

· 实验研究 ·

新生鼠缺氧缺血性脑损伤内源性纤维蛋白溶酶原激活剂变化及其意义

俞丹,毛萌,雷明雨

(四川大学华西第二医院儿科,四川 成都 610041)

[摘要] 目的 新生儿缺氧缺血性脑损伤发病机制尚不十分清楚,目前缺乏有效的治疗手段。近年来,越来越多的研究显示组织纤维蛋白溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)在神经系统中起到很重要的作用。该研究欲探讨纤维蛋白溶酶原激活剂(tPA)在新生鼠缺氧缺血脑损伤中的作用。**方法** 选用Wistar大鼠7日龄的新生鼠,运用Rice-Vannucci动物模型造成新生鼠脑缺血缺氧,缺血缺氧后不同时间取新生鼠大脑检测。异硫氰酸荧光素-右旋糖酐左心室灌注分析脑缺血缺氧后新生鼠脑的再灌注障碍。用逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR),酶谱法检测损伤后不同时间tPA的表达与活性;并采用双重免疫荧光,TUNEL和DAPI染色法检测血小板聚集指标(Integrin GPIIb)与纤维蛋白(fibrin)在缺血缺氧后不同时间的表达及神经细胞凋亡。**结果** 新生鼠脑缺血缺氧后1 h,异硫氰酸荧光素-右旋糖酐心室灌注提示新生鼠大脑有明显的缺血梗塞区,而Integrin GPIIb与fibrin的表达也较对照侧明显增加。但4 h后缺血梗塞区面积明显缩小,伴有Integrin GPIIb与fibrin的表达减少。tPA的表达与活性在缺血缺氧后明显增加。随着缺氧缺血后恢复的时间延长,大脑凋亡细胞增加。**结论** tPA表达的增加在脑缺氧缺血的急性期可有助于血栓溶解,但在脑缺氧缺血的亚急性期却会导致神经细胞凋亡而加重脑损伤。

[中国当代儿科杂志,2008,10(5):651-655]

[关键词] 纤维蛋白溶酶原激活剂;脑缺氧缺血;凋亡;新生大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)05-0651-05

Changes and significance of endogenous tissue plasminogen activators in cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats

YU Dan, MAO Meng, LEI Ming-Yu. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Email: dffmmao@126.com)

Abstract: Objective The mechanism of neonatal hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) remains unclear and effective treatment approach is limited for this disorder. Many studies have shown that tissue-type plasminogen activator (tPA) plays an important role in nervous system. This study investigated the effect of tPA in HIBD in neonatal rats. **Methods** Seven-day-old Wistar rat pups were used for the Rice-Vannucci model of neonatal hypoxia-ischemia (HI). Brain samples were collected 1, 4, and 24 hrs after HI. FITC-Dextran was injected into the left ventricle of pups after HI to observe reperfusion defects of the neonatal brain. RT-PCR and tPA zymogram were used to detect the expression and activity of tPA. Double immunostaining, terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and DAPI staining were used to detect the expression of integrin GPIIb and fibrin and neuronal apoptosis. **Results** FITC-Dextran perfusion analysis indicated there was obvious infarct area in the neonatal brain and the expression of integrin GPIIb and fibrin increased significantly 1 hr after HI compared with the contralateral side. The infarct area decreased and the expression of integrin GPIIb and fibrin were reduced 4 hrs after HI. The expression and activity of tPA increased significantly in neonatal rats after HI, and peaked at 4 hrs after HI. The number of apoptotic neural cells increased progressively with the prolonged reperfusion time following HI. **Conclusions** The increase of tPA in the acute phase after HIBD may be helpful to clot dissolving, but it induces neuronal apoptosis and aggravates brain injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (5):651-655]

Key words: Tissue-type plasminogen activator; Brain hypoxia-ischemia; Apoptosis; Neonatal rats

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是儿科最常见的严重疾病之一,多数病例预后不良。缺氧缺血可损伤新生儿脑细胞,累及神经系统发育中的多个区域而遗留永久

[收稿日期]2007-11-16;[修回日期]2008-01-03
[作者简介]俞丹,女,主治医师,博士。主攻方向:发育期脑损伤。
[通讯作者]毛萌,女,教授,博士研究生导师,四川大学华西第二医院儿科,邮编:610041。

