临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001452

高血压脑出血患者急性期血清 TSP1/2、MMP2/9 与脑血肿量及脑水肿量的关系研究

彭　形，罗　超，肖　刚，蒋光元，王　广
（重庆市中医院神经外科，重庆　400021）

【摘　要】目的：探讨高血压性脑出血患者急性期血清血小板反应蛋白 1（thrombospondin 1，TSP1）、血小板反应蛋白 2（thrombospondin 2，TSP2）、基质金属蛋白酶 2（matrix metalloproteinase 2，MMP2）及基质金属蛋白酶 9（matrix metalloproteinase 9，MMP9）的水平变化及其临床意义。**方法**：收集 52 例发病 24 h 以内确诊急性脑出血患者为研究组（或急性脑出血组），同期测量 52 例正常人血清浓度为正常值；于发病 1、3、7、14 d 行 CT 平扫检查，应用体视学法测量患者脑血肿量和脑水肿量；并抽取病人静脉血，酶联免疫法测定血清中 TSP1/2 和 MMP2/9 的含量。**结果**：①急性脑出血各时间点血清含量与正常值比较，各时间点血清 TSP1/2 及 MMP2/9 含量均明显增高；血清 TSP1 和 TSP2 含量分别在第 3 天[(358.36 ± 20.58)，P=0.000]和第 14 天[(358.8 ± 17.09)，P=0.000]达到高峰；脑出血后第 3 天，血清 MMP2[(454.23 ± 43.34)，P=0.000]、MMP9[(589.24 ± 56.65)，P=0.000]含量达高峰。②脑水肿量于发病后第 7 天达高峰[(38.85 ± 4.19)，P=0.000]，脑血肿量自病发后逐渐降低。③血清 TSP2 含量表达变化与血清 MMP9 含量表达变化呈弱负相关（r=−0.14，P=0.041），血清 TSP2 含量与脑血肿量负相关（r=−0.57，P=0.000），血清 MMP9 含量表达变化与脑血肿量改变呈正相关（r=0.73，P=0.000），血清 MMP2 含量表达变化与脑水肿量改变呈正相关（r=0.79，P=0.000），血清 MMP9 含量表达变化与脑水肿量改变呈正相关（r=0.73，P=0.000）。**结论**：脑出血后 TSP 可能通过调控 MMP 的表达水平来影响脑血肿量及出血灶周围水肿程度。

【关键词】脑出血；血小板反应蛋白；基质金属蛋白酶；脑水肿
【中图分类号】R743.34　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-08-30

Relationship between serum TSP 1/2, MMP 2/9 and brain hematoma and edema in acute phase of hypertensive intracerebral hemorrhage

Peng Xing, Luo Chao, Xiao Gang, Jiang Guangyuan, Wang Guang
(*Department of Neurosurgery, Chongqing Traditional Chinese Medical Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the change level of thrombospondin 1/2 (TSP1/2) and matrix metalloproteinase 2/9 (MMP2/9) in patients with acute hypertensive intracerebral hemorrhage (HICH) and its clinical significance. ***Methods***: The 52 patients with HICH within 24 hours from onset diagnosed with head CT as experimental group and 52 cases of physical examination in the same period were collected as the normal value prospectively. In HICH group, brain hematoma volume and edema volume were calculated by CT detection, and TSP1/2 and MMP2/9 levels in serum were determined on days 1, 3, 7, 14 after onsets. ***Results***: ①The level of TSP1/2 and MMP2/9 in serum of the HICH group was significantly increased than the normal value at each time point. TSP1 and TSP2 reached the peak on the 3 d [(358.36 ± 20.58), P=0.000] and 14 d[(358.8 ± 17.09), P=0.000] respectively after intracerebral hemorrhage. The serum level of the MMP2[(454.23 ± 43.34), P=0.000] and the MMP9[(589.24 ± 56.65), P=0.000] reached the peak on 3 d after intracerebral hemorrhage. ②The cerebral edema volume reached the peak on 7 d[(38.85 ± 4.19), P=0.000] after intracerebral hemorrhage, but the brain hematoma volume gradually decreased after illness. ③The serum level of TSP2 was in weak negative correlation with the serum level of MMP9 after intracerebral hemorrhage (r=−0.14, P=0.000); the serum level of TSP2 was negatively related to the brain hematoma (r=−0.57, P=0.000); the serum level of MMP9 was positively related to the brain hematoma (r=0.73, P=0.000); the serum level of MMP2 (r=0.79, P=0.000) and MMP9 (r=0.73, P=0.000) were positively related to the cerebral edema. ***Conclusion***: The TSP may affects cerebral hematoma volume and edema surrounding bleeding through regulating MMP expression level after cerebral hemorrhage.

