

脑出血患者脑组织中 EPCR、PECAM-1 表达水平 与疾病严重程度的关系

金俊, 唐森

(驻马店市中心医院 神经内三科, 河南 驻马店 463000)

摘要: **目的** 探究脑出血患者脑组织中内皮细胞蛋白 C 受体 (EPCR)、血小板内皮细胞黏附分子 1 (PECAM-1) 表达水平与疾病严重程度的关系。**方法** 选取 2019 年 3 月至 2020 年 8 月于驻马店市中心医院就诊的脑出血患者 100 例为研究对象, 收集临近血肿 0.5 cm 脑组织 (脑出血组织标本, 脑出血组) 和远隔血肿位置的脑组织 (对照组织标本, 对照组)。根据出血量的不同将患者分为少量组 ($n=35$)、中量组 ($n=44$)、大量组 ($n=21$); 根据病情严重程度将患者分为轻型组 ($n=40$)、中型组 ($n=40$) 例、重型组 ($n=20$)。采用免疫组织化学法检测组织中 EPCR、PECAM-1 表达水平; Spearman 法分析脑出血组织 EPCR、PECAM-1 阳性表达率与美国国立卫生研究院卒中量表 (NIHSS) 评分的相关性; Logistic 回归分析脑出血发生的影响因素。**结果** 免疫组织化学染色结果显示, EPCR 在脑出血组的阳性表达率高于对照组, 而 PECAM-1 在脑出血组的阳性表达率低于对照组 ($P<0.05$); 少量组、中量组、大量组脑出血组织 EPCR 阳性表达率依次升高, PECAM-1 阳性表达率依次降低 ($P<0.05$); 轻型组、中型组、重型组脑出血组织 EPCR 阳性表达率依次升高, PECAM-1 阳性表达率依次降低 ($P<0.05$); 脑出血组织 EPCR 阳性表达率与患者 NIHSS 评分呈正相关 ($r=0.416, P<0.001$), PECAM-1 阳性表达率与患者 NIHSS 评分呈负相关 ($r=-0.337, P<0.001$); EPCR 是影响脑出血发生的危险因素, 而 PECAM-1 是影响脑出血发生的保护因素 ($P<0.05$)。**结论** 脑出血患者脑组织中 EPCR 呈高表达, PECAM-1 呈低表达, 均与病情严重程度和出血量有关, 可能作为评估脑出血患者病情的潜在标志物。

关键词: 内皮细胞蛋白 C 受体; 血小板内皮细胞黏附分子 1; 脑出血; 疾病严重程度

中图分类号: R743.34

Relationship between expression levels of EPCR and PECAM-1 in brain tissues of patients with cerebral hemorrhage and severity of disease

JIN Jun, TANG Sen

(Neurology Department, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan 463000, China)

Abstract: **[Objective]** To explore the relationship between the expression levels of endothelial cell protein C receptor (EPCR) and platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) in brain tissue of patients with cerebral hemorrhage and the severity of the disease. **[Methods]** One-hundred patients with cerebral hemorrhage who were treated in Zhumadian Central Hospital from March 2019 to August 2020 were selected as the research objects. The 0.5 cm brain tissue near the hematoma (intracerebral hemorrhage tissue specimen, cerebral hemorrhage group) and brain tissue at the location of distant hematoma (control tissue specimen, control group) were collected. According to the amount of bleeding, the patients were divided into minor group ($n=35$), medium group ($n=44$) and massive group ($n=21$); according to the severity of the disease, patients were divided into mild group ($n=40$), moderate group ($n=40$) cases and severe group ($n=20$). The expression levels of EPCR and PECAM-1 in tissues were detected with immunohistochemistry. The correlation between the positive expression rates of EPCR and PECAM-1 in cerebral hemorrhage tissue and National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score was analyzed with Spearman method. The influencing factors of cerebral hemorrhage were analyzed with logistic regression. **[Results]** The results of immunohistochemical staining showed that the positive expression rate of EPCR in the cerebral hemorrhage group was significantly higher than that in the

