论著

文章编号:1000-5404(2006)14-1490-03

大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤周围带黏结合蛋白多糖-1的表达

罗海彦,胡长林 (重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010)

提 要:目的 研究黏结合蛋白多糖-1(syndecan-1)在大鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤周围带不同时相点的变化及意义。**方法** 采用线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤模型。利用HE染色、免疫组织化学方法,观察正常对照组、假手术组及脑缺血2 h再灌注4、24、72 h和7 d的syndecan-1阳性细胞的分布部位、数量及缺血脑组织的病理变化。**结果** 正常对照组和假手术组syndecan-1免疫活性在皮质部位和皮质下结构表达明显;脑缺血2 h再灌注4 h可见梗死核心区的syndecan-1表达开始减少,24 h明显减少达高峰,72 h和7 d梗死核心区未见syndecan-1表达;脑缺血2 h再灌注4 h周围带的syndecan-1表达开始减少,24 h减少达高峰,到72 h脑梗死周围带的syndecan-1表达增加,7 d时梗死区周围带syndecan-1表达基本恢复;syndecan-1的表达和脑梗死周围带炎性细胞的浸润有一定的关系。**结论** 脑缺血再灌注损伤周围带syndecan-1表达减少,可能是炎性细胞浸润的诱发因素。

关键词: 脑缺血再灌注损伤;syndecan-1;脑梗死周围带

中图法分类号: Q538;R446.8;R743.31 **文献标识码:** A

Syndecan-1 expression in perilesional zone of cerebral ischemia/reperfusion rat

LUO Hai-yan, HU Chang-lin (Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To explore the expression of syndecan-1 in different intervals following focal cerebral ischemia/reperfusion in rat and the relationship between syndecan-1 and inflammatory cells in the rat brain. Methods The rat model of middle cerebral artery occlusion (MACO) was performed by using the intraluminal filament occlusion for 2 h, then released. The rat brain were cut in the coronal planes at the levels of the hippocampus as the templates. The immunohistochemical staining and HE staining were used to observe the distribution and the quantity of syndecan-1 and inflammatory cell expression in the normal control group, sham operation group and the MCAO groups at 4, 24, 72 h and 7 d after reperfusion. Results The expression of syndecan-1 was mainly in the cortex and the subcortex in the rats of normal control group and sham operation group. The immunoreactivity of syndecan-1 in the infarcted core and perilesional infarcted zone started decreasing at 4 h after ischemia/reperfusion, reached the lowest at 24 h. The expression of syndecan-1 in the perilesional infarcted zone was up-regulated at 72 h and recovered at 7 d. The relationship between syndecan-1 and inflammatory cells was of negative correlation. Conclusion The decreasing of syndecan-1 may contribute to inflammatory response in the cerebral infarction region after focal cerebral ischemia/reperfusion.

Key words: brain ischemia/reperfusion; syndecan-1; cerebral infarction perilesional zone

急性脑梗死是缺血再灌注损伤最常见的病理改变,在损伤的早期主要是以兴奋性毒性为主,数小时后则是炎症反应和细胞凋亡起主要作用。如何调控炎症反应向有利于神经功能康复的方向发展是神经保护治疗的关键。近期研究发现黏结合蛋白多糖-1(syndecan-1)在急性炎性反应调控中扮演重要角色,它参与了白细胞和血管内皮细胞的相互作用、白细胞外渗、以及血管通透性的改变和细胞水肿的形成[1],但其在急性脑梗死病理生理机制中的作用尚少见报道。本实验应用大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型,观测syndecan-1在脑梗死周围带的分布和时程表达,以及和炎性细胞浸润的关系,以便为脑梗死急性炎性反应的干预治疗提供新的靶点。

作者简介:罗海彦(1965-),男,四川省武胜县人,博士,副主任医师,主要从事脑血管疾病和神经变性疾病的基础和临床治疗方面的研究。电话:(023)68587190,13883861959

