

大鼠脑干出血后血清 S100B 表达与血肿周围组织的超微结构改变

张海涛^{1,2}, 王永和^{2*}, 曹培成², 卜振富², 李爱军², 程迎新²

1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261053

2. 潍坊市人民医院脑科医院神经外科, 山东 潍坊 261021

摘 要:目的 研究大鼠脑干出血后血清 S100B 的表达及其与行为学改变、脑水肿的关系。观察血肿周围组织超微结构在脑干水肿形成中的变化。方法 利用立体定向技术制作大鼠脑干出血模型, 采用双抗体夹心 ELISA 法检测脑干出血后血清 S100B 蛋白含量, 干湿重法检测脑组织含水量, 电镜观察脑干出血后血肿周围组织超微结构的变化。结果 与假手术组比较, 出血组在脑干出血后 6 h 血清 S100B 含量、行为学改变、脑组织含水量增高, 48 h 达高峰, 之后开始下降; 脑干出血后血清 S100B 蛋白含量、脑组织含水量、行为学改变三者之间相互存在关联 ($P < 0.05$)。脑干出血后血肿周围组织电镜观察: 脑干出血后 6 h 星形胶质细胞胞体和周边足突轻度肿胀, 48 h 可见星形胶质细胞肿胀明显且部分胞浆呈空泡样改变; 髓鞘部分有剥离现象, 并有线粒体嵴断裂及空泡样变。结论 脑干出血后血清 S100B 含量、行为学改变、脑组织含水量三者之间相互呈正相关, 提示脑干出血后高水平的 S100B 蛋白参与脑干出血后脑水肿的形成。

关键词: 脑干出血; 立体定向技术; 脑水肿; S-100B 蛋白

Serum S100B expression and the change of perihematoma tissue ultra microstructure protein in brain tissue after brainstem hemorrhage in rats

ZHANG Hai-Tao^{1,2}, WANG Yong-He^{2*}, CAO Pei-Cheng², BU Zhen-fu², LI Ai-Jun², CHENG Ying-xin². 1 Wei Fang Medical University, Wei Fang, Shandong 261053. 2 Department of Neurosurgery, The People's Hospital of Wei Fang, Wei Fang Brain Hospital, Wei Fang, Shandong 261021.

Abstract: Objective To investigate the correlation of serum S100B expression with behavioral tests and cerebral edema. Examine the changes of perihematoma tissue ultra microstructure in the development of brain edema. **Methods** A rat model of brainstem hemorrhage was established using the stereotactic technology, serum S100B was detected by double antibody sandwich ELISA, Brain water contents were measured by dry-wet weigh method. Perihematoma tissue ultra microstructure was observed under the electron microscope. **Results** Compared with the sham operated group, The S100B protein level in serum, behavioral scores and brain water content increased in the brainstem hemorrhage group at 6 hours, reached a peak at 48 hours, then decreased gradually. The S100B protein level in serum, brain water content, behavioral scores were positively correlated with each other ($P < 0.05$). Perihematoma tissue was observed under the electron microscope: stellate cells and their surrounding foot process mild swelling at 6 hours, Stellate cells visible swelling, partial cytoplasm showed vacuoles sample change, myelin part dissection, had mitochondria crest fault and vacuoles at 48 hours. **Conclusions** The S100B protein level in serum, brain water content, behavioral scores were positively correlated with each other. This suggests that cerebral edema may be developed through the high S100B protein level after brainstem hemorrhage.

Key words: brainstem hemorrhage; stereotactic technology; brain edema; S100B

脑干出血临床上较少见, 约占脑出血的 5% ~ 10%, 多位于脑桥, 与其相关的病死率和致残率约 30% ~ 90%^[1], 脑干水肿形成是导致脑干出血后

病情恶化的主要因素之一, 但脑干出血后脑水肿形成的机制尚不完全清楚。S100B 是一种分子量为 21KD 的酸性钙结合蛋白, 广泛分布于神经系统特

收稿日期: 2011-11-15; 修回日期: 2011-01-29

作者简介: 张海涛 (1986-), 男, 硕士研究生, 主要从事脑血管病的研究。

* 通讯作者: 王永和, 男, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管病和颅底肿瘤方面的研究。

