

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-12-0896-03

实验性大鼠脑出血后细胞凋亡与蛋白激酶 C 同工酶表达的关系及水蛭素的干预作用

田力¹, 刘海峰², 滕伟禹³

(1. 中国医科大学附属盛京医院干诊科, 辽宁省沈阳市 110003; 2. 温州医学院附属第一医院急诊科, 浙江省温州市 325000; 3. 中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 神经病学; 脑出血; 免疫组织化学法; 原位末端标记法; 蛋白激酶 C 同工酶; 细胞凋亡; 水蛭素; 大鼠

[摘要] 目的 探讨大鼠脑出血后蛋白激酶 C 同工酶表达及细胞凋亡程度, 以及水蛭素对二者的影响。方法 采用未抗凝新鲜自体股动脉血注入大鼠尾状核建立脑出血动物模型, 75 只大鼠随机分为对照组、脑出血组及水蛭素组。用免疫组织化学法及原位末端标记法分别测定脑出血后 6 h、1 天、3 天、6 天、10 天等时间点血肿周围组织蛋白激酶 C 同工酶的表达和细胞凋亡程度, 以及水蛭素对二者的影响。结果 与对照组比较, 血肿周围组织中蛋白激酶 C 同工酶水平及凋亡细胞数在脑出血后 6 h 升高 ($P < 0.05$), 第 3 天达高峰 ($P < 0.001$), 此后下降, 10 天时的表达接近正常, 差异无显著性 ($P > 0.05$); 水蛭素能够降低各个时间点蛋白激酶 C 同工酶水平及凋亡细胞的表达。结论 脑出血后血肿周围蛋白激酶 C 同工酶水平及凋亡细胞的表达均上调, 而水蛭素能够抑制细胞凋亡, 其机制可能与抑制蛋白激酶 C 同工酶的表达有关。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

The Relationship Between the Expression of Protein Kinase C Isoenzyme and Apoptosis after Intracerebral Hemorrhage in Rats, and the Intervention Effect of Hirudin

TIAN Li¹, LIU Hai-Feng², and TENG Wei-Yu³

(1. Ward of cadre, The Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Emergency Department, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China; 3. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, China)

[KEY WORDS] Intracerebral Hemorrhage; Immunohistochemistry Method; TUNEL Method; Protein Kinase C Isoenzyme; Cell Apoptosis; Hirudin; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of protein kinase C (PKC) isoenzyme and apoptosis in rats following intracerebral hemorrhage, and the intervention effect of hirudin. **Methods** Animal model was made by injecting self arterial blood into the caudate nucleus of rats. 75 rats were randomly assigned to control group, cerebral hemorrhage group and aprotinin treated group. After the injection, the rats were sacrificed at 6 h, 1 d, 3 d, 6 d, 10 d respectively. The expression of PKC isoenzyme was measured by immunohistochemistry method, and apoptosis detected with TUNEL method over a time course ranging from 6 hours to 10 days. **Results** Compared with the control group, the level of PKC isoenzyme increased after 6 hours of intracerebral hemorrhage and reached its climax at the 3 day, then decreased at the 6 day and come back to the normal standard at the 10 day. Administration of aprotinin could reduce the expression and the level of apoptosis. **Conclusions** The expression of protein kinase C isoenzyme and apoptosis were up-regulated in rats following intracerebral hemorrhage; Aprotinin can reduce the level of apoptosis; the inhibited expression of PKC isoenzyme may be involved in the mechanisms.

脑出血是神经系统的急症、重症, 也是常见病、多发病, 且致死率、致残率较高, 对于脑出血后引发

的一系列病理生理机制及相应治疗方法的探讨是目前科研和临床研究的重点。国内外均有文献报道^[1,2], 脑出血后脑水肿及血肿对于周围脑组织的压迫作用加重了局部脑组织的缺血缺氧, 最终导致神经元不可逆损伤乃至细胞凋亡是可能的机制之一。本实验通过观察脑出血后血肿周围脑组织蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 同工酶的表达和细胞凋亡程度, 以及水蛭素对二者的影响, 从而探讨脑出血后细胞凋亡的机制及水蛭素治疗脑出血的可能。

