

## · 基础研究 ·

# 局部亚低温干预对实验大鼠脑出血后 MMP-2/9 表达及脑水肿的影响

张建平 孟凡超 代吉文 张新颜

**【摘要】目的** 探讨局部亚低温干预对大鼠自体血注入法脑出血模型基质金属蛋白酶-2/9 (MMP-2/9) 表达及脑水肿的影响。**方法** 将 165 只 Wistar 大鼠随机分为常温假手术组 (15 只)、常温实验组 (75 只) 及亚低温实验组 (75 只)。亚低温实验组于脑内注血后给予持续 4 h 的局部亚低温治疗。各组大鼠分别于术后 6 h, 24 h, 72 h, 5 d 及 7 d 时进行脑组织水含量、血脑屏障 (BBB) 通透性测定, 并同时应用免疫组化法测定脑组织 MMP-2/9 表达水平。**结果** 常温实验组大鼠脑组织水含量、BBB 通透性及 MMP-9 表达水平均于术后 6 h 时开始增高, 于 72 h 时达到高峰, 至术后 7 d 时仍明显高于常温假手术组; MMP-2 在术后 24 h 才开始有少量表达, 于术后 5 d 时达到高峰, 至 7 d 时仍保持较高表达水平。亚低温实验组大鼠脑组织水含量、BBB 通透性及 MMP-2/9 的表达情况均与常温实验组接近, 但其各项指标数据均较常温实验组明显降低。常温实验组和亚低温实验组大鼠 MMP-9 的表达与脑组织水含量及 BBB 通透性的变化均呈正相关, 而 MMP-2 的表达与二者变化均无明显相关性。**结论** 亚低温干预可能具有抑制脑出血后 MMP-2/9 表达的作用, 从而保护 BBB, 减轻脑水肿及炎症反应。

**【关键词】** 亚低温; 基质金属蛋白酶; 脑出血; 脑水肿

**The effect of local mild hypothermia on MMP-2/9 expression and brain edema in experimental intracerebral hemorrhage in rats** ZHANG Jian-ping, MENG Fan-chao, DAI Ji-wen, ZHANG Xin-yan. Department of Neurology, the First People's Hospital of Shangqiu of Henan Province, Shangqiu 476100, China

**【Abstract】Objective** To study the effect of local mild hypothermia on the expression of matrix metalloproteinases-2/9 (MMP-2/9) and brain edema in experimental intracerebral hemorrhage (ICH) in rat. **Methods** One hundred and forty-five Wistar rats were randomly divided into a normothermia sham-operation (NSO) group ( $n = 15$ ), a normothermia intracerebral hemorrhage (NICH) group ( $n = 75$ ) and a mild hypothermia intracerebral hemorrhage (MHICH) group ( $n = 75$ ). Autologous arterial blood was stereotaxically injected into the right caudate nucleus of the rats of the NICH and MHICH groups to make intracerebral hemorrhage model. The rats in the MHICH group were then subjected to 4 hours of local mild hypothermia, while those in the NICH group were under the room temperature. The brain water content, permeability of brain-blood barrier (BBB) and expressions of MMP-2/9 were measured by immunohistochemistry method at 6 h, 24 h, 72 h, 5 d and 7 d after operation. **Results** In NICH group, the brain water content, permeability of BBB and expression of MMP-9 all began to increase at 6 h and peaked at 3 d after injection of blood and still higher than the NSO group at 7 d. The expression of MMP-2 only began to increase little at 24 h and peaked at 5 d after operation and remained highly expressed at 7 d. In the MHICH group, the changes of brain water content, permeability of BBB and expression of MMP-9 were similar to those of the NICH group, but the extent of changes was significantly lower at the every time point. In NICH group and MHICH group, MMP-9 expression was positively correlated with both the brain water content and the permeability of BBB, but MMP-2 expression was not correlated with them. **Conclusion** Mild hypothermia might protect BBB against injury caused by ICH and relieve brain edema and inflammation reaction through inhibiting the expression of MMP-2/9.