别是神经胶质细胞中,不仅是脑损伤的检测指标,也是血脑屏障开放的特异性外周标志^[2]。作者通过建立大鼠脑干出血模型,动态观察血清 S100B 蛋白含量的变化,探讨脑干出血后血清 S100B 蛋白含量、脑水肿、行为学改变三者之间的相关性,进一步揭示脑干出血后脑水肿形成的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

健康成年雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 58 只,体重 250 g ~ 300 g。购自中国人民解放军八十九医院实验动物中心。随机抽取 8 只大鼠分为甲、乙两组,进行脑干出血成模预实验,其余 50 只随机分为假手术组和脑干出血后 6 h、24 h、48 h、72 h 组,每组 10 只。

1.2 大鼠脑干出血模型的建立

参照相关文献^[2,3]报道的方法,实验大鼠经 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔注射麻醉后,术区备皮,碘伏消毒后将大鼠固定在立体定位仪上,确定大鼠脑干坐标:矢状缝与人字缝交点为原点,矢状缝右侧 1.4 mm,人字缝前 1 mm,深度距硬膜 7 mm。头皮正中切开,以牙科钻在颅骨上钻一小孔(勿伤及硬膜)。抽取大鼠尾动脉血 200 μ l (肝素钠抗凝)。微量进样器抽取自体抗凝血,以 10 μ l/min 的速度恒速注射,注射完毕后留针 5 min,缓慢退针。骨蜡封闭骨孔。生理盐水冲洗术野,缝合切口后消毒皮肤。甲组注射抗凝血 50 μ l,乙组注射抗凝血 100 μ l,6 小时后统计两组死亡率的差异,然后选取合适注血量进行下一步实验。

1.3 行为学评分

以大鼠完全清醒后的行为学改变对各个组每个时间点每只大鼠进行评分。参照 Longa 评分法^[4] 0 分:无神经功能缺损;1 分:左侧前爪不能完全伸展;2 分:行走时,大鼠向左侧转圈;3 分:行走时,大鼠身体向左侧(瘫痪侧)倾倒;4 分:不能自发行走,有意识丧失;Longa 评分 2 分以上认为造模成功,可用于筛选成功模型。

1.4 标本处理

各组大鼠均在脑干出血后 6 h、24 h、48 h、72 h 抽取尾动脉血,每次采血 2 ml,不抗凝,静置 1 ~ 2 小时,常温下 3500 r/min 离心 15 min 后,留取上清液 0.5 ml,置于 -20℃ 冰箱待用。

实验大鼠于选定的时间点断头取脑,于距脑干区血肿中心外侧缘 1 mm 处取 1 mm × 1 mm × 1 mm

大小的组织块放入 3% 戊二醛中,4℃ 冰箱内固定,用于电镜观察。

1.5 测定血清 S100B 蛋白含量

采用双抗体夹心法,ELISA 试剂盒检测血清中 S100B 蛋白含量,操作严格按照说明书执行。

1.6 脑组织含水量测定

实验大鼠在选定时间点迅速移除脑组织并分成四部分:脑干,小脑和左右大脑半球。电子天平测定各时间点脑干的湿重,经过恒温 100℃ 干燥 24 h,再测量脑干的干重。脑组织含水量 = (脑组织湿重 - 脑组织干重) / 脑组织湿重 × 100% (脑干)。

1.7 电镜观察脑干出血血肿周围组织

前固定:3% 戊二醛 4℃ 固定 2 h, PBS 液反复冲洗 1 h;后固定:1% 四氧化锇 (OsO₄) 置冰箱 4℃ 固定 1 h, PBS 液反复冲洗 30 min;用 50%、70%、90%、95% 酒精梯度脱水 × 10 min,再用 90% 丙酮与 90% 酒精 1:1 混合液脱水 10 min,90% 丙酮脱水 10 min,100% 丙酮脱水 15 min × 2 次;浸透:先于 1:1 的 100% 丙酮与包埋剂的混合物中浸透 30 min,再换纯包埋剂浸透 37℃ 过夜;包埋:包埋剂(环氧树脂)灌满包埋板,组织移入包埋板尖端,置入恒温箱逐渐加温聚合,37℃ 12 h,45℃ 12 h,60℃ 24 h;手工修块;切去 1 μ m 半薄切片,甲苯胺蓝染色,光镜下观察定位;超薄切片机连续切片厚度 70 nm,捞片贴于铜网;染色:醋酸铀避光染色 30 min,蒸馏水反复冲洗并晾干,柠檬酸铅染色 30 min,电镜观察。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 16.0.0 统计软件包处理数据。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两变量之间相关性采用 Pearson 相关分析。显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 行为学观察及评分结果

