

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-07-0510-03

# 大鼠脑缺血再灌注中血脑屏障通透性的改变与基质金属蛋白酶 9 表达的关系

袁 毅, 雷立芳, 涂秋云, 资晓宏

(中南大学湘雅三医院神经内科, 湖南省长沙市 410083)

[关键词] 神经病学; 缺血再灌注损伤; 基质金属蛋白酶 9; 血脑屏障; 实验动物, 大鼠

[摘要] 目的 探讨大鼠脑缺血再灌注中基质金属蛋白酶 9 的表达变化与血脑屏障通透性改变的关系。方法 采用大鼠右侧大脑中动脉缺血再灌注模型, 通过测定渗出血管外的伊文思蓝含量来评价血脑屏障通透性的变化, 采用免疫组织化学的方法检测各组大鼠脑基质金属蛋白酶 9 的表达。90 只大鼠用于上述实验检测, 分别为对照组、假手术组、缺血 2 h 后再灌注 3 h、6 h、12 h、1 d、2 d、4 d 和 7 d 组共 9 组, 每组 5 只。结果 与对照组和假手术组比较脑缺血再灌注后 3 h 脑组织伊文思蓝渗出量增加 ( $0.18 \pm 0.08$  比  $0.86 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$ ), 1 d 后达到高峰 ( $4.64 \pm 1.27 \mu\text{g/g}$ ), 2 d 以后逐渐减小 ( $4.48 \pm 0.65 \mu\text{g/g}$ )。基质金属蛋白酶 9 表达阳性细胞在缺血再灌注 12 h ( $3.64 \pm 0.56$  比  $6.76 \pm 2.26$ )、1 d ( $11.24 \pm 2.64$ )、2 d ( $21.52 \pm 2.03$ )、4 d ( $16.66 \pm 1.38$ ) 和 7 d ( $14.64 \pm 3.77$ ) 均显著增加, 其中 2 d 为高峰期。结论 脑缺血再灌注时基质金属蛋白酶 9 阳性细胞的表达与血脑屏障通透性的增加呈时间相关性, 提示基质金属蛋白酶 9 参与了脑缺血急性期血脑屏障的破坏。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

## The Relation of the Permeability of Blood Brain Barrier and Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in the Rats Model with Cerebral Ischemic and Reperfusion

YUAN Yi, LEI Li-Fang, TU Qiu-Yun, and ZI Xiao-Hong

(Department of Neurology, Xiangya 3 Hospital, Central South University, Changsha 410083, China)

[KEY WORDS] Ischemic Reperfusion Injury; Matrix Metalloproteinase-9; Blood Brain Barrier; Laboratory Animal, Rat

[ABSTRACT] Aim study the change of expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and the permeability of blood brain barrier (BBB) in the rats model with cerebral ischemic and reperfusion. Methods A right middle cerebral artery ischemic reperfusion models were established in this experiment, the change of the permeability of BBB had been evaluated by measuring the content of Evan's blue (EB). The expression of MMP-9 in ischemia reperfusion rat brains had been investigated by immunohistochemistry technology. Result After cerebral ischemic reperfusion, the amount of EB exudation of the brain tissues begin increase in 3 h ( $0.18 \pm 0.08$  vs  $0.86 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$ ), and will get its peak at the time of 1 d ( $4.64 \pm 1.27 \mu\text{g/g}$ ), and will decrease gradually 2 d later ( $4.48 \pm 0.65 \mu\text{g/g}$ ). The expression of MMP-9 increases notably at 12 h ( $3.64 \pm 0.56$  vs  $6.76 \pm 2.26$ ), 1 d ( $11.24 \pm 2.64$ ), 2 d ( $21.52 \pm 2.03$ ), 4 d ( $16.66 \pm 1.38$ ), and 7 d ( $14.64 \pm 3.77$ ) later after ischemic reperfusion, and will go to its peak at the second day. Conclusion The expression of MMP-9 positive cells presents time related with the increase of BBB permeability after cerebral ischemic reperfusion, which point out the MMP-9 participated the process of the damage of BBB.

