维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0700-04

铁离子致脑出血后血肿周围组织损伤研究

刘圣山,李长清

(重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究脑出血后血红蛋白的代谢产物铁离子在血肿周围组织损伤中的作用及去铁胺的干预影响。方法:将 SD 大鼠随机分为假手术组、脑出血组和去铁胺干预组,以自体血大鼠尾状核注射为模型,观察各组大鼠建模术后不同时间点神经功能评分、脑组织含水量和血脑屏障通透性变化、血清 S100B 蛋白和神经元特异性烯醇化酶(Neuron-specific-enolas,NSE)水平及去铁胺干预的影响。结果:与对照组比较,脑出血模型大鼠在建模术后 1~7d 存在明显神经功能障碍,血肿周围脑组织水份含量明显增加,血脑屏障通透性明显增高,血清 S100B 蛋白和 NSE 水平明显升高。去铁胺干预组模型大鼠各观察指标与脑出血模型大鼠呈现相同变化趋势,但神经功能评分明显低于脑出血组,血肿周围脑组织水份含量明显低于脑出血组,血脑屏障通透性明显低于脑出血组,血清 S100B 蛋白和 NSE 水平明显低于脑出血组。结论:脑出血后铁离子异常积聚参与了脑出血后血肿周围组织的损伤,去铁胺对这种损伤有保护作用。

【关键词】铁;脑出血;去铁胺

【中国图书分类法分类号】R743 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-23

Study on injury in brain parenchyma surrounding intracebral hemorrhage induced by iron ions

LIU Sheng-shan, et al

(*Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of iron ions released by metabolism products of haemoglobin after intracerebral hemorrhage (ICH) in the injury of surrounding brain parenchyma and the influence of intervention by deferoxamine (DFO). *Methods*: Sprague-Dawley rats were randomly divided into the sham operation groups、intracebral hemorrhage (ICH) groups and deferoxamine groups, and received infusion of autologous blood. Evaluation on neurological function, brain water content, the permability of blood brain barrier, S100B proteins, neuron-specific-enolas (NSE) and the influence of intervention by deferoxamine were detected at different time points after operation. *Results*: Compared with the sham operation groups, the rats of ICH groups had significantly neurological disorder and the increase of brain water content surrounding brain parenchyma, the permeability of blood brain barrier, S100B protein and NSE of blood serum. The rats of DFO groups had the same trend with the rats of ICH groups in all kinds of observed items but neurological function scores test, brain water content surrounding brain parenchyma, the permeability blood brain barrier, S100B protein and NSE of blood serum were lower than those of ICH groups. *Conclusion*: The abnormal accumulation of iron ions participates the injury of brain tissue surrounding brain parenchyma after ICH and deferoxamine has the protective role for the injury.

【Key words】 Iron; Intracerebral hemorrhage; Deferoxamine

脑出血约占全部卒中的 20%~30%,是威胁中老年人健康的常见疾病之一。脑出血后脑损伤与多种因素有关,血肿溶解后血红蛋白降解产物铁离子可能在其中起着重要作用。我们以自体血大鼠尾状核注射为模型,探讨铁离子在脑出血后脑损伤中的作用及铁螯合剂(去铁胺)在脑出血后脑保护中的潜在临床应用价值。

作者介绍:刘圣山(1980-),男,硕士,研究方向:脑出血。

通讯作者:李长清,男,主任医师,教授,E-mail:licq9217@163.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

本实验使用的实验动物为成年健康 SD 雄性大鼠,体重约为 200~300g,由重庆医科大学实验动物中心提供,符合国

维普资讯 http://www.cqvip.com

家二级实验动物标准。NSE 和 S100B ELISA 检测试剂盒购自美国 Rapidbio 公司,去铁胺由北京诺华制药公司提供。

1.2 动物模型制备与分组

将符合要求的 SD 大鼠随机分为假手术组(SH 组)、脑出血组(ICH 组)、去铁胺组(DFO 组)。其中 SH 组 25 只;ICH 组 44 只,按造模术后 1d、3d、5d、7d 不同时间点分为 4 组,每组 11 只;DFO 组 33 只,按造模术后 3d、5d、7d 不同时间点分为 3 组,每组 11 只。ICH 组和 DFO 组每个时间点 5 只大鼠用于脑组织含水量测定,5 只用于血脑屏障通透性测定,在处死大鼠前各选取其中 4 只经心脏抽取静脉血用于 NSE 和 S100B 检测。SH 组 20 只用于脑组织含水量、NSE 和 S100B 检测,另 5 只用于测血脑屏障通透性。

