

· 基础研究 ·

脑缺血再灌注后基质金属蛋白酶-9 的早期表达及对血脑屏障的破坏

刘华 廖维靖 杨万同 郑婵娟 蒙兰青

【摘要】目的 研究大鼠短暂性脑缺血再灌注对脑组织基质金属蛋白酶-9 (MMPs) 表达的影响及对血脑屏障的破坏程度, 探讨两者之间的关系以及在脑缺血损伤中所起的作用。**方法** 通过制作大鼠脑缺血/再灌注模型, 观察脑缺血后不同再灌注时间对脑含水量、血脑屏障通透性及 MMPs 表达的影响。**结果** 脑缺血再灌注 6 h 时, 大鼠脑组织即有含水量及血脑屏障通透性增加, 并随着时间推移而呈上升趋势。MMPs 主要表达在大鼠缺血侧脑半球内的缺血神经元、血管内皮细胞及嗜中性粒细胞等细胞胞浆中, 其表达含量于缺血再灌注 6 h 后开始增加, 并于再灌注 1~2 d 时达到峰值, 而该组大鼠缺血对侧脑半球组织内未见 MMPs 表达; 假手术组大鼠亦未发现 MMPs 表达。**结论** MMPs 的早期表达与血脑屏障通透性的改变密切相关, 提示 MMPs 可能参与脑梗死后血管源性水肿的早期形成, 从而加重脑缺血再灌注损伤。

【关键词】 基质金属蛋白酶; 缺血性脑损伤; 血脑屏障

Early expression of matrix metalloproteinase 9 and blood-brain barrier disruption after transient cerebral ischemia-reperfusion in rats LIU Hua, LIAO Wei-jing, YANG Wan-tong, ZHENG Chan-juan, MENG Lan-qing. Department of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital, University of Wuhan, Wuhan 430071, China

【Abstract】Objective To study the effects of transient cerebral ischemia-reperfusion (CIR) on the expression of matrix metalloproteinase 9 (MM9) in cerebral tissues and the disruption of blood-brain barrier (BBB), and to explore their relationship in addition to their roles in the cerebral ischemic injuries. **Methods** The effects of different reperfusion time after cerebral ischemia on the water content of brain, the permeability of BBB and the expression of MM9 were investigated after the CIR model was established in rats. **Results** At 6h after CIR, the cerebral water content and the permeability of BBB were increased with time while MM9 was expressed mainly in the plasma of ischemic neurons and the vascular endothelial cells of the ischemic hemisphere. The expression of MM9 was increased at 6h after reperfusion in the ischemic hemisphere, and reached the peak at 1~2d after reperfusion. However, no expression of MM9 was observed in the hemisphere contralateral to the ischemic side in the CIR group and in the sham-operation group. **Conclusion** The early expression of MM9 was closely related to changes of the BBB permeability, which indicated that MM9 might be involved in the cerebral edema of vascular origin in the early stage of cerebral infarction, leading to aggravation of the CIR injuries

【Key words】 Matrix metalloproteinase9; Ischemic cerebral injury; Blood-brain barrier

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)通透性改变在脑缺血再灌注损伤中起着关键性作用, 而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类能降解细胞外基质成分(extracellular matrix, ECM)的蛋白水解酶, 其中 MMP-9 是较重要的一种, 它能降解血管基底膜, 使血脑屏障开放。本实验通过检测脑缺血再灌注后脑含水量及血脑屏障通透性的改变, 以及 MMP-9 的表达, 以探讨各指标间的联系, 从而为更进一步研究脑缺血再灌注损伤机制提供依据。

材料与方法

一、动物分组及造模

选取健康雄性 Wistar 大鼠 70 只, 体重 200 ~ 250 g, 鼠龄 1.5 月, 均购自武汉大学医学院实验动物中心, 将其随机分为缺血再灌注组 (60 只) 及假手术组 (10 只), 2 组大鼠体重、鼠龄等方面差异均无显著性意义, 具有可比性。缺血再灌注大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛 (每千克体重 3.5 ml) 麻醉后, 手术步骤参照 Zea Longa 等^[1] 介绍的线栓造模方法并进行部分改良^[2], 取大鼠颈部正中切口, 结扎右颈外动脉 (ECA), 分离迷走神经, 在距右颈总动脉 (CCA) 分叉处近端 0.5~0.6 cm 处结扎右颈总动脉, 在结扎线的远端置丝线备用。用动脉夹夹闭备用线的远端, 在备用线的血管近端处剪一小切口, 将黑色 5/0 尼龙线栓送入右大脑中动脉 (MCA) 起始部, 遇阻力时停止, 插入深度为 (1.7 ± 0.2) cm, 造成大鼠右大脑中动脉血供阻断

