

心肺复苏大鼠脑基质金属蛋白酶9的表达和血脑屏障的变化

何志捷, 邹子俊, 张云, 周明根, 李祖勇, 方向韶, 黄子通*

(中山大学附属第二医院急诊科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨心肺复苏后早期大鼠脑组织基质金属蛋白酶9(MMP9)的表达和血脑屏障的变化规律。【方法】将80只大鼠随机分为假手术组($n=40$)和复苏组($n=40$)。假手术组仅进行麻醉和气管插管、血管穿刺,不进行窒息,复苏组用气管夹闭窒息法致使心跳骤停后进行复苏,其他与对照组相同,分别在0、3、9、24 h和48 h 5个时间点处死大鼠后,取样,测定脑组织MMP9的表达、MMP9 mRNA、脑含水量与脑组织伊文思蓝含量的变化,电镜观察脑组织的超微结构。【结果】复苏组心肺复苏后3、9、24和48 h脑组织MMP9表达明显高于假手术组,MMP9 mRNA含量与假手术组相比差异有统计学意义,脑含水量与假手术组比较明显升高,与假手术组比较,脑组织伊文思蓝含量明显升高;超微结构发生改变。【结论】在心肺复苏大鼠脑缺血模型中MMP9蛋白和MMP9mRNA的表达明显升高;脑组织的脑含水量和伊文思蓝含量明显升高,血脑屏障受到破坏;电镜超微结构观察证实脑组织损伤明显;这些变化在心肺复苏后24 h达高峰。

关键词: 心肺复苏; 血脑屏障; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R56 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)04-0418-04

Exploration of Variety of Matrix Metalloproteinase 9 and Blood Brain Barrier in Cardiopulmonary Resuscitation Rats

HE Zhi-jie, ZOU Zi-jun, ZHANG Yun, ZHOU Ming-gen, LI Zu-yong, FANG Xiang-shao, HUANG Zi-tong*

(Department of Emergency, The second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the variety of matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and blood brain barrier (BBB) in cardiopulmonary resuscitation rats. 【Methods】 Eighty rats were randomly divided into 2 groups: the sham-operated group ($n=40$) and the resuscitation group ($n=40$). The two groups were anaesthetized and endotracheally intubated, the resuscitation group was also induced to cardiac arrest by aphyasia. Then the rats were put to death and samples were taken at immediate, 3 h, 9 h, 24 h, and 48 h. After that, the expression of MMP9, MMP9 mRNA, water content and Evans blue content in brain tissue were detected. Ultramicrostructure of brain tissue was observed with electron microscope. 【Results】 Compared to the sham-operated group, at 3 h, 9 h, 24 h and 48 h, the expression of MMP9 of resuscitation group was significantly changed. MMP9mRNA significantly increased. Water content statistically increased and so was Evans blue content. The change of ultramicrostructure in the resuscitation group at 3 h, 9 h, 24 h, and 48 h was obvious. 【Conclusion】 The expression of MMP9 and MMP9mRNA obviously increased in the cerebral ischemia model with CPR rats, and got to peak at 24 h. Water content and Evans blue content in brain tissue obviously increased in the cerebral ischemia model with CPR rats, BBB was destroyed, and the peak was 24 h. The injury of ultramicrostructure of brain tissue with electron microscope was obvious, and the peak was 24 h.

Key words: cardiopulmonary resuscitation (CPR); blood brain barrier (BBB); matrix metalloproteinase (MMP)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4): 418-421; 427]

心肺复苏后,脑组织由于缺血缺氧出现一定程度的损害,主要为复苏后脑水肿形成。而脑血管完整性的破坏,导致严重的血脑屏障损伤,是加重

脑复苏后脑水肿和脑损伤的重要因素^[1-2]。近年来,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),尤其是MMP9,在脑缺血-再灌注损伤中的作用已

收稿日期: 2008-12-06

基金项目: 广东省自然科学基金(7001601)

作者简介: 何志捷,副教授, E-mail: hezhijie2004@126.com; * 通讯作者: 黄子通,教授,博士生导师

经日益受到重视。本研究通过检测心肺复苏大鼠早期大鼠脑组织 MMP9 的表达和活性,并观察血脑屏障的变化,希望为脑复苏治疗提供病理生理学的理论依据,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂和主要设备

用健康 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 80 只, 体质量(450 ± 50)g, 由中山大学北校区动物实验中心提供。主要试剂有大鼠 MMP ELISA Kit、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、总 RNA 提取试剂 TRI-Reagent、伊文思蓝(EB)等。主要设备有 5810 型高速离心机、PE-2700 PCR 扩增仪、凝胶图象成像系统、CM10 透射电子显微镜等。