【Key words】intracerebral hemorrhage; thrombospondin; matrix metalloproteinase; brain edema; brain hematoma

作者介绍：彭　形，Email：295936470@qq.com，
研究方向：脑出血的发病机制和治疗。

基金项目：重庆市中医研究院课题基金资助项目（编号：2016-1-47）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171130.1011.004.html
（2017-11-30）

高血压性脑出血(hypertensive intracerebral hemorrhage,HICH)是指伴随高血压基础病史发生的脑实质内出血。脑出血后继发性的脑水肿可导致颅内压增高,引起脑疝,是脑出血致残和致死的重要原因。而脑出血后血脑屏障的破坏则是导致脑水肿发生的最重要因素之一[1],目前尚无特效临床治疗药物。基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase 2,MMP2)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9,MMP9)是脑内最重要的基质金属蛋白酶。相关研究证实,其在脑卒中发病后表达量明显升高,能够通过降解细胞外基质成分,进而破坏血脑屏障,引发并加重脑水肿的发生[2-3]。正常情况下,体内MMP2/9蛋白的表达受多种因素调节,主要包括TIMPs(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases,TIMP)家族等[4],但在病理状态下,基础研究证实基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP)的表达受血小板反应蛋白(thrombospondin,TSP)的调控发挥作用[5],这为探究血脑屏障破坏的机制提供了新的思路。近几年来,针对高血压性脑出血后脑血肿量和脑水肿量的动态变化与血清 MMP2/9 含量变化的研究相对较多,但目前对脑出血后血清 TSP1/2 含量变化以及其与脑血肿量、脑水肿量的关系缺乏认识,尚无针对性试验。本研究主要通过监测高血压性脑出血患者血清 MMP2/9、TSP1/2 表达变化以及发病后脑出血量及脑水肿量动态变化,研究以上指标的变化规律,探讨其临床意义,以期为脑出血的基础研究和临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 随机收集 2015 年 1 月 1 日至 2016 年 1 月 1 日重庆市中医院神经外科收治的 52 例发病在 24 h 内经头颅 CT 证实的高血压性脑出血患者。年龄 35~72(52.31 ± 13.38)岁,男 25 例,女 27 例。对照组选择同期到重庆市人民医院体检的年龄和性别与观察组相匹配的健康人 52 例。年龄 33~74(55.63 ± 13.26)岁,男 26 例、女 26 例。入选病例均符合第四届全国脑血管病学术会议诊断标准。所有病例组患者均为入院当天行颅脑 CT 检查为幕上脑实质出血未破裂入脑室,且发病前无外伤史、无抗凝药物使用史;排除肿瘤、血管畸形以及出血性疾病;既往无神经系统功能缺陷;除高血压外无严重全身性疾病。入选病例均获得患者及家属的知情同意,本研究所有内容均通过重庆市中医院人体实验伦理委员会的审查批准。

1.1.2 器材与试剂 酶标仪(MD 公司,USA)、高速离心机(Eppendorf 公司,GER)、TSP1/2 ELISA kit(EK0642/EK0899,武汉博士德)、MMP2/9 ELISA kit(EK0459/EK0465,武汉博士德)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有病例在发病后 24 h 内、第 3、7 及 14 天早晨空腹采静脉血 5 mL,注入抗凝试管中,以 4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min 分离血清。

1.2.2 检测方法 采用酶联免疫法(enzyme-linked immunoassay,ELISA)检测血清 TSP1/2 及 MMP2/9 水平。操作过程均按试剂盒说明进行。