**【Key words】** Mild hypothermia; Matrix metalloproteinase; Intracerebral hemorrhage; Brain edema

脑出血后脑水肿是导致患者病情加重、甚至死亡的重要原因之一, 其发病机制目前尚未完全阐明。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是分解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的蛋白酶类

中的最重要一类, 其中 MMP-2/9 是 MMPs 家族中的两个重要成员。由于 MMP-2/9 异常表达可使 ECM 的正常降解平衡被破坏, 从而导致多种病理过程发生, 如髓鞘脱失、血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 损伤等<sup>[1]</sup>。近年来研究发现, MMP-2/9 与脑血管病的关系密切, 被证实其参与了脑卒中后脑水肿形成等病理过程<sup>[2]</sup>。亚低温 (31 ~ 35℃) 是目前公认有效的脑保护

作者单位: 476100 商丘, 河南省商丘市第一人民医院神经内科 (张建平、张新颜); 郑州大学第二附属医院神经内科 (孟凡超、代吉文)

治疗措施,具有明显减轻脑水肿的功效。亚低温是否能够对脑出血后 MMP-2/9 表达水平产生影响目前鲜见报道。本研究动态观察了局部亚低温干预对实验性脑出血大鼠血肿周围脑组织 MMP-2/9 表达及脑水肿的影响,以进一步探讨亚低温改善脑水肿的可能机制。现报道如下。

## 材料与方法

### 一、实验动物与分组

共选取健康 Wistar 大鼠 165 只,体重 250 ~ 300 g,鼠龄 4 ~ 5 个月,雌雄各半(由河南省实验动物中心提供)。将实验大鼠随机分为 3 组,即常温假手术组(15 只)、常温实验组(75 只)及亚低温实验组(75 只)。

### 二、实验方法

常温实验组及亚低温实验组大鼠参照 Rosenberg 等<sup>[3]</sup>介绍的方法制作大鼠脑出血模型,将大鼠麻醉后固定于立体定位仪上,行头部正中纵行切口,逐层分离至颅骨后钻孔(前囟后 0.2 mm,中线右 3.0 mm 处)。应用微量注射器从大鼠股动脉抽取适量鲜血,在定位仪引导下经钻孔垂直进针 6 mm(即右侧尾状核位置),缓慢注血 50  $\mu$ l,退针后用补牙胶封颅骨孔并缝合头皮。于模型制作完成后按 Longa 5 分制标准进行评分,剔除 0 分及 4 分者。常温假手术组大鼠只进针不注射,术后均无神经功能缺损表现,活动功能正常。

亚低温实验组大鼠待模型制作完成后,采用 RD-ZL686 型半导体制冷仪(哈尔滨工业大学热工教研室研制)对其脑部进行局部亚低温干预,设定制冷仪温度为 6 $^{\circ}$ C(电脑恒温控制),于模型制作完成后立即将大鼠手术侧顶部头皮与半导体制冷片紧密接触(接触面积为 1.5 cm  $\times$  1.5 cm)。采用 SL-4 型温度传感器(华中科技大学同济医学院研制)监测大鼠鼻咽部和鼓膜部温度,确保其温度在亚低温作用 10 min 内降低至(33.0  $\pm$  0.5) $^{\circ}$ C,同时还监测大鼠直肠温度和呼吸状况,亚低温共持续干预 4 h。待亚低温干预结束后将大鼠置于室温(25 $^{\circ}$ C)环境下自然复温,期间大鼠可自由活动、饮水及进食。

### 三、脑组织水含量测定

常温实验组与亚低温实验组分别于术后 6 h, 24 h, 72 h, 5 d 及 7 d 时各取 5 只大鼠麻醉后断头处死,立即分离出脑组织,用薄层刀片切取约 150 mg 血肿周围脑组织,称湿重后将脑组织放入电热烘箱内以 100 $^{\circ}$ C 烘烤 24 h,再称干重。按下列公式计算脑组织水含量,脑水含量(%) = [(脑湿重 - 脑干重)/脑湿重]  $\times$  100%。常温假手术组大鼠于术后 6 h 处死并取脑组织,其脑组织水含量测定方法同上。

