

· 基础研究 ·

局灶性脑缺血大鼠胰岛素样生长因子-1 在脑和肝脏中的变化

李川 范建中 吴红瑛 魏轶

【摘要】目的 分别观察脑缺血再灌注损伤不同时期胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 在脑和肝脏的表达状况,探讨 IGF-1 在局部及外周的变化特点。**方法** SD 大鼠 64 只,雌雄各半,随机分为假手术组与脑缺血组,每组大鼠 32 只。用大脑中动脉线栓法制备脑缺血模型,利用免疫组化方法,动态观测 IGF-1 在缺血侧大脑皮质和肝实质表达情况的变化。**结果** 与假手术组比较,脑缺血组脑组织中阳性细胞数明显增多,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);脑缺血组中,脑缺血 3 d 组与本组其它时间组比较,阳性细胞数明显增多,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与假手术组各时间组比较,脑缺血 7 d 组肝实质细胞中的阳性表达显著增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);脑缺血各时间组相互比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),其中脑缺血 7 d 组阳性表达率最高为 87.5%。**结论** 脑损伤后,脑内 IGF-1 被激活上调,其表达增强,到第 3 天达到高峰。外周 IGF-1 体液调节反应较迟,从第 7d 开始,IGF-1 体液调节能力有一定程度的恢复,肝脏分泌 IGF-1 增加。

【关键词】 局灶性脑缺血; 大鼠; 胰岛素样生长因子-1

Changes in insulin-like growth factor-1 levels in the brains and livers of rats after cerebral ischemic injury

LI Chuan, FAN Jian-zhong, WU Hong-ying, WEI Yi. Department of Rehabilitation Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: FAN Jian-zhong, Email: fjz@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe dynamically the expression of insulin-like growth factor (IGF-1) in the brain and liver, and to explore changes in IGF-1 levels. **Methods** The thread method was used to establish middle cerebral artery occlusion in rats. The expression of IGF-1 on the ischemic side of the cerebral cortex and in the liver was observed dynamically using immunohistochemical techniques. **Results** The number of IGF-1-positive cells increased significantly, peaking on the 3rd day in the cortex and the 7th day in the liver. **Conclusion** The expression of IGF-1 was upregulated in the brain after the experimental cerebral ischemia; peripheral humoral regulation of IGF-1 responded more slowly and recovered to some extent at the 7th day after cerebral ischemia.

【Key words】 Focal cerebral ischemia; Rats; IGF-1

胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 是一种分子量为 7649 的单链多肽,含有 70 种氨基酸,是一种重要的神经生长因子,对神经组织具有多方面的营养、保护和修复等非特异性作用,在缺血再灌注损伤中起重要保护作用。生物体 IGF-1 主要由肝脏合成和分泌,包括脑在内的部分组织也可合成少量 IGF-1。由于血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的存在,所合成的 IGF-1 不进入血液循环。脑缺血发生后,IGF-1 在脑内的表达增加,发挥非特异性的神经保护作用。同时,在脑缺血损伤后 BBB 通透性增加,血液中 IGF-1 转移至脑内,IGF-1 在生物体内发生再分布^[1,2]。目前报道较多的是脑缺血再灌注后 IGF-1 在脑内变化情况,而 IGF-1 在肝脏中的表达则较少文献报道。本研究采用大脑中动脉阻塞法 (middle cerebral

artery occlusion, MCAO) 制备脑缺血再灌注模型,通过动态观察脑缺血再灌注损伤不同时期 IGF-1 在脑和肝脏的表达,探讨 IGF-1 在局部及外周变化特点。

材料与方法

一、实验材料

选取健康 SD 大鼠 64 只,雌雄各半,体重 250 ~ 330 g,由南方医科大学实验动物中心提供,室温、常湿饲养,普通饲料,自由饮水。质量合格证号: SCXK (粤)2006A051。IGF-1 一抗由美国 NeoMarker 公司公司提供;二抗、DAB 显色试剂盒由北京中杉生物技术有限公司提供;尼龙线直径 0.26 mm,经显微操作烧制而成,头端膨大成球状,直径为 (0.34 ± 0.22) mm,由北京沙东生物技术有限公司提供;日产 Olympus 光学显微镜和 Olympus 数码相机。

