DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.010
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)18-1635-04

论著

大鼠脑出血后细胞凋亡和 *bcl*-2 表达间关系的研究

张艳玲[1],陈康宁[1],邵淑琴[1],王 英[2] (第三军医大学:[1]西南医院神经内科;[2]基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究脑出血后血肿周围水肿带内细胞凋亡与 *bcl*-2 表达的关系。方法 使用胶原酶法建立大鼠脑出血模型。于脑出血后 6、12、24 h、3、7 d 选取血肿灶周围脑组织制成冰冻切片,对切片进行相应染色:用 TUNEL 法观察血肿灶周围细胞凋亡,通过免疫组化和原位杂交方法分别从 mRNA 和蛋白的水平观察 *bcl*-2 的表达。对染色结果进行图像分析及统计学处理,分析细胞凋亡与 bcl-2 表达的关系。结果 脑出血 6 h 后血肿周围出现 TUNEL 阳性细胞,此时 *bcl*-2 的表达降低;之后凋亡细胞数量逐渐增加,至 3 d 达到高峰,此时 *bcl*-2 的表达仍处于低水平;3 d 至 7 d 凋亡细胞数量减少,而 *bcl*-2 的表达增加。结论 脑出血后血肿周围存在细胞凋亡,而 *bcl*-2 的表达降低是脑出血后发生细胞凋亡的重要步骤。

关键词:脑出血;细胞凋亡;*bcl*-2;大鼠;胶原酶
中图法分类号:R329.28;R394.2;R743.340.2 文献标识码:A

Relationship between apoptosis and *bcl*-2 expression after cerebral hemorrhage in rats

ZHANG Yan-ling[1], CHEN Kang-ning[1], SHAO Shu-qin[1], WANG Ying[2] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, [2]Department of Pathogenic Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the apoptosis and *bcl*-2 expression around the hematoma in intracerebral hemorrhage (ICH). Methods The ICH rat model was established by intracranial injection of Ⅳ collagenase. Brain tissues around the hematoma were collected at 6, 12, and 24 h, and 3 and 7 d after hemorrhage for the preparation of frozen sections for staining. Apoptosis was observed by TUNEL, and *bcl*-2 expression was observed by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. The relationship between apoptosis and *bcl*-2 expression was analyzed by image analyzer and statistical methods. Results TUNEL positive cells were found around the hematoma at 6 h after ICH. At the same time, the expression of *bcl*-2 was low. And then, the TUNEL positive cells increased and reached the peak at 3 d after ICH. Meanwhile, the expression of *bcl*-2 was still very low. Then the TUNEL positive cells decreased until 7 d after ICH, but the expression of *bcl*-2 increased. Conclusion Apoptosis can be found around the hematoma after ICH. The decreased expression of *bcl*-2 is one of the most important step in ICH-induced apoptosis.

Key words: intracerebral hemorrhage (ICH); apoptosis; *bcl*-2; rat; collagenase

脑出血是神经系统的常见疾病,是影响人类生存及生活质量的最严重的疾病之一。脑出血最重要的病理生理改变为血肿本身的变化及血肿周围的继发性损伤(血肿周围的神经元损伤及脑水肿)。但针对血肿扩大的治疗方法却疗效甚微[1]。因而人们开始把重点转向了对血肿周围神经细胞损伤[2~5]的研究,有研究表明脑出血后存在细胞凋亡现象,细胞凋亡在脑出血神经损伤机制中有重要作用。*bcl*-2 作为重要的影响凋亡的因子,本研究致力于探讨其在脑出血细胞凋亡中的作用。

作者简介:张艳玲(1974-),女,河北省石家庄市人,硕士,主治医师,主要从事脑血管病方面的研究,发表论文 6 篇。电话:(023)68752905
收稿日期:2003-07-29;修回日期:2003-09-19

