

• 基础研究 •

蛛网膜下腔出血致多器官功能障碍综合征大鼠
延髓内脏带 FOS 蛋白的表达

贺 燕 王 蕾 郭洪志

【摘要】 目的 观察蛛网膜下腔出血(SAH)致多器官功能障碍综合征(MODS)大鼠延髓内脏带(MVZ)FOS蛋白的表达规律,探讨 MVZ 在 SAH 致 MODS 中的可能调控机制。方法 采用 Willis 环注血法建立大鼠 SAH 致 MODS 模型,免疫组织化学法检测 MVZ 内 FOS 蛋白的表达。结果 (1)大鼠 SAH 后 24~36h MVZ 内 FOS 蛋白表达达到高峰,且显著高于正常对照组和假手术组;(2)大鼠 SAH 后各时相点各脏器有不同程度的炎性损害,以 24~36h 为著;(3)SAH 后全身炎症反应综合征和 MODS 发生率为 100%和 69.4%。结论 SAH 后各时相点各脏器的炎性改变与 MVZ 内 FOS 蛋白的表达规律相一致,提示 MVZ 参与了 SAH 后周围脏器功能的调控,是 SAH 致 MODS 的直接调控中枢之一。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;多器官功能衰竭;模型;动物;大鼠

FOS protein expression in the medullary visceral zone in rat
model of multiple organ dysfunction syndrome induced
by subarachnoid hemorrhage

HE Yan*, WANG Lei, GUO Hongzhi

* Department of Neurology, Secondary Affiliated Hospital, Shandong Traditional Chinese Medical University, Jinan 250001, China

【Abstract】 Objective To investigate FOS protein expression in the medullary visceral zone (MVZ) of the rat model of subarachnoid hemorrhage (SAH) induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS), and to discuss the possible regulating mechanisms of MVZ in the development of MODS caused by SAH. Methods Rat model of SAH-induced MODS was prepared by injecting arterial blood into the Willis' circle. The expression of FOS protein in MVZ was analyzed immunohistochemically. Results The FOS protein expression in MVZ peaked at 24-36h after SAH, and was obviously higher than that in normal control group and sham-operation group. Most organs suffered inflammatory injuries at various degrees on each time point after SAH, which peaked at 24-36h. Incidence of systemic inflammatory response syndrome and MODS after SAH was 100% and 69.4% respectively. Conclusion FOS protein expression pattern parallels the histological changes of each organ following SAH. It indicates that MVZ may be one of the direct center regulating the development of SAH-induced MODS.

【Key words】 subarachnoid hemorrhage; multiple organ failure; animal model; rats

目前国内外对急性脑血管病(acute cerebrovascular diseases, ACVD)导致的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的机制尚不清楚。以往研究的焦点多集中于下丘脑,尤其针对 ACVD 致 MODS

时下丘脑-垂体-靶腺轴神经内分泌功能的变化进行了系列研究^[1~3]。而新近的研究发现,在延髓的中尾段存在一个名为“延髓内脏带(medullary visceral zone, MVZ)”的机能结构区,参与了各种应激状态下内脏活动的调节^[4,5],但其是否也参与了 ACVD 致 MODS 的发生过程,目前尚未见相关报道。笔者

收稿日期:2008-07-24

作者单位:250001 济南市,山东中医药大学第二附属医院神经内科(贺燕、王蕾);250012 济南市,山东大学齐鲁医院神经内科(郭洪志)

通讯作者:郭洪志, E-mail: guohongzhi8051@yahoo.com.cn

依据盛志勇院士提出的实验动物 SIRS、MODS 诊断标准^[6],在前期已成功建立蛛网膜下腔出血(sub-arachnoid hemorrhage,SAH)致 MODS 动物模型的基础上^[7],通过观察模型大鼠 MVZ 内 FOS 蛋白的表达规律,探讨 MVZ 对 SAH 后周围器官功能的中枢调控作用,以期为研究 ACVD 致 MODS 的临床防治提供新的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组 成年健康雄性 Wistar 大鼠(清洁级)48只,体重250~300g,山东大学实验动物中心提供。应用随机数字表将大鼠分为正常对照组、假手术组、SAH后4,12,24,36,48,72h 6个亚组,每组6只。

