



大鼠脑外伤后P-selectin表达的变化及意义

颅脑损伤时,除外力直接造成脑损害外,同时发生一系列继发性病理改变,均可引起脑微血管改变与微循环障碍,从而导致继发性脑组织缺血和脑代谢的变化,加重脑水肿,P-选择素为粘附分子选择素家族的主要成员,是一种存在于血小板 α 颗粒和血管内皮细胞Weibel-Palade小体的颗粒膜蛋白。当内皮细胞或血小板受到刺激时,P-选择素迅速表达于细胞表面,在缺血性脑损伤、血栓形成和炎症反应中起重要作用。

本研究观察了大鼠脑外伤后P-selectin的表达变化,报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

健康、成年雌性Sprague-Dawley大鼠(四川大学实验动物中心提供)共60只,体质量220~240 g。将实验动物按分成假手术组、轻度损伤组和重度损伤组,每组又按照脑外伤后6 h、1 d、3 d、7 d分成4个亚组,共12组(每组5只)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 采用Feeney's自由落体硬脑膜外撞击方法制造模型。大鼠术前禁食8 h,禁水2 h,10%水合氯醛(3 ml/kg·b.w.)腹腔内注射,麻醉后俯卧固定于木板上,右侧颅顶部备皮,常规消毒铺巾,选取右侧颅顶旁正中切口,长约3 cm,分离皮肤,切开骨膜,向两侧分离,露出约0.8 cm²大小的颅骨,以前囟后1.5 mm处为中心钻孔,蚊式钳扩大骨窗至4 mm(注意保护矢状窦和硬脑膜,骨窗不能太大,以防脚板倾斜),置入直径为4 mm的脚板,分别用400 g·cm(20 g×20 cm)和800 g·cm(20 g×40 cm)的打击能量造成轻型脑损伤组和重型脑损伤组,骨蜡密封颅骨,缝合头皮术毕。对照组也行颅骨钻孔,但不打击。

1.2.2 脑组织含水量测定 各组取2只大鼠断头后快速剥出全脑,距创伤边缘2 mm处取出脑组织,用电子分析天平测其湿重,然后放入110℃烤箱烘烤24 h至恒重,取出后冷却10 min后称干重,按下式计算:脑含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.2.3 脑组织P-selectin蛋白测定 分别于预定的时间点腹腔麻醉下灌注(先用生理盐水然后用4%多聚甲醛),断头取脑,标本置于4%的多聚甲醛溶液固定6~8 h,然后置于20%的蔗糖溶液中过夜。在光学显微镜下确定损伤部位后,冠状位连续冰冻切片10 μ m,用于免疫组织化学染色,具体按中山生物制品有限公司提供的试剂盒的操作步骤进行。

1.2.4 图像分析 利用计算机图像分析系统在100倍镜下每张切片于皮质区和坏死边缘各随机选取4个视野,分别测量其阳性细胞相对面积比(阳性细胞面积总和占视野面积的百分比)和平均目标灰度值(所测阳性细胞的平均灰度),免疫反应的强弱与灰度值成反比关系。取各视野的平均值作为该标本的观测值。

1.3 统计学分析

实验所得数据以表示,两组间比较行t检验,数据运用SPSS 8.0统计软件处理。

2.1 脑组织含水量测定结果

不同程度大鼠脑损伤伤后脑组织含水量见表1, 除损伤后7 d外, 其余各组较对照均有显著差异。

表 1 不同程度大鼠脑损伤伤后脑组织含水量

Tab.1 Brain edema index of rats with brain injury of different severities (% , Mean±SD)

Groups	6 h after injury	24 h after injury	3 days after injury	7 days after injury
Control	78.46±0.68	78.95±0.57	78.59±0.47	78.88±0.42
Mild injury	79.48±0.64*	80.89±0.37*	79.94±0.56*	79.45±0.45
Severe injury	80.69±0.44 [#]	82.58±0.60 [#]	81.35±0.37 [#]	81.37±0.59