1 材料和方法

1.1 动物分组、模型制作及病理切片制作

1.1.1 动物分组 成年健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,体质量 200~250 g,由大坪医院实验动物中心提供,分段随机分为生理盐水对照组(control)、脑出血组(intracerebral hemorrhage, ICH)各 30 只,在术后 6、12、24 h、3、7 d 取材制作冰冻切片,每时相点动物 6 只。各组间动物体重无显著差异。

1.1.2 动物模型制作 用Ⅳ型胶原酶建立脑出血模型,参照 Rosenberg 等[6~8]的方法,大鼠术前 12 h 禁食,4 h 禁水,0.4% 戊巴比妥钠腹腔麻醉(40 mg/kg),必要时乙醚补充麻醉,保证手术操作期间大鼠有自主呼吸,俯卧固定于江湾型动物头颅立体定位仪上,头皮丁字型切开,取前囟为原点,向右 3 mm,向后 1 mm,深度 5 mm 为注射点(尾状核),骨钻钻开颅骨,进针后脑出血组缓慢注射Ⅳ型胶原酶/肝素/生理盐水溶液 2.0 μl(1 μl 含Ⅳ型胶原酶 0.2 U 及肝素 2 U),对照组(control)仅注射同样体积的生理盐水。留针 2 min,缓慢退针,骨蜡封闭颅骨钻孔。缝合皮肤。术中大鼠肛温保持在 36.5~37.5 ℃。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.3 病理切片制作 术后在相应时相点过量乙醚麻醉动物，迅速开胸暴露心脏，从左心室插管至主动脉根部，在右心耳剪开一小口做出口。4 ℃生理盐水 100 ml 快速灌注，之后稍减慢灌注速度冲洗至流出液清亮，换 4%多聚甲醛 100 ml 快速灌注，之后稍减慢灌注速度继续固定，灌注约 30 min 至动物四肢变硬。断头取脑，以注射针道为中心做冠状切片，厚度约 5 mm。部分标本按常规程序制成厚度 5 μm 的石蜡切片，部分标本在恒冷冰冻切片机下制成厚度 30 μm 的冰冻切片。

1.2 染色

TUNEL 染色按 Roche 公司试剂盒的步骤完成；*bcl*-2 的免疫组化和原位杂交按武汉博士德公司试剂盒的要求完成。

1.3 图像分析

光学显微镜下，DAB 染色阳性细胞呈棕黄色或褐色，利用 Tiger 920 图像分析仪，随机观察阳性细胞数。

1.4 统计学方法

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用SPSS 10.0 统计软件进行重复测量方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 TUNEL 改变

正常脑组织及对照组中各视野偶见 TUNEL 阳性细胞。

脑出血组：6～12 h，针道周围有渗血及组织结构破坏，针道周边有 TUNEL 阳性细胞；24 h～3 d，针道周边、血肿周围有 TUNEL 阳性细胞(图 1)；出血侧及出血对侧的扣带皮质和额皮质区可见到TUNEL 阳性细胞，且3 d出现 TUNEL 阳性细胞的范围较24 h增宽；7 d 时，血肿周围及同侧扣带皮质内局限范围里可见到少量 TUNEL 阳性细胞。



图 1 胶原酶注射后 **24 h**，血肿旁见较多 **TUNEL** 阳性细胞表达，胞核呈棕褐色 (TUNEL× 400)

Fig 1 Lots of TUNEL(+) cells with brownish-stained nuclei around the hematoma at 24 h after injection of collagenase (TUNEL × 400)

对上述阳性细胞数进行图像分析，结果见表1。

表 1 脑出血后各时相点 **TUNEL** 阳性细胞数量（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Quantity of TUNEL(+) cells at different time after intracerebral hemorrhage（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Group	6 h	12 h	24 h	3 d	7 d
ICH	31.7±4.18 **	110.3±12.16 **	238.0±18.58 **#	264.7±23.35 **#	60.5±9.54 **
Control	4.7±1.37	5.0±1.26	4.0±0.89	4.5±1.05	4.0±0.89

