

亚低温对脑缺血再灌注后血脑屏障损伤及明胶酶活性的影响

苏 颖¹ 孙圣刚^{1,2}

摘要 目的:应用 MRI 动态监测亚低温对脑缺血再灌注后血脑屏障损伤的影响,并探讨其保护机制。**方法:**雄性 Wistar 大鼠 42 只,随机分为常温缺血组、亚低温缺血组和假手术组。线栓法建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,分别于再灌注 3.5h、24h 和 5d 行 T1WI 增强扫描,再灌注 24h 和 5d 进行大鼠神经功能缺损评分,脑组织明胶酶活性测定,以及明胶酶活性与磁共振表现的相关分析。**结果:**亚低温治疗明显减小了各时间点 T1WI 信号强化的范围和强度,显著降低缺血再灌注早期及晚期神经功能缺损评分和脑组织明胶酶活性。常温缺血组再灌注 24h 后 MMP-9 活性与 T1WI 信号强化范围正相关。**结论:**亚低温能明显减轻缺血再灌注后血脑屏障损伤的范围和程度,促进神经功能恢复,其保护机制可能与亚低温降低 MMP-9、MMP-2 的活性有关。

关键词 脑缺血;亚低温;血脑屏障;明胶酶;磁共振成像

中图分类号:R49,R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-10-0893-04

Effects of mild hypothermia on the blood-brain barrier and the activity of gelatinases following transient focal cerebral ischemia/SU Ying, SUN Shenggang/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22 (10): 893—896

Abstract Objective:To investigate the effects of mild hypothermia on the blood-brain barrier (BBB) injury after transient focal cerebral ischemia by means of magnetic resonance imaging, and explore the underlying mechanism. **Method:**Forty two Wistar rats were randomly divided into the normothermic ischemic group, hypothermic ischemic group and sham-operated group. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was induced by the intraluminal suture method. Contrast enhanced T1-weighted imaging was taken at 3.5h, 24h and 5d after reperfusion respectively. The neurological deficit scores were evaluated at 24h and 5d after reperfusion, and correspondingly, brain MMP-2 and MMP-9 activities were quantified by gelatin zymography. Correlation between MR findings and the activity of gelatinases was analyzed. **Result:**At all time points lesion volume and signal intensity on postcontrast T1WI were significantly reduced by hypothermia. Hypothermia improved neurological outcome and inhibited the activity of gelatinases during both the early and late phases of ischemia-reperfusion. The activity of MMP-9 at 24h after reperfusion showed significantly correlation with the enhanced volume on postcontrast T1WI. **Conclusion:**Mild hypothermia attenuates BBB disruption and improves neurological outcome after transient focal cerebral ischemia. Suppressing activities of MMP-2 and MMP-9 may be responsible for the vascular protection of hypothermia.

Author's address Dept. of Neurology, Affiliated Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022

Key words cerebral ischemia; mild hypothermia; blood-brain barrier; gelatinases; magnetic resonance imaging

溶栓是目前治疗急性脑梗死的重要手段,但因溶栓增加了继发性出血的危险,其临床应用受到限制。MMP-2、MMP-9 属于基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族成员中的明胶蛋白酶类。近年来研究发现,它们通过降解细胞外基质及基底膜成分,在脑缺血再灌注引起的微血管损伤中扮演着重要角色^[1]。大量动物及临床试验已证实亚低温(32—35℃)对脑缺血具有保护作用。本实验借助磁共振成像技术连续动态的监测亚低温对局部脑缺血再灌注后血脑屏障损伤的影响,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康雄性 Wistar 大鼠 42 只,体重 250—300g (由德国海德堡大学动物中心提供)。实验动物随机分为常温缺血组(n=14)、亚低温缺血组(n=14)和假手

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科,湖北武汉 430022

2 通讯作者:孙圣刚(华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科,湖北武汉 430022)

