL 阳性细胞开始表达,24 h 明显增多,48 h 达高峰,72 h 后逐渐降低,14 d 时仍可见凋亡细胞;Bax 蛋白于 ICH 后 6 h 开始表达,48 h 达高峰,之后逐渐下降,出血后 14 d 仍高于对照组;Bcl-2 蛋白,ICH 后 6 h 表达明显,之后逐渐下降,48 h 降至最低,72 h 后有回升趋势。凋亡主要发生在血肿周围神经细胞和胶质细胞。见表 2,图 1~4。

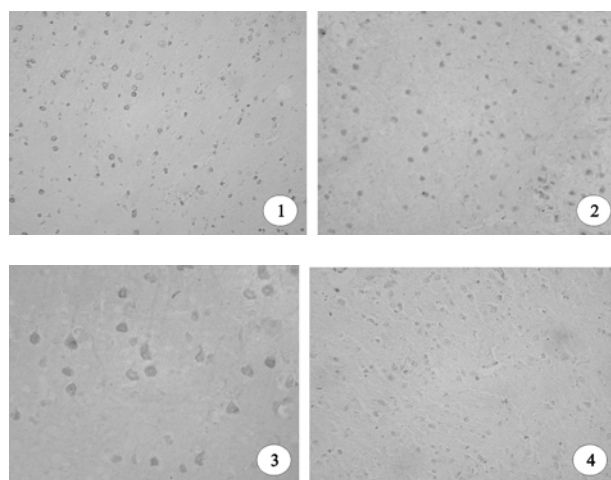


图 1 ICH 后 6 h 的 TUNEL 阳性细胞(免疫组化染色, ×200)

图 2 ICH 后 6 h 的 Bcl-2 阳性细胞(免疫组化染色, ×200)

图 3 ICH 后 72 h 的 Bax 阳性细胞(免疫组化染色, ×400)

图 4 对照组几乎无 TUNEL 阳性细胞表达(免疫组化染色, ×200)

表 2 ICH 后血肿周边组织术后不同时间点 TUNEL 阳性细胞数、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	TUNEL 阳性细胞(个)	Bcl-2 蛋白阳性细胞数(个)	Bax 蛋白阳性细胞数(个)
实验组	35			
6 h	5	31.5 ± 2.7 ^b	26.5 ± 8.4 ^b	9.3 ± 6.7
12 h	5	51.0 ± 14.0 ^b	17.3 ± 2.5 ^b	19.0 ± 5.4 ^b
24 h	5	88.0 ± 15.8 ^b	13.0 ± 4.7 ^a	28.8 ± 2.6 ^b
48 h	5	97.5 ± 22.6 ^b	10.3 ± 2.6 ^a	55.5 ± 45.5 ^b
72 h	5	82.0 ± 6.3 ^b	14.3 ± 5.6 ^b	26.8 ± 4.4 ^b
7 d	5	42.8 ± 12.5 ^b	16.3 ± 5.7 ^b	19.0 ± 3.9 ^b
14 d	5	10.8 ± 2.5	18.5 ± 7.2 ^a	11.8 ± 1.7 ^b
对照组	35			
6 h	5	2.5 ± 2.4	1.5 ± 1.7	2.5 ± 2.7

注:与对照组比,^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$

讨 论

研究证实,细胞凋亡机制参与了脑出血后继发性脑损伤。Qureshi 等^[8]在 12 例行血肿清除术的脑出血患者中发现,10 例患者可见明显细胞凋亡。患者出血 24 h 内可检测到凋亡细胞,5 d 时仍可见到凋亡细胞。Chamnanvanskij 等^[9]用同样方法证实,早产儿颅内出血标本中存在相当比例的细胞凋亡。Matsushita 等^[10]采用胶原酶诱导大鼠脑出血模型,用 TUNEL 染色发现,建立模型 24 h 后在血肿区及其周围检测到大量凋亡细胞,Niss 染色、神经核和胶质纤维酸性蛋白免疫细胞化学双标记染色证实,这些凋亡细胞主要为神经元和星形胶质细胞。而且应用广谱胱冬酶抑制剂 zVAD-fmk 可降低大鼠脑出血后 TUNEL 阳性细胞数。牛黄酸熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acide)可以调整 Bcl-2 家族成员和 NF- κ B 活性,通过中断经典的凋亡通道来调节细胞死亡,从而达到神经保护作用以减少脑损伤^[11]。本研究 ICH 后 6 h 出现 TUNEL 阳性细胞,48 h 达高峰,持续 14 d 之久,与 Matsushita 结果相近。上述研究说明细胞凋亡参与了 ICH 后神经损伤的过程。

