基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1000-04

rt-PA 与尿激酶溶栓后对 MMP-9 及脑出血性转化的对比研究

李 杰[1],李光勤[2],蒋国会[3]

(1. 新乡医学院第一附属医院神经内一科,新乡 453100;2. 重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016;3. 重庆市涪陵中心医院神经内科,重庆 408000)

【摘 要】目的:比较重组组织型纤溶酶原激活剂(Recombinant human tissue-type plasiminogen,rt-PA)与尿激酶溶栓后对基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9,MMP-9)表达和脑出血性转化的影响。方法:采用大鼠自体血栓塞大脑中动脉模型,缺血 6 h 后静脉应用 rt-PA 及尿激酶,24 h 后处死,脑组织中 MMP-9 表达采用免疫组织化学法,脑出血量的测定采用分光光度计法。结果:脑缺血后 MMP-9 表达增加,rt-PA 与尿激酶溶栓后 MMP-9 表达均进一步增加。脑缺血对照组、rt-PA 溶栓组及 UK 溶栓组平均光密度值分别为 0.158 ± 0.010、0.225 ± 0.0341、0.228 ± 0.022,差异有统计学意义($P<0.01$)。溶栓后两组脑出血发生率及脑出血量均较缺血对照组增加,但两组之间无明显差别。结论:rt-PA 与尿激酶溶栓后均可上调 MMP-9 表达并与出血性转化密切相关。

【关键词】重组组织型纤溶酶原激活剂; 尿激酶; 基质金属蛋白酶-9; 溶栓治疗; 出血性转化

【中国图书分类法分类号】R743.34 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-01

Comparative study on the effect of rt-PA and urokinase on the expression of MMP-9 and hemorrhagic transformation in a rat embolic stroke model

LI Jie, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the influence of rt-PA and urokinase on the expression of matrix metalloproteinase (MMP-9) and hemorrhagic transformation after thrombolysis therapy in rats. *Methods*: A focal cerebral ischemia model of rat was established through embolization of left middle cerebral artery with autologous blood clots. rt-PA and urokinase were intravenously administrated 6 hours after ischemia at a dose of 10 mg/kg and 4 000 μ/kg. At the 24th hour after ischemia, all rats were killed. The expression of MMP-9 was detected with immunohistochemical staining and cerebral hemorrhage was quantified by spectrophotometer assay. *Results*: The expression of MMP-9 was increased after ischemia, and MMP-9 was significantly further upregulated after rt-PA and urokinase had been intravenously administrated. The average optical density (AOD) of MMP-9 in the sham operated group was 0.086 ± 0.008, and increased to 0.158 ± 0.010 after cerebral ischemia for 24 hours and then further increased to 0.225 ± 0.034 and 0.228 ± 0.022 in the rt-PA and urokinase thrombolytic therapy groups. Transformation and quantified intracerebral hemorrhage were significantly higher in the therapy groups as compared with the ischemic group. However, there was no difference between rt-PA group and urokinase group. *Conclusion*: rt-PA and urokinase treatment both increase the levels of MMP-9 after ischemia. MMP-9 might be involved in the hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy with rt-PA and urokinase.

【Key words】rt-PA; Urokinase; MMP-9; Thrombolytic therapy; Hemorrhagic transformation

溶栓后出血性转化是溶栓治疗的主要并发症之一,其发生与血脑屏障的破坏有关,基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinas-9,MMPs)是一组锌离子依赖性蛋白内肽酶,能降解脑血管基底膜的主要成份,有报道 MMP-9 与溶栓后出血性转化有关,目前已确定的 MMPs 达 26 种以上。但尿激酶溶栓后的出血性转化是否也与 MMP-9 的改变有关尚无定论,我们采用大鼠自体血栓塞大脑中动脉模型比较重组组织型纤溶酶原激活剂(Recombinant human

作者介绍:李 杰(1979-),男,硕士,
研究方向:脑血管病。

通讯作者:李光勤,男,教授,E-mail:liguangqin@tom.com。

基金项目:重庆市科委自然科学基金计划资助项目(CSPC 2006BB5281);重庆市卫生局项目(编号 04-2-144)。

tissue-type plaiminogen, rt-PA)与尿激酶溶栓后对 MMP-9 的表达和脑出血量的影响并观察 MMP-9 与脑出血性转化之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要药物和试剂

有 rt-PA(德国 Boehringer Ingelhein 公司),尿激酶(丽珠集团丽珠制药厂),Drabkin's 试剂(Sigma 公司),羊抗 MMP-9 多克隆抗体(Santa-Cruz 公司),SP-9003 试剂盒(北京中山生物技术有限公司),凝血酶(黑龙江迪龙制药有限公司),红四氮唑(TTC)(上海生物工程公司)。

