

·基础研究·

# 兔脑缺血再灌注后NSE和S-100的表达及其血清水平的变化\*

金丽英<sup>1</sup> 刘真友<sup>2</sup> 杨学伟<sup>1</sup> 隋庆兰<sup>2,3</sup> 郭云良<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的:探讨兔大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)后脑组织神经元特异性烯醇化酶(NSE)和S-100蛋白的表达及其血清含量的变化。方法:将制作成功的兔MCAO/R模型58只,随机分为永久性缺血组30只和缺血再灌注组28只;另取10只动物行假手术分别作为缺血组(5只)及再灌注组(5只)的对照组。免疫组化法检测脑缺血再灌注不同时间脑组织NSE和S-100蛋白的表达,ELISA法检测血清NSE和S-100的含量。结果:假手术组脑组织NSE和S-100表达微弱,血清含量较低。永久性脑缺血3h和缺血再灌注2h后,脑组织NSE和S-100表达同步升高和降低,变化趋势基本一致,但NSE和S-100表达在缺血再灌注47h组较永久性缺血48h组再次明显升高。血清NSE和S-100水平直到缺血5h和再灌注5h开始同步升高,较脑组织NSE和S-100表达时间延迟3h。结论:神经细胞和胶质细胞对缺血再灌注损伤非常敏感,再灌注可加重脑组织的损伤,破坏血-脑屏障,NSE和S-100从脑脊液循环进入了血液循环,血清NSE和S-100的水平可作为评价脑损伤程度和转归的早期指标。

**关键词** 脑缺血;再灌注损伤;神经元特异性烯醇化酶;S-100蛋白

中图分类号:R743.3, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-11-0964-04

**The expressions and serum levels of NSE and S-100 following cerebral ischemia and reperfusion in rabbits/ JIN Liying, LIU Zhenyou, YANG Xuwei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(11): 964-967**

**Abstract Objective:** To observe the expressions and serum levels of neuron-specific enolase (NSE) and S-100 after middle cerebral artery occlusion and reperfusion (MCAO/R) in rabbits. **Method:** Fifty-eight successful MCAO/R rabbit models were randomly divided into permanent ischemic group 30 cases and ischemic reperfusion group 28 cases. Another 10 rabbits were regarded as sham operation group, which ischemic control 5 cases and reperfusion control 5 cases. The expressions of NSE and S-100 in brain tissue were determined with immunochemical assay, and the serum levels of NSE and S-100 were measured with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** There were weak expressions and low serum levels of NSE and S-100 in sham group. The expressions of NSE and S-100 increased/decreased synchronically and changed basically identically following permanent ischemic 3h and ischemic reperfusion 2h. But the expressions of NSE and S-100 after reperfusion 47h elevated significantly than that in permanent ischemic 48h. The serum levels of NSE and S-100 elevated synchronically at ischemic 5h and reperfusion 5h, and delayed 3h than that in brain tissue expression. **Conclusion:** Neurons and glia are much sensitive to ischemic reperfusion. The reperfusion might enhance brain tissue injury and destroy blood brain barrier to cause the NSE and S-100 entering into blood from cerebral spinal fluid, so that the serum levels of NSE and S-100 might serve as early indexes evaluating brain injury and outcome.

**Author's address** Institute of Cerebrovascular Diseases, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, 266003

**Key words** cerebral ischemia; reperfusion injury; neuron-specific enolase; S-100 protein

脑缺血过程中许多酶、蛋白质都发生变化,其中神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)和S-100蛋白是缺血性脑损伤敏感的神经生化指标<sup>[1-2]</sup>。NSE是普遍存在于生物体内的糖酵解代谢酶,它催化中间产物磷酸烯醇化丙酮酸的生成,NSE是一种细胞内蛋白质,特异地存在于神经细胞和神经内分泌细胞中,神经胶质细胞和其他脑神经组织中不含NSE,故NSE是神经元损伤的标志酶<sup>[3]</sup>。

S-100蛋白是一类酸性可溶性蛋白质,主要位于中

\* 基金项目:山东省卫生厅和青岛市科技局基金资助项目(04-2-NY-46)

1 青岛大学医学院附属医院脑血管病研究所,266003

2 青岛大学医学院附属医院放射科

3 通讯作者:隋庆兰,郭云良(青岛大学医学院附属医院脑血管病研究所)

