DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.007
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

文章编号:1000-5404(2000)02-0115-04

论著

脑缺血再灌注 ICAM-1 的表达与神经元损伤

周华东,张莉莉,陈曼娥 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所脑血管病医院二科,重庆 400042)

提 要 目的:观察细胞间粘附分子 ICAM-1 mRNA 及蛋白在大鼠脑缺血再灌注不同时程脑组织中的表达与脑组织神经元的损伤。方法:45只雄性 Wistar 大鼠随机分为3组:正常组、假手术组、缺血 2h 再灌注 2、4、10、24、48、96、168 h 组,分别进行原位杂交、免疫组织化学和组织 HE 染色。结果:大脑中动脉缺血再灌注 2 h,局部脑组织 ICAM-1 mRNA 表达开始升高,再灌注 10 h 达高峰,持续 168 h;ICAM-1 蛋白表达于再灌注 2 h 开始升高,至 48 h 达到高峰,持续 168 h 以上。结论:脑缺血再灌注后 ICAM-1 表达增高,介导了粒细胞与脑血管内皮细胞的粘附增强,和脑缺血再灌注损伤关系密切。

关键词 脑缺血再灌注;细胞间粘附分子-1;转录
中图法分类号 R619.9;R743.31 文献标识码 A

Expression of intercellular adhesion molecule-1 and neuronal damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats

ZHOU Hua-dong, ZHANG Li-li, CHEN Man-e (Department of Neurology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042)

Abstract Objective: To investigate the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and neuronal damage in cerebral foci after cerebral ischemia/reperfusion in rats. Methods: Forty-five male Wistar rats were randomized into the normal control, sham-operated and cerebral ischemia/reperfusion groups. *In situ* hybridization, histochemistry, immunohistochemistry and histological techniques were used to determine expression of ICAM-1 and its mRNA and neuronal damage in ischemic brain tissue at different time phases after middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2h in rats. Results: The expression of ICAM-1 and its mRNA started to increase at the 2nd h, peaked at the 12th and 48th h respectively after reperfusion. The high levels of expression of ICAM-1 and its mRNA maintained for 96 and 148 h respectively. Conclusion: The expression of ICAM-1 is increased after cerebral ischemia/reperfusion, which participates in the adhesion between neutrophils and capillary endothelial cells. This indicates that ICAM-1 is closely associated with the neuronal damage after cerebral ischemia/reperfusion.

Key words cerebral ischemia/reperfusion; intercellular adhesion molecule-1; transcription; rat

局部脑缺血后白细胞向缺血区浸润,引发组织炎症反应,造成局部脑损害。白细胞向缺血区浸润的一个主要原因是血管内皮细胞和白细胞表面粘附分子表达增高,致使白细胞贴壁、滚动、游离出血管外。在这一过程中,细胞间粘附分子-1(Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)起到了关键的作用。本文用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,原位杂交的方法观察测定 ICAM-1 转录水平的变化,免疫组织化学方法测定 ICAM-1 蛋白表达情况,同时行普通 HE 染色光镜观察神经元损伤情况,以探讨 ICAM-1 在缺血性脑损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

选用体重 250~280 g 雄性 Wistar 大鼠 45 只,随机分组情况如下:对照组(n=5);假手术组(n=5);缺血 2 h 再灌注 2、4、8、24、48、96、168 h,每个时相点各 5 只大鼠。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670268)
作者简介:周华东(1955.11),男,安徽省蚌埠市人,博士,副教授,主要从事缺血性脑血管疾病方面的研究,发表论文31篇。
电话:(023)68757874
收稿日期:1999-11-10;修回日期:1999-12-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 缺血再灌注模型制作和标本制备

德国产尼龙鱼线，直径0.2 mm，顶端烫成直径约0.25 mm的光滑圆球状，用肝素处理后晾干备用。

1%戊巴比妥钠按35 mg/kg进行腹腔注射麻醉，分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)，结扎并切断ECA及其分支，由ECA残端插入已制备好的栓线，沿ECA，CCA分叉部和ICA轻柔推进约2.0 cm时到达ICA颅内分叉部即MCA起始处，阻断流入MCA的血流。再灌注组于缺血2 h后拔除栓线。假手术组操作同上，但仅分离右侧颈总动脉。各组手术时间均在30 min内完成。术中及缺血期间采用反馈式电热毯保持肛温(37±0.2)℃。

模型成功的标志是动物苏醒后出现手术同侧（右侧的）Horner征和手术对侧(左侧)肢体瘫痪，表现为左前肢不能伸出、行走时向左侧倾倒或按逆时针方向转圈。入选动物在取材时发现有蛛网膜下腔出血的，则弃置不用。

