DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.025
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

文章编号:1000-5404(2000)09-0879-03

论著

基质金属蛋白酶在脑出血大鼠易出血区血管的表达

鞠 波,蒋晓江,陈曼娥 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所脑血管病三科,重庆 400042)

提 要:目的 观察高血压脑出血易出血区血管壁明胶酶A和明胶酶B的表达,以探讨基质金属蛋白酶在脑出血易出血区血管壁损伤中的作用。方法 应用自发性高血压卒中模型大鼠出血区脑血管与未发病的高血压大鼠及对照组大鼠的脑血管比较,采用免疫组化方法分析其明胶酶A和明胶酶B的表达。结果 脑出血大鼠出血区血管壁比出血对侧及未发病的高血压大鼠的明胶酶A和明胶酶B表达明显增强,而对照组大鼠没有表达。结论 明胶酶A和明胶酶B的过度表达与易出血区的脑血管壁损伤出血有关,提示应用其抑制剂可以预防和减轻脑出血的发生。

关键词:脑出血;基质金属蛋白酶;免疫组化
中图法分类号:R345.9;R743.34 文献标识码:A

Matrix metalloproteinases expression of hemorrhage-prone vascular wall in intracerebral hemorrhage rats

JU Bo, JIANG Xiao-Jiang, CHEN Man-e (Department of Cerebrovascular Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the expressions of gelatinase A and gelatinase B in the hemorrhage prone vascular wall of hypertensive rat after intracerebral hemorrhage in order to explore the effects of matrix metalloproteinases (MMPs) on the injury of the vascular wall. Methods The expressions of gelatinase A and gelatinase B in cerebrovascular wall were immunohistochemically compared among the hemorrhage-prone area of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR/SP), non-stroke hypertensive rats and normal control groups. Results The expressions of gelatinase A and gelatinase B in the hemorrhagic region were much higher in the hemorrhage group than in contralateral areas and non-stroke hypertensive rats, while no expression was found in the control group. Conclusion The over-expressions of gelatinase A and gelatinase B are associated with the injury and hemorrhage of hemorrhage-prone cerebrovascular wall, which indicate that the MMPs inhibitor might prevent and alleviate the incidence of intracerebral hemorrhage.

Key words: intracerebral hemorrhage; matrix metalloproteinases; immunohistochemistry

基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)是降解细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的最主要蛋白酶[1],文献[2]报道脑血管基底膜中的Ⅳ型胶原可以被细菌胶原酶打断,MMPs分解ECM而破坏基底层并开放血-脑屏障是脑出血病情加重的重要因素[3]。明胶酶A(Gelatinase A,又称MMP-2)和明胶酶B(Gelatinase B,又称MMP-9)降解血管基底膜的主要成份——Ⅳ型胶原,从而造成脑血管病损甚至破裂出血而成为脑出血发生的病理生理机制之一。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

采用中国医科院动物所实验动物繁育场提供的出生3个月的自发性高血压卒中模型大鼠(SHR/SP)25只,体重220~250 g,血压19~26 kPa,雌雄各半。给予高盐饮食,并每天放入4 ℃冰箱内2 h,以诱发卒中。疑有发病的大鼠立即麻醉快速解剖确定。有15只大鼠间断发病,最早在饲养第9天发病,1个月内发病3只,1~2个月发病5只,2~3个月发病7只。其中基底节区出血10只(包括内囊、尾状核等),脑叶出血1只,小脑出血1只,3只为脑梗死。小脑出血和脑叶出血的2只已死亡,将10只基底节区出血的大鼠做为研究的出血组。剩下的10只正

作者简介:鞠 波(1965—),男,山东省荣成市人,主治医师,发表论文7篇,现在解放军第107中心医院神经内科,烟台 264002。电话:(0535)6531424

收稿日期:2000-03-25;修回日期:2000-07-02

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

常大鼠做为高血压组。用第三军医大学第三附属医院动物室提供的 10 只体重 240～280 g、雌雄各半的正常 Wistar 大鼠做对照组。

1.2 主要试剂来源

MMP-2 单克隆抗体, MMP-9 单克隆抗体, 生物素标记二抗, 辣根酶标记链霉卵白素, 正常山羊血清, DAB 显色试剂盒。以上试剂均来自北京中山生物技术有限公司。

1.3 标本取材

SHR/SP 脑出血大鼠发现其发病即立即麻醉, 快速断头取脑, 高血压组和对照组选择合适时间麻醉取脑。全部标本均从前囟处冠状切开, 向后切 3 mm 厚脑组织置液氮冻存后做冰冻切片, 切片厚 8 μm。

1.4 免疫组化方法

采用 S-P 三步法。冰冻切片用 4 ℃丙酮固定后, 3% 过氧化氢孵育; 10% 正常山羊血清封闭; 滴加 1∶25 的一抗(MMP-2 或 MMP-9); 然后逐次滴加生物素标记二抗和辣根酶标记的链霉卵白素。DAB 显色。复染(或不复染), 脱水, 封片。

