

论著

文章编号:1000-5404(2013)13-1398-04

血小板源性生长因子受体在实验性蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用

张光伟¹, 贺学农¹, 周昌龙¹, 夏小辉¹, 孙晓川², 谢延凤² (402160 重庆, 重庆医科大学附属永川医院神经外科¹; 400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院神经外科²)

[摘要] **目的** 通过研究大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后脑水肿及细胞凋亡情况,初步探讨血小板源性生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)参与早期脑损伤的可能机制。**方法** 采用随机数字表法将成年雄性SD大鼠分配至假手术组、SAH组、SAH+Imatinib组、SAH+PDGF-BB组。Imatinib为PDGFR拮抗剂,PDGF-BB为其激动剂,每组18只。采用血管内丝线穿刺颈内动脉分叉处的方法,建立SAH模型。SAH+Imatinib组大鼠在建模前1h,行腹腔注射Imatinib处理;SAH+PDGF-BB组大鼠建模前1h,行侧脑室注射PDGF-BB处理。处理后24h,对各组动物的死亡率、神经功能学评分和脑水含量指标进行研究;RT-PCR、Western blot检测海马组织Caspase-3的表达。**结果** SAH+PDGF-BB组大鼠死亡率、脑组织含水量最高,神经行为功能学评分最低($P < 0.01$);SAH+Imatinib组与SAH组比较,大鼠死亡率、脑组织含水量有所下降,神经行为功能学评分有所提高($P < 0.01$);与其他组比较,SAH+PDGF-BB组大鼠海马组织Caspase-3 mRNA表达最高($P < 0.01$),SAH+Imatinib组与SAH组比较,海马组织Caspase-3 mRNA表达有所下降($P < 0.01$);Western blot检测趋势与RT-PCR检测结果一致。**结论** PDGFR参与SAH后早期脑损伤,其拮抗剂Imatinib能在一定程度上减轻早期脑损伤。

[关键词] 蛛网膜下腔出血;早期脑损伤;血小板源性生长因子受体;凋亡;脑水肿

[中图分类号] R341; R363; R743.35

[文献标志码] A

Role of platelet-derived growth factor receptor in early brain injury following subarachnoid hemorrhage

Zhang Guangwei¹, He Xuenong¹, Zhou Changlong¹, Xia Xiaohui¹, Sun Xiaochuan², Xie Yanfeng² (¹Department of Neurosurgery, Yongchuan Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160, ²Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To observe cephaloedema and cell apoptosis in rats following subarachnoid hemorrhage (SAH), and to explore the mechanism of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) involving in the development of early brain injury. **Methods** Adult male SD rats were randomly divided into 4 groups including a sham operation group, a SAH group, a SAH + imatinib group, and a SAH + PDGF-BB group ($n = 18$). SAH mouse models were established by using intravascular silk puncture of the internal carotid artery crotch. The rats of the SAH + imatinib group were given an intraperitoneal injection of imatinib at 1 h before modeling, while those of the SAH + PDGF-BB group were given an intracerebroventricular injection of PDGF-BB at 1 h before modeling. After treatment for 24 h, the mortality, water content in brain and neurological function score were determined. Caspase-3 expression in hippocampus was detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** The mortality, brain water content and caspase-3 expression level were the highest in the SAH + PDGF-BB group, but the neurological function score was the lowest ($P < 0.01$). The parameters were reduced when SAH rats were injected with imatinib ($P < 0.01$). **Conclusion** PDGFR may participate in the pathogenesis of early brain injury following SAH, and its antagonist imatinib can reduce brain injury to a certain degree.

