

出血转化生物学标志物的研究进展

袁文肖¹ 综述 安中平² 审校

1. 天津医科大学研究生院, 天津市 300070

2. 天津市环湖医院神经内科五病区, 天津市 300060

摘要:出血转化(HT)是缺血性脑卒中急性期常见的并发症,由于出血转化将直接影响临床的治疗效果及预后,因此寻找其特异性的生物学标记物将具有重要意义。近年对于基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、纤维连接蛋白(FN)等出血转化预测指标的研究较多。本文就这3个生物学标志物的特点及与出血转化预测关系的相关研究进展进行阐述。

关键词:脑梗死;出血转化;基质金属蛋白酶-9;胶质纤维酸性蛋白;纤维连接蛋白

出血转化(hemorrhagic transformation, HT)是脑梗死后缺血组织内多灶性的继发出血,体积可以从点状或融合的片状出血到脑实质血肿。出血转化是缺血性脑卒中急性期常见的并发症。其发生率各家报道不一,但众多数据显示了一个共同规律,即溶栓后的出血发生率多高于自然发生率。Pacaroni等^[1]通过一个多中心的临床实验研究得出早期自然发生出血转化的概率约为9%,Valeria等^[2]报道其发生率为12%。而继发于溶栓治疗后的出血发生率Castellanos等^[3]认为是20%,甚至Aviv等^[4]研究发现其发生率可高达56%。

1 出血转化的发生机制

迄今为止关于出血转化机制的研究较多,但其确切的发生机制尚不明确,目前认为可能的发生机制有:①脑梗死后血栓和栓子发生自然崩解、溶栓治疗后发生碎裂、溶解以及血管痉挛减轻后,栓子移向动脉远端,使部分闭塞的血管再通,而闭塞远端的血管因缺血缺氧已发生变性损害,当一定压力的血流通过受损的血管时,即可引起血管破裂出血,从而引发HT。②梗死区内或周边的血管因缺血缺氧,自身调节功能下降,当血流恢复后,血管过度扩张充血,发生过度灌注,容易发生渗血或血管破裂出血。③发生脑梗死后第2~3周侧支循环开始建立,而新生的毛细血管尚未发育健全,在正常压力的冲击下也容易渗血或破裂出血^[5]。

2 出血转化的分型、影像学特点及预后

收稿日期:2010-10-18;修回日期:2011-01-18;

作者简介:袁文肖(1985-),女,硕士研究生,主要从事脑血管病的基础与临床研究。

通讯作者:安中平(1957-),男,主任医师,硕士生导师,主要从事脑血管病、神经免疫疾病、神经系统变性病的研究以及神经电生理、神经病理的临床应用。Email:azpaf@126.com。

2.1 出血转化的分型

关于出血转化的分型较多,目前比较常用的是欧洲分型,即欧洲急性卒中合作组(ECASS)依据脑CT的不同将出血转化分为4型:①出血性梗死I型(hemorrhagic infarct-1, HI-1):沿着梗死灶边缘小的斑点状密度增高的出血点。②出血性梗死II型(hemorrhagic infarct-2, HI-2):梗死灶内较大的融合的出血点,无占位效应。③脑实质血肿I型(parenchymal hemorrhage-1, PH-1):指血肿体积小于梗死区域的30%,占位效应不明显。④脑实质血肿II型(parenchymal hemorrhage-2, PH-2):血肿体积大于梗死区域的30%,伴有明显的占位效应。

2.2 出血转化的影像学特点^[6]

2.2.1 CT扫描表现 在原有椭圆形、扇形、楔形或不规则形的低密度梗死区内混杂形状不规则、密度不均匀的点状、斑片状、环状、条索状或团块状的高密度影像。

2.2.2 MRI表现 在梗死区内有出血信号,由于出血时间不同,MRI表现也不同。急性期呈稍高T₁信号,稍低T₂信号;亚急性期T₁、T₂均为高信号;慢性期T₁、T₂均为低信号。

2.3 出血转化的预后

由于出血的部位及量的不同,出血转化的结局也可能不同,既可能使病情加重甚至危及生命,也可能无任何继发的临床表现。有研究认为无症状性出血不会影响长期的预后,只有PH-2型可能是

导致临床症状加重和临床结局不良的独立危险因素。出血转化的发生,可能加重脑损伤,增加缺血性卒中的治疗难度,同时也会限制抗凝与溶栓等治疗的应用,而早期有效的溶栓是美国 FDA 推荐的唯一可以有效改善缺血性卒中患者预后的方法,因此,如能采用较为简便的指标或方法提早预测出血转化的发生并及时采取相应措施将对治疗起到至关重要的作用。

