论著

文章编号:1000-5404(2005)04-0320-03

内毒素预处理对大鼠全脑缺血后海马内生性 IL-1Rα 的影响

向 强[1],文 亮[1],楚 军[1],高强国[2],刘明华[1] (第三军医大学:[1]西南医院急救部ICU,[2]基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨内毒素预处理对大鼠全脑缺血/再灌注后海马内生性白细胞介素-1受体拮抗剂(IL-1Rα)的影响及意义。**方法** 采用大鼠全脑/缺血再灌注模型,动态观察内毒素预处理后海马组织 IL-1Rα 的表达、含量及 CA1 区神经元计数的变化。**结果** 内毒素预处理后脑组织内生性 IL-1Rα 表达及含量显著增加,海马 CA1 区神经元计数下降幅度减少。**结论** 内毒素预处理对全脑缺血/再灌注后神经元的损伤有明显保护作用;其机制可能与诱导了中枢神经系统内生性抗损伤蛋白 IL-1Rα 的合成有关。

关键词:脑缺血;预处理;内毒素;IL-1Rα

中图法分类号:R392.11; R743.31; R996 **文献标识码**:A

Effects of endotoxin preconditioning on endogenous IL-1 receptor antagonist in rat hippocampus after global brain ischemia

XIANG Qiang[1], WEN Liang[1], CHU Jun[1], GAO Qiang-guo[2], LIU Ming-hua[1] (Intensive Care Unit, Emergency Department, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of endotoxin preconditioning on endogenous IL-1Rα in rat hippocampus after global brain ischemic reperfusion. **Methods** Global ischemia for 20 min by four-vessel occlusion model (4-vo) was used. The dynamic changes of IL-1Rα content, expression, and neuron density of the hippocampal CA1 region were observed. **Results** The expression and content of IL-1Rα in rat hippocampus increased significantly after endotoxin preconditioning, and the ischemic neuron number in rat hippocampus decreased, too. **Conclusion** Endotoxin preconditioning can protect the brain from subsequent ischemic insult. The increase of endogenous IL-1Rα may be related to the protective mechanism.

Key words: cerebral ischemia; prcoditioning; endotoxin; IL-1Rα

内毒素脂多糖衍化物单磷酰基脂质 A(MPL)预处理是药物性预处理的一种新形式,正常人体对 MPL 有良好耐受性,局灶性脑缺血动物实验证实,经 MPL 预处理能显著减轻缺血后的脑水肿和神经元损伤,其机制可能与增强了中枢神经系统内生性的抗损伤物质的合成有关。IL-1Rα 是机体重要的内生性抗损伤物质。MPL 预处理的神经元保护作用与 IL-1Rα 是否有关尚不清楚,为此我们采用四血管阻断造成全脑缺血/再灌注模型,动态观察大鼠海马 IL-1Rα 表达、含量及 CA1 区神经元计数的变化,以及 MPL 预处理对它们的影响。探讨 MPL 预处理对全脑缺血/再灌注后神经元的保护效应及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康成年 Wistar 大鼠 150 只(雌雄不限),体质量(200±20)g,由第三军医大学实验动物中心提供。MPL(美国 RIBI 公司),IL-1Rα 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),IL-1Rα 抗血清(美国 Santa Cruz 公司),S-P 试剂盒(福建迈新公司),DAB 显色试剂盒(福建迈新公司),Western blot 试剂盒(武汉博士德公司)。

1.2 动物模型制作

采用四血管阻断模型,大鼠腹腔麻醉后(乌拉坦 1 000 mg/kg),分离双侧颈总动脉,穿线备用。然后动物卧位固定,沿正中剪开枕后第 2 颈椎皮肤,分离暴露第 1 颈椎的翼孔,沿翼孔烧灼双侧翼孔下行走的椎动脉,阻断血供。次日待动物清醒时用无创动脉夹夹闭双侧颈总动脉,造成全脑缺血 20 min,然后松开动脉夹形成再灌注。150 只大鼠分为 3 组,缺血组(70 只):MPL 预处理组(70 只),动物全脑缺血前 24 h 经尾静脉注入含 MPL 的生理盐水 1 ml(MPL 20 μg/kg),注射时间持续 1 min,24 h 后操作过程同再缺血组;对照组(10 只),模型制作除不夹闭颈

作者简介:向 强(1972-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事脑缺血再灌注损伤及保护方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)65318302-73048

收稿日期:2004-11-30;修回日期:2005-01-08

总动脉和烧灼椎动脉，24 h 前经尾静静脉注入等量生理盐水外，余同缺血组。缺血组和 MPL 预处理组分别设立再灌注后 4、12、24、48、72、120、168 h 时相点，每个时相点各 10 只动物。

