

## Bcl-2、Bax 蛋白在不同年龄组患者脑挫裂伤组织中的表达

庄志军<sup>1</sup>, 高进喜<sup>2\*</sup>, 王如密<sup>2</sup>, 王守森<sup>2</sup>, 林瑞生<sup>1</sup>, 李 榕<sup>1</sup>, 汪伟巍<sup>1</sup>

(1. 福建医科大学附属漳州市医院神经外科, 漳州 363000; 2. 南京军区福州总医院神经外科, 福州 350025)

**[摘要]** **目的:** 研究不同年龄组患者颅脑损伤后脑挫裂伤组织中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达差异, 探讨年龄因素对颅脑损伤患者预后影响的分子生物学机制。**方法:** 收集临床脑挫裂伤患者手术切除的脑挫裂伤组织, 并随机选取 15 例颞叶癫痫或血管畸形手术患者颞叶皮质脑组织作为对照。应用免疫组化和计算机显微图像分析技术, 比较老年组( $\geq 60$ 岁)、成年组(19~59岁)和未成年组( $\leq 18$ 岁)患者脑损伤后 3~9 h 挫裂伤组织中 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的差异。**结果:** 脑损伤后 Bcl-2、Bax 蛋白在脑挫裂伤组织中的表达与对照标本相比明显增强( $P < 0.05$ ); 老年组患者脑挫裂伤组织中 Bcl-2/Bax 蛋白表达比率显著低于未成年组和成年组( $P < 0.05$ ); 成年组患者脑挫裂伤组织中 Bcl-2/Bax 蛋白表达比率显著低于未成年组( $P < 0.05$ )。**结论:** 年龄因素可影响创伤性颅脑损伤后患者脑组织中 Bcl-2、Bax 蛋白的表达, 老年颅脑损伤恢复不良可能与 Bcl-2/Bax 蛋白表达比率降低有关, 而未成年颅脑损伤患者预后较好可能与 Bcl-2/Bax 蛋白表达比率较高有关。

**[关键词]** 颅脑损伤; 年龄; Bcl-2; Bax

**[中图分类号]** R 651.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)09-1113-03

### Expression of Bcl-2 and Bax protein in contusive brain tissue in patients of different ages

ZHUANG Zhi-jun<sup>1</sup>, GAO Jin-xi<sup>2\*</sup>, WANG Ru-mi<sup>2</sup>, WANG Shou-sen<sup>2</sup>, LIN Rui-sheng<sup>1</sup>, LI Rong<sup>1</sup>, WANG Wei-wei<sup>1</sup> (1. Department of Neurosurgery, Zhangzhou Municipal Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Zhangzhou 363000, China; 2. Department of Neurosurgery, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the influence of different ages on expression of Bcl-2 and Bax protein in the contusive brain tissues after traumatic brain injury (TBI), so as to probe into the molecular mechanism of the age influence on the prognosis of TBI patients. **Methods:** The expression of Bcl-2 and Bax protein in contusive and lacerated brain tissue (within 3 h to 9 h after trauma) in aged group ( $\geq 60$  years), adult group (19-59 years) and non-adult group ( $\leq 18$  years) was analyzed and compared by immunohistochemistry method and computer micrograph analysis. The temporal lobe samples of 15 patients with temporal epilepsy or vascular deformity were taken as control. **Results:** The expression of NGF, Bcl-2 and Bax protein in the contusive and lacerated brain tissue was higher in the 3 TBI groups than that in the control group. The ratio of Bcl-2/Bax expression in aged group was significantly lower than those in the adult and non-adult groups ( $P < 0.05$ ); and the ratio of Bcl-2/Bax expression in the adult group was significantly lower than that in the non-adult group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The expression of Bcl-2 and Bax protein after TBI is influenced by the age of sufferers; the decrease of Bcl-2/Bax ratio might be associated with the neurological deficits after TBI in aged patients and the higher ratio of Bcl-2/Bax might be associated with the better prognosis of TBI in non-adult patients.