性的损伤。可致新生儿死亡,成活者常遗留脑瘫、智力低下,癫痫或学习障碍等严重后遗症^[1]。其发病机制尚不十分清楚,缺乏有效的治疗手段。此外,未成熟大脑对缺氧缺血反应可能具有年龄特异性,因此在不同的时期选择适当的治疗非常重要^[2]。

组织纤维蛋白溶酶原激活剂(tPA)和尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator,uPA)可激活纤维蛋白溶酶原形成纤维蛋白溶酶起到溶解血栓的作用^[3]。目前只有tPA获得美国食品及药物管理局的批准可作为溶栓治疗用于治疗缺血性卒中^[4]。tPA的血管内溶栓作用对于缺血后脑损伤有益。以往的研究都集中于成人,tPA在新生儿HIBD中的作用仍有待于阐明。

本研究旨在探讨新生儿缺氧缺血后tPA与脑损伤的关系。我们检测新生鼠缺氧缺血后与脑血栓形成及纤维蛋白溶解相关的各种指标,发现其缺氧缺血后对纤维蛋白酶原系统的激活具特异反应性。tPA表达与活性的增加在缺氧缺血的急性期可有助于血栓溶解,但其在缺氧缺血的亚急性期却会导致细胞凋亡而加重脑损伤。

1 材料和方法

1.1 材料

选用Wistar大鼠7日龄的新生鼠,运用Rice-Vannucci动物模型^[5]。TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,RT-PCR所用各引物购自美国Sigma公司。免疫组化所需抗体Fibrin,Glycoprotein IIb,CD18,P-Selectin购自美国BD Pharmingen公司。TUNEL试剂盒购自Roche diagnostics GmbH公司。

1.2 动物模型制作

新生鼠随机分为实验组(45只)与对照组(15只)。实验组再随机分为缺氧缺血后恢复1,4,24 h组(各亚组n=15)。3%异氟烷吸入麻醉后,结扎其右侧颈总动脉。待新生鼠恢复1 h后将其置于37℃水浴的缺氧箱中(含10%氧气,90%氮气)缺氧,缺氧90 min后,新生鼠送回至母鼠身边原饲氧环境中恢复,待缺氧缺血后恢复1,4,24 h取标本检测。

1.3 脑损伤的判定

新生鼠脑缺氧缺血后1,4,24 h,在麻醉下用4%多聚甲醛行心脏灌注。将实验新生鼠麻醉,固定并剪开胸廓暴露心脏,经左心室心间部进针,同时剪开右心耳,连续灌注生理盐水,待右心耳流出的液体变清亮时改为灌注4%多聚甲醛。灌注结束后处死新生鼠取脑组织。脑组织标本置于4%多聚甲醛固

定24 h,依次置于15%,30%蔗糖多聚甲醛液固定。依次沉底后取大脑组织,50 μm厚连续冰冻切片。每个大脑选用固定的8张不同部位的切片代表整个大脑,并用甲酚紫做Nissl染色。ImageJ软件行图像分析,检测皮质,纹状体,海马等处的损伤。

1.4 异硫氰酸荧光素-右旋糖酐心室灌注分析

将右旋糖酐用异硫氰酸荧光素标记(FITC-dextran,5mg溶于100 uL PBS中;Sigma),在新生鼠脑缺氧缺血后1 h和4 h通过一小针头注入新生鼠左心室中。2 min后,动物被快速断头处死并取出大脑固定48 h。冰冻切片厚度50 μm,用荧光显微镜进行检测,ImageJ软件进行分析。

1.5 RT-PCR分析

用TRIzol试剂提取新生鼠脑组织缺氧缺血侧,对照侧及正常新生鼠脑组织海马的总RNA。用ImageJ软件测量RT-PCR扩增产物光密度值,以β-actin作标准校正各产物的相对含量。所使用的PCR的引物如下:tPA 5'-TGAGCCAACGCAGACAACT-TA-3'和5'-TGACAGCACCCAGCAGGAACT-3';uPA 5'-CGAATACTACAGGGAAGAC-3'和5'-GACATTTTCAGGTTCTTTGG-3';PAI-1 5'-ATCCTGCCTAAGTTCTCTCTG-和5'-ATTGTCTCTGTCCGGT-TGTG-3';β-actin 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3和5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'。

