[12] Fu X, Fang L, Li H, *et al*. Adipose tissue extract enhances skin wound healing[J]. Wound Repair Regen, 2007, 15(4): 540 - 548.
[13] 王 涛,艾国平,邹仲敏,等. 微小RNA分子miR-21和miR-22对C2C12细胞成肌分化影响的研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(9):803 - 806
[14] Cai S, Fu X B, Sheng Z Y. Dedifferentiation: a new approach in stem cell research[J]. BioScience, 2007,57(8): 655 - 662.
[15] Fu X B, Fang L, Li X, *et al*. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury [J]. Wound Repair Regen, 2006,14(3): 325 - 335.
[16] Fu X B, Qu Z, Sheng Z. Potentiality of mesenchymal stem cells in regeneration of sweat glands[J]. J Surg Res, 2006, 136(2): 204 - 208.
[17] 李福兵,赵 玲,鲁秀敏,等. 成熟成骨细胞中敲除基因*fgfr*1小鼠的制备[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(4): 280 - 283.
[18] Li H, Fu X, Ouyang Y, *et al*. Adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages[J]. Cell Tissue Res, 2006, 32(6): 725 - 736.
[19] Fu X B, Sun X, Li X, *et al*. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells *in vivo*[J]. Lancet, 2001, 358(9287): 1067 - 1068.
[20] Li H, Fu X B, Zhang L, *et al*. *In vivo* dedifferentiation of human epidermal cells[J]. Cell Biol Int, 2007, 31(11): 1436 - 1441.

(编辑 吴培红)

文章编号:1000-5404(2008)21-1971-01

个案与短篇

抑制基质金属蛋白酶-9对尿激酶溶栓出血性转化的干预效果

蒋国会[1],李 鱼[1], 李光勤[2] ([1]重庆市涪陵中心医院神经内科,重庆 408000;[2]重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

我国溶栓治疗主要使用尿激酶,关于尿激酶溶栓已被证实其主要并发症同样是溶栓后颅内出血,但尿激酶溶栓后颅内出血性转化与基质金属蛋白酶9(MMP-9)的关系及如何防治方面尚无定论[1]。本实验主要观察不同时间尿激酶溶栓对MMP-9表达的影响及溶栓后颅内出血情况,及MMPs抑制剂联合溶栓治疗对MMP-9的抑制效果和颅内出血性转化的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及给药方法

采用健康成年雄性SD大鼠132只,体质量230 ~ 280g,由重庆医科大学实验动物中心提供。将实验动物分为11组:假手术组、缺血组、不同时间尿激酶溶栓组(简称6 h UK组、9 h UK组、12 h UK组)、强力霉素联合溶栓组(简称6 h UK + Doxy组、9 h UK + Doxy组、12 h UK + Doxy组)和三七皂甙联合溶栓组(简称6 h UK + Sanqi组、9 h UK + Sanqi组、12 h UK + Sanqi组),每组12只,均在24 h后处死,分别测定MMP-9表达和脑出血量并计算各组大鼠的脑出血发生率。

缺血组及各治疗组均采用改良大鼠自体血栓大脑中动脉局灶性脑缺血(MCAO)模型[1],治疗的各组在相应时间点给予尿激酶40 000 U/kg(丽珠集团丽珠制药厂),用1 ml生理盐水稀释后经尾静脉缓慢注射;联合治疗各组强力霉素和三七皂甙均在缺血后2 h稀释后经尾静脉注射,强力霉素30 mg/kg(Sigma公司),三七皂甙240 mg/kg(昆明制药集团股份有限公司,商品名:血塞通)。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 MMP-9免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡后,用SABC法进行免疫组织化学染色,苏木精复染,中性树胶封片。用Image Pro Plus 4.5图像分析系统进行分析,MMP-9蛋白表达的强弱通过计算阳性细胞的平均光密度值来表示。

1.2.2 脑出血量的测定 采用分光光度计法[2],大鼠麻醉后生理盐水心脏灌流,断头取脑,取病灶侧半球置于匀浆器中,加入组织裂解液充分匀浆,将匀浆液移取到2 ml EP管内,4 ℃ 12 000 r/min离心30 min,取上清液0.6 ml加入到盛有2.4 ml Drabkin's试剂试管中,充分静置15 min,于540 nm处比色,根据脑出血量标准曲线得出脑出血量。