control group, while the positive expression rate of PECAM-1 in the cerebral hemorrhage group was significantly lower than that in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The positive expression rate of EPCR in cerebral hemorrhage tissues of minor group, medium group and massive group increased successively, and the positive expression rate of PECAM-1 decreased successively ($P < 0.05$). The positive expression rate of EPCR in cerebral hemorrhage tissues in the mild group, moderate group and severe group increased successively, and the positive expression rate of PECAM-1 decreased successively ($P < 0.05$). The positive expression rate of EPCR in cerebral hemorrhage tissue was positively correlated with the patient's NIHSS score ($r = 0.416$, $P < 0.001$), and the positive expression rate of PECAM-1 was negatively correlated with the patient's NIHSS score ($r = -0.337$, $P < 0.001$). EPCR was a risk factor affecting the occurrence of cerebral hemorrhage, and PECAM-1 was a protective factor affecting the occurrence of cerebral hemorrhage ($P < 0.05$). **【Conclusion】** EPCR is highly expressed in brain tissues of patients with cerebral hemorrhage, while PECAM-1 is lowly expressed. Both of them are related to the severity of the disease and the amount of bleeding, and may be used as potential markers for evaluating the condition of patients with cerebral hemorrhage.

Keywords: endothelial cell protein C receptor; platelet endothelial cell adhesion molecule 1; cerebral hemorrhage; disease severity

脑出血是具有发病率高、病情进展速度快等特点的一种常见急性脑血管疾病^[1]。研究显示,脑出血急性期死亡率达到 30.0%~40.0%,严重威胁患者的生命健康安全^[2]。研究发现,非外伤性脑实质内血管破裂是导致脑出血发病的主因^[3]。脑出血后会发​​生血肿,此时脑组织受到压迫、机体凝血系统被激活,大量凝血酶被释放出来,导致血脑屏障破坏,进而引发脑组织缺血损伤和水肿^[4]。随着医疗科技和分子技术的进步,一定程度上降低了脑出血的死亡率,然而后期的预后效果仍不理想,一些患者治疗后出现生活能力或神经功能恶化现象,因此较多学者致力于探究一些新型分子标志物,用以提高治疗效果^[5]。内皮细胞蛋白 C 受体 (endothelial cell protein C receptor, EPCR) 是一种具有高度亲和力的跨膜蛋白,主要分布于大部分小动脉、小静脉及大血管的内皮细胞表面^[6]。EPCR 与不同物质结合发挥着不同的作用,例如与蛋白 S 的共同作用下灭活凝血因子,发挥抗凝作用;影响炎症细胞因子合成与释放,从而参与炎症调节;另外, EPCR 还可通过相关信号通路参与造血干细胞的保留和重建过程^[7]。此外,研究发现, EPCR 的异常表达会引发机体产生炎症反应^[8]。血小板内皮细胞黏附分子 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1) 是黏附家族因子的成员,主要表达于单核细胞、内皮细胞及循环的血小板中,具有活化血小板、启动凝血反应,抑制凝血酶释放,从而抑制血栓形成的作用^[9]。另有研究表明, PECAM-1 与炎症反应、免疫功能及血管内皮功能紊乱具有密切联系^[10]。然而, EPCR、PECAM-1 二者在脑出血患者中的研

究较少,因此本研究通过检测脑出血患者脑组织中 EPCR、PECAM-1 水平,分析其与疾病严重程度的关系,讨论其临床表达意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 3 月至 2020 年 8 月在驻马店市中心医院就诊的脑出血患者 100 例,其中男 60 例,女 40 例;年龄 42~76 岁,平均 (60.2 ± 15.3) 岁;平均病程 (12.8 ± 2.6) h。纳入标准:①均符合《中国脑出血诊治指南 (2019)》^[11]中相关诊断标准;②病程小于 24 h;③患者首次脑出血且经过颅脑 CT 扫描,认证存在出血灶;④患者临床资料完整。排除标准:①合并心肺肾等器官严重损伤者;②合并凝血血功能障碍和近期使用激素、免疫抑制剂治疗患者;本研究患者及其家属均签署知情同意书,且获得本院伦理委员会批准通过。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 对 100 例脑出血患者脑组织标本进行采集,选取清除血肿手术过程中临近血肿 0.5 cm 脑组织,作为脑出血组织标本 (脑出血组, 100 例);将远隔血肿位置的脑组织作为对照组织标本 (对照组, 100 例)。

