

人腦出血血腫周圍神經元凋亡及部分調控基因的研究

吳成翰¹ 丁喜豔¹ 葉小包¹ 王海燕² 黃繩躍³ 黃愛民² 李會忠¹
吳松鷹¹ 余吉³ 嚴曉華³

¹福建中醫學院附屬第二人民醫院 神經科

²福建醫科大學基礎醫學院

³福建省立醫院

摘 要

觀察腦出血 (ICH) 遲發性神經元死亡現象, 瞭解人腦出血後血腫周圍組織神經元凋亡及相關調節機制, 為臨床治療腦出血繼發性損傷尋找新的方法。對29例高血壓腦出血血腫周圍腦組織病理標本和6例非正常死亡3小時內所取的腦組織標本, 採用去氧核糖核苷酸末端轉移酶介導的缺口末端標記法 (TUNEL) 檢測神經細胞凋亡率; 用免疫組織化學法檢測 Bcl-2、Bax、P53、Caspase-3 蛋白表達水準。腦出血患者血腫周圍組織細胞凋亡率及 Bcl-2、Bax、P53、Caspase-3 蛋白表達明顯高於正常對照組, 差異有統計學意義 ($P < 0.01$)。Bcl-2、P53 蛋白表達與細胞凋亡率呈負相關; Bax、Caspase-3 蛋白表達及 Bax/Bcl-2 與細胞凋亡率呈正相關。細胞凋亡機制參與了腦出血後繼發性神經元損傷。人腦出血後造成 Bcl-2、Bax、P53 蛋白表達增加, Caspase-3 酶活性增加。

關鍵詞: 人 (Human)
腦出血 (Intracerebral hemorrhage)
血腫 (Hematoma)
細胞凋亡 (Cell apoptosis)
凋亡基因 (Apoptosis gene)

前言

腦出血的病理機制十分複雜, 根據目前的動物實驗觀察, 腦出血對機體的損傷分為原發性和繼發性兩種, 原發性損傷引起的神經細胞和軸突的壞死是不可逆的, 任何治療措施都無濟於事, 而繼發性損傷是可治療的, 近期的研究證實細胞凋亡參與腦出血的繼發性損傷^{1,2}。腦出血治療後神經功能改善的主要原因是因為血

腫周圍存在半暗帶, 半暗帶的神經元在一定時間內是可逆的。如能在此時間窗內給予適當的干預, 可使受損的神經組織恢復功能³, 因此對血腫周圍病理機制的探討十分必要。遺憾的是, 既往的研究大多在動物身上進行, 在人類腦出血是否存在著類似的病理改變, 2003年 Qureshi 等⁴對12例腦出血血腫周圍腦組織的細胞凋亡現象進行了觀察, 發現細胞凋亡存在于血

腫周圍區域，是引起細胞死亡的主要方式。但該研究是對既往所收集的標本進行回顧性研究，而且部位分散；在文章的結尾，作者提出了下一步要用免疫組化來分析凋亡的特徵並研究凋亡的調控因素，但至今未見相關的報導，因此我們進行了這項工作，因為血腫清除術乃是目前重症腦出血的治療手段之一，病理標本有了來源，使得該專案得以實施。我們收集了29例腦出血（ICH）患者基底節區血腫周圍組織病理標本，對神經元凋亡現象及部分調控基因進行觀察，以探討細胞凋亡在腦出血後繼發性損傷中的作用及調節機制。

資料與方法

一、病例

我們對在2004年5月至2005年3月間在福建省立醫院和福建中醫學院附屬第二人民醫院住院進行外科手術的29例高血壓腦出血病人留取的病理標本進行研究。所有患者均在術前由患者及/或親屬簽署了知情同意書，同意參加這項研究。每個病人的臨床資料均需符合入選條件。入選條件為：1) 根據病史及CT掃描明確為高血壓腦出血的診斷；2) 出血部位必須在基底節區、出血量需在30ml以上；3) 進行外科手術治療，對所取的標本進行病理研究；4) 排除其他原因引起的腦出血，如腦外傷、腦血管畸形、動脈瘤及澱粉樣血管病變，必要時使用剛果紅染色予以鑒別。

