论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1736-03

蛛网膜下腔出血后S100B蛋白表达增加与脑血管痉挛有关

陈 果,马 颖,程 远,陈维福,谢宗义,朱凤军 (重庆医科大学第二临床学院神经外科,重庆 400010)

摘 要:目的 观察蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后不同时间点S100B蛋白在基底动脉中的表达,探讨S100B蛋白与脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)关系,进一步阐述SAH后CVS的发生机制。**方法** SD大鼠40只,分为正常对照组、假手术组、生理盐水组和实验组。根据取材时间不同,又将实验组分为SAH后第1、3、4、7、14天组,病理切片观察基底动脉病理改变;测定S100B蛋白染色含量,并比较不同时间点基底动脉中S100B蛋白的表达;进行统计学分析。**结果** SAH后在第3天时出现明显的血管腔变小;7 d时血管痉挛达高峰;14 d时动脉改变较7 d时有减轻;基底动脉中S100B蛋白主要表达位于平滑肌细胞。SAH后第3天开始表达增强,7 d时表达最强,14 d时减弱。**结论** SAH后不同时间点S100B蛋白的表达强度不一,随着CVS加重表达越强,在第7天达高峰。S100B蛋白的表达可能与CVS有关。

关键词: SAH;CVS;S100B蛋白;免疫组化染色
中图法分类号: R741.02;R743.31;R743.35 **文献标识码:** A

Relationship between S100B protein expression and cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats

CHEN Guo, MA Ying, CHENG Yuan, CHEN Wei-fu, XIE Zong-yi, ZHU Feng-jun (Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of cerebral vasospasm (CVS) after subarachnoid hemorrhage (SAH) by investigating the relationship between S100B protein and CVS. **Methods** Forty healthy SD rats were divided into four groups randomly: SAH groups, sham operation group, saline group and normal control group. On day 1, 3, 4, 7, 14 after SAH establishment, the basal blood vessels were observed under light microscope and S100B protein expressions in basal arteries were analyzed by immunohistochemical staining. **Results** CVS happened on day 3 after SAH, and reached the peak on day 7 and relieved on day 14. S100B protein mainly expressed in smooth muscle of basal arteries, whose expressions became stronger on day 3 after SAH and reached the climax on day 7 and got declined on day 14. **Conclusion** S100B protein expressed in different levels during the occurrence of SAH. As CVS got aggravated, the expression of S100B protein reached its peak in 7 days, indicating there is a correlation between S100B protein expression and CVS.

Key words: subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm; S100B protein; immunohistochemical staining

脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是对蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)最严重的并发症之一,其发生率为30% ~90%, CVS的最终结果导致弥漫性脑水肿和迟发性缺血性神经损伤,也是SAH致死和致残的首要原因[1]。由于目前有关CVS发生的病理生理机制仍不明确,针对CVS的预防和治疗还不能达到满意的效果。本研究通过建立大鼠SAH动物实验模型,探讨CVS与S100B蛋白之间的关系。

作者简介:陈 果,男,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事脑血管疾病的外科治疗方面的研究。电话:(023)63849075-2075
通信作者:马 颖,E-mail: maying1964@sohu.com
收稿日期:2007-11-23;修回日期:2008-03-06

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康、清洁的SD大鼠40只,雌雄不限,体质量在250 g左右,购自重庆医科大学实验动物中心。按照随机化的原则将大鼠分为实验组、假手术组、生理盐水组和正常对照组,其中实验组又分为SAH后1、3、4、7、14 d共5个时相点。每个时相点5只,正常对照组5只,假手术组和生理盐水组各5只。

1.1.2 主要仪器及实验用品 显微图像采集系统Olympus-Bx51,电动牙科钻韩国Strong 90,国产漂浮导管。北京中杉金桥生物技术有限公司产浓缩型DAB试剂盒,抗原修复液及复合消化液。博士德生物工程有限公司产鼠S-P通用型免疫组