1.2 局灶性脑缺血模型的制作

采用成年雄性 SD 大鼠,体重 230 ~ 280 g,由本校实验动物中心提供。用 3.5%水合氯醛 10 ml/kg 腹腔麻醉大鼠后,取左侧颈部直切口,分离左颈总动脉(CCA),颈内动脉(ICA),颈外动脉(ECA),电凝 ECA 分支甲状腺上动脉,结扎 ICA 重要分支翼腭动脉。离断 ECA(假手术组到此步为止),从 ECA 插入 24G 静脉留置针,将针芯拔出,取血 0.5 ~ 1.0 ml,4 000 r/min 离心 2 min,按 5:1 吸取血浆及少量红细胞共 100 μl,加入 50 万 U/L 凝血酶 1 μl 及 1 mol/L 的氯化钙溶液 20 μl,制成长度约为 1.5 mm、直径为 0.35 mm 的贫血小板血栓,用麻醉导管吸取 8 ~ 10 个,接到静脉留置针末端,将栓子注入 ICA 内。动物苏醒后按 Bederson 评分标准进行神经功能评分,有体征者入选。

1.3 实验动物分组及给药方法

将入选实验动物共 96 只随机分为假手术组、脑缺血对照组、rt-PA 溶栓组及 UK 溶栓组,病理学检查、免疫组织化学、脑出血量及脑出血发生率每组各 6 只,脑出血发生率观察了上述 4 个指标中 24 只(rt-PA 溶栓组)及 12 只(UK 溶栓组),动物心脏灌流取脑后有无出血发生(血肿形成或红细胞漏出),rt-PA 溶栓组仅观察了 12 只,溶栓治疗组于造模后 6 h 分别经尾静脉注射 rt-PA10 mg/kg 或 UK 40 000 U/kg。

1.4 病理检查

各组大鼠在脑缺血 24 h 后腹腔麻醉经 4%多聚甲醛 0.1 mol/L PBS(pH=7.4)心脏灌流,断头取脑,再用 4%多聚甲醛固定 24 h 后石蜡包埋、切片、HE 染色。

1.5 MMP-9 免疫组织化学染色

采用分光光度计法,石蜡切片脱蜡后,过氧化氢消除内源性过氧化物,抗原修复,山羊血清封闭。滴加适当比例稀释的一抗(1:100),37℃孵育 3 h,相继滴加生物素标记的二抗和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素各孵育 30 min,DAB 显色,以上各步均经 PBS 冲洗 3、4 次,苏木素复染,中性树胶封片。

1.6 脑出血量的测定

采用分光光度计法[1],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。

1.7 图像分析处理

每组观察 6 只动物,每只动物随机观察 1 张切片,每张切片随机选取上、中、下、左、右 5 个视野,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[2]。

1.8 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件包对数据进行统计处理,脑出血量用 $M \pm Q$ 表示,两组间比较采用秩和检验。其余计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验,$P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 组织病理学结果

假手术组大脑皮层各层细胞神经元结构完整,未见有出血灶。缺血组可见病灶区神经元胞体肿胀、核固缩、破碎、裂解,细胞周围间隙扩大、间质水肿明显,偶见有点状出血灶。溶栓组仍可见与缺血组相似的病理改变,但病变范围明显减小,可发现有点状出血灶及血肿。

2.2 MMP-9 免疫组织化学结果

假手术组未见有 MMP-9 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 rt-PA 及尿激酶溶栓后 MMP-9 表达进一步增加(见图 1~4),较脑缺血对照组差异有统计学意义($P<0.01$)。在 rt-PA 及尿激酶溶栓组病灶半球的对侧皮质及纹状体也见少许阳性细胞。两溶栓组相比其平均光密度值差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.3 rt-PA 与尿激酶溶栓后对脑出血量、脑出血发生率的影响结果

由表 2 可以看出 rt-PA 与尿激酶溶栓治疗组脑出血量较脑缺血对照组增加,但差异无统计学意义($P>0.05$),两治疗组脑出血量相比无明显差异。病理检查脑出血为红细胞漏出或血肿形成。脑出血发生率脑缺血对照组 24 只动物中有 1 只发生出血(红细胞漏出),尿激酶溶栓组 24 只动物有 6 只发生脑出血(3 只血肿形成,3 只红细胞漏出),rt-PA 溶栓组检测的12 只中有 2 只发生了脑出血(1 只血肿形成,1 只红细胞漏出)。rt-PA 与尿激酶溶栓治疗组脑出血的发生率均高于缺血对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 rt-PA 与尿激酶溶栓后对 MMP-9 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	例数(n)	MMP-9 平均光密度值(AOD)
假手术组	6	0.086 ± 0.008
脑缺血对照组	6	0.158 ± 0.010*
rt-PA 溶栓组	6	0.225 ± 0.034#*
尿激酶溶栓组	6	0.228 ± 0.022#*

