论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0694-03

内毒素预处理对大鼠全脑缺血/再灌注后炎性反应影响的实验研究

向 强[1],文 亮[1],高强国[2] (第三军医大学:[1]西南医院急救部,[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/再灌注后炎性细胞因子的影响及意义。**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对脑组织髓过氧化物酶(MPO)、肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素1-β(L-1β)活性的影响及海马CA_1区神经元计数的变化。**结果** 内毒素预处理后脑组织MPO、TNF-α、IL-1β活性显著降低,海马CA_1区神经元计数下降幅度减少。**结论** 内毒素预处理减轻了全脑缺血/再灌注后的炎性反应,对海马神经有明显保护作用。

关键词: 脑缺血;再灌注;预处理;内毒素

中图法分类号: R392.11; R743.31; R914.4 **文献标识码:** A

Effects of endotoxin preconditioning on inflammatory response after global brain ischemia in rats

XIANG Qiang[1], WEN Liang[1], GAO Qiang-guo[2] ([1]Intensive Care Unit, Southwest Hospital, [2]Department of Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the protective effects of endotoxin preconditioning on the brain ischemic injury and explore its protective mechanism. **Methods** Global ischemia for 20 min by four-vessel occlusion model was used in 140 Wistar rats, in which 70 rats were pretreated with MPL at dose of 20 μg/kg 24 h before global ischemia. Another 10 Wistar rats served as normal controls. Ischemic neurons and neuron density of the hippocampal CA1 region, MPO activity, TNF-α activity, IL-1β activity were assayed at 4, 12, 24, 48, 72, 120, 168 h after reperfusion. **Results** Pretreatment with endotoxin produced significant reductions in ischemic neuron number, MPO activity, TNF-α activity and IL-1β activity. **Conclusion** Endotoxin preconditioning protects brain from subsequent ischemic injury, in which the suppression of cellular inflammation may be the protective mechanism.

Key words: cerebral ischemia; reperfusion; endotoxin; endotoxin

脑缺血/再灌注后的炎症级联反应是神经元损伤的重要因素,提前24 h用内毒素脂多糖衍化物单磷酰基脂质A(MPL)预处理能显著减轻感染中毒性休克及心肌缺血/再灌注动物的炎症损伤,缩小心肌梗塞面积,提高心肌细胞对缺血缺氧的耐受性[1],MPL预处理对脑缺血/再灌注后的炎症反应有何影响尚不清楚,对此我们作了相关研究,并对其机制作了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立及分组

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。采用四血管阻断模型,先烧灼双侧翼孔下椎动脉,次日动物麻醉清醒后夹闭两侧颈总动脉20 min,形成再灌注。150只大鼠随机分为3组,再灌注组(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后操作过程同再灌注组;对照组(10只):模型制作除不夹闭颈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,余同再灌注组。

1.2 指标检测方法

动物达设定时相点后,取视交叉后1 mm及4 mm处脑组织(海马所在部位),迅速浸入液氮中,再置于匀浆器中加2 ml生理盐水,制备10%组织浆,收集的匀浆液以3 500 r/min,4 ℃,离心10 min,上清液分装后-70 ℃保存待测。

1.2.1 海马组织MPO活性测定 取匀浆上清液按试剂盒操作程序进行。

1.2.2 匀浆上清液TNF-α含量采取放免法测定 IL-1β含

作者简介:向 强(1972-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事颅脑伤疾病防治方面的研究,发表论文10篇。电话:13658305436

收稿日期:2005-05-21;修回日期:2005-10-16

量采用 ELISA 法测定，操作严格按试剂盒说明进行，匀浆蛋白定量采用 Lowry 法[2]，调整所得值，绘制标准线，查出对应的 TNF-α，IL-1β 的含量。

1.2.3　海马 CA1 区神经元计数　　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）经左心室灌注以固定脑组织，灌注后迅速断头取脑，将脑组织作冠状切片（片厚 5 mm），组织块置于同一灌注液中 4 ℃后固定 12 h，再行石蜡包埋切片，片厚 5 μm。切片行尼氏染色，光镜下观察，参照 kirino[3] 法，计算双侧海马 CA1 区神经元数目，取其平均值。

$$\text{神经元数（个/mm）} = \frac{\text{CA1 区正常神经元数（个）}}{\text{CA1 区总长度（mm）}}$$

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 软件包进行方差分析。

2　结果

2.1　MPL 预处理对 MPO 活性的影响

缺血组缺血/再灌注 12 h，MPO 升高（$P<0.05$），48 h 达高峰值，之后逐渐降低，至 168 h 仍高于对照组（12 ~ 168 h，$P<0.01$）；MPL 预处理后，并不能阻止 MPO 的升高，但却在 12 ~ 168 h 显著降低了其升高程度（$P<0.01$），见表 1。