1.2 气管夹闭窒息法大鼠心肺复苏模型的建立与动物分组

SD 大鼠称质量后,用水合氯醛腹腔注射诱导麻醉,进行心电监护。经气管插管,接动物呼吸机。机械通气(潮气量 6.5 mL/g,吸入氧浓度体积分数 21%)。待大鼠的血压、心率等生理参数在室温下稳定 10 min 后,记录其基础值,于呼气末夹闭气管插管致呼吸停止。心跳骤停的判断标准为动脉搏动波形消失或收缩压 ≤ 25 mmHg;心电图显示电机械分离或是心搏停止。心跳骤停持续 1 min 后,立即开始心肺复苏。自主循环恢复(return of spontaneous circulation, ROSC) 定义为恢复室上性心律,平均动脉压 ≥ 60 mmHg 并且维持 5 min 以上。ROSC 后 1 h,若大鼠基本生命体征平稳,即可拔除气管插管,放回鼠笼中等待其苏醒。动物分为两组,假手术对照组和复苏组,大鼠均为 40 只,假手术对照组仅进行麻醉和气管插管、血管穿刺,不进行窒息;复苏组进行窒息,均于即刻及 3、9、24 h 和 48 h 时间点分 5 组、每组 8 只处死动物并取样。

1.3 脑复苏大鼠不同时间点 MMP9 表达的变化

脑组织蛋白的提取和定量测定:不同时间点处死大鼠后,立即取 50 mg 脑组织置于细胞裂解液中。冰上匀浆,16 000 r/min($r = 15$ cm)离心 70 min,取上清液,分装后-80 °C 保存用于后续的测定。

MMP9 蛋白表达的测定:将试剂盒(Rat MMP9 ELISA Kit)和蛋白样品平衡至室温后,从密封袋中取出所需板条。根据标准曲线得到稀释样本中

MMP9 浓度。将此浓度乘以稀释倍数 2,得到样本中 MMP9 的浓度 (ng/mL)。最后将结果转化成 MMP9 总蛋白比(ng/mg)。

MMP9 mRNA 的检测:按照逆转录反应试剂盒说明进行逆转录。MMP9 上游引物为 5'-CTTTGTAGGGTCGTTCTG-3'(TaKaRa),下游引物为 5'-CCTGTGAGTGGTTGGATT-3'(TaKaRa),产物片段为 466 bp,扩增片段为 330 bp。RT-PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳,以凝胶成像系统拍照,用进行光密度分析。

1.4 脑复苏大鼠不同时间点大鼠血脑屏障的变化

脑含水量测定:各组大鼠在深度麻醉条件下处死取脑,分离左右大脑半球。剥去脉络丛后,精确称右半球湿质量,于 110 °C 烤箱内干燥 24 h,至恒质量,称其干质量。依公式计算脑组织含水量:含水量(%) = (湿质量-干质量)/湿质量 × 100%。

脑组织伊文思蓝含量的测定:于处死前 15 min 经股静脉注射伊文思蓝(Evans Blue, EB)。断头后取脑组织,分开大脑半球,用滤纸吸干,精确称湿质量并记录。测定其 OD 值,以绘制出标准曲线。甲酰胺作空白比色,根据标准曲线回归方程求得的样品 EB 含量(μg/mL)。再按公式计算脑组织 EB 含量:脑组织 EB 含量(μg/g) = 样品 EB 含量(μg/mL) × 甲酰胺量(mL) ÷ 脑湿质量(g)。

1.5 电镜超微结构的观察

各组大鼠在麻醉下断头取脑,用薄刀片快速切取距前囟 4 ~ 5 mm,中线旁开 3 ~ 4 mm,厚度为 1 mm 左右的脑皮质标本,立即放入电镜前固定液中,4 °C 固定 1 h 后,用锋利刀片修成 1 mm³ 的块,送中山大学北校区电镜室。经 25 g/L 戊二醛固定,梯度酒精脱水,Epon 包埋后制成超薄切片,在透射电镜下观察超微结构。

1.6 统计分析

本研究的数据主要利用统计软件 SPSS 11.0 进行处理,统计分析方法主要是采用方差分析,检验水准 = 0.05,当方差分析结果提示组间有差别时,进一步作处理。对于不同时间点的比较,主要利用试验得到的数据进行描述。

2 结果

2.1 脑复苏大鼠不同时间点 MMP9 表达的变化

假手术组 5 个不同时间点大鼠 MMP9 表达的

比较无差别。复苏组在心肺复苏 3 h MMP9 的表达明显升高,9 h 进一步升高,24 h 达到高峰,与假手术组比较差异有统计学意义(表 1)。

2.2 脑复苏大鼠不同时间点 MMP9 mRNA 表达的变化

假手术组 5 个不同时间点大鼠 MMP9 mRNA 表达的比较无差别。复苏组在心肺复苏 3 h MMP9 mRNA 的表达明显升高,9 h 进一步升高,24 h 达到高峰,与假手术组比较差异有统计学意义(表 2)。

