

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.04.003

炎症因子在脑缺血一再灌注不同时期的基因表达*

辛 青^{1,2} 程葆华² 王 琳² 陈 京^{2△} 白 波^{2△}

(1新乡医学院基础学院,河南 新乡 453003;2济宁医学院神经生物学研究所,山东 济宁 272067)

摘 要 **目的** 探讨白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和细胞间黏附分子1(ICAM-1)在脑缺血一再灌注不同时期的基因表达。**方法** 将Wistar大鼠随机分为假手术组和脑缺血30 min再灌注6 h(IR6h)、12 h(IR12h)、24 h(IR24h)、48 h(IR48h)组。动物模型采用线栓法制备大鼠中动脉栓塞法,用RT-PCR法检测脑缺血一再灌注不同时间点IL-1 β 、TNF- α 及ICAM-1的表达。**结果** IL-1 β 、TNF- α 及ICAM-1在假手术组脑组织内低水平表达。IL-1 β mRNA的表达在脑缺血一再灌注6 h后即明显增高,12 h后表达开始减弱,24~48 h呈低水平增高。TNF- α 在脑缺血一再灌注6 h表达开始上升,24 h达到高峰,48 h后开始下降。ICAM-1脑缺血一再灌注6 h表达开始升高,24 h达到高峰,48 h后仍维持较高水平。**结论** 炎症因子参与了脑缺血一再灌注性损伤,且具有明显的时间规律。

关键词 脑缺血;炎症反应;神经损伤

中图分类号:R338 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2014)08-240-04

The gene expression of pro-inflammatory cytokines at different durations of cerebral ischemia reperfusion

XIN Qing, CHENG Bao-hua, WANG Lin, et al

(Academy of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Objective To explore the gene expression of pro-inflammatory cytokines after different durations of cerebral ischemia reperfusion. **Methods** Rats were randomly divided into five groups: sham group, 30min of cerebral ischemia after 6h, 12h, 24h and 48h groups. Transient focal ischemia/reperfusion model in male Wistar rats were induced by middle cerebral artery occlusion(MCAO) according to the intraluminal filament technique as described. The expression of pro-inflammatory cytokines including interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) were measured using RT-PCR. **Results** The gene expression of IL-1 β , TNF- α , ICAM-1 was low in sham group. The mRNA expression of IL-1 β was significantly increased and reached the peak after 6h, but began a decrease after 12h and kept the low level at 24h and 48h. The mRNA expression of TNF- α gradually increased after 6 h, and reached the highest levels at 24h, then began to decrease at 48h. The mRNA expression of ICAM-1 gradually increased following cerebral ischemia, and reached the peak at 24h and 48h. **Conclusion** Our results demonstrated that cerebral ischemia reperfusion could induce the up-regulation of IL-1 β , TNF- α and ICAM-1 in a time-dependent way.

Key words: Cerebral ischemia; Inflammation; Neural damage

脑缺血一再灌注后触发一系列炎症级联反应,促进炎性细胞的浸润及大量炎性因子的释放。炎

症反应可以引起局部血管痉挛甚至栓塞,加重脑缺血症状。浸润的炎性细胞(主要包括白细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞)产生大量炎性因子,在脑缺血一再灌注损伤中占有重要地位,常见的炎性因子包括IL-1、IL-6、TNF- α 及ICAM-1等。炎性因子可作用于血管内皮,引起血脑屏障的破坏及脑水

* [基金项目] 山东省自然科学基金项目(编号:2012GSF11806);
国家自然科学基金项目(编号:81070961)

△ [通信作者] 白波, E-mail: bbai@mail.jnmc.edu.cn

△ [共同通信作者] 陈京, E-mail: chenjnmc@163.com

肿;刺激花生四烯酸的代谢,使氧自由基产生增加,加重氧化应激损伤;诱发神经细胞凋亡的发生,加重脑损伤^[1-2]。本实验通过建立大鼠局灶性脑缺血一再灌注模型,采用 RT-PCR 法研究了脑缺血一再灌注过程中 IL-1 β 、TNF- α 、ICAM-1 的 mRNA 表达,以了解脑缺血一再灌注炎症损害的病理生理过程。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