作者简介:苏颖,女,博士研究生

收稿日期:2007-02-06

术组(n=14)。 每组各分 2 个亚组,分别为缺血 1.5h 再灌注 24h 组(n=7)和缺血 1.5h 再灌注 5d 组(n=7)。

1.2 动物模型制作

以含 1%氟烷、70%N₂O、30%O₂ 的混合气体对大鼠进行吸入性麻醉,保留自主呼吸。采用改良 Zea Longa 等^[2]线栓法建立大鼠右侧大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型,于缺血 1.5h 后拔出线栓,形成脑缺血再灌注。假手术组不插入线栓,其余处理相同。根据 Maier 提出的方法亚低温组大鼠于插入线栓 1h 后开始酒精擦浴及冰敷^[3],使肛温于 10—15min 内降至 32℃,此时相应脑温约为 32.5℃。通过温度探测仪实时监测肛温并反馈性调节加热板,使大鼠肛温维持在 32℃ 4h。复温时通过加热板,使大鼠肛温于 20—25min 内恢复至 37℃。所有大鼠在制备模型前均分离右侧股静脉,置入留置针管,以备注射造影剂。常温组和假手术组动物在麻醉过程中,体温通过温控加热板维持在 37℃。

1.3 血脑屏障损伤的测定

采用 Brucker 公司超导 2.35T 磁共振波谱成像仪(Biospec 24/40),孔径 120mm,最大梯度强度约 180mT/m。表面线圈有效孔径 40mm。受检动物仰卧,取标准轴位固定,行冠状面扫描。所有动物于拔出线栓后立即行 DWI 扫描,再分别于恢复灌注后 3.5h、24h 和 5d 行 T1WI 增强扫描。① DWI:TR=3000ms,TE=60ms,FOV=4cm×4cm,matrix128×64。② T1WI:TR=400ms,TE=15ms,FOV=4cm×4cm,matrix128×96。T1WI 增强扫描在股静脉注射 Gd-DTPA (0.5mmol/kg) 10min 后进行。磁共振扫描过程中,动物体温通过热风扇维持在 37℃。

所有磁共振扫描图像转到 SUN Sparcstation 10 工作站(SUN Microsystems,USA)进行图像后处理。运用图像分析软件 ANALYZE (Version 7.5, CNSsoftware, Rochester, MN, USA) 测定不同时间点 T1WI 增强扫描信号强化区域体积及平均信号强度值,结果以体积比(rV-T1WI)=强化信号体积/同侧半球体积×100%,强度比(rSI-T1WI)=强化区域平均信号强度值/对侧镜像区平均信号强度值×100%表示。DWI 扫描结果以体积比(rV-DWI)=异常高信号体积/同侧半球体积×100%表示。

1.4 神经功能缺陷评分

参照 Longa 等^[2]确立的 5 级评分法,0 分:提起鼠尾,大鼠向地面伸展两前肢;1 分:左前肢持续屈曲,提尾实验阳性;2 分:向左旋转;3 分:向左侧倾倒;4 分:无自发行走,意识障碍。分别于再灌注 24h 和再灌注 5d 对所有大鼠进行评分。

1.5 明胶酶谱法测定脑组织 MMP-2、MMP-9 活性

所有大鼠于再灌注 24h 和 5d 经心脏灌注生理盐水,迅速断头取脑。根据文献^[4]方法改动,梗死侧大脑半球去除额极和枕极 3mm 后匀浆离心,提取上清,Bradford 法(Bio-Rad)蛋白定量后,调整上清蛋白浓度一致。取等容上清,经 50%饱和硫酸铵盐析得浓缩蛋白粗提液。15μl 纯化样品与 4×加样缓冲液混合后上样,与分子量标准 (Bio-RAD Precision plus proteinTM) 一同经含 0.1% Gelatin 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(40mA 恒流,3h)。电泳后将凝胶置于 2.5%Triton - X100 溶液内,室温下摇床振荡洗脱 2 次,加入明胶酶缓冲液 (50mM Tris pH7.5,10mM CaCl₂,0.02% NaN₃),37℃ 恒温孵育 17h。孵育结束后凝胶经染色液(0.25%考马斯亮蓝、50%甲醇、7%乙酸)染色 0.5h 及脱色液 (50%甲醇、10%乙酸)脱色,直至蓝色背景上显示出透明条带。运用 NIH1.6 软件测定各条带积分光密度值。

1.6 统计学分析

实验数据以均数±标准差或中位数表示。运用 SPSS11.5 进行差异显著性检验和相关回归分析。计量资料的组间比较采用 *t* 检验,计数资料的组间比较采用秩和检验,*P*<0.05 为有显著性意义。