3 出血转化的预测指标

关于出血转化预测指标的研究较多,如钙结合蛋白、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、S-100B 蛋白、神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 等,目前对于 MMP-9、GFAP、FN 的研究较多。FN 是构成基底膜的重要组成部分,MMP-9 的增加可导致基底膜有效组成成分的破坏,GFAP 是维持血脑屏障稳定性及完整性的重要部分,三者都与血脑屏障的破坏有关。血脑屏障的破坏将导致其通透性增加,引起水肿或出血。

3.1 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一组 Zn^{2+} 依赖性蛋白酶,可分成 5 组,即胶原酶、基质溶素、间质溶素、明胶酶和膜型 MMP。MMP-9 即为明胶酶组中的一种,它可以结合基底膜的大分子物质并破坏明胶,主要攻击脑血管周围基膜的主要成分 IV 型明胶原、层黏连蛋白和纤黏连蛋白,破坏血脑屏障,从而引起其通透性升高,导致脑水肿及脑出血性转化。Wagne 等^[7]用蛋白质印迹法及明胶酶谱法在正常小鼠脑中未发现有 MMP-9 蛋白和酶活性的表达,免疫组化法发现 MMP-9 含量极低,这表明正常脑组织 MMP-9 可有表达,但表达极低。Rosell 等^[8]的研究认为外周血中性粒细胞是 MMP-9 的重要来源之一,MMP-9 在缺血区及出血转化区的浓度均升高,而其活化形式在转化区升高更明显。通过激光捕获显微切割 (laser capture microdissection) 技术研究显示在缺血区组成血脑屏障的微血管内皮细胞内含有高水平的 MMP-9,在 MMP-9 含量高的区域内血脑屏障的基本成分发生严重降解。所以 MMP-9 可能通过降解 IV 型胶原导致血脑屏障的破坏而引起出血转化发生。Park 等^[9]通过分别检测梗死后不同时间点的 MMP-9 水平,得出了在脑梗死后急性期血浆

及脑中 MMP-9 都会升高的结论。Lei 等^[10]也得出相似结论。他们通过动物实验得出血脑屏障渗透性的改变与再灌注时间有关,在缺血再灌注区域,血脑屏障的渗透性在 3 h 开始增加,血脑屏障的渗透性在缺血 1 d 后再灌注时达高峰,随后逐渐下降,而 MMP-9 在 3 h 开始增加,再灌注后 2 d 达高峰,然后逐渐下降。由此可以得出 MMP-9 在缺血再灌注区域的表达增加与血脑屏障的渗透性增加有关。

随着组织型纤溶酶原激活物 (tissue plasminogen activator, t-PA) 的大量应用以及关于溶栓后出血转化研究的深入,也从不同角度研究了 MMP-9 对血脑屏障的破坏及对出血转化发生的影响。关于 t-PA 与 MMP-9 的关系多是一些间接的实验研究。Cuadrado 等^[11]研究表明中性粒细胞是 MMP-9 的重要来源,静脉输注 t-PA 可增加出血转化的风险,而 t-PA 又有促进中性粒细胞脱颗粒释放 MMP-9 的作用,因此,MMP-9 与继发的出血有一定关系。Burggraf 等^[12]通过改变 t-PA 的浓度得出出血转化率会随着浓度的升高而增加的结论,而这一结论又与 t-PA 的浓度升高可增加 MMP-9 的浓度相一致。有研究认为减少 MMPs 生成的米诺环素同样有抑制凋亡,抗氧化应激的作用,增加损伤后各种细胞因子及胶质细胞的活性^[13]。Montaner 等^[14]的研究发现基础 MMP-9 水平与迟发性出血转化有关,24 h 后 MMP-9 升高往往可以预测实质血肿,且出血量的大小与基础 MMP-9 呈等级相关。Castellanos 等^[15]在 2003 年通过研究得出脑梗死急性期血清 MMP-9 浓度升高是所有卒中亚型出血转化的独立预测因子。曹心慧等^[16]通过对 558 例缺血性卒中病人进行观察也得出出血转化组 MMP-9 水平明显高于非出血转化组的结论。

3.2 胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)

GFAP 是一种酸性蛋白,含有丰富的天冬氨酸和谷氨酸,属细胞骨架蛋白,是脑间质纤维的主要亚单位。GFAP 主要参与中间纤维的构成,在维持神经元内环境的稳定和血脑屏障的完整中起着重要作用。GFAP 仅在成熟的星形胶质细胞中有丰富而特异性的表达,且在有活性的星形细胞中表达相对更多。故 GFAP 被认为是脑胶质细胞高度特异性的神经生化标志物。在中枢神经系统中,星形胶质细胞的数量超过了神经元,其终足包绕着毛细血管,因此,脑梗死后星形胶质细胞最先受累。脑梗