1.2 模型制作 采用 Willis 环注血法建立 SAH 致 MODS 模型^[7]。观察术后各时相点动物的生命体征,检测血常规、肝肾功、心肌酶,取肺、肝、肾、小肠 HE 染色病理检测,脑组织冰冻切片后免疫组织化学 ABC 法测定 MVZ 中 FOS 蛋白表达,每只大鼠随机选取一套延髓切片,在 20(目镜)×20(物镜)倍率下,计算该套切片中 MVZ 内 FOS 阳性细胞的总和。

1.3 SIRS、MODS 的诊断标准 采用盛志勇院士^[6]的实验动物 SIRS、MODS 诊断标准。

1.4 统计学处理 各项指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 软件包处理,行 *t* 检验、方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物生命体征及血生化变化 假手术组与正常对照组的呼吸、心率、体温及外周血 WBC、ALT、AST、BUN、Cr、CK 差异无显著意义($P > 0.05$);SAH 组的上述各项指标均高于正常对照组和假手术组(表1、2)。

2.2 SAH 组 SIRS、MODS 的发生率 SAH 组 SIRS 的发生率为 100%;25 只符合 MODS,发生率为 69.4%。未到时相点而死亡的 14 只,占 SAH 组的 38.9%。

2.3 动物主要脏器的病理改变 正常对照组和假手术组各器官组织结构基本正常。SAH 组肺脏 4h 即见毛细血管扩张充血、肺泡腔内及血管周围可见渗出;12h 肺泡腔明显扩张,细支气管腔及气管腔内可见纤维蛋白渗出;24h 和 36h 见到轻度慢性淋巴细胞性支气管炎的改变(图1);48h 上述炎性改变减轻。小肠 24h 出现黏膜和黏膜下层水肿、增厚;36h 和 48h 见肌层及黏膜层之间水肿、增厚、充血,轻度炎细胞浸润(图2);72h 偶有黏膜和黏膜下层充

表1 各组动物呼吸、心率、体温、外周血 WBC 的比较($\bar{x} \pm s$)

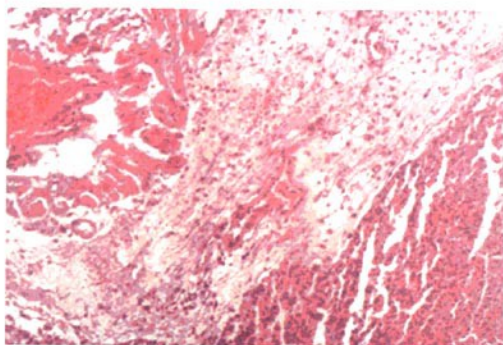
组别	呼吸(次/min)	心率(次/min)	体温(℃)	WBC($\times 10^9/L$)
正常组	61.50±1.37	183.17±51.76	36.52±0.49	6.89±0.36
假手术组	62.83±2.22	192.33±47.21	36.91±0.52	7.11±0.41
SAH 组	126.33±7.81**	329.67±48.83**	39.52±1.56**	22.95±3.16**

注:WBC:白细胞计数。与正常组比较,* $P < 0.001$;与假手术组比较,** $P < 0.001$

表2 各组动物各时相点的肝功、肾功、心肌酶学变化($\bar{x} \pm s$)

