

# 人脑出血后血肿周围组织 HO-1、GFAP 和 cyclinD1 的表达研究

王文昭 赵忠新 戚基萍 王德生 吴鹤 赵瑛

**【摘要】** 目的 探讨脑出血后血肿周围组织血红素氧合酶-1(HO-1)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和细胞周期蛋白 D1(cyclinD1)表达规律,及其与神经修复之间的关系。方法 HE 染色观察脑出血后神经元和星形胶质细胞形态变化,免疫组织化学染色检测脑出血后不同时间点血肿周围组织 HO-1、GFAP 和 cyclinD1 表达水平。结果 脑出血后 2 h 星形胶质细胞胞质内即开始表达 HO-1[(5.30 ± 1.00) 个/高倍视野]、GFAP[(22.60 ± 1.40) 个/高倍视野]和 cyclinD1[(11.50 ± 1.20) 个/高倍视野],达峰值水平后逐渐下降,脑出血后不同时间点表达水平均高于健侧正常脑组织,且差异具有统计学意义(均  $P=0.000$ )。结论 人脑出血后血肿周围组织 HO-1、GFAP 和 cyclinD1 表达变化呈“抛物线”样,HO-1 和 cyclinD1 共同参与了脑出血后星形胶质细胞的增生与活化,以及脑出血后的继发性损伤和修复。

**【关键词】** 脑出血; 星形细胞; 血红素氧化酶(脱环); 神经胶质原纤维酸性蛋白质; 细胞周期蛋白类; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2011.02.014

**Expressions of heme-oxygenase-1, glial fibrillary acidic protein and cyclinD1 in the perihematomal tissues in human hypertensive intracerebral hemorrhage** WANG Wenzhao, ZHAO Zhongxin, QI Jiping, WANG Desheng, WU He, ZHAO Ying. Department of Neurology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Corresponding author: ZHAO Zhongxin (Email: zhaozx@medmail.com.cn)

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship among the expressions of heme-oxygenase-1 (HO-1), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and cyclinD1 in the perihematomal tissues in human intracerebral hemorrhage (ICH) and brain renovation following ICH. **Methods** Paraffin-embedded brain tissues of 32 human fatal cases of ICH from the perihematomal tissues. The tissues from the hemorrhagic lesion side, as well as tissues from the corresponding area at the opposite side as controls, were stained with HE and immunohistochemistry staining. The expressions of HO-1, GFAP and cyclinD1 in the perihematomal tissues were analysed with SPSS 11.5 software. **Results** Expression of HO-1 could be detected in the specimens of the 2 h group [(5.30 ± 1.00)/HP]. The GFAP and cyclinD1 positive astrocytes in the perihematomal tissues were also identified at 2 h group [(22.60 ± 1.40)/HP, (11.50 ± 1.20)/HP, respectively]. All of their levels decreased gradually after the peak. The positive astrocytes of hemorrhagic lesion side at different time points were higher than contralateral expression in normal brain tissues. The difference was statistically significant. **Conclusion** Expressions of HO-1, GFAP and cyclinD1 in the perihematomal tissues were "parabola". The increased expressions of HO-1 and cyclinD1 after ICH provide a potential protection or destruction mechanism after ICH in human.

**【Key words】** Cerebral hemorrhage; Astrocytes; Heme oxygenase (decyclizing); Glial fibrillary acidic protein; Cyclins; Immunohistochemistry

血红素氧合酶(HO)的主要功能是分解源自血

红蛋白的血红素,同时亦是血红素代谢的起始酶和限速酶。在人类和哺乳动物中共存在 3 种同工酶,即 HO-1、HO-2 和 HO-3<sup>[1]</sup>;其中,HO-1 降解血红素产生铁、一氧化碳和胆绿素,后二者被认为具有调节 HO-1 的抗炎和抗氧化作用<sup>[2]</sup>。大量研究已经揭示了星形胶质细胞在脑出血等损伤过程中的重要作

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30270480)

作者单位:200003 上海,第二军医大学附属长征医院神经内科(王文昭,赵忠新,赵瑛);哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科(戚基萍、吴鹤),神经内科(王德生)

通信作者:赵忠新(Email:zhaozx@medmail.com.cn)

用,主要通过脑出血动物模型观察胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和细胞周期蛋白D1(cyclinD1)的表达规律。在本研究中,我们通过免疫组织化学染色法观察人脑出血后不同时间点血肿周围组织HO-1、GFAP和cyclinD1的表达变化,动态反映脑出血后星形胶质细胞的功能变化,以探讨上述蛋白质在神经损伤与修复过程中的作用,为临床治疗提供一些理论依据。