作者单位:金丽英,女,副研究员

收稿日期:2007-05-29

中枢神经系统的星形胶质细胞, 少突胶质细胞以及周围神经的雪旺细胞内, 是神经胶质细胞的标记蛋白。由于NSE和S-100在脑组织中分布不同, 二者相结合可反映脑组织中神经元和神经胶质细胞损害的程度。因此, 检测兔血清中NSE和S-100蛋白的含量及大脑不同脑区NSE和S-100的表达可反映脑损伤的程度<sup>[4]</sup>。本研究应用免疫组化方法测定兔脑缺血和再灌注不同时间脑组织中NSE和S-100的表达, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定兔血清中NSE和S-100的含量, 观察脑组织中NSE和S-100表达与血清中含量的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物模型建立和分组

新西兰兔103只, 性别不限, 体重1.8—3.3kg, 健康状况良好。由山东农业科学院实验动物中心提供。应用线栓法建立大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型, 所有模型均于缺血1h后行MR检查, DWI像上出现异常高信号区作为模型成功的标准<sup>[5]</sup>。将58只成功的动物模型随机分为永久性缺血A组30只和缺血再灌注B组28只。A组再分为A1—A6组, 即缺血1h、3h、6h、12h、24h、48h组, 每组5只; B组再分为B1—B6组, 即再灌注0h 5只、2h 5只、5h 5只、11h 4只、23h 5只、47h 4只。另取10只作为假手术组, 线栓插入后即拔出, 不做其他处理, 随机分为永久性缺血对照组(A0)5只和缺血再灌注对照(B0)5只。

### 1.2 血清NSE和S-100的检测

各组动物在规定的时点, 经心脏穿刺取血5ml, 4000r/min离心10min取上清, -20℃冰箱保存待测。采用双抗夹心ELISA法检测血清中的NSE和S-100含量。试剂盒由天津灏洋科技有限责任公司提供。取出包被有抗NSE或S-100特异抗体的酶标板, 每孔加入100 $\mu$ l标准品和待测家兔血清, 37℃温育60min。洗涤液洗板3次, 吸水纸拍干, 加入100 $\mu$ l生物素化抗家兔NSE或S-100抗体, 37℃温育60min。洗涤液洗板3次, 吸水纸拍干, 加入100 $\mu$ l辣根过氧化物酶标记的抗生物素蛋白链菌素, 37℃温育30min。洗涤液洗板3次, 吸水纸拍干。每孔加入100 $\mu$ lTMB显色液, 37℃暗处温育15min, 每孔加入100 $\mu$ l终止液, 30min内在450nm处酶标仪读OD值, 以OD值为纵坐标, 以标准浓度为横坐标, 绘制标准曲线。根据样品OD值在标准曲线上查出其浓度。

### 1.3 NSE和S-100表达检测

**1.3.1 脑组织标本采集和处理:** 各组动物在规定的时点处死, 完整取脑, 置于生理盐水5min, 洗去脑组织表面的血液, 然后放入4%多聚甲醛固定24h, 蒸馏水浸泡24h, 切取视交叉后方约1cm厚的脑组织置于70%酒精保存。脑组织常规脱水、透明、浸蜡、包埋, 自视交叉后方开始, 连续冠状切片(片厚5 $\mu$ m), 贴于多聚赖氨酸处理的玻片上, 室温保存, 用于免疫组化检测。

**1.3.2 NSE和S-100免疫组化检测:** 兔抗兔NSE和S-100单克隆抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供, 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SABC)免疫组化试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供。标本切片常规脱蜡、水化, 按试剂盒提供的实验步骤进行操作, DAB显色, 光镜下观察, 胞浆出现棕色颗粒为阳性着色细胞。取部分切片一抗以0.1M PBS代替, 不出现阳性细胞。高倍镜下(400倍)在皮质、纹状体区随机各取4个视野计数阳性细胞, 以均数 $\pm$ 标准差表示。

### 1.4 统计学分析

用Excel表格录入数据, SPSS 11.5统计学处理软件进行 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 缺血和再灌注不同时间脑组织NSE和S-100表达的变化

兔脑组织缺血3h后皮质区和纹状体区S-100的表达和纹状体区NSE的表达明显升高, 与假手术组比较差异有显著性( $P<0.05-0.01$ ), 至缺血12h达到高峰, 24h开始下降, 至48h仍高于假手术组( $P<0.05$ ), 见表1。缺血再灌注2h后皮质区和纹状体区NSE和S-100的表达显著升高, 至再灌注11h达高峰, 与假手术组和再灌注0h组比较差异均有显著性( $P<0.05$ ), 见表2, 图1—6。