資料收集：通過詢問患者及/或親屬，我們收集到了29例病人的下述資料：男性16例，女性13例，年齡42-78歲，平均65歲。同時收集既往病史及抽煙、飲酒等飲食情況，神經系統症狀根據美國國立衛生研究院卒中量表(NIHSS)進行評分。這種評分由包括有一名教授在內的治療組集體評定完成。在所有29例患者中，有高血壓病29人，冠心病8人，糖尿病3人，腦卒中病史3人，抽煙11人，飲酒12人，發病時測得平均動脈壓（MAP）170-190 mmHg 4人，150-169 mmHg 13人，120-149 mmHg 12人。根據NIHSS評分結果為：最低10分，最高27分， ≤ 15 分12名，16-20分10名， > 20 分7名；起病到接受手術

治療的平均時間為32.6h，10h以內4例，15-24h 7例，25-66h 17例，120h 1例。每個患者的平均出血量為50.37ml，其中30-45ml 13例，45.1-78ml 16例。術後死亡3例，死亡的主要原因為：再出血1例，腦疝2例。

CT掃描：所有病例均在起病後平均2.1小時內在急診科進行頭顱CT掃描，入院後根據常用的多田公式【 π （長x寬x層數）/6】計算出血量。所有病人均在術前再次頭顱CT檢查，以排除進展性腦出血。

病理標本採集與處理：根據顱腦CT掃描顯示的血腫部位行血腫清除術，切開硬腦膜，沿手術徑路用腦穿刺針探查血腫深度，在探查的過程中在穿刺針尾部（接有空注射器）使用少許負壓，即可吸出一條從皮質到血腫腔完整的少許腦組織，將其留做病理標本，取離血腫邊緣約1.5cm處的腦組織行免疫組織化學檢測Bcl-2、Bax、P53、Caspase-3，剩餘部分觀察凋亡細胞。本研究設正常對照組6例，其病理標本由中國福建省南平市中級法院司法鑒定部門法醫提供的非正常死亡後3小時內進行司法鑒定時提取的基底節周圍腦組織。提取前由死者親屬簽署知情同意書，同意提供腦組織標本參加該研究。以上腦組織標本均用10%甲醛固定，常規石蠟包埋，分批檢測。本實驗在實施前已提交醫院倫理委員會審查，沒有違反倫理道德，同意進行該項研究。

二、免疫組織化學染色檢測Bcl-2、Bax、P53、Caspase-3蛋白表達水準

石蠟切片經常規脫蠟水化後，採用二步法（PV-900）檢測腦組織中的Bcl-2、Bax、P53、Caspase-3蛋白表達水準，一抗分別是鼠抗人Bcl-2、Bax、P53單克隆抗體（即用型，購自北京中杉生物公司）及兔抗人caspase-3多克隆抗體（美國Santa Cru Bio technology公司），DAB顯色劑購自北京中杉生物公司，具體操作步驟嚴格按照說明書進行。

鏡下細胞漿染色呈棕黃色為Bcl-2、Bax、caspase-3陽性細胞，胞核上有棕黃色顆粒者為p53陽性細胞。每張切片上選擇10個具有代表性的高倍視野（ $\times 400$ ），計數陽性細胞數和陰性

細胞數，並計算陽性率 [陽性率=陽性細胞數/(陽性細胞數+陰性細胞數) \times 100%]，計算平均值。

三、TUNEL法檢測凋亡細胞

石蠟切片經脫蠟入水後，置於0.3%過氧化氫液中，室溫30min，採用TUNEL試劑盒（德國Roche公司）檢測凋亡細胞，用BCIP/NBT顯色，具體操作參照Qureshi等⁴的方法。

鏡下細胞核染色呈蘭黑色為TUNEL陽性細胞，在光鏡400倍下選擇10個具有代表性的視野，計數陽性及陰性細胞數，並計算凋亡細胞百分率 [凋亡細胞百分率=陽性細胞數/(陽性細胞數+陰性細胞數) \times 100%]，計算平均值。

四、統計學方法

經D檢驗呈非正態分佈，經自然對數轉換後呈正態分佈，計量資料以mean \pm SD表示，指標之間相關性分析使用Spearman correlation相關分析。統計處理在SPSS 13.0軟體系統下完成。

