

· 论 著 ·

新生鼠缺氧缺血性脑损伤 S-100 NSE mRNA 和蛋白水平变化

王兴河, 秦梅, 樊绍曾, 曾纪骅

(复旦大学医学院儿科医院新生儿科, 上海 200032)

【摘 要】 目的 研究缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后血和脑脊液中 S-100 蛋白(S-100)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平的变化及其与脑细胞死亡数的相关性,并探讨这些蛋白质水平变化的机制。**方法** 采用 7 d 龄 SD 大鼠 HIBD 模型,应用放射免疫方法动态观察 HIBD 血液和脑脊液中 S-100, NSE 水平的变化,用 RT-PCR 的技术和免疫组织化学的方法动态观察 HIBD 后不同时间点脑组织中 S-100, NSE mRNA 和蛋白水平表达的变化。**结果** HI 后血液中 24 h, 48 h S-100 分别为 $(1.205 \pm 0.183) \mu\text{g/L}$ 和 $(1.235 \pm 0.097) \mu\text{g/L}$, NSE 分别为 $(3.97 \pm 0.228) \text{ng/ml}$ 和 $(3.76 \pm 0.234) \text{ng/ml}$, 对照组 S-100 和 NSE 分别为 $(0.645 \pm 0.05) \mu\text{g/L}$ 和 $(3.15 \pm 0.164) \text{ng/ml}$ 。脑脊液中 24 h, 48 h S-100 分别为 $(1.28 \pm 0.031) \mu\text{g/L}$, $(1.32 \pm 0.097) \mu\text{g/L}$, NSE 分别为 $(7.15 \pm 0.717) \text{ng/ml}$, $(4.29 \pm 0.144) \text{ng/ml}$, 对照组 S-100 和 NSE 分别为 $(0.68 \pm 0.059) \mu\text{g/L}$ 和 $(3.42 \pm 0.322) \text{ng/ml}$ 。血液和脑脊液中 S-100, NSE 在 24~48 h 与各自对照组比较都有明显增加 ($P < 0.01$), 同时其水平的变化和脑细胞死亡数呈正相关。NSE mRNA 转录高峰出现在缺氧缺血后 24 h, 而 S-100 mRNA 高峰在 48 h。HIBD 后不同时间点脑组织 S-100 蛋白的表达阳性面积的变化是随时间变化逐渐增加(12~96 h)。NSE 表达的阳性面积随 HIBD 时间延长呈进行性减少 ($P < 0.01$)。**结论** S-100, NSE 能作为缺氧缺血性脑损伤的标志物,在缺氧缺血后 24~48 h 为取标本合适时间。血液和脑脊液中 S-100 水平的升高,不单纯是脑组织损伤时漏出所致,还与转录和翻译水平的增加有关;而血和脑脊液 NSE 水平的升高主要是由脑组织损伤漏出。

【关 键 词】 缺氧缺血性脑损伤; S-100 蛋白; 神经元特异性烯醇化酶; 新生大鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2000)06-0381-05

Changes of the Expression of the mRNA and Protein Level of S-100 and NSE after Hypoxic-ischemic Brain Damage in Newborn Rats

WANG Xing-He, QIN Mei, FAN Shao-Zeng, ZENG Ji-Hua

Department of Neurology, Children's Hospital, Medical Center of Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Objective To evaluate the relationship between changes of cerebrospinal fluid (CSF) or blood S-100 protein (S-100), neuron specific enolase (NSE) levels and the severity of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE), and to explore the mechanism of changes of these protein levels. **Methods** Seven-day postnatal SD rats were used. Their serial blood and CSF S-100 and NSE were measured by radioimmunoassay. By using the RT-PCR technique the expression of mRNA for S-100 and NSE in the brain tissue at different points of time after HI injury was tested. Immunohistochemical assay was used to investigate the changes of the expression of S-100 and NSE at the protein level. **Results** The values of S-100, NSE were $(1.205 \pm 0.183) \mu\text{g/L}$ and $(3.97 \pm 0.228) \text{ng/ml}$ respectively at 24 hours and $(1.235 \pm 0.097) \mu\text{g/L}$, $(3.76 \pm 0.234) \text{ng/ml}$ respectively at 48 hours in the blood, were $(1.28 \pm 0.031) \mu\text{g/L}$,

