

· 临床论著 ·

脑出血各证型患者细胞自噬及 Cathepsin D 表达差异研究

廖远生¹ 杨瑞玲 吴成翰¹ 王开宇²

摘要 **目的** 观察脑出血(ICH)闭脱证患者血肿周围组织细胞自噬和自噬相关蛋白 Cathepsin D 的表达差异。**方法** 将 27 例 ICH 患者根据中医辨证分为阳闭证(12 例)、阴闭证(9 例)、脱证(6 例)3 组,评估出血量及格拉斯哥昏迷量表(GCS)评分、美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分;另选 6 例颅内深部动静脉畸形(AVM)需开颅手术,但未发生脑出血的患者,作为对照组;采用透射电镜(TEM)技术和免疫组化化学法(IHC)检测细胞内自噬泡及 Cathepsin D 蛋白表达情况。**结果** ICH 患者血肿周围脑组织中自噬泡数量及 Cathepsin D 表达明显高于对照组($P < 0.01$)。各证型按自噬泡数量、Cathepsin D 表达水平、出血量、NIHSS 评分排列由高至低均为:脱证、阴闭证、阳闭证($P < 0.01$, $P < 0.05$);按 GCS 评分排列由高至低为阳闭证、阴闭证、脱证($P < 0.01$)。自噬泡数量、Cathepsin D 表达与出血量、NIHSS 评分呈正相关($P < 0.01$);与 GCS 评分呈负相关($P < 0.01$)。**结论** 细胞自噬参与了 ICH 后继发性神经细胞损伤,闭脱证患者血肿周围组织细胞自噬和自噬相关蛋白 Cathepsin D 的表达存在差异。

关键词 脑出血;继发性脑损伤;细胞自噬;组织蛋白酶 D;闭证;脱证

Various Syndrome Autophagy of Intracerebral Hemorrhage and Expression Variation of Cathepsin D
LIAO Yuan-sheng¹, YANG Rui-ling¹, WU Cheng-han¹, and WANG Kai-yu² 1 Department of Neurology, Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350003); 2 Department of Neurosurgery, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou (350001)

ABSTRACT **Objective** To observe the differences of neural autophagy and the expression of Cathepsin D in patients with excess syndrome of stroke and depletion syndrome of stroke in the peri-hematoma brain tissue of intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** Twenty-seven patients were assigned to three groups according to syndrome typing, i.e., as Yang excess group (12 cases), Yin excess group (9 cases), and depletion syndrome group (6 cases). The hemorrhage volume was assessed. National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) and Glasgow Coma Scale (GCS) scores were recorded. Another six encephalic arteriovenous malformation (AVM) patients that require craniotomy, without occurrence of ICH, were enrolled as the control group. Autophagy in the peri-hematoma brain tissue was observed by using transmission electron microscopy (TEM). The expressions of Cathepsin D was detected by immunohistochemistry (IHC). **Results** The number of autophagic vacuoles and the expression of Cathepsin D were significantly increased in the peri-hematoma brain tissue of ICH patients compared with that in the control group ($P < 0.01$). In accordance with autophagic amount, Cathepsin D expression level, bleeding amount, and NIHSS, syndromes types were sequenced from high to low as depletion syndrome, Yin excess syndrome and Yang excess syndrome ($P < 0.01$, $P < 0.05$); in accordance with GCS, syndromes types were sequenced as Yang excess syndrome, Yin excess syndrome and depletion syndrome ($P < 0.01$). Autophagic amount and Cathepsin D expression were positively correlated to bleeding volume and NIHSS ($P < 0.01$), and negatively correlated to GCS ($P < 0.01$). **Conclusions** Autophagy participates in secondary neuron injury after ICH. Autophagy and the expression of Cathepsin D were different in the pe-

基金名称:国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81403255);福建省卫生厅青年基金资助项目(No. 2014-2-33)

作者单位:1. 福建中医药大学附属第二人民医院神经内科(福州 350003);2. 福建省立医院神经外科(福州 350001)

通讯作者:吴成翰, Tel: 13905015219, E-mail: prwch@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20171001.318

ri-hematoma brain tissue of patients with excess syndrome of stroke and depletion syndrome of stroke.