### 2.2 缺血和再灌注不同时间血清NSE和S-100含量的变化

兔脑缺血6h后其血清中NSE和S-100的含量明显升高, 至缺血24h达到高峰, 48h后下降, 但仍高于假手术组( $P<0.05$ ), 见表3。缺血再灌注5h后血清中NSE和S-100的含量明显升高, 再灌注23h达高峰, 再灌注47h下降, 但仍高于假手术组( $P<0.05$ ), 见表4。

### 2.3 不同脑区NSE和S-100表达与血清含量的相关分析

永久性脑缺血3h和缺血再灌注2h后, 脑组织NSE和S-100表达同步升高和降低、变化趋势基本

一致,但NSE和S-100表达在缺血再灌注47h组较永久性缺血48h组又明显升高。说明神经细胞和胶质细胞对缺血再灌注损伤非常敏感,而且再灌注可能是加重脑组织的损伤因素之一(表1,2)。

永久性脑缺血3h和缺血再灌注2h后,脑组织NSE和S-100表达同步升高。但血清NSE和S-100

水平直到缺血5h和再灌注5h才开始升高,二者同步变化(表3,4)。说明随着缺血再灌注损伤的加重,血-脑脊液屏障受到破坏,细胞内的NSE和S-100逐渐释放和漏出,从脑脊液循环进入了血液循环。因此,通过检测血清NSE和S-100的水平,可以判断缺血再灌注损伤的程度及其转归。

**表1 永久性缺血组脑组织NSE和S-100阳性细胞数** ( $\bar{x}\pm s$ ,个/高倍视野)

组别	动物数	皮质区		纹状体区	
		NSE	S-100	NSE	S-100
假手术组	5	12.75±5.91	13.00±3.16	14.75±2.50	11.25±2.99
缺血1h	5	14.50±3.42	24.50±5.92	32.50±3.11	20.75±5.56
缺血3h	5	28.25±4.65 <sup>②</sup>	44.50±6.86 <sup>②</sup>	40.50±5.74 <sup>②</sup>	19.50±5.80 <sup>①</sup>
缺血6h	5	27.50±6.76 <sup>②</sup>	68.25±5.85 <sup>②</sup>	40.25±12.5 <sup>②</sup>	20.75±3.86 <sup>②</sup>
缺血12h	5	76.25±9.60 <sup>②</sup>	79.00±24.04 <sup>②</sup>	42.50±6.45 <sup>②</sup>	33.25±3.86 <sup>②</sup>
缺血24h	5	63.25±8.18 <sup>②</sup>	35.75±4.35 <sup>②</sup>	25.75±4.35 <sup>②</sup>	28.00±7.79 <sup>②</sup>
缺血48h	5	57.27±7.34 <sup>②</sup>	18.50±5.32 <sup>①</sup>	14.75±3.59 <sup>②</sup>	20.50±3.11 <sup>①</sup>

与假手术组比较:①P<0.05,②P<0.01

**表3 缺血组血清NSE和S-100水平变化** ( $\bar{x}\pm s$ ,pg/ml)

组别	动物数	NSE	S-100
假手术组	5	9.69±3.60	5.93±1.70
缺血1h	5	10.13±4.75	6.53±2.47
缺血3h	5	13.53±3.93	8.63±3.44
缺血6h	5	17.28±4.54 <sup>①</sup>	10.03±3.62 <sup>①</sup>
缺血12h	5	17.06±5.29 <sup>①</sup>	18.41±7.00 <sup>②</sup>
缺血24h	5	23.95±9.11 <sup>①</sup>	23.17±10.87 <sup>②</sup>
缺血48h	5	14.81±3.57 <sup>①</sup>	14.54±5.90 <sup>①</sup>