1.6 tPA酶谱法

将纤溶酶原和酪蛋白加入SDS-PAGE凝胶中。用RIPA缓冲液加入等量的样品缓冲液(0.5M Tris-HCL,pH6.8,100%丙三醇,0.05%溴酚蓝,10% SDS)提取样品蛋白,并低电压跑胶5 h。电泳后,用2.5% Triton-X-100在室温下清洗凝胶2次,每次30 min,然后在甘氨酸(0.1M甘氨酸,pH 8.0)中37℃孵育过夜。用考马斯亮蓝溶液将凝胶染色30 min,过夜脱色,可见有活性的蛋白酶溶解底物后形成的条带。

1.7 组织学

冰冻切片厚度为30 μm。用大鼠相应的抗体行免疫组化检测Fibrin,Glycoprotein IIb,CD18,P-Selectin等的表达。用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)方法检测神经细胞的凋亡。

1.8 统计分析

所有数据用平均值±标准($\bar{x} \pm s$)差表示。不同组之间的定量数据使用微软Excel的两组(非配对)间t检验。

2 结果

2.1 Nissl 染色结果

新生鼠结扎其右侧颈总动脉,缺氧 90 min。恢复 24 h 后,Nissl 染色可见右侧脑组织肿胀并有明显的梗塞灶。

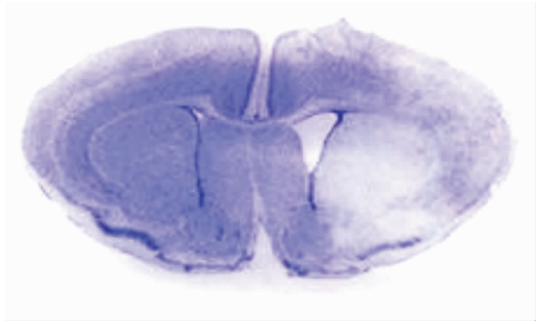


图1 Nissl 染色 Nissl 染色发现缺氧缺血后 24 h 后右侧脑组织肿胀并有明显梗塞灶。

2.2 异硫氰酸荧光素-右旋糖酐 (FITC-dextran) 心室内注射与免疫组化染色结果

Fite-dextran 作为血液灌注的示踪剂,心室内注射,显示新生鼠脑缺氧缺血后 1 h,大脑再灌注障碍明显;4 h 再灌注障碍却明显减轻(图 2)。提示与成年大鼠脑的持续性再灌注障碍不同,在新生鼠大脑,缺氧缺血仅导致暂时性再灌注障碍。新生鼠大脑缺氧缺血可诱导内皮细胞激活 (P-Selectin 表达) 和血小板聚集 (Integrin GPIIb),但新生鼠大脑缺氧缺血仅导致纤维蛋白 (fibrin) 在血管中短暂的沉积。Integrin GPIIb 与纤维蛋白 (fibrin) 的表达在缺氧缺血后 1 h 表达明显增加,而缺氧缺血后 4 h 表达明显减少提示血栓溶解(图 3)。

2.3 新生鼠脑缺氧缺血后 RT-PCR 和酶谱法检测 tPA 的表达与活性

RT-PCR 分析发现新生鼠大脑缺氧缺血后,tPA 表达明显增加(图 4)。tPA 酶谱法显示有活性的蛋白酶溶解底物后形成的条带,与对照组相比,新生鼠大脑缺氧缺血后 1 和 4 h,条带明显增宽提示 tPA 活性明显增加,以缺氧缺血后 4 h 最明显。

