DOI:10.16016/j.1000-5404.201609150

干细胞因子联合抗白细胞介素17A抗体对小鼠脑缺血预后的影响

卢 龙[1],贺伟峰[2],王 益[1],文 珊[1],胡 俊[1],史树贵[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:神经内科[1],全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨干细胞因子(stem cell factor,SCF)联合抗白细胞介素-17A抗体(anti-IL-17A)对小鼠脑缺血预后的影响。**方法** 通过线栓法对C57BL/6小鼠建立大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型,60 min后取出线栓,恢复右侧大脑中动脉血流,建立脑缺血再灌注模型。小鼠脑缺血再灌注后分别给予腹腔注射生理盐水(normal saline,NS)、anti-IL-17A、SCF、anti-IL-17A + SCF。观察各组小鼠MCAO术后脑梗死体积、脑组织病理损伤和脑水肿程度、神经功能评分、神经细胞凋亡和炎症反应等变化。**结果** 与NS组相比,其余各治疗组脑梗死体积、脑组织病理损伤和脑水肿均显著减轻($P<0.05$),神经功能评分得到明显改善($P<0.05$),神经细胞凋亡减少($P<0.05$),且anti-IL-17A + SCF组显著优于anti-IL-17A组和SCF组($P<0.05$)。此外,anti-IL-17A还能明显减少脑组织IL-17A和IL-1β的表达($P<0.05$)。**结论** SCF联合anti-IL-17A能更好地改善脑缺血损伤和促进神经功能恢复。

[关键词] 脑缺血;炎症;白细胞介素-17;干细胞因子
[中图法分类号] R-332;R743.31;R979.5 [文献标志码] A

Effect of stem cell factor combined with anti-interleukin 17A antibody on prognosis of cerebral ischemia in mice

Lu Long[1], He Weifeng[2], Wang Yi[1], Wen Shan[1], Hu Jun[1], Shi Shugui[1] ([1]Department of Neurology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of stem cell factor (SCF) combined with anti-interleukin 17A (anti-IL-17A) antibody on the prognosis of cerebral ischemia in mice. **Methods** Mouse model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) were induced in C57BL/6 mice by inserting nylon monofilament through the right common carotid artery for 60 min followed by reperfusion. Then the mice were respectively given normal saline (NS), anti-IL-17A, SCF, anti-IL-17A + SCF through intraperitoneal injection after cerebral ischemia and reperfusion. The changes of cerebral infarct volumes, pathological injury severity and brain edema, neurological deficits, apoptosis and inflammatory response of neural cells after MCAO were observed in each group. **Results** Compared with the NS group, the cerebral infarct volume, pathological injury severity and brain edema were significantly alleviated in the other treatment groups ($P<0.05$). The neurological deficits were significantly improved ($P<0.05$), and the apoptosis of neurons was decreased in the treated groups ($P<0.05$). Furthermore, the effect of anti-IL-17A + SCF treatment was better than that of anti-IL-17A and SCF alone treatment ($P<0.05$). In addition, anti-IL-17A significantly reduced the expression levels of IL-17A and IL-1β in the brain tissues. **Conclusion** SCF combined with anti-IL-17A can better improve the cerebral ischemia injury and promote the recovery of neurological function.

[**Key words**] cerebral ischemia; inflammation; interleukin-17; stem cell factor

