DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.013
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

文章编号:1000-5404(2002)12-1405-03

论著

凝血酶对大鼠尾状核区神经细胞DNA损伤的动态研究

周中和,王景周,李 玮,高 东,高 唱,周红杰 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 研究脑出血血液凝固释放的凝血酶对神经细胞DNA的损伤,探讨脑出血神经细胞损伤的机制。方法 采用立体定位技术,将15 U凝血酶注入大鼠右侧尾状核,并用凝血酶的特异抑制剂水蛭素进行干预,于不同时相点测定TUNEL阳性细胞及caspase-3免疫反应性(Immunoreactivity,IR)细胞的表达。结果 凝血酶组TUNEL阳性细胞于造模后12 h出现,3 d达到高峰,1周仍有较多表达($P<0.01$);caspase-3 IR 6 h开始表达,1 d达高峰,1周仍有少量表达。水蛭素干预组TUNEL阳性细胞较凝血酶组明显减少(12 h,1 d,3 d,1周,$P<0.01$);caspase-3 IR较凝血酶组明显降低(6 h,12 h,1 d,3 d,$P<0.01$;1周,$P<0.05$)。结论 15 U的凝血酶可导致大鼠尾状核区神经细胞DNA损伤,损伤持续时间1周以上;凝血酶释放很可能是脑出血神经细胞凋亡的机制之一。

关键词:凝血酶;水蛭素;DNA损伤;脑出血
中图法分类号:R329.24;R345;R743.340.2 文献标识码:A

Dynamic study on damage of nerve cell DNA in caudate nucleus induced by thrombin in rats

ZHOU Zhong-he, WANG Jing-zhou, LI Wei, GAO Dong, GAO Chang, ZHOU Hong-jie (Department of Neurology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the damage of nerve cell DNA induced by thrombin released during blood congulation in intracerebral hemorrhage (ICH) for mechanisms of apoptosis of nerve cells in ICH. Methods With the use of stereotaxic technique, 15U thrombin (TH) was injected into the right caudate nucleus of rat, and hirudin (HI), a specific inhibitor of thrombin, was used for intervention. Expression of TUNEL-positive cells and caspase-3 IR cells was detected in the right caudate nucleus at different time points after operation. Results TUNEL-positive cells appeared in the thrombin model 12 h after 15 U thrombin injection, reached a peak in 3rd day, and were present for more than 1 week. While the expression of caspase-3 began in 6 h, peaked in 1 d, and a few caspase-3 IR cells were still found in 1 week. However, the numbers of TUNEL-positive cells in 12 h, 1 d, 3 d, 1 week after injection was decreased strongly in TH+HI group than in TH group ($P<0.01$), so were the numbere of caspase-3 IR cells ($P<0.01$ in 6 h, 12 h, 1 d, and 3 d; $P<0.05$ in 1 week). Conclusion The damage of nerve cell DNA in caudate nucleus can be induced by 15U thrombin, which lasts for more than 1 week, and thrombin's releasing may be one of the mechanisms for neural apoptosis after ICH.

Key words: thrombin; hirudin; DNA damage; intracerebral hemorrhage

探讨脑出血神经损伤机制是目前卒中研究的热点。有研究表明细胞凋亡参与了脑出血继发性神经损伤[1],但脑出血诱发细胞凋亡的机制不甚明了。凝血酶(Thrombin,TH)作为一种细胞外信号分子,可导致培养的肿瘤细胞、神经元、神经胶质细胞DNA损伤(主要是凋亡)[2,3],脑出血血液凝固过程中释放大量凝血酶,它是否参与脑出血后神经细胞DNA损伤尚有待研究。实验将一定量的凝血酶注入到大鼠尾状核,采用TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end- labelling,TUNEL)技术标记DNA损伤、免疫组化检测caspase-3表达的动态变化,并用其特异抑制剂水蛭素(Hirudin,HI)进行干预,探讨凝血酶对在体神经细胞DNA的损伤及其规律,并分析神经细胞DNA损伤与caspase-3蛋白表达的关系,初步阐述凝血酶释放是否是脑出血神经细胞凋亡的机制之一。

1 材料与方法

1.1 主要器材与试剂

江湾型动物头颅立体定位仪(上海第二军医大学);5μl微量进样器(浙江省医用器材厂);凝血酶(Sigma);重组水蛭素(Sigma);TUNEL试剂盒(Roche);caspase-3一抗(Santa Cruz)。

