

## • 论著 •

## 凝血酶介导大鼠脑组织细胞间黏附分子-1 表达与白细胞浸润的研究

高长越 周华东 陈曼斌

**【摘要】目的** 探讨凝血酶在脑出血后血肿周围区炎症反应中的作用。**方法** 72 只 Wistar 大鼠随机分为假手术对照组和凝血酶模型组,分别用免疫组化和髓过氧化物酶(MPO)法检测注入凝血酶后 6、12、24、48、72 和 120 h 不同时间点脑血肿周围组织细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达及白细胞浸润情况。**结果** 注入凝血酶后 6 h 脑血肿周围组织 ICAM-1 表达即已升高,于 72 h 达到高峰,持续至 120 h 仍有较高表达;而该区组织 MPO 活性于 6 h 即已开始升高,24 h 达一高峰,48 h 有所下降,至 72 h 达最高峰,持续到 120 h 活性仍较高。MPO 与 ICAM-1 的表达除 24 h 略不一致外,其余各时间点二者均一致,呈明显正相关。**结论** 凝血酶可诱导局部脑组织表达 ICAM-1,并与该区域白细胞的浸润明显相关;凝血酶在脑出血后血肿周围组织的继发性损伤过程中起着重要作用。

**【关键词】** 凝血酶; 细胞间黏附分子-1; 白细胞浸润; 脑出血

**Expression of intercellular adhesion molecule - 1 and neutrophil infiltration induced by injection of thrombin in rats** GAO Chang - yue, ZHOU Hua - dong, CHEN Man - e. Department of Neurology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

**【Abstract】Objective** To investigate the role of the thrombin in inducing inflammatory response in brain tissue adjacent to hematoma in the brain. **Methods** Seventy - two male Wistar rats were randomly divided into two groups: sham - operated control group and thrombin injection group. Immunohistochemical technique and myeloperoxidase (MPO) determination were respectively used to evaluate intercellular adhesion molecule - 1 (ICAM - 1) expression and neutrophil infiltration in adjacent brain tissue of the thrombin injection zone at 6, 12, 24, 48, 72 and 128 hours after thrombin injection. **Results** The expression of ICAM - 1 in tissues adjacent to thrombin injection started to increase 6 hours after the injection, peaking at 72 hours, and lasting for 120 hours. MPO activity of tissues in the area increased 6 hours, reached a high level at 24 hours, then decreased slightly, and it peaked at 72 hours after thrombin injection, correlating closely with the increase in ICAM - 1 expression except the changes at 24 hours. **Conclusion** The increased expression of ICAM - 1 after thrombin injection is correlated with the degree of the neutrophil infiltration in the brain tissue around the thrombin injection zone, indicating thrombin is important to produce secondary brain damage after cerebral hemorrhage.

**【Key words】** thrombin; intercellular adhesion molecule - 1; neutrophil infiltration; cerebral hemorrhage

自发性脑出血(ICH)时,外源性凝血途径产生大量多余的凝血酶聚集在出血周围脑组织中。研究发现,高浓度凝血酶具有神经毒性作用,可引起细胞死亡,尤其是在 ICH 中,凝血酶具有神经毒性介质作用<sup>[1,2]</sup>。脑出血后病理生理机制的重要环节之一是脑出血后出血部位及周围组织存在着炎症反应<sup>[3]</sup>; Del Bigio 等<sup>[4]</sup>发现,血肿周围白质存在强烈的中性粒细胞反应,凝血酶可使中性粒细胞向血肿周围聚集,转化为活化的白细胞,发生流变学改变,表现为聚集性、黏附性增高和变形性降低,致使微循环有效

面积减少,有效灌注压下降。因此,本研究拟通过观察向大鼠脑组织中注入凝血酶后,周围脑组织细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达和白细胞浸润情况,从而探讨凝血酶在脑出血后血肿周围组织损伤中的作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 动物模型与分组:成年健康雄性 Wistar 大鼠 72 只,体重 250~300 g,由大坪医院实验动物中心提供,随机分为两组。①凝血酶模型组:48 只,又按注入凝血酶后 6、12、24、48、72 和 120 h 分为 6 个时间点,每个时间点 8 只动物。模型采用立体定向脑内注入法<sup>[2]</sup>,具体步骤:用体积分数为 5%的水合氯醛 35 mg/100 g 腹腔内注射麻醉大鼠,俯卧位固定于定向仪上,顶部剃毛消毒后正中矢状切开,在前囟后

基金项目:全军医药卫生科研基金课题(01MB107)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院神经内科

作者简介:高长越(1974-),男(汉族),江苏省徐州市人,医学硕士,讲师,主治医师。

1 mm、左旁 3 mm 处用牙科钻钻一直径约 1 mm 小孔,微量注射器固定在定向仪上,将注射器推进至已钻好的孔内,进针 5 mm(相当于尾状核部),用 20 s 匀速将 300 U 凝血酶+1 ml 生理盐水注入大鼠脑内,留针约 1 min 后退出,用骨蜡封闭骨窗,缝合皮肤。②假手术对照组:24 只,每个时间点 4 只,操作同凝血酶模型组,但只注入等量生理盐水。