2 结果

2.1 动物模型鉴定

DWI 扫描结果显示:假手术组大鼠 DWI 扫描无异常表现。常温缺血组和亚低温缺血组大鼠于脑缺血 1.5h 后 DWI 上均出现异常高信号,主要分布于缺血侧纹状体和(或)顶叶皮质区,其 rV-DWI 无明显组间差异(*P*>0.05,图 1),该结果说明本实验线栓法制备的缺血模型具有良好的重复性,避免由于组间缺血程度的差异而影响实验结果的评判。

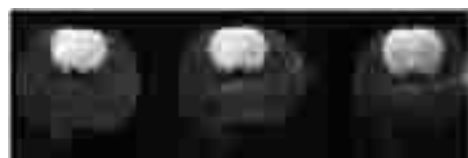


图 1 各组大鼠缺血 1.5h DWI 扫描

2.2 血脑屏障损伤

T1WI 增强扫描结果显示:常温缺血组和亚低温缺血组各时间点梗死侧均出现片状强化,且多见于基底核区。常温组 rV-T1WI 随时间延长呈递增趋势,再灌注 5d 后有所下降;亚低温组各时间点 rV-T1WI 变化不明显,且显著低于常温组相应时间点(*P*<0.05,图 2)。常温及亚低温组 rSI-T1WI 随时间

的延长呈递增趋势,但亚低温组各时间点 rSI-T1WI 均低于常温组 ($P<0.05$, 表 1)。假手术组在 T1WI 增强扫描中无异常表现。

2.3 神经功能缺损评分

亚低温缺血组再灌注 24h 及 5d 后神经功能缺损评分均明显低于常温缺血组相应时间点 ($P<0.05$)。假手术组大鼠未见神经功能障碍。见表 2。

2.4 MMP-2、MMP-9 蛋白酶活性

再灌注 24h 后常温组和亚低温缺血组的脑组织明胶酶谱均显示: 蓝色背景下两条透明条带 MMP-2 和 MMP-9 分别位于 72 KDa 及 92 KDa 处; 亚低温

组 MMP-2、MMP-9 蛋白酶活性显著低于常温组 ($P<0.01$, 图 3)。再灌注 5d 后常温组和亚低温缺血组 MMP-2 水平进一步升高, MMP-9 则下降至检测水平以下; 亚低温组 MMP-2 蛋白酶活性仍明显低于常温组 ($P<0.05$, 表 3)。假手术组仅显示微弱 MMP-2 条带, 未见 MMP-9 水解条带。

2.5 明胶酶活性与血脑屏障损伤的相关性分析

常温缺血组大鼠再灌注 24h 后 MMP-9 蛋白酶活性与 T1WI 信号强化区体积正相关, 回归方程: $y=1.98x-97.5, r=0.96, (P<0.05)$; MMP-2 蛋白酶活性与 T1WI 信号强化范围及强度均无明显相关性。

表 1 各实验组不同时间点 T1WI 增强扫描高信号体积及信号强度的比较

($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	rV-T1WI			rSI-T1WI		
	R3.5h(n=14)	R24h(n=14)	R5d(n=7)	R3.5h(n=14)	R24h(n=14)	R5d(n=7)
常温缺血组	6.4 $\pm$ 2.5	13.3 $\pm$ 4.5	9.2 $\pm$ 4.7	145.0 $\pm$ 19.8	153.2 $\pm$ 17.1	155 $\pm$ 19.9
亚低温缺血组	2.1 $\pm$ 0.6 ^①	3.3 $\pm$ 0.8 ^①	2.1 $\pm$ 0.3 ^①	135 $\pm$ 20 ^①	136 $\pm$ 9.1 ^①	142 $\pm$ 15 ^①

注: R3.5h, R24h, R5d 分别为再灌注 3.5h、24h 和 5d; ①与常温缺血组相比 $P<0.05$

表 2 各实验组大鼠不同时间点神经功能缺陷评分

评分值 (中位数 M, 评分值)