1.2 动物与分组

Wistar大鼠90只(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所医用动物实验中心提供),雌雄不限,鼠龄10~12月,体重350~450 g(雄性偏重)。大鼠随机分成3组:对照组(CO),凝血酶组(TH),凝血酶+水蛭素组(TH+HI)。TH组注入凝血酶15 U/3μl,TH+HI组注入凝血酶15 U/1.5μl及水蛭素15 U/1.5μl,CO组注入生理盐水3μl。每组大鼠30只,各组又分成术后6和12 h及1、3和7 d 5个时相点。

1.3 动物模型制备

大鼠均经10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔麻醉,俯卧固定于

基金项目:重庆市卫生局"十五"重点项目(2001-2003)
作者简介:周中和(1970-),男,湖北省浠水县人,硕士研究生,主治医师,主要从事脑出血神经元损伤机制方面的研究。电话:(023)68757343
收稿日期:2002-01-07;修回日期:2002-07-08

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

立体定位仪上，于头皮正中切口约 1.5 cm，钝性分离出前囟，注入点定位为右侧尾状核（坐标：AP1/RAT3/DV5，参照文献[4]），牙科钻穿透颅骨，各组大鼠均用微量进样器注入生理盐水或凝血酶或凝血酶＋水蛭素溶液 3 μl，停留 2 min 后缓慢退针，骨蜡封闭骨窗，缝合头皮，回笼饲养。

1.4 取材及标本制备

各组大鼠到规定时间后，10%水合氯醛（400 mg/kg）腹腔麻醉后开胸，经左心室常规灌注固定，迅速断头取脑，以注入点为中心前后各 1 mm 处冠状切除鼠脑额端及枕端，中间部分继续入 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液中作后固定。恒温冰冻切片机连续切片，片厚 5 μm，冷丙酮固定 30 min，自然凉干，置低温冰箱保存备用。

1.5 检测指标

TUNEL 阳性细胞检测：严格按 Roche 公司提供的操作规程进行。caspase-3 免疫反应性测定：免疫组化（二步法）。

1.6 统计学处理

利用图像分析仪在 400 倍光镜下，观察并计数右侧尾状核区三个不重复视野 TUNEL 细胞和 caspase-3 IR 细胞数目。利用 SPSS10.0 软件统计分析，检测数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，作 t 检验。

2 结果

2.1 各组造模后不同时相点 TUNEL 阳性细胞的表达

各组标本低倍镜下见针道止于尾状核中心区域，表明凝血酶及水蛭素等准确注入到尾状核；高倍镜下见 TUNEL 阳性细胞胞核为棕黄色，分布于尾状核区、针道旁、同侧皮层，主要位于尾状核区。表 1 为各组大鼠尾状核区 TUNEL 阳性细胞的表达情况：在凝血酶组，凝血酶注入后 12 h 即有明显表达，3 d 后可以增加十多倍，7 d 后仍较对照组高；在水蛭素干预后，除 6 h 外，其他各时间点 TUNEL 阳性细胞均较单凝血酶组明显减少尤其以 3 d 最明显，但在 1、3、7 d 3 个时间点仍较对照组多；在对照组，各视野偶见 TUNEL 阳性细胞。

表 1 各组造模后不同时相点 TUNEL 阳性细胞数目（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Tab 1 Number of TUNEL-positive cells at different time points after injection（$\bar{x}\pm s$）

Group	Time after Injection				
	6 h	12 h	1 d	3 d	7 d
Control	1.83±0.41	1.83±0.75	2.33±0.82	2.17±0.75	1.83±0.31
TH	1.83±0.75	18.17±5.23*	62.33±11.36*	345.67±30.49*	42.17±11.02*
TH+HI	1.67±0.82	3.83±1.31△	17.17±2.48△	39.50±5.79△	4.17±1.94△

*：$P<0.01$ *vs* Control；△：$P<0.01$ *vs* TH group

2.2 各组造模后不同时相点 caspase-3 IR 细胞的表达

caspase-3 IR 细胞胞浆为棕黄色，部分细胞胞浆和胞核均被黄染。阳性细胞主要位于尾状核区，针道旁亦有表达。表 2 为各组大鼠尾状核区 caspase-3 IR 细胞的表达情况：在凝血酶组，凝血酶注入后 6 h 即有明显表达，1 d 后显著增加，其后逐渐下降，7 d 后仍较对照组高；在水蛭素干预后，各时间点 caspase-3 IR 细胞均较单凝血酶组明显减少，以 1 d 最明显，在对照组，各视野可见 0～3 个 caspase-3 IR 细胞。

表 2 各组造模后不同时相点 caspase-3 IR 细胞数目（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Number of caspase-3 IR cells at different time points after injection（$\bar{x}\pm s$）