动物按上述分组情况到规定时间腹腔注射戊巴比妥钠麻醉，经左心室主动脉插管灌注生理盐水200 ml，然后用Zamboni固定液200 ml灌注固定，取脑组织投入Zamboni固定液，于4℃下继续固定20 h，放入30%蔗糖溶液(用4%多聚甲醛配制)过夜，取出标本置于恒冷切片机上经下丘脑中央部行全脑连续冠状切片(厚20 μm)。

1.3 原位杂交方法检测ICAM-1 mRNA的表达

1.3.1 cDNA探针制备 鼠ICAM-1 cDNA质粒由日本T.horiuchi博士惠赠，转化到大肠杆菌(JM109)中扩增，用酚氯仿进行质粒提取和纯化，加入内切酶*BamH*Ⅰ进行酶切，低熔点琼脂糖凝胶法回收目的片段，随机引物法地高辛标记(标记试剂盒购于Boehringer mannheim公司)。

1.3.2 原位杂交操作步骤 切片经0.3% TritonX-100漂洗、蛋白酶K消化、预杂交后，在探针浓度为5 ng/μl的杂交液中于43℃下孵育20 h，1∶800的抗地高辛抗体在室温下反应12 h，经NBT/BCIP显色系统染色后得到结果。杂交前所用器械均经过RNA酶处理。原位杂交阴性对照采用以下3种方法：①杂交前将切片用20 μg/ml RNA酶37℃下预处理30 min；②杂交液中未加探针；③未加抗地高辛抗体。相邻切片作HE染色。

1.4 免疫组织化学方法检测ICAM-1的表达

上述冰冻切片经H_2O_2处理10 min后，用非免疫血清封闭15 min。一抗为小鼠抗大鼠ICAM-1单克隆抗体(购于武汉博士德公司)，工作浓度为1∶100，室温下过夜进行抗原抗体反应。ABC试剂盒按说明书进行操作。PBS漂洗后，DAB显色系统进行闭光显色，光镜观察。阴性对照用PBS代替一抗进行孵育。

1.5 数据分析

在10×10光镜下，以阳性染色的单个内皮细胞或内皮细胞簇为一个阳性血管标记，每例观察切片1张，于血管丰富区随机选取5个相互非重叠视野进行观察，并做定量图象分析（MAS-图象分析系统，重庆大学），测出每平方毫米组织切片的阳性微血管数，进行统计学分析，数据以$\bar{x}\pm s$表示，用t检验。光镜下观察中性白细胞浸润及病理形态学变化。

2 结果

2.1 ICAM-1 mRNA阳性反应的变化

缺血2 h再灌注不同时间组大鼠，其缺血区均有不同程度ICAM-1 mRNA阳性反应的血管，与缺血侧相比有显著性差异；缺血2 h再灌注2 h大鼠缺血侧ICAM-1 mRNA表达开始升高，至再灌注10 h达高峰，其后水平略有下降，持续至再灌注168 h仍有表达。阳性反应血管以微血管为主，阳性染色见于微血管的内皮细胞胞浆内，呈紫蓝色，主要分布于额顶叶皮层及尾壳核区域，这与缺血灶的部位相一致。对照组与假手术组可见少量的、低表达的ICAM-1 mRNA阳性血管，见表1，图1。

表1 对照组、假手术组及缺血再灌注组大鼠脑组织ICAM-1 mRNA阳性血管数(/mm², $n=5$)

Tab 1 Number of ICAM-1 mRNA positive vasa in control, sham operation and ischemia-reperfusion group (/mm², $n=5$)

Group	Time points of ischemia-reperfusion(h)						
	2	4	10	24	48	96	168
Control	51.6±6.2	72.4±14.4	78.3±13.8	63.2±9.5	74.1±12.2	64.6±10.4	58.9±13.4
Sham operation	60.2±8.4	69.3±12.3	70.0±10.1	67.5±12.7	76.6±13.5	57.1±12.6	64.3±10.1
Ischemia-reperfusion	187.0±41.6*△	449.3±53.1*△	1108.4±80.3*△	860.5±80.3*△	708.0±79.5*△	604.3±66.1*△	574.8±75.3*△

*：$P<0.01$ *vs* control；△：$P<0.01$ *vs* sham operation

2.2 ICAM-1免疫染色阳性的变化

缺血2 h再灌注不同时间组大鼠，其缺血区均有不同程度ICAM-1阳性反应的血管，与缺血侧相比有显著性差异；缺血2 h再灌注2 h大鼠缺血侧ICAM-1表达开始升高，至再灌注48 h达高峰，其后水平逐渐有所下降，持续至再灌注168 h仍保持较高水平，主要分布在梗死灶周围区域。阳性反应血管以缺血区的微血管为主，表现为血管壁呈棕黄色深染。对照组与假手术组双侧未见有明显的ICAM-1阳性染色血管，见图2。