细胞凋亡是细胞的程序性死亡,需要启动细胞内的特殊基因,转录及合成特殊的蛋白质。Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族中已被发现的与细胞凋亡关系密切的两种基因,在中枢神经系统中均有表达。Bcl-2 基因有较弱的促进细胞周期和细胞增殖的能力,其过度表达可特异性抑制细胞凋亡,而 Bax 基因的过度表达能加速依赖 IL-3 细胞株在细胞因子缺失时发生细胞凋亡,并对抗 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用。Bax 和 Bcl-2 是上述两种基因的蛋白质表达产物,Bax 可通过其自身形成的 Bax 同二聚体和/或与 Bcl-2 形成 Bax-Bcl-2 异二聚体而发挥作用,Bax 同二聚体促进细胞凋亡,Bax-Bcl-2 异二聚体则抑制细胞凋亡^[13]。本实验结果显

示:对照组 TUNEL 阳性细胞表达很少,而 ICH 组,6 h 血肿周边 TUNEL 阳性细胞开始明显表达,48 h 达高峰,72 h 后逐渐降低,14 d 时仍可见凋亡细胞。Bax 蛋白表达与 TUNEL 阳性细胞变化一致,ICH 后 48 h 达高峰,14 d 仍高于对照组。而 Bcl-2 蛋白,于 ICH 后早期表达明显,48 h 降至最低。且脑出血后这些变化与大鼠行为学改变呈现一致性。而正常和对照组大鼠偶见凋亡,提示细胞凋亡是影响脑出血后神经损伤的重要因素。神经细胞凋亡的机制尚未阐明,可能与脑缺血再灌注产生的自由基、兴奋性氨基酸、钙离子内流、蛋白质的磷酸化等有关,更重要的是与凋亡细胞内活跃的基因表达有关^[14]。

总之,实验性脑出血血肿周围存在凋亡现象,且凋亡基因的变化与神经损伤程度呈一致性趋势。阻断细胞凋亡有望成为改善脑出血预后的有效治疗措施。

参 考 文 献

- [1] Matsushita K, Meng W, Wang X, et al. Evidence for apoptosis after intracerebral hemorrhage in rat striatum. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000,20:396-404.
- [2] Gong C, Boulis N, Qian J, et al. Intracerebral hemorrhage-induced neuronal death. *Neurosurgery*, 2001,48:875-883.
- [3] Rosenberg GA, Mun-Bryce BS, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*, 1990,21:801-807.
- [4] Bederson JB, Pitlis LH, Tsun M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion:evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986,17:472-476.
- [5] Altumbabic M, Peeling J, Bigio MRD, et al. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration. *Stroke*, 1998,29:1917-1923.
- [6] Dean RL, Scozafava J, Goas JA, et al. Age related differences in behavior across the life span of the C57BL/6J mouse. *Exp Aging Res*, 1981,7:427-451.
- [7] Hua Y, Schallert T, Keep RF, et al. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat. *Stroke*, 2002,33:2478-2484.
- [8] Qureshi AI, Suri MF, Ostrow PT, et al. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery*, 2003,52:1041-1047.
- [9] Chamnanvanskij S, Margraf LR, Bums D, et al. Apoptosis and white matter injury in preterm infants. *Pediatr Dev Pathol*, 2002,5:184-189.
- [10] Matsushita K, Meng W, Wang X, et al. Evidence for apoptosis after intracerebral hemorrhage in rat striatum. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000,20:396-404.
- [11] Rodrigues CM, Solaa S, Nan Z, et al. Tauroursodeoxycholic acid reduces apoptosis and protects against neurological injury after acute hemorrhagic stroke in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003,100:6087-6092.
- [12] Oltvai ZN, Millman CI, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993,74:609-619.
- [13] Chiarugi V, Maguelli L, Cinelli M. Complex interplay among apoptosis factors: RB, p53, E2F, TGF- β , cell cycle inhibitors and the bcl-2 gene family. *Pharmacol Res*, 1997,35:257.

(修回日期:2007-04-14)

(本文编辑:熊芝兰)