1.5 图像分析方法

采用重庆大学和第三军医大学联合开发的 EIG 综合图像分析系统, 分析阳性反应的灰度值(0～255 范围内, 灰度值与染色强度成反比), 每组动物取 2 张切片。每张切片取 10 个视野, 分别测其灰度值, 取平均灰度值。

1.6 统计学方法

所有数据均由 Excel 7.0 数量统计程序进行贮存、转换和运算。组内自身对照和配对实验数据用配对, t 检验。组间比较采用方差分析, t 检验。数据统计结果的图形化由 Excel 7.2 绘图程序完成。

2 结果

脑出血组出血侧血管壁的 MMP-2 的表达明显增强(69.51±7.83), 见图 1; 出血对侧血管壁的 MMP-2 表达亦较多(114.96±13.06), 但明显少于出血侧($P<0.05$)。高血压组的脑内血管壁的 MMP-2 表达更少(190.76±13.21), 而对照组则没有表达(对照组无阳性染色故未做图像分析)。

MMP-9 的表达情况与 MMP-2 类似, 出血侧血管壁表达最强(50.84±6.41), 见图 2。出血对侧较弱(106.64±9.53), 高血压组更弱(195.65±10.20), 对照组没有表达。

另外, MMP-9 在出血侧血管壁的表达强于 MMP-2, 而在出血对侧和高血压组差别没有显著性。

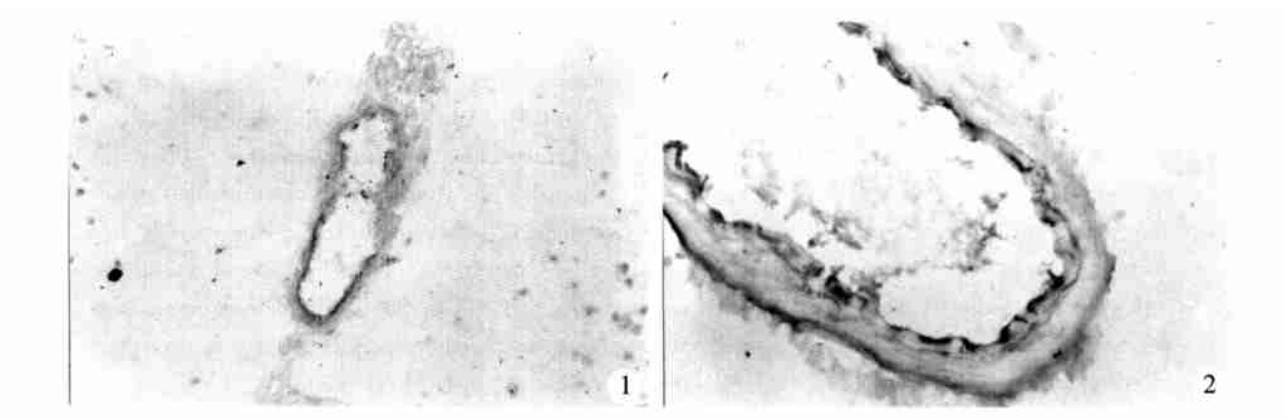


图 **1** **MMP-2** 在出血侧脑血管壁的表达 (S-P× 400)

Fig 1 Expression of MMP-2 in the hemorrhagic side of cerebral vascular wall (S-P× 400)

图 **2** **MMP-9** 在出血侧脑血管壁的表达 (S-P× 400)

Fig 1 Expression of MMP-9 in the hemorrhagic side of cerebral vascular wall (S-P× 400)

3 讨论

高血压性脑出血的发病机制目前还不十分清楚, 主要有以下 4 种学说: 微动脉瘤学说; 梗死后出血学说; 动脉壁病损学说; 小静脉出血学说。高血压时, 血管平滑肌细胞(VSMC)肥大、增殖及结缔组织含量增多, 在大、中动脉壁表现为 VSMC 增生和细胞外基质扩张, 在阻力血管表现为 VSMC 增生和向内膜下迁移, 这些引起了动脉壁的异常增厚, 平滑肌变性, 弹性降低, 甚至形成微动脉瘤等, 使动脉壁在血压突然升高时而破裂出血。

在动脉壁病损及形成动脉瘤过程中, 血管 ECM 的破坏和重建起着很重要的作用, 而 MMPs 是降解 ECM 的最主要的蛋白酶, 它们与基质金属蛋白酶组织抑制剂(Tissue inhibiter of matrix metalloproteinase, TIMP)的失衡导致了血管壁病损等许多病理过程。长期高血压使血管内皮受损, 循环中的单核细胞、血小板等粘附于损伤的内皮或内皮下组织, 并释放大量的细胞因子如白