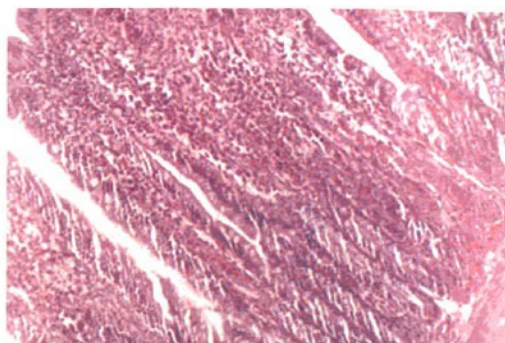
组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	BUN($\mu\text{mol/L}$)	Cr($\mu\text{mol/L}$)	CK(U/L)
正常组	71.67±12.86	164.17±27.30	6.15±0.73	29.70±1.15	744.50±83.54
假手术组	78.83±10.63	166.83±21.99	7.09±0.83	31.15±2.44	768.53±79.16
SAH 组					
4h	88.16±22.15	185.23±35.45	8.72±1.14	34.47±3.65**	1020±139.33△▲
12h	197.67±13.56**	226.50±35.39**	17.94±1.74**	52.20±5.73**	2267.17±261.79**
24h	238.33±35.65**	371.01±32.79**	28.80±3.91**	79.25±6.15**	2983.67±270.03**
36h	221.61±33.49**	301.52±31.28**	23.14±2.89**	65.73±5.94**	2203.35±296.68**
48h	162.84±22.36**	255.34±33.20**	12.17±2.05**	57.07±5.48**	1383.83±214.57**
72h	107.17±12.45△	187.50±35.32△	9.05±1.28△	41.03±4.19△	1071.16±129.67△

注:ALT:丙氨酸转氨酶,AST:天冬氨酸转氨酶,BUN:尿素氮,Cr:肌酐,CK:肌酸激酶。与正常组比较,* $P < 0.01$,△ $P < 0.05$;与假手术组比较,** $P < 0.01$,▲ $P < 0.05$



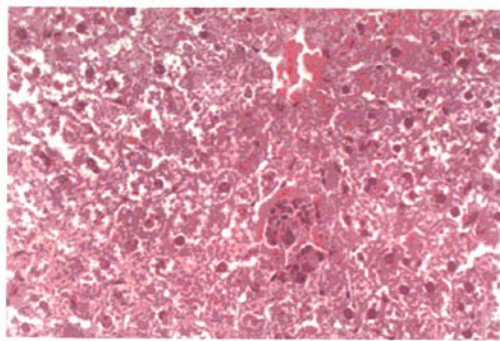
肺泡腔明显扩张, 可见血管扩张充血、渗出, 并呈轻度慢性淋巴细胞性支气管炎的改变

图 1 SAH 组出血后 24h 肺组织病理变化(SP×400)



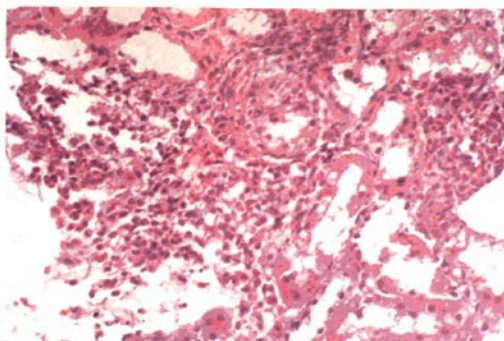
小肠黏膜水肿、增厚明显, 可见轻度炎细胞浸润

图 2 SAH 组出血后 36h 小肠组织病理变化(SP×400)



见肝细胞明显肿胀, 肝窦扩张, 间质内见少量慢性炎细胞浸润、肝细胞嗜酸性变

图 3 SAH 组出血后 24 小时肝组织病理变化(SP×400)



见肾间质充血明显, 肾小球萎缩, 肾小管扩张大小不等, 少数近曲小管上皮细胞水肿, 胞浆变空

图 4 SAH 组出血后 36h 肾组织病理变化(SP×400)

血、水肿。肝脏 8h 出现少数肝细胞水肿, 24h 见肝细胞点状坏死, 肝窦扩张(图 3); 36h 间质内见少量慢性炎细胞浸润、肝细胞嗜酸性变; 48h 减轻。肾脏 12h 开始出现肾间质充血, 少数近曲肾小管上皮细胞水肿; 24h 和 36h 出现了肾小球萎缩, 肾小管扩张大小不等(图 4); 48h 减轻。