## 资料与方法

### 一、资料

1. 标本来源 脑组织标本取自哈尔滨医科大学第一临床医学院神经病学教研室脑库全脑标本,并符合以下纳入标准:(1)为单侧基底节、丘脑、额顶叶或颞叶出血,且未破入脑室。(2)排除颅脑创伤、曾经使用过抗凝药物或肿瘤出血患者。

2. 一般资料 共纳入32例1997-2005年在哈尔滨医科大学第一临床医学院神经内科经抢救无效的脑出血死亡患者,男性20例,女性12例;年龄56~84岁,平均(59.26±12.93)岁。出血部位分别位于基底节(23例)、丘脑(4例)、额顶叶(4例)和颞叶(1例)。按照出血时间(发病至死亡)共分为以下7组:出血2h(6例)、1~3d(6例)、4~5d(5例)、6~7d(5例)、8~10d(4例)、11~15d(3例)和16~19d(3例)。

### 二、实验方法

1. 标本制备 于患者死亡后1h采集脑组织标本,自出血灶边缘向外1~3cm及出血灶对侧切取相应脑组织,并以出血灶对侧(健侧)的正常脑组织作为对照。标本置低温冰箱保存,24h内解剖全脑组织标本并即刻以质量分数为3.7%中性甲醛溶液固定,经取材、脱水、透明、浸蜡、包埋、连续切片制备层厚为4μm的脑组织切片。

2. HE染色 光学显微镜下观察血肿周围组织神经元和星形胶质细胞的形态变化。

3. 免疫组织化学染色 (1)试剂:免疫试剂中I抗[为兔抗人HO-1(1:50)、鼠抗人GFAP(1:100)和鼠抗人cyclinD1(1:50)单克隆抗体],通用型SP-9000免疫组织化学检测试剂盒[含通用型IgG抗体(Fab段)-辣根过氧化物酶(HRP)多聚体(1:100)],以及二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒分别购自中山生物工程有限公司和美国Zymed公司。(2)染色方

法:脑组织切片常规脱蜡至水,I抗分别标记HO-1(1:50)、GFAP(1:100)和cyclinD1(1:50);加入通用型II抗,DAB显色,苏木素复染。采用免疫组织化学染色SP二步法,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。以已知阳性反应组织切片<sup>[3]</sup>作为阳性对照,以磷酸盐缓冲液代替I抗作为阴性对照。(3)阳性结果判定:光学显微镜下观察血肿周围脑组织,以星形胶质细胞胞质内出现棕黄色颗粒为HO-1、GFAP和cyclinD1表达阳性细胞。随机选择5个互不重叠的高倍视野(×400),计数阳性细胞数目并分别计算其算术平均值(个/高倍视野)。

### 三、统计分析方法

采用SPSS 11.5统计软件进行数据分析。实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,不同测量时间点HO-1、GFAP和cyclinD1表达水平的比较采用单因素方差分析,两两比较行LSD-*t*检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、组织形态学观察

HE染色显示,出血灶对侧(健侧)的正常脑组织神经元和星形胶质细胞无明显改变(图1a)。出血2h组出血灶周围脑组织神经元肿胀,星形胶质细胞数目明显增加;至出血第7~15天时达峰值水平,神经元体积明显增大,细胞核呈淡染(图1b);出血第15天时星形胶质细胞数目有所下降,但仍高于对照组。

### 二、血肿周围脑组织相关蛋白的表达变化

1. HO-1表达 免疫组织化学染色显示,脑出血后2h血肿周围星形胶质细胞即出现HO-1表达;至第1~3天时阳性细胞数目显著增加并达峰值水平( $P=0.000$ );此后逐渐减少,但至出血第16~19天时仍可见HO-1表达阳性细胞(表1,图2)。而出血灶对侧(健侧)未见HO-1表达( $P=0.000$ ,表1)。

2. GFAP表达 免疫组织化学染色显示,出血后所有测量时间点血肿周围星形胶质细胞GFAP表达阳性细胞数目均高于对照组( $P=0.000$ ,表1)。脑出血后2h,GFAP表达阳性星形胶质细胞数目开始增加,神经元体积增大、突起增粗,阳性细胞染色逐渐加深;于第6~15天时达峰值水平,呈不规则簇状分布,持续维持在较稳定状态( $P=0.000$ );至出血第16~19天时阳性细胞数目逐渐减少,但仍高于出血

