

内质网应激与蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的相关性研究

齐文涛 曹德茂 彭爱军 王友伟 武永康

摘要 **目的** 探讨 CAAT 增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP)、海马葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 和 caspase - 12 在蛛网膜下腔出血 (SAH) 后的表达及其在早期脑损伤 (EBI) 中的作用。**方法** 选取健康雄性 SD 大鼠 78 只, 采用随机数字表法将其分为空白对照组 (6 只)、假手术组 (36 只) 与 SAH 组 (36 只)。将假手术组和 SAH 组分别于 1、6、12、24、48、72h, 采用简单随机抽样法选取 6 只大鼠, 神经功能缺陷评分后处死。比较各组不同时间点光镜及电镜下大鼠海马神经元形态改变、CHOP、GRP78、caspase - 12 相对表达水平、海马神经元凋亡细胞水平、脑水肿严重程度及神经功能缺陷评分情况。**结果** 通过 Western blot 法检测 CHOP、GRP78 和 caspase - 12 的表达, SAH 组与空白对照组、假手术组在 12、24、48、72h 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且在 SAH 后 24h 达到峰值。TUNEL 法检测大鼠海马区神经元凋亡显示, SAH 组与对照组、假手术组在 6、12、24、48、72h 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 在电镜下, SAH 后 24h 节点可见明显的神经元凋亡。SAH 组 12、24、48、72h 的神经功能缺陷评分及脑水肿程度明显重于空白对照组及假手术组, 在 24h 达高峰, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。SAH 组大鼠的 CHOP、GRP78 和 caspase - 12 Western blot 法检测结果与脑水肿严重程度及神经元凋亡结果之间呈极显著正相关, 与神经功能缺陷评分呈极显著负相关 ($P < 0.05$)。**结论** SAH 后 72h 内确实造成了 EBI, 同时发生了内质网应激, 内质网应激与 EBI 严重程度之间均呈正相关, 揭示内质网应激在 SAH 后 EBI 的病理过程中发挥了重要作用。

关键词 蛛网膜下腔出血 内质网应激 海马葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) CAAT 增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) Caspase - 12

中图分类号 R4 R6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.036

Study on the Correlation between Endoplasmic Reticulum Stress and Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage. Qi Wentao, Cao Demao, Peng Aijun, et al. Department of Neurosurgery, The Affiliated Hospital of Yangzhou University, Jiangsu 225001, China

Abstract Objective To investigate the role of the CAAT enhancer binding protein homologous protein (CHOP), hippocampus glucose regulated protein 78 (GRP78) and caspase - 12 in the early brain injury (EBI) after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** A total of 78 healthy male SD rats were randomly divided into the blank comparison group (6 rats), sham operation group (36 rats) and SAH group (36 rats). 6 rats in the sham operation group and the SAH group were selected at 1, 6, 12, 24, 48, and 72h respectively. These rats were sacrificed after a neurological deficit score. Compared the morphological changes of hippocampal neurons in rats at different time points under light microscope and electron microscope, CHOP, GRP78, caspase - 12 relative expression level, hippocampal neuron apoptosis, brain edema severity and neurological deficit score. **Results** The expression of CHOP, GRP78 and caspase - 12 was measured by Western blot, the SAH group was compared with the blank comparison group and the sham operation group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$) at 12, 24, 48, and 72h, and reached the peak at 24h after SAH. Detection of hippocampal neuronal apoptosis by TUNEL showed there was significant difference ($P < 0.05$) at 6, 12, 24, 48, 72h between SAH group and comparison group, sham operation group. Under electron microscope, obvious neuronal apoptosis was observed at the 24h node after SAH. The neurological deficit scores and the degree of brain edema in SAH group were significantly higher than those in the blank comparison group and the sham operation group at 12, 24, 48 and 72h, and reached the peak at 24h, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In SAH group, there was a significant positive correlation between the results of CHOP, GRP78 and caspase - 12 and the severity of brain edema and neuronal apoptosis, and there was a significant negative correlation with neurological deficit scores ($P < 0.05$). **Conclusion** EBI and ER stress do exist in 72h after SAH, and there is a positive correlation between ER stress and the severity of EBI. It reveals that ER stress play an important role in the pathological process of EBI after SAH.