2.3 脑缺血再灌注后缺血区中性白细胞浸润及细胞形态的变化

脑缺血2 h开始出现轻度的神经元缺血性改变，至再灌注24 h神经元缺血性改变和白细胞浸润改变明显；再灌注72 h，缺血区神经元表现为严重的缺血性损伤，缺血周围组织与缺血区边界明显，白细胞大量聚集在缺血梗死周围区，这一现象出现在ICAM-1表达高峰的后面，提示ICAM-1参与了白细胞聚集和神经元损伤机制；再灌注168 h坏死组织区域逐渐扩大，有的出现

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

缺血区腔穴, 这与 ICAM-1 的表达情况相一致。对照组和假手术组未见脑组织有白细胞浸润及神经元损伤。

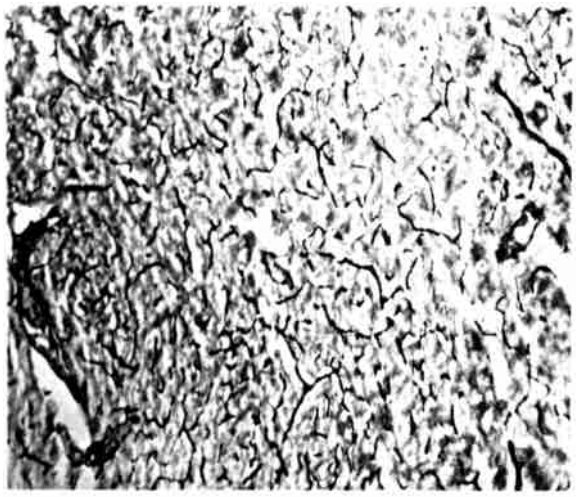


图 1　再灌注 10 h 脑血管内皮细胞 ICAM-1 mRNA 的表达 (NBT/BCIP× 100)

Fig 1　Expression of ICAM-1 mRNA in endothelial cells of cerebral vessels 10 h after reperfusion　(NBT/BCIP× 100)



图 2　再灌注 48 h 脑血管内皮细胞 ICAM-1 的表达　(ABC× 200)

Fig 2　Expression of ICAM-1 in endothelial cells of cerebral vessels 48 h after reperfusion　(ABC× 200)

3　讨论

脑缺血再灌注后快速恢复的血流是加重缺血区损伤的重要原因, 正常情况下, 中性粒细胞及血管内皮细胞表面有少量 ICAM-1 表达, 但在脑缺血等病理情况下, ICAM-1 明显上调[1], 使得白细胞与血管内皮细胞间粘附力增加, 进而贴壁、滚动、嵌塞微血管, 造成局部血液动力学环境改变; 白细胞跨过内皮细胞间隙进入周围组织, 释放大量炎性介质和细胞因子, 造成缺血区域的脑组织损伤, 并吸引更多的白细胞进入组织, 形成恶性循环。本实验中对照组及假手术组动物双侧皮质 ICAM-1 mRNA 呈低水平表达, ICAM-1 免疫染色未见有明显阳性反应; 各组大鼠缺血对侧的 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达较少, 随再灌注时间的延长, 无明显上升趋势。缺血 2 h 再灌注 2 h 组动物缺血侧 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达均开始升高, 再灌流 10 h, ICAM-1 mRNA 阳性反应最强, 达到高峰, 其后略有下降, 至再灌流 168 h 后仍有表达 ; 再灌流 48 h, ICAM-1 阳性反应达到高峰, 其后逐渐下降, 至再灌流 168 h 后仍保持较高水平, 这与 Zhang 等[1]的研究结果相一致。

ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 阳性血管表达部位主要分布在缺血侧额叶、顶叶皮质及尾状核与壳核外侧部, 与缺血灶部位相一致。除缺血部位血管内皮细胞外, 某些部位如海马 CA1 区、额、顶叶皮层及尾壳核内的某些神经核团也有阳性表达。参与缺血再灌注脑损伤的粘附分子除 ICAM-1 外还有 E- 选择素[2] 、P- 选择素[3] 、CD18[4]等, 这些粘附分子相互协调, 共同作用, 介导着白细胞和内皮细胞间的粘附。

应用抗粘附分子抗体治疗缺血性脑血管病的尝试也取得了令人瞩目的成绩。1993 年 Bowes 等[5]报道在鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤中使用 ICAM-1 抗体减少了脑缺血性损伤。1995 年, Zhang 等[6]发现在阻断大鼠大脑中动脉 2 h 再灌注 1 h, 使用 ICAM-1 单克隆抗体能使缺血性损伤面积明显缩小, 而在大脑中动脉永久阻断无再灌注时则无此作用。近来研究发现 ICAM-1 的单克隆抗体能选择性地减少神经细胞凋亡, 这可能是其脑保护作用机制之一[7]。

总之, 脑缺血再灌注时白细胞与内皮细胞间的粘附是导致缺血区组织损伤的主要原因, 粘附分子介导了这两种细胞间的粘附作用。有效阻断这一过程, 减轻缺血性脑损伤, 是目前治疗缺血性脑血管病的一条有效途径。

参考文献

[1] Zhang R L, Chopp M, Zaloga C, *et al*. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat[J]. Brain Research, 1995, 682(1):182－186.