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的完整性在脑缺血再灌注损伤的病理生理过程中起着重要的作用, 缺血后再灌注将导致 BBB 严重破坏, 从而促发明显的脑水肿和梗死<sup>[1]</sup>。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一组含  $\text{Zn}^{2+}$  的、参与降解包括骨在内的全身各种组织细胞外基质(如胶原、层

黏素、明胶、弹性硬蛋白、黏连蛋白及蛋白多糖等)的蛋白水解酶家族, 主要来自嗜中性粒细胞、胶质细胞、发育过程中的小脑星形细胞、神经元和血管内皮细胞等<sup>[2,3]</sup>。MMP 在机体各种组织的发育和修复、肿瘤发生发展、炎症反应等过程中发挥着重要的作用<sup>[4,5]</sup>; 近年来还发现脑缺血及再灌注后也将出现 MMP 表达的增加, 其中 MMP-9 与脑缺血再灌注损伤的关系尤为密切<sup>[6,7]</sup>。本实验采用大鼠大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)栓塞模型, 研究脑局灶性缺血再灌注后不同时间点 BBB 通透性的变化及 MMP-9 的表达规律。

[收稿日期] 2008-05-29 [修回日期] 2008-06-29

[基金项目] 湖南省自然科学基金(04JJ6015; 06JJ50062)

[作者简介] 袁毅, 博士研究生, 主治医师, 主要从事脑血管病及神经系统遗传性疾病的基础和临床研究, 联系电话 15974169448, E-mail 为 docyuan@163.com。雷立芳, 博士研究生, 主治医师, 主要从事脑血管病及神经系统的遗传性疾病的基础和临床研究。通讯作者资晓宏, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管病的基础和临床研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

选用健康雄性清洁级 SD 大鼠 90 只, 体重 200~280 g, 鼠龄 3~4 月, 由湖南农业大学动物中心提供。随机分成血脑屏障组和 MMP-9 组, 每组再细分为对照组、假手术组以及模型组; 其中对照组和假手术组各 5 只大鼠, 模型组 35 只大鼠又分为缺血 2 h 再灌注 3 h、6 h、12 h、1 d、2 d、4 d 和 7 d 组共 7 小组。每小组各 5 只大鼠。

### 1.2 动物模型制备

参照 Longa 线栓法<sup>[8]</sup>, 并稍加改良制作大鼠右侧 MCA 缺血再灌注模型。取直径约 0.185 mm 的钓鱼丝线, 剪裁成长度为 5.5 cm 各段, 用火柴燎后火焰将丝线一端烧成球状, 使丝线头部直径为 0.25~0.28 mm, 栓线插入 MCA 起始处, 于各时间段栓塞后 2 h 进行再灌注, 再灌注时丝线拔至颈总动脉分叉处即可。假手术组大鼠同样分离出动脉, 但栓线插至距动脉交叉约 1.3~1.5 cm 左右。实验选用苏醒后行走时向右侧旋转或右侧肢体瘫痪的大鼠进行。

### 1.3 血脑屏障通透性评价

各组大鼠均在处死前 30 min 通过尾静脉注射 2% 伊文思蓝 (Evan's blue, EB) 2 mL/kg, 用甲酰胺浸泡法<sup>[9]</sup>测脑组织 EB 含量。首先建立 EB 标准曲线, 求出各标准管相应的光密度值(X)与 EB 含量(Y)的直线回归方程( $Y = 11.33X - 0.347$ ); 然后取缺血灶周围重约 0.4 g 脑组织标本, 放入盛有 4 mL 甲酰胺的试管中, 加上橡皮塞, 45℃水浴 24 h, 加温数小时后需用一细棒将浮在上面的脑组织轻轻压沉, 以便脑组织中 EB 能充分溶解出来, 水浴 24 h 后用吸管轻轻吸出上清液, 比色测光密度值, 按公式计算脑组织 EB 含量: 脑组织 EB 含量( $\mu\text{g/g}$  脑湿重) = 标准品 EB 含量( $\mu\text{g/mL}$ )  $\times$  甲酰胺量 (mL)  $\div$  脑湿重 (g), 标准品 EB 含量系根据标准曲线回归方程求得。

### 1.4 免疫组织化学方法检测基质金属蛋白酶 9 的表达

各组大鼠分别在所需时间点处死, 处死时先经水合氯醛麻醉, 再灌注 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液约 200 mL。开颅取脑, 置相同固定液后固定 24~48 h, 连续恒冷冰冻切片, 片厚 20  $\mu\text{m}$ 。然后每隔 3 张取 1 张切片, 用 10 mmol/L PBS (pH 7.4) 漂洗, 0.3% 过氧化氢室温孵育 15 min, 5% 小牛血清白蛋白室温封闭, 1:200 多克隆兔抗鼠 MMP-9 抗体中 4℃孵育过夜, 1:200 生物素化的羊抗兔 IgG 室温孵育 2.5 h, 1:200 的 ABC 复合物室温孵育 1 h, DAB 显色, 10 mmol/

