

大鼠脑缺血 - 再灌注损伤时中性粒细胞趋化因子的基因表达*

刘 静, 蔡定芳, 沈思钰, 赵 刚, 梁 辉

(复旦大学附属华山医院中西医结合研究所, 上海 200040)

[摘要] 目的 探讨中性粒细胞趋化因子(CINC)在脑缺血-再灌注损伤病理生理过程中的重要作用。方法: 线栓法制备大鼠短暂性大脑中动脉栓塞(MCAO)模型, RT-PCR检测缺血再灌区脑组织CINC mRNA的表达, 并同时测定髓过氧化物酶(MPO)活性。结果 缺血90 min再灌注6 h至24 h缺血区脑组织CINC mRNA表达相较假手术组明显上调(分别为 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), 并呈时相变化, 12 h达高峰。MPO活性在再灌注6 h时无明显变化, 12 h-24 h呈明显的上升趋势($P < 0.01$)。结论: 短暂性脑缺血时CINC mRNA表达上调, 其时程早于中性粒细胞的浸润。提示CINC在脑缺血-再灌注损伤的炎症机制中发挥重要作用。

[关键词] 局部缺血; 再灌注损伤; 中性白细胞; 趋化因子; 脑; 大鼠; 髓过氧化物酶

[KEY WORDS] Ischemia; Reperfusion injury; Neutrophils; Chemotactic factors; Brain; Rats; Myeloperoxidase

[中图分类号] R743.3 **[文献标识码]** A

大量证据表明炎症反应介导了脑缺血-再灌注损伤, 而中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)的聚集、浸润是炎症反应发生的关键步骤^[1]。中性粒细胞趋化因子(cytokine-induced neutrophil chemoattractant, CINC)是一种特异性趋化PMN的细胞因子, 其浓度梯度构成了PMN穿越血管内皮的基础, 因此CINC有望成为抗炎治疗的一个突破点。本实验利用短暂性大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 检测CINC mRNA表达及髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性的变化, 以探讨CINC在缺血-再灌注损伤中的作用。

材 料 和 方 法

1 实验动物

健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠32只, 体重250-300 g, 由上海中国科学院实验动物饲养中心提供。随机分为假手术组、脑缺血再灌注6 h、12 h及24 h组, 每组8只。

2 主要试剂

Trizo(美国Gibco BRL公司), 逆转录试剂盒(美国Promega公司), 焦炭酸二异酯、dNTPs、Taq酶(上海生工生物工程公司), PCR Marker(华美生物工程公司), CINC及GAPDH引物由复旦大学医学院生化教研室欧周罗教授赠送; MPO测试盒(南京建成生物工程研究所)。

3 大鼠短暂性MCAO模型的复制

采用Zea Longa线栓法造成大鼠局灶性脑缺血再灌注模型: 10%水合氯醛(0.3 g/kg, ip)麻醉成功后, 正中切开颈部皮肤, 暴露左侧颈总动脉和颈外动脉, 电凝颈外动脉分支-枕动脉和甲状腺上动脉, 结扎颈外动脉的两端, 从远心端切

口插入(4-0)单股尼龙线, 经同侧颈内动脉至大脑中动脉起始处, 平均插线长度为(2.0±0.2) cm, 阻断90 min拔线再灌。手术中维持大鼠体温(37-37.5)°C。假手术组不插尼龙线, 其余同上。

4 缺血脑区CINC mRNA的表达

4.1 总RNA抽提 按Trizol液的说明书进行提取。

4.2 cDNA合成 利用美国Promega公司逆转录试剂盒进行逆转录, 总反应体系20 μL, 42°C反应50 min, 95°C 5 min, 4°C 5 min, cDNA产物置于-20°C保存。

4.3 PCR扩增 CINC引物5'-AAC AGA GCA CCA TGG TCT-3', 5'-GAC GCC ATC GGT GCA ATC TA-3'(335 bp); GAPDH引物5'-CTC TAC CCA CGG CAA GTT CAA-3', 5'-GGG ATG ACC TTG CCC ACA GC-3'(515 bp), 反应物终体积为25 μL, 95°C变性5 min, 反应条件: 94°C变性15 s, 54°C退火45 s, 72°C延伸45 s, CINC扩增35个循环, GAPDH扩增31个循环, 72°C延伸7 min, 产物-20°C保存。

4.4 PCR产物的分析 取产物10 μL经1.2%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果, 并用图像仪分析拍照。通过GAPDH校正半定量, 计算CINC mRNA表达的相对值。