2.4 各组模型 MVZ 内 FOS 蛋白表达(表 3) 正常对照组和假手术组 MVZ 内均见少量浅染的 FOS 阳性细胞(图 5), 差异无显著性($P>0.05$)。SAH 组 MVZ 内 FOS 阳性细胞数明显高于正常对照组和假手术组, 多数深染(图 6), 其中在背内侧部(dorsomedial, DM)的孤束核(nucleus of the solitary tract, NTS)、最后区(area postrema, AP)、迷走神经背核(dorsal motor nucleus of vagus nerve, DMV)和延髓腹外侧部(ventrolateral medulla, VLM)的外侧网状核(lateral reticular nucleus, LRN)较密集, 24h 达到高峰, 36~48h 表达逐渐减少, 72h 仍有阳性表达。

表 3 各组动物各时相点延髓内脏带 FOS 蛋白阳性表达变化($\bar{x} \pm s, \times 10^{-3} / \mu m^2$)

项目	n	FOS 阳性细胞数
正常组	6	5.83±1.17
假手术组	6	6.33±1.21
SAH 组	36	101.50±13.06**
4h	6	49.66±4.63**
12h	6	76.50±4.72**
24h	6	115.16±13.79**
36h	6	90.84±12.86**
48h	6	62.10±8.19**
72h	6	39.67±5.24**

注:与正常组比较, * $P<0.01$; 与假手术组比较, * $P<0.01$

3 讨论

3.1 FOS 蛋白表达与 ACVD FOS 蛋白是即刻早

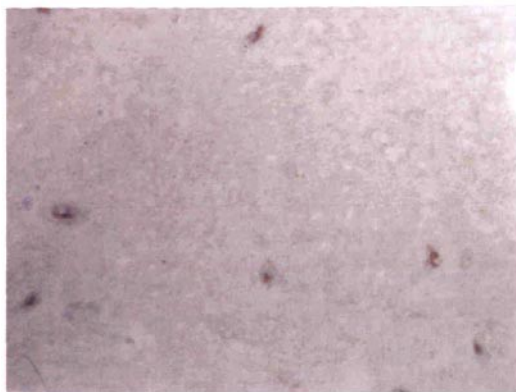


图 5 假手术组延髓内脏带可见少量浅染的 FOS 阳性细胞表达(SP×400)

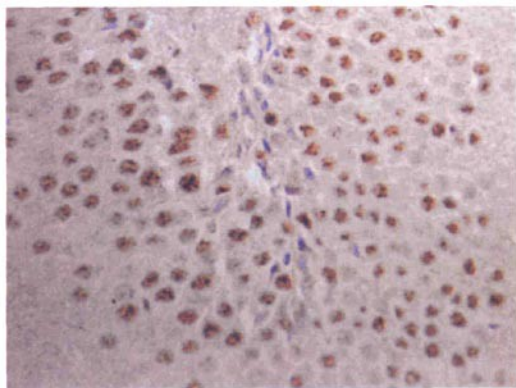


图 6 SAH 组 24h 延髓内脏带内可见多数深染的 FOS 阳性细胞表达(SP×400)

期基因 *c-fos* 的表达产物,作为细胞转录调控因子,参与信号传递系统各效应酶的转录过程。许多研究^[8,9]证实,FOS 蛋白具有“示踪”作用,可以作为神经元活动的定位和功能指标。王蕾等^[10]应用不同剂量(0.4U,0.8U)的胶原酶复制大鼠脑出血致 MODS 模型后发现,脑出血后大鼠 MVZ 内 FOS 阳性表达较对照组增加,而且 0.8U 组 FOS 阳性细胞数明显高于 0.4U 组。由此可见,严重的 ACVD 时可导致中枢神经系统内 FOS 蛋白表达的改变,而且在一定程度上 FOS 被诱导的数量与所受刺激强度一致。