### 四、BBB 通透性测定

常温实验组与亚低温实验组分别于术后 6 h, 24 h, 72 h, 5 d 及 7 d 时各取 5 只大鼠经股静脉注射 2% 伊文思蓝(Evans-blue, EB, 购自美国 Sigma 公司)溶液(4 ml/kg 体重),并于 2 h 后断头处死。取血肿周围约 100 mg 脑组织,称湿重后将脑组织置于含有 5% 甲酰胺溶液的试管中,于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱中孵育 72 h,提取液采用 721 型分光光度计( $\lambda = 620$  nm)测其光密度值。采用倍比稀释法制作标准曲线,再根据标准曲线求得脑组织 EB 含量( $\mu$ g/g 脑组织)。常温假手术组大鼠 BBB 通透性测定方法同上。

### 五、MMP-2/9 免疫组化染色检测

常温实验组与亚低温实验组分别于术后 6 h, 24 h, 72 h, 5 d 及 7 d 时各取 5 只大鼠麻醉后断头处死,取血肿周围脑组织置入 4% 多聚甲醛中固定 24 h,制作石蜡切片,片厚 4  $\mu$ m。染色步骤严格按照免疫组化试剂盒 SABC 法说明书进行。一抗为兔抗大鼠 MMP-2/9 抗体(购自武汉博士德生物工程有限公司),工作效价 1:100, DAB 显色。以 PBS 缓冲剂代替一抗作为阴性对照。常温假手术组大鼠 MMP-2/9 免疫组化染色方法同上。

### 六、图像分析

在光学显微镜下,免疫组化染色 MMP-2/9 阳性细胞胞浆或胞核内可见棕黄色颗粒或团块状物质。采用 MCV300 型病理图像分析仪进行 MMP-2/9 阳性细胞计数及阳性微血管计数,在 400 倍光镜下随机选取血肿周围 5 个不同视野进行计数并取平均值。

### 七、统计学分析

所得数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 10.0 版统计软件包进行组间  $t$  检验和相关性分析, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义或有显著相关性。

## 结 果

### 一、各组大鼠脑组织水含量结果比较

与常温假手术组比较,常温实验组大鼠脑内注血后 6 h 时开始出现脑组织水含量增高,在术后 72 h 时达到高峰,随后逐渐下降,至术后 7 d 时仍明显高于常温假手术组。亚低温实验组大鼠各观察时间点脑组织水含量均较常温实验组明显降低,两者差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),具体数据详见表 1。

### 二、各组大鼠 BBB 通透性比较

与常温假手术组比较,常温实验组大鼠脑内注血后 6 h 时开始出现 BBB 通透性增高,于术后 72 h 时达到高峰,随后逐渐下降,到术后 7 d 时仍明显高于常温假手术组。亚低温实验组大鼠各观察时间点 BBB 通透性均较常温实验组明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),具体数据详见表 2。

### 三、各组大鼠 MMP-2/9 表达结果比较

在常温假手术组大鼠标本各视野中均未见或仅偶见 MMP-2/9 阳性细胞表达。常温实验组大鼠脑内注血后 6 h 时血肿周围脑组织开始出现 MMP-9 阳性细胞表达,在术后 72 h 时达到高峰,随后逐渐下降,至术后 7 d 时仍有明显表达。MMP-9 早期阳性细胞主要为血管内皮细胞、胶质细胞、神经细胞及中性粒细胞等;MMP-9 阳性微血管数量也有相似的变化趋势。MMP-2 阳性细胞在脑内注血后 24 h 时才有少量表达,在术后 5 d 时达到高峰,至术后 7 d 时仍维持较高表达水平。MMP-2 阳性细胞主要为血管内皮细胞、神经细胞、巨噬细胞等;MMP-2 阳性微血管数量也有相似的变化趋势。亚低温实验组大鼠 MMP-2/9 的表达变化情况与常温实验组接近,但其表达量在各观察时间点均较常温实验组明显降低 ( $P < 0.05$ )。相关性分析结果表明,常温实验组及亚低温实验组 MMP-9 的表达与脑组织水含量及 BBB 通透性均呈正相关,而 MMP-2 的表达与二者变化无明显相关性,具体数据见表 3。