〔收稿日期〕 2000-04-21; 〔修回日期〕 2000-09-12

〔基金项目〕 国家“九五”攻关课题, 专题合同编号: 96-904-06-04

〔作者简介〕 王兴河(1962-), 男, 博士, 主治医师

(7.15 ± 0.717) $\eta\text{g/ml}$ respectively at 24 hours and (1.32 ± 0.097) $\mu\text{g/L}$, (4.29 ± 0.144) $\eta\text{g/ml}$ respectively at 48 hours in the CSF after HI injury. The values of S-100, NSE were increased significantly in both the blood and CSF samples during 24~48 hrs after HI injury than in the control group (0.645 ± 0.05 $\mu\text{g/L}$, 3.15 ± 0.164 $\eta\text{g/ml}$ and 0.68 ± 0.059 $\mu\text{g/L}$, 3.42 ± 0.322 $\eta\text{g/ml}$ respectively). The increment corresponded well with death cell counts in the brain after HI injury; a peak of mRNA expression of NSE emerged at 24 hours after HI injury, while S-100 mRNA occurred at 48 hours. The positive area of the expression of S-100 at the protein level increased progressively during 12~96 hrs, but the expression of NSE decreased significantly with the lapse of time. **Conclusions** S-100 and NSE are sensitive markers for hypoxic-ischemic brain damage(HIBD). The appropriate time for sample collection is 24~48 hrs after HI injury. The mechanism of S-100 level increase in the blood and CSF after HI injury is not only due to the leakage from damaged brain cells but also through a high expression of S-100 mRNA and S-100 protein, while the elevation of NSE in the blood and CSF was mainly due to the leakage from neuronal damage.

Key words: Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE); S-100 protein (S-100);

Neuron specific enolase (NSE); Neonatal rat

新生儿缺氧缺血性脑病(Hypoxic-Ischemic Encephalopathy, HIE)是新生儿期死亡和致残重要疾病之一,寻找能早期判断新生儿HIE脑损伤的严重程度的特异性标志物有十分重要的临床意义,有学者报道^[1~6]脑缺血或脑创伤时血液和脑脊液中S-100蛋白(S-100)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平有一定变化。本实验研究新生鼠脑缺血(HI)S-100, NSE水平变化的规律、评价其对HIBD的诊断价值并探索它们水平变化的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

新生7 d SD大鼠,平均体重 14.5 ± 2 g,雌雄各半,共288只,由上海医科大学实验动物部提供;S-100放免Kit瑞典AB Sangtec Medical公司产品;NSE放免Kit法国CIS Bio International公司产品;S-100生物素化单抗IgG及ABC试剂盒美国Vector公司产品;NSE单抗试剂盒丹麦Dako公司产品;引物设计由中科院细胞所上海生工生物工程公司合成。引物序列:NSE:(1)5'-TCGAGGACATCCCAGCCATCA-3', (2)3'-GGTGCGATGGTGCTGTTGATG-5',产物长度244 bp;S-100:(1)5'-GAGCTGGAGAAGGCCATGGTTG-3', (2)3'-TCAAAGAACTCATGACAGGCTGTGG-5',产物长度262bp。

1.2 方法

1.2.1 HIBD模型制备 乙醚吸入麻醉后,双线结扎左侧颈总动脉,恢复4 h后给吸入8% O₂和92% N₂混合气体2 h,在造模后6 h, 12 h, 48 h, 72 h, 96 h 6个时间点采取血液、脑脊液测S-100, NSE

水平和脑组织S-100, NSE检测(每组6只);又在造模的即刻, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h检测脑组织S-100, NSE mRNA表达的变化(每组8只)。

1.2.2 检测方法 血液和脑脊液S-100, NSE用放射免疫法测定;脑组织S-100, NSE mRNA检测,用RT-PCR技术;脑组织S-100, NSE阳性细胞用免疫组化ABC法。S-100单抗工作液稀释度1:100, NSE单抗工作液稀释度1:200;S-100, NSE的定量测定用雷卡显微镜及配套处理系统和计算机分析系统,用10×40物镜测定30 μm^2 面积内阳性面积。

1.2.3 结果分析与统计学处理 用POMS-4, POMS-15医学统计软件。两组比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 缺氧缺血(HI)后血液和脑脊液S-100, NSE水平变化

如表1所示S-100在HI后12 h已明显升高。48 h达高峰, 96 h与对照组差异无显著性意义;NSE水平变化见表2,在HI后24, 48 h与对照组比较差异有显著性意义。