5 MPO活性检测

于各时点采用生理盐水心内灌注, 断头截取缺血侧脑组织, 称重后制成10%的组织匀浆, 按测试盒说明书操作。1个酶活力单位定义为每克组织在37°C的反应体系中H₂O₂被分解1 μmol。

6 统计学处理

实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间均数比较采用独立样本t检验。

结 果

1 CINC mRNA的表达

假手术组脑组织CINC mRNA有轻度的表达, 缺血再灌注

[收稿日期] 2001-11-14 [修回日期] 2002-01-07

*[基金项目] 上海市卫生局“百人计划”资助项目(No. 97BR016)

6 h 至 24 h 缺血区 CINC mRNA 表达明显高于假手术组(分别为 $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$) ,再灌注 12 h 达高峰,见表 1 和图 1。

表 1 各时点 CINC mRNA 的表达和 MPO 活性

Tab 1 Changes of CINC mRNA expression and MPO activity in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Time after reperfusion (h)	CINC mRNA	MPO activity(U/g)
Sham	0.213 ± 0.070	0.037 ± 0.010
6	0.376 ± 0.136*	0.045 ± 0.013
12	0.708 ± 0.216**	0.211 ± 0.043**
24	0.563 ± 0.151**	0.412 ± 0.067**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sham.

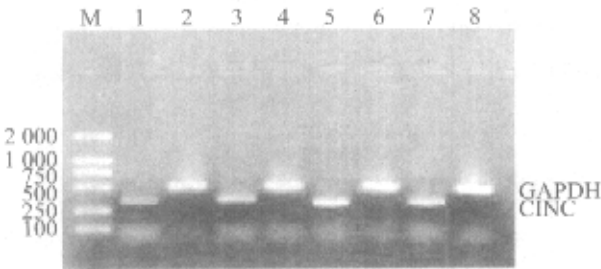


Fig 1 1.2% agarose gel of PCR products of CINC and GAPDH. Lane 1, 2: sham; Lane 3, 4: 6 h after reperfusion; Lane 5, 6: 12 h after reperfusion; Lane 7, 8: 24 h after reperfusion.

图 1 CINC 及内参照 GAPDH PCR 扩增结果

2 CINC mRNA 表达与 MPO 活性时相变化的关系(见表 1)

CINC mRNA 表达的上调早于 MPO 活性的升高,但表达时程短暂,再灌注 24 h 时即开始下降,而此时 MPO 活性正处于明显的上升趋势。

讨 论

急性缺血性卒中病人常表现白细胞增多,体温上升等炎症反应的指征。动物实验进一步证实,PMN 粘附、浸润入脑实质是造成缺血-再灌注损伤的重要原因。Jiang 等^[2]报道大鼠 MCAO 后 4 h 给予重组中性粒细胞抑制因子(recombinant neutrophil inhibitory factor, rNIF)可减小梗塞体积、改善神经功

能缺损评分。PMN 介导再灌注损伤的机制包括阻塞微血管,造成继发性低灌注;释放氧自由基、缩血管物质和水解酶,增加血管通透性引发水肿等^[3]。

CINC 是大鼠中人类 IL-8 的对应物,与 IL-8 结构和功能相近。CINC 不仅能特异性吸收 PMN,介导其跨越血管内皮,还能激活 PMN 的呼吸爆发和脱颗粒,从而诱导细胞膜表面表达粘附分子 CD11b/CD18,使 PMN 结合内皮细胞的能力增加(3-10)倍。Yamasaki 等^[4]报道一定程度的脑细胞损伤和再灌注是诱导 CINC 生成增加的前提,并且认为缺血再灌脑区 CINC 的短暂性表达具有损害作用,抗 CINC 抗体能明显减轻脑水肿、缩小梗塞体积。本实验观察到大鼠 MCAO 90 min 再灌注 6 h-24 h CINC mRNA 表达明显上调。MPO 是 PMN 和单核细胞所特有的细胞内酶,而单核细胞中此酶的活性较低。已经证实 PMN 单克隆抗体 RP3 能完全阻断缺血脑区 MPO 活性的增加,因此,以 MPO 活性反映组织内 PMN 积聚并作为炎性细胞浸润的定量指标是很有价值的^[5]。本实验表明 CINC mRNA 的表达时程明显早于 MPO 活性,提示 CINC 可能通过介导 PMN 浸润而参与了脑缺血-再灌注损伤。

[参 考 文 献]

[1] DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke - Utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy[J]. Neurology, 1998, 51(Suppl 3): S62 - S68.

[2] Jiang N, Chopp M, Chahwala S. Neutrophil inhibitory factor treatment of focal cerebral ischemia in the rat[J]. Brain Res, 1998, 788(1): 25 - 34.