[Key words] aneurysmal subarachnoid hemorrhage; early brain injury; platelet-derived growth factor receptor; apoptosis; cephaloedema

Corresponding author: Zhou Changlong, Tel: 86-23-85382926, E-mail: 582745843@qq.com

动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aneurysmal subarachnoid hemorrhage, SAH)是神经外科常见的颅内自发性

出血性疾病,因其可怕的致死率和致残率,严重威胁人类生命健康。早期脑损伤被认为是产生后期脑血管痉挛和神经后遗症的重要原因之一^[1]。因此,了解SAH后早期脑损伤的形成机制才是预防晚期脑血管痉挛和神经后遗症的首要前提。早期脑损伤是指动脉瘤破裂

[通信作者] 周昌龙,电话:(023)85382926, E-mail: 582745843@qq.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130305.1419.009.html> (2013-03-05)

后,血液进入蛛网膜下腔后的最初72 h内对全脑所造成的急性损伤。目前,早期脑损伤的发生机制仍无定论,综合国内外的研究显示,SAH后血脑屏障的破坏与神经元的凋亡是其中的关键^[2]。研究报道,SAH可致脑脊液中血小板源性生长因子的表达水平升高,激活血小板源性生长因子受体^[3](platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)。而Ras/MAPK途经的启动则是PDGFR信号转导通路的重要环节之一^[4]。MAPK可以促进JNK的磷酸化,再通过转录依赖或转录非依赖的方式调控下游靶基因的表达或靶蛋白的活性而介导细胞凋亡和脑水肿^[5]。因此,本研究以PDGFR作为切入点,对SAH后早期脑损伤的发生机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

SD雄性成年大鼠72只,体质量(250±30)g;均由重庆医科大学实验动物中心提供。外科手术器械1套(上海浦东金环医疗用品有限公司),4号尼龙线购自日本Astron公司,Imatinib、PDGF-BB粉剂购自美国Amresco公司,单克隆即用型兔抗大鼠Caspase-3抗体试剂盒购自美国Sigma公司,硝酸纤维素膜(上海普易生物技术有限公司),抗β-actin单克隆抗体(美国Santa Cruz公司),Trizol、逆转录和扩增试剂盒、引物合成(上海生物工程公司),DNA标准(广州威佳公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药方法 按照随机数字表将SD大鼠分为4组:假手术组、SAH组、SAH+Imatinib组、SAH+PDGF-BB组,每组均为18只,若动物死亡,随机补充,以保证每组的样本量。本实验采用Bederson等^[6]报道的血管内丝线穿刺颈内动脉分叉处的方法成功建立大鼠SAH模型,SAH+Imatinib组大鼠在建模前1 h,行腹腔注射PDGFR拮抗剂(Imatinib 120 mg/kg)处理;SAH+PDGF-BB组大鼠建模前1 h,行侧脑室注射PDGFR激动剂(PDGF-BB 100 μg/kg)处理。

1.2.2 观察指标 在建立SAH模型后24 h,分别对各组动物的死亡率、神经功能学评分和脑含水量指标进行观察。神经功能学评分参考Garcia神经功能评分标准,包括以下6项:自主运动;四肢运动的对称性;前爪的伸展性;攀爬运动;肢体的本体感觉;触须反应。最低分3分,最高分18分,得分越低则神经功能缺失越严重。采用双盲法于术后24 h评分并记录。评估实验大鼠脑水分含量的方法如下:各组大鼠在断头取脑并切取双侧海马后直接称重(湿质量),后用烤箱(105℃,72 h)烘烤,随后再称量(干质量)。脑含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.2.3 标本处理 观察结束,断头取脑;手术切取双侧海马组织,用4℃PBS缓冲液100 mL冲洗3次,将标本取适当大小装入微量离心管内,编号后同上清液置入-70℃冰箱内保存,供RT-PCR和Western blot法检测。