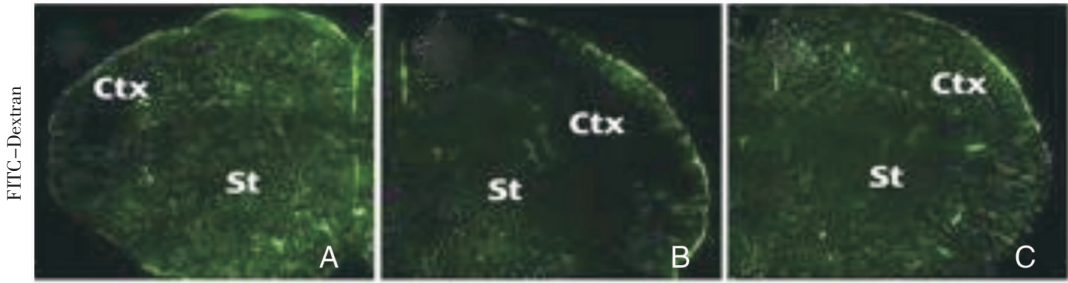


图2 新生鼠脑缺氧缺血后 tPA 表达和活性增加可致脑暂时性的缺血再灌注障碍 (FITC - dextran 染色 ×100) A:对照侧脑组织,未见缺血再灌注障碍;B:缺氧缺血后 1 h 右侧脑组织有明显的再灌注障碍;C:缺氧缺血后 4 h 右侧脑组织再灌注障碍明显减轻。

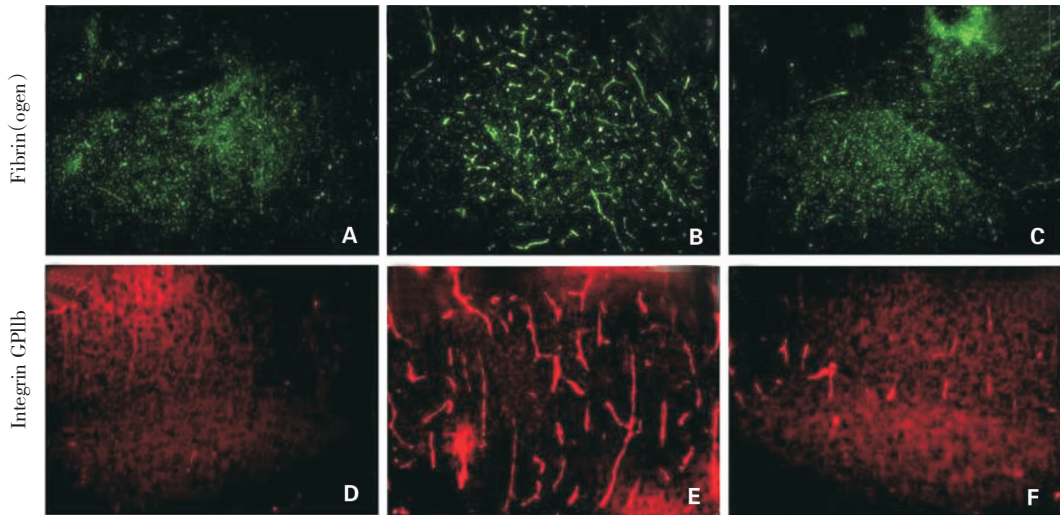


图3 新生鼠大脑缺氧缺血可诱导血小板聚集 (Integrin GPIIb) 与纤维蛋白 (fibrin) 在血管中短暂的沉积 (双重免疫荧光 ×400)。 A:对照侧脑组织;B:缺氧缺血后 1 h 右侧脑组织 Fibrin(ogen) 表达增加;C:缺氧缺血后 4 h 右侧脑组织 Fibrin(ogen) 表达减少;D:对照侧脑组织;E:缺氧缺血后 1 h 右侧脑组织 Integrin GPIIb 表达明显增加;F:缺氧缺血后 4 h 右侧脑组织 Integrin GPIIb 表达减少。

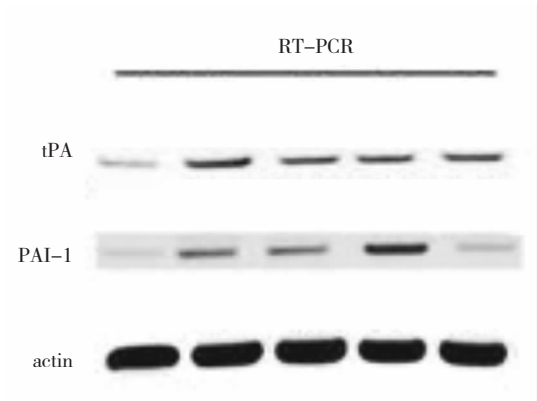


图4 RT-PCR图。提示缺氧缺血后tPA表达明显增加。

2.4 TUNEL 和 DAPI 染色

TUNEL 和 DAPI 染色显示新生鼠脑缺氧缺血后 24 h,其大脑皮质和海马区均可见凋亡细胞(细胞核及胞浆内出现浓染致密的颗粒块状亮绿色或蓝色荧光),(图 5)。