1.2.2 免疫组化染色 将收集到的标本在液氮中贮存备用,5 μm 切片,在 65℃ 下烤片 2 h 后,采用 EnVision 法检测脑出血患者脑组织中 EPCR、PECAM-1 表达情况。依次进行下列步骤:0.01 mol/L PBS 缓冲液清洗切片多次后,室温晾干,滴加 0.25% 牛血清白蛋白后,并在室温孵育

40 min; 加入 EPCR、PECAM-1 抗体 (稀释比为 1:100), 4℃ 条件下孵育 20 h, 再加入生物素标记的二抗于 37℃ 下孵育 20 min, PBS 缓冲液冲洗后, DAB 显色试剂盒显色 10 min, 苏木素染色 1 min 后 PBS 冲洗, 梯度乙醇脱水; 采用二甲苯透明、中性树胶进行封固; 最后置于显微镜下选取 5 个视野记录阳性细胞数并采集图像资料。

对各张染色切片结果进行评分, 并取平均值。评分标准依据细胞染色强度和阳性细胞所占百分比进行。其中细胞不着色为 0 分, 着淡黄色为 1 分, 着黄色或黄棕色为 2 分, 着棕褐色或深褐色为 3 分; 阳性细胞 <5% 为 0 分, 阳性细胞在 5%~26% 间为 1 分, 阳性细胞在 26%~50% 间为 2 分, 阳性细胞 >50% 为 3 分。将细胞染色强度和阳性细胞所占百分比记分结果相乘, 为最终得分, 得分 ≥ 2 分为阳性表达 (+), 得分 < 2 分为阴性表达 (-)。

1.3 分组标准

根据美国国立卫生研究院卒中量表 (National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS) 评分评估脑出血患者的病情严重程度, 将 100 例脑出血患者分为轻型组 40 例、中型组 40 例、重型组 20 例 (其中轻型为患者肌力 III 级以上且意识状态清楚, NIHSS 评分为 1~4 分; 中型为患者肌力 II~III 级且

存在意识中等程度障碍, NIHSS 评分为 5~15 分; 重型为患者肌力 0~I 级且存在意识重度障碍, NIHSS 评分 >15 分)。根据出血量的不同, 将 100 例脑出血患者分为少量组 35 例、中量组 44 例、大量组 21 例 (其中少量: 脑出血 <15 mL; 中量: 脑出血 15~30 mL; 大量: 脑出血 >30 mL)。比较各组患者脑出血组织 EPCR、PECAM-1 表达。

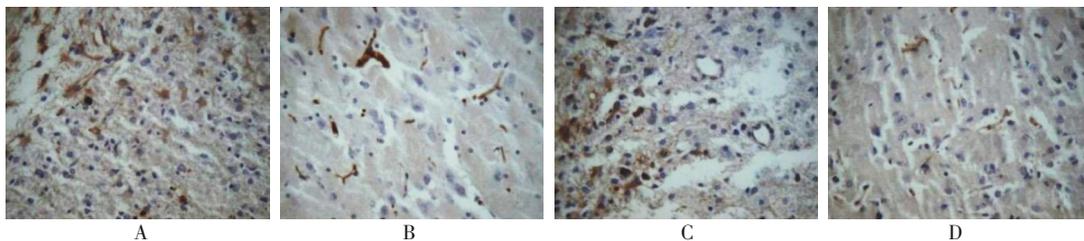
1.4 统计学方法

利用 SPSS 25.0 统计学软件对数据进行分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 三组数据比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验; 计数资料以百分率 (%) 表示, 采用 χ^2 检验; Spearman 法分析脑出血组织中 EPCR、PECAM-1 水平与患者 NIHSS 评分的相关性; Logistic 回归分析脑出血发生的影响因素。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCR、PECAM-1 在脑出血组织中表达的免疫组化结果