注:*与假手术组相比 $P<0.01$;#与缺血组相比 $P<0.01$

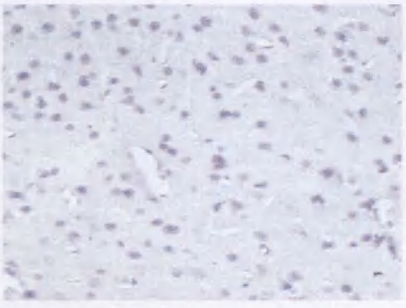


图 1 假手术组未见有 MMP-9 表达(×400)

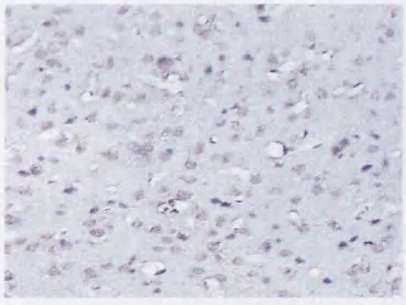


图 2 脑缺血 24h 组 MMP-9 表达增加(×400)

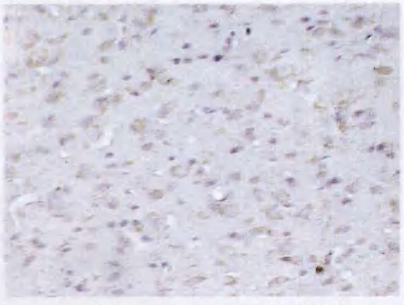


图 3 rt-PA 溶栓组 MMP-9 表达增强(×400)

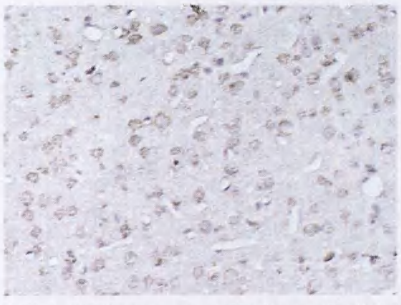


图 4 尿激酶溶栓组 MMP-9 表达进一步增强(×400)

表 2 rt-PA 与尿激酶溶栓后对脑出血量($M\pm Q$)及脑出血发生率的影响结果(rt-PA 溶栓组 24 只,UK 溶栓组 12 只)

组别	脑出血量(μl)	脑出血发生率(%)
假手术组	0.00 ± 0.27	0
脑缺血组	0.00 ± 1.48	4.17
rt-PA 溶栓组	1.60 ± 9.05	16.67
尿激酶溶栓组	3.16 ± 8.84	25

3 讨 论

溶栓治疗会因为血脑屏障的破坏而增加脑出血的危险性,最近研究表明与基质金属蛋白酶有关,MMPs 是一组能降解细胞外基质的锌离子依赖性蛋白酶,是分解细胞外基质的蛋白酶类中最重要的一类。MMP-9 是基质金属蛋白酶的一种,能够降解脑血管基底膜的主要成分,脑缺血后 MMP-9 通过蛋白水解作用破坏毛细血管间的紧密连接和基底膜,引起血脑屏障的破坏,使血液成分容易外渗,继而引发血管源性脑水肿及脑出血性转化[3]。

在正常脑组织中 MMP-9 无表达或少量表达[4],缺血再灌注后脑组织梗死灶周围血管内皮及胶质细胞表达,缺血再灌注后血脑屏障的通透性增加与基质金属蛋白酶尤其是 MMP-9 表达增加有关[5]。本实验发现在脑缺血后 MMP-9 表达增加,主要在缺血区周围神经元及血管内皮细胞,海马和纹状体区的神经元也有表达,而当使用 rt-PA 与尿激酶溶栓治疗后在缺血侧半球的对侧也发现有 MMP-9 的表达,可能与使用 rt-PA 与尿激酶溶栓治疗有关。