**1.2 方法:**于制模后各时间点将两组大鼠中的半数分别先以 4 ℃ 的生理盐水 200 ml 灌流冲洗血液,再用 Zamboni 固定液 200 ml 经主动脉灌注固定;取脑组织固定 20 h 后,用质量分数为 30% 的蔗糖溶液(体积分数为 4% 的多聚甲醛配置)脱水过夜,标本置恒冷冰冻切片中行冠状连续切片,链霉卵白素过氧化物酶(SP)染色法检测组织 ICAM-1 蛋白表达,一抗(工作浓度 1:100)为小鼠抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体(购于 Santa Cruse 公司),室温下孵育过夜。卵白素-生物素免疫染色法(ABC)试剂盒(北京中山公司)按说明书操作,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色后光镜观察,阳性表现为组织内微血管内皮细胞膜及神经细胞膜呈棕黄色深染。

两组各时间点另外半数大鼠则以生理盐水灌流冲洗血液后断头处死,取脑组织速冻后称湿重。分别切取凝血酶注入处脑组织和假手术对照组相应部位以及对侧脑组织各 100 mg,经匀浆并离心后,取上清液 0.1 ml 加入 2.9 ml 反应液[用 pH 6.0 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)配置,含二茴香胺(ODD)0.167 mg/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.005 g/L]中,25 ℃ 下用分光光度计在 460 nm 波长处测定髓过氧化物酶(MPO)活性。MPO 活性单位是 U/g,为 25 ℃ 下 1 min 降解 1 μmol 时所需要过氧化物的量。

**1.3 统计学方法:**在 10×10 光学显微镜下观察每一组动物同一部位切片,选择 6 个不重复视野进行

观察,MAS-图像分析系统进行定量图像分析,测出 1 mm<sup>2</sup>组织切片的阳性细胞数。资料表达用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠不同时间点 ICAM-1 免疫染色阳性变化(表 1):**假手术对照组手术侧针道周围组织可见少量 ICAM-1 阳性染色血管,各时间点间差异无显著性;手术对侧未见表达。凝血酶模型组各时间点周围组织均有不同程度 ICAM-1 阳性反应的血管和神经细胞,手术对侧可见少量表达,与假手术对照组比较差异均有显著性( $P$  均  $< 0.01$ );注入凝血酶 6 h 周围组织即有阳性表达,至 72 h 达高峰,持续至 120 h 仍有阳性表达。

**2.2 各组大鼠不同时间点 MPO 活性检测(表 2):**假手术对照组手术后各时间点 MPO 活性差异无显著性。注入凝血酶后 6 h 周围组织 MPO 活性即已升高,24 h 即达一高峰,48 h 有所下降,至 72 h 达到最高峰,持续到 120 h 活性仍较高,与假手术对照组比较差异均有显著性( $P$  均  $< 0.01$ )。这一结果除 24 h 与 ICAM-1 表达增高略不一致外,其余各时间点两者均一致。

## 3 讨论

目前对于脑缺血后缺血区及其周围组织存在炎症反应的观点,国内外学者已取得共识,并对其病理生理机制也有了较深入的系统研究。但对脑出血后血肿周围组织的损伤机制尚缺乏深入探讨。有学者研究证实,脑出血后血肿周围组织神经肽 Y 含量增加,使神经细胞过度兴奋,加重了神经细胞损害<sup>[5]</sup>。我们知道,ICH 时凝血酶由外源性凝血途径产生,1 ml 血浆可产生 210~360 U 凝血酶,而 1 ml 血液仅需 1 U 的凝血酶即可在 15 s 内凝固;那么过多的

表 1 各组大鼠不同时间点手术侧脑组织 ICAM-1 阳性微血管和神经细胞数( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Number of ICAM-1 positive brain cells and micro-vessels in the injection zone at different time point of each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h
假手术对照组	12	0.36±0.10	0.41±0.15	0.40±0.12	0.44±0.11	0.38±0.12	0.36±0.08
凝血酶模型组	24	2.90±0.32*	5.16±1.30*	7.24±1.36*	13.02±1.45*	16.16±2.53*	7.63±1.96*

注:与假手术对照组比较;\* $P < 0.01$

表 2 各组大鼠不同时间点手术侧周围组织 MPO 活性( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Activity of MPO in the injection zone at different time point of each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h
假手术对照组	12	0.020±0.002	0.019±0.002	0.022±0.003	0.024±0.003	0.021±0.001	0.023±0.002
凝血酶模型组	24	0.082±0.012*	0.178±0.062*	0.196±0.056*	0.163±0.047*	0.253±0.082*	0.128±0.035*

注:与假手术对照组比较;\* $P < 0.01$

凝血酶在局部聚积对脑组织的损害的确值得探讨。Del Bigio 等<sup>[4]</sup>发现,血肿周围白质中存在白细胞活化。活化白细胞可产生自由基、蛋白水解酶类和其他活性物质,对局部脑组织造成直接而严重的损伤。同时凝血酶使神经元和胶质细胞变性,破坏血-脑屏障,形成并加重脑水肿<sup>[6]</sup>。Kane 等<sup>[7]</sup>在大鼠脑出血前给予全身 X 线照射可引起白细胞、血小板减少及血管周围脑水肿减轻。国内学者应用强力霉素治疗脑出血大鼠可明显减轻血肿周围组织白细胞浸润、脑水肿程度及改善预后。提示以白细胞浸润为中心环节的炎症反应参与了血肿周围脑损害的发生<sup>[8]</sup>。