组别	动物数	评分值	
		R 24h	R 5d
常温缺血组	7	3	2
亚低温缺血组	7	1 ^①	1 ^①

注: R 24h, R 5d 分别为再灌注 24h 和 5d。①与常温缺血组相比 $P<0.05$

表 3 各实验组大鼠不同时间点脑组织

明胶酶活性 ($\bar{x}\pm s$, 积分光密度)

组别	R 24h		R 5d	
	MMP-2(n=7)	MMP-9(n=7)	MMP-2(n=7)	MMP-9(n=7)
假手术组	78 $\pm$ 21	-	73 $\pm$ 19	-
常温缺血组	1186 $\pm$ 481	973 $\pm$ 330	1583 $\pm$ 473	-
亚低温缺血组	428 $\pm$ 159 ^①	384 $\pm$ 104 ^①	935 $\pm$ 126 ^①	-

注: R24h, R5d 分别为再灌注 24h 和 5d。①与常温缺血组相比 $P<0.05$

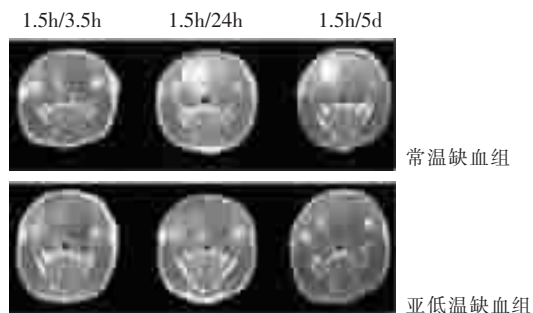


图 2 常温缺血组和亚低温缺血组不同时间点 T1WI 增强扫描

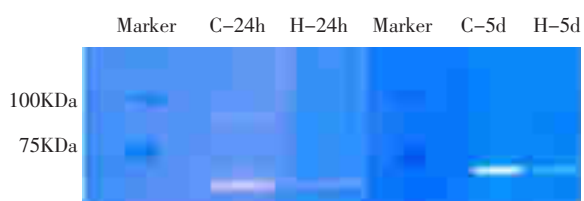


图 3 缺血再灌注 24h 和 5d 各实验组脑组织明胶酶谱分析

C-常温缺血组 H-亚低温缺血组

3 讨论

目前认为, 缺血再灌注导致的血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)通透性增加是导致出血性转化的主要原因, 成为临床上限制急性脑梗死溶栓治疗的首要因素。亚低温(32—35℃)对脑缺血的保护作用广泛, 其机制可能与降低组织氧耗量及代谢率, 抑制自由基生成, 减少兴奋性氨基酸和炎性介质释放, 降低 Ca^{2+} 内流, 减轻 BBB 损伤有关。本实验中, 我们首次利用磁共振增强扫描对缺血再灌注后血脑屏障的损伤进行评定, 实现在同一活体上连续动态的监测病理变化, 为深入研究亚低温对血脑屏障的作用特点提供充分可靠的评价指标。

正常脑组织中, 静脉注射的顺磁性造影剂 Gd-DTPA 不能通过 BBB, 只有在 BBB 完整性破坏时, T1WI 增强扫描才会出现信号强化, 其强化范围和信号强度均反映出 BBB 的受损情况^[5]。国外已有动物研究提示脑缺血再灌注早期 T1 加权上梗死区的脑实质强化, 预示着出血性梗死的发生^[6]。本研究证实缺血及再灌注早期持续给予亚低温治疗能明显减轻再灌后 BBB 损伤, 促进神经功能恢复, 与文献报道一致^[7]。此外, 我们发现亚低温对 BBB 的保护作用起效快, 作用稳定而持久, 不仅能明显缩小再灌注早期 BBB 损伤的范围和程度, 对再灌注晚期 BBB 的损伤同样具有显著的保护作用。

然而亚低温对脑缺血再灌注后 BBB 的保护机制目前尚不清楚。近年研究表明, 明胶蛋白酶 MMP-2、MMP-9 在血脑屏障损伤过程中具有重要作用。激活的明胶蛋白酶通过降解细胞外基质 IV 型胶原、层粘连蛋白和纤维连接蛋白直接破坏 BBB 的重要成