作者单位: 225001 扬州大学附属医院神经外科

通讯作者: 武永康, 副教授, 电子信箱: qwt_2000@sina.com

Key words Subarachnoid hemorrhage; Endoplasmic reticulum stress; Hippocampal glucose regulating protein 78 (GRP78); CAAT enhancer binding protein homolog (CHOP); Caspase - 12

自发性蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH), 特别是动脉瘤性的 SAH, 是一种临床常见的急性脑血管疾病, 致残率、病死率高^[1]。近期研究表明, 造成 SAH 患者预后差的主要原因可能为早期脑损伤 (early brain injury, EBI), 其具体机制尚不明确^[2]。有研究者认为细胞凋亡是 EBI 发生、发展过程中的主要病理生理机制, 是决定 SAH 最终预后的关键因素^[3]。内质网应激 (endoplasmic reticulum stress) 途径是近年才发现的一种新的细胞凋亡途径, 在很多神经系统疾病的发生、发展中发挥着重要作用, 如脑缺血、阿尔茨海默病、帕金森病等^[4]。本实验试图通过研究 SAH 后内质网应激水平, 探讨内质网应激与 SAH 后神经功能损害的关系及机制, 为 SAH 后 EBI 的治疗策略提供新的思路。

材料与方法

1. 实验仪器与试剂: 高速颅骨钻 (ZH. GSZ, 山东临沂), 显微镜 (OLYMPUS. BX41, 日本), 10% 水合氯醛 (购于扬州市第一人民医院医院), AQP - 4 多克隆抗体、caspase - 12、CHOP、GRP78 单克隆抗体, 内参 β - actin, TUNEL 试剂盒, DAB 显色试剂盒 (均购自上海誉津生物技术有限公司)。

2. 动物的来源与分组: 成年雄性 SD 大鼠 78 只 (购于扬州大学实验动物中心), 体质量 300 ± 50 g, 月龄 2 ~ 3 个月。采用随机数字表法将大鼠分为空白对照组 6 只、假手术组 36 只与 SAH 组 36 只。

3. 模型的建立及鉴定: 采用视交叉前池注血法建立 SAH 模型。SD 大鼠称重, 通过腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 (0.35g/kg) 麻醉, 消毒铺巾并逐层分离皮下组织至颅骨, 用高速电钻在冠状缝前 5mm、中线旁开 3mm 颅骨处钻孔, 小心挑破硬脑膜, 将 PE - 10 导管向两耳假想连线方向中点刺入约 1cm, 接 1ml 注射器, 回抽即见清亮脑脊液。假手术组注入生理盐水 0.3ml, SAH 组用碘伏消毒大鼠尾部后, 尾部动脉穿刺抽动脉血 0.3ml, 1min 内通过 PE - 10 导管注入大鼠蛛网膜下腔, 注入完毕后骨蜡封闭骨孔, 消毒并缝合切口。SAH 组大鼠开颅后于大脑 Willis 环附近蛛网膜下腔可见明显积血, 而假手术组蛛网膜下腔未见积血, 鉴定为建模成功, 否则为建模失败。

4. 神经功能缺陷评分: 参照 Kaoutzanis 等的行为学评分^[5]: 进食: 自由进食 2 分, 拒绝进食 1 分。运动

反应: 自由行走 5 分, 行走困难 4 分, 不能行走 3 分, 刺痛时肢体收缩 2 分, 刺痛时无反应 1 分。睁眼反应: 自行睁眼 4 分, 声音刺激睁眼 3 分, 刺痛睁眼 2 分, 不能睁眼 1 分。总分 11 分, 最低 3 分。对各组大鼠各时间点进行神经行为学评分。