**：$P<0.01$，*vs* control；#：$P<0.05$，*vs* 24 h

2.2 *bcl*-2 的 mRNA 及蛋白表达改变

对照组各视野可见到 *bcl*-2 的 mRNA 的染色阳性细胞。

原位杂交显示 *bcl*-2 的 mRNA 量：脑出血后 6 h，见极少量阳性细胞(图 2)；12～24 h，针道周边、血肿周边、出血侧及出血对侧的扣带皮质和额皮质区出现阳性细胞，12 h 和 24 h 之间比较无明显差别($P=1.000$)；脑出血后 3 d 上述区域及腹侧区域阳性细胞数明显增多；脑出血后 7 d 上述区域仍可见到阳性细胞，染色强度及数量下降。

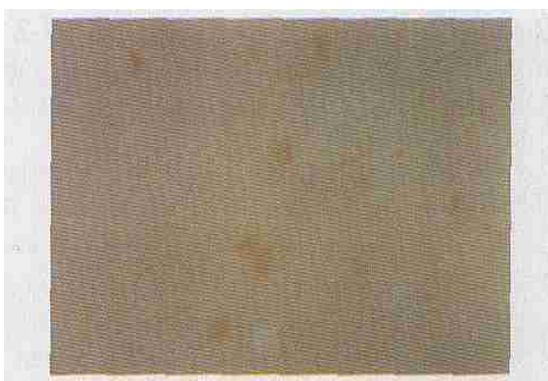


图 2 胶原酶注射后 **6 h**，血肿周边区见 ***bcl*-2** 阳性细胞表达降低，胞浆呈棕黄色 (原位杂交× 400)

Fig 2 Decreased *bcl*-2 mRNA(+) cells with brownish stained nuclei around the hematoma at 6 h after injection of collagenase (ISH× 400)

对上述阳性细胞数进行图像分析，结果见表2。

表 2 脑出血后各时相点 ***bcl*-2** 原位杂交阳性细胞数量（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 The quantity of *bcl*-2 mRNA(+) cells at different time after intracerebral hemorrhage（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Group	6 h	12 h	24 h	3 d	7 d
ICH	11.7±2.58 **	143.3±12.44	135.8±14.63	257.8±14.55 **	105.5±12.58
Control	118.8±8.28	113.5±7.61	122.1±8.42	120.5±3.94	107.1±5.71

$F=31.910$，$P=0.000$，**：$P<0.01$，*vs* control

免疫组化显示 bcl-2 蛋白表达量：脑出血后 6 h，针道周边、血肿周边、出血侧及出血对侧的扣带皮质和额皮质区出现少量阳性细胞；12 h 后，上述区域及腹侧区域阳性细胞数增多；3 d 阳性细胞数量最多、染色强度最强、占据范围最大(图 3)。对照组各时相点均见较多阳性细胞。

对照组各视野可见到 *bcl*-2 的免疫组化的染色阳性细胞。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 3　胶原酶注射后 3 d 血肿周边区见 *bcl*-2 免疫组化阳性细胞表达增高, 胞浆呈棕黄色　(DAB× 400)

Fig 3　Increased expression of *bcl*-2 Pro(+) cells with brownish-stained nuclei around the hematoma at 3 d after injection of collagenase　(DAB×400)

对上述阳性细胞数进行图像分析, 结果见表3。

表3　脑出血后各时相点 *bcl*-2 免疫组化阳性细胞数量 (n= 6　$\bar{x}\pm s$)

Tab 3　The quantity of *bcl*-2 protein (+) cells at different time after intracerebral hemorrhage (n= 6,　$\bar{x}\pm s$)

Group	6 h	12 h	24 h	3 d	7 d
ICH	10.8±1.94 **	123.7±9.79	130.5±7.71	231.7±12.52 **	103.2±5.71
Control	96.7±7.17	110.0±7.54	107.7±8.55	88.8±7.00	94.2±6.82