化染色试剂盒及鼠抗人 S100B 单克隆抗体。

1.2　实验方法

1.2.1　SAH 模型建立　　SAH 模型制作参照季鹰等[2]改良后的方法。取 250 g 左右 SD 大鼠,用 10% 水合氯醛(0.1 ml/100 g)腹腔麻醉,切开顶部中线皮肤,在距前囟前 5 mm、中线旁 3 mm 处用电动牙科钻钻孔,挑破硬膜。将导管紧贴前颅窝底蛛网膜下腔送入颅底动脉环,连接注射器回抽,证实有清亮脑脊液流出,未造成脑组织损伤。缝合导管两侧皮肤,将导管固定在皮肤上。剪开大鼠腹股沟皮肤,钝性分离出股动脉,在动脉两端置线打结,但不收紧。罂粟碱 0.1 ml 滴在股动脉上,30 s 后见动脉明显扩张,采集 0.3 ml 动脉血,结扎股动脉后迅速注入蛛网膜下腔内。20 ~ 30 s 注完后拔除导管,以骨蜡填封钻孔处,防止血液流出,缝合皮肤。

1.2.2　假手术组、生理盐水组　　单纯开颅钻孔的大鼠作为假手术组,开颅钻孔注射生理盐水的动物做为生理盐水组。

1.2.3　标本采集及制作　　分别于模型制作成功后第 1、3、4、7、14 天在 10% 水合氯醛麻醉后打开胸腔,以生理盐水和多聚甲醛灌注后断颈处死大鼠,剪开颅骨取出含有脑干的基底动脉,多聚甲醛固定 1 d。常规病理切片,光镜下观察。做 S100B 的免疫组织化学:切片脱水,3% 过氧化氢甲醇液封闭过氧化物酶,孵育 10 min;滴加正常山羊血清,孵育 20 min;倾去血清(勿洗),滴加一抗(S100B);(每次实验均设 2 张阴性对照,用 PBS 代替一抗)PBS 冲洗,3 次 ×5 min;滴加生物素标记的二抗工作液,37 ℃孵育 20 min;滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液,37 ℃ 孵育 20 min;显色剂 DAB 显色,光镜下观察染色 5 ~ 10 min;苏木精复染 2 ~ 3 min;1% 盐酸酒精分化 3 s,自来水冲洗,梯度酒精脱水;二甲苯透明;中性树胶封片,光镜下观察以定性及定位。同时对基底动脉内径进行测量,利用公式:内径 = sqr(长径 × 宽径) 来计算血管内径。柯勇等[3]用大鼠二次注血模型,在与造影相同时间点取材进行光镜观察,发现光镜下血管直径的时相变化与造影结果一致。

1.2.4　结果判断　　根据文献报道,大鼠 CVS 程度不但可以经血管造影加以证实,而且其形态学也明显发生改变:包括管径变窄、内皮细胞变性出现皱褶、破损、平滑肌细胞肥大、变形,外膜增厚、纤维化,伴有炎细胞浸润。

S100B 蛋白在哺乳动物中枢神经系统中,主要由神经胶质细胞合成和分泌,特别是星形胶质细胞和少突胶质细胞;正常脑组织中仅有微量的 S100B 蛋白表达。S100B 蛋白免疫染色阳性为棕黄色或褐色。

采用成都金盘电子科大多媒体技术有限公司 GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统,根据平滑肌中出现的棕黄色或褐色对切片进行定性和半定量分析。在 20 × 20 倍光学显微镜下,每张片取连续不重复的 5 个视野,求出着色的阳性积分光密度及着色面积,运用公式 AIOD = 阳性积分光密度/管壁面积,求出单位面积的阳性积分光密度(IOD/μm^2)。

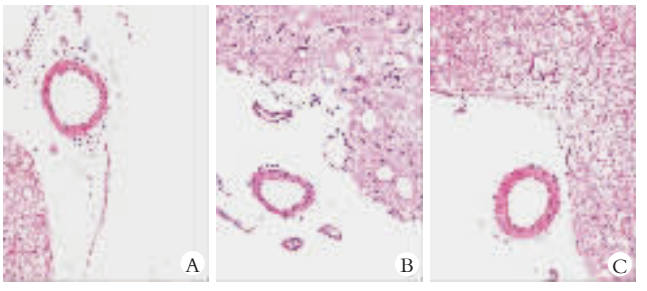
1.3　统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据统计分析采用 SPSS 11.0 统计软件,不同时间点的实验组与对照组比较采用配对 t 检验。