5. 组织固定及处理: 造模成功后, 将假手术组和 SAH 组分别于 1、6、12、24、48、72h, 采用简单随机抽样法选取 6 只大鼠处死, 断头取脑, 取下两侧海马及额叶底部脑组织, 各取部分用于 Western blot 法检测 caspase - 12、CHOP、GRP78 蛋白的表达, TUNEL 法检测大鼠海马神经元凋亡细胞水平, 电镜观察, 部分放入 4% 甲醛溶液中固定后常规 HE 染色制作切片光镜下观察细胞形态, 剩余脑组织用于干湿重测定评估脑水肿情况。空白对照组大鼠直接处死后, 固定及处理方法同上。

6. TUNEL 法检测大鼠海马神经元凋亡细胞数: 烘片后, 充分脱蜡和水化。20 μ g/ml 的蛋白酶 K 消化组织 15min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 震洗后, 用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水浸泡 45min, 后 PBS 震洗 5min (3 次), 滴加 50 μ l TUNEL 反应混合液, 37 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 1h, PBS 震洗后滴加过氧化物酶 (POD) 转换液, 后 37 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 30min, 后 PBS 震洗 5min (3 次), 滴加 DAB 并在镜下控制显色程度, 清水洗净后 HE 复染, 后梯度乙醇溶液脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。在高倍镜 ($\times 400$) 下随机选取不重复的 10 个视野, 细胞核呈黄色为阳性细胞, 计数视野下阳性细胞数, 以阳性细胞数的均值作为海马神经元凋亡细胞数量。

7. Western blot 法检测 CHOP、GRP78、caspase - 12 蛋白的表达: 称取 30mg 海马区脑组织置入无酶 EP 管中, 加入组织裂解液 150 μ l, 超声粉碎组织后, 冰上静置 30min 充分裂解, 13000r/min 高速离心 15min, 取上清液, 重复离心直至没有沉淀为止。提取总蛋白, 将浓度调至 10 μ g/ml, 加样量总蛋白不超过 200 μ g, 分别加入 CHOP 抗体 (1: 500)、GRP78 抗体 (1: 1000)、caspase - 12 抗体 (1: 500) 及 β - actin 抗体 (1: 1000), 置于室温摇动并洗膜、曝光、显影。蛋白条带用 Quantity one 软件分析, 计算出不同时间点 β - actin、CHOP/ β - actin、GRP78/ β - actin 及 caspase - 12/ β - actin 的比值。

8. 干湿称重法计算脑组织标本水含量来反映脑水肿程度:将取下两侧海马及额叶底部脑组织后剩余的脑组织用电子分析天平分别称取湿重(mg),然后置入110℃恒温箱烘烤24h至恒重,置于干燥缸冷却10min取出称干重,用干湿重法计算脑组织含水量。计算公式为:脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

9. 电镜观察细胞形态:取额叶底部脑组织约1mm³。2.5%戊二醛,磷酸缓冲液配制固定2h。用0.1mol/L磷酸漂洗液漂洗15分3次,1%锇酸固定液固定2~3h,用0.1mol/L磷酸漂洗液漂洗15分3次。在4℃冰箱内依次用50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇、90%乙醇90%丙酮(1:1)、90%丙酮脱水各15~20min,取出后在室温100%丙酮中分3次各处理15~20min。纯丙酮+包埋液(2:1)包埋后固化,超薄切片机切片50~60nm,3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色,透射电镜观察、拍片。

