

# 脑出血后灶周组织形态和焦亡 相关蛋白表达水平的研究

徐辰 李国忠 钟镒

**【摘要】 目的** 观察自发性脑出血后血肿周围脑组织内神经胶质细胞的组织形态学特点及焦亡相关蛋白 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  的表达水平变化。**方法** 高血压性脑出血死亡者(发病后 3~33h 死亡)的全脑标本 5 例,出血侧为实验组,非出血侧为对照组;血肿周围的脑组织(1×1×0.3 cm<sup>3</sup>)的石蜡切片行常规 H&E 染色及 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白的免疫组化染色,光学显微镜下观察脑组织内神经胶质细胞的组织形态特点及 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白的表达水平变化,计数阳性细胞的数量,析因设计的方差分析和费舍尔最小显著差异确定显著性水平。**结果** 血肿周围脑组织内的神经胶质细胞肿大,核质凝集、碎裂和溶解;caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达在神经胶质细胞、血管内皮细胞和壁细胞的胞浆内,IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白还同时表达在上述细胞的细胞外基质内;caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达明显增强,阳性细胞显著增多( $P < 0.01$ )。**结论** 自发性 ICH 后血肿周围脑组织内的神经胶质细胞肿大,核质凝集、碎裂和溶解;caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平显著上调。这提示神经胶质细胞的焦亡途径被启动,其可能是脑出血后脑组织继发性损伤的机制之一。

**【关键词】** 脑出血 组织形态学 Caspase-1 IL-18 IL-1 $\beta$

**【中图分类号】** R743.34 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2019)05-0513-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.05.002

**The study on the brain tissue morphology and the expression level of pyroptosis-related proteins after intracerebral hemorrhage** Xu Chen, Li Guozhong, Zhong Di. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001

**【Abstract】 Objective** To observe the histomorphological characteristics of the glial cells as well as the expression levels of caspase-1, IL-18 and IL-1 $\beta$  proteins in human brain tissue after spontaneous intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** 5 whole brain specimens (died within 3~33 hours after spontaneous ICH) were selected, of which the bleeding side was the experimental group and the non-bleeding side was the control group. Paraffin sections of brain tissue (1 cm×1 cm×0.3 cm) around the hematoma were routinely prepared, and H&E staining and immunohistochemical staining of caspase-1, IL-18 and IL-1 $\beta$  proteins were performed respectively. Under light microscope, the histomorphological features of the glial cells and the expression levels of caspase-1, IL-18 and IL-1 $\beta$  proteins were observed, the number of positive cells were counted, the variance analysis of factorial design and the least significant difference of Fisher were used to determine the significance level. **Results** The glial cells in the brain tissue around the hematoma swelled and their nuclear matter agglutinated, fragmented and dissolute. Caspase-1, IL-18 and IL-1 $\beta$  proteins were expressed in glial cells, vascular endothelial cells and parietal cells, IL-18 and IL-1 $\beta$  proteins were also expressed in the extracellular matrix of the above cells. The expression levels of caspase-1, IL-18 and IL-1 $\beta$  proteins were significantly enhanced, and the positive cells were significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** After spontaneous ICH, the glial cells in the brain tissue around the hematoma swelled, and their nuclear matter agglutinated, fragmented and dissolute. The expression levels of caspase-1, IL-18 and IL-1 $\beta$  proteins were significantly up-regulated. It was suggested that the pyroptosis pathway of glial cells was initiated, which was one of the mechanisms of secondary damage of brain tissue after spontaneous ICH.