2.2 HI后血和脑脊液中S-100, NSE水平变化与脑死亡细胞数的相关性

S-100在HI后12~72 h与脑细胞死亡数呈显著正相关, NSE在HI后12~48 h有显著正相关。见表3。

2.3 HI后不同时间脑组织S-100 mRNA及NSE mRNA表达的变化

以扫描辉度值表示,如表4所示S-100 mRNA在HI 6 h表达明显增加, 48 h达高峰, 96 h与对照

组差异无显著意义;而 NSE mRNA 在 HI 2 h 与对照组比有显著性差异,24 h 达高峰,96 h 差异无显著性。

2.4 脑组织中 S-100,NSE 检测

HI 后以未结扎侧作对照组,结扎侧的 S-100 在胶质细胞内阳性表达在实验观察期间随着 HI 后时间的延长而逐渐增强(表 5)。HI 后 12 h S-100 阳性细胞只有扫描强度的增强,而细胞形态无明显变化。24~48 h 阳性细胞体增大,突起明显的数目增多,至 72~96 h 几乎全部阳性细胞的胞体增大及突起(图 1,2);而 NSE 在神经元内阳性表达随着 HI 后时间的延长而逐渐减弱。(表 6,图 3,4)

表 3 血液、脑脊液 S-100,NSE 水平变化与脑细胞死亡数的相关性

Table 3 Degree of relationship between changes of S-100, NSE both in the blood or CSF and the number of dead brain cells (r , $n=6$)

	脑脊液		血液	
	S-100 r	NSE r	S-100 r	NSE r
6h	0.711	0.53	0.613	0.59
12h	0.926	0.925	0.705	0.90
24h	0.891	0.789	0.78	0.78
48h	0.72	0.88	0.76	0.84
72h	0.88	0.70	0.86	0.57
96h	0.376	0.60	0.49	0.124

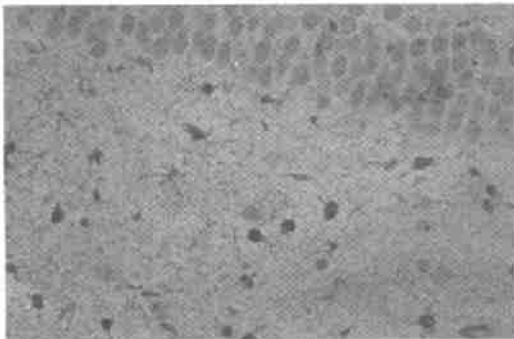


图 1 对照组 72 h 海马区胶质细胞 S-100 蛋白呈阳性反应 (×400)

Figure 1 Positive immunohistochemical stain of astrocyte S-100 protein in the hippocampus of the control group

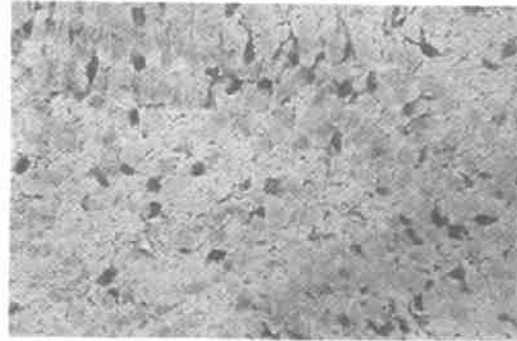


图 2 HI 后 72 h 损伤组海马区胶质细胞 S-100 蛋白免疫组化染色阳性面积明显增加 (×400)

Figure 2 Increase in positive immunohistochemical stain of astrocyte S-100 protein in the hippocampus 72 h after HI injury

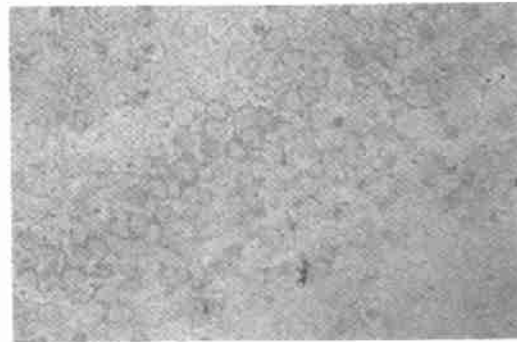


图 3 对照组 24 h 海马区神经元 NSE 免疫组化可见神经元胞浆中 NSE 阳性反应 (×400)