2.2　MPL 预处理对 TNF-α 活性的影响

与对照组比较，缺血组缺血/再灌注后 4 h 脑海马组织中 TNF-α 水平即已升高，72 h 达峰值，之后逐渐下降，168 h 与对照组水平接近（4 h，$P<0.05$，12 ~ 120 h，$P<0.01$）；MPL 预处理后，明显延迟了脑海马组织中 TNF-α 升高的时间，降低了其升高程度（12 ~ 120 h，$P<0.01$），见表 2。

2.3　MPL 预处理对 IL-1β 活性的影响

与对照组相比较，缺血组缺血/再灌注后 12 h，海马组织中 IL-1β 水平已显著升高，72 h 达高峰，之后逐渐降低，168 h 仍明显高于对照组水平（$P<0.01$）；MPL 预处理后与缺血组相比较，各时相点海马组织中 IL-1β 升高水平显著降低（$P<0.01$），见表 3。

2.4　MPL 预处理，海马 CA_1 区神经元密度及缺血细胞数变化

海马 CA_1 区神经元计数于再灌注后 4 h 即明显低于预处理组（$P<0.01$），表现为神经元密度下降，细胞肿胀，核编移，尼氏小体消失，正常形态神经元数目减少，异常形态的细胞数增多，随再灌注时间延长正常形态神经元数进一步减少，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，见表 4。

表 1　脑缺血/再灌注后海马组织匀浆 MPO 变化（U/g，$n=10$，$\bar{x} \pm s$）

组别	对照组	全脑缺血 20 min 后再灌注时间（t/h）						
		4	12	24	48	72	120	168
缺血组	0.62 ± 0.09	0.66 ± 0.10	0.96 ± 0.13^{a}	1.01 ± 0.12^{a}	1.38 ± 0.21^{a}	1.07 ± 0.14^{a}	0.91 ± 0.08^{a}	0.82 ± 0.04^{a}
预处理组	0.62 ± 0.09	0.63 ± 0.03	0.74 ± 0.05^{ab}	0.84 ± 0.10^{ab}	0.96 ± 0.13^{ab}	0.87 ± 0.11^{ab}	0.79 ± 0.06^{ab}	0.71 ± 0.05^{ab}

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与缺血组比较

表 2　脑缺血/再灌注后海马组织匀浆 TNF-α 变化（pg/mg，$n=10$，$\bar{x} \pm s$）

组别	对照组	全脑缺血 20 min 后再灌注时间（t/h）						
		4	12	24	48	72	120	168
缺血组	36.41 ± 4.95	44.08 ± 3.97^{a}	56.9 ± 4.04^{b}	73.98 ± 7.98^{b}	59.06 ± 7.42^{b}	76.84 ± 8.87^{b}	47.56 ± 6.44^{b}	38.87 ± 2.21
预处理组	36.41 ± 4.95	38.15 ± 3.25	43.22 ± 6.64^{bc}	54.19 ± 7.58^{bc}	45.97 ± 3.76^{bc}	55.99 ± 7.01^{bc}	36.88 ± 3.35^{c}	35.82 ± 3.39

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与缺血组比较

表 3　脑缺血/再灌注后海马组织匀浆 IL-1β 变化（ng/mg，$n=10$，$\bar{x} \pm s$）

组别	对照组	全脑缺血 20 min 后再灌注时间（t/h）						
		4	12	24	48	72	120	168
缺血组	7.49 ± 1.62	7.59 ± 1.41	17.22 ± 3.13^{a}	20.91 ± 3.47^{a}	31.85 ± 5.11^{a}	47.73 ± 5.48^{a}	24.35 ± 4.25^{a}	11.45 ± 1.92^{a}
预处理组	7.49 ± 1.62	7..32 ± 1.13	11.44 ± 2.02^{ab}	16.72 ± 2.70^{ab}	21.33 ± 3.64^{ab}	29.80 ± 3.37^{ab}	12.34 ± 2.81^{ab}	8.52 ± 1.58^{ab}

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与缺血组比较

表 4　缺血/再灌注后海马 CA1 区神经元记数变化（个/mm，$n=10$，$\bar{x} \pm s$）

组别	对照组	全脑缺血 20 min 后再灌注时间（t/h）						
		4	12	24	48	72	120	168
缺血组	227.5 ± 6.24	193.4 ± 15.29^{b}	176.4 ± 9.8^{b}	170.6 ± 10.97^{b}	160.8 ± 10.04^{b}	141.4 ± 8.79^{b}	126.8 ± 8.61^{b}	99.7 ± 9.28^{b}
预处理组	227.5 ± 6.24	212.2 ± 12.91^{ac}	202.7 ± 13.32^{bc}	183.3 ± 10.48^{bc}	179.3 ± 12.52^{bc}	171.4 ± 11.89^{bc}	159.7 ± 13.24^{bc}	153.9 ± 9.13^{bc}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与缺血组比较

