

·实验研究 Experimental research·

实验性兔脑血管痉挛模型中 I 型钙蛋白酶表达的初步研究

吴 健, 余 健, 印 佳, 刘一之

【摘要】 目的 研究 I 型钙蛋白酶(calpain-I)在兔脑血管痉挛(CVS)模型中的表达,探讨钙蛋白酶在 CVS 中的意义。**方法** 25 只健康清洁级新西兰大白兔,5 只为正常对照组,20 只采用血管内穿刺法制成脑血管痉挛模型,随机分为蛛网膜下腔出血(SAH)12 h、1 d、3 d、7 d 组,用免疫组化染色(SP 法)观察基底动脉平滑肌中 calpain-I 的表达,并采用组织化学评分法进行半定量分析,观察其表达的变化。**结果** 对照组基底动脉见极少量 calpain-I 阳性染色平滑肌细胞,SAH 12 h 组见少量阳性细胞,随着时间的延长,阳性细胞数显著增多,染色强度明显增加,以 SAH 后 3 d 组为最明显,在 SAH 后 7 d 组仍可见大量阳性染色平滑肌细胞,但染色强度下降。半定量分析显示 SAH 后 3 d 为 calpain-I 表达高峰,各组之间 calpain-I 表达差异具有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** SAH 后痉挛的脑血管平滑肌 calpain-I 表达增强,且具有早期、渐变、持续性的特点,calpain-I 可能参与 CVS 血管壁结构性改变的信号调节过程。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;脑血管痉挛;I 型钙蛋白酶;实验动物,兔

中图分类号:R-332 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2010)-08-0631-04

The expression of calpain-I in cerebral vasospasm: a preliminary investigation in experimental rabbits

WU Jian, YU Jian, YIN Jia, LIU Yi-zhi. Department of Interventional Radiology, the Affiliated Taixing People's Hospital, Yangzhou University, Taixing, Jiangsu Province 225400, China

Corresponding author: LIU Yi-zhi

【Abstract】 Objective To investigate the expression of calpain-I in rabbit model with cerebral vasospasm and to discuss the clinical significance of calpain-I in cerebral vasospasm. **Methods** Twenty-five healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into two groups: normal control group ($n = 5$) and subarachnoid hemorrhage (SAH) group ($n = 20$). The subarachnoid hemorrhage was created by endovascular punctures. The SAH group, according to the time of sacrifice, was randomly and equally subdivided into 12-hour, 1-day, 3-day, and 7-day subgroups with 5 rabbits in each group. The expressions of calpain-I of the smooth muscles of basilar arteries in both groups were determined by means of immunohistochemistry technique, and the semi-quantitative analysis of calpain-I was evaluated by histochemistry score. **Results** The expression of calpain-I was slightly elevated at 12 hours after SAH, it reached to its peak at the third day, and then declined on the seventh day. The semi-quantitative analysis of calpain-I showed that the difference in the expression of calpain-I between two groups was of statistic significance ($P < 0.01$). **Conclusion** After subarachnoid hemorrhage, the expression of calpain-I in the spasmodic smooth muscles of basilar artery is enhanced, and the changes of the expression level is early, gradual and continuous. Most probably, the calpain-I participates in the process of vessel wall structural signal transduction change in cerebral vasospasm. (J Intervent Radiol, 2010, 19: 631-634)

【Key words】 subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm; calpain-I; experimental animal; rabbit

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)可致

脑组织缺血或迟发性缺血性脑损害,甚至脑梗死,成为 SAH 致死和致残的主要因素^[1]。CVS 发病机制至今仍未完全清楚,目前认为 CVS 病理生理变化包括持久的脑血管收缩和血管结构性改变。同时,血管平滑肌细胞内 Ca^{2+} 存在异常增高^[2]。而钙蛋白酶

作者单位:225400 江苏省泰兴扬州大学附属泰兴人民医院介入科(吴 健),麻醉科(余 健),神经外科(印 佳);苏州大学附属第一医院介入科(刘一之)

通信作者:刘一之

(calpain)作为细胞内 Ca^{2+} 依赖的中性蛋白酶,在病理状态下过度活化为具有蛋白水解功能的活性形式,可引起细胞内相关蛋白和酶的降解,从而导致一系列疾病,如早老性痴呆、脑缺血损害、创伤性脑脊髓损伤等的发生^[3]。本实验采用兔 CVS 动物模型,通过免疫组织化学方法观察 CVS 中不同时间点兔脑基底动脉血管平滑肌内 calpain-I 的表达,探讨钙蛋白酶在 CVS 疾病发生过程中的意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和器材