3.2 MVZ 与 ACVD 致 MODS 时脏器损伤 近年来的研究^[11]发现在大鼠延髓中、尾段的横切面上,存在一条从背内侧至腹外侧的带状区,称之为 MVZ。该区与躯体性、内脏性感觉的传递和内脏活动的调节关系密切,是另一重要的应激反应调控中枢,对 ACVD 时各周围脏器的功能产生严重的影响。

3.3 MVZ 与 ACVD 致肺损伤 有研究^[12]显示,电毁损大鼠 MVZ 内的 NTS 可导致神经元性肺水肿,认为 NTS 尾侧部的上行纤维与脑干网状结构儿茶酚胺神经元有广泛的纤维联系,从而通过调节儿茶酚胺的释放引起神经元性肺水肿。本研究发现,SAH 组各时相点呼吸频率明显较对照组加快,在 24,36,48h 时相点更为显著,其肺脏的非特异性炎症损害也从 SAH 后 4h 开始出现,24h~36h 达高峰,48h 后减轻。同时 MVZ 内 FOS 蛋白阳性表达亦出现相同规律,FOS 阳性表达以 NTS 的尾侧部、LRN 最为密集,SAH 组在 4h 即出现以上部位的 FOS 阳性表达,24h 达高峰,36h 亦持续较高水平,48h 开始逐渐消退,提示 SAH 后脑内一系列病理生理改变,影响 MVZ 的 NTS 和 LRN 的功能,使在正常情况下对肺脏的呼吸功能调控失去平衡,进而引起神经源性肺水肿。

3.4 MVZ 与 ACVD 致心脏损伤 国内学者^[13]在静脉注射垂体后叶素诱发的高血压、急性心肌缺血的心血管应激反应模型上发现,FOS 蛋白表达局限于 MVZ 区域内,而周围其他核团均为阴性,MVZ 内 FOS 蛋白表达以 NTS 和 VLM 较为密集,50% 为 FOS/TH 双标阳性神经元,说明 MVZ 内儿茶酚胺神经元参与心血管伤害性刺激的应激反应。鉴于本实验条件所限,本研究未能检测 SAH 后大鼠的血压、心电图改变,但心率及心肌酶学的改变已能反映大鼠心肌缺血情况。本实验 SAH 组在出血后 4h MVZ 内就出现 FOS 密集表达,主要分布于 NTS、LRN、DMV,少数位于 AP。FOS 表达 24h 达高峰,36h 仍有较密集表达,72h 逐渐消退。FOS 蛋白阳性表达同心率、心肌酶改变一致,提示 MVZ 内 FOS 的阳性表达与外周心肌缺血有关,推测 MVZ 参与了 SAH 后心脏功能的调控。

3.5 MVZ 与 ACVD 致肠损伤 陈良为等^[14]发现大鼠胃内导入 1% 甲醛后,延髓 FOS 免疫阳性神经元主要位于中段和尾段的 NTS 腹外侧区和两者之间的网状结构,FOS/TH 双阳性神经元占 TH 单阳性神经元总数的 50% 以上,提示 MVZ 内半数以上的儿茶酚胺神经元参与消化道伤害性刺激的应激反应。本研究中 SAH 组大鼠在 SAH 后 24h 出现小肠的炎性损害,36~48h 达高峰,72h 明显减轻。与 SAH 后 MVZ 内 FOS 表达规律相一致,尤其是 DMV 内 FOS 蛋白的密集表达,提示 SAH 后通过影响 NTS、DMV 的功能,造成了肠道黏膜、黏膜下层的炎性损害。

ACVD 致 MODS 的机制复杂, 本研究发现, SAH 后心肌酶学及周围重要脏器的病理改变与 MVZ 内 FOS 蛋白的大量表达在时间上存在明显的一致性, 它们之间可能存在着必然的联系, 提示 MVZ 参与了 SAH 后各周围脏器功能的调控, 是 SAH 致 MODS 的直接调控中枢之一。