3 讨论

MPL是减毒的沙门氏菌属R595菌株脂多糖衍化物,正常人体对其有良好耐受性[4]。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减轻了脑缺血/再灌注后的炎症反应有关。

脑缺血/再灌注后的炎症级联反应是神经元继发性损害的重要因素,髓过氧化物酶(MPO)是存在于中性粒细胞(PMN)内的标志酶,其活性的高低反映了中性粒细胞的数量。中性粒细胞的浸润是反映脑缺血/再灌注后存在炎性反应的重要标志之一。越来越多的研究显示,中性粒细胞的浸润可能是缺血神经元继发性损害最关键的因素[5,6]。其依据在于再灌注后中性粒细胞的聚集,浸润与神经元损伤有明显时间相关性,中性粒细胞缺乏的动物脑缺血/再灌注后神经元损伤明显减轻,给予抗中性粒细胞单克隆抗体RP_3,能显著改善脑缺血/再灌注后的神经损伤。在我们的研究中,全脑缺血/再灌注后,MPO活性明显升高进一步证实了中性粒细胞可能参与了全脑缺血/再灌注损伤后的继发性脑损害。再灌注时中性粒细胞在病灶区血管内聚集,阻塞微血管形成无复流(no-reflow phenomenon),使缺血区不能得到充分灌注,同时大量浸润到脑组织的中性粒细胞释放溶酶体酶使组织蛋白水解破坏,产生大量自由基,加重缺血后的氧化应激反应,更为重要的是激活的中性粒细胞分泌多种炎性细胞因子如TNF-α、IL-1β、IL-6等,形成再灌注后的炎症级联反应[7]。再灌注后脑组织内增多的TNF-α又进一步激活中性粒细胞,增加白细胞-内皮细胞粘附分子的表达,促进白细胞粘附于毛细血管或小血管壁,并渗透至脑组织,加重炎性损伤。而增多的IL-1β可以通过刺激内皮细胞表达白细胞粘附分子,使白细胞向缺血区浸润,IL-1β尚可促进IL-8、TNF-α,克隆刺激因子和IL-1β的自身合成,形成缺血损伤促使脑缺血/再灌注后炎症损伤不断扩大[8,9]。

本研究结果显示,经内毒素MPL预处理,MPO升高幅度在整个再灌注期(12~168 h)显著降低,提示中性粒细胞向脑组织浸润减少,同时MPL预处理显著降低了脑组织中TNF-α、IL-1β的含量,也显著减轻了海马CA_1区神经元缺失的程度。表明MPL预处理对缺血/再灌注神经元有明显保护作用,这一作用与减轻了再灌注后的炎症反应密切相关。由于MPL预处理的神经保护效应产生于给药后24 h,而非给药即刻或中间某个时辰,这一时间窗与新的蛋白质合成相吻合。我们推测,这一效应的产生可能在于:亚损伤剂量内毒素预刺激,启动了中枢动系统内源性保护机制,促使某些内生性抗损伤蛋白和抗炎因子的产生,抑制了缺血/再灌注后白细胞向脑组织的浸润,减少了炎性细胞因子的产生,神经元损伤减轻。MPL预处理减轻了脑缺血/再灌注后的炎症级联反应,对如何通过发挥机体自身的抗损伤机制达到减轻病损的目的作了初步研究,为脑缺血/再灌注神经元损伤的防护提供了新的研究思路,但其更深层机制尚需进一步探讨。

参考文献:

[1] 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.

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

[3] KIRINO T, TAMURA A, SANO K. A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus[J]. Stroke, 1986, 17(3): 455-459.

[4] HE S Y, DENG H W, LI Y J. Monophosphoryl lipid A-induced delayed preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide[J]. Eur J Pharmacol, 2001, 420(2-3): 143-149.

[5] TAKIZAWA T, TADA T, KITAZAWA K, *et al*. Inflammatory cytokine cascade released by leukocytes in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage[J]. Neurol Res, 2001, 23(7): 724-730.

[6] NAWASHIRO H, MARTIN D, HALLENBECK J M. Neuroprotective effects of TNF binding protein in focal cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2003, 778(2): 265-271.

[7] BLAMIRE A M, ANTHONY D C, RAJAGOPALAN B, *et al*. Interleukin-1beta -induced changes in blood-brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient, and cerebral blood volume in the rat brain: a magnetic resonance study[J]. J Neurosci, 2000, 20(21): 8153-8159.

[8] BOUTIN H, LEFEUVRE R A, HORAI R, *et al*. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage[J]. J Neurosci, 2001, 21(15): 5528-5534.

[9] 向 强, 杨 娟, 文 亮, 等. 内毒素预处理对大鼠前脑缺血再灌注后海马神经元保护效应的研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(19): 1762-1764.

(编辑 汪勤俭)