[收稿日期] 2007-08-13 [修回日期] 2007-11-10

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(20051095)

[作者简介] 田力, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为脑出血后脑水肿发生的机制, 联系电话为 13591650790, E-mail 为 tianlicmu2@126.com。刘海峰, 硕士研究生, 医师, 研究方向为脑出血后脑水肿发生的机制, E-mail 为 haifengcnu@126.com。滕伟禹, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为脑出血后脑水肿发生的机制。E-mail 为 tengweiyucnu@126.com。

1 材料和方法

1.1 实验动物的分组及处理

健康雄性 Wistar 大鼠 75 只, 体重 320 ± 20 g, 由中国医科大学实验动物部提供。随机分为 3 组: 对照组, 尾状核内注入生理盐水 78 μ L。脑出血组, 尾状核内注入自体新鲜动脉血 75 μ L, 5 min 后注入生理盐水 3 μ L。水蛭素组(水蛭素由北京大学生命科学学院朱作言教授赠送), 尾状核内注入自体新鲜动脉血 75 μ L, 5 min 后注入含水蛭素 10 U 的生理盐水 3 μ L, 各组 25 只。对照组在手术 6 h 后处死, 脑出血和水蛭素组分别在造模后 6 h、1 d、3 d、6 d、10 d 处死, 各时相点有 5 只大鼠。

1.2 动物模型制作方法

脑出血动物模型制作参照文献[3], 大鼠以 10% 水合氯醛(350 mg/kg) 腹腔麻醉后, 固定于脑立体定向仪。无菌条件下头部正中纵形切口, 暴露前囟和冠状缝, 于前囟前 0.2 mm、中线右侧旁开 3 mm 处用直径 1 mm 的牙钻钻孔。用 1 mL 的注射器经右侧股动脉抽取 75 μ L 自体血, 经颅骨的钻孔将注射器垂直插入脑内 6 mm(相当于尾状核的部位), 缓慢注入。对照组操作同实验组, 但不注血, 留针 10 min 后退针。经预实验证实模型成功的判定标准为术后沿针道冠状面切开脑组织可见血肿形成。

1.3 标本采集及处理

大鼠脑出血后不同时点以 0.3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg) 腹腔内麻醉后开胸, 暴露心脏, 经左心室灌注肝素化生理盐水 100~200 mL(右心耳剪一小口), 快速冲洗体内血液后, 再给予 4% 甲醛冲洗灌注脑组织约 30 min, 断头处死, 取鼠脑用 4% 甲醛固定 24 h, 取出脑组织在血肿区作冠状切片, 常规脱水、浸蜡、石蜡包埋, 将脑组织切成厚 5 μ m 的连续切片, 裱片于涂布粘片剂(多聚赖氨酸)的载玻片。烤片 56 $^{\circ}$ C, 2 天后置室温待用。

表 1. 各组脑组织蛋白激酶 C 同工酶阳性细胞表达的变化($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	6 h	1 d	3 d	6 d	10 d
对照组	25	33.3 \pm 2.7	38.5 \pm 5.2	40.2 \pm 4.3	36.7 \pm 5.3	31.3 \pm 3.1
出血组	25	50.9 \pm 6.1 ^a	63.8 \pm 6.4 ^b	84.7 \pm 7.6 ^b	56.5 \pm 4.0 ^a	36.4 \pm 3.2
水蛭素组	25	40.3 \pm 3.6 ^c	48.6 \pm 4.4 ^c	66.5 \pm 3.3 ^c	40.2 \pm 3.1 ^c	33.2 \pm 2.8

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与脑出血组比较。

3 讨论

脑出血后细胞凋亡调控是一个多种因素影响的复杂的病理过程, 脑出血后凝血酶释放、血肿及降解

1.4 蛋白激酶 C 同工酶含量的免疫组织化学测定

用免疫组织化学法测定蛋白激酶 C 同工酶的含量。试剂盒由中国人民解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所提供, 严格按照说明书操作, 在显微镜下观察结果和拍照并于镜下计数病变侧 5 个不同视野大脑皮层的阳性细胞数。