2　结果

2.1　常规 HE 染色镜下观察

HE 染色后观察大鼠基底动脉发现:正常对照组、假手术组、生理盐水组可见内皮细胞排列紧密,内膜完整(图 1A)。SAH 第 1 天组较对照组无明显变化,在第 3 天(图 1B)时出现明显的血管内皮细胞变性、皱褶,平滑肌细胞肥大,外膜出现粒细胞和单核细胞浸润;第 7 天(图 1C)时内皮细胞皱褶最明显甚至出现破损,平滑肌细胞扭曲变形,细胞间隙增宽,外膜变厚,炎性细胞浸润最明显;第 14 天时动脉改变较第 7 天时有减轻。



A:正常对照组; B: SAH 后 3 d 组; C: SAH 后 7 d 组

图 1　大鼠基底动脉形态学观察　(HE × 200)

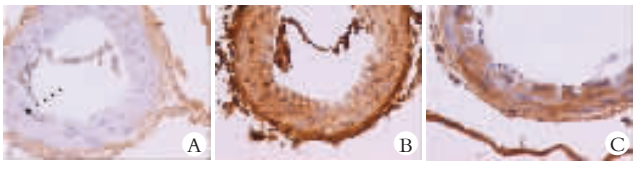
2.2　免疫组织化学检测

免疫组化结果显示:正常对照组可见脑组织基底动脉中有主要位于平滑肌的 S100B 蛋白轻度表达,呈棕黄色或黄褐色(图 2A),SAH 后第 3 天可见 S100B 蛋白的表达开始增高(图 2B)。SAH 后第 7 天 S100B 蛋白的表达达到高峰(图 2C),SAH 后第 14 天有所下降。统计学结果见表 1。

表 1　S100B 在基底动脉中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AIOD
正常对照组	5	0.007 0 ± 0.000 9
假手术组	5	0.007 4 ± 0.000 9
生理盐水组	5	0.007 3 ± 0.001 2
SAH 1 d 组	5	0.008 3 ± 0.003 7
SAH 3 d 组	5	0.084 5 ± 0.009 1[a]
SAH 4 d 组	5	0.090 4 ± 0.113 8[a]
SAH 7 d 组	5	0.113 8 ± 0.048 8[a]
SAH 14 d 组	5	0.044 2 ± 0.011 8[a]

a: $P < 0.05$, 与正常对照组比较



A:正常对照组; B: SAH 后 3 d 组; C: SAH 后 7 d 组

图 2　免疫组化观察 S100B 蛋白的表达　(S-P × 400)

3　讨论

CVS 是指 SAH 后大脑底部大容量动脉管腔的迟发性缩窄,表现为血管腔变细,血流量降低。

3.1 SAH 模型建立

本实验采用改良后的经额颅底动脉环注血法:基本不会损伤脑组织,也减少了对颅底的损伤。接近于自发性 SAH。通过病理切片光镜下观察证实了该方法建造的 SAH 模型可靠性。保证了 CVS 的存在。

3.2 CVS 时血管的病理改变

Sako 等通过建立 SAH 模型证实,在脑血管发生痉挛时,在光镜下其形态学发生明显改变,包括管径变窄内皮细胞变性出现皱褶、破损,平滑肌细胞肥大、变形,外膜增厚、纤维化,伴有炎症细胞浸润。本实验结果显示 SAH 第 1 天组光镜下无明显变化,第 3 天出现明显的血管内皮细胞变性、皱褶,平滑肌细胞肥大,外膜出现粒细胞和单核细胞浸润;第 7 天内皮细胞皱褶最明显甚至出现破损,平滑肌细胞扭曲变形,细胞间隙增宽,外膜变厚,炎性细胞浸润最明显;第 14 天时动脉的改变较第 7 天时有所减轻。测量血管直径表明出血 1 d 管径变化不大,而出血后 3、4、7 及 14 d 管径狭窄明显,相对于正常组和对照组有显著差异。