[3] Pantoni L, Sarti C, Inzitari D. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia - experimental bases and therapeutic perspectives[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18(4): 503 - 513.

[4] Yamasaki Y, Matsuo Y, Zagorski J, et al. New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rat[J]. Brain Res, 1997, 759(1): 103 - 111.

[5] Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, et al. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat - effects of neutrophil depletion[J]. Stroke, 1994, 25(7): 1496 - 1475.

大鼠脑缺血-再灌注损伤时中性粒细胞趋化因子的基因表达

作者: 刘静, 蔡定芳, 沈思钰, 赵刚, 梁辉
作者单位: 复旦大学附属华山医院中西医结合研究所, 上海, 200040
刊名: 中国病理生理杂志 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE JOURNAL OF PATHOPHYSIOLOGY
年, 卷(期): 2002, 18(4)
被引用次数: 8次

参考文献(5条)

1. DeGraba TJ [The role of inflammation after acute stroke-Utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy](#) 1998(Suppl 3)
2. Jiang N, Chopp M, Chahwala S [Neutrophil inhibitory factor treatment of focal cerebral ischemia in the rat](#) 1998(01)
3. Pantoni L, Sarti C, Inzitari D [Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia-experimental bases and therapeutic perspectives](#) 1998(04)
4. Yamasaki Y, Matsuo Y, Zagorski J [New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rats](#) 1997(01)
5. MATSUO Y, Onodera H, Shiga Y [Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat-effects of neutrophil depletion](#) 1994(07)

相似文献(10条)

1. 期刊论文 张立克, 王雯, 陈瑞芬, 王民, 丁鼎武, ZHANG Li-Ke, WANG Wen, CHEN Rui-Fen, WANG Min, DING Ding-Wu [细胞色素p450对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的影响](#) -中国病理生理杂志1999, 15(6)
目的:通过观察细胞色素p450抑制剂对大鼠在体心肌缺血/再灌注损伤的影响,了解细胞色素p450与心肌缺血/再灌注损伤的关系,并初步分析作用机制。方法:观察给予细胞色素p450抑制剂或11, 12-EET后,大鼠在体心肌缺血/再灌注室性心律失常、心肌梗塞范围及超微结构的变化,及TEA与glibenclamide对EETs作用的影响。结果:细胞色素p450抑制剂clotrimazole(0.9 mmol/L)和SKF525A(0.54 mmol/L)减轻、而外源性11, 12-EET加重缺血/再灌注心律失常、心肌梗塞范围及心肌超微结构病变;TEA与glibenclamide可拮抗11, 12-EET的作用。结论:细胞色素p450参与了心肌缺血/再灌注损伤;其作用与EETs释放并开通钙敏感性及ATP敏感性钾通道有关。
2. 期刊论文 赵红川, 耿小平, 朱立新 [前列腺素E1在肝脏缺血-再灌注损伤和肝切除中的作用](#) -安徽医科大学学报2001, 36(5)
目的:探讨肝门阻断和肝切除时前列腺素E1(PGE1)在肝脏缺血-再灌注损伤和肝脏再生中的作用。方法:24只健康大耳白兔随机均分为2组,所有动物均在第一肝门阻断40 min后行肝左外叶切除,阻断45 min后开放第一肝门,对照组缺血前10 min和缺血后120 min内经外周耳缘静脉持续滴入NS 0.5 ml*kg⁻¹*min⁻¹;PGE1组缺血前10 min和缺血后120 min内经外周耳缘静脉持续滴入PGE1 0.5 μg*kg⁻¹*min⁻¹。缺血前后测定两组动物丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、血清丙二醛(MDA)、血清超氧化物歧化酶(SOD)及肝细胞增殖细胞核抗原(PCNA)的表达;计算术后体重变化和动物3天手术死亡率。结果:与对照组相比,缺血后PGE1组肝功能受损明显减轻;血清MDA含量降低;血清SOD升高(P<0.05)。PCNA表达差异无显著性。PGE1组手术前后体重差异无显著性,术后3天体重与对照组比较有升高(P<0.05)。PGE1组术后3天手术死亡率减低(P<0.05)。结论:PGE1对肝脏缺血-再灌注损伤有明显的保护作用,其机制可能与通过活化腺苷酸环化酶-环磷酸腺苷(AC-cAMP)途径相关。围手术期应用PGE1无明显地促进肝细胞增殖的作用。
3. 期刊论文 汤礼军, 田伏洲, 王雨, 李小军, 黄大熔, 胡建中 [兔肝冷保存后复温缺血-再灌注损伤及其相关机制的研究](#) -中国病理生理杂志2001, 17(2)
目的:探讨原位肝移植过程中兔肝冷保存后复温缺血-再灌注损伤的意义及其相关机制。方法:采用兔肝冷保存-再灌注损伤模型,观察兔肝冷保存后复温缺血对其再灌注后肝功能的影响及在此过程中肝组织内丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化。结果:冷保存6h后又分别经历0、15、30及60min复温缺血的4组供肝于再灌注2h时,复温缺血时间越长者,其受体兔血液中AST、ALT或AKP值越大;且各组彼此间均存在非常显著差异(P<0.01)。此外,各组供肝在复温缺血末及再灌注2h时,组织中SOD活性或MDA含量彼此间也均有非常显著差异(P<0.01);且复温缺血时间越长的供肝组织中SOD活性越低,而MDA含量则越高。结论:兔肝冷保存后即使经历一短暂的复温缺血也会给其再灌注后的肝功能带来显著损伤,且氧自由基及其引发的脂质过氧化反应参与了兔肝复温缺血-再灌注损伤过程;提示兔肝冷保存后复温缺血可能是导致肝移植术后原发性供肝功能损伤的重要原因。
4. 期刊论文 罗万俊, 陈胜喜, 胡佳心, 蒋海河, LUO Wan-Jun, CHENG Sheng-Xi, HU Jia-Xin, JIANG Hai-He [缺血预处理对肺再灌注损伤脂质过氧化的影响](#) -中国病理生理杂志1999, 15(9)
目的:观察缺血预处理对在体兔肺常温缺血再灌注损伤脂质过氧化的影响。方法:采用阻断左肺门的肺缺血再灌注损伤模型,硫代巴比妥酸法及DTNB直接法测肺组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSHpx)及肺组织光镜观察。结果:缺血再灌注组左肺MDA较假手术组和缺血组为高,而SOD和GSHpx活性较低(P<0.01),肺组织损伤较重。与缺血再灌注组比较,缺血预处理+缺血再灌注组有较低的MDA含量和较高的SOD与GSHpx活性(P<0.05),肺损伤亦较轻。结论:缺血预处理可减轻兔肺常温缺血再灌注诱导的脂质过氧化反应。
5. 期刊论文 蔡琪, 李晓玫, 王海燕, Cai Qi, LI Xiao-mei, WANG Hai-yan [缺血/再灌注损伤时丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路的变化](#) -中国病理生理杂志2000, 16(12)
Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including extracellular signal-regulated kinases (ERKs), c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) and p38 MAPK, play an important role in transducing environmental stimuli to the transcriptional machinery in the nucleus in mammalian cells by virtue of their ability to phosphorylate and regulate the activity of various transcription factors. It was recently