*P<0.05, [#]P<0.01 vs control group

2.2 脑组织P-selectin蛋白测定

重度损伤后6 h、24 h以及轻度损伤后24 h粒细胞在损伤灶周围浸润的情况见图1~3。分别示重度损伤后24 h、3 d、7d损伤灶周围可见大量免疫阳性染色血管, 见图4~6。重度损伤后24 h、3 d粒细胞在伤侧侧脑室浸润情况见图7、8。

2.3 图像分析

重伤组和轻伤组与对照组在皮质损伤边缘, 海马和侧脑室腔等P-selectin蛋白阳性表达平均灰度值各时相点均存在显著差异(P<0.05), 对照组皮质损伤边缘P-selectin阳性表达相对面积比显著低于重伤组和轻伤组(P < 0.05)。见表2、3。

3 讨论

局灶性和广泛性脑外伤均可引起脑微血管改变与脑微循环障碍, 从而导致继发性脑组织缺血和脑代谢的变化, 是产生继发性脑缺血、脑水肿的重要病理基础, 脑微循环障碍是脑外伤后重要的病理生理学变化[1]。有研究报道, 闭合性脑外伤后的死亡与脑缺血有关[2]。因此深入探讨脑微循环在脑外伤后的变化规律和发生机制, 将有利于改善脑外伤的预后。

本实验结果显示, 脑外伤后P-选择素表达明显升高, 而且持续3~5 d, 其表达升高主要位于损伤灶周围区和伤侧侧脑室, 与脑水肿的发生部位一致。P-选择素表达的时间变化与脑外伤后脑水肿、脑缺血等继发性损伤发生的时间基本一致, 提示P-选择素与脑外伤继发性损伤密切相关。P-选择素为粘附分子选择素家族的主要成员, 通常储于血小板中的 α 颗粒、致密颗粒及血管内皮细胞的分泌颗粒(Weibel-Palade小体)中, 颅脑损伤后发生缺血再灌注损伤, P-选择素在其中起重要作用[3]。

P-选择素在再灌注后20 min内激活中性粒细胞, 并粘附在受损的内皮上, 进一步引起血管功能失调和组织损伤[4]。(2)激活血小板, 释放血小板活化因子(PAF), 促进血栓形成, PAF高浓度时, 通过增加细胞钙离子内流, 具有直接神经毒性, 并可激活血小板, 影响血栓形成, 增强炎症反应, 从而加重再灌注损伤。组织缺血后的再灌注损害产生大量氧自由基, 造成内皮细胞损伤, 内皮下胶原暴露, 激活血小板, 有利于局部脑血管微血栓的形成, 加之PMN对内皮细胞的粘附, 更加重微血管的堵塞。(3)PMN和血小板释放自由基等炎性介质: PMN和血小板被P-选择素激活后, 释放炎性介质, 可弥散到附近细胞引起损伤, 更加加重脑组织的损伤, 加上脑组织缺血、无复流现象等, 更促进了PMN和血小板聚集, 形成恶性循环[5]。另外, 弹性蛋白酶、IL-1、IL-

6、IL-8、TNF- α 、TGF- β 等细胞因子以及花生酸代谢产物都能弥散到附近细胞引起损伤。他们均与P-选择素激活的PMN和血小板有关。(4)PMN直接损伤内皮细胞：P-选择素激活PMN后，PMN跨内皮细胞膜浸润，释放溶解酶等，引起内皮细胞损伤。激活多核聚细胞(PMN)，粘附在受损的内皮细胞上，内皮功能更差，中性白细胞粘附增强使其更多地积聚于缺血的脑组织，导致微血管的堵塞和血管舒缩功能障碍，进一步加重损伤。在此过程中，细胞间黏附分子(ICAM)亦起重要作用[6]：激活血小板，释放血小板活化因子(PAF)，影响血栓形成，增强炎症反应，从而加重再灌注损伤，使细胞完整性和结构破坏；Jacoby[7]等人运用脑外伤病人与健康成人对比研究，分别测定血小板激活的指标，发现P-选择素表达增加与死亡率的增长程度密切相关，P-选择素可以作为评价血小板活化程度的特异性标志。