## 讨 论

ECM 由细胞间多种蛋白质和非蛋白质组成,构

成细胞生存的微环境,具有支持、连接、营养及防御等生理功能。BBB 主要由脑毛细血管内皮细胞、血管基底膜及胶质细胞终足构成,血管基底膜与 ECM 是维持 BBB 完整性的重要结构组成。ECM 的主要成分如胶原、糖蛋白、脂蛋白等均系 MMP-2/9 作用的底物<sup>[1]</sup>。在正常脑组织中有多种细胞参与 MMPs 的合成及分泌过程,如星形细胞、内皮细胞、胶质细胞、神经细胞、T 细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞等,细胞分泌 MMPs 的同时还产生其内源性的天然抑制剂即 TIMPs,二者以复合物的形式调节 ECM,使 ECM 降解保持动态平衡。在一些存在过多基质被降解的病理过程中,发现 TIMP 与 MMP 间的平衡被破坏,使 MMPs 总体上的表达或活性增加,从而导致正常 ECM 降解平衡被破坏并引发多种相关病理反应<sup>[1,4]</sup>。

近年来研究发现,MMP-2/9 参与了缺血性和出血性脑损伤过程,其与脑损伤后 BBB 开放、炎性细胞浸润、脑水肿形成等密切相关<sup>[2]</sup>。Rosenberg 等<sup>[5]</sup>采用胶原酶法诱导脑出血模型时发现,实验大鼠脑出血后 24 h 时脑组织水含量和 MMP-9 表达水平升高,并伴有富含 IV 型胶原纤维的脑血管床基底膜被破坏,给予

表 1 3 组实验大鼠脑组织水含量比较(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组 别	只数	术后 6 h	术后 24 h	术后 72 h	术后 5 d	术后 7 d
常温假手术组	15	76.62 ± 0.54	-	-	-	-
常温实验组	75	79.86 ± 0.31 <sup>a</sup>	81.44 ± 0.43 <sup>a</sup>	84.12 ± 0.58 <sup>a</sup>	82.32 ± 0.26 <sup>a</sup>	80.22 ± 0.27 <sup>a</sup>
亚低温实验组	75	77.13 ± 0.46 <sup>b</sup>	78.15 ± 0.43 <sup>b</sup>	80.24 ± 0.36 <sup>b</sup>	79.21 ± 0.47 <sup>b</sup>	78.54 ± 0.42 <sup>b</sup>

注:与常温假手术组术后 6 h 比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与常温实验组相同时间点比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

表 2 3 组实验大鼠 BBB 通透性比较( $\mu\text{g/g}$  脑组织,  $\bar{x} \pm s$ )

组 别	只数	EB 值				
		术后 6 h	术后 24 h	术后 72 h	术后 5 d	术后 7 d
常温假手术组	15	8.48 ± 0.42	-	-	-	-
常温实验组	75	12.46 ± 0.42 <sup>a</sup>	34.85 ± 0.96 <sup>a</sup>	45.14 ± 1.21 <sup>a</sup>	24.15 ± 0.74 <sup>a</sup>	16.28 ± 0.48 <sup>a</sup>
亚低温实验组	75	9.02 ± 0.39 <sup>b</sup>	22.57 ± 0.58 <sup>b</sup>	28.36 ± 0.97 <sup>b</sup>	18.22 ± 0.54 <sup>b</sup>	10.67 ± 0.48 <sup>b</sup>

注:与常温假手术组术后 6 h 比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与常温实验组相同时间点比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