1.2.4 检测指标 RT-PCR和Western blot法检测海马组织Caspase-3表达。

1.2.5 RT-PCR 大鼠Caspase-3上游引物:5'-GACAA-CAACGAAACCTCCGT-3',下游引物:5'-GGCAGTAGTCGCCTCT-

GAAG-3';全长350 bp;β-actin上游引物:5'-TGACGTGGACATC-CGCAAAG-3',下游引物:5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3';全长200 bp。将在-70℃冰箱中保存的标本组织取出,按说明书依次进行提取总RNA,合成第1、2链,电泳分析等步骤。凝胶图像分析系统检测灰度,Caspase-3/β-actin比值表示Caspase-3 mRNA相对水平。

1.2.6 Western blot法检测 标本从冰箱取出,依次进行蛋白质提取、定量(Bradford法)、SDS-PAGE电泳、考马斯亮蓝染色、转移及免疫显色等步骤。使用图像分析软件分别测定4组中Caspase-3条带的灰度值,将条带灰度值与β-actin条带灰度值相比,得出统计数据。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件,多组间比较行单因素方差分析,组间比较行t检验。

2 结果

2.1 成功建立SAH模型后24 h各组动物的死亡率、神经功能学评分和脑含水量指标的比较

SAH+PDGF-BB组与其他3组比较,大鼠死亡率和脑组织含水量最高,神经功能学评分最低($P < 0.01$);SAH+Imatinib组与SAH组比较,大鼠死亡率有所下降,脑组织含水量有所减少,神经功能学评分有一定程度的提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表1。

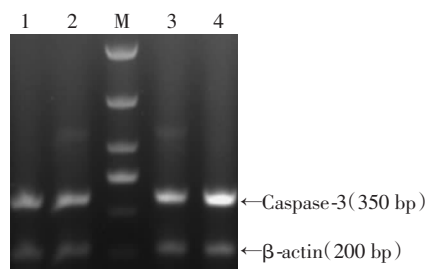
表1 各组大鼠死亡率、脑含水量、神经功能学评分结果($n = 18, \bar{x} \pm s$)

组别	死亡率(%)	脑含水量(%)	神经功能学评分(分)
假手术组	0	76.27 ± 0.34 ^a	16.24 ± 1.42 ^a
SAH组	44.44	80.91 ± 0.79 ^a	10.15 ± 2.24 ^a
SAH + Imatinib组	33.33	78.14 ± 0.45 ^{ab}	14.47 ± 1.74 ^{ab}
SAH + PDGF-BB组	83.33	84.77 ± 1.04	7.04 ± 1.07

a: $P < 0.01$,与SAH+PDGF-BB组比较;b: $P < 0.01$,与SAH组比较

2.2 海马组织Caspase-3 mRNA的表达

SAH+PDGF-BB组(1.909 ± 0.171)与其他3组[假手术组(0.201 ± 0.134)、SAH组(1.743 ± 0.114)、SAH+Imatinib组(1.532 ± 0.127)]比较,海马组织Caspase-3 mRNA表达最高($P < 0.01$);SAH+Imatinib组与SAH组比较,海马组织Caspase-3 mRNA表达有所下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见图1。



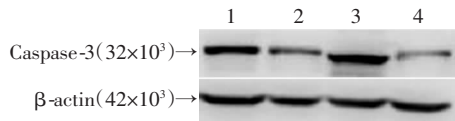
1:假手术组;2:SAH+Imatinib组;M:标准;3:SAH组;4:SAH+PDGF-BB组

图1 RT-PCR检测各组大鼠海马组织Caspase-3 mRNA的表达

2.3 海马组织Caspase-3蛋白Western blot检测结果

SAH+PDGF-BB组(0.697 ± 0.019)与其他3组[假手术组(1.317 ± 0.213)、SAH组(0.558 ± 0.027)、SAH+Imatinib组(0.326 ± 0.121)]比较,海马组织Caspase-3蛋白表达最高

($P < 0.01$); SAH + Imatinib 组与 SAH 组比较, 海马组织 Caspase-3 蛋白表达有所下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。Caspase-3 蛋白表达趋势与 RT-PCR 检测结果一致, 进一步验证 Caspase-3 蛋白在各组的表达趋势。见图 2。