F= 81.078,　P= 0.000,　**:　P< 0.01,　*vs* control

3　讨论

我们研究中发现, bcl-2 的表达, 不管是在 mRNA 水平, 还是在蛋白水平, 在脑出血早期即出现下降。实验中, 尾状核注射胶原酶溶液后 6 h, 切片中仅见到血管周围出现渗血及机械性损伤, 神经细胞尚无水肿表现, bcl-2 的表达已经出现下降。6～24 h 为血肿的扩大过程, bcl-2 的表达始终处于低水平, 此时 TUNEL 染色提示细胞凋亡呈上升趋势。24 h 至 3 d 后, *bcl*-2 表达恢复并逐渐高于对照组, 与之相伴的是细胞凋亡的数量逐渐减少。故而, 我们的研究结果提示: bcl-2 基因的早期表达的降低可能为引发细胞凋亡的重要步骤, bcl-2 基因的表达增高可作为抑制凋亡的保护因子, 抑制脑出血后的细胞凋亡。

Kingman 等[9,10] 的研究认为, 细胞凋亡与 caspase 的蛋白酶解级联反应密切相关, 而 caspase-3 的激活是细胞凋亡的最终共同途径。caspase 的蛋白酶解级联反应主要有 2 种途径: 线粒体依赖途径和凋亡的死亡受体途径。凋亡的线粒体依赖途径: 凋亡因子促使线粒体释放细胞色素 C, 在 ATP 或 dATP 存在下, 细胞色素 C 使凋亡蛋白酶活化因子-1(A-paf-1)发生构象改变而活化, 从而促使 procaspase-9 活化, 活化的 caspase-9 激活下游的效应酶 caspase-3, 切割特定的凋亡底物, 诱发细胞凋亡。凋亡的死亡受体途径: 其过程是死亡受体 CD95、TNFR1、DR3、DR4 或 DR5 等经接头蛋白介导, 接头蛋白具有死亡效应结构区, 活化起始酶 caspase-1、caspase-6、caspase-8、caspase-10, 活化下游的效应酶 caspase-2、caspase-3、caspase-7 等, 诱发凋亡反应。*bcl*-2 家族中抗凋亡成员的作用机制主要是通过线粒体途径实现的, 这类蛋白主要是通过直接作用于类 CED-4 分子, 抑制细胞色素 C 从线粒体释放, 从而抑制 caspase-9 的激活, 抑制 caspase-9 对 caspase-3 的激活, 阻止凋亡发生。而对死亡受体途径无作用。

对于某些细胞, *bcl*-2 基因的表达降低往往是凋亡发生的第一步, 也是最重要的环节。结合我们的研究, 发现脑出血后早期存在 *bcl*-2 的表达降低, 且 *bcl*-2 的表达影响细胞凋亡的程度, 从而证实脑出血后细胞凋亡与线粒体依赖途径有关。这和张先花等[11] 的研究结论一致。

但是, 什么因素影响了 *bcl*-2 的基因表达? 其信号转导过程是怎样的? 以往的众多研究者在这方面做了大量的工作。已经证实, 脑部疾患中多种因素影响细胞凋亡的发生发展, 包括自由基[12], 兴奋性氨基酸[13]、血浆内皮素 (ET)[14]、降钙素基因相关肽 (CGRP)[15]、β-内啡肽[16] 等。部分因素已经证实和 bcl-2 的表达有关, 在血管平滑肌细胞凋亡[17] 的研究中发现一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡可能与抑制 Bcl-2 和粘着斑激酶基因表达有关; 缺氧/复氧[18] 诱导细胞凋亡与其诱导细胞产生的复杂的生理反应, 如线粒体细胞色素 C 释放、活性氧生成及线粒体 Ca^{2+} 向胞质转移等密切相关, 这些生理异常均直接或间接地启动了细胞凋亡, 而缺氧/复氧诱导细胞凋亡过程受 *bcl*-2 家族蛋白、能量代谢、缺氧诱导因子以及缺氧反应基因等多因素的调控。

尽管证实 *bcl*-2 的表达影响细胞凋亡发生, 但是, 如何控制凋亡因子作用后的信号转导过程, 目前尚无临床应用的有效方案, 尚需要进一步研究总结。

参考文献:

[1] Kingma T A, Mendelow A D, Graham D I, *et al*. Experimental intracerebral mass: description of model, intracranial pressure changes and neuropathology[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1998, 47: 128－137.