预实验组大鼠成模后,于 6 h 后观察各组死亡率。甲组大鼠 (50 μ l) 死亡率为 0,Longa 评分 > 2 分有 3 例,乙组大鼠 (100 μ l) 死亡率为 75%,Longa 评分 > 2 分有 1 例。得出甲组较乙组有较高的造模成功率,较低的死亡率,因此选用 50 μ l 自体血进行实验。(如表 1)

表 1 实验甲组(50 μl)和乙组(100 μl)成模率的比较

组别	n	死亡率	Longa FZ 评分 >2 分	成模率
甲组	4	0	3	75%
乙组	4	75%	1	25%

注: 甲乙两组死亡率比较, $P < 0.05$; 成模率比较, $P < 0.05$ 。

大鼠造模成功后, 脑干出血组大鼠出现明显的神经功能缺损症状和行为学改变, 活动量、进食水量明显减少, 自洁能力差, 反应迟钝, 可出现眼球

震颤及偏瘫, 并成进行性加重, 同时伴有大小便失禁等现象; 假手术组 6 h 出现轻偏瘫、24 h 基本恢复, 偏瘫症状基本消失, 进食正常。对各个组每个时间点每只大鼠进行评分 ($n = 50$), 按照评分得到的数值, 结果用均数 \pm 标准差表示, 术后 6 h 行为学评分增加, 48 h 达峰, 脑干出血组较假手术组显著增高 ($P < 0.05$)。(如表 2)

表 2 实验大鼠脑含水量、行为学评分和血清 S100B 蛋白含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	假手术组	6 h	24 h	48 h	72 h
脑含水量 (% 脑干)	69.95 \pm 0.18	71.36 \pm 0.48 [#]	72.70 \pm 0.58 [#]	75.41 \pm 0.13 [#]	73.92 \pm 0.13 [#]
行为学评分	0.67 \pm 0.58	2.33 \pm 0.50 [#]	2.89 \pm 0.33 [#]	3.33 \pm 0.50 [#]	3.11 \pm 0.60 [#]
血清 S100B 蛋白含量	0.19 \pm 0.17	0.94 \pm 0.17 [*]	1.65 \pm 0.35 [*]	2.38 \pm 0.25 [*]	1.74 \pm 0.34 [*]

注: 各组 $n = 10$, 出血组与假手术组比较, [#] $P < 0.05$, ^{*} $P < 0.01$

2.2 血清 S100B 蛋白含量

大鼠血清 S100B 蛋白含量 6 h 开始增加, 48 h 水平最高, 之后逐渐下降。6 h、24 h、48 h、72 h 组均较假手术组增高, 有统计学意义 ($P < 0.01$)。(如表 2)

2.3 脑组织脑干含水量测定结果

脑干出血组在出血后 6h 即增加, 48h 达到高峰, 然后开始缓慢下降。与假手术组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。(如表 2)

2.4 血清 S100B 蛋白含量与脑组织含水量、行为学改变之间的相关性

S100B 蛋白含量与脑组织含水量之间存在关联 ($r = 0.972$; $P < 0.05$), S100B 蛋白含量与行为学改变之间也存在关联 ($r = 0.969$; $P < 0.05$), 脑组织含水量与行为学改变之间也存在关联 ($r = 0.965$; $P < 0.05$)。

2.5 电镜观察结果

电镜下可见成模大鼠脑干出血后 6 h 组星形胶质细胞胞体和周边足突轻度肿胀, 胞浆内有大量水肿液, 而神经细胞胞体轻度肿胀, 胞核疏松, 胞浆液化, 胞膜结构完整, 核膜完整, 轴索内神经丝结构基本正常。24 h 组较 6 h 组星形胶质细胞肿胀明显, 神经元轻度变性, 部分髓鞘轻度剥离, 其余未见明显差别; 48 h 组可见星形胶质细胞胞体肿胀更加明显, 胶质细胞足突内大量空泡出现严重水肿, 部分胞浆可呈空泡样变; 部分细胞可见变性坏死, 电子密度增高, 髓鞘有部分剥离现象, 并有线粒体嵴断裂及空泡样变。72 h 组较 48 h 组星形胶质细胞胞体和星形胶质细胞足突肿胀稍减弱、细胞变性坏死和髓鞘剥离现象较多。假手术各时间点改变不明显, 仅可见星形胶质细胞胞体轻度水肿, 电子密度较低, 胞膜结构完整, 核膜完整, 神经细胞胞膜结构完整。(如图 1)