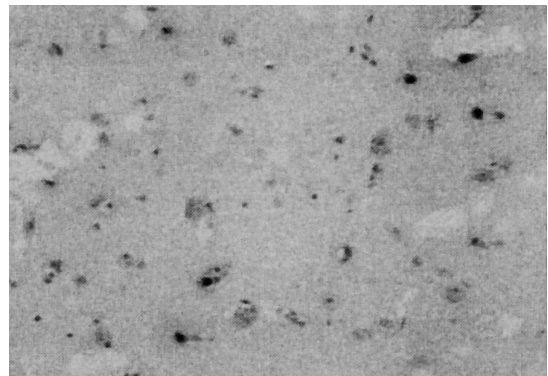
結果

一、所有病例血腫周圍的凋亡證據是明顯的，在血腫周邊觀察到的主要是壞死細胞和少許的凋亡細胞，在血腫的附近區觀察到的主要是凋亡細胞和少許的壞死細胞，凋亡在症狀出現的6h內即可觀察到，越往後凋亡細胞數越多，15h左右達到高峰，而對照組僅觀察到個別的凋亡細胞。在進行免疫組織化學染色檢測的29例標本中均檢測到大量的Bcl-2、Bax、P53、Caspase-3表達的陽性細胞，而對照組極少表達。如圖一(A~J)所示。

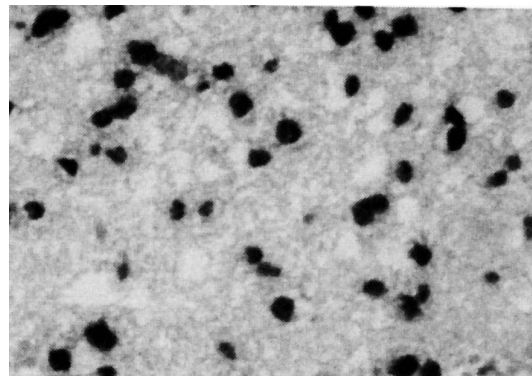
二、ICH患者與對照組細胞凋亡率及Bcl-2、Bax、P53、Caspase-3蛋白表達陽性率的比較 (mean \pm SD)：見圖二，從圖二可見ICH組細胞凋亡率及Bcl-2、Bax、P53、Caspase-3蛋白表達明顯高於對照組，差異有統計學意義。

三、Bcl-2、Bax、Bax/Bcl-2、P53、Caspase-3與出血量、NIHSS積分及細胞凋亡率的相關分析：見表一。

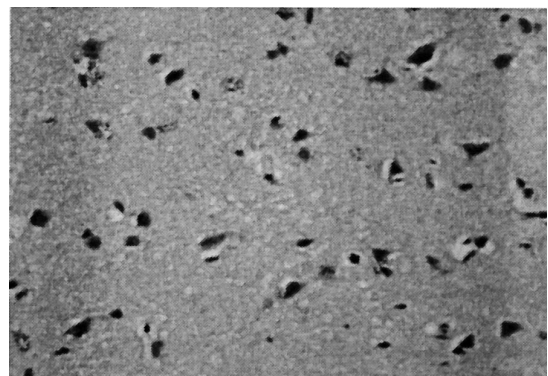
從表一可見，Bcl-2、P53蛋白表達陽性率與出血量、NIHSS積分及細胞凋亡率呈負相關(P均 $<$ 0.01)，Bax、Bax/Bcl-2及Caspase-3與出血量、