表 3 亚低温实验组与常温实验组 MMP-2/9 表达的变化(个/ $\text{mm}^3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组 别	术后 6 h	术后 24 h	术后 72 h	术后 5 d	术后 7 d
常温实验组( $n = 75$ )					
MMP-9 阳性细胞数	13.17 ± 2.51	32.61 ± 3.43	48.28 ± 3.59	36.73 ± 3.19	24.57 ± 2.95
MMP-9 阳性微血管数	1.47 ± 0.46	3.14 ± 1.09	11.48 ± 2.36	8.64 ± 2.03	5.75 ± 2.14
MMP-2 阳性细胞数	0	4.34 ± 1.26	11.57 ± 2.83	24.19 ± 3.45	18.25 ± 1.47
MMP-2 阳性微血管数	0	1.38 ± 0.52	2.72 ± 0.79	5.38 ± 1.78	3.46 ± 1.44
亚低温实验组( $n = 75$ )					
MMP-9 阳性细胞数	10.12 ± 2.17 <sup>a</sup>	23.44 ± 3.81 <sup>a</sup>	39.31 ± 3.62 <sup>a</sup>	30.74 ± 3.14 <sup>a</sup>	18.34 ± 3.21 <sup>a</sup>
MMP-9 阳性微血管数	0.86 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.81 <sup>a</sup>	8.36 ± 2.14 <sup>a</sup>	5.36 ± 2.28 <sup>a</sup>	3.26 ± 1.77 <sup>a</sup>
MMP-2 阳性细胞数	0	2.46 ± 1.06 <sup>a</sup>	7.21 ± 1.46 <sup>a</sup>	19.47 ± 3.26 <sup>a</sup>	14.87 ± 2.66 <sup>a</sup>
MMP-2 阳性微血管数	0	0.87 ± 0.34 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.67 <sup>a</sup>	3.21 ± 1.34 <sup>a</sup>	2.24 ± 1.36 <sup>a</sup>

注:与常温实验组相应数据比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

MMP-9 抑制剂 BB-1101 后能显著减轻脑组织水含量,提示阻断 MMP-9 激活是防治脑出血后脑水肿的一个重要潜在途径。

本研究结果显示,常温假手术组大鼠标本各视野中均未见或仅偶见 MMP-2/9 阳性细胞表达,常温实验组大鼠脑内注血后 6 h 时即开始出现 MMP-9 阳性细胞及阳性微血管表达,在术后 72 h 时达到高峰,然后逐渐下降,至术后 7 d 时仍明显高于常温假手术组,同时相关性分析发现 MMP-9 的表达与脑组织水含量及 BBB 通透性呈正相关,提示脑出血诱导 MMP-9 表达水平增高,这可能也是脑出血后 BBB 受损、血管源性脑水肿的重要原因之一。MMP-9 的致水肿作用除与降解微血管内皮基底膜有关外,还可能与中性粒细胞从血管中渗出有联系。本研究结果发现,在脑出血早期,血肿周围脑组织中即有中性粒细胞 MMP-9 阳性表达及中性粒细胞浸润。相关研究指出,中性粒细胞、巨噬细胞均需借助于 MMP-9 游出血管外<sup>[6]</sup>。中性粒细胞浸润到血肿周围后释放炎症介质引起脑组织继发性损伤,进一步加重了脑水肿。MMP-2 的表达变化与 MMP-9 不同,常温实验组大鼠脑内注血后 24 h 时才开始有少量 MMP-2 阳性细胞及阳性微血管表达,在术后 5 d 时达到高峰,随后逐渐降低,至术后 7 d 时仍维持较高表达水平,MMP-2 的表达与脑组织水含量及 BBB 通透性无明显相关性。MMP-2 表达阳性细胞多数为巨噬细胞,主要来源于血液和脑组织中<sup>[1]</sup>,巨噬细胞胞浆内含有大量溶酶体酶和线粒体,当其浸润到血肿周围后,在吞噬细胞碎片及坏死组织的同时,还能释放出各种酶类,包括组织损伤因子。故推测 MMP-2 的表达水平不仅能提示脑组织是否进一步损伤,同时还表明其与脑出血后期细胞碎片和组织清除及修复过程有关,这可能亦是 MMP-2 表达时间较晚且持续较久的原因。