KEYWORDS intracerebral hemorrhage; secondary brain injury; autophagy; cathepsin D; excess syndrome; depletion syndrome

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 后继发病理性损害是患者死亡的主要原因。研究证实细胞自噬参与了 ICH 的继发性损伤。He Y 等^[1,2]证实实验大鼠 ICH 后自噬可被显著激活。Gong Y 等^[3]研究发现老龄大鼠脑出血后诱导自噬发生,且导致更严重的神经功能缺损。由于开颅血肿清除术目前仍是重症 ICH 的治疗手段之一,手术过程中会有组织碎片脱落,这些脱落的组织碎片可以作为病理标本,使得本研究得以实施。本研究先后收集了 27 例脑出血患者,观察了中风闭证、脱证患者血肿周围神经元细胞的自噬泡及自噬相关蛋白 Cathepsin D 表达差异,报道如下。

资料与方法

1 诊断标准及中医辨证分型标准 ICH 诊断参照《各类脑血管疾病诊断要点》^[4]。中医诊断为中风,辨证为阴闭证、阳闭证、脱证^[5,6]。

2 纳入及排除标准 纳入标准:符合诊断标准;出血部位在基底节区;出血量 >30 mL;且颅内血肿占位明显需使用脑血肿清除术进行治疗;发病到接受手术治疗时间 ≤24 h;患者和(或)其亲属均在入组前或术前签署知情同意书。排除标准:与华法林相关性 ICH 及其他脑血管疾病和小脑、脑干出血患者;合并有肝、肾、造血系统和内分泌等严重原发性疾病、精神病、感染、肿瘤及结缔组织性疾病者;进展性脑出血者。

3 一般资料 27 例均为 2011 年 1 月—2013 年 2 月福建省立医院神经外科住院手术的 ICH 患者 (ICH 组),其中男 14 例,女 13 例,年龄 28~88 岁,平均 (55 ± 17) 岁。其中阳闭证患者 12 例 (男 7 例,女 5 例),年龄 (58 ± 18) 岁;阴闭证患者 9 例 (男 3 例,女 6 例),年龄 (64 ± 13) 岁;脱证患者 6 例 (男 4 例,女 2 例),年龄范围 (52 ± 13) 岁;另选 6 例颅内深部动静脉畸形 (arteriovenous malformation, AVM) 需开颅手术,但没有发生脑出血的患者,作为对照组,其中男女各 3 例,年龄 39~65 岁,平均 (51 ± 10) 岁。本研究通过福建中医药大学附属第二人民医院伦理委员会审查和批准 (批件号:2004-02-06)。

4 观察指标及方法

4.1 颅内出血量 按照多田公式 [$\pi \times \text{血肿}(\text{长} \times \text{宽} \times \text{层数})/6$]^[7] 计算患者颅内出血量。

4.2 格拉斯哥昏迷量表评分 入院后参照参考文

献[8]行格拉斯哥昏迷量表 (Glasgow Coma Scale, GCS) 评分。

4.3 美国国立卫生研究院卒中量表评分 入院后参照参考文献[9]行美国国立卫生研究院卒中量表 (National Institute of Health Stroke Scale, NIHSS) 评分。

4.4 脑组织标本的采集 收集患者在脑血肿清除手术过程中,由吸引器引流出的废弃脑组织碎片作为病理标本^[10]。标本收集由本课题组自制脑组织碎片回收装置完成,该装置由吸引器、过滤网、自动冲洗系统和制冷系统组成 (该系统已获中华人民共和国实用新型专利,专利号:ZL201120081987.6;同时已申请 PCT,申请号:PCT/CN 2011/079833),此系统能够在 0℃ 的环境下将组织碎片与血液、组织液及生理盐水自动过滤分开,从切开脑膜进入脑组织到血肿清除的整个手术过程中均有出血必需使用吸引器,在吸引器吸血时必然吸入少量的脑组织,此时回收装置能够将这些脑组织碎片分离出来并随时取出。

4.5 电镜标本的制作和观察 取材,3%戊二醛-1.5%多聚甲醛前固定,1%锇酸-1.5%亚铁氰化钾后固定,酒精-丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋剂包埋;超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色。使用 Philips EM208 型透射电镜高倍镜下观察、摄片,然后进行对比分析,在 TEM 下有时难以区分自噬体和自噬溶酶体,这些结构统称为自噬泡 (autophagic vacuole, AV)^[11],因此采用 AV 作为观察指标。采用免疫组织化学染色检测 Cathepsin D 表达水平,一抗为兔抗人单克隆抗体 Cathepsin D (购自英国 Abcam 公司),免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。运用 TEM 高倍镜及免疫组化法对 ICH 组及对照组的组织切片进行观察,对比每个视野内的 AV 数量及 Cathepsin D 表达情况。