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970935, 30271671)

作者单位: 430071 武汉, 武汉大学中南医院康复医学科

(middle cerebral artery occlusion, MCAO)。尼龙线由上海申丁实业有限公司生产,直径约 0.15 mm。实验前,加热线栓头端使之成光滑球形,线栓长约 4 cm。于大鼠脑缺血持续 1.5 h 后,将线栓轻轻拔至 CCA 处即可恢复 MCA 的血供。在造模过程中,使用白炽灯维持动物肛温在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 术后将大鼠置于放有清洁垫料的饲养盒中饲养,自由饮水、进食。假手术组尼龙线栓插入深度仅为 1 cm,于 1.5 h 后将线栓拔至 CCA 处,其它处理方式均与缺血再灌注组一致。

当大鼠脑缺血持续 1.5 h 拔线栓后,按照 Zea Longa 等^[1]介绍的方法对各组大鼠进行神经功能缺损评分:0 分——大鼠无任何神经功能缺失;1 分——左前肢不能伸展;2 分——向左侧行走;3 分——向左侧转圈成追尾状;4 分——意识障碍,无自主行走。如大鼠神经功能评分在 1~3 分间则认为造模成功,纳入本研究。缺血再灌注组分别在缺血再灌注 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 5 d 及 7 d 时各取 5 只大鼠进行血脑屏障通透性的研究,同时取 5 只假手术组大鼠作为对照,每只大鼠均做脑系数、脑含水量及血脑屏障通透性的测定。同样在进行 MMP-9 免疫组化测定时,缺血再灌注组分别在缺血 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 5 d 及 7 d 时各取 5 只大鼠进行检测,同时取 5 只假手术组大鼠作为对照。

二、脑系数及脑含水量的测定

各组大鼠于相应再灌注时间结束时称其体重,然后以低温断头方式处死后快速取脑组织,沿桥脑上界水平面切断,称全脑重。按公式计算脑系数:脑系数 = (全脑重/体重) × 100%。当大鼠全脑取下后,以视交叉后 2 mm 处为分界,前部用来测定血脑屏障通透性,后部用来测定脑含水量。将后部脑组织称湿重后,于 85℃ 烤箱中烘烤 5 d 后连续称重 3 次,直至重量保持恒定后记录干重数据,根据下列公式计算脑组织含水量:脑组织含水量 = [(湿重 - 干重)/湿重] × 100%。

三、血脑屏障通透性的测定

本研究用于血脑屏障通透性测定的各组大鼠于处死前 4 h,经其腹腔缓慢注入 2% 伊文思蓝生理盐水液(每千克体重注射 2 ml),然后低温断头处死。将大鼠前部脑组织称湿重后,浸泡于 4 ml 甲酰胺液中并置于 45℃ 温箱内孵育 72 h,取其浸泡液在 721 分光光度计下检测对波长 620 nm 光线的吸光度,然后根据标准曲线计算脑组织内伊文思蓝的含量(mg/g 脑湿重)。其中甲酰胺由中国医药集团上海化学试剂公司生产,批号:T20020705;伊文思蓝购于武汉天源生物技术有限公司,由 Sigma 公司 E-2129 分装。