**【Key words】** Cerebral hemorrhage Histomorphology Caspase-1 IL-18 IL-1 $\beta$

自发性脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)具有较高患病率、病死率和致残率的特点,已成为严重威胁人类健康和生命的脑血管疾病之一。ICH 后的脑组织可产生一系列的继发性损伤包括血脑屏障功能紊乱所致的血管性水肿<sup>[1]</sup>、小胶质细胞激活所致的炎症级联反应<sup>[2-3]</sup>和神经细胞死亡<sup>[4]</sup>等。

焦亡(pyroptosis)是细胞程序性死亡的一种,是高度炎症形式的天然免疫反应。免疫细胞识别自身内部和外来的危险信号,不断胀大直至细胞膜破裂,细胞内的促炎症细胞因子被释放到细胞外基质中,导致组织炎症级联反应<sup>[4]</sup>。文献回顾显示有关人 ICH 后脑组织继发性损伤与焦亡关系的研究尚缺乏报道,本实验拟以人 ICH 后血肿周围脑组织为研究对象,观察 ICH 后人脑组织内神经胶质细胞的组织形态学特点以及焦亡相关蛋白 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  在人脑组织内的表达水平情况,初步分析 ICH 后人脑组织继发性损伤中的焦亡机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

因高血压病致自发性 ICH 死亡者(发病 3~33 h 内死亡)的全脑标本 5 例(来自哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科脑库),排除因脑外伤、肿瘤和使用抗凝剂所致的 ICH;记录显示尸体在死亡后 1 h 内被放在冰箱中保存,24 h 内被剖检获得全脑标本,并立即用 4% 中性甲醛溶液固定,常温保存。出血侧为实验组,非出血侧的对应部位为对照组。

### 1.2 主要试剂

兔抗人 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司),EnVision™ 免疫组化检测试剂和 DAB 显色试剂(北京中山生物技术有限公司)。

### 1.3 标本制备

在血肿皮质侧取材,组织块大小为 1 cm×1 cm×0.3 cm,常规制作血肿周围脑组织石蜡切片,常规行 H&E 染色,按厂商说明书行 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白的 PV 两步法的免疫组化(immunohistochemistry, IHC)染色(一抗稀释比例为 1:100)。

### 1.4 观察指标

在光学显微镜下观察脑组织内神经胶质细胞的组织形态学特点以及 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白在脑组织内的表达情况。

在 10×40 倍光学显微镜下应用 NIS-Elements

BR 3.0 影像软件,分别计数每一个标本 IHC 切片中血肿周围和水肿周围脑组织内 5 个视野中 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  的阳性细胞数量,计算出平均值,以单视野面积为分母,脑组织内阳性细胞数量被表示成阳性细胞数/10000  $\mu\text{m}^2$  脑组织。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSSv. 17.0 统计学软件;2×2 两因素的析因设计的方差分析(ANOVA)被用来做整体效应分析;费舍尔最小显著差异(Fisher's LSD)的检验被用来进行组间比较;显著水平被设置为  $P<0.05$ ,每组  $n=5$ 。

## 2 结果

### 2.1 ICH 后脑组织内神经胶质细胞的组织形态学特点

实验组血肿周围脑组织内神经胶质细胞的形态发生明显变化,主要表现为髓鞘肿胀或消失,细胞和细胞核体积增大,核质深染、碎裂和溶解,即神经胶质细胞呈空心样和空泡样改变。与实验组比较,对照组神经胶质细胞髓鞘清晰,细胞和细胞核体积小,核质深染,个别细胞呈空心样和空泡样改变(图 1)。

### 2.2 ICH 后脑组织内焦亡相关蛋白的表达情况

#### 2.2.1 caspase-1 蛋白

Caspase-1 蛋白表达在对照组和实验组脑组织内的神经胶质细胞、血管内皮细胞和壁细胞的细胞浆内。与对照组比较,IHC 后血肿周围脑组织内的 caspase-1 蛋白在神经胶质细胞内的表达面积明显增加(图 1)。