[2] Del Bigio M R, Yan H J, Xue M, *et al*. Intracerebral infusion of a second-generation ciliary neurotrophic factor reduces neuronal loss in rat striatum following experimental intracerebral hemorrhage[J]. J Neurol Sci, 2001, 15, 192(1-2): 53－59.

[3] Fotheringham A P, Davies C A, Davies I. Oedema and glial cell involvement in the aged mouse brain after permanent focal ischaemia[J]. Neur-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

ropathol Appl Neurobiol, 2000, 26(5): 412—423.
[4] Xi G, Hua Y, Keep R F, *et al*. Systemic complement depletion diminishes perihematomal brain edema in rats[J]. Stroke, 2001, 32(1): 162—167.
[5] Yang G Y, Betz L, Chenevert T L, *et al*. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and bloodbrain barrier permeability in rats[J]. J Neusurg 1994, 81(1): 93—102.
[6] Rosenberg G A, Mun Bryce S, Wesley M, *et al*. Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1990, 21(5): 801—807.
[7] Del Bigio M R, Yan H J, Buist R, *et al*. Perimental intracerebral hemorrhage in rats magnetic resonance imaging and histopathological corralates [J]. Stroke, 1996, 27(1): 2312—2319.
[8] Peeling J, Yan H J, Chen S G, *et al*. Protective effects of free radical inhibitors in intracerebral hemorrhage in rat[J]. Brain Res, 1998, 795(12): 63—70.
[9] Kingman T A, Mendelow A D, Graham D I, *et al*. Experimental intracerebral mass: time-ralated effects on local cerebral blood flow[J]. J Neurosurg, 1987(67): 732—738.
[10] 蔡文琴, 阮怀珍, 黎海蒂. 医用神经生物学基础[M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 2001. 406—409.
[11] 张花先, 黎杏群, 唐 涛, 等. 脑溢安颗粒对脑出血大鼠脑组织bcl-2表达的影响[J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27(1): 38—40.
[12] Egashira T, Goto H, Takeda H, *et al*. Alterations in neurotransmitter, amino acid and free radical related substances in cerebrospinal fluid in patients with cerebrovascular diseases[J]. Nippon Ronen Igakkai Zasshi, 1999, 36(4): 256—261.
[13] 蒋晓江, 董为伟, 许志强, 等. 脑出血血肿周边脑区谷氨酸及受体的变化[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(12): 1194—1196.
[14] Barone F C, Ohlstein E H, Hunter A J, *et al*. Selective antagonism of endothelin A receptors improves outcome in both head trauma and focal stroke in rat[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2000, 36(5 Suppl 1): S357—361.
[15] 高 晨, 李美琳. 脑梗死患者血浆内皮素-1和降钙素基因相关肽含量改变及其意义[J]. 北京医科大学学报, 1999, 31(3): 265—266.
[16] Molina P E. Noradrenergic inhibition of TNF upregulation in hemorrhagic shock[J]. Neuroimmunomodulation, 2001, 9(3): 125—133.
[17] 杨长春, 温进坤, 韩 梅. 粘着斑激酶在一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(1): 10—12.
[18] 朱光旭, 杨 珂, 霍江涛. 缺氧/复氧诱导细胞凋亡及其调控[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2001, 21(3): 175—177.