10. 统计学方法:采用SPSS 18.0统计学软件进行统计分析,实验所得数据全部采用二因素方差分析,并利用LSD法进行多重比较。组间相关性用英文字母标记,含有相同字母表示组间差异无统计学意义,不含相同字母表示组间比较差异有统计学意义。对于各个指标两两之间计算Pearson相关系数, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 建立SAH模型结果:SAH组有1只大鼠因麻醉死亡,3只大鼠因注血后72h内死亡,病死率11.11%;假手术组2只大鼠因麻醉死亡,1只大鼠注生理盐水后死亡,病死率为8.33%;空白对照组无死亡,病死率为0;3组病死率比较差异无统计学意义($P>0.05$),及时补做7只进行实验。SAH组大鼠开颅后于大脑Willis环附近蛛网膜下腔可见大量积血,部分在前循环处可见血凝块;假手术组蛛网膜下腔未见血凝块。

2. 神经功能缺陷评分结果:大鼠经水合氯醛溶液腹腔麻醉后1h未完全清醒,无法进行神经功能缺陷评分。3h后大鼠逐渐恢复,故从6h开始评分。假手术组各时间点评分无明显变化,接近满分,SAH组评分6h开始下降,24h达到谷值,然后逐渐上升,第6、12、24、48、72h SAH组与空白对照组、假手术组比较明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$,表1)。

表1 神经功能缺陷评分($\bar{x} \pm s, n=6$)

时间	假手术组	SAH组
空白对照组	11	11
6h	10.17 ± 0.753	8.00 ± 0.894 ^{*#}
12h	10.00 ± 0.632	6.33 ± 1.211 ^{*#}
24h	9.83 ± 0.753	3.83 ± 0.753 ^{*#}
48h	9.67 ± 1.211	5.67 ± 0.817 ^{*#}
72h	10.00 ± 0.894	6.83 ± 0.983 ^{*#}

LSD_{0.05} = 1.035;与空白对照组比较,^{*} $P<0.05$;与假手术组比较,[#] $P<0.05$

3. 脑水肿检测:空白对照组及假手术组脑水肿程度轻微,组间、组内各时间点比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。SAH组6h脑水肿开始加重,24h达到峰值,48、72h脑水肿仍较重。第12、24、48、72h SAH组与对照组、假手术组比较脑水肿明显,差异有统计学意义($P<0.05$,表2)。

表2 脑组织干湿比反映脑水肿程度($\bar{x} \pm s, n=6$)

时间	假手术组	SAH组
空白对照组	0.5729 ± 0.0319	0.5729 ± 0.0319
1h	0.5664 ± 0.0337	0.5943 ± 0.0407
6h	0.5864 ± 0.0348	0.6212 ± 0.0407
12h	0.5678 ± 0.0300	0.6441 ± 0.0380 ^{*#}
24h	0.5717 ± 0.0446	0.7739 ± 0.0230 ^{*#}
48h	0.5567 ± 0.0492	0.7283 ± 0.0491 ^{*#}
72h	0.5814 ± 0.0523	0.6822 ± 0.0399 ^{*#}

LSD_{0.05} = 0.063;与空白对照组比较,^{*} $P<0.05$;与假手术组比较,[#] $P<0.05$

4. TUNEL法检测神经元凋亡结果:400倍显微镜下观察发现,空白对照组、假手术组凋亡细胞较少,组间、组内比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。SAH组1h出现少量凋亡细胞,6h凋亡细胞数增多,12h凋亡细胞明显增多,24h凋亡细胞达到峰值,细胞着色也较深,48h凋亡细胞逐渐下降,72h凋亡细胞数目明显减少,12、24、48、72h SAH组与空白对照组、假手术组比较,差异有统计学意义($P<0.05$,表3)。

5. Western blot法检测CHOP蛋白表达结果:空白对照组、假手术组CHOP蛋白表达微弱,组间、组内不同时间点比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。SAH组CHOP蛋白表达与空白对照组、假手术组比较明显增多,SAH组6hCHOP蛋白表达开始上升,于24h达到峰值,然后逐渐下降,72h仍有较明显表达,第12、24、48、72h SAH组与对照组、假手术组比较,差异有统计学意义($P<0.05$,表4)。