免疫组化结果显示, EPCR 在脑出血组的阳性表达率高于对照组, 而 PECAM-1 在脑出血组的阳性表达率低于对照组, 差异均有统计学意义 (P < 0.05)。见图 1、表 1。



A: 脑出血组织中 EPCR 阳性表达; B: 脑出血组织中 EPCR 阴性表达; C: 脑出血组织中 PECAM-1 阳性表达; D: 脑出血组织中 PECAM-1 阴性表达。

图 1 EPCR、PECAM-1 在脑出血组织中表达的免疫组化结果 (×400)

表 1 EPCR、PECAM-1 在脑出血组织和对照组织中的表达情况 [n=100, n(%)]

组别	EPCR		PECAM-1	
	阳性(+)	阴性(-)	阳性(+)	阴性(-)
脑出血组	68(68.00)	32(32.00)	31(31.00)	69(69.00)
对照组	10(10.00)	90(90.00)	88(88.00)	12(12.00)
χ^2	70.702		67.414	
P	<0.001		<0.001	

2.2 不同出血量患者脑出血组织中 EPCR、PECAM-1 阳性表达率

大量组脑出血组织中 EPCR 阳性表达率高于中量组和少量组, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 中量组脑出血组织中 EPCR 阳性表达率高于少量组, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 而大量组脑出血组织中 PECAM-1 阳性表达率低于中量组和少量组, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 中量组脑出血组织中 PECAM-1 阳性表达率低于少量组, 差异有

统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 EPCR、PECAM-1 在不同出血量患者脑出血组织中的表达情况 [n(%)]

组别	n	EPCR		PECAM-1	
		阳性(+)	阴性(-)	阳性(+)	阴性(-)
少量组	35	17(48.57)	18(51.43)	20(57.14)	15(42.86)
中量组	44	31(70.45) ¹⁾	13(29.55)	10(31.82) ¹⁾	34(68.18)
大量组	21	20(95.24) ¹⁾²⁾	1(4.76)	1(4.76) ¹⁾²⁾	20(95.24)
χ^2		70.702		67.414	
P		<0.001		<0.001	

注: 1) 与少量组比较, $P<0.05$; 2) 与中量组比较, $P<0.05$ 。

2.3 不同病情严重程度患者脑出血组织中 EPCR、PECAM-1 阳性表达率

重型组脑出血组织中 EPCR 阳性表达率高于轻型组和中型组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 中型组脑出血组织中 EPCR 阳性表达率高于轻型组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 而重型组脑出血组织中 PECAM-1 阳性表达率低于轻型组和中型组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 中型组脑出血组织中 PECAM-1 阳性表达率低于轻型组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 EPCR、PECAM-1 在不同病情严重程度患者脑出血组织中的表达情况 [n(%)]

组别	n	EPCR		PECAM-1	
		阳性(+)	阴性(-)	阳性(+)	阴性(-)
轻型组	40	18(45.00)	22(55.00)	21(52.50)	19(47.50)
中型组	40	30(75.00) ¹⁾	10(25.00)	9(22.50) ¹⁾	31(77.50)
重型组	20	20(100.00) ¹⁾²⁾	0(0.00)	1(5.00) ¹⁾²⁾	19(95.00)
χ^2		20.037		16.316	
P		<0.001		<0.001	

注: 1) 与轻型组比较, $P<0.05$; 2) 与中型组比较, $P<0.05$ 。

2.4 EPCR、PECAM-1 阳性表达率与患者 NIHSS 评分的相关性

Spearman 结果显示, 脑出血组织 EPCR 阳性表达率与患者 NIHSS 评分呈正相关 ($r=0.416$, $P<0.001$), 脑出血组织 PECAM-1 阳性表达率与患者 NIHSS 评分呈负相关 ($r=-0.337$, $P<0.001$)。