收稿日期:2005-09-21;修回日期:2005-11-25

1　材料与方法

1.1　实验动物

健康雄性 SD 大鼠 42 只，体质量 230～250 g，由重庆医科大学实验动物中心提供，实验动物分为正常对照组、假手术组、脑缺血 2 h 再灌注 4、24、72 h 和 7 d 组，每组动物 7 只。

1.2　试剂

山羊抗 syndecan-1 抗体购自 Santa Cruz 公司，免疫组化试剂盒和 DAB 染色试剂购自北京中杉金桥公司。

1.3　大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型建立

参照 Longa 等[2]线栓法制备大鼠中动脉缺血再灌注模型，3.5% 水合氯醛麻醉，线栓采用 0.23 直径的尼龙鱼线，头端用清漆处理使其变圆钝，成梭型，直径最大为 0.25～0.28 mm，分离颈外动脉，远端结扎、灼断，从颈外动脉插入线栓，由颈总动脉分叉处向颈内动脉进线，深度 20 mm 左右，遇轻微阻力即止；全部大鼠均栓塞右侧大脑中动脉。动物模型入组标准：动物清醒后爬行时出现向左转圈（追尾现象）或提尾时出现左前肢内收屈曲。假手术组栓线进入翼腭动脉，进入长度约为 15 mm，动物清醒后不出现任何神经系统体征。脑缺血组大鼠于缺血 2 h后，再次麻醉拔出栓子至颈外动脉，进行再灌注。

1.4　观测时相点选择和标本制备

时相点选择缺血 2 h 再灌注 4、24、72 h 和 7 d。脑组织标本采集及切片：于各时相点采用生理盐水和 4% 多聚甲醛进行左心室灌注和内固定，4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液后固定 12 h，20% 蔗糖磷酸盐缓冲液浸泡 2～3 d，然后不同梯度的无水乙醇脱水，石蜡包埋切片，切片部位统一采用海马平面切片，片厚 7 μm。HE 染色和免疫组织化学染色采用连续切片。

1.5　HE 染色

观察梗死区域及细胞形态的变化。

1.6　syndecan-1 免疫组织化学染色

一抗：syndecan-1 抗体工作浓度为 1∶200。利用中杉金桥公司提供的 S-P 免疫组化试剂盒，参照说明书进行操作，然后进行 DAB 显色，苏木精复染，盐酸乙醇分化，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树酯封片。

1.7　图像分析及统计学处理

应用 MPLAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统对 syndecan-1 染色阳性细胞进行计数，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0统计软件进行 t 检验和方差分析。

2　结果

2.1　脑缺血再灌注的病理变化

缺血 2 h 再灌注 4 h，在尾状核外侧部、顶叶皮质区可见坏死区，坏死核心区脑组织淡染、细胞数明显减少，神经纤维稀疏，神经元核固缩，胞质嗜酸性，大部分细胞结构被破坏。周边半暗带区细胞形态基本完整，部分细胞呈缺血性改变，神经细胞空泡变性，周围炎性细胞浸润不明显。缺血 2 h 再灌注 24 h，坏死区扩大，半暗带缩小，炎性细胞浸润明显。缺血 2 h 再灌注 72 h 坏死区明显扩大，波及整个大脑半球，右侧侧脑室受压明显，大量的炎性细胞聚集。缺血 2 h 再灌注 7 d 后，可见大量胶质细胞增生，1 例出现梗死后再出血，坏死核心区和周围带未见明显的炎性细胞浸润，但还可见少量的单核细胞和巨噬细胞。