表 3 神经元凋亡计数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

时间	假手术组	SAH 组
空白对照组	3.33 ± 2.25	3.33 ± 2.25
1h	5.33 ± 1.86	9.50 ± 3.62
6h	5.67 ± 2.16	14.00 ± 5.59
12h	6.50 ± 3.08	19.00 ± 6.75 ^{**}
24h	6.17 ± 1.94	33.00 ± 6.36 ^{**}
48h	7.00 ± 2.37	23.50 ± 5.01 ^{**}
72h	7.83 ± 3.31	16.00 ± 5.22 ^{**}

$LSD_{0.05} = 6.318$; 与空白对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与假手术组比较, [#] $P < 0.05$

表 4 Western blot 法检测 CHOP 蛋白

表达相对结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

时间	假手术组	SAH 组
空白对照组	0.0834 ± 0.0075	0.0834 ± 0.0075
1h	0.0867 ± 0.0088	0.0910 ± 0.0052
6h	0.0802 ± 0.0082	0.1169 ± 0.0080
12h	0.0913 ± 0.0062	0.1438 ± 0.0130 ^{**}
24h	0.0871 ± 0.0046	0.3488 ± 0.0356 ^{**}
48h	0.0932 ± 0.0063	0.2552 ± 0.0164 ^{**}
72h	0.1003 ± 0.0074	0.1732 ± 0.0138 ^{**}

$LSD_{0.05} = 0.051$; 与空白对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与假手术组比较, [#] $P < 0.05$

6. Western blot 法检测 GRP78 蛋白表达结果:空白对照组、假手术组 GRP78 蛋白均表达微弱,组间、组内在不同时间点比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。SAH 组 6h 开始表达上升,于 24h 达到峰值,然后逐渐下降,72h 表达仍较明显,第 12、24、48、72h SAH 组与空白对照组、假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 5)。

表 5 Western blot 法检测 GRP78 蛋白

表达相对结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

时间	假手术组	SAH 组
空白对照组	0.2058 ± 0.0178	0.2058 ± 0.0178
1h	0.2061 ± 0.0214	0.2307 ± 0.0383
6h	0.2211 ± 0.0285	0.2485 ± 0.0208
12h	0.2047 ± 0.0195	0.3947 ± 0.0660 ^{**}
24h	0.2233 ± 0.0276	0.6288 ± 0.0408 ^{**}
48h	0.2203 ± 0.0175	0.4705 ± 0.0533 ^{**}
72h	0.2370 ± 0.0116	0.3613 ± 0.0474 ^{**}

$LSD_{0.05} = 0.089$; 与空白对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与假手术组比较, [#] $P < 0.05$

7. Western blot 法检测 caspase - 12 表达结果:空白对照组、假手术组 caspase - 12 表达微弱,组间、组内不同时间点比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

SAH 组 6h caspase - 12 表达开始明显上升,于 24h 达到峰值,然后逐渐下降,72h 仍有少量表达,第 6、12、24、48、72h SAH 组与空白对照组、假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 6)。

表 6 Western blot 检测 caspase - 12 表达

相对结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

时间	假手术组	SAH 组
空白对照组	0.1874 ± 0.0105	0.1874 ± 0.0105
1h	0.1892 ± 0.0132	0.2334 ± 0.0291
6h	0.1998 ± 0.0180	0.3183 ± 0.0368 ^{**}
12h	0.1909 ± 0.0156	0.4028 ± 0.0464 ^{**}
24h	0.2077 ± 0.0211	0.5486 ± 0.0393 ^{**}
48h	0.2005 ± 0.0136	0.4350 ± 0.0445 ^{**}
72h	0.2053 ± 0.0242	0.3732 ± 0.0387 ^{**}

$LSD_{0.05} = 0.063$; 与空白对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与假手术组比较, [#] $P < 0.05$