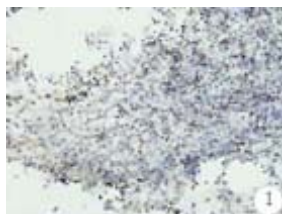


图1 重度损伤后6 h粒细胞在损伤灶周围浸润

Fig.1 Neutrophil infiltration 6 h after severe brain injury (Immunohistochemical staining,original magnification: $\times 10$)

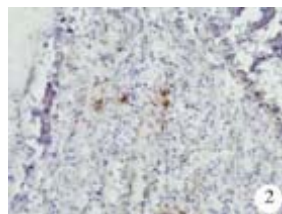


图2 重度损伤后24 h粒细胞在损伤灶周围浸润

Fig.2 Neutrophil infiltration 24 h after severe brain injury (Immunohistochemical staining,original magnification: $\times 10$)



图3 轻度损伤后24 h粒细胞在损伤灶周围浸润

F.g.3 Neutrophil infiltration 24 h after mild injury (Immunohistochemical staining, original magnification: $\times 10$)



图4 重度损伤后24 h后的免疫阳性染色血管

Fig.4 Immunoreactive vessels 24 h after severe brain injury (Immunohistochemical staining, original magnification: $\times 10$)

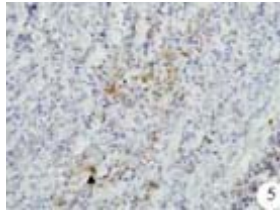


图5 重度损伤后3 d后的免疫阳性染色血管

Fig.5 Immunoreactive vessels 3 days after severe brain injury (Immunohistochemical staining, original magnification: $\times 10$)

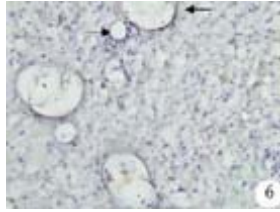


图6 重度损伤后7 d后的免疫阳性染色血管

Fig.6 Immunoreactive vessels 7 days after severe brain injury (Immunohistochemical staining, original magnification: $\times 10$)

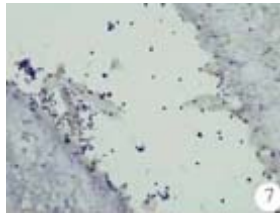


图7 重度损伤后24 h粒细胞在伤侧侧脑室浸润

Fig.7 Neutrophil infiltration in the lateral ventricle 24 h after severe brain injury (Immunohistochemical staining, original magnification: $\times 10$)

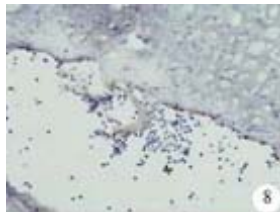


图8 重度损伤后3d粒细胞在伤侧侧脑室浸润

Fig.8 Neutrophil infiltration in the lateral ventricle 3 days after severe brain injury (Immunohistochemical staining, original magnification: $\times 10$)

表 2 不同程度大鼠脑损伤伤后 P-selectin 表达图象分析
灰度值

Tab.2 Gray scale of different brain injuries by
computerized imaging technique (*Mean* \pm *SD*)

Group	6 h after injury	24 h after injury	3 days after injury	7 days after injury
Control	165 \pm 0.37	158 \pm 0.64	166 \pm 0.51	171 \pm 0.60
Mild injury	127 \pm 0.45*	15 \pm 0.39*	120 \pm 0.48*	128 \pm 0.62
Severe injury	89 \pm 0.69*	54 \pm 0.48*	71 \pm 0.37*	82 \pm 0.54

* $P < 0.05$ vs control group

表3 不同程度大鼠脑损伤伤后 P-selectin 阳性表达面积
比结果

**Tab.3 Positive P-selectin expression area ratio after
different brain injuries by computerized imaging
technique**

Group	6 h after injury	24 h after injury	3 days after injury	7 days after injury
Control	7±0.33%	8±0.18%	6±0.52%	7±0.53%
Mild injury	11±0.34%*	15±0.49%*	14±0.38%*	12±0.57%
Severe injury	16±0.61%*	18±0.29% [△]	17±0.17%*	15±0.34%