(编辑 薛国文)

(上接1634页)

2 结果

由于手术时间受许多客观因素影响, 很难准确加以对比, 但根据对同一手术小组人员所实施的相类似手术的分析, 新手术方法确实比传统方法省时, 平均节约时间约20~35 min。新手术方法组术后伤口无1例感染, 传统方法组术后伤口感染4例(7.84%)。

术后腮腺区凹陷畸形[2]: 新手术方法组1级24例, 2级15例, 3级4例。绝大部分为面形正常或轻微畸形(1级+2级39例, 占90.70%), 传统方法组1级0例, 2级0例, 3级32例, 4级17例, 5级2例, 绝大部分为轻~中度畸形(3级+4级49例, 占96.08%), 两组有显著性差异($P<0.01$)。

Fveys综合征: 新手术方法组3例(6.98%), 传统方法组13例(25.49%), 两组有显著差异($P<0.01$)。

术后面瘫: 新手术方法组发生一过性面瘫11例(25.58%), 传统方法组发生一过性面瘫15例(29.41%), 前者比后者低, 但无显著性差异($P<0.05$), 两组均未发生永久性面瘫。涎瘘: 新手术方法组4例(9.30%), 传统组7例(13.73%), 前者低但无显著差异($P>0.05$)。

肿瘤复发: 两组患者经随访0.5~5年均无1例复发。

3 讨论

对腮腺良性肿瘤的手术治疗方法一直以来都是颌面外科医生不断探索、总结和改进的课题。单纯肿瘤包膜外切除(剜出术), 因其高的肿瘤复发率已基本被摒弃。传统手术方法虽然彻底性高但费时, 手术技巧要求高, 术后并发症发生率高。俞光岩等[3]应用腮腺区域性切除术治疗腮腺腺淋巴瘤(Warthin瘤)取得满意效果。在此基础上, 毛驰等[2]又提出了一种改良的腮腺切除术, 根据肿瘤的位置, 选择性解剖面神经颈面干而行腮腺部分切除术。保留腮腺主导管不影响肿瘤的复发且利于保持腮腺的分泌功能[4]。

我们认为, 鉴于面神经主干、分支在腮腺组织中的特殊走行, 将腮腺由面神经分支为不同的段进行肿瘤定位腮腺部分切除, 既形象又便于理解和掌握, 且充分体现面神经分支与腮腺的解剖关系, 又符合手术原则, 且手术适用面更广。因此, 我们将这一新手术方法命名为分段式腮腺切除术更加贴切和全面。

由临床研究可见, 新手术方法由于切除范围小, 寻找面神经部分外围支省时、快捷且减少了面神经损伤的危险性, 传统手术之所以术后面瘫发生率高同它手术范围大、解剖面神经分支多、面神经解剖段长有关系[5]。与传统手术法相比, 新手术方法由于切除组织少, 腮腺残余暴露组织面小且增加了腮腺咬肌筋膜的覆盖, 因此术后面部凹陷畸形、Fveys综合征的发生率明显降低, 涎瘘的发生率亦较低。新手术切口的设计使之更具隐蔽性、美观性。术后伤口加压包扎时间缩短只需5 d, 更受患者欢迎, 而且手术有足够的无瘤安全边界, 肿瘤复发率极低, 值得在临床中应用和推广。

这里要特别说明的是, 腮腺的管型瘤由于范围散在, 位置深浅不一, 与面神经关系复杂, 难于进行腮腺分段定位及选择面神经解剖分支, 因此不适用于本手术法。

关键词: 腮腺切除术; 腮腺良性肿瘤; 分段式切除术
中图法分类号: R739.87 文献标识码: B

参考文献:

[1] 张锡泽, 邱蔚六, 王模堂, 等. 涎瘘肿瘤[A]. 见: 邱蔚六 主编. 口腔颌面外科学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1986. 432.
[2] 毛 驰, 俞光岩, 彭 歆, 等. 改良的腮腺切除术[J]. 现代口腔医学杂志, 2002, 16(1): 62—64.
[3] 俞光岩, 马大权, 柳晓冰, 等. 腮腺区域性切除术在沃率瘤治疗中的应用[J]. 中华口腔医学杂志, 1996, 31(6): 372—374.
[4] 徐 明, 董飞君, 吴 伟. 保留腮腺主导管腮腺浅叶切除术的临床应用[J]. 口腔颌面外科杂志, 2000, 10(3): 209—210.
[5] 胡晓文, 欧阳喈. 腮腺切除术后面神经功能损伤[J]. 现代口腔医学杂志, 2000, 14(2): 121—122.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net