8. 电镜结果:SAH 组海马神经元凋亡比较严重,术后 6h 即可见细胞皱缩,体积变小,12h 时胞质内空泡较多,细胞核体积变小,核膜下染色质边集、浓聚,呈现凋亡表现,24h 时最为严重(图 1),细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体。空白对照组及假手术组海马神经元及细胞器形态良好。

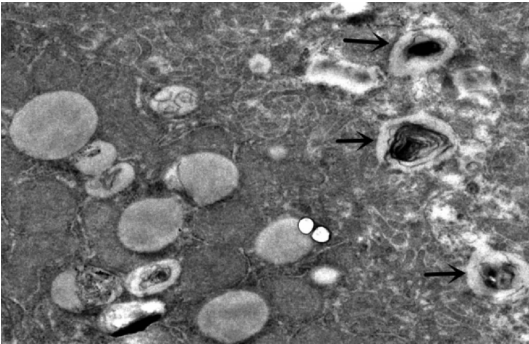


图 1 SAH 后 24h 海马神经元电镜图 (×8000)

可见凋亡表现严重,细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体(黑色箭头所示)

9. 根据 Spearman 相关性分析显示,SAH 组大鼠的 CHOP、GRP78 和 caspase - 12 Western blot 法检测结果与脑水肿严重程度及神经元凋亡结果之间呈极显著正相关,与神经功能缺陷评分呈极显著负相关($P < 0.05$,表 7)。

讨 论

内质网是细胞合成蛋白和存储钙的重要场所。在缺氧,氧化应激,感染以及钙离子稳态失衡等病理

表 7 Spearman 相关性分析

项目	CHOP	GRP78	Caspase - 12	神经功能缺陷评分	干湿比
GRP78	0.9261	-	-	-	-
caspase - 12	0.8938	0.9119	-	-	-
神经功能缺陷评分	-0.8606	-0.8715	-0.8718	-	-
干湿比	0.8451	0.8227	0.8614	-0.7402	-
凋亡计数	0.8681	0.8810	0.8524	-0.8353	0.7886

情况下,内质网未折叠的蛋白质会明显增多,当超出内质网处理能力时,细胞会激活一些相关信号级联反应,来应对条件的变化和恢复内质网良好的蛋白质折叠环境,称为内质网应激。内质网应激介导的凋亡是继经典的死亡受体活化和线粒体损伤两条途径后最新发现的一条细胞凋亡途径^[6]。适度的内质网应激有利于细胞内钙和蛋白质加工等稳态恢复正常,增强细胞耐受应激刺激的能力,持续而严重的内质网应激则触发内质网相关性细胞凋亡(endoplasmic reticulum associated death, ERAD),造成细胞损伤。ERAD途径主要包括 caspase - 12 剪切活化、CHOP/GADD153 表达上调,以及 c - jun 氨基末端激酶(JNK)途径的激活^[7]。

CHOP (C/EBP homologous protein) 也称 GADD153,主要位于细胞核,正常情况下 CHOP 表达量较少,它是内质网应激介导的凋亡通路中重要的信号分子,受转录因子 ATF4 调控,发生内质网应激时,其表达水平升高^[8]。持久、过度的内质网应激激起 CHOP 的大量表达,CHOP 主要通过耗尽细胞谷胱甘肽和增加细胞对氧化应激的敏感度,上调凋亡基因 Bax,下调抗凋亡基因 BCL2 介导细胞的凋亡^[9]。GRP78 表达于细胞质,是内质网应激的标志性蛋白^[10]。GRP78 是内质网中最主要的分子伴侣蛋白,也是内质网启动的蛋白标志物,其表达可反应内质网的启动和稳态调节能力^[11]。caspase 家族是内质网应激过程中最终执行凋亡的水解酶类,目前发现其家族共有 14 个成员,caspase - 12 是 ER stress 导致细胞凋亡途径的一个特异性分子^[12]。正常情况下,caspase - 12 以酶原形式存在,当内质网应激出现时激活 caspase - 12,激活的 caspase - 12 进一步激活下游的 caspase - 9,活化的 caspase - 9 进一步激活 caspase - 3、6、7 等效应 caspase,并最终导致了细胞凋亡^[13]。因此,可以通过检测细胞内 caspase - 12、CHOP、GRP78 等的表达量来反映 ER stress 的状态。