found that the changes in activity of MAPKs occurred during ischemia/reperfusion, but the biological significance of the changes was still controversial.

6. 期刊论文 [郑直, 张勇刚, 符民桂, 夏春芳, 唐朝枢, 刘乃奎, 巴曲酶对狗心脏缺血/再灌注损伤中血栓素A2水平的影响](#) - [中国病理生理杂志](#)2001, 17 (1)

目的: 研究巴曲酶(BAT)对狗心脏缺血/再灌注(I/R)损伤过程中血栓素A₂(TXA₂)水平的影响。方法: 结扎狗左冠状动脉前降支30min, 恢复血流90min, 造成I/R模型, 于缺血前或缺血后15min静注BAT (1U/kg), 测定血浆、心肌TXB₂浓度以及血浆磷酸肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)活性, 并检测心脏功能, 观察病理学变化。结果: I/R组心肌组织及血浆TXB₂水平明显升高, 血浆CK及LDH活性明显降低, 心功能受损。病理学发现心肌纤维水肿、排列紊乱、线粒体水肿、嵴明显断裂、细胞核皱缩。给予BAT后, 动物死亡率、再灌期血浆及心肌TXB₂水平、血浆CK及LDH活性以及LVEDP明显低于I/R组, 而±dp/dtmax明显高于I/R组, 病理学检查无明显损伤。结论: BAT能够降低血浆及心肌TXA₂水平减轻心肌组织I/R损伤。

7. 期刊论文 [梁直厚, 孙圣刚, 梅元武, LIANG Zhihou, SUN Shenggang, MEI Yuanwu 大鼠脑局部缺血后高血糖对再灌注损伤的影响](#) - [脑与神经疾病杂志](#)2001, 9 (3)