2 h 组 ( $P=0.000$ ; 表 1, 图 3)。

3. cyclinD1 表达 免疫组织化学染色显示, 血肿周围星形胶质细胞 cyclinD1 表达阳性, 且不同测量时间点阳性细胞数目均高于对照组 ( $P=0.000$ , 表 1)。cyclinD1 表达阳性细胞自脑出血后 2 h 即开始出现; 至第 6~15 天时阳性细胞数目明显增多且达峰值水平; 持续稳定一段时间后 cyclinD1 表达逐渐减弱, 但仍高于对照组 ( $P=0.000$ ; 表 1, 图 4)。

### 讨 论

自发性脑出血后外渗的红细胞可导致氧化损伤从而诱发氧化应激反应<sup>[4]</sup>。在正常生理情况下, HO-1 仅在少数神经元和星形胶质细胞中表达<sup>[5]</sup>; 但在金属、氧化应激或其他病理条件的刺激下, HO-1 可大量且迅速表达。本实验结果显示, 脑出血后 2 h 血肿周围组织即可出现 HO-1 表达阳性细胞, 表明

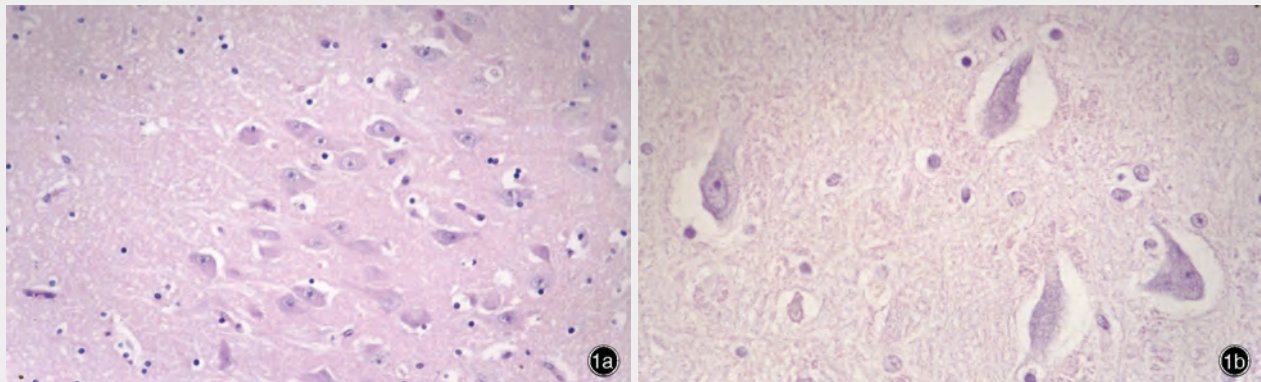


图 1 光学显微镜观察所见 免疫组织化学染色(SP 二步法) 高倍放大 1a 出血灶对侧(健侧)的正常脑组织神经元和星形胶质细胞无明显变化 1b 脑出血后第 7~15 天出血灶周围脑组织神经元体积明显增大, 细胞核淡染; 星形胶质细胞增生

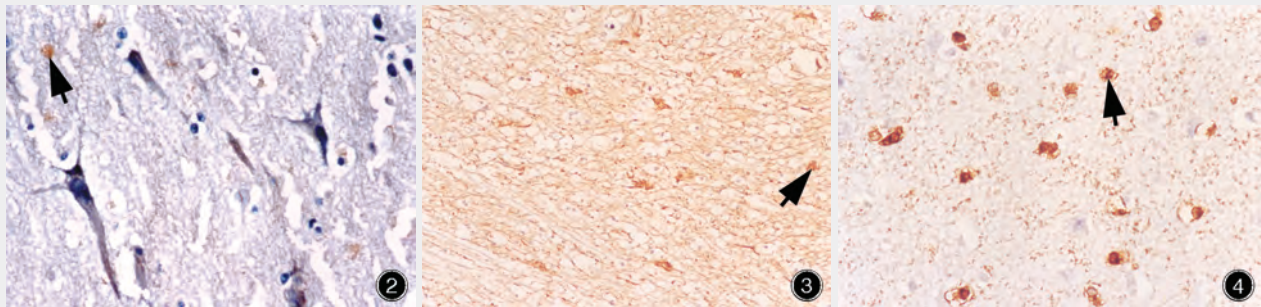


图 2 光学显微镜观察显示, 脑出血第 3 天出血灶周围脑组织星形胶质细胞高表达 HO-1(箭头所示) 免疫组织化学染色(SP 二步法) 高倍放大 图 3 光学显微镜观察显示, 脑出血第 1 天出血灶周围脑组织星形胶质细胞高表达 GFAP(箭头所示) 免疫组织化学染色(SP 二步法) 高倍放大 图 4 光学显微镜观察显示, 脑出血第 5 天出血灶周围脑组织星形胶质细胞高表达 cyclinD1(箭头所示) 免疫组织化学染色(SP 二步法) 高倍放大