本实验通过检测 CHOP、GRP78 和 caspase - 12 的表达反映内质网应激,通过行为神经功能缺陷评

分、脑水肿和神经元凋亡反映 EBI,运用相关性分析,来进一步探讨内质网应激在 SAH 后 EBI 中的作用。本研究中用 Western blot 法检测 CHOP、GRP78 和 caspase - 12 的表达,SAH 组与空白对照组、假手术组在 12、24、48、72h 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),SAH 组 CHOP、GRP78 和 caspase - 12 表达 6h 开始上升,均于 24h 达到峰值,然后逐渐下降,24h 时间点与其他时间点蛋白表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TUNEL 法检测大鼠海马区神经元凋亡显示,空白对照组及假手术组神经元凋亡少,且各时间点无明显差异,SAH 组 1h 凋亡细胞较少,6h 凋亡细胞逐渐增多,24h 达到峰值,SAH 组与对照组、假手术组在 6、12、24、48、72h 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),在电镜下,SAH 后 24h 节点可见明显的神经元凋亡。SAH 组 12、24、48、72h 的神经功能缺陷评分及脑水肿程度明确重于空白对照组及假手术组,在 24h 达高峰,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。SAH 组大鼠的 CHOP、GRP78 和 caspase - 12 Western blot 法检测结果与脑水肿严重程度及神经元凋亡结果之间呈极显著正相关,与神经功能缺陷评分呈极显著负相关($P < 0.05$)。

本研究表明,在 SAH 后 72h 内 CHOP、GRP78 和 caspase - 12 表达均显著增高,说明 SAH 后确实发生了 ER stress。通过分析空白对照组、假手术组、SAH 组的神经功能缺陷评分、脑水肿程度和神经元凋亡的差异,以及电镜下细胞及细胞器形态,说明在 SAH 早期确实发生了 EBI。并进一步证实了 CHOP、GRP78 和 caspase - 12 表达与 EBI 严重程度之间均存在正相关,初步揭示 CHOP、GRP78 和 caspase - 12 表达在 SAH 后 EBI 的病理过程中发挥了重要作用,这将为今后深入研究 SAH 后 EBI 的发生机制及寻找针对性的治疗策略、潜在治疗靶点提供理论依据。

参考文献

- 1 Saema A, Aida M, Lars E. Inhibition of cerebrovascular raf activation attenuates cerebral blood flow and prevents upregulation of contractile receptors after subarachnoid hemorrhage[J]. BMC Neurosci, 2011, 12(1):107