ICH 组大鼠和 DFO 大鼠以相同方法建立自体血尾状核注射的脑出血大鼠模型,建模方法为大鼠经质量分数为 3.5%的水合氯醛(1ml/100g)腹腔注射麻醉后,按包新民等的方法将大鼠俯卧位固定于定向仪上,剪掉头部毛发,常规消毒,剪开头颅皮肤,消毒,沿头皮正中作 10mm 长矢状切口,用 30%双氧水腐蚀颅骨上腱膜及颅骨外膜,暴露颅骨标志。在冠状缝右侧旁开 3.0mm,前囟前 0.5mm 处作为进针点。此点垂直向下 5.5mm 处即为大鼠右侧尾状核处。用 5 号针钻孔在进针点钻一直径约为 1.5mm 的圆孔,深达硬膜表面而不穿破硬膜。调整立体定位仪,使微量注射器的针头穿破硬膜并垂直进针约 5.5mm,注射采自尾静脉的自体血 50μl,速度均为 10μl/min,注射完毕即退针,用无菌骨蜡封闭圆孔,消毒、缝合头皮,动物置于单独的笼中,保持 25℃室温。SH 组对照组大鼠按上述操作步骤,用微量注射器穿刺进针,但不注射,余同。实验中出现动物死亡或因其它原因不能完成实验导致各实验动物数不足预定数额者通过随机抽样原则补齐动物并重新造模。

DFO 组大鼠给与去铁胺,方法为建模术后 24h 腹腔注射,100mg/kg,2 次 /d,3d 组、5d 组和 7d 组分别注射 3d、5d 和 7d。

1.3 观察指标及其方法

1.3.1 鼠神经功能评分 各组大鼠于造模成功后 1d、3d、5d 和 7d 采用 Rosenberg 评分:(1)自发的同侧转圈:0 分(不转圈)~4 分(持续转圈);(2)对侧后肢在被动侧移位 2~3cm 后复位情况:0 分(立即复位)~4 分(不复位);(3)走过长 70cm 宽 2.4cm 木条的能力:0 分(容易走过)~4 分(不能走过);(4)双侧前肢抓握直径约 2mm 铁丝的能力:0 分(能紧紧抓握)~4 分(不能抓握)。

1.3.2 脑组织含水量测定 用干湿法测脑组织含水量。模型建立成功后不同时期迅速取脑组织,清除表面脑膜及血块,放在带滤纸的培养皿中吸干脑表面的水份,纵切分成左右两半球,分别放在 2 个已称重的箔纸上,称湿重(Wet tissue weight),然后迅速放入烤箱内,100℃烤 24h,取出称干重(Dry tissue weight)。取脑组织到称重的整个过程在 5min 内完成。按以下公式计算脑水含量:脑水含量 =(湿质量—干质量)/湿质量 × 100%。

1.3.3 血脑屏障通透性测定 经股静脉注射 2%伊纹思蓝,2h 后生理盐水心脏灌流,断头取出血侧半球称重后置于 4ml 甲酰胺中,37℃水浴 48h,3 000r/min 离心,取上清液于 632 nm 处比色,从伊纹思蓝标准曲线上查得伊纹思蓝含量。

1.3.4 NSE 和 S100B 检测 分别在各时间点采静脉血,用酶联免疫分析法测定血清 NSE 和 S100B 浓度。具体做法是:用抗体包被微孔板,制成固相抗体,用辣根过氧化物酶标记抗体制成酶标抗体,特异形成"抗体 - 抗原 - 酶标抗体"复合物,显色后用酶标仪在 450mm 波长下测定吸光度,计算样品浓度。

1.4 统计分析

所有数据以均数 ± 标准差表示,用 SPSS10.0 统计软件做单因素方差分析(one-wayANOVA),并对样本均数作两两比较(SNK 方法)。

2 结 果

2.1 大鼠神经功能评分

与假手术组相比,脑出血组大鼠神经功能评分造模术后 1d 明显升高($P<0.01$),以后逐渐下降。去铁胺组造模术后各时间点神经功能评分与脑出血组呈现相同趋势,但升高程度明显低于脑出血组(见表 1),提示去铁胺去除铁离子可减轻神经功能障碍。

2.2 脑组织水含量变化

脑出血组大鼠造模术后血肿侧脑组织含水量较对侧明显升高,术后 3d 最明显($P<0.01$),以后逐

表 1 各组大鼠神经功能评分比较

	例数	SH 组	ICH 组	DFO 组
1d	10	0.90 ± 0.56	13.50 ± 0.97*	11.90 ± 1.52*#
3d	10	0.90 ± 0.56	12.90 ± 1.39*	11.40 ± 1.55*#
5d	10	0.90 ± 0.56	12.40 ± 0.84*	11.10 ± 1.44*#
7d	10	0.90 ± 0.56	11.90 ± 1.19*	10.50 ± 1.26*#