L PBS 终止反应, 晾干, 脱水, 中性树胶封片。阴性对照采用正常羊血清代替一抗, 二抗为兔抗鼠 MMP-9 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司生产)。MMP-9 阳性表达为细胞质染色, 阳性细胞为棕黄色, 正常细胞呈绿色。每只大鼠选 3 张切片, 每张切片在 40 倍物镜下随机选取 5 个不重叠视野, 共计 15 个视野, 计算每个视野的阳性细胞数。

### 1.5 统计学处理

测定结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。应用单因素方差分析和各组均数  $t$  检验处理,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。变量正态分布的两变量间的相关分析用双尾 Spearman 相关检验, 所有数据使用 SPSS11.5 软件进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠脑组织中伊文思蓝渗出量变化

脑缺血再灌注 3 h 脑组织 EB 渗出量增加, 可见损伤区蓝染较正常区域颜色深, 脑缺血再灌注 6~12 h 脑组织 EB 渗出量逐渐增加, 再灌注 1 d 脑组织 EB 渗出量达到高峰, 2 d 以后逐渐减小, 模型各小组分别与假手术组相比, 在 3 h 差异无显著性, 6 h~4 d 有显著性差异(表 1,  $P < 0.01$ )。

表 1. 各组大鼠脑组织基质金属蛋白酶 9 的表达及脑组织伊文思蓝含量变化

分 组	MMP-9 阳性细胞数		EB 含量 ( $\mu\text{g/g}$ )	
	鼠数	$\bar{x} \pm s$	鼠数	$\bar{x} \pm s$
对照组	5	3.64 $\pm$ 0.56	5	0.18 $\pm$ 0.08
假手术组	5	4.00 $\pm$ 0.45	5	0.21 $\pm$ 0.03
再灌注 3 h	5	4.75 $\pm$ 1.10	5	0.86 $\pm$ 0.12
再灌注 6 h	5	5.02 $\pm$ 1.69	5	1.43 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>
再灌注 12 h	5	6.76 $\pm$ 2.26 <sup>ac</sup>	5	2.97 $\pm$ 0.56 <sup>bd</sup>
再灌注 1 d	5	11.24 $\pm$ 2.64 <sup>bd</sup>	5	4.64 $\pm$ 1.27 <sup>bd</sup>
再灌注 2 d	5	21.52 $\pm$ 2.03 <sup>bd</sup>	5	4.48 $\pm$ 0.65 <sup>bd</sup>
再灌注 4 d	5	16.66 $\pm$ 1.38 <sup>bd</sup>	5	2.03 $\pm$ 0.16 <sup>bd</sup>
再灌注 7 d	5	16.66 $\pm$ 1.38 <sup>bd</sup>	5	1.05 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与再灌注 3 h 组比较。

### 2.2 各组大鼠脑组织中基质金属蛋白酶 9 表达的动态变化

在对照组和假手术组均可见少量 MMP-9 免疫阳性细胞表达(表 1)。与假手术组相比较, 缺血再灌注 3~6 h 组没有明显差别。缺血再灌注 12 h、1 d、2 d、4 d 和 7 d 组均显著增加, 其中 2 d 为高峰期,

4 d 后渐下降。再灌注后 1 d~4 d 与再灌 3 h 比较, 也有显著性差异(表 1)。

### 2.3 血脑屏障通透性改变与基质金属蛋白酶 9 表达的关系

双尾 Spearman 相关检验发现, 在缺血再灌注 3h 后脑组织 EB 渗出量与脑组织 MMP-9 表达的阳性细胞数呈正相关, 相关系数( $r$ )为 0.764。

## 3 讨论

脑缺血性疾病是目前严重威胁人类健康的疾病之一。但是缺血性卒中发生、发展的机制仍不完全清楚, 并且缺乏有效的干预措施; 缺血性卒中的超早期诊断、溶栓治疗的时间窗的扩大、减少溶栓后出血及神经保护药物的选择是目前临床工作中急待解决的难题。大量研究证实, 蛋白酶和自由基是导致缺血再灌注损伤的主要因子<sup>[10,11]</sup>, 而溶栓的过程也就是缺血再灌注的过程, 因此, 研究脑缺血超早期再灌注后 BBB 的通透性改变对脑梗塞早期诊断及指导脑梗死的溶栓治疗具有重要的临床意义。