1.3　取材及指标检测

各组动物达各时相点时，以 4% 多聚甲醛/PBS 缓冲液（0.1 mol/L，pH 7.4）经左心室灌注固定脑组织，灌注后取脑分离出海马组织置入同一灌注液中（4 ℃）后固定 6～12 h，分别制作石蜡、冰冻切片。IL-1Rα 免疫组化染色，按 S-P 试剂盒程序进行。新鲜海马组织上清液 IL-1Rα Western-blot 检测参照彭秀玲等[1]的方法进行，以双波长分光光法测定 IL-1Rα 含量，标本蛋白定量以 Lowry 法[2]进行。海马 CA1 区神经元记数，石蜡切片行尼氏染色，光镜下观察，计算双侧海马 CA1 区神经元数目。取其平均值。神经元数（个/mm）= $\frac{\text{CA1 区正常神经元数（个）}}{\text{CA1 区总长度（mm）}}$

免疫组化染色结果由（AMIS00）真彩医学图像分析系统处理，10×10 视野下，每张切片取 5 个视野，以积分光密度（IOD 值）表示染色强度，5 个视野均值作结果。

1.4　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示用 SPSS 软件包行双因素方差分析。

2　结果

2.1　海马组织 IL-1Rα 的表达变化

见表 1，对照组海马组织中未见 IL-1Rα 表达，缺血组再灌注 120 h 海马组织出现 IL-1Rα 的阳性染色，并持续存在于 168 h。MPL 预处理组海马 IL-1Rα 阳性染色提前出现，染色增强，其中 24 h 海马组织已出现 IL-1Rα 的少量表达，并随时间延长逐渐增高，于 72 h 达高峰，之后逐渐降低，168 h 仍有少量表达。

表 1　脑缺血/再灌注后海马组织匀浆 IL-1Rα 的表达变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Changes of IL-1Rα expression in the hippocampus after cerebral ischemic reperfusion（$\bar{x} \pm s$）

Group	n	IL-1Rα	After the period of global ischemia for 20 min						
			4 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h
Control	10	0	–	–	–	–	–	–	–
Ischemia	70	–	0	0	0	0	0	1.24±0.12**	2.47±0.17**
Preconditioning	70	–	0	0	0.98±0.11**△△	2.23±0.28**△△	5.18±0.61**△△	3.97±0.51**△△	2.64±0.17**

**：$P<0.01$，*vs* control；△△：$P<0.01$，*vs* ischemia

2.2　海马组织中 IL-1Rα 含量的变化

Western blot 于对照组及缺血组 4～48 h 的脑海马组织上清液中均未检出 IL-1Rα，而缺血组 72，120，168 h 和 MPL 预处理组的 12～168 h 海马组织上清液中均检测到了 IL-1Rα。双波长分光光度法检测，缺血/再灌注后 24～168 h 海马组织上清液中有少量 IL-1Rα，MPL 预处理组 IL-1Rα 显著增加，其中缺血/再灌注后 4 h，已有少量 IL-1Rα，随时间推移逐渐升高，72 h 达高峰，之后逐渐降低，168 h 仍可检出（表 2）。

表 2　脑缺血/再灌注后海马组织中 IL-1Rα 含量的变化（$\bar{x} \pm s$，ng/ml）

Tab 2　Changes of IL-1Rα content in the hippocampus after cerebral ischemic reperfusion（$\bar{x} \pm s$，ng/ml）

Group	n	IL-1Rα	After the period of global ischemia for 20 min						
			4 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h
Control	10	0	–	–	–	–	–	–	–
Ischemia	70	–	0	0	0.018±0.001**	0.517±0.032**	1.029±0.096**	1.674±0.141**	1.975±0.185**
Preconditionin	70	–	0.218±0.012**△△	0.643±0.041**△△	1.073±0.086**△△	2.160±0.173**△△	4.476±0.837**△△	3.925±0.626**△△	2.861±0.408**△△

**：$P<0.01$，*vs* control；△△：$P<0.01$，*vs* ischemia

2.3　MPL 预处理，对海马 CA1 区神经元记数的影响

海马 CA1 区神经元记数于再灌注后 4 h 即明显低于对照组（$P<0.01$），随再灌注时间延长进一步减少，于 168 h 减至最少。MPL 预处理后虽不能完全阻止神经元数目的减少，但显著降低了神经元减少的程度（表 3）。

表 3　缺血/再灌注 168 h 海马 CA1 区神经元密度及缺血细胞数变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 3　Changes of neuron density in CA1 region after cerebral ischemic reperfusion（$\bar{x} \pm s$）

Group	n	Neuron density（mm^{-1}）	Ischemic neuron number
Control	10	227.5±16.2	0
Ischemia	70	120.3±11.9**	79.5±18.7**
Preconditioning	70	213.8±13.6△△	12.10±4.9**△△

**：$P<0.01$，*vs* control；△△：$P<0.01$，*vs* ischemia

3　讨论

MPL 是减毒的沙门氏菌属 R595 菌株脂多糖衍化物，本实验证实了内毒素 MPL 预处理对全脑缺血/再灌注海马神经元的显著保护作用，其保护效应的产生可能与增强了中枢神经系统内生性抗损伤蛋白 IL-1Rα 的合成有关。

Toyoda 等[3]在局灶性脑缺血动物实验中发现，缺血再灌注前 24 h 给予亚损伤剂量（20 μg/kg）MPL 能显著减轻其后的神经元损伤和脑组织水肿，而在此前或此后的时间点给于 MPL，未能发现其脑保护作用，这一时间窗与基因转录，新的蛋白质合成的时相相吻合。研究者推测 MPL 预处理的神经保护作用可能与诱导