1.2.3 测量血肿量及水肿量 应用体视学法,采用自制的方格测量法,取 1 块 10 cm × 10 cm 透明塑料片,按 CT 上的比例尺长度为单位,间隔在板上划出相互垂直的线,制成纵横交错的测格,测格的边长就是 CT 片上 1 cm 的长度。按体视学原理[6],方格直线的交叉点(测点)代表一定面积,在此为 1 cm^2,将测试系统叠放在 CT 片上,计数落在血肿及其周围水肿带上的测点数,累加每层血肿或水肿上的测点数就为相应的体积数值(mL)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。计量资料数据以均数 ± 标准差表示,样本均数间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验;相关性分析采用 Pearson 相关分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 高血压性脑出血发病前后各时间点血清 TSP1/2 及 MMP2/9 表达变化

发病后 2 周内,血清 TSP1 浓度升高明显(P=0.000),与发病前相比,发病后第 3 天血清 TSP1 浓度达高峰(P=0.000),后浓度逐渐降低;血清 TSP2 浓度在发病后随着病情进程逐渐升高,在发病后第 14 天达高峰(P=0.000)。发病后 2 周内,血清 MMP2 浓度升高明显(P=0.000),与发病前相比,发病 24 h 后 MMP2 浓度明显升高(P=0.000),第 3 天达高峰(P=0.000),后逐渐降低;血清 MMP9 浓度进程与 MMP2 相似,在发病 24 h 后 MMP9 浓度明显升高(P=0.000),于第 3 天达高峰(P=0.000),后随病情进程逐渐降低,具体结果见表 1。

2.2 CT 动态扫描结果

发病后各时间点脑水肿量、脑血肿量及脑水肿量/脑血肿量随着病情进展有明显差异(P=0.000)。由表 2 可知,脑出血后 2 周内,出血灶周围组织水肿量逐渐增大,且在发病后第 7 天达高峰(P=0.000),后逐渐降低;脑内血肿量随病程进展逐渐下降,发病后第 14 天与发病后第 1 天相比,颅内血肿量明显减少(P=0.000);脑出血后 2 周内,脑水肿量/脑血肿量随着病程的迁延逐渐降低,在脑出血后第 7 天降至最低(P=0.000)。

表 1 脑出血发病前后各时间点血清 TSP1/2 及 MMP2/9 表达量

Tab.1 Expression of TSP1/2 and MMP2/9 in serum before and after ICH in each time point

组别	TSP1(ng/mL)	TSP2(ng/mL)	MMP2(μg/mL)	MMP9(μg/mL)
发病前	115.00 ± 14.69	101.68 ± 9.53	59.30 ± 11.17	66.30 ± 11.17
发病后 1 d	156.50 ± 10.91[a]	148.44 ± 14.90[a]	73.66 ± 11.13[a]	220.57 ± 23.57[a]
发病后 3 d	358.36 ± 20.58[b]	231.84 ± 17.15[a]	454.23 ± 43.34[b]	589.24 ± 56.65[b]
发病后 7 d	212.72 ± 24.29[a]	280.00 ± 11.86[a]	208.76 ± 16.02[a]	437.74 ± 34.01[b]
发病后 14 d	147.16 ± 20.62[a]	358.80 ± 17.09[b]	73.34 ± 9.51[a]	91.46 ± 11.94[a]
F 值	622.520	1 181.260	1 656.070	1 467.950
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：与发病前相比，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$

表 2 脑出血后不同时间点脑血肿量和脑水肿量

Tab.2 Hematoma volume and brain edema area after ICH at different time points

组别	水肿量（mL）	血肿量（mL）	水肿/血肿
发病后 1 d	21.71 ± 3.87	26.73 ± 9.20	1.05 ± 0.27
发病后 3 d	30.83 ± 3.60[a]	25.12 ± 11.2	0.59 ± 0.15[a]
发病后 7 d	38.85 ± 4.19[b]	20.56 ± 8.91[a]	0.37 ± 0.16[b]
发病后 14 d	23.17 ± 3.72	15.78 ± 6.83[a]	0.49 ± 0.28[a]
F 值	222.130	75.050	99.350
P 值	0.000	0.000	0.000