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

细胞介素-1(IL-1)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子 α(TNFα),这些因子均可刺激血管内皮细胞及血管平滑肌细胞产生 MMPs,而 MMPs 则破坏血管基底膜屏障,导致了血管内皮细胞及平滑肌细胞的迁移,引起了基质的破坏及重建,导致了血管壁的变性及微动脉瘤或夹层动脉瘤的形成。胶原是细胞外基质的主要成份,占其干重的 20%~50%,尤其Ⅳ型胶原,是血管基底膜的主要成份,Ⅳ型胶原酶对Ⅳ型胶原的过度降解是血管壁病损的重要原因之一,Ⅳ型胶原酶包括 MMP-2 和 MMP-9,它们主要由血管内皮细胞及平滑肌细胞分泌,到细胞外基质中发挥作用。小神经胶质细胞及星形胶质细胞也可产生,在炎症刺激下局部浸润的嗜中性粒细胞及巨噬细胞也能产生[4]。有人从开颅行动脉瘤夹闭术中得到的动脉瘤与非脑血管瘤病人开颅术中得到的颞浅动脉,测量后发现,动脉瘤壁上的明胶酶 B 及 TIMPs 明显高于其它正常部位的颅内动脉及颅外动脉[5],Bruno 等[6] 通过手术病人的脑动脉瘤组织与基底动脉比较后指出,动脉瘤的发生与细胞外基质的改变及明胶酶 A 和明胶酶 B 等基质金属蛋白酶有关。

本实验结果表明,正常 Wistar 大鼠脑血管壁没有发现 MMP-2 和 MMP-9 的表达,而在 SHR/SP 大鼠的血管壁仅有少量表达,在发生脑出血的 SHR/SP 大鼠 MMP-2 和 MMP-9 表达较强,而且出血区血管壁的 MMP-2 和 MMP-9 表达明显强于出血对侧,这证明了大鼠高血压性脑出血的血管壁病损与 MMP-2 和 MMP-9 有关,而且在发生出血时,MMP-2 和 MMP-9 的产生进一步增多。Rosenberg[7] 在实验中大脑内注射不同剂量的胶原酶可以引起一个与剂量大小呈正相关的脑内血肿。这些提示了 MMPs 在高血压脑出血中的预警信号作用,应用 MMPs 相应的阻滞剂有可能预防或减轻脑出血的发生。

参考文献:

[1] Emonard H, Grimaud J A. Matrix metalloproteinasea. A review [J]. Cell mol Biol, 1990, 36(2): 131—153.
[2] Rosenberg G A, Estrada E, Kelley R O, *et al*. Bacterial collagenase disrupts extracellular matrix and opens blood-brain barrier in rat[J]. Neurosci Lett, 1993, 160(1): 117—119.
[3] Rosenberg G A, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat[J]. Neurology, 1997, 48(4): 921—926.
[4] Herron G S, Banda M J, Clark E J, *et al*. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. Ⅱ. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors[J]. J Biol Chem, 1986, 261(6): 2 814—2 818.
[5] Kim S C, Singh M, Huang J, *et al*. Matrix metalloproteinase-9 in cerebral aneurysms[J]. Neurosurgery, 1997, 41(3): 642—666.
[6] Bruno G, Todor R, Lewis K, *et al*. Vascular extracellular matrix remodeling in cerebral aneurysms[J]. J Neurosurg, 1998, 89(3): 431—440.
[7] Rosenberg G A, Mun-Bryce S, Westey M, *et al*. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1990, 21(5): 801—807.

(编辑 冯崇英)

文章编号: 1000-5404(2000)09-0881-01

经验与短篇

胃前壁巨大恶性间质瘤 1 例报告

Report a case of giant malignant stromal tumor in anterior gastric wall

安 永, 别 平, 杨占宇 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心、西南肝胆外科医院, 重庆 400038)

患者男性, 66 岁, 因上腹剧痛 6 h 入院(住院号: 269661)。入院前 6 h 无明显诱因突发上腹部剧烈胀痛, 呈持续性, 向下腹部放射, 无畏寒、发热、呕血、腹泻、黑便, 肛门停止排气排便及黄疸。查体: 急性痛苦面容, 皮肤、巩膜无黄染, 心、肺(-), 腹饱满, 上腹部可扪及一巨大包块, 下缘平脐平面, 左侧缘及左腹直肌外缘, 右侧缘及右锁骨中线, 表面光滑, 质韧, 活动性差, 触痛(+), 无波动感, 与呼吸关系不密切, 移动性浊音(-), 肠鸣音正常。腹部 B 超及 CT 均提示肝左叶巨大实质性占位, 大小 17 cm×15 cm×9 cm。上消化道钡餐示胃体小弯及胃窦部见一弧形压迹。胃镜: 正常。乙型肝炎病毒标志物阴性。AFP< 25 ng/ml,

(下转 884 页)

作者简介: 安 永(1976—), 男, 山西省忻州市人, 硕士研究生, 医师, 主要从事梗阻性黄疸、胰腺肿瘤方面的研究。电话: (023)68753737

收稿日期: 2000-02-28; 修回日期: 2000-04-10

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