2.5 影响脑出血发生的 Logistic 回归分析

以是否发生脑出血为因变量 (未发生=0、发生=1), 将赋值后的自变量 EPCR、PECAM-1 纳入 Logistic 回归分析, 结果显示 EPCR 是影响脑出血发生的危险因素, 而 PECAM-1 是影响脑出血发生的保护因素 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 Logistic 回归分析脑出血发生的影响因素

自变量	B	S.E.	Wald χ^2	P	OR	95%CI
EPCR	1.347	0.392	11.804	<0.001	3.845	1.783~8.290
PECAM-1	-0.601	0.129	21.740	<0.001	0.548	0.426~0.706

3 讨论

脑出血发生是由于脑血管病变, 导致血流流入患者的脑实质、脑室、蛛网膜下腔中, 从而破坏脑实质的结构, 增加局部压力, 导致脑实质水肿。水肿中的物质含有一定的毒性作用, 会损伤周边脑组织, 破坏血脑屏障, 严重影响患者预后。临床采用药物或手术治疗能有效地降低患者的死亡率, 改善患者预后^[12]。因此, 探究脑出血的发病机制成为广大医学者研究难点和重点。

EPCR 可分为两种类型: 膜结合型 EPCR (membrane-bound EPCR, mEPCR) 和可溶性 EPCR (soluble EPCR, sEPCR), 其中 mEPCR 主要表达于内皮细胞表面, 具有抗炎及抗凝作用。mEPCR 一定条件下被降解后进入血液, 形成 sEPCR^[13]。KESHAVA 等^[14] 在小鼠试验研究中得出, EPCR 过表达导致肺功能损害和胸膜重构, 进而产生肺部纤维化。袁叶双等^[15] 在蛋白 C 途径抗炎作用中论述道, EPCR 异常表达会导致蛋白 C 抗凝血活性发生改变。然而 EPCR 在脑出血中的研究较少, 因此本研究分析了脑出血患者脑组织 EPCR 水平与病情发展的关系, 结果显示, 脑出血组 EPCR 阳性表达率显著高于对照组, 且大量组、重型组脑出血组织中 EPCR 阳性表达率最高, 说明 EPCR 水平异常升高可能与脑出血发病有关, 且随病情加重而上升, 提示 EPCR 可能作为指示脑出血患者病情严重程度的潜在生物标志物。

PECAM-1 主要分布于粒细胞、单核细胞和血小板中, 正常生理状态下高表达于内皮细胞, 具有活化 T 细胞、吞噬和杀伤细胞的作用^[9]。同时, PECAM-1 还参与介导信号转导和多种炎症反应, 在防止组织水肿和维持血管通透性中也发挥着重要的作用^[16]。叶贯超等^[17] 在研究中得出, PECAM-1 在肺腺癌中表达水平降低, 可作为该病的一种独立分子标志物, 且与标记基因明显相关。张雷等^[18] 研究发现, 可溶性 PECAM-1 对炎性细胞产生损伤性作用, 增强炎性细胞迁徙, 引发肾功能的损伤。本研究结果显示, 脑出血组 PECAM-1 阳性表达率显著低于对照组, 且大量出血、重型脑出血患者 PECAM-1 表达水平最低, 表明

PECAM-1 可能参与调控脑出血发生发展进程, 且其水平随患者病情加重而下降。

Spearman 分析结果显示, EPCR 水平与 NIHSS 评分呈正相关, 表明 EPCR 有可能刺激炎性因子而导致其分泌增加, 进而引发患者病情严重程度加深; 而 PECAM-1 水平与 NIHSS 评分呈负相关, 进一步说明 PECAM-1 水平随着病情加重而减少, 但相互作用机制有待深入探讨。多因素 Logistic 回归分析结果表明, EPCR 是影响脑出血发生的危险因素, 而 PECAM-1 是影响脑出血发生的保护因素, 提示 EPCR 水平升高、PECAM-1 降低均可能会使脑出血发生风险升高, 及时检测脑组织 EPCR、PECAM-1 水平有利于判定脑出血患者病情发展情况。

综上所述, 脑出血患者脑组织 EPCR 水平随病情加重而升高, PECAM-1 水平随病情加重而降低, 二者可能相互作用促进脑出血的发生发展。本研究尚存在一些不足之处, 后续应进一步加大研究样本量, 为临床脑出血诊治提供更可靠指标。