SPF 级雄性 Wistar 大鼠,由山东鲁抗医药股份有限公司提供;TRIzol 总 RNA 提取试剂购自天根生化科技(北京)有限公司;琼脂糖购自 Biowest Gene 有限公司;PCR Mix 购自 TaKaRa 公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 健康雄性 Wistar 大鼠,体重 280~320g。随机分为假手术组、模型组,其中模型组按照再灌注时间不同分为缺血 30 min,再灌注 6h、12h、24h 及 48h 4 个亚组。

1.2.2 模型建立 根据 Longa 改良线栓法制备 Wistar 大鼠大脑中动脉栓塞模型^[3-5]。

1.2.3 RT-PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。IL-1 β 上游为 5'-aggacccaagcac-cttcttt-3',下游为 5'-agacagcagcaggcattttt-3';TNF- α 上游为 5'-tgcctcagcctcttctcatt-3',下游为 5'-gtgggt-

gaggagcacgtagt-3';ICAM-1 上游为 5'-aggatccatc-catccaca-3',下游为 5'-gccacagtctctcaagcaca-3'; β -actin 上游为 5'-ctcagttgctgaggagtccc-3',下游为 5'-attcgagagaaggaggaggct-3'。取大鼠缺血侧海马组织,利用 TRIzol 法提取 RNA,并经紫外分光光度计检测 RNA 的纯度及浓度。取 1 μ g RNA,参照 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行反转录。以 cDNA 为模板,采用 TaKaRa 公司的 PCR mix 进行 PCR 反应,总反应体系为 20 μ L。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,目的基因的表达水平通过 β -actin 进行校正,计算出 IL-1 β 、TNF- α 及 ICAM-1 mRNA 表达的相对值。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 统计分析软件进行数据的统计分析。

2 结果

2.1 脑缺血后动物行为改变

本文结果显示,手术后大鼠多在 2h 内清醒,假手术组大鼠均正常活动,未出现神经缺损症状。脑缺血一再灌注不同时间组大鼠均出现比较明显的神经缺损症状,表现为大鼠活动减少,反应迟钝,右侧 Horner 征阳性,不能完全伸展左前肢,行走时向左侧转圈,出现追尾现象,甚至向左侧倾倒(见图 1)。



图 1 脑缺血模型复制成功后出现的神经缺损症状

2.2 PCR 结果

应用 IL-1 β 、TNF- α 及 ICAM-1 特异引物,以逆转录合成的 cDNA 为模板通过 RT-PCR 方法扩增目的基因,并计算其 mRNA 相对表达量。以目的基因 mRNA 的转录水平与内参基因 β -actin mRNA 的转录水平相对变化作为判断的标准,以

此来衡量缺血再灌注不同时间炎症因子基因的变化情况。IL-1 β 、TNF- α 及 ICAM-1 在假手术组脑组织内表达较低。IL-1 β mRNA 的表达在脑缺血再灌注 6 h 后即明显增高,12 h 后有所降低,24~48 h 维持低水平增高(见图 3A,表 1)。TNF- α 在脑缺血再灌注 6 h 表达开始上升,24 h 达峰值,48