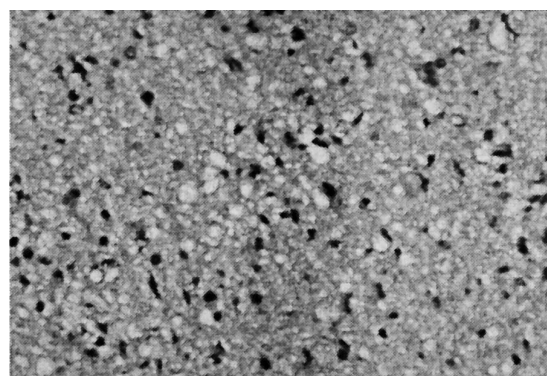
圖一A：正常人腦組織細胞凋亡(10X20)。



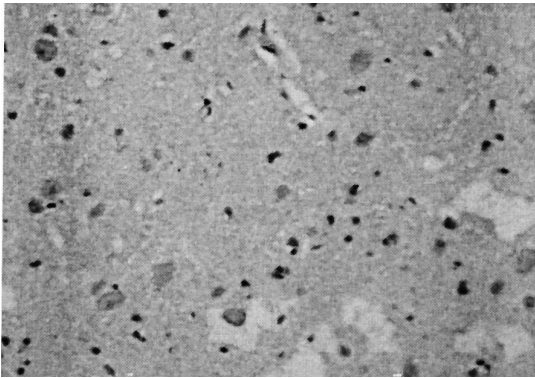
圖一B：腦出血患者腦組織細胞凋亡(10X40)。



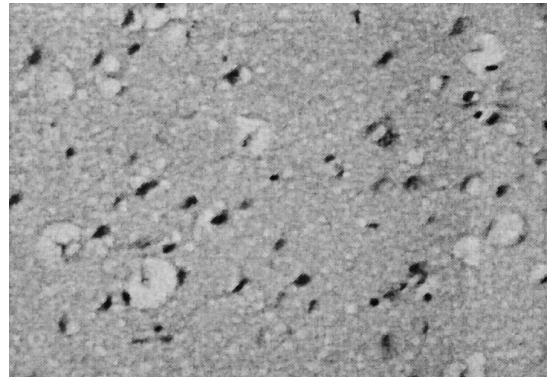
圖一C：正常人腦組織bcl-2蛋白表達(10X20)。



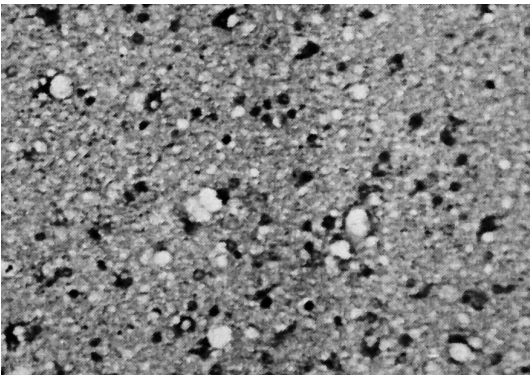
圖一D：腦出血患者腦組織bcl-2蛋白表達(10X20)。



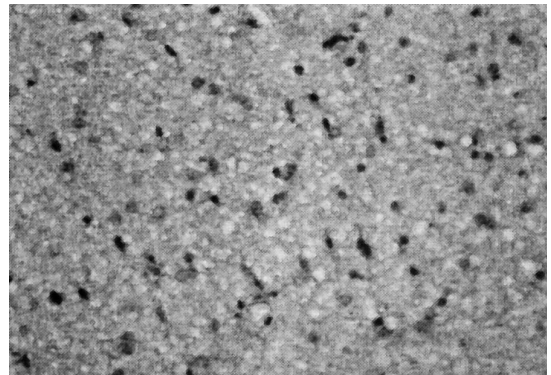
圖一E：正常人腦組織bax蛋白表達(10X20)。



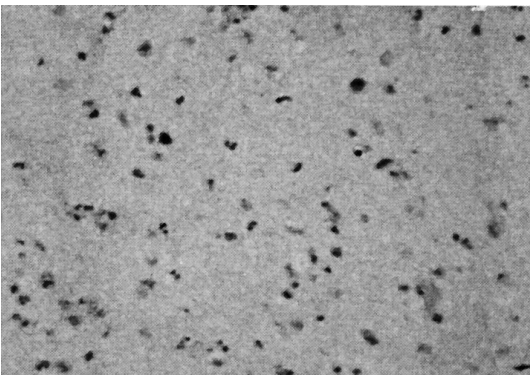
圖一I：正常人腦組織caspase-3蛋白表達(10X20)。



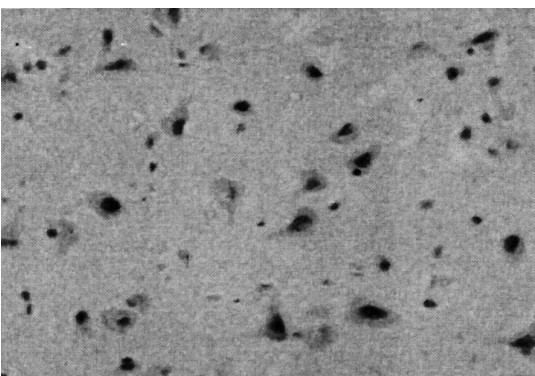
圖一F：腦出血患者腦組織bax蛋白表達(10X20)。



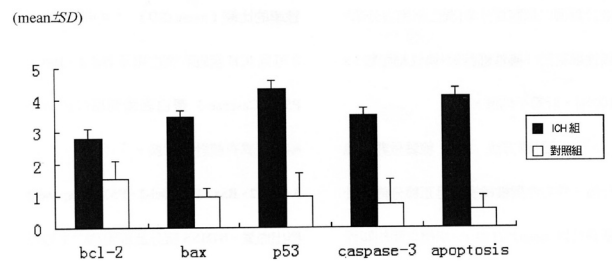
圖一J：ICH腦組織caspase-3蛋白表達(10X20)。



圖一G：正常人腦組織P53蛋白表達(10X20)。



圖一H：ICH腦組織P53蛋白表達(10X40)。



圖二：ICH組與對照組細胞凋亡率及Bcl-2、Bax、P53、Caspase-3蛋白表達陽性率的比較(mean ± SD)。

注：該圖資料為經自然對數轉換後的資料，ICH組與對照組相比較，P均<0.01。

NIHSS積分及細胞凋亡率呈正相關(P均<0.01)。Bcl-2、Bax、P53、Caspase-3蛋白表達及Bax/Bcl-2比值對細胞凋亡具有調控作用。

四、Bcl-2、Bax、Bax/Bcl-2、P53與Caspase-3的相關分析：見表二。

結果表明，凋亡調控基因之間也存在著一

表一：Bcl-2、Bax、Bax/Bcl-2、P53、Caspase-3與出血量、NIHSS及細胞凋亡率的相關性