免疫组化试剂一抗为鼠抗兔多克隆 calpain-I 抗体(英国 Abcam 公司);二抗为广谱二抗(上海长岛生物技术公司);EXCEL-14 微导管(Boston 公司);0.010 英寸 Transend EX platinum 微导丝(Cordis 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 25 只新西兰大白兔(苏州大学医学院实验动物中心提供)4~5 月龄,体质量 2~3 kg,雌雄不拘。采用血管内穿刺法制作兔 CVS 模型:30%乌拉坦溶液 2.0~3.0 ml/kg 经兔耳缘静脉注射麻醉后,分离股动脉并插入 0.035 英寸超滑导丝和 4 F 猎人头导管至颈总动脉造影了解颈内动脉解剖并确定工作位。随后用 4 F 导管接 Y 阀连接肝素生理盐水加压冲洗装置(压力 250 mmHg),经 Y 阀同轴引入预塑形微导管、微导丝系统,在路图指导下导管导丝配合插入右(或左)颈内动脉后行脑血管造影。然后将微导丝硬头端送入微导管,在透视下调整微导管确保导管头未移出颈内动脉后将导丝硬头快速推出微导管 1~2 cm,重复上述动作 2 次后退出微导丝,结扎股动脉,缝合皮肤切口结束操作。

1.2.2 SAH 及 CVS 发生的判断 头颅 CT 扫描颅底部脑池显示为清晰低密度者为未出血,若低密度脑池影消失或显示为高密度铸型者则为发生 SAH。如 SAH 组基底动脉内径缩小与对照组均值比较存在统计学差异,则认为发生 CVS;如差异无统计学意义,则判断为未发生 CVS。

1.2.3 实验分组 分正常对照组,SAH 12 h,1、3、7 d 5 组(每组 5 只),每日观察并记录兔的行为和神经功能情况。所有实验兔在上述时间点麻醉后处死灌注,取全脑标本置于固定液中以备免疫组化检测。

1.2.4 HE 染色及基底动脉内径测量 在基底动脉上、中、下段分别切取 3 段包含基底动脉和附近部

分脑组织的标本,梯度脱水并石蜡包埋切片,HE 染色后在光学显微镜 100× 视野下测量,取纵轴和横轴的均值为测量结果。

1.2.5 calpain-I 表达的观察和测定 取血管痉挛性改变显著的切片 SP 法染色。高倍镜下随机选 5 个视野,统计基底动脉壁平滑肌 calpain-I 染色阳性细胞数并根据染色强度及阳性细胞所占百分比用组织化学评分 HSCORE 法计算积分行半定量分析(阳性着色为浅黄色、棕黄色或棕褐色颗粒状,染色强度自轻到重按 0~3 分计算:无着色 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分,积分计算公式: $\text{HSCORE 积分} = \sum (i + 1) \times \text{阳性反应细胞}\%$; i 为染色强度得分^[4],5 个视野的 HSCORE 积分的平均值作为该张切片的最终积分)。

1.3 统计学方法

所有数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,SPSS 13.0 软件进行统计学分析,组间比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAH 模型成功率

本组兔总数 40 只,其中 5 只兔作正常对照,成功制成模型并获取标本 20 只(图 1)。模型成功率 57%(20/35)。

a 对照组兔脑 CT 扫描(脑池为清晰低密度) b SAH 组 CT 扫描(脑池高密度铸型)

图 1 对照组与 SAH 组 CT 扫描图

2.2 SAH 后实验兔行为学改变

所有动物 SAH 后均有不同程度的行为学异常,表现为出血后即刻心率迅速加快,呼吸急促,前肢强直样改变,10 只兔出现大小便失禁,8 只出现呼吸骤停,3 只经吸氧和人工呼吸抢救后在 10 min 内恢复自主呼吸;出血后第 1 天动物均表现为不同程度的神情呆滞、活动差、嗜睡、拒食,1~2 d 后才逐渐恢复,第 7 天表现同正常兔无明显差别。

2.3 SAH 各组 and 对照组比较

SAH 各组动物基底动脉内径显著减小,血管收

缩明显。其中 SAH 后 12 h 收缩最明显,与对照组比较,动脉内径下降了约 50.4%。在随后的第 1 d 有所恢复,SAH 后第 7 d 基底动脉内径再次明显缩小,与对照组比较降低了 45.7%。对照组和 SAH 12 h, 1、3、7 d 时测得的基底动脉内径平均值分别为 (427.72 ± 7.99) 、 (212.10 ± 16.95) 、 (334.68 ± 17.41) 、 (333.82 ± 12.11) 和 $(231.94 \pm 11.48) \mu\text{m}$ 。SAH 各组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。基底动脉在 SAH 第 7 天时观察到有明显的结构性改变,表现为血管壁增厚,平滑肌细胞层次增加、极性紊乱、细胞间隙增大、内皮层形态乳头样增生改变(图 2)。