Corresponding author: Shi Shugui, E-mail: shishg@yeah.net

[通信作者] 史树贵,E-mail:shishg@yeah.net

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161129.1659.019.html

缺血性脑卒中因其高发病率、高致残率和高死亡率而严重威胁人类健康[1]。炎症反应是加重脑缺血继发性脑损伤的关键因素之一[2]。近年研究发现,γδT 细胞分泌的白细胞介素-17A(IL-17A)是引发脑缺血炎症级联放大反应的关键因素,其可诱导中性粒细胞、单核细胞前往缺血缺氧组织增强炎症反应[3]。Gelderblom 等[4]在小鼠脑缺血 3 h 后给予抗白细胞介素-17A 抗体(anti-IL-17A)可显著抑制炎症反应和减少脑梗死体积,同时促进神经功能恢复。干细胞因子(stem cell factor,SCF)是一种重要的造血生长因子,Zhao 等[5]研究显示,在小鼠脑缺血后 3 h 至 7 d 连续每天给予 SCF,可促进缺血缺氧区神经干细胞的增殖分化,以及梗死灶周围血管的增生。但脑缺血导致脑损伤的过程相当复杂,针对任何单一环节的治疗,不能充分有效地阻止神经细胞缺血损伤。如何有效治疗脑梗死,降低致残率仍是临床研究的一大课题。因目前尚少见联合应用 anti-IL-17A 和 SCF 治疗脑缺血相关报道,且 anti-IL-17A 和 SCF 在脑缺血治疗上发挥的修复机制不同,所以本研究旨在通过观察 anti-IL-17A 联合 SCF 对小鼠脑缺血的治疗效果,为更好地治疗脑缺血提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

实验动物为 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 25~30 g,由第三军医大学实验动物中心提供。实验过程严格遵循第三军医大学动物实验管理使用规定。小鼠用随机数字法分成假手术组($n=5$)、生理盐水(normal saline,NS)组($n=30$)、anti-IL-17A 组($n=30$)、SCF 组($n=30$)和 anti-IL-17A + SCF 组($n=30$)。在小鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)术后各组分别给予不同处理因素。

1.2 主要试剂

2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,Sigma,美国),TUNEL 试剂盒(Roche,瑞士),RNA 提取试剂盒(Qiagen,德国),cDNA 合成试剂盒(Toyobo,日本),重组小鼠 SCF(PeproTech,美国),重组小鼠单克隆抗白细胞介素-17A 抗体(clone 17F3,BioXCell,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 脑缺血再灌注模型建立 参考 Sugimori 等[6]的方法建立小鼠 MCAO 模型。术前小鼠采用 5% 水合氯醛 7 mL/kg 腹腔注射麻醉。整个手术过程用取暖灯保持小鼠体温维持在 36 ℃左右。经右侧颈总动脉用 7-0 的尼龙线栓闭塞小鼠大脑中动脉,线栓尖端距颈总动脉分叉处约 9 mm。60 min 后取出线栓,恢复右侧大脑中动脉血流。

1.3.2 神经功能评分 参考 Longa 评分法[7],采用盲法评估方式分别于小鼠 MCAO 术后 1、3、7 d 进行评分。0 分:无神经功能损伤;1 分:左侧前肢不能完全伸展;2 分:行走时小鼠身体向左侧转圈;3 分:行走时小鼠身体向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,有意识丧失。

1.3.3 TTC 染色 采用 TTC 染色法检测脑梗死体积。MCAO 术后 7 d 取出脑组织并冠状位切成 1 mm 厚度的脑片,置于 2% 的 TTC 溶液中 37 ℃孵育 20 min。然后经 4% 多聚甲醛固定 12 h 后照相,用 Image J 软件计算脑梗死体积。

1.3.4 HE 染色 采用 HE 染色行脑组织病理学检查,MCAO 术后 7 d 小鼠深度麻醉后,给予 NS 和 4% 多聚甲醛心脏灌流后取脑,脱水并石蜡包埋,将脑组织冠状切为 5 μm 厚的切片,然后进行常规 HE 染色,并在显微镜下观察各组切片的组织形态学。

1.3.5 脑组织含水量测定 深度麻醉小鼠后取脑,分别将小脑及两个大脑半球快速用电子天平称量得湿质量,置于 100 ℃烤箱 24 h 后称量得干质量,脑组织水含量 =(湿质量 - 干质量)/湿质量 ×100%。

1.3.6 神经细胞凋亡检测 小鼠 MCAO 术后 7 d 取脑进行石蜡切片,按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书步骤染色,分别选择缺血半暗带 3 个 0.1 mm × 0.1 mm 区域计数 TUNEL 阳性细胞,取平均值。