	出血量 (ml)		NIHSS積分		細胞凋亡率	
	r_s	P	r_s	P	r_s	P
Bcl-2	-0.676	$P<0.01$	-0.764	$P<0.01$	-0.671	$P<0.01$
Bax	0.654	$P<0.01$	0.604	$P<0.01$	0.592	$P<0.01$
Bax/Bcl-2	0.741	$P<0.01$	0.788	$P<0.01$	0.721	$P<0.01$
P53	-0.674	$P<0.01$	-0.728	$P<0.01$	-0.818	$P<0.01$
Caspase-3	0.802	$P<0.01$	0.683	$P<0.01$	0.688	$P<0.01$

表二：Bcl-2、Bax、Bax/Bcl-2、P53與Caspase-3的相關性

	Caspase-3	
	r_s	P
Bcl-2	-0.626	$P<0.01$
Bax	0.416	$P<0.05$
Bax/Bcl-2	0.570	$P<0.01$
P53	-0.458	$P<0.05$

定的相關性，Bcl-2與Caspase-3呈負相關、Bax與Caspase-3呈正相關、Bax/Bcl-2與Caspase-3呈正相關、P53與Caspase-3呈負相關 ($P<0.01$)。

討論

一、本研究的突出發現

在Qureshi等⁴之後，再次證實了人腦出血急性期損傷的病理變化。我們在血腫腔周邊觀察到以壞死細胞為主，往皮層方向逐漸出現了凋亡細胞，而且越來越多，壞死細胞逐漸減少，在離血腫邊緣1.5cm以外的區域觀察不到壞死細胞，但出現了大量的凋亡細胞，凋亡在腦出血後6h就被觀察到，此後逐漸增多，到15h達到高峰，此高峰一直持續到我們所觀察的66h，到120h減少。這與Matsushita等³和Nakashima等⁵的動物實驗觀察結果基本符合。可以看出凋亡是個進展性過程，有一定的時間窗，如能在此時間窗內阻斷凋亡，則可減少細胞的死亡，這為臨床上治療干預提供了可能。同時，我們還發現了細胞凋亡與很多因素有關，與出血量、NIHSS積分呈正相關，出血量越大，凋亡率越高，病情越重。可見，腦出血後的細胞凋亡現象與神經損傷的變化趨勢一致。但沒有發現凋