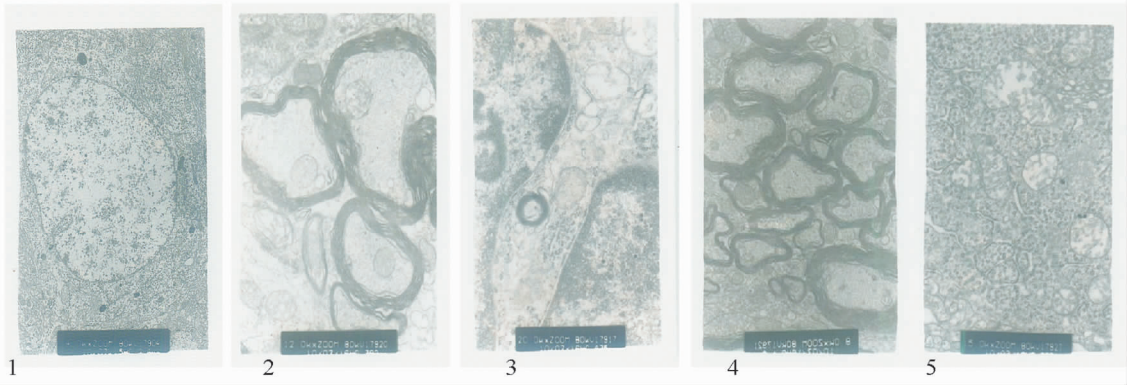


图 1 1、2、3、4、5 分别为假手术组和脑干出血后 4 h、6 h、24 h、48 h 组电镜下表现

3 讨论

实验性脑干出血动物模型可以再现人脑干出血的重要病理表现,包括脑水肿形成、代谢明显降低和组织病理反应等。因此,动物模型是研究脑干出血机制的重要手段,可用于检验脑干出血的治疗措施。目前国内外研究大鼠脑干出血的模型主要包括胶原酶诱导法和自体血注入法两类。Kirkman等^[5]认为自体血的动物模型更接近临床情况,便于定量和定位研究出血损伤的机制,而且可以建立一个与神经功能缺损、脑水肿、脑皮质灌注不足相符合的动物模型。因此,本文采用自体血进行实验。

S100 蛋白家族各亚型分布不同,生物学作用亦不同。S100B 主要分布于中枢神经系统和周围神经系统的神经胶质细胞、Schwann 细胞、以及某些神经元、黑色素细胞、软骨细胞、脂肪细胞中,生理量主要由活的星形胶质细胞产生,作用于神经元,具有神经生长因子样作用,对神经系统的生长发育具有促进作用。而高水平的 S100B 对神经细胞有毒害作用,Buttner 等^[6]在脑缺血性卒中的临床研究中证实患者血清或脑脊液 S100B 蛋白含量明显增高,与梗塞体积、神经功能缺损显著相关。脑水肿形成的主要因素先前研究认为由于大鼠脑干出血形成后颅内压升高,导致脑疝,压迫脑干,以致死亡^[7]。其他一些研究认为动物模型建成后,释放一些神经毒性物质,例如凝血酶,通过诱发炎症因子,降解血肿,触发了脑水肿的形成^[8]。脑干出血后脑水肿形成机制复杂,大致包括四个阶段^[9]:第一阶段是血凝块回缩和蛋白渗出;第二阶段是凝血酶和凝血级联反应;第三阶段是红细胞溶解和血红蛋白及其代谢产物的毒性作用;第四阶段是其他血液成分及细胞因子在脑水肿形成中的作用。

脑组织含水量是代表脑组织水肿程度的数量指标。结合实验结果,血清 S100B 蛋白水平与脑组织含水量同步增高,6 h 增加,峰值时间都出现在脑干出血后 48 h,两者具有显著相关性($r = 0.972; P < 0.05$),提示 S100B 在分子水平参与脑干出血后脑水肿的形成。研究还发现大鼠行为学改变在脑干出血后 6 h 开始出现,48 h 最为明显,之后逐渐恢复。从行为学评分结果可以看出脑干出血组与假手术组比较有相当明显的差别,而且也是 48 h 达峰与脑水肿形成时间一致。显然,脑干出血后脑水肿发生规律和行为学变化规律显著相关($r = 0.965; P < 0.05$),证明了脑水肿是大鼠脑