1: SAH 组; 2: SAH + Imatinib 组; 3: SAH + PDGF-BB 组; 4: 假手术组
图 2 Western blot 检测各组大鼠海马组织 Caspase-3 蛋白的表达

3 讨论

尽管近些年在动脉瘤的诊断和治疗上都取得了长足的进步, 如 CTA 技术广泛应用、介入治疗迅速普及, 但 SAH 的总体死亡率仍高达 51%, 而且 1/3 的幸存者都遗留有不同程度的神经功能缺失, 从而严重影响生活质量。目前, 国内外关于 SAH 的研究主要包括两个方面: 即 SAH 后早期脑损伤和 SAH 后期脑血管痉挛。在过去的很长时间, 研究的重点都是脑血管痉挛, 但进展甚微, 近些年来, SAH 的死亡率和致残率并无明显改善。然而, 不容忽视的是, SAH 后的大部分死亡病例均发生于起病后的早期(尚未发生脑血管痉挛), 且许多 SAH 后遗症也无法用脑血管痉挛解释。研究表明, SAH 致脑脊液中 PDGF 表达增加, 激活 PDGFR。而 Ras/MAPK-JNK 途径与细胞凋亡及脑水肿密切相关^[4], 因此, 本实验以 PDGFR 作为切入点, 论证 Ras/MAPK-JNK 通路参与早期脑损伤的过程。目前, 鲜有报道 PDGFR 的激活与 SAH 后早期脑损伤的关系, 而论证 Ras/MAPK-JNK 通路参与早期脑损伤的过程则是本研究的创新点之一。应用 PDGFR 抑制剂 Imatinib 及其激动剂 PDGF-BB 来验证 PDGFR 在 SAH 后早期脑损伤中的作用, 则尚少见文献报道。

国外研究证实 SAH 后 24 h, 实验动物脑内有显著脑水肿存在, SAH 后脑水肿是混合型的, 但早期以血管源性水肿为主, SAH 后的血管源性水肿与血脑屏障的破坏有关。SAH 后血脑屏障的破坏主要有几方面的诱发因素: 一是与 SAH 后血管内皮细胞和星形胶质细胞发生凋亡有关, 这主要是由 SAH 后 p53、TNF- α 等因子的诱导凋亡的作用引起, 这些因子的活化及表达增加与 SAH 后急性期发生的缺氧损伤和凝血酶的作用相关^[7-8]。SAH 后血脑屏障的破坏的另一个重要原因则是血管周围基质的降解。有研究表明, SAH 后 24 h, c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino-terminal kinase, JNK) 的表达被明显上调^[9], 在磷酸化 c-Jun 启动凋亡通路的同时, JNK 可以诱导基质蛋白酶(如基质金属蛋白酶-9/2)的活化, 降解细胞外基质成分及增加水通道蛋白(AQP-1、AQP-4)的表达造成血脑屏障的渗

透性增加^[1]。第三, JNK 使内皮紧密连接蛋白(zonula occludens-1, ZO-1)和 Occludin 不仅表达下降, 而且从正常的细胞膜移位至细胞质^[10]。ZO-1 是构成内皮细胞紧密连接的重要成分之一, 为血脑屏障的紧密连接的特异性标志, 对各种影响血脑屏障功能的刺激敏感。

细胞凋亡是早期脑损伤的另外一种表现形式, SAH 后细胞凋亡的发生、调控涵盖了凋亡的各种通路, 包括线粒体通路、死亡受体通路、Caspase 依赖或非 Caspase 依赖方式等。文献^[5]报道, MAPK 可以促进 JNK 的磷酸化, 再通过转录依赖或转录非依赖的方式调控下游靶基因 Caspase-3 的表达或活性而介导细胞凋亡。JNK 被活化后可从胞质转位入核, 通过磷酸化激活 c-Jun、c-Fos、Elk-1 等转录因子而调节下游凋亡相关靶基因 Caspase-3 表达, 同时介导线粒体途径的细胞凋亡^[11-13]。活化的 JNK 也可留在胞质内, 通过磷酸化直接调节 Bcl-2 家族成员的活性而介导细胞凋亡的发生^[14]。