注：与发病前相比，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$

2.3 脑出血后血清 TSP1/2 含量变化与 MMP2/9 含量变化的相关性分析

脑出血后 1~14 d 内，血清 TSP1 表达变化与血清 MMP2 含量表达变化呈正相关（$r=0.300$，$P=0.000$），与血清 MMP9 含量表达变化呈正相关（$r=0.540$，$P=0.000$）；血清 TSP2 含量表达变化与血清 MMP9 含量表达变化呈弱负相关（$r=-0.140$，$P=0.041$），与血清 MMP2 含量表达变化无相关性（$P=0.051$）。

2.4 脑出血后血清 TSP1/2、MMP2/9 含量变化分别与脑血肿量和脑水肿量改变的相关性分析

脑出血后 1~14 d，血清 TSP2 含量表达变化与脑血肿量改变呈负相关（$r=-0.570$，$P=0.000$），血清 MMP9 含量表达变化与脑血肿量改变呈正相关（$r=0.730$，$P=0.000$），血清 TSP1（$P=0.088$）、MMP2（$P=0.072$）含量变化与脑血肿量改变无相关性；血清 MMP2 含量表达变化与脑水肿量改变呈正相关（$r=0.790$，$P=0.000$），血清 MMP9 含量表达变化与脑水肿量改变呈正相关（$r=0.730$，$P=0.000$），而脑水肿量变化与血清 TSP1（$r=0.338$，$P=0.013$）及 TSP2（$r=0.188$，$P=0.008$）含量变化呈弱正相关性。

3 讨 论

高血压性脑出血（hypertensive intracerebral hemorrhage，HICH）患者 30 d 内死亡率高达近 40%[7]。脑出血后脑内血肿的占位效应及出血本身对脑组织的损害是引起预后不良的两大病理因素[8]。因此能否及时清除脑内血肿，减轻血肿对脑组织的破坏作用，是减轻继发性脑水肿、降低死亡率、提高患者生存质量的关键。

MMP 是一组由内皮细胞、星形胶质细胞等分泌的锌依赖性蛋白酶，MMP2 和 MMP9 为其 2 个重要功能亚型，其主要作用是降解细胞外基质成分。正常状态下脑组织及血浆中 MMP2/9 含量表达较低，但在炎症、肿瘤等多种病理状态下中，其表达量明显增加[9-10]。脑出血后脑组织中 MMP2/9 表达增加，可通过水解层粘连蛋白、胶原纤维等，直接破坏细胞间的紧密连接及细胞外基质分子，增加血脑屏障的通透性，加重脑水肿的发生[11-12]。Abilleira 等[13]研究发现，ICH 患者出现神经症状后 24 h 内 MMP9 浓度明显升高，与血肿周围水肿呈正相关，且与意识障碍程度有密切相关。本研究显示脑出血患者于发病 24 h 内其血清 MMP9 水平即开始升高，第 3 天达高峰，以后逐渐下降，第 14 天时基本降至正常水平。其水平变化与出血灶周围血肿量及水肿量均呈明显正相关，与上述临床实验结论一致。

TSP 是一组结构和功能高度相关的调节性基质糖蛋白家族，主要由激活的血小板、内皮细胞、神经元、胶质细胞等分泌[14]，TSP 的作用发挥与 MMP 的表达有密切关系。Rodriguez-Manzaneque 等[15]发现 TSP1 通过抑制 MMP9 的表达抑制肿瘤周围血管生成。John 等[16]研究表明 TSP1 可以通过双重调控 MMP2/9 及其抑制蛋白 TIMP1 的表达调控肿瘤进程；Kamochi 等[17]研究表明在人大肠癌细胞中过表达 TSP2 基因水平能够降低 MMP2、MMP9 蛋白的表达。本试验结果显示血清 TSP1 含量于脑出血后第 3 天达峰值，随着病情的进展，血清 TSP1 含量变化

与血清 MMP2/9 含量变化及脑水肿量改变均呈正相关；血清 TSP2 于脑出血后第 14 天达峰值，且其血清含量变化与血清MMP9 含量改变及脑血肿量改变呈均呈负相关。