表 1 心肺复苏不同时间点时的 MMP9 的表达

Table 1 Expression of MMP9 of CPR rat in different time ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

Group	0 h	3 h	9 h	24 h	48 h
Sham-operated group	82 ± 33	80 ± 77	82 ± 40	83 ± 55	82 ± 38
Resuscitation group	82 ± 37	106 ± 24 ¹⁾	113 ± 53 ¹⁾	130 ± 46 ¹⁾	118 ± 53 ²⁾

1) Compared with sham-operated group in the same time, $P < 0.05$; 2) Compared with sham-operated group in the same time, $P < 0.01$

表 2 心肺复苏不同时间点时的 MMP9 mRNA 的表达

Table 2 Expression of MMP9 mRNA of CPR rat in different time ($\bar{x} \pm s$)

Group	0 h	3 h	9 h	24 h	48 h
Sham-operated group	0.25 ± 0.06	0.24 ± 0.07	0.26 ± 0.08	0.25 ± 0.05	0.24 ± 0.07
Resuscitation group	0.24 ± 0.07	0.63 ± 0.12 ¹⁾	0.79 ± 0.14 ¹⁾	1.06 ± 0.28 ²⁾	0.96 ± 0.25 ²⁾

1) Compared with sham-operated group in the same time, $P < 0.05$; 2) Compared with sham-operated group in the same time, $P < 0.01$

2.3 心肺脑复苏后大鼠血脑屏障的变化

2.3.1 心肺脑复苏后大鼠脑含水量的变化

假手术组 5 个不同时间点大鼠脑含水量的比较无差别。复苏组在心肺复苏 3 h 脑含水量明显升高,9 h 进一步升高,24 h 达到高峰,与假手术组比较差异有统计学意义(表 3)。

2.3.2 心肺脑复苏后大鼠脑组织伊文思蓝含量的变化

假手术组 5 个不同时间点大鼠脑组织伊文思蓝含量的比较无差别。复苏组在心肺复苏 3 h 脑组织伊文思蓝含量明显升高,9 h 进一步升高,24 h 达到高峰,与假手术组比较差异有统计学意义(表 4)。

表 3 心肺复苏不同时间点时的脑含水量

Table 3 Expression of water content of CPR rat in different time ($\bar{x} \pm s$, %)

Group	0 h	3 h	9 h	24 h	48 h
Sham-operated group	76.9 ± 2.5	78.4 ± 3.1	77.7 ± 2.2	78.4 ± 1.6	78.3 ± 2.8
Resuscitation group	77.5 ± 2.9	83.4 ± 2.4 ¹⁾	86.7 ± 2.5 ¹⁾	93.6 ± 2.5 ¹⁾	89.2 ± 2.0 ¹⁾

1) Compared with sham-operated group in the same time, $P < 0.01$

表 4 心肺复苏不同时间点时的脑组织伊文思蓝含量

Table 4 Expression of water content of CPR rat in different time ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/g}$)

Group	0 h	3 h	9 h	24 h	48 h
Sham-operated group	4.3 ± 2.5	3.9 ± 1.6	4.3 ± 2.6	4.3 ± 1.9	4.1 ± 2.6
Resuscitation group	6.0 ± 2.2	10.5 ± 4.8 ¹⁾	11.1 ± 4.6 ¹⁾	11.9 ± 3.5 ¹⁾	11.6 ± 3.3 ¹⁾

1) Compared with sham-operated group in the same time, $P < 0.01$

2.4 电镜超微结构观察

假手术组在即刻、3 h、9 h、24 h 和 48 h 时间点的电镜超微结构观察均未见超微结构的改变

(图 1A-E)。复苏组在即刻时间点未见超微结构的改变,在 3 h、9 h、24 h 和 48 h 时间点均发现超微结构的改变,在 24 h 和 48 h 时间点变化明显,