四、MMP-9 免疫组化检测

用于 MMP-9 免疫组化检测的各组大鼠(包括假手术组)于相应再灌注时间结束时,进行心脏灌注固

定,取视交叉处前、后 2 mm 处的脑组织制作切片。将取下的脑组织用石蜡包埋,制作厚 5 mm 的连续切片。采用 S-P 染色法,具体染色步骤参照 S-P 试剂盒说明。切片染色完毕后经微波修复,再经 3% H_2O_2 孵育后,于 15% 正常山羊血清中封闭 15 min,滴加 1:100 的一抗,然后逐次滴加生物素标记二抗及由辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,经 DAB 显色、苏木素复染,最后用中性树胶封片,阴性对照以 0.01 mol/L 的 PBS 代替一抗。一抗为 MMP-9 兔多抗(购自武汉博士德生物工程公司),S-P 试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。采用 HPIAS-1 000 高分辨率彩色病理图像报告分析系统-XZS(由同济千屏影像工程公司提供)进行图像分析处理,得出平均面密度、吸光度值。每只实验大鼠均取 3 张切片,在每张脑切片的缺血侧部分(假手术组大鼠脑切片在假手术侧部分)随机采集 5 个高倍镜(200 倍)视野,测定每个视野区域面积的吸光度值(吸光度与染色强度成正比),再计算各组切片的平均吸光度值。

五、统计学分析

所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验,使用 Excel 2000 进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

结 果

一、不同缺血再灌注时间对大鼠血脑屏障各指标的影响

本研究结果表明,脑缺血再灌注组大鼠各时间点上的脑含水量及脑系数均比假手术组明显增高,并于缺血再灌注第 5 天时达到峰值;同样脑缺血再灌注组大鼠脑组织内的伊文思蓝含量也随着缺血再灌注时间的延长而明显增多,并于再灌注 2~3 d 后达到峰值,上述各指标的具体情况见表 1。

表 1 不同缺血再灌注时间对大鼠脑系数、脑含水量及伊文思蓝含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	脑系数(%)	含水量(%)	伊文思蓝 (湿重,mg/g)
假手术组	5	0.746 ± 0.031	77.11 ± 0.69	3.14 ± 0.13
缺血再灌注组				
再灌 6 h	5	0.785 ± 0.034 *	77.93 ± 0.68 *	3.77 ± 0.28 **
再灌 12 h	5	0.786 ± 0.012 *	78.15 ± 0.46 *	4.10 ± 0.32 **
再灌 1 d	5	0.807 ± 0.033 **	81.25 ± 0.80 **	4.52 ± 0.24 **
再灌 2 d	5	0.815 ± 0.018 **	82.00 ± 0.72 **	5.51 ± 0.24 **
再灌 5 d	5	0.825 ± 0.027 **	83.82 ± 0.49 **	4.77 ± 0.27 **
再灌 7 d	5	0.822 ± 0.021 *	83.78 ± 0.45 **	4.67 ± 0.43 **

注:与假手术组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

二、不同缺血再灌注时间对大鼠脑组织 MMP-9 表达的影响

本研究发现,大鼠缺血侧脑半球在缺血再灌注后

各时间点均可见到 MMP-9 免疫阳性细胞表达,其主要分布于神经元、血管内皮细胞及中性粒细胞等细胞胞浆中,镜下所见 MMP-9 免疫阳性细胞呈棕黄色淡染,大鼠脑缺血组织 MMP-9 的表达于再灌注 6 h 后开始升高,并于 2 d 后达到峰值,随后下降,其具体变化趋势见图 1;假手术组大鼠及缺血再灌注组大鼠缺血对侧脑半球组织内未见 MMP-9 免疫阳性细胞表达。