亚低温是目前公认有效的脑保护治疗措施之一。脑出血的病理机制较复杂,呈多因素、多位点、多环节、多时段网络模式,采取单一治疗措施的疗效往往不够理想。由于亚低温能进行多位点的整体性干预,相关的基础及临床研究均证实亚低温干预对脑出血具有显著疗效。综合目前相关研究成果,亚低温对脑出血的保护及治疗机制可能包括以下方面:①抑制代谢率,维持脑血流量<sup>[7]</sup>;②保护 BBB,减轻脑水肿及降低颅内压<sup>[8]</sup>;③减少钙离子的内流,阻断钙对神经元的毒性作用<sup>[9]</sup>;④减少对脑细胞结构蛋白的破坏,促进脑细胞结构及功能修复<sup>[10]</sup>;⑤促进细胞间信号传递功能恢复<sup>[11]</sup>;⑥抑制脑损伤后内源性有害因子的生成、释放及摄取等<sup>[12]</sup>。局部亚低温干预能否将脑内病灶温度

降低至亚低温水平是治疗关键。王德生等<sup>[7]</sup>对实验猪脑部实施局部亚低温干预后,对其脑部温度梯度变化进行测定,发现其基底节区脑温可降低至 33℃,证实达到亚低温水平。本研究结果显示,亚低温实验组大鼠经局部亚低温干预后,其不同时间点脑组织水含量及 BBB 通透性均较常温实验组明显降低,同时 MMP-2/9 的表达量也较常温实验组显著下降,表明亚低温干预可能具有抑制脑出血后 MMP-2/9 表达异常升高的作用,从而保护 BBB、减轻脑水肿及炎症反应。

由于亚低温干预的作用机制非常复杂,其影响脑出血后 MMP-2/9 表达的具体机制目前尚未完全清楚,是否存在某个或多个信号传导通路,还有待今后更深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] Planas AM, Sole S, Justicia C, et al. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neur Dis*, 2001, 8: 834-846.
- [2] 许宏伟, 杨期东, 刘晓英, 等. MMP-2/9 与脑出血后脑水肿的关系探讨. *中风与神经疾病杂志*, 2004, 21: 295-297.
- [3] Rosenberg GA, Mun-bryce S, Wsley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rat. *Stroke*, 1990, 21: 801-807.
- [4] Martin L, Dorothe B, Nathalie W, et al. ACE inhibition reduces activity of the plasminogen/plasmin and MMP systems in the brain of spontaneous hypertensive stroke-prone rats. *Neurosci Lett*, 2005, 376: 205-209.
- [5] Rosenberg GA, Narratil W. Metalloproteinase inhibition blocks edema in cerebral hemorrhage in the rat. *Neurology*, 1997, 48: 921-926.
- [6] Alvarez SJ, Delgado P, Abilleira S, et al. Temporal profile of matrix metalloproteinase and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome. *Stroke*, 2004, 35: 1316-1319.
- [7] 王德生, 刘巍松, 丰宏林, 等. 局部亚低温对猪脑温度梯度的影响. *中华医学杂志*, 2001, 81: 849-851.
- [8] MacLellan CL, Davies LM, Fingas MS, et al. The influence of hypothermia on outcome after intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*, 2006, 37: 1266-1268.
- [9] 胡波, 孙圣刚, 梅元武, 等. 亚低温在大鼠脑缺血再灌注中对氨基酸和自由基系统动态平衡的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25: 195-198.
- [10] Schaller B, Graf R. Hypothermia and stroke: the pathophysiological background. *Pathophysiology*, 2003, 10: 7-35.
- [11] 吴国祥, 李承晏, 刘春英, 等. 亚低温处理大鼠脑缺血再灌注损伤后神经干细胞增殖的动态变化. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28: 515-517.
- [12] 简志宏, 朱珊珊, 刘仁忠. 亚低温对创伤性脑水肿大鼠-氧化氮及脑水含量的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28: 217-220.

(修回日期: 2007-07-20)

(本文编辑: 易 浩)