对照组 caspase-1 阳性的神经胶质细胞的形态可表现为(1)细胞小,细胞核圆形或椭圆形,核质染色较深且均匀,胞浆内少量 caspase-1 蛋白阳性表达;(2)细胞大,细胞核不可见,细胞中央区缺乏细胞结构,除中央区外的胞浆内充满 caspase-1 蛋白阳性表达,即细胞呈空心样;(3)细胞大, caspase-1 表达范围和细胞结构缺乏面积增大,即细胞呈空泡样。与对照组比较,实验组血肿周围脑组织内的神经胶质细胞的上述变化更显著,主要表现为细胞和细胞核显著增大,核质凝集和碎裂(图 1)。

ICH 后血肿周围脑组织内 caspase-1 阳性神经胶质细胞数量显著多于对照组( $P<0.001$ )和 ICH 后水肿周围脑组织( $P<0.01$ )。ICH 后水肿周围脑组织内 caspase-1 阳性神经胶质细胞数量增多,但与对照组比较无显著差异( $P>0.05$ )(图 2)。

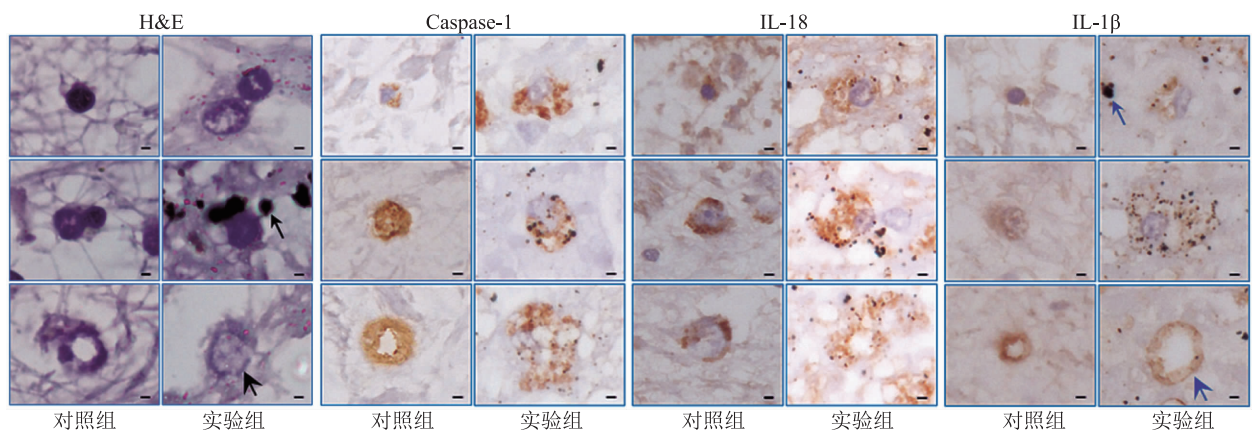


图 1 脑出血后血肿周围脑组织内神经胶质细胞的组织形态 蓝色和黑色长箭头指向出血后沉积在组织中的血液成分；黑色短箭头指向细胞核，蓝色短箭头指向阳性染色的细胞

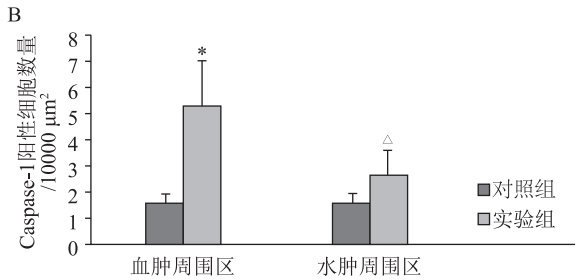
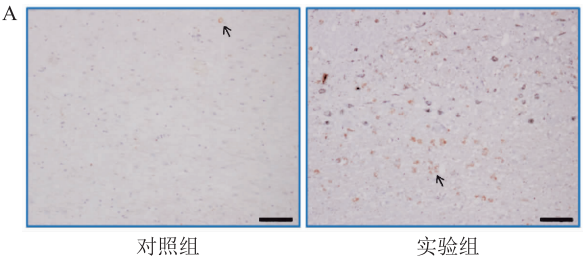