1.3.7 RT-PCR MCAO 术后 7 d 提取脑组织 IL-17A 和 IL-1β 总 RNA。通过 RT-PCR 制备 cDNA,利用 PCR 检测目的基因表达情况。所用引物见表 1。

表 1 引物序列及产物长度

基因	引物序列(5 →3)	产物长度(bp)
IL-17A	上游 CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC 下游 AGCTTTCCCTCCGCATTGACACAG	143
IL-1β	上游 CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG 下游 GATCCACACTCTCCAGCTGCA	152
GAPDH	上游 CGTGCCGCCTGGAGAAAC 下游 AGTGGGAGTTGCTGTTGAAGTC	138

1.3.8 给药方法 按参考文献[3, 5]的研究方法给药。SCF 组:术后 3 h 给予 SCF 皮下注射,给药剂量为200 μg/(kg · d),连续给药 7 d。anti-IL-17A 组:每只单次腹腔注射 anti-IL-17A 抗体 50 μg,MCAO 术后 3、12 h 各 1 次;anti-IL-17A + SCF 组:按 anti-IL-17A 组和 SCF 组处理方法同时给予;NS 组:给予等体积生理盐水腹腔注射。

1.4 统计学分析

数据使用 Graph Pad Prism 6.0c 统计软件进行统

计学分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较行单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结果

2.1　各组小鼠生存率观察

接受不同处理因素后,观察各组小鼠 MCAO 术后 1、3、7 d 各时间点的生存率,在术后第 1 天时,各组生存率无差异,但在第 3、7 天时,anti-IL-17A + SCF 组生存率最高,其次是 anti-IL-17A 组和 SCF 组,NS 组生存率最低(表 2)。

表 2　各组小鼠生存率($n = 30$,%)

组别	1 d	3 d	7 d
NS 组	100	86.7	66.7
anti-IL-17A 组	100	90.0	83.4
SCF 组	100	90.0	80.0
anti-IL-17A + SCF 组	100	93.4	90.0

2.2　对脑梗死体积和脑组织病理损伤的影响

MCAO 术后 7 d 观察到各组小鼠均出现不同程度的脑梗死灶和组织病理损伤。与 NS 组相比较,anti-IL-17A、SCF 和 anti-IL-17A + SCF 组脑梗死体积均显著减少($P < 0.05$),且 anti-IL-17A + SCF 组显著小于 anti-IL-17A 组和 SCF 组($P < 0.05$,图 1A、B)。脑梗死区 HE 染色显示病理损伤最严重的为 NS 组,可见大量神经细胞水肿坏死,炎症细胞浸润明显,其次是 anti-IL-17A、SCF 组,损伤程度最轻的为 anti-IL-17A + SCF 组(图 1C)。