5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,计量资料若符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不符合正态分布以 P50 (P25, P75) 表示。组间比较符合正态分布的采用单因素方差分析,不符合正态分布的用秩和检验;计数资料用 χ^2 检验;相关分析采用直线相关分析;P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 ICH 患者各证型术前颅内出血量及 GCS 评

分、INIHS 评分比较(表 1) 各证型按出血量和 NIHSS 评分高低顺序排列为脱证、阴闭、阳闭,按 GCS 评分高低排列为阳闭、阴闭、脱证($P<0.01$)。

表 1 ICH 患者各证型颅内出血量及 GCS 评分、NIHSS 评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

证型	例数	出血量(mL)	GCS 评分(分)	NIHSS 评分(分)
阳闭	12	38±4	9.4±1.9	21.5±1.2
阴闭	9	54±5*	6.6±1.1*	25.2±0.8*
脱证	6	72±7*△	4.0±1.3*△	28.5±1.1*△

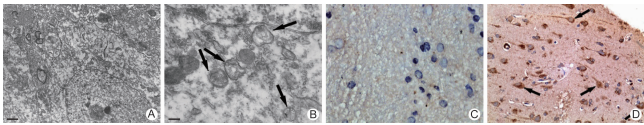
注:与阳闭证比较,* $P<0.01$;与阴闭证比较,△ $P<0.01$

2 两组 AV 数量及 Cathepsin D 表达情况比较(表 2,图 1) ICH 组 AV 数量及 Cathepsin D 表达明显多于对照组($P<0.01$)。

表 2 两组 AV 数量及 Cathepsin D 表达比较 [P50(P25,P75)]

组别	例数	AV(个)	Cathepsin D(%)
对照	6	3.0(2.0,4.0)	4.0(2.0,4.0)
ICH	27	13.0(9.0,20.0)*	10.0(9.0,11.0)*

注:与对照组比较,* $P<0.01$



注:A、B 为 TEM 高倍镜结果(scale bar = 300 nm);箭头所指为 AV;C、D 为免疫组化法(×200),细胞浆染色呈棕黄色为 Cathepsin D 阳性细胞(箭头所指)

图 1 两组 AV 数量及 Cathepsin D 表达

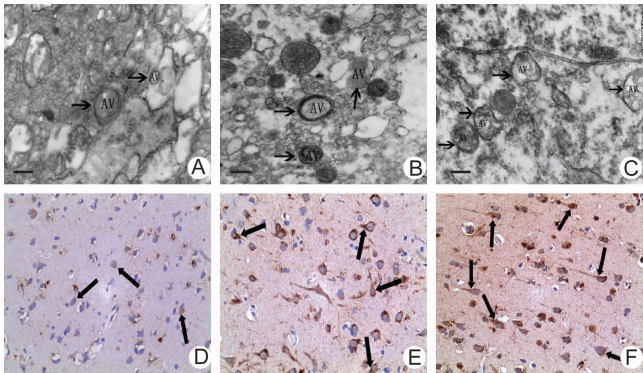
3 ICH 患者各证型 AV 数量及 Cathepsin D 表达比较(表 3,图 2) ICH 患者中医各证型之间血肿周围脑组织神经细胞内 AV 数量及 Cathepsin D 表达有差异($P<0.01$),按 AV 数量多少及 Cathepsin D 表达高低顺序排列为:脱证、阴闭、阳闭。

表 3 ICH 患者各证型 AV 及 Cathepsin D 比较 ($\bar{x}\pm s$)

证型	例数	AV(个)	Cathepsin D(%)
阳闭	12	10.0±1.6	7.8±2.5
阴闭	9	17.7±4.6*	11.9±2.7*
脱证	6	22.7±2.2*△	14.2±3.9*△