注:与假手术组比较,*$P<0.01$;与脑出血组比较,#$P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

渐下降。去铁胺组造模术后各时间点脑组织含水量变化与脑出血组呈现相同趋势,但升高程度明显低于脑出血组($P<0.05$)(见表 2),提示铁离子参与了脑出血后脑水肿形成,去铁胺去除铁离子可减轻脑水肿。

2.3 血脑屏障通透性变化

与假手术组相比,脑出血组大鼠造模术后各时间点脑组织伊纹思蓝含量明显增高($P<0.01$),以造模术后第 1d 最明显。去铁胺组造模术后各时间点脑组织伊纹思蓝含量与脑出血组呈现相同趋势,但增高程度明显低于脑出血组(见表 3),提示去铁胺去除铁离子可改善脑出血后血肿周围组织血脑屏障通透性。

2.4 血清 NSE 水平变化

与假手术组相比,脑出血组大鼠血清 NSE 水平造模术后 1d 就有明显升高,术后 3d 最明显($P<0.01$),以后逐渐下降。去铁胺组大鼠造模术后各时间点血清 NSE 水平变化与脑出血组呈现相同趋势,但升高程度明显低于脑出血组(见表 4),提示去铁胺去除铁离子可减轻脑组织神经元的损害程度。

2.5 血清 S100B 水平变化

与假手术组相比,脑出血组大鼠血清 S100B 水平造模术后 1d 就有明显升高,术后 3d 最明显,以后逐渐下降。去铁胺组大鼠造模术后各时间点 S100B 血清水平变化与脑出血组呈现相同趋势,但升高程度明显低于脑出血组(见表 5),提示去铁胺去除铁离子可减轻脑组织胶质细胞的损害程度。但去铁胺组血清 S100B 下降程度没有 NSE 显著。

3 讨 论

S100B 蛋白是神经胶质细胞的标志蛋白,NSE 是神经元的标志酶[1]。当中枢神经系统细胞受损时,S100B 蛋白和 NSE 可释放至脑脊液中,并可经受损的血脑屏障进入血液循环,因此检测血清 S100B 蛋白和 NSE 水平可反映中枢神经系统损害程度。本实

表 2 脑组织水含量变化(%)($\bar{x} \pm s$)

	例数	ICH 组对侧	ICH 组血肿侧	DFO 组对侧	DFO 组血肿侧
1d	5	78.20 ± 1.17	79.20 ± 1.12#		
3d	5	80.60 ± 1.03	83.10 ± 1.03*	77.80 ± 2.50	81.20 ± 1.50*▲
5d	5	78.70 ± 1.33	82.10 ± 6.02*	78.00 ± 2.29	79.20 ± 2.33*▲
7d	5	78.10 ± 1.69	80.60 ± 1.15*	77.80 ± 2.52	78.10 ± 1.23#▲

注:同组血肿侧与对侧比较,*$P<0.01$;#$P<0.05$。DFO 组血肿侧与 ICH 组血肿侧比较,▲$P<0.05$。

表 3 伊纹思蓝浓度的比较($\bar{x} \pm s$)

	例数	SH 组(μg/ml)	ICH 组(μg/ml)	DFO 组(μg/ml)
1d	5	0.076 ± 0.02	1.099 ± 0.22*	
3d	5	0.076 ± 0.02	0.996 ± 0.15*	0.738 ± 0.12*#
5d	5	0.076 ± 0.02	0.857 ± 0.14*	0.538 ± 0.20*#
7d	5	0.076 ± 0.02	0.652 ± 0.15*	0.395 ± 0.09*#

注:与假手术组比较,*$P<0.01$;与脑出血组比较,#$P<0.05$。

表 4 血清 NSE 水平变化的比较($\bar{x} \pm s$)

	例数	SH 组(μg/L)	ICH 组(μg/L)	DFO 组(μg/L)
1d	4	7.12 ± 1.17	8.37 ± 0.61*	
3d	4	7.12 ± 1.17	13.95 ± 1.93*	10.52 ± 1.59*#
5d	4	7.12 ± 1.17	11.32 ± 1.24*	9.18 ± 0.92*#
7d	4	7.12 ± 1.17	9.78 ± 1.14*	7.11 ± 1.76#

注:与假手术组比较,*$P<0.01$;与脑出血组比较,#$P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 5 血清 S100B 水平变化的比较($\bar{x} \pm s$)

	例数	SH 组(μg/L)	ICH 组(μg/L)	DFO 组(μg/L)
1d	4	0.27 ± 0.02	1.45 ± 0.25*	
3d	4	0.27 ± 0.02	2.25 ± 0.41*	1.74 ± 0.29*▲
5d	4	0.27 ± 0.02	1.62 ± 0.21*	1.62 ± 0.21*▲
7d	4	0.27 ± 0.02	1.05 ± 0.12*	0.87 ± 0.13*▲