参 考 文 献

- [1] LU KY, YUEN KF, LUO JY, et al. Therapeutic effects of acupuncture on sensory ataxia after a cerebral hemorrhage: a case report[J]. *Medicine*, 2020, 99(29): e21124.
- [2] 王红娟, 宋慧群, 张姗姗, 等. 西比灵联合 NGF 对脑出血患者的 NIHSS、ADL 评分及血肿体积改善效果[J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(17): 3320-3324.
- [3] 张海垠, 黄艳丽. hs-CRP、NSE 在急性脑出血患者诊治过程中的应用价值[J]. *中国实验诊断学*, 2019, 23(7): 1119-1121.
- [4] POLLINS AC, BOYER RB, NUSSENBAUM M, et al. Comparing processed nerve allografts and assessing their capacity to retain and release nerve growth factor[J]. *Ann Plast Surg*, 2018, 81(2): 198-202.
- [5] ZHANG CY, REN XM, LI HB, et al. Simvastatin alleviates inflammation and oxidative stress in rats with cerebral hemorrhage through Nrf2-ARE signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(14): 6321-6329.
- [6] 程礼敏. 蛋白 C 抗凝系统功能及分子缺陷的研究进展[J]. *科技视界*, 2021(24): 72-75.
- [7] 王夕妍, 杨仁池. 内皮细胞蛋白 C 受体在造血干细胞中作用的研究进展[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2019, 42(3): 259-263.
- [8] 刘汇洋, 刘轩琦, 白静茹, 等. 内皮蛋白 C 受体对类风湿关节炎疾病进展的影响[J]. *包头医学院学报*, 2021, 37(2): 39-45.
- [9] 张丽, 赵莉娜, 彭静, 等. 子痫前期孕妇血清白细胞介素 17、和肽素及血小板内皮细胞黏附分子 1 水平检测及临床意义[J]. *陕西医学杂志*, 2020, 49(11): 1515-1518, 1526.
- [10] 刘前, 邓倩, 陈凯. 活化白细胞黏附分子与血小板内皮细胞黏附分子-1 在 2 型糖尿病并发急性脑梗死患者中的变化及意义[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2021, 24(7): 578-584.
- [11] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国脑出血诊治指南(2019)[J]. *中华神经科杂志*, 2019, 52(12): 994-1005.
- [12] 李燕, 熊志伟. Dickkopf-1、LINGO-1、caveolin-1 在脑出血中的表达水平变化及其与病情严重程度的关系[J]. *卒中与神经疾病*, 2020, 27(3): 332-335, 340.
- [13] 钱骏, 黄中伟, 徐建如, 等. sEPCR 在脓毒症患者中的表达及临床意义[J]. *中国医药导报*, 2021, 18(10): 88-91.
- [14] KESHAVA S, MAGISETTY J, TUCKER TA, et al. Endothelial cell protein C receptor deficiency attenuates *Streptococcus pneumoniae*-induced pleural fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 64(4): 477-491.
- [15] 袁叶双, 蒋科, 杨小红. 蛋白 C 途径的抗炎及其在自身免疫性疾病中的作用[J]. *医学综述*, 2019, 25(22): 4379-4384.
- [16] 刘亚梅, 孙佳, 宋学薇, 等. 侵入性胎盘组织中 PECAM-1 的表达以及与疾病的相关性研究[J]. *标记免疫分析与临床*, 2020, 27(6): 1026-1032.
- [17] 叶贯超, 刘亚飞, 黄岚, 等. 血小板和内皮细胞黏附分子 1 表达水平和免疫浸润与肺腺癌预后的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(8): 1527-1530.
- [18] 张雷, 朱梅生, 冯超亮, 等. 血清瘦素、网膜素-1 及血小板内皮细胞黏附分子在原发性高血压早期肾损害患者中的表达及其意义[J]. *中国当代医药*, 2020, 27(34): 46-48, 52, 封 4.

(张咏 编辑)