Group	Time after Injection				
	6 h	12 h	1 d	3 d	7 d
Control	1.67±0.52	1.83±0.75	2.33±1.03	2.0±0.89	1.67±0.82
TH	8.17±1.36*	41.0±6.26*	373.17±26.54*	34.83±4.06*	5.33±1.03*
TH+HI	3.0±0.89△	12.67±1.86△	45.0±5.06△	9.33±1.51△	3.33±0.52▲

*：$P<0.01$ *vs* Control；▲：$P<0.05$，△：$P<0.01$ *vs* TH group

3 讨论

以往人们认为，脑出血后的神经损伤主要是血肿的机械损伤、脑水肿损伤以及随后的脑组织坏死。因此，清除血肿、脱水降颅压是脑出血患者的主要治疗手段，但疗效令人失望[5]。脑出血后细胞凋亡性损伤的发现为出血性脑损伤的防治提供了新的可能途径[1]。阐明脑出血细胞凋亡的发生机理对其防治显得及其重要。与缺血性损伤不同，脑出血的最大特点在于血肿本身，脑出血后细胞凋亡性损伤可能与血肿成分有关。

近 10 年来不同凝血酶受体相继发现，凝血酶被当作一种细胞外信号分子[6]，具有广泛的细胞生物学效应，低浓度时能保护组织细胞，高浓度的凝血酶则具有细胞毒性[3]。脑出血血液凝固过程中释放大量的凝血酶（260～360 U/ml 血浆）。作为血肿成分中最特殊的物质，凝血酶在出血性脑损伤中的作用倍受关注。国内外学者都已证实，凝血酶可导致脑出血后的脑水肿及血脑屏障破坏[7,8]。此外，凝血酶还与脊髓损伤后的神经细胞凋亡有关[9]。离体实验表明，即便微克分子浓度的凝血酶也可导致培养的神经元和胶质细胞凋亡[2]。脑和脊髓中有大量的凝血酶结合位点，加之脑血管内皮细胞缺乏一种潜在的凝血酶抑制因子血栓调节素（Thrombomodulin），神经组织更易遭受凝血酶攻击。因此，凝血酶参与脑出血神经细胞迟发性死亡是可能的。

为了不受脑出血其他因素的影响，我们直接将 15 U 的凝血酶（根据文献[7]，15 U 凝血酶相当于大鼠 50 μl 出血所释放的凝血酶量，大鼠 50 μl 脑出血当于人 40 ml 脑出血，为中等量脑出血）注入大鼠右侧尾状核进行研究。TUNEL 技术是利用 DNA 断裂后暴露的 3′末端进行标记而达到检测 DNA 损伤的目的。目前认为 TUNEL 阳性细胞有两种类型：一种是核呈弥漫性淡染；另一种是核呈斑点状深染，伴核周染色质浓缩。前一种类型被认为是坏死细胞，后一种才是真正意义上的凋亡细胞。我们检测到的 TUNEL 阳性细胞绝大多数为棕黄色深染，呈颗粒状分布于核周或浓缩成团，约 10%TUNEL 阳性细胞核呈均匀一致的淡染。caspase 为胱冬肽酶家族，是一组与 CED-3 同源的调控哺乳动物细胞凋亡的蛋白酶家族，被认为是细胞凋亡的执行者。caspase-3 是 caspase 家族最主要的成员之一。caspase-3 在胞浆内生成，通过转位（Translocation）进入胞核，在核内经过一系列酶切作用导致 DNA 断裂，最

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

终导致细胞凋亡。我们观测到的 caspase-3 IR 在术后 6 h 组、12 h 组多位于胞浆，在 1 d 组和 3 d 组胞核和胞浆都有。对凝血酶处理组的 caspase-3 IR 细胞和 TUNEL 阳性细胞进行动态分析不难发现，二者存在时间上的依赖性：caspase-3 开始表达的时间和达到高峰的时间均较 TUNEL 阳性细胞提前。这一结果与二者的病理生理关系相吻合。我们的结果提示：凝血酶导致的神经细胞 DNA 损伤主要为凋亡性损伤。

水蛭素是目前发现的最强的凝血酶抑制剂，1U 的水蛭素可以对抗 1U 凝血酶的作用。有实验表明[8]，水蛭素可以减轻脑出血后的脑水肿。我们的实验发现，水蛭素可以显著减少凝血酶诱导的神经细胞 TUNEL 阳性细胞数和 caspase-3 IR 细胞数。这不仅进一步证实了凝血酶对神经细胞 DNA 的损伤作用，还提示应用水蛭素或水蛭素制剂有可能成为防治脑出血凝血酶对神经细胞 DNA 损伤的一种手段。