**[KEY WORDS]** craniocerebral trauma; age; Bcl-2; Bax

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(10):1113-1115]

年龄是影响颅脑损伤预后的重要因素之一。临床资料表明<sup>[1-2]</sup>, 颅脑损伤后老年患者存在着恢复慢, 神经功能缺失严重, 预后差, 病死率高等特点, 而未成年颅脑损伤患者的预后通常优于成年和老年, 但是目前人们对这一临床现象的病理生理学机制还报道甚少。大量的实验证实凋亡抑制因子 Bcl-2 和凋亡促进因子 Bax 蛋白的表达与受损神经细胞的转归密切相关。为此, 本实验观察了老年、成年和未成年患者脑挫裂伤脑组织中的 Bcl-2、Bax 蛋白表达差异, 试图由此探讨年龄对颅脑损伤预后影响的分子生物学机制。

### 1 材料和方法

1.1 研究对象 选取 2004 年 7 月至 2005 年 2 月福州总医院和解放军第 476 医院收治的脑挫裂伤患者中急诊开颅手术的 58 例患者, 并随机选取 15 例颞叶

**[基金项目]** 南京军区福州总医院院内基金(YN200307)。Supported by the Foundation of Fuzhou General Hospital of PLA Nanjing Military Area Command(YN200307)。

**[作者简介]** 庄志军, 硕士, 住院医师。

E-mail: zhuangzhijun1980@126.com

\* Corresponding author. E-mail: gaojinxi@sohu.com

癫 或血管畸形手术患者颞叶皮质脑组织作为对照。

1.2 筛选条件 (1)病情选择:入院时患者为重型颅脑损伤患者,格拉斯哥昏迷评分(Glasgow coma scale, GCS)为 6~8 分;(2)时间窗选择:所有标本均来自伤后 3~9 h;(3)标本来源部位:额颞叶皮质脑挫裂伤组织缺血半暗带(periischemic zone, PIZ)区;(4)临床及随访资料完整;(5)资料证明入院前和手术室没有低血压/血容量减少、缺氧,并排除原来患有严重神经系统、心血管系统、呼吸系统、泌尿系统等疾病的患者;(6)为了保持样本组织学的一致性,复染后发现包含有坏死区域和(或)炎性细胞浸润,太接近于坏死中心与 PIZ 区的交点,予以排除。符合进一步实验的标本有 46 例。

1.3 分组 按《中华人民共和国民法通则》和联合国提出的年龄划分标准,年龄≥60 岁为老年组,19~59 岁为成年组,≤18 岁为未成年组。脑挫裂伤标本中老年组 11 例,成年组 25 例,未成年组 10 例。对照标本中老年组 4 例,成年组 7 例,未成年组 4 例。

1.4 标本取材和石蜡切片制备 术中去除容易吸除的坏死中心后,PIZ 区与临近不易吸除的白质区域肉眼观察易于区别,用取瘤钳从 PIZ 区咬除不大于 3 mm<sup>3</sup> 的样本<sup>[3]</sup>。常规石蜡切片,片厚 5 μm。

1.5 Bcl-2、Bax 蛋白检测 采用免疫组化 EnVision 法,第一抗体(即用型)购自福州迈新公司。用计算机显微图像分析系统观察 Bcl-2、Bax 阳性细胞分布,计算每 mm<sup>2</sup> 中阳性细胞数。

1.6 统计学处理 各组测定数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

## 2 结果

2.1 阳性细胞分布 Bcl-2 和 Bax 蛋白主要位于核

膜上,在内质网、线粒体外膜上也有分布,因此表达阳性的细胞主要在胞质着色,呈弥漫性或散在棕红色颗粒。主要分布于大脑半球皮质神经元和神经胶质细胞(图 1)。

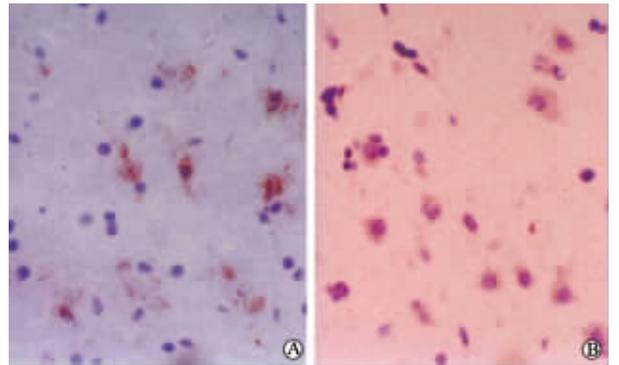


图 1 脑挫裂伤组 Bcl-2(A)和 Bax(B)免疫组化阳性细胞  
Fig 1 Expression of Bcl-2(A) and Bax(B) protein in contusive and lacerated brain tissues(×400)