分——基底膜,加重 BBB 损伤。本实验明胶酶谱分析显示缺血再灌注 24h 后 MMP-9 的蛋白酶活性与 BBB 损伤的范围正相关,进一步证实了明胶蛋白酶,尤其是 MMP-9 是导致 BBB 通透性增加的重要因素,这与 Rosenberg^[1]观察的结果基本一致。因此我们推测,亚低温对 BBB 的保护作用可能与其降低明胶蛋白酶活性有关。

有关亚低温影响明胶酶活性的文献国内尚未见报道,本实验结果证实,缺血及再灌注早期亚低温治疗不仅能明显抑制再灌注早期 MMP-2、MMP-9 蛋白酶活性,对再灌注晚期持续升高的 MMP-2 蛋白酶活性同样具有显著的抑制作用,这与亚低温对 BBB 的保护效应相一致。据此我们认为,亚低温对脑缺血再灌注后 BBB 的保护作用与其降低明胶蛋白酶活性密切相关,其机制可能包括:①MMP-9 启动子区域包含有 NF- κ B 和 AP-1 (activating protein-1)结合位点,两种转录因子的激活与 MMP-9 的表达关系密切^[8-9]。亚低温可能通过影响 NF- κ B 抑制蛋白的磷酸化抑制 NF- κ B 向细胞核的易位与结合^[10],从而降低 MMP-9 的表达。②MMPs 的活性受到内源性组织抑制物 (tissue inhibitors of MMPs, TIMPs)的特异性抑制。Lee 等^[11]发现亚低温促进了缺血再灌注后 TIMP-2 的表达。TIMP-2 是 MMP-2 的特异性抑制物,亚低温处理组 MMP-2 活性降低可能与 TIMP-2 表达增加,对 MMP-2 的特异性抑制作用增强有关。③浸润的中性粒细胞与活化的小胶质细胞是缺血脑组织内 MMPs 的重要来源,亚低温治疗可以降低缺血脑组织内黏附分子的表达,减少白细胞浸润和小胶质细胞活化,从而间接降低脑内 MMPs 水平^[12-13]。

4 结论

急性脑梗死的溶栓和亚低温联合治疗提供了新的立足点,同时也证实了 MRI 在急性脑梗死的疗效监测及预后评价中具有极大的潜力和重要意义。

参考文献

[1] Rosenberg G, Estrada E, Deneoff J, et al. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain[J].Stroke,1998, 29:2189—

2195.
[2] Longa E, Weinstein P, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J].Stroke, 1989,20:84—91.
[3] Maier C, Ahern K, Cheng M, et al. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation [J].Stroke,1998,29:2171—2180.
[4] Zhang J, Gottschall P. Zymographic measurement of gelatinase activity in brain tissue after detergent extraction and affinity-support purification [J].J Neurosci Methods,1997,76(1):15—20.
[5] Neuman T, Kastrup A, Crespigny A, et al. Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation [J].Stroke,2000,31:1965—1972.
[6] Knight R, Barker P, Fagan S, et al. Prediction of impending hemorrhagic transformation in ischemic stroke using magnetic resonance imaging in rats [J].Stroke,1998,29:144—151.
[7] Huang F, Zhou L. Effect of mild hypothermia on the changes of cerebral blood flow, brain blood barrier and neuronal injuries following reperfusion of focal cerebral ischemia in rats [J].Chin Med J (Engl),1998,111(4):368—372.
[8] Wu C, Hsieh H, Jou M, et al. Involvement of p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK and nuclear factor- κ B in interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocytes [J]. J Neurochem,2004,90(6):1477—1488.
[9] Eberhardt W, Huwiler A, Beck K, et al. Amplification of IL-1 β -induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF- κ B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways [J].J Immunol,2000,165(10):5788—5797.
[10] Han H, Karabiyikoglu M, Kelly S, et al. Mild hypothermia inhibits nuclear Factor- κ B translocation in experimental stroke [J].J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23:589—598.
[11] Lee J, Yoon Y, Moseley M, et al.Reduction in levels of matrix Metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke [J]. J Neurosurg, 2005,103(2):289—297.
[12] Gidday J, Gasche Y, Copin J, et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia [J].Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005,289(2):H558—568.
[13] Deng H, Han H, Cheng D, et al. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation [J]. Stroke, 2003,34:2495—2501.