图 2 脑出血后血肿周围脑组织内 caspase-1 蛋白表达水平 A 为 caspase-1 蛋白 IHC 染色，箭头指向 caspase-1 阳性表达的神经胶质细胞；B 为 caspase-1 阳性细胞计数；与对照组血肿周围区比较，\*  $P < 0.001$ ；与实验组血肿周围区比较， $\Delta P < 0.01$

## 2.2.2 IL-18 蛋白

IL-18 蛋白表达在对照组和实验组脑组织内的神经胶质细胞、血管内皮细胞和壁细胞的细胞浆内以及细胞周围的基质内。与对照组比较，ICH 后血肿周围脑组织内的 IL-18 蛋白在神经胶质细胞内外的表达面积明显增加(图 1)。

对照组 IL-18 阳性的神经胶质细胞的形态可表现为(1)核质染色较深且均匀的细胞，细胞和细胞核小，细胞核圆形或椭圆形，胞浆内少量 IL-18 蛋白阳性表达；(2)核质碎裂且分布不均的细胞，细胞和细胞核均较大，细胞核圆形，胞浆内充满 IL-18 蛋白阳性表达；(3)细胞体积越大，IL-18 蛋白表达范围和

细胞结构缺乏面积也越大，即细胞呈空心样。与对照组比较，实验组血肿周围脑组织内的神经胶质细胞的上述变化更显著，主要表现为细胞和细胞核显著增大，核质碎裂和溶解(图 1)。

ICH 后血肿周围脑组织内 IL-18 阳性神经胶质细胞数量显著多于对照组( $P < 0.001$ )和 ICH 后水肿周围脑组织( $P < 0.001$ )。ICH 后水肿周围脑组织内 IL-18 阳性神经胶质细胞数量增多，但与对照组比较无显著差异( $P > 0.05$ )(图 3)。

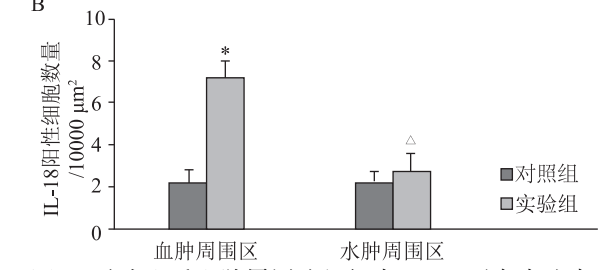
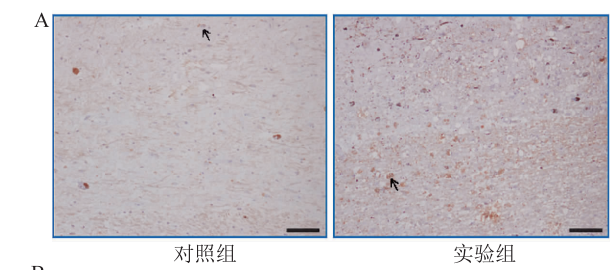


图 3 脑出血后血肿周围脑组织内 IL-18 蛋白表达水平 A 为 IL-18 蛋白 IHC 染色，箭头指向 IL-18 阳性表达的神经胶质细胞；B 为 IL-18 阳性细胞计数；与对照组血肿周围区比较，\*  $P < 0.001$ ；与实验组血肿周围区比较， $\Delta P < 0.001$

## 2.2.3 IL-1β 蛋白

IL-1β 蛋白表达在对照组和实验组脑组织内的神经胶质细胞、血管内皮细胞和壁细胞的细胞浆内

以及细胞周围的基质内。与对照组比较,ICH 后血肿周围脑组织内的 IL-18 蛋白在神经胶质细胞内外的表达面积明显增加(图 1)