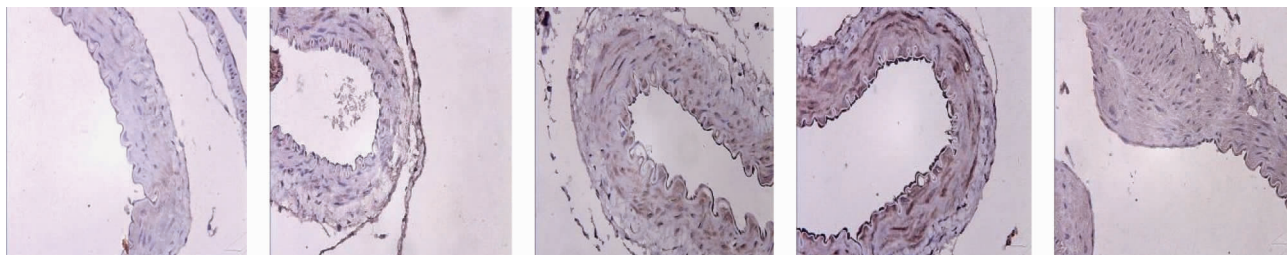
2.4 免疫组化染色

对照组基底动脉切片见极少量 calpain-I 阳性染色平滑肌细胞。SAH 12 h 组见少量阳性细胞,表

a 对照组基底动脉管腔大、管壁薄(HE 染色, $\times 100$) b SAH 7 d 基底动脉管腔缩小,管壁显著增厚(HE 染色, $\times 100$)

图 2 对照组和 SAH 组基底动脉血管壁比较

现为平滑肌细胞中淡黄色颗粒沉着。随着时间的延长,阳性细胞数目明显增多,染色深度显著增加,以 SAH 3 d 组最明显,在 SAH 7 d 组仍可见大量阳性染色平滑肌细胞,但染色强度下降(图 3)。



a 对照组基底动脉 calpain-I 组化染色见极少量阳性染色平滑肌细胞 ($\times 400$) b SAH 后 12 h 组基底动脉 calpain-I 组化染色少量棕黄色阳性染色平滑肌细胞 ($\times 400$) c SAH 后 1 d 组基底动脉 calpain-I 组化染色阳性细胞明显增多 ($\times 400$) d SAH 后 3 d 组基底动脉 calpain-I 组化染色见大量强阳性平滑肌细胞 ($\times 400$) e SAH 后 7 d 组基底动脉 calpain-I 组化染色大量阳性染色平滑肌细胞,染色强度较前降低 ($\times 400$)

图 3 对照组和 SAH 各时间组免疫组化染色结果

2.5 免疫组化半定量分析

对照组兔基底动脉平滑肌 calpain-I 表达微弱,SAH 后 12 h 表达增加,第 3 天表达最强,第 7 天时表达下降,但仍高于对照组。对照组、SAH 各组之间 calpain-I 表达 SAH 各组与对照组相比行 LSD 法方差分析差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

对照组及 SAH 后 12 h、1、3、7 d HSCORE 均分别为 (0.188 ± 0.061) 、 (0.612 ± 0.096) 、 (2.268 ± 0.371) 、 (3.532 ± 0.233) 和 (1.780 ± 0.159) 。

3 讨论

SAH 后血管造影示痉挛的发生率在 65% ~ 70%,其中 36%患者产生症状性脑缺血^[5],严重影响患者的生存和预后。现有的各种治疗手段,包括手术、血流动力学治疗、钙离子阻滞剂等只能取得部分疗效。关于 CVS 的发生机制和病理基础当前仍存在不同观点,自 20 世纪 90 年代以来大量研究主要是围绕 CVS 持续性主动收缩的因素和调节收缩的

信号传导通路,其中钙离子机制是目前研究热点。

钙离子通过电压依赖性(VDCC)和受体依赖性钙离子通道(RDCC)内流以及平滑肌细胞内肌质网贮存的钙离子释放导致细胞内钙离子浓度升高,启动平滑肌细胞收缩。钙离子/钙调蛋白(CAM)依赖的肌球蛋白轻链激酶的激活以及继发性的肌球蛋白轻链磷酸化和脱磷酸化是调节平滑肌收缩的主要通路。CVS 是一种病理性的收缩,与生理性收缩有明显不同,动物实验发现 SAH 后犬的基底动脉细胞内钙离子调节机制受损,并提示肌动蛋白结合蛋白(CAP 和 CAD)的降解和磷酸化在 CVS 的发生中起一定作用^[6]。SAH 后细胞内钙离子浓度升高可能介导了持续的血管收缩^[7]。

calpain-I 是钙依赖性中性蛋白酶,在中枢神经系统中广泛存在。生理状态下大多以无活性的酶原形式存在,其活性形式参与细胞增殖、分化和凋亡等基本细胞事件^[8]。病理状态下钙蛋白酶过度活化可以引起细胞内各种蛋白和酶的降解,导致细胞结