2.3　神经功能评分

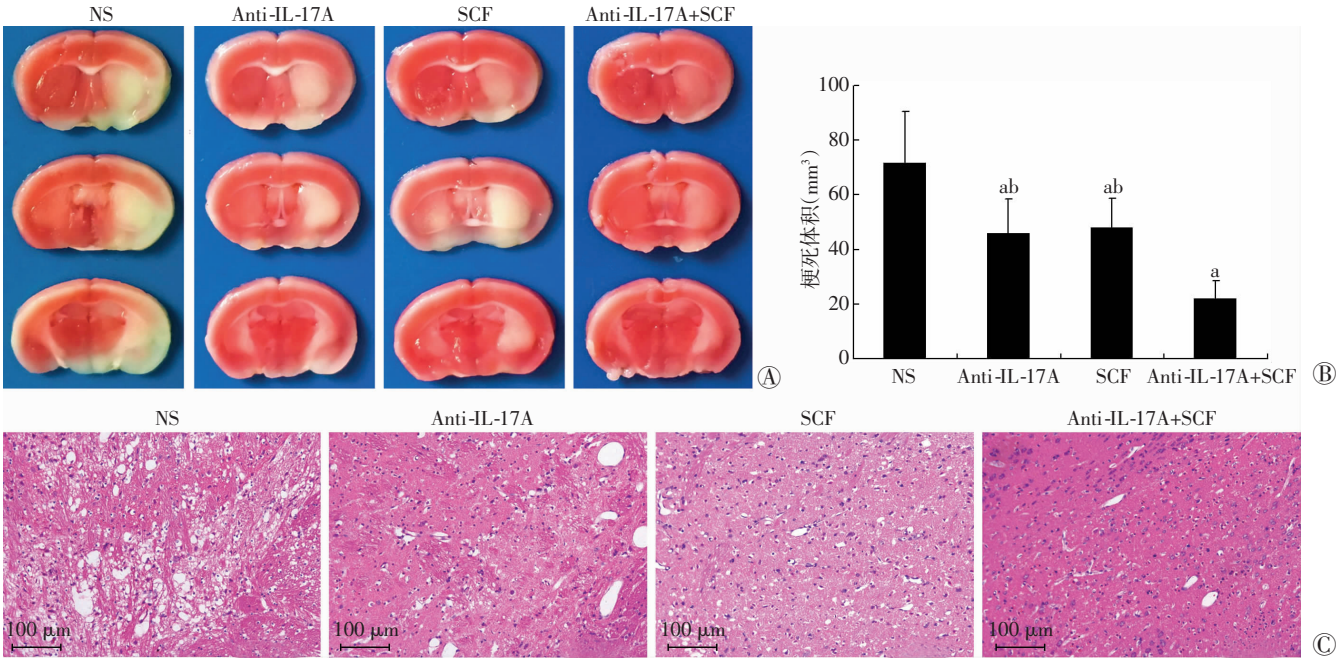
MCAO 术后 1、3、7 d 进行神经功能评分,结果显示,各模型组均表现出了严重的神经功能损伤。在第 7 天时,与 NS 组相比较,经 anti-IL-17A、SCF 和 anti-IL-17A + SCF 干预后的小鼠神经功能症状得到明显缓解($P < 0.05$),且 anti-IL-17A + SCF 组缓解程度优于 anti-IL-17A 组和 SCF 组(图 2A)。

2.4　脑水肿检测

MCAO 术后各组均出现不同程度的脑水肿,于术后 3 d 达高峰。在第 3 天时与 NS 组相比较,anti-IL-17A、SCF 和 anti-IL-17A + SCF 组脑水肿得到明显缓解($P < 0.05$),且 anti-IL-17A + SCF 组比 anti-IL-17A 组和 SCF 组缓解更明显($P < 0.05$,图 2B)。