本研究发现, SAH 组大鼠脑组织含水量较假手术组增加, SAH + Imatinib 组大鼠死亡率、脑组织含水量均较 SAH 有所下降, 而神经功能学评分有所提高, 凋亡相关因子 Caspase-3 表达有所下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); SAH + PDGF-BB 组与另 3 组比较, 大鼠死亡率, 脑组织含水量最高, 神经功能学评分最低, Caspase-3 表达最活跃, 差异显著 ($P < 0.01$)。研究表明, SAH 可致脑脊液中 PDGF 的表达水平升高, 激活 PDGFR, 而 Ras/MAPK 途径的启动则是 PDGFR 信号转导通路的重要环节之一。因此, 我们有理由推测: SAH 后血脑屏障的破坏与 PDGFR 的活化有关。PDGFR 的活化可通过 JNK 途径: 一方面导致胶质细胞和内皮细胞凋亡; 另一方面促进细胞外基质降解; 再一方面, 调节 Occludin 和 ZO-1 的磷酸化, 促使其从细胞膜移位至细胞质, 从而调节内皮细胞间的通透性, 以上 3 个方面共同作用, 导致血脑屏障被破坏, 使其通透性增加, 脑水肿加重。早期脑损伤中细胞凋亡的发生和调控也与 PDGFR 的活化有关, MAPK-JNK 途径可能是关键环节。

参考文献:

- [1] Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, et al. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(8): 916-925.
- [2] Cahill J, Calvert J W, Zhang J H. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(11): 1341-1353.
- [3] Maeda Y, Hirano K, Hirano M, et al. Enhanced contractile response of the basilar artery to platelet-derived growth factor in subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke, 2009, 40(2): 591-596.
- [4] Hughes A D, Clunn G F, Refson J, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle [J].

- Gen Pharmacol, 1996, 27(7): 1079-1089.
- [5] Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(4): 1061-1095.
- [6] Bederson J B, Germano I M, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat [J]. Stroke, 1995, 26(6): 1086-1092.
- [7] Sibon I, Menegon P, Rouanet F, et al. MRI of acute brainstem ischaemia: cytotoxic versus vasogenic oedema? [J]. Eur J Neurol, 2004, 11(7): 497-498.
- [8] 陈佳琳, 姚声涛, 郭宗铎. TNF- α 在实验性蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 34(15): 1620-1622.
- [9] Zhou M L, Shi J X, Hang C H, et al. Potential contribution of nuclear factor-kappaB to cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(9): 1583-1592.
- [10] Yatsushige H, Ostrowski R P, Tsubokawa T, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosci Res, 2007, 85(7): 1436-1448.
- [11] Simard J M, Geng Z, Woo S K, et al. Glibenclamide reduces inflammation, vasogenic edema, and caspase-3 activation after subarachnoid hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(2): 317-330.
- [12] Claassen J, Vu A, Kreiter K T, et al. Effect of acute physiologic derangements on outcome after subarachnoid hemorrhage[J]. Crit Care Med, 2004, 32(3): 832-838.
- [13] Pan J, Zhao Y X, Wang Z Q, et al. Expression of FasL and its interaction with Fas are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson disease[J]. Neurosci Lett, 2007, 428(2/3): 82-87.
- [14] Weston C R, Davis R J. The JNK signal transduction pathway[J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(2): 142-149.
- (收稿:2012-12-16;修回:2013-02-04)
(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2013)13-1401-01

个案与短篇

1 例内镜下切除直肠巨大 LST 的疗效及围术期护理

张 扬, 于凌燕, 于 劲, 李春花, 刘春雨 (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院消化内科)