与假手术组比较:①P<0.05,②P<0.01

**表2 缺血再灌注组脑组织NSE和S-100阳性细胞数** ( $\bar{x}\pm s$ ,个/高倍视野)

组别	动物数	皮质区		纹状体区	
		NSE	S-100	NSE	S-100
假手术组	5	13.65±6.03	18.23±8.36	18.34±3.04	20.25±5.12
再灌注0h	5	16.50±2.38	21.50±3.51	26.50±3.11	19.50±4.20
再灌注2h	5	37.75±8.10 <sup>②</sup>	29.50±6.45 <sup>①</sup>	27.50±6.24 <sup>①</sup>	25.00±4.76 <sup>①</sup>
再灌注5h	5	33.75±13.7 <sup>②</sup>	43.25±6.18 <sup>②</sup>	76.75±20.25 <sup>②</sup>	34.50±5.92 <sup>②</sup>
再灌注11h	4	32.25±5.68 <sup>②</sup>	37.25±6.85 <sup>②</sup>	26.00±3.16 <sup>①</sup>	52.75±6.95 <sup>②</sup>
再灌注23h	5	27.00±4.40 <sup>②</sup>	29.00±5.35 <sup>①</sup>	28.75±5.62 <sup>①</sup>	21.75±3.30 <sup>①</sup>
再灌注47h	4	25.00±7.53 <sup>①</sup>	38.50±7.94 <sup>②</sup>	33.00±8.98 <sup>①</sup>	55.75±12.3 <sup>②</sup>

与再灌注0h组比较:①P<0.05,②P<0.01

**表4 缺血再灌注组血清NSE和S-100水平变化** ( $\bar{x}\pm s$ ,pg/ml)

组别	动物数	NSE	S-100
假手术组	5	8.92±3.33	6.44±2.12
再灌注0h	5	10.95±3.83	7.33±3.03
再灌注2h	5	20.84±10.82	16.00±9.44
再灌注5h	5	24.46±11.39 <sup>①②</sup>	13.73±5.28 <sup>①②</sup>
再灌注11h	4	21.16±7.91 <sup>①②</sup>	13.86±5.34 <sup>①②</sup>
再灌注23h	5	23.37±7.04 <sup>①②</sup>	19.65±9.78 <sup>①②</sup>
再灌注47h	4	16.28±4.74 <sup>①②</sup>	14.23±6.46 <sup>①②</sup>

①与假手术组比较,t=2.57-3.47,P<0.05;②与再灌注0h比较,t=2.57-3.47,P<0.05



图1 缺血12h皮质区S-100的表达



图2 再灌注5h皮质区S-100的表达



图3 缺血12h纹状体NSE的表达



图4 再灌注5h纹状体NSE的表达



图5 缺血12h纹状体S-100的表达



图6 再灌注5h纹状体S-100的表达

### 3 讨论

正常情况下,体液中NSE的含量很低,当脑组织缺血缺氧中毒损伤时,细胞膜的完整性受到破坏,NSE便从神经元中漏出,通过血-脑脊液屏障进入血液和脑脊液,故NSE的含量可反映神经元死亡的程度<sup>[6]</sup>。脑梗死后梗死灶周围的主要病理变化是神经元的变性坏死。神经髓鞘的崩解,血-脑脊液屏障的破坏,NSE从细胞内释放通过脑脊液或血-脑脊液屏障进入外周血<sup>[7]</sup>。提示NSE可跨过血-脑脊液屏障进入体循环,因而可在外周血中检测到NSE浓度的

升高<sup>[8]</sup>。

本实验结果显示,在假手术组兔的皮质区和纹状体区神经细胞有基础水平的NSE表达,血清中NSE含量较低。而在脑缺血3h时皮质区和纹状体区的神经细胞内NSE表达增强,缺血12h最明显,在缺血6h后血清中NSE含量开始升高,至缺血24h达高峰,提示缺血性损伤诱导NSE表达上调,神经元产生的NSE透过细胞膜,跨过血-脑脊液屏障进入血液循环。因此,监测外周血的NSE变化,可了解神经元细胞坏死的情况及严重程度并可以早期诊断并

评价脑损伤的程度。

缺血再灌注 2h 脑组织 NSE 的表达开始升高,再灌注 23h 后,随着损伤因素的加重,细胞形态发生变化,神经细胞内 NSE 的表达达到高峰,而后逐渐下降;而血清中 NSE 的含量在再灌注 5h 也开始升高,再灌注 23h 达到高峰,47h 时后也开始下降。其原因一方面是由于受损细胞胞浆内的 NSE 不断漏出,另一方面可能是由于损伤程度超过了细胞的耐受能力,影响了细胞的代谢过程,导致 NSE 表达降低。说明脑组织的细胞形态结构趋于稳定,已缺血坏死的神经细胞的代谢停止,NSE 的表达和由胞内的漏出停止,血中的含量也逐渐恢复正常。与文献报道结果相一致<sup>[9-10]</sup>。