h 后开始下降(见图 3B,表 2)。ICAM-1 脑缺血再灌注 6 h 表达开始上升,24 h 达峰值,48 h 后仍维

持较高水平(见图 3C,表 3)。

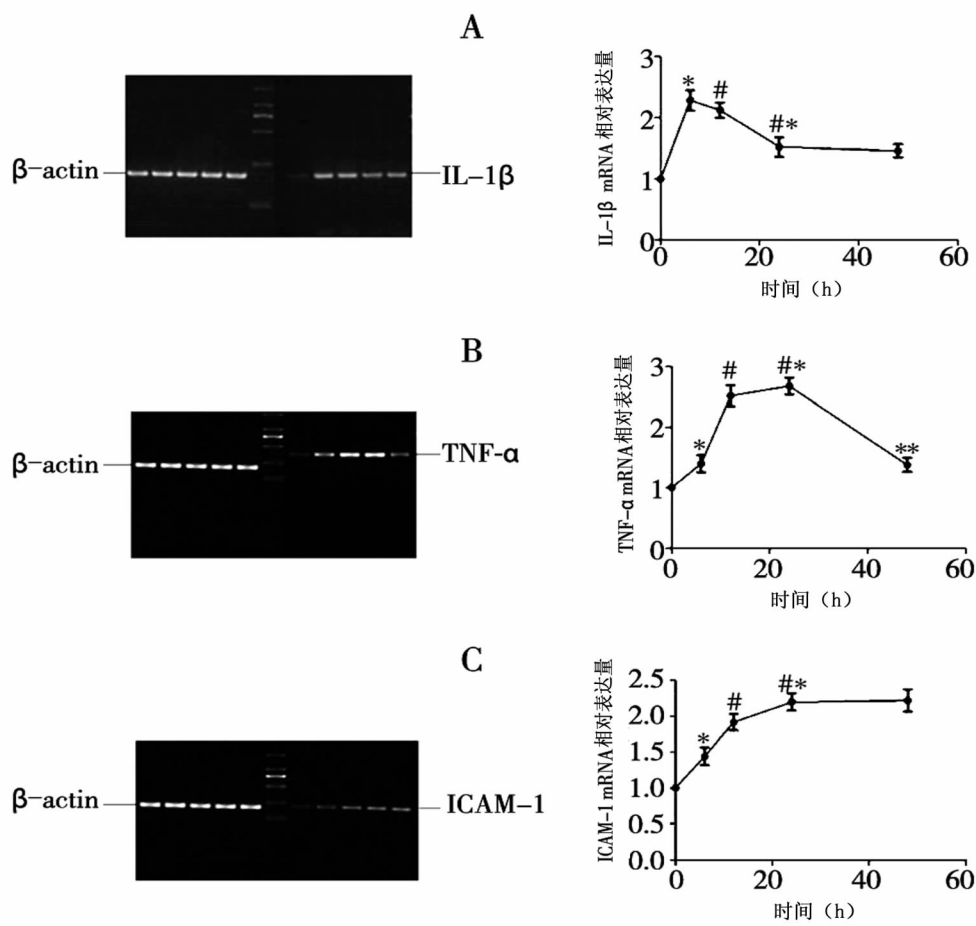


图 3 不同脑缺血再灌注时间内 IL-1β、TNF-α、ICAM-1 mRNA 的表达

表 1 大鼠局灶性脑缺血一再灌注不同时间炎性因子基因的表达

组别	n	IL-1β mRNA	TNF-α mRNA	ICAM-1 mRNA
假手术组	5	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
IR6h 组	5	2.280±0.166 *	1.400±0.141 *	1.440±0.125 *
IR12h 组	5	2.120±0.124 #	2.520±0.172 #	1.920±0.116 #
IR24h 组	5	1.520±0.156 # *	2.680±0.139 # *	2.200±0.118 # *
IR48h 组	5	1.460±0.106	1.380±0.116 * *	2.220±0.153

注: *: IR6h 组与假手术组比较, $P < 0.05$; #: IR12h 组与 IR6h 组比较, $P < 0.05$; #: IR24h 组与 IR12h 组比较, $P < 0.05$; * *: IR48h 组与 IR24h 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

脑缺血引起的脑损伤通常与运动、认知等功能相关,因此我们采用改良的 Zea-Longa 5 级评分法^[8],评估与动物模型的脑缺血相关的认知和行为

学改变。我们发现,缺血性脑损伤能够引起大鼠不同程度的神经缺损症状的出现,如不能完全伸展对侧前肢;行走时向对侧转圈,并出现追尾现象;行走时出现向对侧倾倒现象等。

脑缺血一再灌注触发的炎症反应,损害血脑屏障,加重了脑水肿及脑损伤的发生,在此病理生理过程中,炎细胞浸润及炎症因子的释放发挥着重要作用。本实验应用 RT-PCR 的方法检测了大鼠局灶性脑缺血一再灌注过程中炎症因子 IL-1β、TNF-α、ICAM-1 的表达。结果发现,脑缺血一再灌注性损伤能够引起 3 种炎症因子 mRNA 表达的不同程度增高,其中 IL-1β 在 IR6h 达峰值,IR12h 后即开始有所降低;TNF-α 的基因表达在 IR24h 达峰值,IR48h 后有所降低,ICAM-1 在 IR24h 达峰值,IR48h 后仍维持较高水平。