1.5 脑细胞凋亡的检测

严格按照试剂盒说明进行操作。光镜下可见到 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞核中出现棕黄色颗粒。显色后在 400 倍光镜下计数 TUNEL 阳性细胞, 每片取血肿周围 5 个不重复视野。将 6 张切片的阳性细胞数的平均值作为该时间点的阳性细胞个数。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计学软件单因素方差分析进行检验, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠自体股动脉血制备的脑出血大体模型

本实验采用未抗凝新鲜自体股动脉血注入大鼠右侧尾状核建立脑出血动物模型, 6 h 后冠状切片可见针道周边少量渗血, 右侧尾状核区域血肿形成, 1 天后血肿大小达高峰, 3 天后逐渐吸收, 10 天时血肿体积明显缩小, 血肿周围脑水肿基本吸收。

2.2 蛋白激酶 C 同工酶和凋亡细胞的表达及水蛭素的干预

免疫组织化学处理后 PKC 同工酶阳性细胞的胞膜及胞浆呈棕黄色, 正常脑组织中弱阳性表达, 脑出血后出血周围区域较明显表达。TUNEL 染色阳性的细胞即凋亡细胞和 PKC 同工酶阳性表达均与脑出血后 6 h 有不同程度抑制作用($P < 0.05$), 尤其对脑出血后 1~3 天抑制作用最为明显($P < 0.01$; 表 1, 表 2)。

产物的毒性作用、炎性反应、钙超载、兴奋性氨基酸及自由基等共同起作用, 其中脑出血后血肿周围脑组织血流量降低对诱导凋亡的研究成为目前研究热

表 2. 各组脑组织 TUNEL 阳性细胞表达的变化($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	6 h	1 d	3 d	6 d	10 d
对照组	25	23.3 ± 2.7	30.1 ± 3.0	36.3 ± 2.9	32.8 ± 3.6	27.0 ± 2.6
出血组	25	66.9 ± 7.1 ^a	105.9 ± 14.1 ^b	148.7 ± 17.0 ^b	98.5 ± 13.1 ^a	36.4 ± 4.7
水蛭素组	25	34.5 ± 3.2 ^c	73.6 ± 8.8 ^c	90.5 ± 12.6 ^c	56.4 ± 5.3 ^c	30.2 ± 5.0

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与脑出血组比较。

点^[4,5]。PKC 是一类由多种同工酶组成的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,是细胞信号转导通路中心分子之一。PKC 通过对蛋白质的磷酸化,在神经元兴奋性调节、信号传递、突触塑性、细胞增殖中起关键作用,其中 PKC 同工酶在脑组织中含量丰富。脑出血可诱导细胞信号转导的异常,引起神经元死亡和/或凋亡^[6];而蛋白激酶在细胞信号转导起重要作用。本实验显示 PKC 同工酶在脑出血后血肿周围异常表达,即脑出血后 6 h,PKC 同工酶明显表达,3 天达高峰,10 天基本恢复正常水平。同时还发现,脑出血后 6 h 针道周边有少量 TUNEL 阳性细胞,3 天时血肿周围出现大量 TUNEL 阳性细胞,6 天时开始减少,10 天明显减少,即说明脑出血可诱导血肿周围神经元 PKC 同工酶表达上调,从而诱导细胞凋亡。

Lee 等^[7]发现血肿周围缺血是造成脑水肿的重要原因之一,脑缺血/再灌注可诱导 PKC 移位激活并参与神经元损伤,其机理可能与其促进钙超载、兴奋性氨基酸及第三信使表达有关;PKC 抑制剂可以保护脑缺血/再灌注诱导的神经元的损伤。Xue 等^[8]发现,细胞凋亡在自体血注入后 4 h 出现,48~72 h 达到高峰,并持续 4 周以上。这均表明细胞凋亡机制不仅参与了出血性脑损伤,而且作用时间长。本实验凋亡持续时间短,可能与指标的检测方法不同有关。本实验提示脑出血后血肿周围 PKC 同工酶表达与细胞凋亡水平变化趋势一致,李玲等^[9]也发现二者呈正相关($P < 0.01$)。由此可以得出结论,脑出血后脑组织 PKC 同工酶表达上调与血肿周围神经元凋亡关系密切,PKC 同工酶上调可能为诱导凋亡的路径之一。PKC 可通过以下多条途径引起神经元凋亡:激活磷脂酶促进自由基生成、磷酸化活化核转录因子使血管收缩,加重缺血缺氧等;促进钙超载,大量兴奋性氨基酸在缺血组织的堆积使细胞膜通透性增加,继而 Ca^{2+} 内流增加并启动神经元凋亡程序。