S-100 蛋白是神经胶质细胞的标记蛋白,当脑组织缺血损伤后损害了神经胶质细胞,大量的胞浆蛋白质漏出细胞进入细胞间液,可溶性的 S-100 蛋白通过细胞间液进入脑脊液,穿过破坏的血-脑脊液屏障进入血液循环。因此,脑脊液和血液中出现 S-100 蛋白能够反映出中枢神经系统神经胶质细胞的损伤和死亡,血清 S-100 $\beta$  蛋白的浓度与脑组织的损伤程度有关,并受细胞因子调节<sup>[11]</sup>。

本实验结果显示,在假手术组兔的皮质区和纹状体区神经细胞有基础水平的 S-100 表达,血清中 S-100 含量较低。在脑缺血 1h 时皮质区和纹状体区的神经细胞内 S-100 表达增强,与假手术组比较差异有显著性,阳性细胞的表达于缺血 12h 最明显,而后逐渐开始下降。

S-100 表达的增多和血清中含量的升高可能是细胞损伤后的一种自我保护机制。当脑组织缺血缺氧时,受损的神经胶质细胞就会释出 S-100 蛋白进入脑脊液,进而通过血-脑脊液屏障进入血液。此时,升高的血清 S-100 蛋白可作为脑损伤的指标。由于 S-100 对神经系统发育有利,因此神经胶质细胞在神经系统受损后释出 S-100 可能是修复神经元的一种形式。但 S-100 浓度过高则导致神经元凋亡,所以 S-100 的释放既是脑损伤的机制又是脑损伤的后果<sup>[12]</sup>。由此可见在缺血性脑损伤中 S-100 无论是神经细胞的表达还是血清中的含量均有明显的升高,具有同步升高现象。

另外,在缺血和再灌注相对应的时间点进行比

较,结果发现其血清中 NSE 和 S-100 的含量在两个相对应时间点之间无显著性差异。缺血 12h、24h、48h 脑组织皮质区和纹状体区 NSE 的表达较再灌注 11h、23h、47h 明显增多,缺血 6h、12h 纹状体区 S-100 的表达较再灌注 5h、11h 明显增多。这可能与长时间的脑组织缺血,细胞内水肿逐渐加重以及血管源性水肿出现有关。

## 参考文献

- [1] Butterworth RJ, Wassif WS, Sherwood RA, et al. Serum neuron-specific enolase, carnosinase, and their ratio in acute stroke[J]. Stroke, 1996,27(11):2064—2068.
- [2] Abrah HD, Butterworth RJ, Bath PM, et al. Serum S-100 protein: relationship to clinical outcome in acute stroke [J]. Ann Clin Biochem, 1997,34(4):366—370.
- [3] 贺勇,尤志瑶,周少华,等. 短暂性脑缺血发作患者血清 S-100 和神经元特异性烯醇化酶的测定及临床意义[J]. 实用医学杂志, 2005,21(1):37—38.
- [4] 王晓明,张国元,许可,等. 脑梗死患者血清神经元特异性烯醇化酶、S-100 $\beta$  蛋白和髓鞘碱性蛋白含量的变化[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(9):572—573.
- [5] 孔令琦,谢敬霞,韩鸿宾. 提高线栓法大鼠中动脉闭塞性兔脑缺血模型稳定性和可重复性的研究 [J]. 中国医学影像技术, 2004, 20(2):209—212.
- [6] Lafon-Cazal M, Bougauh I, Steinberg G, et al. Measurement of gamma enolase, a new method for selective quantification of neurotoxicity independently from gliolysis [J]. Brain Res, 1992,593(1):63—68.
- [7] Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Rancan M, et al. S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2001,18(5):491—498.
- [8] 杨慧君,王生池,李云萍,等. 急性脑梗死神经元特异性烯醇化酶的临床意义[J]. 中华实用医学, 2004,6(4):16—18.
- [9] Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, et al. Early neurobehavioral outcome after stroke is release of neurobiochemical markers of brain damage[J]. Stroke, 1999,30(6):1190—1195.
- [10] 王粤,张红,龚薇薇,等. 脑缺血再灌注损伤后 NSE 和 S-100 $\beta$  的表达[J]. 齐鲁医学杂志, 2004,19(1):1—3.
- [11] Rustandi RR, Baldisseri DM, Weber DJ. Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S-100 $\beta$  (beta)[J]. Nat Struct Biol, 2000,7(7):570—574.
- [12] 张晓伟. S-100 蛋白研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2005,28(3): 270—273.