IL-1 β 是一种能够激活多种免疫细胞和炎症细胞的炎症因子,诱导白细胞与血管内皮细胞黏附分子的表达;促进花生四烯酸和其他炎症介质的释放;诱发白细胞聚集,促进局部炎症反应,减少脑血流,加重局部脑缺血;促使氧自由基的产生,加重神经毒性及神经细胞凋亡^[6-7]。

TNF- α 是一种典型的具有多种生物学功能的炎症因子,在缺血一再灌注性脑损伤中起关键作用:促进缺血脑组织内白细胞的活化、聚集及黏附,并进一步促进炎症介质和蛋白水解酶的释放,导致局部炎症的扩大,进一步加重脑组织的损伤;诱导血管内皮细胞激活形成促凝状态,增加缩血管物质的释放,诱导血管收缩,降低脑血流,增加缺血性脑损伤及脑卒中的危险性;诱导花生四烯酸的释放及氧自由基的产生损伤细胞膜;促使脑局部兴奋性氨基酸增多,加重兴奋性神经毒性作用;通过 Fas-FasL 介导的死亡受体途径促进神经细胞凋亡^[8]。

局部脑缺血后 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子释放增多,进而刺激血管内皮细胞 ICAM-1 的表达。ICAM-1 即可促进白细胞的黏附,又可介导白细胞跨内皮细胞迁移到炎症部位,是导致白细胞向缺血区浸润的关键因子^[9-11]。因此,脑缺血一再灌注后,IL-1 β 、TNF- α 、ICAM-1 在脑内的表达未达峰值前,及时应用选择性阻断剂,对改善缺血一再灌注脑损伤可能是有益的。有研究表明,ICAM-1 抑制剂可抑制白细胞的浸润,减轻炎症反应,减轻脑损伤。另外,抗炎治疗可以延长急性脑缺血后的 rt-PA 溶栓治疗时间窗^[12-13]。

本文结果表明,炎症因子及黏附分子介导了脑缺血一再灌注不同时期的炎症级联反应,为通过免疫学机制调控不同时期的炎症损伤程度,进而研究发现新的治疗缺血性脑血管病的有效途径提供了理论依据,但是确切的机理尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Gu L, Huang B, Shen W, et al. Early activation of nSMase2/

ceramide pathway in astrocytes is involved in ischemia-associated neuronal damage via inflammation in rat hippocampi[J]. J Neuroinflammation, 2013, 10(1):109.

- [2] Guan T, Liu Q, Qian Y, et al. Ruscogenin reduces cerebral ischemic injury via NF- κ B-mediated inflammatory pathway in the mouse model of experimental stroke[J]. European J Pharmacol, 2013, 714(1):303-311.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [4] 李金国, 白波. 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型的研究[J]. 泰山医学院学报, 2008, 29(4):308-312.
- [5] 蔡世昌, 张秋玲, 李金国, 等. Apelin 对急性局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠脑神经细胞的保护作用[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(012):1324-1328.
- [6] Vasiljevic B, Magljajic B, Djukic S, Gojnic M, et al. New insights into the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. Pediatr Int, 2011, 53(4):454-462.
- [7] Wang X, Zhang J, Si D, et al. Progesterone inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and interleukin-1 β in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage[J]. Int J Neurosci, 2014, 124(1):42-48.
- [8] Zhang S, Qi Y, Xu Y, et al. Protective effect of flavonoid-rich extract from Rosa laevigata Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation[J]. Neurochem Int, 2013, 63(5):522-532.
- [9] He W, Chen W, Zhou Y, et al. Xanthotoxol exerts neuroprotective effects via suppression of the inflammatory response in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33(5):715-722.
- [10] Maddahi A, Edvinsson L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway[J]. J Neuroinflammation, 2010, 7(1):14.
- [11] 王友, 王立赞, 王保生, 等. 利多卡因对缺血再灌注家兔心肌 NF- κ B 和血浆 ICAM-1 的影响[J]. 济宁医学院学报, 2012, 35(6):399-401.
- [12] Yilmaz G, Granger DN. Cell adhesion molecules and ischemic stroke[J]. Neurol Res, 2008, 30(8):783-793.
- [13] Lo EH. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research[J]. Br J Pharmacol, 2008, 153(S1):S396-S405.

(收稿日期 2014-06-11)