2.2 阳性细胞计数 对照标本 Bcl-2 和 Bax 蛋白免疫组化染色均为阴性或弱阳性,在老年组、成年组和未成年组中的表达差异不明显。脑挫裂伤标本中 Bcl-2 蛋白在老年组、成年组和未成年组中的表达相差不多 ( $P > 0.05$ ),而 Bax 蛋白在老年组中的表达均高于未成年组和成年组,而成年组表达也高于未成年组 ( $P < 0.05$ )。由于 Bcl-2、Bax 在调节细胞凋亡中的作用相反且在颅脑损伤后表达均有增加,故本组计算了脑挫裂伤组的 Bcl-2/Bax 值,统计结果显示,三组之间均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ );老年组脑挫裂伤组织中 Bcl-2/Bax 显著低于未成年和成年组 ( $P < 0.05$ );成年组脑挫裂伤组织中 Bcl-2/Bax 显著低于未成年组 ( $P < 0.05$ )。详见表 1。

表 1 不同年龄颅脑损伤后额叶和颞叶 Bcl-2、Bax 蛋白的表达

Tab 1 Expression of Bcl-2 and Bax protein in brain tissues adult, non-adult and aged patients after traumatic brain injury

( $\bar{x} \pm s, \text{mm}^{-2}$ )

Protein	Frontal lobe cerebral cortex			Temporal lobe cerebral cortex		
	Non-adult (n=10)	Adult (n=25)	Aged(n=11)	Non-adult (n=10)	Adult (n=25)	Aged(n=11)
Bcl-2	273.0±30.6	267.8±27.1	264.5±28.8	271.8±29.6	267.0±18.1	265.2±23.9
Bax	274.2±28.6	405.2±31.2*	454.7±41.0*△	265.7±36.6	386.8±41.8*	464.7±47.1*△
Bcl-2/Bax	1.00±0.12	0.66±0.07*	0.58±0.05*△	1.02±0.09	0.69±0.08*	0.57±0.06*△

\*  $P < 0.05$  vs non-adult; △  $P < 0.05$  vs adult

## 3 讨论

在创伤性颅脑损伤急性期,脑挫裂伤的特征是中心的坏死区,四周环绕着局部缺血非坏死组织区域,即 PIZ 区。随着对 PIZ 研究的深入,现在许多学

者认为,广义的 PIZ 通过治疗干预是有可能被挽救的,即潜在可逆的缺血脑组织。然而,PIZ 并非处于静止状态,而在时间与空间上呈一个动态的变化过程。这一定义重点着眼于临床并有助于明确可能被挽救的对象,提示 PIZ 是治疗的主要目标。

当暴力作用于头部时,不但造成原发性脑损伤,也将引起继发性脑损伤。现已广泛认可颅脑损伤后迟发性神经元死亡(delayed neuron death, DND)导致行为损害<sup>[4]</sup>。近来 *bcl-2* 基因家族与颅脑损伤后 DND 的关系亦越来越受学者们的关注。*bcl-2* 基因及其家族成员在细胞凋亡中起重要作用,它们共同构成一个非常复杂的相互作用网络,调控细胞凋亡。大量的实验证实凋亡抑制因子 Bcl-2 和凋亡促进因子 Bax 蛋白的表达与受损神经细胞的转归密切相关。鉴于此,本实验选择了凋亡相关蛋白(Bcl-2, Bax)作为研究对象。

部分脑挫裂伤患者需要急诊开颅行挫裂伤组织清除术和(或)额极、颞极切除减压术,这为研究人脑外伤后 DND 提供了条件。但采用这种方法有一定的困难,主要在于手术切除挫伤灶本身存在大量的坏死,所以要研究凋亡蛋白的标本必须来自挫伤灶周围的脑组织,而非挫伤灶本身。而且坏死和炎性细胞都对免疫化学发生反应,因此标本必须无明显坏死和大量炎细胞浸入才符合凋亡相关蛋白的研究条件。所以我们选择了坏死组织周围的非坏死区非炎症浸润区,即 PIZ 区来进行分析。

由于 *bcl-2*、*bax* 基因属于即刻早期基因,在创伤后数小时即被激活,24 h 到达高峰,1 周后恢复正常。因此,本实验选取较为关键的颅脑损伤早期(3~9 h)作为观察时间点。