另外本实验还发现经水蛭素处理后,PKC 同工酶及细胞凋亡在各时间点均有下降,1~3 天尤其明

显。水蛭素治疗后各时相点 TUNEL 阳性细胞明显降低($P < 0.05$)。即水蛭素对细胞内 PKC 同工酶表达及凋亡细胞表达有明显抑制作用;水蛭素能有效抑制血肿周围 PKC 同工酶表达从而抑制细胞凋亡。

目前已知,从天然水蛭中提取的水蛭素是作用最强的凝血酶特异性抑制剂,它是一种单链多肽,由 65 个氨基酸组成,它可与凝血酶的精氨酸环结合,可减少凝血酶的产生;从而减轻其炎症反应以及神经细胞凋亡等神经毒性作用。目前有实验^[10,11]证实了水蛭素能够明显降低脑出血后血脑屏障开放的程度,并减轻脑组织水肿。考虑水蛭素也正是通过减轻出血灶周围组织水肿压迫及抗凝血酶作用抑制了 PKC 同工酶表达与细胞凋亡,这也为脑出血治疗提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] Fotheringham AP, Davis CA, Davis I. Oedema and glial cell involvement in the aged mouse brain after permanent focal ischemia [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2000, **26** (5): 412-423.
- [2] Jin X, Zhao H, Wang JF, Fang LB, Lin JY, Gao Y. Influence of beta-endorphin on function of immune system of patients with cerebral hemorrhage [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2003, **83** (16): 1409-412.
- [3] 田力, 刘海峰, 滕伟禹. 大鼠实验性脑出血后基质金属蛋白酶 2 和 9 的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (3): 221-223.
- [4] 赵性泉, 龙洁, 张在强. 大鼠局灶性脑缺血半暗带细胞凋亡动态变化规律的研究[J]. *首都医科大学学报*, 2000, **3** (1): 26-28.
- [5] Qureshi AI, Suri MF, Ostrow PT. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage [J]. *Neurosurgery*, 2003, **52** (5): 1041-1048.
- [6] Wickman G, Lan C, Vollrath B. Functional roles of the rho/rho kinase pathway and protein kinase C in the regulation of cerebrovascular constriction mediated by hemoglobin: relevance to subarachnoid hemorrhage and vasospasm [J]. *CircRes*, 2003, **92** (7): 809-816.
- [7] Lee EJ, Hung YC. Maked anemic hypoxia deteriorates cerebral hemodynamics and brain metabolism during massive intracerebral hemorrhage [J]. *J Neuro Sci*, 2001, **190** (1-2): 3-10.
- [8] Xue M, Del Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death [J]. *Neurosci Lett*, 2000, **283** (3): 230-232.
- [9] 李玲, 陈康宁, 陈福明, 黄河清, 桂丽, 张艳玲. 大鼠脑出血后蛋白激酶 C 同工酶和细胞内钙离子下调亡的关系[J]. *中国脑血管杂志*, 2006, **3** (10): 440-444.
- [10] 田力, 滕伟禹, 张威. 大鼠脑出血后脑含水量变化及水蛭素的干预作用[J]. *中国医科大学学报*, 2006, **34** (3): 244-245.
- [11] Rikuzo Hamada, Hideki Matsuoke. Antithrombin therapy for intracerebral hemorrhage [J]. *Stroke*, 2000, **31** (3): 794-795.

(此文编辑 李玲玲)