死可刺激星形细胞转化为反应性的星形细胞,从而合成大量 GFAP。这种神经胶质活跃的过程是星形细胞对脑内任何严重损害的一种特有反应。

有研究表明,缺血性脑损伤后,脑组织中 GFAP mRNA 及其蛋白的表达均显著增强,缺血半暗带及其周围脑组织的 GFAP 表达随缺血时间的延长而明显增强。Williama 等^[17]得出活化的 GFAP 在鼠脑损伤后 6 h 便开始在损伤区产生较强的免疫反应。脑梗死后血清 GFAP 的水平与梗死体积有关,对于腔隙性梗死,GFAP 含量在发病时已明显升高,并且随时间的延长而下降,在发病后 2 d 降至正常,而部分前循环梗死和完全前循环梗死患者的 GFAP 水平是持续升高的,因此 GFAP 可作为预测腔隙性或面积较小的脑梗死患者相对灵敏的指标^[18]。国内有学者研究表明,梗死面积较大的患者血清 GFAP 水平较高,该研究通过在脑梗死后不同时间点测定血清 GFAP 水平,得出 GFAP 含量与梗死面积的大小存在正相关。Wunderlich 等^[19]通过实验得出缺血性卒中患者发病 6 h 后血清 GFAP 开始升高,48 h 后升高明显,且其水平与神经缺失症状和脑梗死体积呈正相关。缺血性损伤后,大量释放的谷氨酸是引起神经细胞损伤的重要因素,上调的 GFAP 可能使细胞内谷氨酸合成酶的活性下降,通过抑制谷氨酸的代谢而发挥对缺血脑组织的保护作用^[23]。但是关于脑梗死后出血转化与 GFAP 的关系研究较少。詹海涛等^[20]通过对 72 例急性血栓形成性脑梗死患者及 50 例正常人血清 GFAP 含量的比较观察得出急性脑梗死患者血清 GFAP 含量与出血转化发生率呈一致性升高,提示检测血清 GFAP 可早期诊断急性脑梗死及出血转化。

3.3 纤维连接蛋白 (FN)

纤维连接蛋白 (FN) 主要由血管内皮细胞合成, FN 在人体中以两种形式存在: ① 血浆型 FN (plasma FN, pFN): 主要由肝细胞合成和分泌并以可溶的形式存在于血浆和其他体液中; ② 细胞型 FN (cellular FN, cFN): 由不同种类的细胞合成, 以不可溶的形式存在于多种组织的细胞外基质中。基底膜主要是由层粘连蛋白 (laminin, LN)、IV 型胶原 (collagen IV, Col IV)、FN 等大分子物质组成的超微网状结构。正常基底膜由 Col IV 形成三维网状骨架, 构成基底膜基本框架, 三维网状骨架上连接 LN、FN 等。Col IV、LN、FN 等成分的减少是脑微血管基底膜破坏的根本原因, 而血脑屏障结构功能

的改变又是脑缺血后水肿、出血和炎症反应等病理变化的中心环节^[21]。脑缺血性梗死后这些成分的减少导致血脑屏障结构完整性破坏, 通透性增加, 引起微血管出血。已有的研究表明纤维连接蛋白与出血转化有关。

以往的研究证实脑梗死患者血清中 FN 水平高于对照组, 该研究认为 FN 升高的原因为内皮细胞受损、破坏, 细胞内 FN 的释放及血小板聚集时, 血小板 α 颗粒释放 FN^[22]。这一时期的研究是从宏观的角度探讨纤维连接蛋白与梗死后出血之间的关系, 尚未从分子生物学及超微结构的角度进行研究。t-PA 含有指形结构、生长因子样区域和 2 个三角区, 三角区和指形区域可结合纤维蛋白, 催化纤溶酶原变为纤溶酶, 具有溶解脑血栓所含纤维蛋白凝块的能力。t-PA 治疗由于其较高的出血率而受到限制。研究证实 t-PA 治疗后会致血脑屏障的破坏及内皮细胞的损坏, 引起水肿和出血。血浆纤维连接蛋白在 t-PA 治疗后脑梗死继发出血的患者中明显升高。Castellaos 等^[23]对 87 例发病 6 h 内用 t-PA 静脉溶栓的缺血性卒中患者进行研究, 其中 71 例在 3 h 内接受溶栓治疗, 结果有 26 例患者发生出血, 发生出血转化者 t-PA 治疗前的血液 FN 水平 ($4.8 \mu\text{g/ml}$) 显著高于无出血转化者 ($1.7 \mu\text{g/ml}$), 并且认为出血越严重, 纤维连接蛋白水平越高, 当其浓度达到或超过 $3.6 \mu\text{g/ml}$ 时, 预测出血转化发生的准确性达 100%。