- 2 Dong Z, Qi L, Ji Y, *et al.* Correlation between nitric oxide and early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *Int J Neurosci*, 2015, 125(7):531-539
- 3 Sugawara T, Jadhav V, Ayer R, *et al.* Thrombin inhibition by argatroban ameliorates early brain injury and improves neurological outcomes after experimental subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Stroke*, 2009, 40(4):1530-1532
- 4 Martinez JA, Zhang Z, Svetlov S I, *et al.* Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(12):1480-1493
- 5 Kaoutzanis M, Yokota M, Sibilia R, *et al.* Neurologic evaluation in a canine model of single and double subarachnoid hemorrhage[J]. *J Neurosci Methods*, 1993, 50(3):301-307
- 6 Chen S, Feng H, Sherchan P, *et al.* Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 115(2):64-91
- 7 李秀琴, 蔡晓红. 内质网应激诱导慢性间歇低氧幼鼠认知相关的脑损害[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(11):69-73
- 8 杨方万, 穆茂媛, 肖娟娟, 等. 内质网应激诱导细胞凋亡机制的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(10):176-180
- 9 Wali JA, Rondas D, McKellzie MD, *et al.* The prototypic BH3-only proteins Bim and Puma are downstream of endoplasmic reticulum and mitochondrial oxidative stress in pancreatic islets in response to glucotoxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(3):e1124
- 10 石印青, 陈亮, 任利, 等. 内质网应激分子伴侣 GRP78 在大鼠缺血再灌注损伤肝脏中的表达[J]. *中国普外科杂志*, 2013, 26(7):905-910
- 11 Li C, Harada A, Oh Y. IGF1BP-3 sensitizes antiestrogen-resistant breast cancer cells through interaction with GRP78[J]. *Cancer Lett*, 2012, 325(2):200-206
- 12 李京, 孙善全, 刘辉, 等. 大鼠脊髓缺血再灌注损伤中 Irf1 α 、caspase-12 的表达与细胞凋亡[J]. *中华创伤杂志*, 2010, 26(4):349-353
- 13 Nakaqawa T, Zhu H, Mofishirna N, *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta[J]. *Nature*, 2000, 403:98-103

(收稿日期:2017-10-23)

(修回日期:2017-11-14)

PET-CT 在妇科恶性肿瘤诊治中的应用

朱雪洁 陈香娟 陈杨宗 张秀云 朱 华

摘 要 **目的** 探讨 PET-CT 在妇科恶性肿瘤的诊断和治疗中的临床应用。**方法** 回顾性分析 2011 年 11 月~2016 年 3 月在温州医科大学附属第一医院行 PET-CT 检查的妇科恶性肿瘤患者 68 例,其中 50 例血肿瘤标志物正常,CT 和(或)MRI 诊断为妇科恶性肿瘤;18 例 CT 和(或)MRI 检查正常但血肿瘤标志物持续升高。**结果** 68 例患者中宫颈癌 21 例,卵巢癌 40 例,子宫内膜癌 6 例,输卵管癌 1 例。50 例 CT 和(或)MRI 怀疑妇科恶性肿瘤的患者中,17 例(34%)患者 PET-CT 为阴性,改变了治疗方法,避免了不必要的干预。18 例 CT 和(或)MRI 阴性但血肿瘤标志物持续升高的患者中,12 例(67%)患者 PET-CT 阳性,比传统的影像学检查更及时、准确的诊断肿瘤的复发,从而指导治疗,改善预后。**结论** PET-CT 作为一种有效且无创的影像学诊断方法,对于临床制定和调整妇科恶性肿瘤治疗方案有着重要的意义。

关键词 PET-CT 妇科恶性肿瘤 诊断 复发

中图分类号 R737.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.037

Clinical Value of PET-CT in Diagnosis and Treatment of Gynecologic Malignant Tumors. Zhu Xuejie, Chen Xiangjuan, Chen Yangzong, *et al.* The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** The aim of this study was to evaluate the role of positron emission tomography-CT (PET-CT) in diagnosis and treatment of gynecologic malignancy. **Methods** This is a retrospective study of 68 patients of gynecologic malignancy registered in The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University from November 2011 to March 2016. Fifty cases were suspicious or inconclusive lesions on CT and/or MRI with normal serum tumor markers. Eighteen cases were persistently raised serum tumor markers with negative CT and/or MRI findings. **Results** Out of 68 cases who was detected by PET-CT, the results were as follows: 21 cases with cervical cancer, 40 cases with ovarian cancer, 6 cases with endometrial cancer, and 1 cases with cancer of fallopian tube. PET-CT scan was negative in 17 cases (34%) of these patients whose CT and/or MRI scan was suspicious, which changed the therapeutic modality and prevented further unnecessary interventions. In 18 cases whose CT and/or MRI scan was negative but clinical suspicion of recurrence based