参考文献

- [1] 郭洪志, 迟兆富, 李义召, 等. 急性脑血管病下丘脑-垂体-性腺轴与多器官功能衰竭的关系. 中华神经科杂志, 1996, 29: 63.
- [2] 郭洪志, 王凤丽, 刘爱芬, 等. 合并多器官功能衰竭的急性脑血管病患者神经内分泌的改变研究. 中风与神经疾病杂志, 1997, 14: 305-307.
- [3] 郭洪志, 郭福堂, 朱汉英. 急性脑血管病所致多器官功能衰竭特点. 中风与神经疾病杂志, 1991, 8: 87-88.
- [4] Rao ZR, Ju G. Morphology of the medullary visceral zone. Chin Sci Bull, 1999, 44: 1-10.
- [5] Li T, Gao W, Rao ZR. Noxious somatic stimulation induced expression of FOS-like immunoreactivity in catecholaminergic neurons with habenular nucleus projection in the medullary visceral zone of rat. Brain Res, 1998, 783: 51-56.
- [6] 盛志勇, 胡森. 多器官功能障碍综合征. 北京: 科学出版社, 2000. 185-188.

- [7] 贺燕, 郭洪志. 大鼠蛛网膜下腔出血致多器官功能障碍综合征模型的建立. 中华老年多器官疾病杂志, 2006, 5: 41-43.
- [8] Barden N. Do antidepressants stabilize mood through actions on the HPA system? Trends Neurosci, 1995, 18: 6.
- [9] Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. J Comp Neurol, 1990, 296: 517-530.
- [10] 王蕾, 齐新, 郭洪志. 大鼠脑出血致多器官功能障碍综合征延髓内脏带 FOS 蛋白的表达. 中国神经精神疾病杂志, 2005, 4: 241-244.
- [11] Jia HG, Rao ZR, Shi JW. Projection from the ventrolateral medullary neurons containing tyrosine hydroxylase to the central amygdaloid nucleus in rat brain. Brain Res, 1992, 589: 167-170.
- [12] 吴昊, 惠国桢. 电毁损鼠延髓孤束核致急性肺水肿的试验研究. 江苏医药杂志, 2002, 28: 338-342.
- [13] 高文, 饶志仁. 心血管应激大鼠延髓内脏带神经元 FOS 蛋白表达. 第四军医大学学报, 1998, 19: 377-380.
- [14] 陈良为, 张建华, 饶志仁. 大鼠延髓内脏带内含前-原脑啡肽 mRNA、甲硫氨酸-脑啡肽和亮氨酸-脑啡肽神经元的分布. 解剖学报, 1995, 26: 256-260.

(上接第 543 页)

平 $< 316.5 \text{ ng/L}$, 其远期预后仍然非常乐观。这在临床上对 AMI 患者预后进行个体化区分, 以及确定择期进一步的治疗方案都有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, et al. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). Circulation, 2003, 107: 1231-1233.
- [2] Maurellet JD, Liu PT. B-type natriuretic peptide in the management of heart failure. Hong Kong Med J, 2008, 14: 216-219.
- [3] Tapanainen JM, Lindgren KS, Makikallio TH, et al. Natriuretic peptides as predictors of non-sudden and sudden cardiac death after acute myocardial infarction in the beta-blocking era. J Am Coll Cardiol, 2004, 43: 757-763.

- [4] De Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med, 2001, 345: 1014-1021.
- [5] Omland T, Aakvaag A, Bonarjee VV, et al. Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. Comparison with plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide. Circulation, 1996, 93: 1963-1969.
- [6] Meier MA, Al-Badr WH, Cooper JV, et al. The new definition of myocardial infarction: diagnostic and prognostic implications in patients with acute coronary syndromes. Arch Intern Med, 2002, 162: 1585-1589.
- [7] Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, et al. B-type natriuretic peptides and ejection fraction for prognosis after myocardial infarction. Circulation, 2003, 107: 2786-2792.