二、实验方法

1. 动物分组:将 64 只大鼠随机分为假手术组和脑

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院康复医学科

通讯作者:范建中,Email: fjz@fmmu.edu.cn

缺血组,每组 32 只。2 组均于缺血再灌注 2 h 后根据观察时间点的不同分为 2 h 组、1 d 组、3 d 组、7 d 组,每个时间点 8 只。

2. 局灶性脑缺血再灌注模型制备:脑缺血组参照廖维靖等^[3]中动脉线栓方法制备大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型。大鼠用 10% 水合氯醛(0.35 ml/100 g 体重)腹腔注射麻醉,大鼠仰卧位固定于手术台上,颈正中切口,长 1.6~1.9 cm,暴露右侧颈总动脉和颈外动脉,5/0 丝线结扎颈外动脉,分离与颈总动脉伴行的迷走神经,在距颈总动脉分叉近端 0.5~0.6 cm 处结扎颈总动脉,在结扎线的远端,置丝线备用。用微小动脉夹夹闭备用线远端的颈总动脉,在备用线的近端用眼科剪剪一小切口,将尼龙线栓送入切口,向上推至动脉夹处,将备用线扎紧,随即松开动脉夹,将线栓沿颈总动脉,颈内动脉顺行向上插入至大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)起始部,遇阻力时停止。从颈总动脉分叉处计算插入深度(18~20 mm),造成 MCAO,缺血 2 h 后,用乙醚再次麻醉,将栓线后拔退至颈总动脉,即恢复大脑中动脉的血供。造模时室温保持在 20~30℃,肛温维持在(37.0±0.5)℃,术后将动物置于放有清洁垫料的饲养盒,自由饮水,进食必要时用滴管给动物喂水,湿润鼻部和眼部。假手术组除不插入尼龙线外,其它处理方法同脑缺血组。纳入及剔除标准:在规定缺血时限内(术后 2~3 h)按 Longa 等^[4]的 5 分制评分标准评分:0 分,无神经损伤症状;1 分,不能伸展对侧前爪;2 分,向外侧划圈;3 分,向对侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失。1 分以上视为造模成功,如未出现肢体瘫痪(0 分)或已死亡的动物被剔除。

3. 标本制作:各组动物到达预定时间后,用水合氯醛深麻醉动物(0.8 ml/100 g 体重),用经处理后头端较钝的 16 号铁制针头穿刺入左心室至主动脉起始部;眼科剪剪开右心耳,先用 100 ml 生理盐水快速充洗体内血液,续用 10% 中性福尔马林 400 ml 进行灌注固定;断头取脑,在视交叉前后 1~3 mm 之间取脑片,在肝脏边缘 2~4 mm 取标本,用同一固定液后固定 6~8 h。进行常规脱水、透明、石蜡包埋,冠状切片,片厚 5 μm。

4. 免疫组化检测:二步法(SP 法)免疫组化检测试剂由北京中杉金公司提供。制成的标本置于 65℃ 烤箱中烤 2~3 h,自动脱蜡机脱蜡,蒸馏水洗 3 min。用枸橼酸盐修复液(pH 值=6.0)于 1.2 个大气压下高压修复 3.5 min,水浴冷却,蒸馏水洗 3 min。置于 3% H₂O₂ 中微波炉 350 W 加热 3 min,阻断内源性过氧化物酶,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗 5 min×3 次。加兔抗大鼠胰岛素样生长因子-1 多克隆抗体(一抗稀释浓度 1:35)孵育盒中 4℃ 孵育 72 h, PBS 冲洗 5 min×3 次。加兔二抗-HRP

多聚体于室温孵育 30 min, PBS 冲洗 5 min×3 次。DAB 显色,在显微镜下控制反应时间,苏木素复染,脱水,透明,封片。胞浆和(或)胞膜处呈棕黄色为阳性。

5. 计算方法:脑组织——每只鼠取切片 2 张,在低倍镜(×400)视野下,找到缺血侧大脑皮质计数非重叠 5 个不同视野,所得阳性细胞数取平均值^[5]。肝组织——免疫组化化学染色结果根据细胞染色程序及染色细胞百分率进行评定^[6]:基本不着色为 0 分,着色淡者为 1 分,着色较深者为 2 分;着色细胞占计数细胞百分率:5% 以下为 0 分,6%~25% 为 1 分,51% 及其以上为 3 分。将每张切片染色程度与染色百分率各自相乘,为其最后得分。得 0~1 分为阴性(-),得 2~3 分为阳性(+),得 4 分及 4 分以上为强阳性(+++)。