在对照组，各时相点均有少量 TUNEL 阳性细胞和 caspase-3 IR 细胞，数量上有一定差异，但无统计学意义，这可能与针道损伤及动物衰老性凋亡有关。

综上所述，我们认为 15U 凝血酶可以导致大鼠神经细胞 DNA 损伤，主要为凋亡性损伤，持续时间达一周以上，应用水蛭素可以抑制凝血酶的这种效应；凝血酶释放很可能是脑出血神经细胞凋亡的机制之一。但要判断细胞凋亡在出血性脑损伤中的地位，要确定抗凝血酶治疗在防治出血性脑损伤中的意义，还需大量深入的研究。尽管如此，我们认为凝血酶在出血性脑损伤中有重要作用，进一步的研究是值得的。

参考文献：

[1] Matsushita K, Meng W, Wang X, *et al*. Evidence for apoptosis after intercerebral hemorrhage in rat striatum[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(2): 396－404.
[2] Donovan F M, Pike C J, Cotman C W, *et al*. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities[J]. J Neurosci, 1997, 17(14): 5 316－5 326.
[3] Zain J, Huang Y Q, Feng X S, *et al*. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells[J]. Blood, 2000, 95(10): 3 133－3 138.
[4] 包新民，舒斯之. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京：人民卫生出版社，1991. 39－40.
[5] Altumbabic M, Peeling J, Del Bigio M R. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration[J]. Stroke, 1998, 29(9): 1 917－1 922.
[6] Smirnova I V, Zhang S X, Citron B A, *et al*. Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death protease pathways inducing apoptosis in model motor neurons[J]. J Neurobiol, 1998, 36(1): 64－80.
[7] Lee K R, Kawai N, Kim S, *et al*. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model[J]. J Neurosurg, 1997, 86(2): 272－278.
[8] 宫 晔，陈衔城，鲍伟民. 脑出血后脑组织水、离子变化及水蛭素的作用[J]. 上海医科大学学报，2000, 27(2): 105－107.
[9] Citron B A, Smirnova I V, Arnold P M, *et al*. Upregulation of neurotoxic serine proteases prothrombin, and protease-activated receptor 1 early after spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2000, 17(12): 1 191－1 203.

（编辑 冯崇英）

文章编号：1000-5404(2002)12-1407-02

个案与短篇

大面积烧伤病人早期合并肠系膜上动脉压迫综合征 1 例的护理体会

Experience on nursing an extensive burn patient with superior mesenteric artery compression syndrome

黄贤慧 （第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所，重庆 400038）

肠系膜上动脉压迫综合征的发病率为 1%，多发生于伤后 3 周以后，我科曾收治 1 例大面积烧伤病人伤后第 8 天出现该病。现报道如下。

1 临床资料

患者，女性，22 岁，于 1997 年 7 月 26 日被火药爆炸烧伤全身各处，总面积 85%，25% 浅Ⅱ度，45%深Ⅱ度、15/Ⅲ度。伤后 2 h 即送当地医院予补液、抗感染、创面外涂烧伤湿润膏等处理，伤后 5 d 转入我院，病程中一直禁食，无恶心、呕吐及腹胀，既往有胃下垂历史，入院时无不适主诉，生命征平稳，神志清楚、精神差，明显消瘦，体重 36.1 kg，肝功总蛋白51.4 g/L，白蛋白28.44 g/L。予抗感染，静脉高价营养治疗，入院后第 3 天即伤后第 8 天诉恶心、呃逆有腹胀，伴喷射性呕吐为胃内容物及墨绿色胆汁 240 ml，伏卧后症状缓解，无腹痛、头痛及头晕、瞳孔无异常改变，次日 B 超示：肠系膜上动脉与腹主动脉夹角为 12°伴胃潴留，腹部平片示急性胃扩张，胃下垂至盆腔，钡餐 X 线透视下可见钡剂于幽门顺利通过，近端十二指肠扩大，逆蠕动，第 3 段梗阻明显，诊断为肠系膜上动脉压迫综合征。经禁食，持续胃肠减压，静脉营养支持等处理，1 周后症状消失，负压吸引量＜600 ml/d，逐渐试进食，口服要素饮食，3 周后症状完全消失，大便通畅，同时手术，48 d 痊愈出院。

2 讨论

十二指肠第四段位于腹主动脉和肠系膜上动脉形成的夹角中，严重烧伤病人因长期平卧，超高代谢，负氮平衡，显著消瘦，使肠系膜及腹膜后脂肪减少，使结缔组织的支持力减弱，腹主动脉

（下转 1410 页）

作者简介：黄贤慧(1964－)，女，四川省成都市人，主管护师，主要从事烧伤临床护理方面的研究。电话：(023)68754679

收稿日期：2002-09-05；修回日期：2002-11-06

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