4 展望

由于梗死后出血转化将直接影响预后及治疗效果, 因此寻找其特异性的生物学标记物将具有重要意义。然而, 现有的研究多倾向于对单个预测因子的研究, 但是单因子预测的灵敏性和特异度有限, 致使假阳性率和假阴性率偏高或偏低, 这都将直接影响临床治疗决策, 因此可通过联合多种方法进行早期预测, 以提高灵敏性和特异性。联合多种方法寻找特异性的生物学标记物进行早期预测将成为今后研究的方向。

参 考 文 献

- [1] Paciaroni M, Agnelli G, Corea F, et al. Early Hemorrhagic Transformation of brain Infarction: Rate, Predictive factors, and Influence on Clinical Outcome: Results of a Prospective Multicenter Study. *Stroke*, 2008, 39(8): 2249-2256.
- [2] Valeria T, Marco D, Norma Di B, et al. Frequency and Determinants for Hemorrhagic Transformation of Cerebral Infarc-

- tion. *Neuroepidemiology*, 2009, 33(3): 261-265.
- [3] Castellanos M, Sobrino T, Millón M, et al. Serum Cellular Fibronectin and Matrix Metalloproteinase-9 as Screening Biomarkers for the Prediction of Parenchymal Hematoma After Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke: A Multicenter Confirmatory Study. *Stroke*, 2007, 38(6): 1855-1859.
 - [4] Aviv RI, dEsterre CD, Murphy BD, et al. Hemorrhagic transformation of ischemic stroke: prediction with CT perfusion, *Radiology*, 2009, 250(3): 867-877.
 - [5] 李军,袁亮. 脑梗死出血性转化患者表现与分析. *医药论坛志*, 2007, 28(4): 872-888.
 - [6] 洪玉娥,吴倩,郭茜. 出血性脑梗死的临床与影像分析. *安徽医学*, 2010, 31(1): 54-56.
 - [7] 毛玲,查运红. 基质金属蛋白酶-9 与脑缺血血脑屏障损伤的关系. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2006, 33(1): 96-98.
 - [8] Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A. MMP-9-Positive Neutrophil Infiltration Is Associated to Blood-Brain Barrier Breakdown and Basal Lamina Type IV Collagen Degradation During Hemorrhagic Transformation After Human Ischemic Stroke. *Stroke*, 2008, 39(4): 1121-1126.
 - [9] Park KP, Rosell A, Foerch C, et al. Plasma and brain matrix metalloproteinase-9 after acute focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2009, 40(8): 2836-2842.
 - [10] Lei LF, Zi XH, Tu QY. Matrix metalloproteinase-9 expression and blood brain barrier permeability in the rat brain after cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res*, 2008, 3(5): 505-508.
 - [11] Cuadrado E, Ortega L, Hernandez-Guillamon M, et al. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol*, 2008, 84(1): 207-214.
 - [12] Burggraf D, Martens H, Dichgans M, et al. rt-PA causes a dose-dependent increase in the extravasation of cellular and non-cellular blood elements after focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 2007, 1164: 55-62.
 - [13] Machado LS, Sazonova IY, Kozak A, et al. Minocycline and tissue-type plasminogen activator for stroke: assessment of interaction potential. *Stroke*, 2009, 40(9): 3028-3033.
 - [14] Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke*, 2001, 32(12): 2762-2767.
 - [15] Castellanos, Rogelio L, Joaquin S, et al. Plasma Metalloproteinase-9 Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 2003, 34(1): 40-46.
 - [16] 曹心慧,刘鸣,吴波. 血浆基质金属蛋白酶-9 与缺血性卒中出血转化关系的系统评价. *中国循证医学杂志*, 2006, 6(5): 361-369.
 - [17] Williams AJ, O'Shea PJ, Williams GR. Complex interactions between thyroid hormone and fibroblast growth factor signalling. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2007, 14(5): 410-415.
 - [18] 谭延国,薛迎红,徐斌,等. 血清胶质纤维酸性蛋白与急性脑梗死患者临床特点与预后的关系. *首都医科大学学报*, 2007, 28(2): 162-165.
 - [19] Wunderlich MT, Wallesch CW, Goertler M. Release of glial fibrillary acidic protein is related to the neuro-vascular status in acute ischemic stroke. *Eur J Neurol*, 2006, 13(10): 1118-1123.
 - [20] 詹海涛,陈钢. 血清胶质纤维酸性蛋白在脑梗死患者并发 HI 及 MODS 中的临床意义. *广东医学*, 2008, 29(10): 1717-1718.
 - [21] 卢金华,李智文. 溶栓联合神经保护剂对大鼠脑梗死的保护作用. *中国实用神经疾病杂志*, 2008, 11(12): 12-15.
 - [22] 高幼奇,王细福,朱小刚,等. 脑卒中病人血浆纤维连接蛋白测定的临床意义. *临床神经病学杂志*, 1992, 5(1): 42-43.
 - [23] Castellanos M, Leira R, Serena J. Plasma Cellular-Fibronectin Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation After Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 2004, 35(7): 1671-1676.