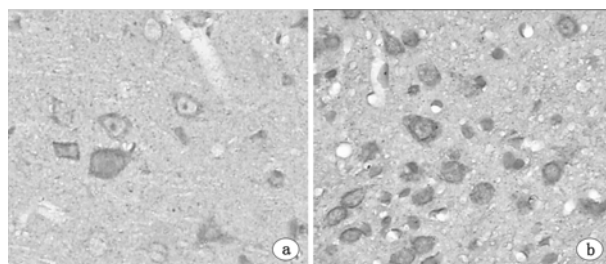
三、统计学分析

资料由 SPSS 11.5 版软件处理。脑组织实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,2 组数据采用 *t* 检验进行统计学比较。多组数据经方差齐性检验后,采用单因素方差分析进行统计学比较。肝组织采用 χ^2 检验进行组间及多组间统计学比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、IGF-1 在大脑皮质缺血侧不同时期的阳性表达情况

在脑缺血组和假手术组,大脑皮质阳性细胞主要见于神经元细胞,以细胞浆表达为主,其它细胞较少表达,分布较均匀,着色较深。见图 1。



注:a. 假手术组, b. 脑缺血组

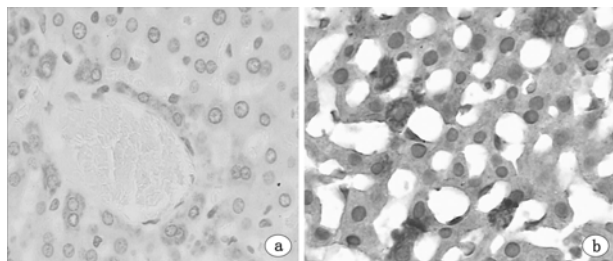
图 1 IGF-1 在缺血侧大脑皮质的表达(SP 染色, ×400)

与假手术各组比较,脑缺血组阳性细胞数明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);脑缺血组中,3 d 组较其它各组明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

二、IGF-1 在肝组织中不同时期的阳性表达情况

假手术组阳性细胞仅见于中央静脉周围,以细胞浆表达为主,其它部位未见阳性细胞表达,着色较浅。脑缺血组阳性细胞呈散在分布,细胞浆表达明显,着色较深。假手术组与脑缺血组均未发现强阳性表达(图 2)。脑缺血 7 d 组 IGF-1 阳性强度与假手术组比较,

差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 脑缺血组组内比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 其中以脑缺血 7 d 组阳性率最高, 为 87.5%, 其次为 1 d 组和 3 d 组, 均为 25%, 1 d 组最低, 为 12.5%, 详见表 2。



注: a. 假手术组, b. 脑缺血组

图 2 IGF-1 在肝脏中的表达 (SP 染色, $\times 400$)

表 1 2 组不同时间大鼠皮质缺血侧 IGF-1 免疫反应阳性细胞计数 (个, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	各时间点			
		2 h	1 d	3 d	7 d
假手术组	8	11.60 $\pm$ 0.49	11.62 $\pm$ 0.37	11.80 $\pm$ 0.43	11.6 $\pm$ 0.28
脑缺血组	8	12.48 $\pm$ 0.34 ^{ab}	13.12 $\pm$ 0.41 ^{ab}	14.65 $\pm$ 0.53 ^a	13.20 $\pm$ 0.30 ^{ab}

注: 与假手术组同时时间段组比较, ^a $P < 0.01$; 脑缺血 3 d 组与组内其它时间段比较, ^b $P < 0.01$

表 2 假手术组与脑缺血组 IGF-1 阳性强度比较 (只)

组 别	n	阳性强度		
		-	+	++
脑缺血组	32			
2 h	8	7	1	0
1 d	8	6	2	0
3 d	8	6	2	0
7 d	8	7 ^a	1 ^a	0
假手术组	32			
2 h	8	7	1	0
1 d	8	8	0	0
3 d	8	8	0	0
7 d	8	2	6	0

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$

讨 论

我们在实验中发现, 脑缺血鼠再灌注 2 h 后第 1 天神经症状表现相对较重, 随着时间的延长, 神经功能均有一定程度的恢复。说明脑缺血再灌注后, 除损伤因素外, 还存在内源性保护因素。研究表明, 内源性保护机制包括诱导神经营养因子、释放抑制神经递质、降低大脑温度及增加血流量。近年来, IGF-1 作为重要的神经营养因子已备受人们关注, 体外实验均已证实, 它对发育期及成熟的中枢神经和神经胶质细胞均有营养作用, 影响其生长、存活及分化^[7]。它的作用机制包括抗兴奋性氨基酸、降低脑血管阻力、阻止细胞内钙超载、调节一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的活性、维持低氧诱导因子-1 α 的表达等。有研究表明, IGF-1 主要作