表 1 脑出血后不同测量时间点 HO-1、GFAP 和 cyclinD1 表达阳性细胞数目的比较( $\bar{x} \pm s$ , 个/高倍视野)

出血时间	样本例数	HO-1		GFAP				cyclinD1			
		出血组	对照组	出血组	对照组	t 值	P 值	出血组	对照组	t 值	P 值
2 h	6	5.30 ± 1.00	0	22.60 ± 1.40	17.30 ± 2.10	16.656	0.000	11.50 ± 1.20	7.00 ± 0.60	18.209	0.000
1~3 d	6	10.20 ± 0.70	0	31.30 ± 1.30	17.60 ± 2.00	46.778	0.000	21.40 ± 1.30	6.90 ± 0.80	46.107	0.000
4~5 d	5	9.20 ± 0.60	0	44.15 ± 1.50	15.80 ± 1.60	600.345	0.000	35.40 ± 1.50	7.10 ± 0.60	70.171	0.000
6~7 d	5	6.70 ± 0.80	0	52.30 ± 2.40	17.20 ± 1.00	55.613	0.000	43.20 ± 1.20	6.80 ± 0.90	238.516	0.000
8~10 d	4	7.40 ± 0.90	0	51.80 ± 1.50	17.10 ± 1.50	2.061	0.000	42.00 ± 1.20	7.20 ± 0.70	70.261	0.000
11~15 d	3	7.10 ± 1.00	0	51.50 ± 1.89	16.50 ± 1.70	279.925	0.000	41.90 ± 1.40	7.10 ± 0.40	59.460	0.000
16~19 d	3	5.40 ± 0.50	0	38.00 ± 1.70	17.00 ± 1.50	181.187	0.000	29.90 ± 1.80	7.00 ± 0.30	49.315	0.000
F 值		26.352		242.767	0.618			398.366	0.177		
P 值		0.000		0.000	0.714			0.000	0.981		

脑出血可迅速诱导脑组织高表达 HO-1,并以出血第 1~3 天表达水平最高,此与脑出血动物模型的研究结果相似<sup>[6]</sup>。提示:脑出血后红细胞大量溶解和血红素增多可诱导产生大量 HO-1。

颅脑创伤和脑缺血动物模型研究发现,HO-1 具有神经保护作用<sup>[7]</sup>,但部分脑出血研究却得出完全相反的结论<sup>[8]</sup>。众所周知,脑出血后血肿周围组织常伴有明显水肿,此为患者病情加重的重要原因之一,而 HO-1 降解血红素所产生的铁离子、胆红素和一氧化碳等物质可造成脑组织损害,并与脑水肿的产生有关<sup>[4]</sup>。经研究发现,经静脉给予锡中卟啉 IX (HO-1 抑制物)能够有效改善脑出血后的神经元缺失<sup>[9]</sup>。胆红素为强有力的抗氧化剂,有脑血管痉挛的蛛网膜下隙出血患者脑脊液胆红素、HO-1 和过氧化脂质表达水平均明显高于无脑血管痉挛的蛛网膜下隙出血者<sup>[10]</sup>。提示:脑出血可以诱发 HO-1 和胆红素高表达,二者均可反映氧化应激反应强度。在本研究中,脑出血第 16~19 天时 HO-1 表达阳性细胞数目与出血 2 h 时无明显差异,表明在脑出血 16~19 d 这一时间范围内,HO-1 表达水平虽已降至出血 2 h 时的状态,但仍明显高于健侧正常脑组织。这可能与脑出血后较长一段时间内,血肿周围组织中仍有大量铁离子、胆绿素等有害物质聚集,从而加重脑水肿程度有关。此外,星形胶质细胞对 HO-1 的表达能力亦可加剧神经元内氧化应激反应,使线粒体微孔开放、胞质内铁离子进入线粒体基质,进一步加重脑组织损伤<sup>[11-13]</sup>。