2.2　脑缺血再灌注损伤周围带 syndecan-1 的表达

正常对照组、假手术组及左侧大脑半球可见均一的深棕黄染色细胞，着色部位为细胞核、细胞浆和细胞膜。缺血 2 h 再灌注4 h，病灶侧海马、尾状核可见形态轻度萎缩，梗死的核心区可见少量的 syndecan-1 阳性细胞，梗死周围带的 syndecan-1 阳性细胞开始减少；再灌注 24 h，梗死核心区和周围带 syndecan-1 阳性细胞减少达高峰，与 4 h 时间点相比核心区和周围区的 syndecan-1 阳性细胞表达有显著性差别；再灌注 72 h，梗死核心区基本未见 syndecan-1 阳性染色细胞，但梗死周围区的 syndecan-1 阳性细胞表达明显增加，较 4、24 h 时间点相比二者有显著性差异；再灌注 7 d 时，梗死核心区未见 syndecan-1 阳性细胞，周围带 syndecan-1 表达基本上与 4 h 时间点相同；缺血 2 h 再灌注 4、24 h 未损伤侧 syndecan-1 表达无显著性差别，再灌注 72 h 未损伤侧 syndecan-1 表达有显著性上调，再灌注 7 d 未损伤侧 syndecan-1 表达与 4、72 h 点基本相同，具体见表 1。

表 1　大鼠脑缺血再灌注损伤 syndecan-1 的表达（$n=7$，$\bar{x} \pm s$）

组别	皮质			皮质下结构		
	未损伤侧	梗死周围带	梗死核心区	未损伤侧	梗死周围带	梗死核心区
脑缺血 2 h 再灌注 4 h	72 ± 7.8	38 ± 2.2[b]	16 ± 3.4[e]	84 ± 7.6	37 ± 2.4[b]	11 ± 12[e]
脑缺血 2 h 再灌注 24 h	85 ± 9.1	12 ± 1.3[bc]	3.5 ± 2.1[d]	79 ± 7.8	15 ± 2.3[bc]	3.6 ± 2.5[e]
脑缺血 2 h 再灌注 72 h	127 ± 9.8[a]	68 ± 5.9[bd]	—	116 ± 9.2[a]	66 ± 5.2[bd]	—
脑缺血 2 h 再灌注 7 d	76 ± 7.2	39 ± 3.1[b]	—	87 ± 7.9	35 ± 2.7[b]	—

a：$P<0.01$，与其他组未损伤侧相比；b：$P<0.01$，与同一组未损伤侧相比；c：$P<0.01$，d：$P<0.05$，与其他组梗死周围带相比；e：$P<0.01$，与其他组梗死核心区和梗死周围带相比

3　讨论

缺血性脑血管病的病理改变主要包括梗死的核心区和周围带，核心区形成主要是血流量严重不足和能量代谢障碍，一般发生在缺血后数小时或数分钟，呈不可逆坏死。周围带包括缺血半暗带和轻度脑灌注不足区，对脑缺血周围带的及时有效的治疗直接关系到神经功能的恢复。目前研究发现造成脑缺血周围带第 2

次损伤的原因主要包括兴奋性氨基酸毒性和炎性反应[3]。兴奋性毒性可以造成钙离子超载、氧自由基、低氧诱导分子、一氧化氮合成酶和谷氨酸增加，并且触发炎性反应过程，同时损伤的星型胶质细胞、小胶质细胞、内皮细胞、白细胞和周围衍生的免疫细胞快速诱导转录因子，造成炎性细胞因子和趋化因子表达增加，一些细胞因子如核转录因子(NF-κB)可以激活肿瘤坏死因子和白介素1、6，还可诱导血管内皮生长因子，增加血脑屏障通透性和水肿[4,5]。

炎性细胞因子诱导内皮细胞表面的细胞内黏附分子、血小板内皮黏附分子(PECAM-1)、内皮细胞白细胞黏附因子(ELAM-1)的过度表达，导致中性粒细胞结合迁移至脑损伤部位，IL-8 和 MCP-1 还可以诱导巨噬细胞和单核细胞进入脑损伤部位，大量的炎性细胞可以阻塞微血管、产生氧自由基和一氧化氮[6]。