[关键词] 大肠巨大侧向发育型肿瘤; 内镜下黏膜剥离术; 围术期; 护理

[中图分类号] R473.5 [文献标志码] B

大肠侧向发育型肿瘤(lateral spreading tumor, LST)易发生癌变, 须及时治疗。传统的 LST 治疗主要采取内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)^[1], 本例因病灶大小限制不能采用传统 EMR, 故采取内镜下黏膜剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)治疗。现将本例治疗方法、疗效及围术期护理报告如下。

1 临床资料

1.1 资料

患者, 女性, 66 岁, 以“反复腹泻 2 年余”为主要临床表现。解黄色糊样便, 4~5 次/d, 伴有黏液, 未见脓血, 伴有腹胀、肛门坠胀感。2011 年 10 月外院肠镜提示: 升结肠管状腺瘤, 直肠病变。并于内镜下行“升结肠管状腺瘤切除术”。2012 年 8 月上述症状逐渐加重, 外院肠镜提示: 直肠绒毛管状腺瘤改变, 病理活检提示: 直肠活检组织绒毛管状腺瘤。2013 年 4 月以“直肠侧向生长型息肉”收入我科, 建议其行手术治疗。

1.2 器械和材料

CF-Q260JI 电子结肠镜, CF-Q260AI 放大染色内镜, HOOK 刀、IT 刀, MAJ-70 注射器, 钛夹及释放器均为 Olympus, APC300 氩离子型凝固器(REBE 德国), 0.4% 靛胭脂, 1:1 000 肾上腺素生理盐水等。

1.3 术前准备

检查准备: 术前患者完善 3 大常规及凝血 4 项, HIV、梅毒、肝炎 10 项等化验, 心电图、B 超、CT、肠镜结果等。肠道准备: 患者前 1 d 晚上进食清淡、易消化的流质饮食, 术前禁食 12 h, 用聚乙二醇电解质散(和爽散剂)溶解在 2 000 mL 的清水中+比沙可啶片 10 mg 顿服, 行彻底肠道准备。必要时用 0.9% 生理盐水 1 000 mL 行清洁灌肠。心理护理: 详细向患者及家属介绍此次手术的目的、操作过程、可能发生的并发症及术前术后的注意事项, 消除患者的恐惧、紧张及疑虑心理。护理人员要及时评估患者的心理状况, 加强与患者的有效沟通, 及时汇报病情, 减轻患者的心理负担^[2]。

1.4 术中配合

患者取左侧卧位, 双腿屈膝靠近腹部, 充分暴露臀部, 予心电图监护, 吸氧 2 L/min。静脉留置针按(2~2.5 kg)^[3]予丙泊酚进行静脉麻醉。充分麻醉后常规进镜, 于直肠距门齿 8~15 cm 处可见黏膜结节样增生, 边界清晰, 表面大小不等结节样增生, NBI 观察可见 IPCL 倾向于 III A 型(佐野分型), 靛胭脂溶液染色后可见病变边界清晰, 近环周, 局部点状标记, 使用玻璃酸钠+甘油果糖进行黏膜下层注射, 使病变与固有层分离, 以整个病灶明显隆起为标准。于标记点外侧 2 mm 用 Hook 刀环周切开, 然后用 IT 刀进行剥离治疗, 注射与剥离交替进行, 最后切除整块病变。过程中可见创面少量渗血, 给予止血钳处理, 剥离后可见数处直径 0.4~0.5 cm。全层切开, 给予内镜下钛夹夹闭, 创面大小约 14 cm×10 cm, 病变大小约 13 cm×8 cm, 整个过程顺利, 用时 7 h, 切除物送病检。术后予止血、抗感染等对症支持治疗。

[通信作者] 张 扬, E-mail: panqianguang@aliyun.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130530.0838.002.html>(2013-05-30)