目的: 探讨脑缺血后轻度高血糖对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响。方法: 用线栓法建立脑缺血模型, 随机分为①10%葡萄糖溶液组。②复方氯化钠溶液组。观察神经功能缺损症状、应用图象分析仪测量梗塞面积、光镜观察脑组织病理变化。结果: 10%葡萄糖溶液组与复方氯化钠溶液组的梗塞面积、病理变化、神经功能缺损恢复均无显著差异。结论: 缺血后轻度高血糖对缺血再灌注损伤无明显影响。

8. 期刊论文 [夏晓红, 申玉学, 石纪才, 于占久, 何瑞荣, XIA Xiao-Hong, SHEN Yu-Xue, SHI Ji-Cai, YU Zhan-Jiu, HE Rui-Rong 内皮素抗体在大鼠肾缺血/再灌注损伤中的作用](#) - [中国病理生理杂志](#)1999, 15 (5)

目的和方法: 为探讨内皮素在肾缺血/再灌注损伤中的发病学意义, 本实验在大鼠肾缺血/再灌注损伤模型上, 观察了内皮素抗体对肾缺血/再灌注损伤的作用。结果: 肾缺血/再灌注损伤大鼠, 血清尿素氮(SUN)、肌酐(Scr)含量及血浆内皮素(PET)水平显著升高; 脂质过氧化物丙二醛(MDA)产生增多; 肾小管上皮细胞明显损伤, 应用内皮素单克隆抗体能显著降低PET水平和MDA含量, 减轻肾小管上皮细胞损伤, 改善肾功能。结论: 内皮素是参与肾缺血/再灌注损伤发病的重要因素之一, 阻断ET的生物学作用是防治肾缺血/再灌注损伤的有效途径。

9. 期刊论文 [林科灿, 刘景丰 肝脏热缺血再灌注损伤的病理生理学机制](#) - [福建医科大学学报](#)2005, 39 (z1)

肝脏缺血再灌注损伤分为热缺血再灌注损伤和冷保存再灌注损伤。热缺血再灌注损伤见于肝叶切除、肝移植、低血容量性休克、严重肝外伤、静脉闭塞性疾病、肝移植血栓形成(Budd-Chiari综合征)等。肝移植还涉及冷保存再灌注损伤。

10. 学位论文 [韩述岭 抗肿瘤坏死因子-α单克隆抗体减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤实验研究](#) 2003

目的: 研究抗肿瘤坏死因子-α单克隆抗体(Anti-TNF-α mAb)预处理对肾脏缺血-再灌注损伤(IRI)的预防和保护作用, 为临床上移植器官缺血-再灌注损伤(IRI)及由此导致的急性肾功能衰竭等提供新的预防和治疗方案。结论: 抗TNF-α单克隆抗体(Anti-TNF-α mAb)能有效减轻肾脏缺血再灌注损伤(IRI), 对肾脏缺血-再灌注损伤(IRI)有明显的预防和保护作用, 该研究为临床上移植肾脏缺血-再灌注损伤及由此导致的急性肾功能衰竭提供新的预防和治疗思路。

引证文献(8条)

1. [何志承, 丁力, 邱磊 趋化因子对氧化还原代谢的影响及在疾病中的作用](#) [期刊论文] - [药学实践杂志](#) 2007 (5)
2. [李新友, 屠伟峰, 利多卡因对中性粒细胞介导性脏器损伤的保护作用](#) [期刊论文] - [实用医学杂志](#) 2006 (7)
3. [冯旭东 新清开灵干预大鼠脑出血后炎症反应抑制继发性脑损伤的机制研究](#) [学位论文] 硕士 2006
4. [彭军, 张连元, 门秀丽, 董淑云, 胡永奇, 李宏杰, 赵利军, 赵琪 大鼠肢体缺血再灌注过程中血及骨骼肌的相应指标变化](#) [期刊论文] - [中国病理生理杂志](#) 2005 (7)
5. [韩旭 复方当归注射液对脑缺血再灌注后炎症反应的保护作用及其机制的实验研究](#) [学位论文] 硕士 2005
6. [韩英 IL-8单克隆抗体对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其可能机制](#) [学位论文] 硕士 2005
7. [刘玉珍 针刺对大鼠局灶性脑缺血再灌注后白细胞浸润和相关粘附分子mRNA和蛋白表达影响的实验研究](#) [学位论文] 博士 2005
8. [孙文燕 异亚丙基莽草酸抗大鼠脑缺血再灌注损伤的炎症机制研究](#) [学位论文] 博士 2005

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgblslzz200204024.aspx
授权使用: 沈阳分公司(lijie), 授权号: 9032ffac-a6e9-47d9-8efd-9dea01094d8f

下载时间: 2010年9月7日