[2] Limdsberg P J, Carpen O, Paetau A, *et al*. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in ischemic stroke[J]. Circulation, 1996, 94(5):939-943.

[3] Geng J G, Bevilacoua M P, Moore K L, *et al*. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140[J]. Nature, 1990, 343(6260):757－760.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[4] Catsuo Y, Onodera H, Shiga Y, *et al*. Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. Brain Res, 1994, 656(2):344—350.
[5] Bowes M P, Zivin J A, Rothleic R. Monoclonal antibody to the ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model[J]. Exp Neurol, 1993, 119(1):215—219.
[6] Zhang R L, Chopp M, Jiang N, *et al*. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rats[J]. Stoke, 1995, 26(5):1 438—1 444.
[7] Chopp M, Li Y, Jiang N, *et al*. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16(4):578—584.

（编辑　谢义霞）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)02-0118-02

腭裂患者术后语音状况的调查

The investigation of postoperation of cleft palate

陈渝斌[1]，夏　田[2]，石　冰[2]　（[1] 第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所口腔科，重庆 400042；[2] 华西医科大学口腔医学院，成都 610041）

治疗先天性腭裂疾患的主要目的是恢复患者的正常语音。然而目前大多数腭裂患者术后仍有明显的语音障碍，既是由于术后未能形成完全的腭咽闭合，也是一些不良代偿发音习惯或其他因素(如智力、听力障碍、牙畸形等)所造成。本文通过对在华西医科大学口腔颌面外科接受过腭裂手术的部分复诊患者的语音评价资料进行分析，以期为指导临床腭裂手术治疗及术后语音评价、治疗提供依据。

1　材料与方法

本研究收集了自 1989 年在华西医科大学口腔医院复诊的腭裂术后患者的语音评价资料。所有患者均在华西医科大学口腔医院接受手术整复治疗。语音评价年龄 4.5～22 岁。患者在手术后数月到数年曾到华西医科大学口腔医院复诊接受语音评价。纳入标准为：①腭裂患者不伴有已知的综合症或明显智力发育障碍；②腭裂手术为一次完成，无能引起明显漏气的口鼻腔瘘；③未接受过腭咽部Ⅱ期手术；④无明显听力障碍。

共有 276 例患者符合上述标准，其中男性 161 例，女性 115 例，男女性别及腭裂分类比例见表 1。

表 1　腭裂患者男女性别及腭裂临床分类比例

	单侧Ⅲ度	双侧Ⅲ度	Ⅱ度	合计
男	80	22	59	161
女	62	17	36	115
合计	114	39	95	276

语音评价包括以下几个部分：

1.1　语音状况综合评价

耳听评价患者说话时的发音质量和发音情况。分为正常或基本正常(可接受)，发音异常(轻度发音障碍和明显发音障碍)2 档。基本正常指患者在正常说话状态下语音质量和发音情况基本无异常，轻度发音障碍指患者发音时可听及少许鼻音或个别其他发音异常，明显发音障碍指患者说话时有明显鼻音及其他发音异常。

1.2　发音测验

分别检测患者在发每一个元音和辅音时是否正常，是否有代偿性发音、音遗漏、音代替或其他异常发音。

1.3　腭咽闭合情况

通过听音、鼻听音、冷镜和鼻咽纤维镜等方法临床评价患者的语音质量(包括过度鼻音和过低鼻音)和发音的鼻漏气的量来综合评价患者发音时的腭咽闭合状况。结果分 3 档：完全腭咽闭合；轻度腭咽闭合不全，轻度过度鼻音伴轻度鼻漏气；明显腭咽闭合不全，明显过度鼻音伴明显鼻漏气。

2　结果

手术年龄在 3 岁以下的患者的术后语音正常或基本正常率为 70.4%（19/27），高于手术年龄大于 3 岁组的 34.9%（87/249），见表 2。

表 2　手术年龄 3 岁前和 3 岁后术后语音的比较

	正常或基本正常	发音异常	合计(人)
手术年龄 3 岁以下(含 3 岁)	19	8	27
手术年龄 3 岁以上	87	162	249
合计	106	170	276

作者简介：陈渝斌(1971.8)，男，重庆市人，硕士，住院医师，主要从事口腔颌面外科方面的研究。电话：(023)68757368
收稿日期：1998-12-25；修回日期：1999-08-06

（下转 122 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net