本组实验结果发现,正常对照组 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达为阴性或弱阳性,老年组、成年组和未成年组无差别。脑损伤后脑挫裂伤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白免疫阳性细胞大量增加,这与有关神经损伤后 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达变化的动物实验观察结果是一致的<sup>[5-6]</sup>。老年组患者脑挫裂伤组织 Bax 蛋白表达显著高于未成年组和成年组,由于 Bcl-2 蛋白表达基本一致,因此老年组患者损伤侧 Bcl-2/Bax 比例也就低于未成年组和成年组;同样成年组患者脑挫裂伤组织 Bax 蛋白表达显著高于未成年组,由于 Bcl-2 蛋白表达基本一致,因此成年组患者损伤侧 Bcl-2/Bax 比例也就低于未成年组。根据凋亡相关理论:Bcl-2/Bax 比例决定细胞受刺激后凋亡还是存活,Bcl-2 蛋白占优时细胞存活,Bax 蛋白占优时细胞凋亡,老年患者脑损伤后 Bcl-2/Bax 比例的下降就意味着老年患者受损神经元抗凋亡能力减弱。这与高进喜等<sup>[7]</sup>得到的观点比较一致,他们发现液压打击伤后 NGF、Bcl-2、Bax 蛋白在大鼠损伤侧大脑皮质、海马表达明显增强,老龄组大鼠伤侧皮质 NGF 蛋白表达和 Bcl-2/Bax 蛋白表达比率显著低于

幼龄组,认为老龄和幼龄大鼠液压脑损伤后 NGF、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的差异提示老龄哺乳动物受损神经元修复和生存能力下降。而 Clark 等<sup>[8]</sup>研究发现:重型颅脑损伤后生存患者脑组织中 Bcl-2 蛋白高于死亡患者,儿童脑组织样本中 Bcl-2 蛋白表达水平高于成年人,因此他们认为 Bcl-2 表达的增强可能是儿童颅脑损伤恢复较好的重要原因之一。与 Clark 不同的是,Bittigau 等<sup>[9]</sup>发现在出生后 3~30 d 的大鼠中,3~7 d 鼠颅脑损伤后 Bcl-2 蛋白表达水平最低,预后最差;而 30 d 鼠 Bcl-2 蛋白表达水平最高,预后最好,他们认为这有助于解释新生儿颅脑损伤预后较差的原因。以上研究表明 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平的确受到年龄因素的影响,但目前还不清楚这种影响产生的分子生物学机制,有待于进一步研究。

总之,重型颅脑损伤后老年组患者损伤侧皮质 Bcl-2/Bax 比例显著低于未成年组,这一发现对临床上老年人颅脑损伤后恢复慢、神经功能缺失重、预后差,和未成年颅脑损伤患者的预后优于成年和老年的原因提供了一种合理的解释。

#### [参考文献]

- [1] Hukkelhoven C W, Steyerberg E W, Rampen A J, et al. Patient age and outcome following severe traumatic brain injury: an analysis of 5 600 patients[J]. *J Neurosurg*, 2003, 99: 666-673.
- [2] Czosnyka M, Boyd C S, Ahmed R, et al. Age, intracranial pressure, autoregulation, and outcome after brain trauma[J]. *J Neurosurg*, 2005, 102: 450-454.
- [3] Narendra N, Narotam P K, Agrawal D K, et al. Influence of apoptosis on neurological outcome following traumatic cerebral contusion[J]. *J Neurosurg*, 2004, 101: 233-240.
- [4] Hong J, Gui J, Zhou Y, et al. Study on cognition disorder and morphologic change of neurons in hippocampus area following traumatic brain injury in rats[J]. *Shin J Traumatol*, 2002, 5: 36-39.
- [5] 骆纯, 朱诚, 卢亦成, 等. 大鼠液压脑损伤后 Bcl-2、Bcl-x 和 Bax 蛋白表达的改变[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22: 54-56.
- [6] 杨小锋, 李谷, 刘伟国, 等. 严重颅脑损伤后细胞凋亡状态及相关基因 Bcl-2、Bax 的表达[J]. *中华急诊医学杂志*, 2004, 13: 100-102.
- [7] 高进喜, 卢亦成, 江基尧, 等. 幼龄和老龄大鼠液压脑损伤后 NGF、Bcl-2、Bax 蛋白的表达[J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24: 496-498.
- [8] Clark R S, Kochanek P M, Adelson P D, et al. Increased in Bcl-2 protein in cerebrospinal fluid and evidence for programmed cell death in infants and children after severe traumatic brain injury[J]. *J Pediatr*, 2000, 137: 197-204.
- [9] Bittigau P, Sifringer M, Pohl D, et al. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain[J]. *Ann Neurol*, 1999, 45: 724-735.

[收稿日期] 2007-02-08

[修回日期] 2007-06-21

[本文编辑] 孙岩