Figure 3 Immunohistochemical stain of neuron NSE in the hippocampus of the control group, and positive NSE stain in neuron cytoplasm

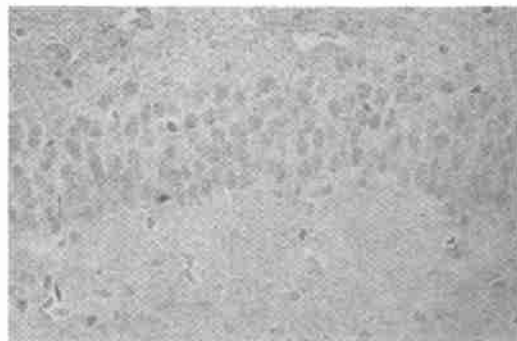


图 4 HI 后 4 h 损伤组海马神经元 NSE 免疫组化染色阳性反应明显减弱 (×400)

Figure 4 Decrease in positive immunohistochemical stain of neuron NSE in the hippocampus 24 h after HI injury

表1 HI后血液、脑脊液S-100水平变化

Table 1 Changes of S-100 level in the blood and CSF after HI injury ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

	对照	HI组					
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
血	0.645±0.050	0.70±0.060	0.976±0.196	1.205±0.183	1.235±0.097	0.838±0.061	0.718±0.077
<i>t</i>		1.584	3.952	7.106	12.68	5.547	1.836
<i>P</i>		>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05
脑脊液	0.68±0.059	0.72±0.065	1.01±0.185	1.28±0.031	1.32±0.097	0.85±0.078	0.76±0.060
<i>t</i>		1.151	4.172	7.181	13.75	4.216	0.2396
<i>P</i>		>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

注:S-100在血液和脑脊液水平变化显示正相关 $r=0.098$, $P<0.01$

表2 HI后血液、脑脊液NSE水平变化

Table 2 Changes of NSE level in the blood and CSF after HI injury ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

	对照	HI组					
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
血	3.15±0.164	3.21±0.164	3.44±0.306	3.97±0.228	3.76±0.234	3.53±0.379	3.24±0.142
<i>t</i>		0.523	1.880	6.225	4.586	2.104	0.896
<i>P</i>		>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05
脑脊液	3.42±0.322	3.46±0.230	3.63±0.381	7.15±0.717	4.29±0.144	3.89±0.42	3.76±0.24
<i>t</i>		0.226	1.053	11.62	3.855	2.183	2.095
<i>P</i>		>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05

注:NSE在血液和脑脊液水平变化显示正相关 $r=0.842$, $P<0.05$

表4 HI后脑组织S-100 mRNA和NSE mRNA表达变化

Table 4 Changes of the expression of S-100 mRNA and NSE mRNA in brain tissues after HI injury ($\bar{x} \pm s$)

	对照	HI 组								
		0 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
S-100 mRNA										
扫描辉度值	14228±1810	15861±2639	16598±2216	16855±2338	17950±2416	25471±2654	28989±2945	31453±3492	18506±2703	16281±1572
<i>t</i>		1.14	2.02	2.17	4.10	8.57	10.46	10.75	3.22	2.09
<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.05	>0.05
NSE mRNA										
扫描辉度值	18966±1275	20765±1282	22618±2086	24149±2553	27868±3450	34107±3814	55489±3828	38069±4183	28170±2149	19310±1377
<i>t</i>		2.43	3.56	4.44	5.93	9.22	22.17	10.70	9.02	0.50
<i>P</i>		>0.05	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

表5 HI后脑组织切片S-100阳性面积的变化

Table 5 Changes of S-100 positive area of brain tissue slices after HI injury ($\bar{x} \pm s$, $/30\mu\text{m}^2$)

对照	HI组					
	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
对照侧	1.18±0.16	1.09±0.12	1.15±0.14	1.10±0.18	1.12±0.14	1.10±0.15
结扎侧	1.65±0.52	2.38±0.14	4.91±0.62	6.01±0.56	7.54±0.50	9.27±0.63
<i>t</i>	2.064	7.270	14.48	20.12	29.74	30.42
<i>P</i>	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表6 HI后脑组织切片NSE阳性面积的变化
Table 6 Changes of positive NSE area of brain tissue slices after HI injury ($\bar{x} \pm s$, $/30\mu\text{m}^2$)