对照组 IL-1 $\beta$  阳性的神经胶质细胞的形态可表现为(1)核质染色较深且均匀的细胞,细胞和细胞核小,细胞核圆形或椭圆形,胞浆内少量 IL-1 $\beta$  蛋白阳性表达;(2)核质碎裂且分布不均的细胞,细胞和细胞核均较大,细胞核圆形,胞浆内较多 IL-1 $\beta$  蛋白阳性表达;(3)核质消失的细胞,细胞大,中央区外的胞浆内充满 IL-1 $\beta$  蛋白阳性表达,缺乏 IL-1 $\beta$  蛋白阳性表达的中央区面积明显增大,细胞呈空泡样。与对照组比较,实验组血肿周围脑组织内的神经胶质细胞的上述变化更明显,主要表现为细胞和细胞核体积显著增大,核质染色较浅且不均匀,核质碎裂或溶解,细胞多呈大的空泡样(图 1)。

ICH 后血肿周围脑组织内 IL-1 $\beta$  阳性神经胶质细胞数量显著多于对照组( $P<0.001$ )和 ICH 后水肿周围脑组织( $P<0.001$ )。ICH 后水肿周围脑组织内 IL-1 $\beta$  阳性神经胶质细胞数量增多,但与对照组比较无显著差异( $P>0.05$ )(图 4)。

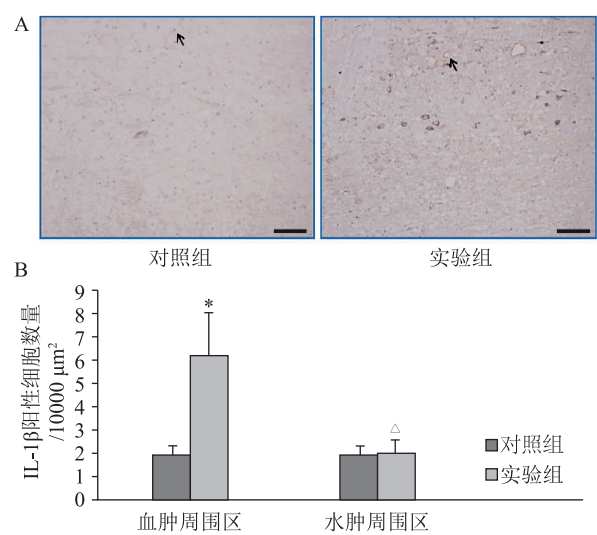


图 4 脑出血后血肿周围脑组织内 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平 A 为 IL-1 $\beta$  蛋白 IHC 染色,箭头指向 IL-1 $\beta$  阳性表达的神经胶质细胞;B 为 IL-1 $\beta$  阳性细胞计数;与对照组血肿周围区比较,\*  $P<0.001$ ;与实验组血肿周围区比较, $\Delta$   $P<0.001$

3 讨论

在多细胞生物体内生理情况下组织内环境的稳定通过维持细胞增殖和细胞死亡之间的平衡得以实现。生理性细胞死亡途径被称之为凋亡,这是进化

保守的细胞自杀形式,受控于基因<sup>[5-6]</sup>。凋亡细胞的形态特点是细胞缩小变圆,细胞膜结构完整,凋亡小体形成<sup>[7]</sup>。

当机体受到病理性刺激时如果损伤大于修复,则机会启动多种形式的细胞死亡如自噬、铁死亡、坏死性凋亡和焦亡等,这些也都是程序性细胞死亡形式<sup>[4,8-11]</sup>。发生自噬和铁死亡的细胞膜无明显的改变,核质无凝集,自噬细胞内产生自噬液泡,铁死亡细胞变圆,细胞核大小正常。发生坏死性凋亡和焦亡的细胞膨大变形,细胞膜破裂;坏死性凋亡细胞始于细胞肿胀和细胞膜解体,最后发生细胞核降解;焦亡细胞不断胀大直至细胞膜破裂,并伴随着细胞核碎裂<sup>[7]</sup>。