亡與病程有關，這可能與我們所選的手術病例大部分在15h之後（僅有3例在8h以內）有關，因為15h以後凋亡已進入高峰期，此外可能還與所選病例出血量大、樣本數較少有關，今後如能以小時為單位進行時間與凋亡關係的研究則能解決此問題。

首次在人腦出血病理標本上應用免疫組織化學染色檢測凋亡的相關調控基因。在凋亡細胞存在最嚴重的區域內我們觀察到了Bcl-2、Bax、P53及Caspase-3陽性細胞的大量表達，而這些物質在正常對照組腦組織中僅有少量表達。這種表達的陽性率與細胞凋亡率有相關性，這種相關性對細胞凋亡具有調控作用。

二、人腦出血後凋亡相關調控基因蛋白表達及意義

經典的細胞凋亡是體內外因素觸發細胞內預存的死亡程式而導致的細胞死亡過程，它包括凋亡信號的轉導、基因的啟動、凋亡的執行及凋亡細胞的消除四個階段，是一種基因調節的複雜過程⁶。細胞凋亡的多步驟基因調控機制仍在研究之中，但現在認為至少包含了兩個重要機制，即Bcl-2家族蛋白的調控及caspase（胱氨酸蛋白酶）家族的啟動。

(一).Bcl-2、Bax蛋白表達及意義

Bcl-2是第一個被確認有抑制凋亡作用的基因，通過抑制凋亡而增加細胞生存。Bax是Bcl-2家族中最具促凋亡特徵的基因，生物作用是促進凋亡，拮抗Bcl-2的功能。Bcl-2與Bax兩者的平衡與凋亡調控直接相關，Bcl-2與Bax比值的高與低可能決定細胞在受到凋亡刺激信號後是趨向於存活還是凋亡⁷。本研究顯示，正常對照組Bcl-2有少量表達，Bax則很少表達，ICH組Bcl-2

和Bax的表達明顯高於對照組，但Bax表達的增加較Bcl-2表達的增加更為明顯，從而抑制Bcl-2的作用產生促凋亡作用。Bcl-2蛋白表達陽性率與細胞凋亡率成負相關、Bax蛋白表達陽性率與細胞凋亡率成正相關，與李維瀧等⁸的動物實驗結果一致。經Bax/ Bcl-2比值與細胞凋亡率的相關性分析，發現兩者呈正相關。說明Bcl-2、Bax蛋白表達及兩者的比值對ICH患者血腫組織周圍細胞凋亡具有調控作用。另外，從Bax蛋白表達陽性率及Bax/ Bcl-2比值與出血量、NIHSS積分成正相關，Bcl-2蛋白表達陽性率與出血量、NIHSS積分成負相關的關係可以看出，出血量大時，凋亡誘導因素就強，促凋亡基因Bax的啟動隨之增加，Bax/Bcl-2比值也升高，細胞凋亡率增加，病情隨之加重。

(二).P53蛋白表達及意義

P53是細胞基因的"看守衛士"，監視基因的完整性。本研究顯示ICH組P53蛋白明顯表達，而正常對照組極少表達，經相關分析其表達與細胞凋亡率、出血量、NIHSS積分呈負相關，表明P53參與了血腫周圍腦組織細胞凋亡的調控。

(三).Caspase-3的活化

Caspase家族是一組特異性切割天門冬氨酸(aspartate)的半胱氨酸蛋白酶(cysteine protease)，是細胞死亡的執行者，Caspase是細胞進入程序性死亡的特異性標誌，其調控蛋白主要有三種：P53、bcl-2、apaf1蛋白⁹。本研究顯示ICH組Caspase-3蛋白高表達，其表達與細胞凋亡率、出血量、NIHSS積分呈正相關，表明腦出血後存在Caspase-3蛋白酶活性的增加，且出血量越大，Caspase-3蛋白表達越高，細胞凋亡率隨之增高，繼發性損傷越重。

三、部分相關調控基因的關係

另外本研究結果表明Caspase-3與Bax及Bax/Bcl-2呈正相關性，與Bcl-2、P53呈負相關性，可見Caspase和Bcl-2家族及P53分子間不是相互獨立的而是相互作用的，這反映了調亡過程的複雜性。腦出血後血腫周圍區大量神經元發生調亡，調亡的調控機制十分複雜，可能存在一條P53誘導的通過bax依賴的caspase-3酶啟動的