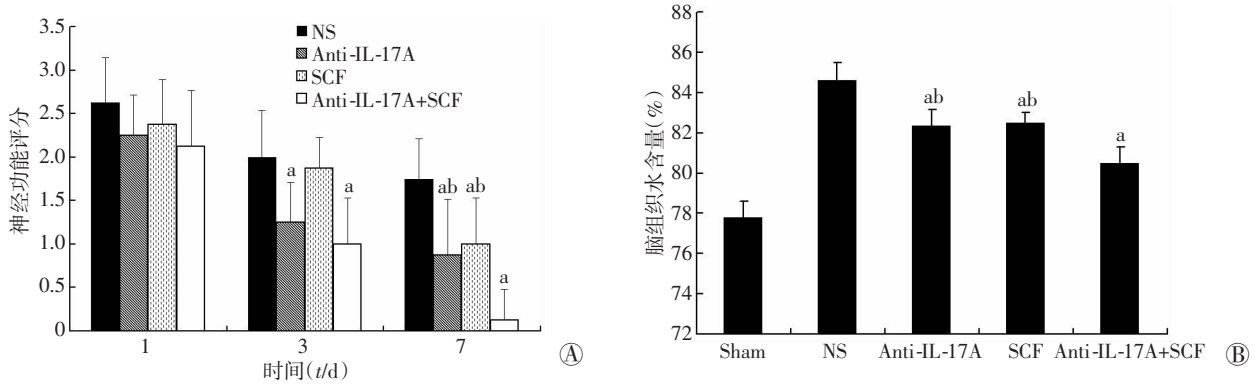
2.5　脑缺血半暗带区神经凋亡细胞检测

MCAO 术后 7 d 采用 TUNEL 染色法检测各组缺血半暗带区神经细胞凋亡情况(图 3A)。与 NS 组比较,anti-IL-17A、SCF 和 anti-IL-17A + SCF 组 TUNEL 阳性细胞均显著减少($P < 0.05$),且 anti-IL-17A + SCF 组显著少于 anti-IL-17A 组和 SCF 组($P < 0.05$,图 3B)。



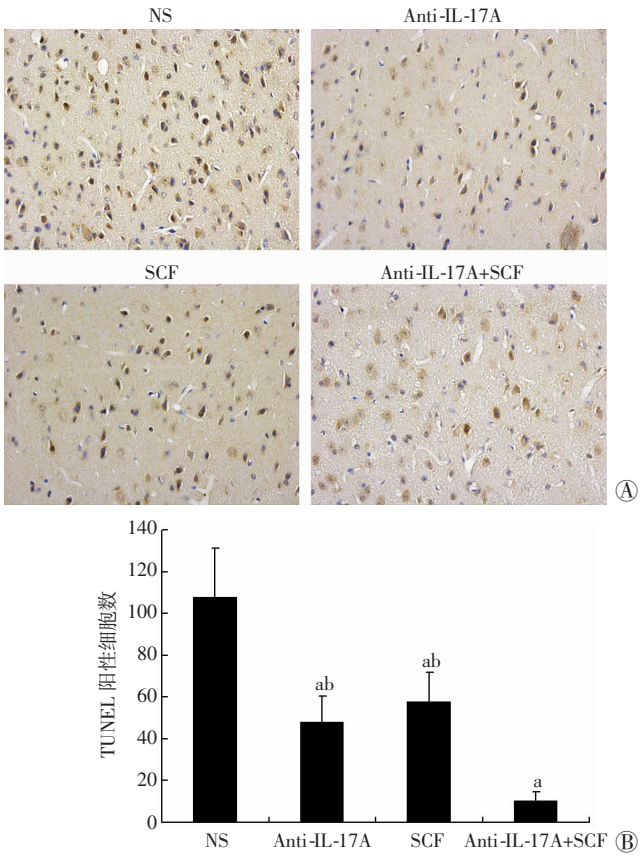
A:小鼠脑组织 TTC 染色结果;B:脑梗死体积分析结果;C:脑梗死区 HE 染色结果(200) a:$P < 0.05$,与 NS 组比较;b:$P < 0.05$,与 anti-IL-17A + SCF 组比较($n = 5$)

图 1　MACO 术后 7 d 各组脑组织 TTC 染色、梗死体积分析和 HE 染色



A:神经功能评分结果($n=8$);B:脑组织水含量检测结果($n=4$); a: $P<0.05$,与 NS 组比较;b:$P<0.05$,与 anti-IL-17A+SCF 组比较