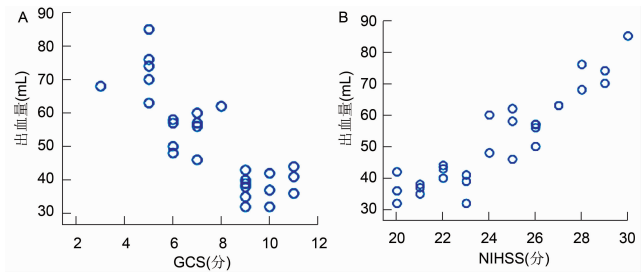
注:与阳闭证比较,* $P<0.01$;与阴闭证比较,△ $P<0.05$

4 ICH 组术前颅内出血量与 GCS 及 NIHSS 评分的关系(图 3) 出血量与 GCS 评分呈负相关($r=-0.831$, $P<0.01$),与 NIHSS 评分呈正相关($r=0.920$, $P<0.01$)。



注:A、D 为阳闭证;B、E 为阴闭证;C、F 为脱证;A - C 为 TEM 高倍镜结果(scale bar = 300 nm),箭头所指为 AV;D - F 为免疫组化法(×200),细胞浆染色呈棕黄色为 Cathepsin D 阳性细胞(箭头所指)

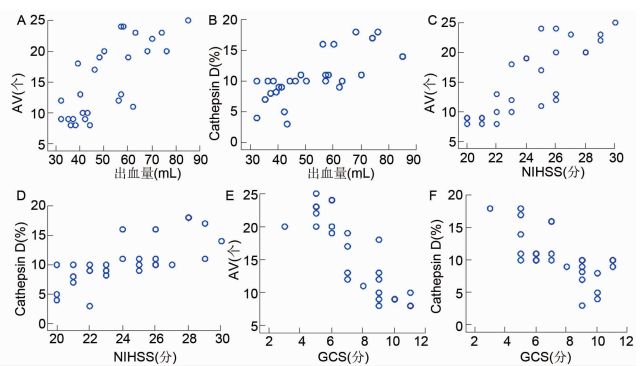
图 2 ICH 患者各证型 AV 数量及 Cathepsin D 表达



注:A 为术前颅内出血量与 GCS 评分的关系;B 为术前颅内出血量与 NIHSS 评分的关系

图 3 ICH 组术前颅内出血量与 GCS 及 NIHSS 评分的关系

5 ICH 后 AV 及 Cathepsin D 表达与出血量、GCS 及 NIHSS 评分间的关系(图 4) ICH 患者 AV 和 Cathepsin D 表达与出血量、NIHSS 评分呈直线正相关($r_{4-A}=0.758$, $r_{4-B}=0.718$, $r_{4-C}=0.827$, $r_{4-D}=0.714$, $P<0.01$);与 GCS 评分呈直线负相关($r_{4-E}=-0.866$, $r_{4-F}=-0.677$, $P<0.01$)。



注:A、B 分别为 AV 数量、Cathepsin D 表达与出血量的关系;C、D 分别为 AV 数量、Cathepsin D 表达与 NIHSS 评分的关系;E、F 分别为 AV 数量、Cathepsin D 表达与 GCS 评分的关系

图 4 ICH 后 AV 及 Cathepsin D 表达与出血量、GCS 及 NIHSS 评分间的关系

讨 论

Cathepsin D 是存在于溶酶体中的天冬氨酸蛋白酶,在溶酶体中主要表现内肽酶活性。Cathepsin D 是介导自噬过程的重要蛋白,有研究表明其能介导自噬的过程,若能抑制 Cathepsin D,就能阻止 AV 的形成^[12]。Cathepsin D 是溶酶体的标记物,它的表达和激活可反映自噬活性,在执行自噬性细胞死亡过程中扮演着重要的角色^[13]。

适度的自噬能清除细胞内过多或异常的蛋白质、细胞器,甚至病原微生物,这不仅有利于维持细胞稳态,也促进氨基酸等的再循环,为多种生化进程提供底物或原料^[14]。正常生理条件下,细胞自噬的水平很低,作用主要是维持细胞正常的新陈代谢,在本研究中对对照组也较少观察到 AV 和 Cathepsin D 的表达,符合这种生理现象。但当受到一定的病理刺激时,细胞自噬水平就会显著增高;通过自噬能够及时清除异常的细胞质和(或)细胞器等物质,这对于维持细胞的正常功能发挥了重要作用。但过度自噬可引起细胞死亡,发生自噬性细胞死亡^[15]。