本研究中因高血压病致自发性 ICH 而死亡的人脑组织的 H&E 染色切片被用来评估血肿周围脑组织内神经胶质细胞的组织形态学特点,结果显示血肿周围脑组织内的神经胶质细胞发生不同程度的胀大样改变,并伴随着核质深染、碎裂和溶解。由于没有做神经胶质细胞的特殊染色,故不能确定这些胀大的神经胶质细胞的确切种类。根据 ICH 后血肿周围脑组织内神经胶质细胞的上述形态变化特点,推测其可能与焦亡途径的启动有关。

焦亡是细胞程序性死亡的一种高度炎症形式,是天然免疫反应的一种。在这一过程中免疫细胞识别自身内部或外来危险信号,不断胀大直至细胞膜破裂,细胞内促炎细胞因子被释放到细胞外基质内,导致组织激烈的炎症级联反应<sup>[4,11]</sup>。

焦亡的发生有赖于 caspase-1 的活化,活化的 Caspase-1 的一个重要功能就是执行其对促炎细胞因子 IL-18 前体和 IL-1 $\beta$  前体的切割功能,使其成为具有生物活性的促炎细胞因子 IL-18 和 IL-1 $\beta$ <sup>[53-56]</sup>。活化的 Caspase-1 的另外一个重要功能是裂解 GSDMD,断裂后 GSDMDd 的 N 末端的 PFD 多聚化后在细胞膜上形成预估直径为 1.1~2.4 nm 的孔道,这些孔道在允许细胞外水进入细胞内的同时,将细胞内活化的促炎细胞因子 IL-18 和 IL-1 $\beta$  释放到细胞外基质内,这一过程被称作是焦亡激活的经典途径<sup>[12]</sup>。

有关 ICH 后脑组织内神经细胞死亡是否涉及焦亡途径的认知主要来自对实验性 ICH 动物模型的研究<sup>[13-16]</sup>。有关人 ICH 后神经细胞的死亡是否涉及焦亡途径的研究还未见报道。

本研究因 ICH 而死亡的人脑组织的 IHC 染色切片被用来评估血肿周围脑组织(即水肿区)内焦亡



相关蛋白 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  的表达情况,结果显示 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达在神经胶质细胞、血管内皮细胞和壁细胞的胞浆内,IL-18 和 IL-1 $\beta$  还同时表达在上述细胞的细胞外基质内;与对照组的脑组织和实验组水肿周围的脑组织比较,实验组血肿周围脑组织内的 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达显著增强,阳性细胞数量显著增多;与对照组的脑组织比较,实验组水肿周围的脑组织内的 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达增强不明显,阳性细胞数量增多,但无统计学意义。这提示人 ICH 后血肿周围脑组织内的焦亡相关蛋白 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  的表达显著上调,IL-18 和 IL-1 $\beta$  在血肿周围脑组织内的释放显著增加。本研究认为人 ICH 后 caspase-1 依赖的焦亡的经典途径被激活,神经胶质细胞可能发生了焦亡性死亡;被释放到细胞外基质内的促炎细胞因子 IL-18 和 IL-1 $\beta$  成为进一步加重脑组织继发性损伤的重要因素之一。

ICH 后焦亡相关蛋白的表达与 ICH 后时间之间的关系的研究尚缺乏系统性和一致性。一项体外研究显示,用氯高铁血红素处理的 N9 小胶质细胞的原代培养的上清液中 IL-1 $\beta$  的分泌没有增加,研究者认为氯高铁血红素没有显著地影响 N9 小胶质细胞的焦亡<sup>[17]</sup>。Zhang 等人的临床研究显示,在出血 0~24 h,IL-1 $\beta$  蛋白表达水平达到最大值<sup>[18]</sup>。本实验在纳入观察的 5 例因 ICH 而死亡者的血肿周围脑组织内观察到 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白阳性表达均明显增强,33 h 者变化更显著。