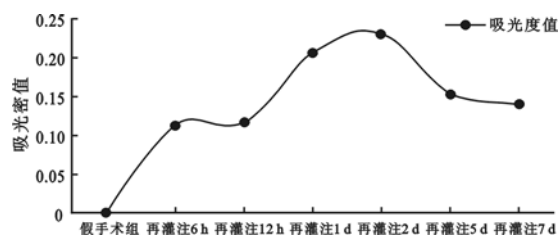


图 1 不同脑缺血再灌注时间对大鼠脑组织 MMP-9 阳性细胞吸光度值的影响

讨 论

相关资料表明^[3],如伊文思蓝与血浆蛋白结合,可作为评估血脑屏障损伤、血浆蛋白外渗及血管源性水肿的定性指标。采用分光光度计法检测渗入到大鼠脑组织内的伊文思蓝含量,可作为判断血脑屏障通透性改变、血管源性脑水肿的定性指标,且目前已被广泛采用。我们通过检测大鼠脑组织内伊文思蓝的含量发现,当缺血再灌注 6 h 时,缺血再灌注组大鼠脑组织内伊文思蓝的含量比假手术组明显增多,差异具有极显著性意义($P < 0.01$),表明此时大鼠脑组织内血浆蛋白开始外渗;当再灌注 12 ~ 24 h 时,伊文思蓝含量逐渐增加,表明血脑屏障的通透性还在继续增加;当再灌注 2 d 时,伊文思蓝含量达到高峰,表明此时血脑屏障的通透性最大;当再灌注 5 d 或 7 d 时,伊文思蓝含量则逐渐减少,上述现象与 Rosenberg 等^[4]的研究结果基本一致,其中部分差异可能是由于缺血时间及再灌注时间点的选取不同以及其它一些主观原因所造成。

MMPs 通过降解细胞外基质使血脑屏障受损、通透性增加,引起脑毛细血管内的水分及血浆蛋白外渗,导致细胞间隙内水分增多,形成血管源性水肿。本实验发现,MMP 的表达时相与血脑屏障的通透性改变具有相关性,均在再灌注 2 d 后达到峰值,由此通过检测 MMP-9 表达的变化来推测血脑屏障通透性的改变以及血管源性水肿的发生及发展,将具有重要意义。

相关研究报道表明,脑缺血再灌注后血脑屏障通透性的改变、血管源性水肿程度与 MMPs 关系密切。Rosenberg 等^[5]在向大鼠脑内注射明胶酶的实验中发现,MMP-9 能通过水解蛋白作用破坏毛细血管紧密连接及基底膜,引起血脑屏障破坏,继而导致组织损伤。

随后 Rosenberg 等^[6]还发现大鼠在脑缺血后,其脑水肿程度的变化趋势与脑内 MMP-9 含量的变化趋势相一致,提示 MMP-9 在脑缺血继发性组织损伤及血管源性水肿中起关键作用;进一步的研究还发现,由脑缺血诱导的 MMPs 含量变化对血脑屏障通透性的影响具有双向性^[4],其中血脑屏障的首次开放和脑水肿形成与 MMP-9 表达的升高有关,且该效应可被人工合成的 MMP-9 抑制剂所抑制,但血脑屏障的第二期开放则不能被 MMP-9 抑制剂所抑制,此时的损伤原因可能涉及 MMP-9 以外的因素,如自由基、兴奋性氨基酸及蛋白酶等等。Heo 等^[7]发现,在那些脑梗死后有血肿形成的患者中,其 MMP-9 含量比没有血肿形成的患者升高的更快,推测高水平的 MMP-9 参与了血管基底膜的破坏,从而导致继发性脑出血而形成水肿。

脑缺血再灌注损伤是目前国内、外研究的重要课题之一。如在脑梗死超早期给予溶栓治疗,可以减轻脑损伤,改善脑梗死患者的预后,其中溶栓的过程也就是缺血再灌注过程,因此我们研究脑缺血超早期再灌注后血脑屏障通透性的改变,对脑梗死后脑水肿的防治及指导溶栓治疗具有重要临床意义。本研究结果表明,MMP-9 的表达与血脑屏障通透性、脑水肿的发生密切相关,能否通过早期抑制 MMP-9 的表达或者应用 MMP-9 的抑制剂来减轻脑缺血再灌注的损伤作用,值得进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- 2 廖维靖, 范明, 杨运煌, 等. 线栓阻断大鼠脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 345-348.
- 3 王社军, 蒋传路, 康军, 等. 大鼠脑缺血/再灌注后血脑屏障通透性的改变及转移生长因子 $\beta 1$ 的表达. *中华神经外科杂志*, 2003, 19: 51-54.
- 4 Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, et al. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*, 1998, 29: 2189-2195.
- 5 Rosenberg GA, Dencoff JE, McGuire PG, et al. Injury-induced 92-kilodalton gelatinase and urokinase expression in rat brain. *Lab Invest*, 1994, 71: 417-422.
- 6 Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, et al. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16: 360-366.
- 7 Heo JH, Lucero J, Abumiya T, et al. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19: 624-633.

(收稿日期: 2003-08-29)

(本文编辑: 易 浩)