本研究通过 TEM 和 IHC 观察发现:人脑神经细胞很少发生自噬现象,而 ICH 血肿周围脑组织神经细胞内的 AV 和 Cathepsin D 表达明显增多($P < 0.05$)。ICH 患者血肿周围脑组织神经细胞内 AV 及自噬相关蛋白 Cathepsin D 表达高于对照组,提示 ICH 能够激活自噬溶酶体途径,表现为神经细胞内自噬体的形成和溶酶体的激活,AV 及 Cathepsin D 表达的增多,而且随着出血量的增加,神经细胞内 AV 及 Cathepsin D 表达就越多,病情也就越重。在相关性分析中发现神经细胞内 AV 及 Cathepsin D 表达与出血量、NIHSS 评分呈正相关,与 GCS 评分呈负相关,AV 及 Cathepsin D 表达的多少与病情轻重呈正相关;由于出血量、NIHSS 评分及 GCS 评分可以从一定程度上反映 ICH 后脑损伤的情况,所以上述结果间接提示了细胞自噬参与了 ICH 后的继发性神经细胞损伤,根据目前对自噬的相关研究结果^[16]推测,这种 AV 及自噬相关蛋白表达的增多可能与诱导凋亡的启动有关,使细胞趋向坏死从而加重损伤,适时地使用自噬激活剂或抑制剂来启动或关闭自噬并使其维持在适度的水平,对病情的改善可能会起到一定的作用。由于人脑取材的困难,适合选择的病例数较少,故本研究无法准确、清晰地观察到人类 ICH 后自噬表达变化的全部过程,这有赖于以后的动物实验进一步研究。

本研究表明在中医阳闭、阴闭、脱证中 AV 及 Cathepsin D 表达依次升高,AV 及 Cathepsin D 表达对中

医微观辨证有一定的帮助,脱证的出血量及 NIHSS 评分明显高于闭证,而 GCS 评分低于闭证,提示脱证的脑实质损伤较闭证严重,闭证及脱证可反映病情的轻重。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] He Y, Wan S, Hua Y, et al. Autophagy after experimental intracerebral hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(5): 897-905.
- [2] He Y, Hua Y, Song S, et al. Induction of autophagy in rat hippocampus and cultured neurons by iron[J]. Acta Neurochir Suppl, 2008, 105(1): 29-32.
- [3] Gong Y, He Y, Gu Y, et al. Effect of aging on autophagy after experiment intracerebral hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 111: 113-117.
- [4] 中华神经科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379-380.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 32-33.
- [6] 王永炎主编. 中医内科学[M]. 第6版. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 124-131.
- [7] 张逵, 陈联盟. CT 定量、多田公式、体视学法测定颅内血肿体积的对比研究[J]. 中华外科杂志, 1998, 36(9): 573.
- [8] 王忠诚主编. 王忠诚神经外科学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2005: 380-381.
- [9] 王新, 王拥军, 刘峥, 等. 四个脑卒中量表信度与效度的对比研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21(3): 140-143.
- [10] Wang KY, Wu CH, Zhou LY, et al. Ultrastructural changes of brain tissues surrounding hematomas after intracerebral hemorrhage[J]. Eur Neurol, 2015, 74(1-2): 28-35.
- [11] Mizushima N. Autophagy: process and function[J]. Gene Dev, 2007, 21(22): 2861-2873.
- [12] Araki T, Hayashi M, Saruta T. Anion-exchange blocker enhances cytoplasmic vacuole formation and cell death in serum-deprived mouse kidney epithelial cells in mice[J]. Cell Biol Int, 2006, 30(1): 93-100.
- [13] 廖远生, 吴成翰, 杨瑞玲. 组织蛋白酶 D 与自噬及脑出血的关系[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39(6): 537-540.
- [14] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice[J]. J Cell Biol, 2005, 169(3): 425-434.
- [15] He T, Wang HJ, Tan YZ. The roles of autophagy in cell survival and cell death[J]. Prog Physiol Sci, 2008, 39(1): 37-40.
- [16] Shen X, Ma L, Dong W, et al. Autophagy regulates intracerebral hemorrhage induced neural damage via apoptosis and NF- κ B pathway[J]. Neurochem Int, 2016, 96(1): 100-112.

(收稿: 2016-02-18 在线: 2017-11-16)

责任编辑: 赵芳芳