动物和人类之间的炎症表达存在着差异。就动物模型而言,不论是微泵注血诱导的 ICH 模型还是注射胶原酶诱导的 ICH 模型,都与实际上的急性 ICH 之间存在着差异。胶原酶诱导的 ICH 模型出血速度缓慢,以弥散性出血为主,血肿出现较晚,可见于造模后数小时<sup>[19]</sup>。胶原酶对血管壁有破坏作用,使血流循环与真实出血之间存在着差异<sup>[20]</sup>。

由于本实验具有一些限制,仍有一些问题存在,如标本量较少,无法充分统计比较各个时间点 caspase-1、IL-18 和 IL-1 $\beta$  蛋白的表达情况;如要验证确实存在焦亡途径,尚需检测 Caspase-1 介导的 gasdermin D 激活途径;究竟是哪一种神经胶质细胞参与了 ICH 后的焦亡途径也还需要用一些特殊染色技术验证。

## 参 考 文 献

[1] Keep RF, Hua Y, Xi GH. Intracerebral haemorrhage: mecha-

nisms of injury and therapeutic targets[J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(8):720-731.

- [2] Taylor RA, Chang CF, Goods BA, et al. TGF-beta 1 modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2017, 127(1):280-292.
- [3] Zhang Z, Zhang Z, Lu H, et al. Microglial polarization and inflammatory mediators after intracerebral hemorrhage[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 54(3):1874-1886.
- [4] Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases[J]. *Immunol Rev*, 2017, 277(1):61-75.
- [5] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4):239-257.
- [6] Hetts SW. To die or not to die; an overview of apoptosis and its role in disease[J]. *JAMA*, 1998, 279(4):300-307.
- [7] Fink SL, Cookson BT. Apoptosis and necrosis: mechanism description of dead and dying eukaryotic cells[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(4):1907-1916.
- [8] Zille M, Karuppagounder SS, Chen YA, et al. Neuronal death after hemorrhagic stroke in vitro and in vivo shares features of ferroptosis and necroptosis[J]. *Stroke*, 2017, 48(4):1033-1043.
- [9] Wu Y, Song J, Wang Y, et al. The potential role of ferroptosis in neonatal brain injury[Z], 2019:115.
- [10] Liao KH, Sung CW, Huang YN, et al. Therapeutic potential of drugs targeting pathophysiology of intracerebral hemorrhage: from animal models to clinical applications[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(15):2212-2225.
- [11] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3):486-541.
- [12] Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages[J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(11):1812-1825.
- [13] Yao ST, Cao F, Chen JL, et al. NLRP3 is Required for Complement-Mediated Caspase-1 and IL-1beta Activation in ICH[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2017, 61(3):385-395.
- [14] Lin X, Ye H, Siaw-Debrah F, et al. AC-YVAD-CMK inhibits pyroptosis and improves functional outcome after intracerebral hemorrhage[Z], 2018:3706047.
- [15] Yuan RR, Fan HY, Cheng SQ, et al. Silymarin prevents NLRP3 inflammasome activation and protects against intracerebral hemorrhage[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 93:308-315.
- [16] Bobinger T, Burkardt P, Huttner HB, et al. Programmed cell death after intracerebral hemorrhage[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16(9):1267-1281.
- [17] Tan Y, Tan SW, Fan BY, et al. Hemin induces the activation of NLRP3 inflammasome in N9 microglial cells[J]. *Iran J Immunol*, 2018, 15(2):122-132.
- [18] Zhang ZL, Liu YG, Huang QB, et al. NF-kappa B activation and cell death after intracerebral hemorrhage in patients[J]. *Neurological Sciences*, 2014, 35(7):1097-1102.
- [19] Alharbi BM, Tso MK, Macdonald RL. Animal models of spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. *Neurol Res*, 2016, 38(5):448-455.
- [20] Andaluz N, Zuccarello M, Wagner KR. Experimental animal models of intracerebral hemorrhage[J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2002, 13(3):385-393.

(2019-04-22 收稿)