蛋白多糖是一类非常复杂的大分子糖复合物，主要由糖胺聚糖链共价连接于核心蛋白所组成。以往认为蛋白多糖是构成细胞外基质的主要成分，起着维持组织充盈和黏弹性作用。近年来研究表明大多数真核细胞均能合成一定类型的蛋白多糖，它们不仅分布于细胞基质，而且还存在于细胞表面、细胞内分泌颗粒以及细胞核中，它们参与了细胞分化、生长、黏附、迁移、信息传递及组织形态结构形成。

syndecan-1 是蛋白多糖的亚型，主要存在于上皮细胞表面，其核心蛋白分子量约3.1万，含有3个结构域，除含有硫酸乙酰肝素(HS)链外，亦含有硫酸软骨素(CS)链，不同细胞产生的 syndecan-1 分子量有所不同。syndecan-1 的生理功能与其含有的硫酸乙酰肝素侧链密切相关[1]，硫酸乙酰肝素与 L-和 P-选择素反应调节白细胞；整合素的活化依赖硫酸乙酰肝素调节的趋化因子活性并增加 IL-6、NF-κB、IFN-γ 及 TNF 的表达，硫酸乙酰肝素也可以促进趋化因子的多聚化，诱导靶细胞黏附分子表达结合；硫酸乙酰肝素参加了趋化因子梯度的形成并促进白细胞渗出和血管通透性调节；目前研究表明 syndecan-1 参加了白细胞和血管内皮细胞相互作用的调节、激肽原梯度的形成、趋化因子活性调节，在炎症情况下 syndecan-1 缺乏可以促使血管通透性增加和白细胞外渗，其机制可能是syndecan-1与激肽原和肝素结合蛋白相互作用的结果。

我们研究发现，在急性大鼠脑缺血 2 h 再灌注 4 h，梗死的核心区和周围带的 syndecan-1 阳性细胞开始减少；再灌注 24 h，梗死核心区和周围带 syndecan-1 阳性细胞减少基本上达高峰，在损伤侧的海马 syndecan-1 表达几乎为阴性；再灌注 72 h 周围区 syndecan-1 阳性细胞表达开始上调明显较 4、24 h 表达增加；再灌注 7 d 时周围带 syndecan-1 表达基本恢复到 4 h 水平。结合病理我们观察到急性脑梗死 syndecan-1 减少的高峰较炎性细胞浸润的高峰时间早，72 h 炎性细胞集聚和脑水肿高峰时其病灶周围带的 syndecan-1 却明显上调。提示 syndecan-1 减少可能诱发炎性细胞浸润，syndecan-1 的上调可能还具有抗炎、抗脑细胞水肿的作用。实验显示再灌注 72 h 未损伤侧 syndecan-1 表达明显较其他时间点升高，这可能是颅内脑水肿达高峰时未损伤侧的一种保护性表达。研究提示 syndecan-1 的变化与急性脑梗死缺血再灌注损伤的病理生理改变有密切关系，syndecan-1 在急性脑缺血再灌注损伤发病机制中炎性细胞的浸润和细胞水肿形成起重要作用，其作用可能是通过调节血管的通透性和炎性细胞的迁移而产生。

本实验显示 syndecan-1 参与了急性脑缺血再灌注损伤的炎性反应和脑水肿的病理生理过程，syndecan-1 的表达减少可能启动了血管通透性增加和炎性细胞的迁移、浸润。因此对 syndecan-1 表达的干预可能会对急性脑缺血再灌注损伤炎性反应和脑水肿进行调控，这为急性脑缺血再灌注损伤的神经保护性治疗提供了新的靶点，有着重要的临床应用前景。但 syndecan-1 是否通过干预炎性细胞因子或趋化因子来调节炎性反应还有待进一步研究。

参考文献：

[1] GOTTE M. Syndecans in inflammation[J]. FASEB J, 2003, 17(6): 575-591.

[2] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[3] IADECOLA C, ALEXANDER M. Cerebral ischemia and inflammation [J]. Curr Opin Neurol, 2001, 14(1): 89-94.

[4] CARLSON N G, WIEGGEL W A, CHEN J, *et al*. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways[J]. J Immunol, 1999, 163(7): 3963-3968.

[5] ZHANG Z, CHOPP M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia[J]. Trends Cardiovasc Med, 2002, 12(2): 62-66.

[6] DANTON G H, DIETRICH W D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62(2): 127-136.

(编辑 陈聪连)