构和功能发生改变。本实验建立的兔血管内穿刺 CVS 动物模型研究表明在 SAH 后 12 h 兔基底动脉明显收缩,SAH 后 1 d 有所恢复,在 7 d 时出现迟发性的收缩并伴有管壁结构性改变。免疫组化结果显示正常对照组基底动脉平滑肌细胞 calpain-I 表达微弱,SAH 组出血后 12 h 表达出现增强,3 d 左右达到高峰,在出血后 7 d 已出现表达下降趋势,但仍高于正常组,各组之间 calpain-I 的表达均具有统计学差异,表明 SAH 后 calpain-I 表达改变具有早期出现、逐渐变化的过程,其表达高峰早于脑血管迟发性痉挛、血管结构性改变的时间。提示 calpain-I 在 CVS 的发生过程中可能参与脑血管壁结构性改变的调节,如启动血管壁的组成细胞及间质的增殖、增生。国内外研究表明钙蛋白酶抑制剂对血管平滑肌及心房肌增殖具有剂量依赖抑制作用^[9-11],也从侧面证实了 calpain-I 参与了上述组织结构的重构。根据现有研究,calpain-I 在 CVS 中的机制可能还包括如下几个方面:①激活的钙蛋白酶可通过有限的酶解作用,使 L-型钙离子通道的空间构象发生改变,导致其对钙离子的传递效率大大提高^[12]。②水解肌动蛋白结合蛋白 CAD 和 CAP,解除对肌动蛋白激活的肌球蛋白 ATP 酶的抑制作用^[13],平滑肌细胞收缩功能得以增强。③部分降解细胞骨架蛋白和收缩蛋白,使细胞收缩单元和细胞骨架脱耦联,导致顺应性下降,对各种扩血管药物的作用失去反应^[14]。

从本实验研究看,SAH 后 CVS 与基底动脉平滑肌细胞增殖所致的器质性管腔狭窄有关,但也不排除出血后脑血管平滑肌出于某种自身保护调节机制而主动收缩。比较可以肯定的是,在 CVS 发生的早期,脑血管壁平滑肌内 calpain-I 表达增强,而且其激活可能参与了脑血管壁结构性改变的信号调节过程。

[参 考 文 献]

- [1] Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought[J]. *Neurol Res*, 2009, 31: 151 - 158.
- [2] Aihara Y, Jahromi BS, Yassari R, et al. Molecular profile of vascular ion channels after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 2004, 24: 75 - 83.
- [3] Gall DE, Thompson VF, Li H, et al. The calpain system[J]. *Physiol Revi*, 2003, 83: 731 - 801.
- [4] Harrington DJ, Lessey BA, Rai V, et al. Tenascin is differentially expressed in endometrium and endometriosis[J]. *J Pathol*, 1999, 187: 242 - 248.
- [5] Nishizawa S, Laher I. Signaling mechanisms in cerebral vasospasm [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2005, 15: 24 - 34.
- [6] Kim I, Leinweber BD, Morgalla M, et al. Thin and thick filament regulation of contractility in experimental cerebral vasospasm[J]. *Neurosurgery*, 2000, 46: 440 - 446.
- [7] Ishiguro M, Wellman TL, Honda A, et al. Emergence of a R-type Ca^{2+} channel (CaV 2.3) contributes to cerebral artery constriction after subarachnoid hemorrhage[J]. *Circ Res*, 2005, 96: 419 - 426.
- [8] Azam M, Andrabi SS, Sahr KE, et al. Disruption of the mouse μ -calpain gene reveals an essential role in platelet function [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 2213 - 2220.
- [9] 杨永健, 朱文玲, 周兴文, 等. 钙蛋白酶参与心力衰竭患者心肌重构的信号传导[J]. *中华心血管病杂志*, 2005, 33: 247 - 250.
- [10] Ariyoshi H, Okahara K, Sakon M, et al. Possible involvement of m-calpain in vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18: 493 - 498.
- [11] Xue Hong jie, Li Wei min, Li Yue, et al. Calpain I inhibition prevents atrial structural remodeling in a canine model with atrial fibrillation[J]. *Chin Med J*, 2008, 121: 32 - 37.
- [12] Vosler PS, Brennan CS, Chen J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration [J]. *Mol Neurobiol*, 2008, 38: 78 - 100.
- [13] Tani E. Molecular mechanisms involved in development of cerebral vasospasm[J]. *Neurosurg Focus*, 2002, 12: 1 - 8.
- [14] Tani E, Matsumoto T. Continuous elevation of intracellular Ca^{2+} is essential for the development of cerebral vasospasm[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2004, 2: 13 - 21.

(收稿日期:2010-01-12)

[1] Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, et al. Cerebral