高浓度凝血酶具有神经毒性作用,可引起细胞死亡,尤其是在 ICH 中,凝血酶具有神经毒性介质作用<sup>[1,2]</sup>。国内有学者研究证实,凝血酶可使肾小球系膜细胞的 ICAM-1 表达上调<sup>[9]</sup>,从而在肾小球炎症中起着炎性介质的作用。然而凝血酶在脑出血后血肿周围白质的炎性反应中是否起着炎性介质的作用,目前尚未见报道。本研究结果表明,注入凝血酶后 6 h 周围组织即有 ICAM-1 表达,至 72 h 达最高峰,到 120 h 仍有较高表达;假手术对照组则未见明显表达。而反映白细胞局部浸润的 MPO 活性 6 h 即已明显升高,至 24 h 达一高峰,48 h 略有下降,到 72 h 达最高峰,之后缓慢下降,但至 120 h 仍较假手术对照组高,与 ICAM-1 的表达基本一致。这说明凝血酶和脑血肿周围组织 ICAM-1 的表达明显相关,脑出血后外源性途径产生的过量凝血酶可能作为炎性介质参与了血肿周围白质的炎性反应。本研究发现,注入凝血酶周围组织除微血管内皮细胞有 ICAM-1 表达外,神经细胞表面亦有表达,这可导致白细胞与其结合起直接损伤作用,凝血酶可能介

导了除血管内皮细胞外还包括神经元细胞在内的细胞表面 ICAM-1 表达,是脑出血后凝血酶引起继发性脑损伤的另外重要机制之一。此外,本研究中还发现,在注入凝血酶组对侧部位的微血管可见少量 ICAM-1 表达,推测可能是凝血酶沿着神经纤维间隙至对侧相应部位诱导内皮细胞表达所引起的远隔效应。但在本研究中凝血酶是直接还是间接引起脑血管内皮细胞和神经细胞 ICAM-1 的表达,其各自的机制如何,还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- 1 Lee K R, Kawai N, Kim S, et al. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage; effects of thrombin on cerebral blood flow, blood barrier permeability, and cell survival in a rat model [J]. *J Neurosurg*, 1997, 86: 272 - 278.
- 2 Lee K R, Colon G P, Betz A L, et al. Edema from intracerebral hemorrhage; the role of thrombin [J]. *J Neurosurg*, 1996, 84: 91 - 96.
- 3 Chao Gong, Hoff J T, Keep R F. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rat [J]. *Brain Research*, 2000, 871: 57 - 65.
- 4 Del Bigio M R, Yan H J, Buist R, et al. Experimental hemorrhage in rats; magnetic response imaging and histopathological correlate [J]. *Stroke*, 1996, 27: 2312 - 2330.
- 5 许志强, 陈曼娥, 蒋晓江, 等. 脑出血大鼠急性期血浆及脑匀浆神经肽 Y 活性的变化 [J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16: 218 - 220.
- 6 马承泰, 蒋艳霞, 王左. 醒脑静-生脉混合液对凝血酶损伤星形胶质细胞的保护作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2003, 10: 46 - 48.
- 7 Kane P J, Modha P, Strachan R D, et al. The effect of immunosuppression on the development of cerebral edema in an experimental model of intracerebral hemorrhage; whole body and regional irradiation [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 1992, 55: 781 - 786.
- 8 李光勤, 董为伟. 大鼠脑出血周围区白细胞浸润及强力霉素效果的研究 [J]. *中华神经科杂志*, 1999, 32: 58 - 59.
- 9 陈香美, 傅博, 叶一舟, 等. 凝血酶介导肾小球系膜细胞细胞间粘附分子 1 表达上调及水蛭素的阻断作用 [J]. *中华肾脏病杂志*, 1998, 14: 211 - 214.

(收稿日期: 2005-03-20 修回日期: 2005-04-20)

(本文编辑: 李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

### 欢迎订阅 2005 年《中国中西医结合急救杂志》

《中国中西医结合急救杂志》系中国中西医结合学会主办、天津市天和医院承办的全国性科技期刊(为中国中西医结合学会系列杂志之一,由《中西医结合实用临床急救》杂志更名),是我国中西医结合急救医学界权威性学术期刊,已进入国内外多家权威性检索系统。本刊为双月刊,64 页,国际通用 16 开大版本,80 克双胶纸印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2005 年的订阅手续,邮发代号:6-93,定价:每期 6.9 元,全年 41.4 元。《中国中西医结合急救杂志》已经进入美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”、“em120.com 危重病急救在线”以及国家中医药管理局“中国传统医药信息网”(http://www.Medicine China.com)。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议,并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清。不同意者论文可不投本刊。

(期刊编辑部)