3 讨论

在成年大脑中,神经元与小胶质细胞分泌 tPA 而非 uPA,维持细胞外蛋白质水解水平^[6]。目前只有 tPA 获得美国食品及药物管理局的批准可作为溶

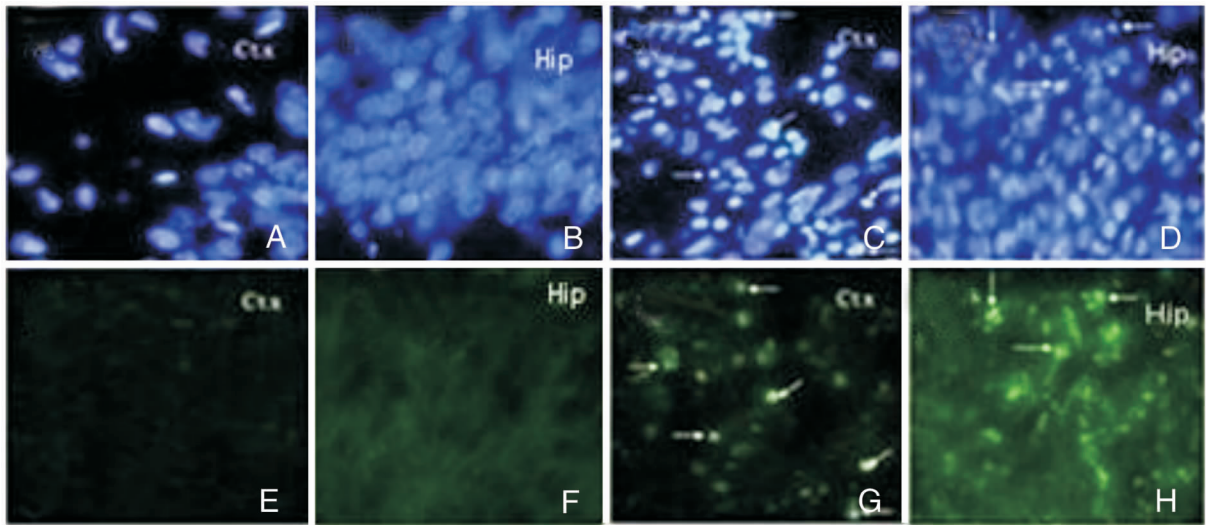


图5 新生鼠缺氧缺血后 24 h TUNEL 和 DAPI 染色。 A:对照侧(左侧)大脑皮质;B:对照侧(左侧)大脑海马;C:缺氧缺血后损伤侧(右侧)24 h,见右侧大脑皮质可见细胞核及胞浆内出现浓染致密的颗粒块状亮蓝色荧光(箭头处)提示细胞凋亡;D:缺氧缺血后损伤侧(右侧)24 h,示右侧大脑海马处也可见细胞核及胞浆内出现浓染致密的颗粒块状亮蓝色荧光(箭头处)提示细胞凋亡;E:对照侧(左侧)大脑皮质,未见 TUNEL 阳性细胞;F:对照侧(左侧)大脑海马,未见 TUNEL 阳性细胞;G:缺氧缺血后损伤侧(右侧)24 h,右侧大脑皮质可见 TUNEL 阳性细胞(箭头处);H:缺氧缺血后损伤侧(右侧)24 h,右侧大脑海马处 TUNEL 阳性细胞(箭头处)

栓治疗用于治疗缺血性卒中。tPA 的血管内溶栓作用对于缺血后脑损伤有益,但其作用由于以下原因存在局限性:①引起脑出血的危险性;②有害的血管外的作用:对神经细胞有兴奋性毒性^[7,8];③较短的治疗时间窗。④可提高 N-甲基-D-天(门)冬氨酸(N-methy-D-aspartate, NMDA)受体及蛋白酶激活受体 1(PAR1)介导的兴奋性毒性^[9,10]。