以上结果表明在脑出血后早期 TSP1 高表达可能会通过促进 MMP2/9 的表达，破坏血脑屏障，加重脑水肿的发生，而在疾病后期 TSP2 表达增高可能通过抑制 MMP2/9 的表达水平发挥保护血脑屏障作用，从而减轻继发性脑水肿的程度，改善患者神经功能。因此，TSP1 和 TSP2 在高血压性脑出血疾病进程中发挥不同的作用。因此动态监测血清 TSP1/2 及 MMP2/9 水平对于高血压性脑出血患者的病情判断、疗效观察及评价预后具有潜在的重要临床价值。但由于本研究纳入病例有限，其具体机制有待通过基因调控和蛋白组学研究进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Wasserman JK, Schlichter LC. Minocycline protects the blood-brain barrier and reduces edema following intracerebral hemorrhage in the rat[J]. Exp Neurol, 2007, 207(2): 227-237.

[2] Switzer JA, Hess DC, Ergul A, et al. Matrix metalloproteinase-9 in an exploratory trial of intravenous minocycline for acute ischemic stroke [J]. Stroke, 2011, 42(9): 2633-2635.

[3] Copin JC, Bengualid DJ, Da Silva RF, et al. Recombinant tissue plasminogen activator induces blood-brain barrier breakdown by a matrix metalloproteinase-9-independent pathway after transient focal cerebral ischemia in mouse[J]. Eur J Neurosci, 2011, 34(7): 1085-1092.

[4] Leśniak-Walentyn A, Hrabia A. Expression and localization of matrix metalloproteinases (MMP-2, -7, -9) and their tissue inhibitors (TIMP-2, -3) in the chicken oviduct during pause in laying induced by tamoxifen[J]. Theriogenology, 2017, 88: 50-60.

[5] Yang Z, Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2[J]. Mol Biol Cell, 2000, 11(10): 3353-3364.

[6] Pakkenberg B, Boese J, Albeck M, et al. Unbiased and efficient estimation of total ventricular volume of the brain obtained from CT-scans by a stereological method[J]. Neuroradiology, 1989, 31(5): 413-417.

[7] Chen G, Ping L, Zhou S, et al. Early prediction of death in acute hypertensive intracerebral hemorrhage[J]. Exp Ther Med, 2016, 11(1): 83-88.

[8] Xue M, Del-Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time courrse of inflammation and cell death[J]. Neurosci Lett, 2000, 283(3): 230-232.

[9] Harkness KA, Adamson P, Sussman JD, et al. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinases expression in CNS vascular endothelium[J]. Brain, 2000, 123(Pt 4): 698-709.

[10] Jiang X, Namuru S, Nagata I. Matrix metalloproteinase inhibitor KB-R7785 attenuates brain damage resulting from permanent focal cerebral ischemia in mice[J]. Neurosci Lett, 2001, 305(1): 41-44.

[11] Planas AM, Solé S, Justicia C, et al. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat braqin after transient focal cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(5): 833-846.

[12] Machida T, Takata F, Matsumoto J, et al. Brain pericytes are the most thrombin-sensitive matrix metalloproteinase-9-releasing cell type constituting the blood-brain barrier in vitro[J]. Neurosci Lett, 2015, 599: 109-114.

[13] Abilleira S, Montaner J, Molina CA, et al. Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. J Neurosurg, 2003, 99(1): 65-70.

[14] Tyzack GE, Sitnikov S, Barson D, et al. Astrocyte response to motor neuron injury promotes structural synaptic plasticity via STAT3-regulated TSP-1 expression[J]. Nat Commun, 2014, 5: 4294.

[15] Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, et al. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(22): 12485-12490.

[16] John AS, Hu X, Rothman VL, et al. Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion[J]. Exp Mol Pathol, 2009, 87(3): 184-188.

[17] Kamochi J, Tokunaga T, Tomii Y, et al. Overexpression of the thrombospondin 2 (TSP2) gene modulated by the matrix metalloproteinase family expression and production in human colon carcinoma cell line[J]. Oncol Rep, 2003, 10(4): 881-884.

（责任编辑：冉明会）