干出血后肢体功能障碍的重要原因。结合血清 S100B 蛋白含量和行为学评定结果,两者在不同时间点动态观察上几乎完全一致,行为学变化大的时间点,评分分值也高,而此时 S100B 蛋白含量也高,两者显著相关($r = 0.969; P < 0.05$)。S100B 由星形胶质细胞产生,星形胶质细胞的终足参与组成血脑屏障,脑干出血后胶质细胞坏死,S100B 合成增多,血脑屏障破坏,引发脑水肿,加重了大鼠脑干出血后行为学改变。经统计学分析,脑干出血后血清 S100B 蛋白含量、脑组织含水量、行为学改变三者之间密切相关。

结合电镜观察结果进一步证实了脑干出血后血肿周围组织脑水肿的形成。脑干出血后,血肿周围的水肿包括细胞毒性水肿和血管源性水肿。血管源性水肿是由于血脑屏障开放,血管通透性增加导致血浆成分外渗引起的细胞间质性水肿。研究发现,脑干出血早期主要是轻中度水肿,以细胞毒性水肿为主,通常表现为细胞轻度或中度损害,当致病原因消除后仍可恢复正常;若进一步发展,神经元可变性、坏死。林昌福等^[10]认为脑出血周围除了存在缺血半暗带外还存在代谢性半暗带,因此,在治疗上除了积极有效的挽救半暗带区脑缺血,还应改善局部代谢,如清除血中有毒物质。Xue 等^[11]认为如果能在早期解除血肿对脑组织的压迫刺激,可以减少神经元的凋亡。因此,作者认为脑干出血早期(6 h 内)尽早进行干预,有利于保护神经元,降低病死率和致残率,有助于改善患者预后。

综上所述,S100B 由星形胶质细胞产生,星形胶质细胞的终足参与组成血脑屏障。因此,脑干出血后胶质细胞坏死。S100B 合成增多,血脑屏障破坏,引发脑水肿和炎性细胞浸润,脑水肿加重了大鼠肢体功能障碍。大鼠脑干出血后,血肿越大,胶质细胞凋亡数量越多,神经功能缺损症状越明显,S100B 蛋白含量也越高。脑干出血早期(6 h 内)的 S100B 蛋白含量有助于判断患者的转归。

参 考 文 献

- [1] Jang JH, Song YG, Kim YZ. Predictors of 30-day mortality and 90-day functional recovery after primary pontine hemorrhage. J Korean Med Sci, 2011, 26(1):100-107.
- [2] 朱凤军,马颖,程远. S100B-血脑屏障开放的血浆标志. 国际神经病学神经外科学杂志, 2007, 34(3): 249-252.

- [2] Lekic T, Tang J, Zhang J. A rat model of pontine hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 105: 131-134.
- [3] Lee J, Jallo GI, Guarnieri M, et al. A novel brainstem tumor model: guide screw technology with functional, radiological, and histopathological characterization. *Neurosurg Focus*, 2005, 18(6A): E11.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rat. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] Kirkman MA, Allan SM, Parry-Jones AR. Experimental intracerebral hemorrhage: avoiding pitfalls in translational research. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(11): 2135-2151.
- [6] Buttner T, Weyers S, Postert T, et al. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke*, 1998, 29(3): 730.
- [7] Thiex R, Tsirka SE. Brain edema after intracerebral hemorrhage: mechanisms, treatment options, management strategies, and operative indications. *Neurosurg Focus*, 2007, 22(5): E6.
- [8] Tanaka Y, Marumo T, Shibuta H, et al. Serum S100B, brain edema, and hematoma formation in a rat model of collagenase-induced hemorrhagic stroke. *Brain Res Bull*, 2009, 78(4-5): 158-163.
- [9] 周衡俊, 詹仁雅, 万曙. 脑出血后脑水肿形成机制的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2009, 36(3): 225-228.
- [10] 林昌福, 于朝春. 脑出血后血肿周围半暗带生化研究现状. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(5): 436-438.
- [11] Xue M, Del Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death. *Neurosci Lett*, 2000, 283(3): 230-232.