有研究认为^[11]兴奋性毒素可使 tPA 活性增加而导致神经细胞退化变性。在小鼠大脑中脑动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的动物模型中发现,tPA 缺乏的小鼠相比对照组,其脑梗塞的体积及神经细胞损伤都有所减少^[12]。而在 MCAO 后,如果将重组的 tPA 注入 tPA 缺乏的小鼠,其脑梗塞的体积也会增加。并且由于 tPA 可激活纤

维蛋白溶酶原形成纤维蛋白溶酶,同时促使基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs),尤其是 MMP9 表达上调,活性增加,引起神经血管的蛋白质水解,细胞基底膜的降解,造成血脑屏障损害及脑出血^[13,14]。血脑屏障受损会促进脑梗塞的加重。在成年动物模型中,有研究发现 MMP 抑制剂的使用可能改善缺血性脑损害^[15]。

我们运用 Rice-Vannucci 动物模型,检测新生鼠缺氧缺血后与脑血栓形成及纤维蛋白溶解相关的各种指标。新生鼠脑缺氧缺血后 Integrin GPIIb 和纤维蛋白表达急性增加可导致血栓形成而发生再灌注障碍。但异硫氰酸荧光素-右旋糖酐心室灌注分析提示新生鼠脑缺氧缺血导致缺血再灌注障碍是短暂性的,这与在成年大脑,脑缺氧缺血可诱发血栓形

成,导致持续性再灌注障碍不同^[16]。tPA 表达与活性的增加在缺氧缺血的急性期可有助于血栓溶解,但其在缺氧缺血的亚急性期却会导致细胞凋亡而加重脑损伤,同时也提示持续性 tPA/血纤维蛋白溶酶在缺氧缺血后的激活是临床上导致新生儿脑实质与白质损伤的重要原因。因此在适当的时候如果能减轻 tPA 的血管外作用,将对缺氧缺血后的新生儿大脑起到保护作用。

[参 考 文 献]

[1] Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Am J Perinatol*, 2000, 17(3):113-120.

[2] Vexler ZS, Sharp FR, Feuerstein GZ, Ashwal S, Thoresen M, Yager JY, et al. Translational stroke research in the developing brain [J]. *Pediatr Neurol*, 2006, 34(6):459-463.

[3] The National Institutes of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke [J]. *N Engl J Med*, 1995, 333(24):1581-1587.

[4] Benchenane K, López-Atalaya JP, Fernández-Monreal M, Touzani O, Vivien D. Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury [J]. *Trends Neurosci*, 2004, 27(3):155-160.

[5] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ishemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2):131-141.

[6] Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, et al. Extracellular proteolysis in the adult murine brain [J]. *J Clin Invest*, 1993, 92(2):679-685.

[7] Melchor JP, Strickland S. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 93(4):655-660.

[8] Kaur J, Zhao Z, Klein GM, Lo EH, Buchan AM. The neurotoxicity of tissue plasminogen activator [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(9):945-963.

[9] Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling [J]. *Nat Med*, 2001, 7(1):59-64.

[10] Junge CE, Sugawara T, Mannaioni G, Alagarsamy S, Conn PJ, Brat DJ, et al. The contribution of protease-activated receptor 1 to neuronal damage caused by transient focal cerebral ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(22):13019-13024.

[11] Sheehan JJ, Tsirka SE. Fibrin-modifying serine proteases thrombin, tPA, and plasmin in ischemic stroke: a review [J]. *Glia*, 2005, 50(4):340-350.

[12] Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice [J]. *Nat Med*, 1998, 4(2):228-231.

[13] Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2002, 33(3):831-836.

[14] Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee SR, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J, Lo EH. Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2005, 36(9):1954-1959.

[15] Gu Z, Cui J, Brown S, Fridman R, Mobashery S, Strongin AY, Lipton SA. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(27):6401-6408.

[16] Adhami F, Liao G, Morozov YM, Schloemer A, Schmithorst VJ, Lorenz JN et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(2):566-583.

(本文编辑:吉耕中)