了新的抗损伤蛋白的合成有关，并发现给予 IL-1Rα 抗血清可降低 MPL 预处理的保护效应，提示 IL-1Rα 与 MPL 神经保护作用有关[3]。在我们的研究中援用了 MPL 预处理的这一时间点，结果显示，对照组大鼠及缺血组早期未能检测出 IL-Rα，可能是因为 IL-1Rα 含量太少或检测方法不够灵敏。MPL 预处理组于缺血后 4 h 即检测出 IL-1Rα 增多，并持续至再灌注后168 h，与缺血组比较差异显著（$P<0.01$），MPL 预处理后海马内生性 IL-1Rα 的合成显著增多。IL-1Rα 是体内唯一选择性阻断 IL-1 所有作用的受体拮抗剂，是机体重要的内生性抗损伤物质[4]。正常脑组织 IL-1Rα mRNA 表达较低，脑内 IL-1Rα 含量少。脑缺血后 IL-1Rα 的含量增加是机体在损伤应激下内源性抗损伤机制发挥作用的结果。IL-1Rα 的含量增加，其来源尚不十分清楚，可能来自单核巨噬细胞，成纤维细胞，神经元和胶质细胞。将载有人 IL-1Rα cDNA 的重组腺病毒载体转染至小鼠大脑后，IL-1Rα 在两侧大脑半球的表达水平显著增高，转染小鼠持续性 MCAO 后 24 h 脑梗死体积较对照组小鼠明显缩小，脑水肿减轻[5,6]。其机制可能在于增多的 IL-1Rα 与 IL-1 竞争性结合 IL-1RI，阻止了 IL-1 介导的信号转导，从而阻断了 IL-1 的生物学活性[7]。IL-1 家族成员有广泛的生物学效应，介导了再灌注后的炎症反应，可能是脑水肿发生，急性神经元死亡及迟发性神经元死亡的原因之一。

中枢神经系统内生性抗损伤蛋白 IL-1Rα 合成增加，再灌注后的炎性损伤减轻，可能是 MPL 预处理神经保护作用的重要机制，但 MPL 预处理通过何种途径，如何诱导机体内源性 IL-1Rα 的合成增加尚不明确，其可能机制在于亚损伤剂量的 MPL 作为应激原调动了机体的免疫应答反应，动物给于 MPL 后均出现不同程度的发热反应和白细胞计数升高，IL-1Rα 是单核细胞来源的 17 000 多肽，增多的单核细胞导至 IL-1Rα 合成增多。此外给于 MPL 后产生的无菌炎性反应使机体处于应激反应状态，中枢系统中起修复，抗损伤作用的成纤维细胞和胶质细胞活性增高，诱使 IL-1Rα 合成增多[8]。作为药物性预处理的一种新形式，正常人体对 MPL 有良好的耐受性[9]，经过更深入研究，极有可能作为临床心，脑缺血高危人群及高危手术者的预防性用药，以减轻发病后组织，器官的损害，为研究脑缺血/再灌注神经元的防护提供了新的思路，但其更深层机制尚需进一步探讨。

参考文献：

[1] 彭秀玲，袁汉英，谢 毅. 基因工程实验技术[M]. 第2版. 长沙：湖南科学技术出版社，1998. 248－259.

[2] Lowry O H, Roserbrough N J, Farr A L, *et al*. Protein measurements with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265－275.

[3] Toyoda T, Kassell N F, Lee K S. Induction of tolerance against ischemia/reperfusion injury in the rat brain by preconditioning with the endotoxin analog diphosphoryl lipid A[J]. J Neurosurg, 2000, 92(3): 435－441.

[4] Haspolat S, Anlar B, Kose G, *et al*. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist levels in patients with subacute sclerosing panencephalitis and the effects of different treatment protocols[J]. J Child Neurol, 2001, 16(6): 417－420.

[5] Yang G Y, Mao Y, Zhou L F, *et al*. Attenuation of temporary focal cerebral ischemic injury in the mouse following transfection with interleukin-1 feceptor antagonist[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1999, 72(2): 129－137.

[6] Garcia J H, LiuK F, Relton J K, *et al*. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion[J]. Am J Pathol, 1997, 147(5): 1477－1486.

[8] Masada T, Hua Y, Xi G, *et al*. Attenuation of intracerebral hemorrhage and thrombin-induced brain edema by overexpression of interleukin-1 receptor antagonist[J]. J Neurosurg, 2001, 95(4): 680－686.

[8] Wang X, Barone F C, Aiyar N V, *et al*. Interleukin-1receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats[J]. Stroke, 1997, 28(1): 155－162.

[9] Zimmermann C, Ginis I, Furuya K, *et al*. Lipopolysaccharide-induced ischemic tolerance is associated with increased levels of ceramide in brain and in plasma[J]. Brain Res, 2001, 895(1-2): 59－65.

（编辑 薛国文）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，"名"可以有1个，2个或3个，但"姓"只有1个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；"名"可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 Public J Q

本刊编辑部