3.3 S100B 蛋白与 CVS 关系

本实验免疫组化检测结果显示:S100B 蛋白在 SAH 大鼠基底动脉中表达明显增强。在不同出血时期,S100B 蛋白表达强弱不等:出血第 1 天稍增强,但和正常组无明显差异;以后表达明显增强,其中第 7 天最强,14 d 时有所减弱。与正常组相比,均有明显差异($P<0.01$);HE 染色观察到:脑血管痉挛在第 3 天出现,第 7 天达到高峰,14 d 时有所减弱;该实验充分证实 CVS 与 S100B 蛋白表达密切相关:血管痉挛越强,S100B 蛋白表达越明显。作为钙调蛋白和 PKC 活化因子,其表达增强可能是参与脑血管痉挛的机制之一。且有研究表明属于低分子量钙结合蛋白家族的 S100B 蛋白是脑内特异蛋白并与钙调蛋白及其他 EF 手形钙离子结合蛋白具有高度同源性[4]。

Berger 发现 S100B 可使细胞内 Ca^{2+} 升高。经证实 S100B 可以促进 PI(磷酯酰肌醇)水解,生成的 IP_3(三磷酸肌醇)及代谢产物作用于滑面内质网和肌浆网,使内质网上的钙通道开放,释放 Ca^{2+}。Ca^{2+} 与 S100B 特异结合,引起后者构象改变,暴露疏水区域与细胞膜结合,平滑肌细胞染色增强[5]。而细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,钙调蛋白(CaM)和 Ca^{2+} 结合后激活肌球蛋白轻链激酶(MLCK),激活的 MLCK 在 Thr18/Ser19 两位点使 MLC 双磷酸化,解除其对肌动蛋白 ATP 酶的抑制作用。从而引起 α-action 肌丝滑行,平滑肌收缩,脑血管痉挛。

另一方面 Donato[6] 指出,S100B 蛋白可通过阻碍激酶和激酶底物的结合抑制蛋白磷酸化。尽管 S100B 蛋白抑制蛋白磷酸化的过程尚未完全清楚,但一些研究已表明 S100B 蛋白在信号转导中的作用,特别是在细胞内 Ca^{2+} 浓度与 S100B 靶蛋白磷酸化状态之间有着重要作用。

S100B 蛋白参与调节细胞骨架的 3 种主要成分,与钙调素结合蛋白作用能增强肌动蛋白 ATP 活性,与原肌球蛋白相互作用调节肌动蛋白结构。Miyagi 等[7] 观察到脑血管痉挛常伴随 RhoA 及其激酶增加,RhoA 激酶可直接磷酸化 MLC 来抑制 MLCP,使其激活,而平滑肌对恒定的钙离子浓度的敏感性增加,产生 Ca^{2+} 敏感性,导致 MLC 磷酸化水平升高和平滑肌细胞收缩增强[8,9]。

目前对 S100B 的研究表明其与血管痉挛有关,但它在 CVS 中如何发挥作用,我们怎样利用这一发病机制去防治蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛还待进一步研究。

参考文献:

[1] Dietrich H H, Dacey R C Jr. Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm [J]. Neurosurgery, 2000, 46(3): 517 - 530.

[2] 季 鹰, 吴建中, 赵雅度, 等. 一种新的蛛网膜下腔出血(SAH)动物模型的建立[J]. 中华神经外科杂志, 1991, 7(1): 11 - 13, 77 - 78.

[3] 柯 勇, 吴 惺, 袁先厚, 等. 大鼠迟发性脑血管痉挛血管造影的时相变化[J]. 中国实验诊断学, 2004, 8(1): 18 - 21.

[4] Ridinger K, Schafer B W, Durussel I, *et al*. S100A13. Biochemical characterization and subcellular localization in different cell lines [J]. J Biol Chem, 2000, 275(12): 8686 - 8694.

[5] Lefranc F, Golzarian J, Chevalier C, *et al*. Expression of members of the calcium-binding S-100 protein family in a rat model of cerebral basilar artery vasospasm[J]. J Neurosurg, 2002, 97(2): 408 - 415.

[6] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF - hand type with intracellular and extracellular functional roles [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33(7): 637 - 668.

[7] Miyagi Y, Carpenter R C, Meguro T, *et al*. Upregulation of rho A and rho kinase messenger RNAs in the basilar artery of a rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurosurg, 2000, 93(3): 471 - 476.

[8] Batchelor T J, Sadaba J R, Ishola A, *et al*. Rho-kinase inhibitors prevent agonist - induced vasospasm in human internal mammary artery [J]. BrJ Pharmacol, 2001, 132(1): 302 - 308.

[9] 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]. Cric Res, 2003, 92(7): 809 - 816.

(编辑 王 红)