对照	HI组					
	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
对照侧	19.65 $\pm$ 2.65	20.32 $\pm$ 3.05	20.04 $\pm$ 3.22	20.35 $\pm$ 3.69	21.07 $\pm$ 2.85	20.35 $\pm$ 3.42
结扎侧	19.25 $\pm$ 2.92	14.54 $\pm$ 2.81	9.62 $\pm$ 2.31	6.23 $\pm$ 1.26	4.12 $\pm$ 0.57	2.71 $\pm$ 0.35
<i>t</i>	0.2554	3.379	6.248	8.847	14.16	12.56
<i>P</i>	0.803	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

S-100蛋白是一种酸性钙结合蛋白,它主要集中在星形胶质细胞内,参与了神经细胞的生长、分化和代谢的调节^[9];NSE是糖原酵解途径的关键酶,定位于神经元内^[7~9]。因此,它们水平的变化可反映神经组织不同成分的损伤。本研究表明,HI后S-100,NSE先后均升高,以S-100蛋白升高较早出现,持续亦较久。本研究又表明,S-100,NSE水平变化与脑细胞死亡数有较好的相关性,因此S-100,NSE浓度升高可反映中枢神经系统缺氧缺血损害的情况,可作为一种量化的特异性生化指标用于HIBD的诊断。根据升高的高峰时间,在HI后24~48 h取样本为合适。

为什么HIBD时血和CSF中S-100,NSE水平会升高呢?本研究观察到脑的缺氧缺血后不论S-100或NSE的mRNA表达均增加。说明它们在转录的水平有增加,而进一步研究发现S-100蛋白在脑损伤后24 h阳性细胞胞体增大,有突起,随损害时间延长这种细胞渐增多,到72 h损伤侧脑组织S-100阳性细胞几乎均为有突起的胞体增大的星形胶质细胞,S-100阳性表达面积/单位面积内与对照侧相比较从损伤后12 h开始增加,48~72 h增加幅度较大,到96 h为止仍有继续增加之势,S-100阳性细胞面积的增多与脑损害的程度和损害的时间长短呈正相关,这表明缺氧缺血型损害可使S-100翻译的水平增加;而NSE阳性表达面积/单位面积内却从损伤后12 h开始减少,24 h明显减少,染色由强转弱。HI后脑组织虽有NSE转录水平增高,但翻译水平非但未有增加反见NSE阳性细胞面积的减少,且与脑损害的程度和损害时间长短有关。

故我们认为血和CSF S-100水平的增高不仅仅有脑组织损伤漏出的因素,尚与其转录、翻译水平的增高、S-100合成增多有关,而NSE在血和CSF中水平的增加则主要是由于脑组织损伤的漏出所致。

[参 考 文 献]

- [1] Bakay RA, Sweeney KM, Wood JH. Pathophysiology of cerebrospinal fluid in head injury. Part 2. Biochemical markers for central nervous systems trauma [J]. Neurosurgery, 1986, 18 (3): 376-382.
- [2] Horn M, Seger F, Schlot W. Neuron-specific enolase in gerbil brain and serum after transient cerebral ischemia [J]. Stroke, 1995, 26 (2): 290-297.
- [3] Hardemark HG, Ericsson N, Kotwica Z, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid after experiment traumatic of focal ischemic brain damage [J]. J Neurosurg, 1989, 71 (5): 727-731.
- [4] Hardemark HG, Persson L, Bolander H, et al. Neuron-specific enolase is a marker of cerebral ischemia and infarct size in rat cerebrospinal fluid [J]. Stroke, 1988, 19 (9): 1140-1144.
- [5] Barone FC, Clark RK, Price WJ, et al. Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia [J]. Brain Res, 1993, 623 (1): 77-82.
- [6] Johnsson P. Markers of cerebral ischemia after cardiac surgery [J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 1996, 10 (1): 120-126.
- [7] Aurell A, Rosengren LE, Karisson B, et al. Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction [J]. Stroke, 1991, 22 (10): 1254-1258.
- [8] Hatfield RH, Mckernan RM. CSF neuron-specific enolase as a quantitative marker of neuronal damage in a rat stroke model [J]. Brain Res, 1992, 577 (2): 249-252.
- [9] Henrbe S, Hilmar WP, Reiber H, et al. Neuron specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases [J]. Stroke, 1994, 24 (3): 558-565.

(本文编辑:黄榕)