星形胶质细胞为中枢神经系统的主要支持成分,在神经元生长、发育、再生和分化过程中发挥重要作用。中枢神经系统损伤后,星形胶质细胞可发生反应性增生,而 GFAP 则是星形胶质细胞的主要细胞骨架蛋白,为其特异性标志。有研究显示,在脑损伤后第 7~15 天星形胶质细胞 GFAP 表达水平达峰值;尤其是脑挫裂伤时,星形胶质细胞可于伤后 1 h 即出现反应性肿胀和增生,并持续 10 余小时。本研究结果亦提示,脑出血后星形胶质细胞胞质 GFAP 表达呈“抛物线”样变化,出血 2 h 时其周围脑组织星形胶质细胞呈轻度反应性增生,随着出血时间的延长阳性细胞数目逐渐增多,免疫组织化学染色阳性细胞染色逐渐加深;至出血第 7~15 天时星形胶质细胞反应性增生达峰值水平。已有的研究证实,脑出血后星形胶质细胞异常活跃,并于出血灶周围组织发生肥大和增生性变化以促进神经

元生长和存活<sup>[13]</sup>;而且出血灶周围星形胶质细胞的早期聚集尚可增强神经元对低糖和缺氧的耐受,因此对脑出血周围的缺血神经元有着明显的保护作用<sup>[14]</sup>。由此可见,脑出血早期星形胶质细胞的反应性增生是对神经元损伤的应答反应,与维持神经元存活有关。当疾病进展至晚期时,GFAP 阳性反应逐渐减弱,表明严重损伤刺激和长期缺血缺氧业已超出星形胶质细胞对缺氧的耐受程度,故细胞发生凋亡、坏死。

cyclinD1 为细胞分裂 S 期细胞周期蛋白,即分别出现于 G<sub>1</sub> 期和 S 期,并于此两期中达峰值水平,该蛋白主要负责细胞通过 G<sub>1</sub> 期限制点进入 S 期,促进细胞周期进程<sup>[15]</sup>。本研究观察表明,星形胶质细胞 cyclinD1 表达水平呈现与 GFAP 相同的规律,即“抛物线”样变化,而且二者消长规律一致:自脑出血后 2 h 开始出现反应性增生,表达水平逐渐增强,至第 7~15 天时达峰值水平。提示:cyclinD1 同样能够促进星形胶质细胞活化并使其进入细胞增殖周期,呈现反应性增生以发挥对神经元的保护作用;亦说明 cyclinD1 对细胞外生长信号十分敏感,脑出血可诱导其在星形胶质细胞中的表达。

本研究结果显示,星形胶质细胞在脑出血的演变过程中异常活跃,同时 HO-1 表达呈现动态变化并使细胞周期发生病理性改变,HO-1 与 cyclinD1 共同参与了脑出血后的星形胶质细胞增生与活化,以及出血后的继发性损伤和修复。由于标本获取困难,对更长时期的脑出血后血肿周围星形胶质细胞动态变化的观察尚有待于更多脑组织标本的积累,期望能够通过脑出血后血肿周围组织的研究,获得治疗脑出血、降低患者病残率的新思路。

## 参 考 文 献

- [1] Lee IS, Lim J, Gal J, et al. Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells. *Neurochem Int*, 2011, 58:153-160.
- [2] Kanno H, Ozawa H, Dohi Y, et al. Genetic ablation of transcription repressor Bach1 reduces neural tissue damage and improves locomotor function after spinal cord injury in mice. *J Neurotrauma*, 2009, 26:31-39.
- [3] Jozkowiec A, Was H, Dulak J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9:2099-2117.
- [4] Wu J, Hua Y, Keep RF, et al. Oxidative brain injury from extravasated erythrocytes after intracerebral hemorrhage. *Brain Res*, 2002, 953(1/2):45-52.
- [5] Vaya J, Song W, Khatib S, et al. Effects of heme oxygenase-1 expression on sterol homeostasis in rat astroglia. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42:864-871.