称取4.73 mg伊文思蓝置于一带刻度的容量瓶中,加入生理盐水稀释至25 ml,静置后取上清液0.3 ml加入5.7 ml甲酰胺混匀做为第1管,从第1管取出3 ml加入3 ml甲酰胺作为第2管,照此类推,共做5管,其浓度依次为:0.946、0.473、0.237、0.118、0.059 μg/L。将试管置于试管架上,放入37 ℃恒温水浴箱中水浴48 h,然后分别测得吸光度值,并制出伊文思蓝标准曲线。

1.2.3 脑出血发生率 观察每组12只大鼠的脑出血情况,采用确切概率法计算出各组大鼠的出血发生率。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件行确切概率法和t检验。

2 结果

2.1 MMP-9免疫组织化学结果

假手术组未见MMP-9免疫阳性细胞表达,脑缺血对照组主要在缺血区皮质神经元及血管内皮细胞有MMP-9表达,海马及纹状体也见少许MMP-9表达,与假手术组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。应用尿激酶溶栓后MMP-9表达进一步增加,和缺血对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且随溶栓时间延迟,MMP-9表达增高更显著。在MCAO后2 h分别用强力霉素和三七皂甙干预组与相应时间点单用尿激酶溶栓组

(下转1979页)

基金项目:重庆市卫生局课题(04-2-144)
Supported by the Bureau Public Health of Chongqing (04-2-144)
作者简介:蒋国会,女,重庆市人,硕士,医师,主要从事脑血管病方面的研究。E-mail: jiangguohuisn@163.com
通信作者:李光勤, E-mail: liguangqin@tom.com
收稿日期:2008-06-03;修回日期:2008-07-17

调节,但其具体调节机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Simper D, Strobel W M, Linder L, *et al*. Indirect evidence for stimulation of nitric oxide release by tumor necrosis factor-alpha in human veins in vivo[J]. Cardiovas Res, 1995, 30(4): 960 – 964.

[2] Lang R J, Harvey J R, McPhee G J, *et al*. Nitric oxide and thiol reagent modulation of Ca^{2+}-activated K^+ (BK_{Ca}) channels in myocytes of the guinea-pig taenia caeci[J]. J Physiol, 2000, 525(Pt 2): 363 – 376.

[3] Li T, Liu L, Xu J, *et al*. Changes of Rho kinase activity after hemorrhagic shock and its role in shock-induced biphasic response of vascular reactivity and calcium sensitivity[J]. Shock, 2006, 26(5): 504 – 509.

[4] 李　涛,刘良明,杨光明,等. 失血性休克大鼠血管平滑肌钙敏感性变化及其在休克双相血管反应性变化中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(11): 647 – 650.

[5] Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage[J]. Cell, 2004, 116(2): 167 – 179.

[6] Wojciak-Stothard B, Tsang L Y, Haworth S G. Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Phoysiol, 2005, 288(4): L749 – L760.

[7] Wojciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T, *et al*. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 7): 1343 – 1355.

[8] Sander E E, ten-Klooster J P, van-Delft S, *et al*. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPase determines cellular morphology and migratory behavior[J]. J Cell Biol, 1999, 147(5): 1009 – 1022.

(编辑　吴培红)

(上接 1971 页)

比较,MMP-9 平均光密度值均明显降低($P<0.05$);强力霉素和三七皂甙两组间比较其平均光密度值差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

表 1　MMP-9 表达、脑出血量和出血发生率情况

组别	MMP-9 平均光密度 (AOD)	脑出血量 (μl)	脑出血发生率 (%)
假手术组	0.086 ± 0.008	0.00 ± 0.27	0
脑缺血对照组	0.158 ± 0.010[a]	0.00 ± 1.48	0
6 h UK 溶栓组	0.227 ± 0.022[b]	3.16 ± 8.84	16.67
9 h UK 溶栓组	0.293 ± 0.030[bc]	4.92 ± 11.43[b]	33.33[b]
12 h UK 溶栓组	0.326 ± 0.034[bc]	7.56 ± 11.83[bc]	41.67[bc]
6 h UK + Doxy 组	0.147 ± 0.020[d]	2.79 ± 7.94	8.33
9 h UK + Doxy 组	0.185 ± 0.033[d]	4.06 ± 11.27	16.67
12 h UK + Doxy 组	0.233 ± 0.031[d]	5.30 ± 8.73	33.33
6 h UK + Sanqi 组	0.153 ± 0.017[d]	2.81 ± 4.91	8.33
9 h UK + Sanqi 组	0.224 ± 0.019[d]	4.23 ± 12.09	25.00
12 h UK + Sanqi 组	0.251 ± 0.030[d]	6.03 ± 11.07	33.33