研究发现, 局灶性脑缺血再灌注后 3h 脑组织 EB 渗出量开始增加, 说明血脑屏障受到破坏, 其通透性开始增加, 再灌注 1d 达高峰, 目前认为, 再灌注所致的血脑屏障的破坏可能与下列因素有关: 1

缺血再灌注后大量释放的氧自由基对基底膜的损伤作用; (2) 激活的蛋白水解酶对基底膜组成蛋白的降解作用; (3) 能量代谢障碍, 内皮细胞和组成 BBB 的胶质细胞功能损害等。导致 BBB 的结构或功能的完整性损伤, 通透性增加, 以基底膜损伤最为重要<sup>[12]</sup>。

研究结果同时发现 MMP-9 阳性细胞在缺血再灌注后 3 h 开始表达增加, 这与 Rosenberg 等<sup>[7]</sup>的结果一致, 而且与血脑屏障的开放时间一致; MMP-9 阳性表达细胞数在缺血再灌注后 12 h、1 d、2 d、4 d 和 7 d 均显著增加, 其中 2 d 为高峰期, 4 d 后渐下降。MMP-9 阳性细胞主要出现在缺血及周边区的内皮细胞和中性粒细胞等。这说明了 MMP-9 参与了急性脑缺血再灌注损伤, 并进一步证实缺血性 BBB 的开放和 MMP-9 活性增高有关。

本研究的结果显示 BBB 的通透性改变与缺血后再灌注的时间密切相关, 缺血再灌注 3 h, BBB 的通透性开始增加; 再灌注 6~12 h, BBB 通透性逐渐

增加; 再灌注 1 d, BBB 的通透性明显增加, 且达高峰, 2 d 以后逐渐减小, 这一结果提示脑梗死超早期给予溶栓是可行的。但应高度重视溶栓后再灌注引起的脑损害及 BBB 开放引起的脑水肿。

Mark 等<sup>[13]</sup>用 ELISA 发现 MMP-9 的增高在患者发生缺血性中风后 3~6 h 出现异常升高, 其敏感性达 98.1%, 特异性达 93.1%。这与目前的动物模型研究结果是一致的, 即 MMP-9 阳性细胞在缺血再灌注脑组织中的表达具有时效性, 同时 Mark 等的研究结果与脑缺血再灌注动物模型的血脑屏障开放时间也是一致的。因而, 可以认为急性缺血性中风患者血清中 MMP-9 的改变与脑缺血再灌注时血脑屏障破坏密切相关, 而血清 MMP-9 测定有可能为缺血性脑中风的早期诊断开辟新的途径。

### [参考文献]

- [1] Yang GY, Loris A. Reperfusion induced injury to the blood brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke*, 1994, **25**: 1 658-665.
- [2] 张承俊, 朱兴雷. 辛伐他汀对肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导的人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 9 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (1): 50-52.
- [3] 陈白玉, 李熙芹, 何汉江, 等. 急性冠状动脉综合征患者基质金属蛋白酶 9 基因多态性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (3): 209-212.
- [4] Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1993, **4**: 197-250.
- [5] Lukes A, Murr Bryce S, Lukes M, et al. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 1999, **19**: 267-284.
- [6] Romanic AM, White RF, Arleth M, et al. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size [J]. *Stroke*, 1998, **29** (8): 1 020-030.
- [7] Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, et al. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin 1 and microglia in cell cultures [J]. *Brain Res*, 2001, **893** (1-2): 104-112.
- [8] 辽维靖, 范明, 杨运煌, 等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, **24** (6): 345-348.
- [9] 虞佩兰, 杨于嘉. 小儿脑水肿与颅内高压 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999, 349-350.
- [10] Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts [J]. *Am J Physiol*, 2001, **280**: C53-C60.
- [11] Aoki T, Sumii T, Mori T, et al. Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats [J]. *Stroke*, 2002, **33**: 2 711-717.
- [12] Asahi M, Wang XY, Mori T, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia [J]. *Neurosci*, 2001, **21**: 7 724-732.
- [13] Mark AR, Howard JK, Jeffrey RD, et al. Early biomarkers of stroke [J]. *Clin Chem*, 2003, **49** (10): 1 733-739.

(此文编辑 胡必利)