图 2 各组小鼠 MCAO 术后神经功能评分和脑组织水含量检测

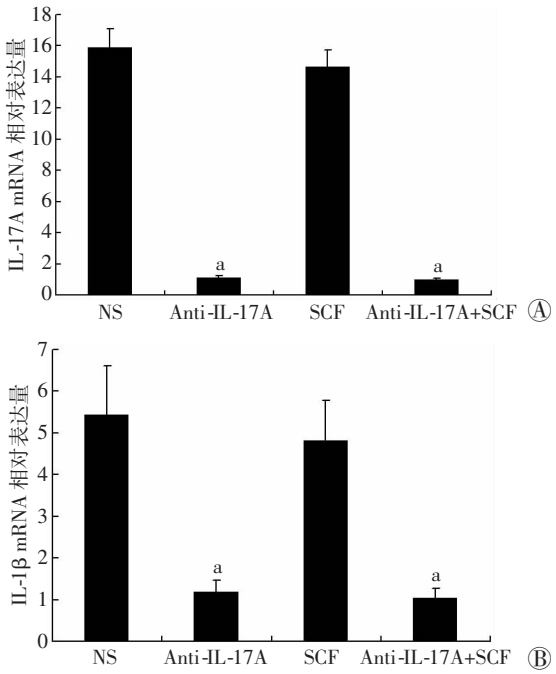


A:TUNEL 染色检测结果(×400);B:各组 TUNEL 阳性细胞数分析结果 a:$P<0.05$,与 NS 组比较;b:$P<0.05$,与 anti-IL-17A+SCF 组比较($n=5$)

图 3 MCAO 术后 7 d 小鼠脑梗死缺血半暗带区神经细胞凋亡检测

2.6 炎症因子 IL-17A、IL-1β 检测

RT-PCR 检测小鼠 MCAO 术后 7d 时 IL-17A 和 IL-1β 表达情况。与 NS 组相比,IL-17A 和 IL-1β 在 anti-IL-17A 组和 anti-IL-17A+SCF 组均明显减少($P<0.05$),在 SCF 组无显著变化($P>0.05$,图 4A、B)。



A:IL-17A;B:IL-1β a:$P<0.05$,与 NS 组比较($n=6$)

图 4 RT-PCR 检测各组 IL-17A 和 IL-1βmRNA 的表达情况

3 讨论

缺血性脑卒中已成为患者死亡和残疾的主要原因之一,且发病率在逐年上升[8]。炎症反应在脑缺血继发性脑损伤的发生发展过程中发挥着重要的作用[9]。脑缺血在发生数分钟内就启动了炎症级联反应,并最终导致了缺血核心区域不可逆地损伤。然而梗死核心区周围的缺血半暗带并未完全坏死,如果及时地给予抗炎,促进血管、神经元的修复等治疗可减轻脑缺血损伤[10]。因此,该实验联合应用 anti-IL-17A 和 SCF,从不同的修复机制联合治疗脑缺血,观察能否得到更佳

的治疗效果。已有研究发现,产生 IL-17A 的细胞很多,包括 γδT 细胞、αβ T 细胞、小神经胶质细胞等[11]。Shichita 等[12]证实,参与脑缺血损伤的 IL-17A 主要来自 γδT 细胞。IL-17A 是脑缺血炎症反应中起重要作用的炎症因子之一,脑缺血发生后开始逐渐增多,第 3 天达高峰[13],其可诱导单核细胞、中性粒细胞透过血脑屏障进入脑组织释放大量炎症因子,引发炎症级联放大反应导致过度炎症,且可增强神经毒性因子如 IL-1β、TNF-α 和基质金属蛋白酶等的产生,从而破坏血脑屏障和促进神经元凋亡。Gelderblom 等[4]研究发现小鼠脑缺血抗 IL-17A 单克隆抗体治疗或 IL-17A 基因敲除均可减轻脑梗死体积和改善神经功能。

SCF 是一种造血生长因子,在缺血性脑卒中后大量上调。SCF 与受体 c-Kit 结合可促进骨髓内皮祖细胞的生存、黏附和动员。内皮祖细胞在缺血性脑卒中后可促进血管再生、神经发生及改善神经功能[14]。体外实验研究表明缺氧情况下 SCF 可诱导小鼠皮质培养细胞神经发生,还可刺激培养细胞和整体动物皮质侧脑室外侧壁的室下带和海马齿状回的颗粒下层的神经发生[15]。在动物体内实验中,Zhao 等[5]在大鼠脑缺血后给予 SCF,术后 7 d 时观察到脑梗死体积减轻和神经功能改善。但 SCF 促进血管、神经发生的作用相对缓慢,所以我们选择 MCAO 术后 7 d 为本实验观察终点。