*P<0.05 vs control group

粒细胞与内皮细胞的黏附是许多组织器官缺血再灌注损伤的一个关键步骤，P-选择素抑制剂通过抑制白细胞黏附和髓过氧化酶的活性发挥神经保护作用[8]。我们的实验结果进一步显示脑外伤后损伤灶粒细胞、血管内皮细胞等都有表达，而且伴有粒细胞的浸润，其变化与脑水肿的时相变化基本一致，说明粒细胞和血管内皮细胞在脑外伤后的继发性微循环障碍有关系。缺血再灌注的炎性级联反应通过早期的白细胞和内皮的相互作用有助与脑血管和周围脑组织的额外损伤，而黏附分子选择素家族介导了白细胞对内皮的起始、滚动、和黏附，通过大鼠缺血再灌注模型证实抗P-选择素药物对于大鼠缺血再灌注损伤具有保护作用[9]。缺血再灌注和凝血酶诱导了血小板和中性粒细胞的黏附，而且通过抑制P-选择素可以减少起损伤[10]。

综上所述，本研究结果显示：脑外伤后损伤灶周围P-选择素表达升高，且重型损伤较轻型损伤升高明显，其表达升高的时间变化与脑外伤后脑水肿、脑缺血等继发性损伤发生的时间基本一致，与脑外伤的继发性损伤关系密切。可能可以在临床上试用P-选择素单克隆抗体(阻滞剂)来阻断颅脑损伤后P-选择素激活PMN和血小板而引起的炎性反应、血栓形成、高凝状态、缺血再灌注等一系列不利的病理生理过程，阻断其起始环节，减轻病变，改善预后，从而达到治疗的目的[11][12]。

参考文献:

- [1] 刘卫平, 章翔, 易声禹, 等. 大鼠急性颅脑损伤后脑微循环的变化[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(12): 1506-9.
- Liu WP, Zhang X, Yi SY, et al. Changes of cerebral microcirculation after acute brain injury in rat[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2000, 21(12): 1506-9.
- [2] Kelly DF, Martin NA, Kordestani R, et al. Cerebral blood flow as a predictor of outcome following traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 1997, 86(4): 633-41
- [3] Suzuki H, Abe K, Tojo SJ, et al. Reduction of ischemic brain injury by anti-P-selectin monoclonal antibody after permanent middle cerebral artery occlusion in rat[J]. Neurol Res, 1999, 21(3): 269-76.
- [4] Grady MS, Cody RF Jr, Maris DO, et al. P-selectin blockade following fluid-percussion injury: behavioral and immunochemical sequelae[J]. J Neurotrauma, 1999, 16(1): 13-25.
- [5] Fei zhou, Piper IR, Miller JD. A clinical and experimental study of camodulin, thromboxane A2 and prostacyclin changes after head injury [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(5): 742-6.
- [6] Whalen MJ, Carlos TM, Dixon CE, et al. Reduced brain edema after traumatic brain

- injury in mice deficient in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1[J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 67(2): 160-8.
- [7] Jacoby RC, Owings JT, Holmes J, et al. Platelet activation and function after trauma[J]. *J Trauma*, 2001, 51(4): 639-47.
- [8] Uhm CS, Kim KB, Lim JH, et al. Effective treatment with fucoidin for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2003, 15, 353(1): 21-4.
- [9] Ruehl ML, Orozco JA, Stoker MB, et al. Protective effects of inhibiting both blood and vascular selectins after stroke and reperfusion[J]. *Neurol Res*, 2002, 24(3): 226-32.
- [10] Chong ZZ, Xu QP, Sun JN. Effects and mechanisms of triacetylshikimic acid on platelet adhesion to neutrophils induced by thrombin and reperfusion after focal cerebral ischemia in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(8): 679-84.
- [11] Shiino A, Matsuda M, Handa J, et al. Poor recovery of mitochondrial redox state in CAI after transient forebrain ischemia in gerbils[J]. *Stroke*, 1998, 29(11): 2425-41.
- [12] Suzuki H, Hayashi T, Tojo SJ, et al. Anti-P-selectin antibody attenuates rat brain ischemic injury[J]. *Neurosci Lett*, 1999, 265(3): 163-6.
-

[回结果列表](#)