rt-PA 溶栓后能够破坏血脑屏障,从而增加出血性转化的发生率。最近已有研究证明血清 MMPs 特别是 MMP-9 可能和急性缺血性卒中使用 rt-PA

造成的出血并发症有关。基线水平的 MMP-9 升高是静脉内使用 rt-PA 治疗造成脑出血的独立预测因素[6]。在大鼠的溶栓实验中发现联合应用 MMP-9 抑制剂 BB-94 后可显著降低 rt-PA 溶栓所致的脑出血发生率[7]。体外研究发现 rt-PA 可诱导血管内皮细胞 MMP-9 的表达[8],Kelly 等[9]报道使用 t-PA 溶栓后 MMP-9 活性进一步增加,而对照组未见有MMP-9 活性的改变。本实验结果表明使用 rt-PA 溶栓后 MMP-9 的表达进一步增加,与缺血组相比有显著性差异,同时出血性转化的发生率及出血量均有进一步增加的趋势,与国外报道一致[10]。说明 rt-PA 与尿激酶溶栓后 MMP-9 表达增高与出血性转化有一定的关系。主要原因可能是 rt-PA 与尿激酶同属纤溶酶原激活剂,而纤维蛋白在 MMPs 的激活过程中起了重要作用。从而使 MMP-9 的表达增加,对脑血管基底膜的降解作用进一步增强而引起出血性转化。本实验结果显示 rt-PA 与尿激酶溶栓后脑出血量及脑出血发生率无明显差别,Chelsea 等[11]报道临床使用 t-PA 溶栓治疗者出血性转化的发生率为 50%,而尿激酶溶后脑出血的发生率为 32%。两者差别无统计学意义。国外有报道,发病 3 h 内急性卒中患者常规剂量 rt-PA 静脉溶栓治疗,给药结束时未好转者再经动脉尿激酶溶栓,使动脉再通率和临床转归好转率均增高,而且安全可行[12]。说明尿激酶仍然是比较安全的溶栓药物。

2005 年国外学者发现尿激酶可增加动脉 MMP-2 及 MMP-9 的含量与活性[13]。尿激酶是我国的主要溶栓药物,未见有尿激酶与脑 MMP-9 关系的报道。本实验首次发现使用尿激酶溶栓后脑出血量及出血转化率与 MMP-9 增加有密切关系,在减少缺血侧脑组织损伤方面与 rt-PA 无显著差异。

本实验结果表明,使用 rt-PA 与尿激酶溶栓后发生脑出血性转化与 MMP-9 表达增加相关,而 rt-PA 与尿激酶对溶栓后出血性转化的发生率及脑出血量的影响无明显差异。在应用溶栓药物时可以通过联合使用抑制 MMP-9 活性的药物来降低出血性转化并发症的发生。

参 考 文 献

[1] Choudri T F, Hoh B L, Solomon R A, et al. Use of a. spectrophotometric assay to objectively quantify intracerebral hemorrhage in mice[J]. Stroke, 1997, 28: 2296 - 2302.

[2] 刘元生,陈运贞,王悦喜.心肌梗塞后心肌重塑与 PDGF-B 蛋白表达的相关性[J].重庆医科大学学报,2001,26(4):382-383.

[3] Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19(9): 1020-1028.

[4] Wagner S, Nagel S, Kluge B, et al. Topographically graded postischemic presence of metalloproteinases is inhibited by hypothermia[J]. Brain Res, 2003, 984(1-2): 63-75.

[5] Maier C M, Hsieh L, Yu F, et al. Matrix metalloproteinase-9 and myeloperoxidase expression: quantitative analysis by antigen immunohistochemistry in a model of transient focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2004, 35(5): 1169-1174.

[6] Montaner J, Molina C A, Monasterio J, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human strike[J]. Circulation, 2003, 107: 598-603.

[7] Sumii T, Lo E H. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorhagic transformation after embolic focal ischemia in rats[J]. Stroke, 2002, 33: 831-836.

[8] Wang X, Lee S R, Arai K, et al, Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator[J]. Nat Med, 2003, 9: 1313-1317.

[9] Kelly M A, Shuaib A, Todd K G. Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis[J]. Exp Neurol, 2006, 200(1): 38-49.

[10] Asahi M, Asahi K, Wang X, et al. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20: 452-457.

[11] Kidwell C S, Saver J L, Carneado J, et al. Predictors of hemorrhagic transformation in patients receiving intra-arterial thrombolysis[J]. Stroke, 2002, 33: 717-724.

[12] Lee K Y, Kim D I, Kim S H, et al. Sequential combination of intravenous recombinant tissue plasminogen activator and intra-arterial urokinase in acute ischemic stroke[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2004, 25: 1470-1475.

[13] Solomatina M A, Plekhanova O S, Man'shikova M Y, et al. Urokinase increases the content and activity of matrix metalloproteinase-2 and 9 during in vivo constrictive arterial remodeling[J]. Bull Exp Bio Med, 2005, 139: 283-286.

(责任编辑:冉明会)