本研究分别应用 SCF 和 anti-17A 均可减轻脑损伤,但单独应用 SCF 和 anti-17A 脑保护作用有限,联合应用 SCF 和 anti-17A 可更有效地减轻脑梗死体积和神经细胞凋亡,更好地促进神经功能恢复。

综上所述,联合应用 SCF 和 anti-17A 既可抑制脑缺血后的炎症反应,又可促进梗死灶周围神经干细胞的增殖分化和血管的增生,起到了协同的作用,最终更好地减少了脑梗死体积和促进了神经功能的恢复,但 SCF + anti-17A 在脑保护过程中的相互作用机制以及对脑缺血远期恢复效果仍待进一步研究。

参考文献:

[1] Macrez R, Ali C, Toutirais O, *etal*. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies [J]. Lancet Neurol, 2011, 10(5): 471 – 480. DOI:10.1016/S1474-4422(11)70066-7

[2] Fu Y, Liu Q, Anrather J, *etal*. Immune interventions in stroke[J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(9): 524 – 535. DOI:10.1038/nrneurol.2015.144

[3] Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, *etal*. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury[J]. Nat Med, 2009, 15(8): 946 – 950. DOI:10.1038/nm.1999

[4] Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, *etal*. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke[J]. Blood, 2012, 120(18): 3793 – 3802. DOI:10.1182/blood-2012-02-412726

[5] Zhao L R, Singhal S, Duan W M, *etal*. Brain repair by hematopoietic growth factors in a rat model of stroke[J]. Stroke, 2007, 38(9): 2584 – 2591. DOI:10.1161/STROKEAHA.106.476457

[6] Sugimori H, Yao H, Ooboshi H, *etal*. Krypton laser-induced photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion without craniectomy in mice[J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2004, 13(3): 189 – 196. DOI:10.1016/j.brainresprot.2004.06.001

[7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *etal*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 – 91. DOI:10.1161/01.str.20.1.84

[8] 李惠允. 短暂性脑缺血发作患者的相关危险因素及引起脑梗死的风险预测[D]. 第三军医大学, 2015.
Li Huyun, The risk factors of transient ischemic attack patients and its risk of stroke[D]. Third Military Medical University, 2015

[9] Brea D, Agulla J, Rodríguez-Yáñez M, *etal*. Regulatory T cells modulate inflammation and reduce infarct volume in experimental brain ischaemia[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(8): 1571 – 1579. DOI:10.1111/jcmm.12304

[10] Perez-de-Puig I, Miró-Mur F, Ferrer-Ferrer M, *etal*. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke[J]. Acta Neuropathol, 2015, 129(2): 239 – 257. DOI:10.1007/s00401-014-1381-0

[11] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, *etal*. Functional specialization of interleukin-17 family members [J]. Immunity, 2011, 34(2): 149 – 162. DOI:10.1016/j.immuni.2011.02.012

[12] Shichita T, Konoeda F, Yoshimura A. Role of T lymphocytes in ischemic brain injury [J]. Clinical neurology, 2010, 50(11): 878 – 880. DOI:10.5692/clinicalneurol.50.878

[13] Zhang J, Mao X, Zhou T, *etal*. IL-17A contributes to brain ischemia reperfusion injury through calpain-TRPC6 pathway in mice[J]. Neuroscience, 2014, 274: 419 – 428. DOI:10.1016/j.neuroscience.2014.06.001

[14] Doycheva D, Shih G, Chen H, *etal*. Granulocyte-colony Stimulating Factor in Combination with Stem Cell Factor Confers Greater Neuroprotection after Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Neonatal Rats than a Solitary Treatment [J]. Translational Stroke Research, 2012, 4(2): 171 – 178. DOI:10.1007/s12975-012-0225-2

[15] Jin K, Mao X O, Sun Y, *etal*. Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3): 311 – 319. DOI:10.1172/JCI15251

(**收稿**:2016-09-22;**修回**:2016-09-30)

(编辑 王小寒)