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与脑缺血对照组比较;c:$P<0.05$,与同组 6 h 比较;d:$P<0.05$,与同时段 UK 组比较

2.2　脑出血量和脑出血发生率

由表 1 可以看出假手术组和缺血对照组几乎没有脑出血发生,而尿激酶溶栓后部分大鼠出现颅内出血,病理检查脑出血为红细胞漏出或血肿形成,6 h UK 组脑出血量和出血发生率均高于缺血对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$),9 h 和 12 h UK 溶栓与缺血对照组比较,脑出血量和出血发生率明显增加($P<0.05$),且 12 h UK 组和 6 h UK 组相比也有统计学差异,说明溶栓时间越晚,脑出血量和出血发生率增加更明显。同时段尿激酶联合 MMPs 抑制剂治疗组与单用 UK 组比较,出血量和出血发生率有较少趋势,但无统计学差异($P>0.05$)。强力霉素和三七皂甙各组间无明显差异($P>0.05$)。

3　讨论

静脉溶栓治疗仍是目前急性缺血性脑卒中最有效的药物治疗方法,时间窗内 rt-PA 与尿激酶溶栓治疗的疗效和安全性均得到大规模实验反复证实,但目前面临的主要问题仍是治疗时间窗和溶栓并发症两方面。尿激酶是溶栓的主要药物,本实验主要研究时间窗内及超过时间窗尿激酶溶栓对 MMP-9 及溶栓后出血性转化的影响,以及给予 MMPs 抑制剂强力霉素和三七皂甙抑制 MMP-9 对尿激酶溶栓后出血性转化的干预效果,进一步探讨超过治疗时间窗溶栓的主要并发症及防治措施,寻求延长溶栓时间窗的方法。

大量动物实验和临床研究都证实 rt-PA 溶栓治疗组颅内出血性转化发生率明显高于对照组,并且和溶栓后 MMP-9 蛋白表达水平有相关性。基础 MMP-9 水平与迟发性颅内出血性转化有关,基线水平的 MMP-9 升高是静脉内使用 t-PA 溶栓治疗后脑出血的独立预测因子[3]。

我们在实验中发现尿激酶溶栓后 MMP-9 表达水平显增加,且随溶栓时间延迟 MMP-9 增高越显著,而尿激酶溶栓后脑出血量和出血发生率增加,尤以 9、12 h 溶栓后更明显。说明尿激酶溶栓后颅内出血性转化与溶栓后 MMP-9 高表达相关。若能有效抑制溶栓后 MMP-9 高表达,则有可能减轻溶栓后出血性转化,改善溶栓并发症。强力霉素属广谱 MMPs 抑制剂,而三七皂甙已被证实在脑缺血时具有抑制 MMP-9 的作用。本实验在选用抑制 MMP-9 的药物联合尿激酶溶栓治疗,观察抑制 MMP-9 对尿激酶溶栓后出血性转化的干预效果,发现强力霉素和三七皂甙联合尿激酶溶栓治疗均能有效抑制溶栓后 MMP-9 表达,并且降低溶栓后脑出血量和出血发生率,说明抑制 MMPs 的药物联合尿激酶溶栓治疗可能是减轻溶栓并发症,延长溶栓治疗时间窗的有效方法。

关键词: 脑缺血;尿激酶;溶栓;基质金属蛋白酶-9;出血性转化

中图法分类号: R743　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 张新江,常丽英,张苏明,等. 大鼠自体血栓大脑中动脉闭塞模型的改良[J]. 卒中与神经疾病, 2003, 10(1): 12 – 15.

[2] Choudhri T F, Hoh B L, Solomon R A, *et al*. Use of a spectrophotometric hemoglobin assay to objectively quantify intracerebral hemorrhage in mice[J]. Stroke, 1997, 28(11): 2296 – 2302.

[3] Castellanos M, Leila R, Serena J, *et al*. Plasma cellular – fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke [J]. Stroke, 2004, 35(7): 1671 – 1676.

(编辑　王小寒)