細胞調亡基因調控機制。通過調控相關的基因可以減少細胞調亡的發生。在這方面已有大量的動物實驗在進行，Matsushita等³的研究發現應用Caspase抑制劑可顯著減少24-48h的TUNEL陽性細胞數。Bissonnette等¹⁰發現IL-1 α 和IL-6可減少星形膠質細胞和小膠質細胞的氧化損害，而減少細胞調亡。劉楠等¹¹研究認為IL-8單克隆抗體可提高Bcl-2，減少Bax，使Bax/ Bcl-2的比值增高，從而抑制神經元調亡。這些研究使我們看到了將來臨床使用抑制神經細胞調亡藥物的美好曙光。

參考文獻

1. Xue M, Del Bigio MR. Intracortical hemorrhage injury in rats: relationship between blood fractions and brain cell death. *Stroke* 2000; 31: 1721-7.
2. Matsushita K, Meng W, Wang X, et al. Evidence for apoptosis after intercerebral hemorrhage in rat striatum. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 396-404.
3. Siddique MS, Mendelow AD. Surgical treatment of intracerebral haemorrhage. *Br Med Bull* 2000; 56: 444-56.
4. Qureshi AI, Suri MF, Ostrow PT, et al. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery* 2003; 52: 1041-8.
5. Nakashima K, Yamashita K, Uesugi S, et al. Temporal and spatial profile of apoptotic cell death in transient intracerebral mass lesion of the rat. *J Neurotrauma* 1999; 16: 143-51.
6. Carlos PC, Donald LP, Lee JM. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol* 1997; 387: 70-87.
7. Pepper C, Hoy T, Bentley DP. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer* 1997; 76: 935.
8. 李維瀧、蘇芳忠、陶勝忠、等。兔腦出血灶周圍腦組織細胞調亡及bcl-2和bax的檢測。河南醫科大學學報 2001; 36: 678-80.
9. 張美霞、羅清禮。視網膜疾病與細胞調亡及caspase研究概況。中華眼底病雜誌 2001; 17: 79-81。
10. Bissonnette CJ, Klegeris A, McGeer PL, et al. Interleukin 1 α and interleukin 6 protect human neuronal SH-SY5Y cells from oxidative damage. *Neurosci Lett* 2004; 361: 40-3.
11. 劉楠、韓英、陳榮華、等。白細胞介素8單克隆抗體對大鼠腦缺血再灌注損傷的保護作用。中華神經科雜誌 2005; 38: 455-7.

Neural Apoptosis of Around Hematoma and Some Apoptosis-gene in Intracerebral Hemorrhage Patients

Cheng-Han Wu, Xi-Yan Ding, Xiao-Bao Ye, Hai-Yan Wan, Sheng-Yao Huang,
Ai-Min Huang, Hui-Zhong Li, Song-Ying Wu, Ji Yu, and Xiao-Hua Yan

*Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Fujian
College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, China*

To observe human neural apoptosis and expression of apoptosis-related genes in order to elucidate regulation mechanism in the perihematomal region of Intracerebral Hemorrhage (ICH) patients. We selected 29 specimens of the perihematoma region from 29 patients who underwent surgical evacuation of an intracerebral hematoma. The control group included 6 samples that were collected from crops within 3 hours after they died from accidents. The neural apoptosis was evaluated by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine 5'triphosphate nick end labeling (TUNEL) method and the expression of Bcl-2, Bax, p53, and caspase-3 genes were detected by immunohistochemistry method. The apoptosis rate and the expression of Bcl-2, Bax, p53, caspase-3 in the perihematomal region of ICH patients increased significantly in comparison with the control group ($p < 0.01$). The expression levels of Bcl-2 and p53 correlated negatively with the apoptosis rate ($p < 0.01$), while the expression levels of Bax, caspase-3 and the Bax/Bcl-2 ratio correlated positively with the apoptosis rate in perihematomal region of ICH patients ($p < 0.01$). Apoptosis was involved in the delayed brain injury after ICH in human. The expression of Bax, caspase-3 and the Bax/Bcl-2 ratio changed as the apoptosis and may play an important role during the period of apoptosis. (J Intern Med Taiwan 2009; 20: 440-446)