- [6] Xue M, Del Bigio MR. Intracortical hemorrhage injury in rats: relationship between blood fractions and brain cell death. *Stroke*, 2000, 31:1721-1727.
- [7] Chang EF, Wong RJ, Vreman HJ, et al. Heme oxygenase - 2 protects against lipid peroxidation - mediated cell loss and impaired motor recovery after traumatic brain injury. *J Neurosci*, 2003, 23:3689-3696.
- [8] Huang FP, Xi G, Keep RF, et al. Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products. *J Neurosurg*, 2002, 96:287-293.
- [9] Koeppen AH, Dickson AC, Smith J. Heme oxygenase in experimental intracerebral hemorrhage: the benefit of tin - mesoporphyrin. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63:587-597.
- [10] Pyne - Geithman GJ, Morgan CJ, Wagner K, et al. Bilirubin production and oxidation in CSF of patients with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25:1070-1077.
- [11] Sutherland GR, Auer RN. Primary intracerebral hemorrhage. *J Clin Neurosci*, 2006, 13:511-517.
- [12] Soares MP, Bach FH. Heme oxygenase - 1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med*, 2009, 15:50-58.
- [13] Sugawara T, Lewén A, Noshita N, et al. Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats. *J Neurotrauma*, 2002, 19:85-98.
- [14] Miyazaki H, Nagashima K, Okuma Y, et al. Expression of glial cell line - derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res*, 2001, 922:165-172.
- [15] Pu P, Kang C, Li J, et al. The effects of antisense AKT2 RNA on the inhibition of malignant glioma cell growth in vitro and in vivo. *J Neurooncol*, 2006, 76:1-11.

(收稿日期:2011-03-08)

## · 小词典 ·

### 中英文对照名词词汇(十一)

- 髓过氧化物酶 myeloperoxidase(MPO)
- 髓鞘碱性蛋白 myelin basic protein(MBP)
- 胎盘型谷胱甘肽 S 转移酶  
glutathione S transferase of placental type(GST-P)
- P-糖蛋白 P-glycoprotein(P-gp)
- 糖化血红蛋白 glycosylated hemoglobin (HbA1c)
- 糖基化终末产物 advanced glycation end products(AGEs)
- 糖基化终产物受体  
receptor for advanced glycation end products(RAGE)
- 体质量指数 body mass index(BMI)
- 外侧基底核原基 lateral ganglionic eminence(LGE)
- 外科减压术治疗恶性大脑中动脉梗死试验  
Decompressive Surgery for the Treatment of Malignant Infarction of the Middle Cerebral Artery(DESTINY)
- 完全前循环梗死 total anterior circulation infarct(TACI)
- 微创术与重组组织型纤溶酶原激活物联合清除  
颅内出血研究  
Minimally-Invasive Surgery plus rt-PA for Intracerebral Hemorrhage Evacuation(MISTIE)
- 微栓子信号 microembolic signals(MES)
- 微血管密度 microvascular density(MVD)
- 未破裂动脉瘤血管内治疗分析研究  
Analysis of Treatment by Endovascular Approach of Nonruptured Aneurysms(ATENA)
- 无症状性出血性转化  
hemorrhage in pallid transformation of infarction(HI)
- 无症状性颈动脉栓子研究  
Asymptomatic Carotid Emboli Study(ACES)
- 无症状性颈动脉外科手术试验-2  
Asymptomatic Carotid Surgery Trial-2(ACST-2)
- 无症状性颈动脉粥样硬化研究  
Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study(ACAS)
- 系统评价 systematic review(SR)
- Cochrane 系统评价 Cochrane systematic review(CSR)
- 细胞间黏附分子-1  
intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)
- 细胞外基质 extracellular matrix(EM)
- 细胞外信号调节激酶  
extracellular signal-regulated kinase(ERK)
- 纤溶酶原激活物抑制物-1  
plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)
- 纤维母细胞生长因子 fibroblast growth factor(FGF)
- 纤维母细胞生长因子受体  
fibroblast growth factor receptor(FGFR)
- 相对各向异性 relative anisotropy(RA)
- 相对脑血流量 relative cerebral blood flow(rCBF)
- 相对脑血容量 relative cerebral blood volume(rCBV)
- 心血管健康认知研究  
Cardiovascular Health Cognition Study(CHCS)
- 心血管健康研究 Cardiovascular Health Study(CHS)
- 辛伐他汀治疗局部缺血性卒中炎性标志物研究  
Markers of Inflammation after Simvastatin Ischemic Cortical Stroke(MISTICS)
- 信号转导和转录激活因子  
signal transducer and activator of transcription(STAT)
- 兴趣区 region of interest(ROI)
- 5-溴-2-脱氧尿嘧啶 5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)
- 血管内皮生长因子  
vascular endothelial growth factor(VEGF)
- 血管内皮生长因子受体  
vascular endothelial growth factor receptor(VEGFR)
- 血管内支架成形术  
percutaneous angioplasty and stenting(PTAS)