主要为血管周围有水肿明显、有空泡,微血管基底膜可见增厚,细胞间隙水肿现象,间隙增大,有的

内皮细胞肿胀特别明显,有的发生凋亡,亦可见神经元不同时期的凋亡现象(图2A-E)。

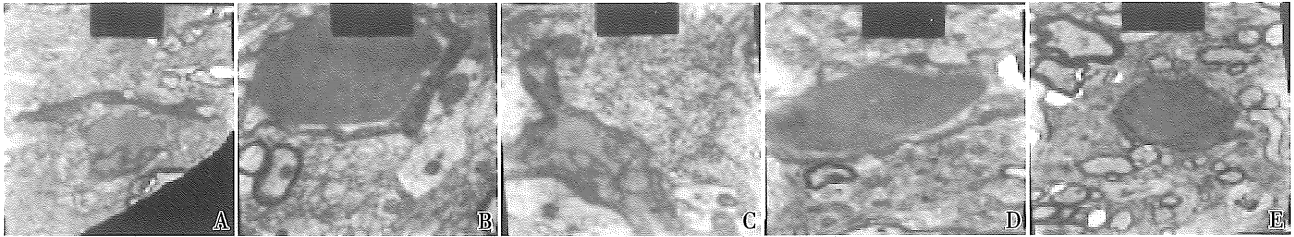


图1 假手术组不同时点脑组织电镜观察

Fig.1 The observation of brain tissue of Sham-operated group with electron microscope in different point

A: 0 h; B: 3 h; C: 9 h; D: 24 h; E: 48 h; $\times 13\ 000$

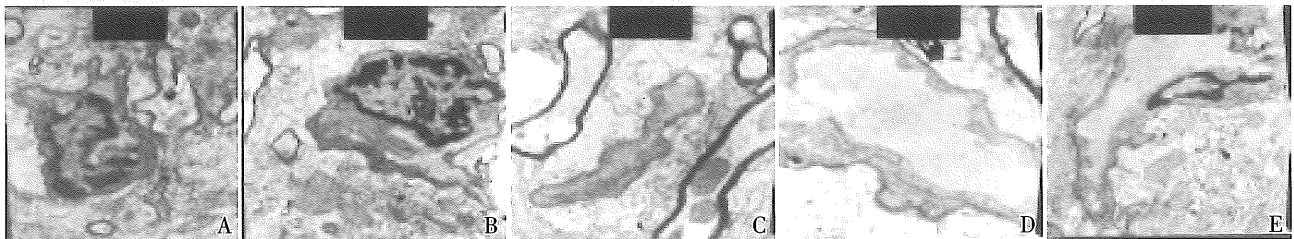


图2 复苏组不同时点脑组织电镜观察

Fig.2 The observation of brain tissue of resuscitation group with electron microscope in different point

A: 0 h; B: 3 h; C: 9 h; D: 24 h; E: 48 h; $\times 13\ 000$

3 讨论

CPR后,脑组织由于缺血缺氧可出现一定程度的损害,主要为脑复苏后脑水肿形成、脑缺血-再灌注损伤^[1-2]。随着急救医疗体系的完善和CPR技术的提高,患者发生心跳骤停后恢复自主循环的机率增加^[3]。然而目前对于循环恢复后继发的缺血缺氧性脑损害仍缺乏足够有效的治疗办法,使得CPR救治成功率仍然不高。

近年来研究发现不少内科急危重症中MMPs分泌增加,加速ECM的降解,可造成组织的损伤。MMPs是一组含锌酶的基因家族,被分泌至细胞外间隙,在中性pH环境下能够起作用。MMPs能降解几乎细胞外基质的所有成分,MMPs的激活能降解脑血管上的关键蛋白质,作用于毛细血管周围的主要成分为IV型胶原、层粘连蛋白、纤黏蛋白等的基底膜,这些成分的降解能破坏血管结构的完整性,破坏血脑屏障,从而导致血管渗漏和破裂。在局灶性脑缺血-再灌注损伤研究中,基质金属蛋白酶^[4-6],尤其是MMP9的作用也是日益受到重

视^[7]。Abilleira等^[8]对59例脑出血患者发病24h内的血清MMP9含量进行研究后发现,MMP9含量升高与血肿周围水肿体积和病情恶化有关,与深部出血的相对水肿体积(绝对水肿体积/颅内出血体积)相关;Rosenberg等^[9]在脑缺血区发现,MMP9在缺血后3~4h表达即开始增加,12h后明显增高,24~48h达高峰,一直持续到缺血后15d左右回落到基础水平,表明MMP9与急性期血脑屏障损伤有关。

基于上述研究,发现心肺复苏3h脑组织脑含水量和伊文思蓝含量明显升高,24h大鼠脑组织脑含水量和伊文思蓝含量达到高峰,与假手术组比较差异均有统计学意义,表明大鼠心肺复苏后出现了脑水肿及血脑屏障的破坏,血管源性水肿可能在大鼠心肺复苏所致脑水肿的机制方面起了较重要的作用。本研究在电镜超微结构观察中也证实,心肺复苏后大鼠脑微血管周围水肿明显、微血管基底膜增厚,细胞间隙增大,内皮细胞肿胀、凋亡等,在24h最明显,与假手术组比较均有明显的差异,这些均表明心肺复苏后出现血脑

(下转第427页 to page 427)