注:与假手术组比较,*$P<0.01$;与脑出血组比较,▲. $0.05<P<0.1$。

验观察显示,脑出血模型大鼠血清 NSE 和 S100B 水平显著高于假手术对照组,提示脑出血大鼠存在明显的神经细胞和胶质细胞破坏。本实验观察还发现脑出血大鼠血清 S100B 蛋白水平上调的比率明显高于 NSE,给予去铁胺干预后血清 NSE 和 S100B 浓度均有下降,但 S100B 没有 NSE 下降明显,提示神经元和神经胶质细胞对铁离子异常的反应存在差异,这与 Gaasch 等研究发现一致[2]。

红细胞是血液中含量最多的血细胞,其主要成分是血红蛋白(Haemoglobin,HB)。脑出血时大量的 HB 从裂解的红细胞中释放,铁和胆红素均是 HB 分解产物。去铁胺为铁螯合剂,对离子铁具有极高的特异性和亲和力,能与离子铁快速结合形成去铁敏-铁复合物排出体外,不断减少局部铁离子的浓度;而且铁离子被去铁敏络合后通常不再具有活性或活性很弱[3]。本实验观察发现,给予去铁胺干预,能明显改善脑出血模型大鼠造模术后各时间点的脑水肿程度、血脑屏障通透性,降低血清 S100B 蛋白和 NSE 水平,提示铁离子异常增多在脑出血后血肿周围组织神经元、神经胶质细胞和血脑屏障的破坏、脑组织水肿中起着重要作用,使用去铁胺可对抗铁离子的这些脑损害作用,从而促进缺损神经功能的康复。

文献报道局部铁离子急剧增多可通过多种途径致脑组织损伤。(1)Fe^{3+} 可通过 Fenton 反应产生过多氧自由基引发氧化应激反应,体内正常代谢和非正常代谢产生的超氧阴离子(O_2^-)是反应性低的物质,但是在铁离子的参与下通过 Fenton 反应,可转化成反应性强得多的羟自由基(OH·)。氧自由基可造成生物分子(核酸、蛋白质、脂质)的氧化损伤,继而引起细胞结构破坏和功能代谢障碍。Avqul[4]发现出血性卒中患者血浆抗氧化剂超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)和总超氧化物清除力(Total superoxide scavenger activities,TSSA)明显降低,而氧化剂 NO 水平显著升高,提示自由基在脑出血后脑损伤起一定作用。(2)脑出血后铁离子引发的氧化应激可能通过影响水通道蛋白-4(Aquaporin,AQ-P4)表达而加重脑水肿。王改青[5]等的研究发现应用去铁胺可使 ICH 大鼠 AQP4mRNA 表达降低,AQP4 蛋白表达与 AQP4 mRNA 表达呈正相关。(3)完整转铁蛋白和凝血酶(Thrombase)相互作用可引起脑损伤。Nakamura D[6]通过分别给大鼠基底节注入完整转铁蛋白、不带铁的转铁蛋白、凝血酶以及转铁蛋白和凝血酶混合物,发现只有后者能引起基底节脑水肿,DNA 损伤和细胞内铁积聚。这提示凝血酶诱导的转铁蛋白受体增加可导致细胞内铁摄取和细胞毒性的增加。

参 考 文 献

[1] Weglewski A,Ryglewicz D,Mular A,et al. Changes of protein S100B 8erunl concentration during ischemic and hemorrhagic stroke in relation to the volume of stroke lesion[J]. Neurol Neurochir Pol, 2005;39(4):310-317.

[2] Gaasch JA,Lockman PR,Gerdenhuvs WJ,et al. Brain iron toxicity:Diff-erentail Responses of astrocytes,neurons,and endothelial cells[J]. Neurochem Res,2007;32(7):1196-1208.

[3] Zimmer DB,Chaplin J,Baldwin A,et al. S100 一 mediated signal transdu-tion in the nervous system and neurological diseases [J]. Cell Mol Biol,2005;51(2):201-214.

[04] Avqul R,Demircan B,Erdem F,et al. Plasma values of oxidants and antioxidants in acute brain hemorrhage:role of free radicals in the development of brain injury[J]. Biol Trace Elem Res, 2005;108(1-3):43-52.

[5] 王改青,杨期东.去铁胺干预对大鼠 ICH 后水通道蛋白 4 表达变化的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2006;13(4):234-237.

[6] Nakamura T,Xi G,Park JW,et al. Holo-transferrin and thrombin can int-eract to cause brain damage[J]. Stroke,2005;36(2):348-352.

(责任编辑:谭乐勤)