用脑缺血损伤的第二阶段, 此阶段神经元死亡表现为迟发性神经细胞死亡, 发生机制主要涉及脑缺血对神经细胞凋亡的不适当诱导, 推测 IGF-1 通过抑制神经细胞凋亡而起神经营养保护作用^[8]。外源性 IGF-1 同样具有神经保护作用, 刁尧等^[9]从脑室注入 IGF-1, 发现 IGF-1 可明显减小脑梗死体积、减少凋亡细胞数及促进 Bcl-2 蛋白表达。王丹等^[10]从尾静脉注入 IGF-1, 发现用药组细胞坏死凋亡减少, Caspase-3 阳性细胞数明显下降。提示 IGF-1 对局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用, 在脑缺血损伤时 IGF-1 能通过血脑屏障, IGF-1 可通过抑制神经细胞凋亡发挥作用。

在脑缺血部位, IGF-1 表达明显增加并与损伤程度呈正相关。损伤较轻时, IGF-1 表达增加仅局限于大脑皮质; 严重损伤时, 则弥漫于整个受损半球^[11]。IGF 受体表达增加与损伤程度亦呈正相关, 脑轻度损伤时 IGF 受体表达仅限于大脑皮质区, 重度损伤时弥漫整个海马及纹状体区^[12]。在慢性缺血动物模型中发现, 缺血后 72 h IGF-1 信使核糖核酸在受损半球表达明显增加, 14 d 仍明显增加^[13]。徐忠信等^[14]发现局灶缺血 3 h 及缺血 3 h 再灌注 3 h、6 h 组, 中心区、半影区阳性细胞数均增多, 表达增强, 再灌注 24 h 和 48 h 达高峰。本研究发现, 脑缺血脑皮质表达 IGF-1 有增高的趋势, 3 d 达到高峰, 7 d 有所下降, 但仍高于假手术组 (表 1), 与以往文献报道一致^[5]。

脑缺血损伤后脑组织对 IGF-1 的需求增加, 除自身合成增加以外, 尚需外周 IGF-1 向颅内转移。血液 IGF-1 主要由肝脏产生和分泌, 由肝脏分泌入血的 IGF-1 绝大部分与 IGF 结合蛋白结合失去活性, 而游离型 IGF-1 生物活性强。血中游离型 IGF-1 和结合型 IGF-1 可以相互转化, 保证血液中有均衡稳定的游离型 IGF-1 发挥平稳的生理作用。血液中的 IGF-1 受生长激素 (growth hormone, GH)/IGF-1 (GH/IGF-1) 轴调节, 该调节轴包括 GH、生长激素受体、IGF-1。生长激素受体主要分布于肝细胞, 因此肝脏是 GH 的中心靶器官。GH 与其受体结合后, 引起肝脏合成、分泌 IGF-1。同时 IGF-1 对垂体有负反馈作用, 当血液 IGF-1 下降, 可促进 IGF-1 分泌增加, 使血液 IGF-1 恢复正常。

由于 IGF-1 是一种多肽, 生理情况不能通过 BBB, 在脑缺血发生后, BBB 受损, 通透性增加, 血液中 IGF-1 进入颅内。Schwab 等^[15]研究发现, 急性缺血性卒中患者脑组织中 IGF-1 增加的同时, 外周血中 IGF-1 及 IGFBP-3 的浓度降低。推测血清的 IGF-1 与 IGFBP-3 结合转移至脑内, 使血清 IGF-1 下降。Scheepens 等^[16]发现, 脑缺血后血液中 IGF-1 水平下降, 补充 GH 后恢复正常。在急性脑卒中的患者中发现, 2 周时, 随着临床病情的稳定, 肝组织分泌 IGF-1 增加, 血中 IGF-1 水

平有一定程度的恢复^[17]。本试验发现,在缺血 2 h、再灌注 7 d 时,肝组织 IGF-1 表达增强(表 2),提示 IGF-1 对 GH 负反馈调节产生作用,GH 分泌增加。

综上所述,脑缺血再灌注损伤后,脑组织对 IGF-1 需求增加,局部 IGF-1 系统迅速上调,2 h 时 IGF-1 增多,3 d 达到高峰。外周 IGF-1 体液调节在初期受到抑制,随着神经功能逐步的恢复,7 d 时 IGF-1 体液调节有一定程度恢复,GH/IGF-1 上调,肝脏产生 IGF-1 增多,由肝分泌入血的 IGF-1 通过 BBB 进入颅内,进一步增强神经保护作用。目前尚未 IGF-1 在脑缺血临床运用报道,本实验为 IGF-1 将来治疗脑缺血在时间窗方面提供参考。

参 考 文 献

- [1] 庞春红,李澎涛. 脑缺血再灌注损伤后血脑屏障通透性研究进展. 中日友好医院学报,2007,21:238-240.
- [2] 刘宗超,王慕一. 胰岛素样生长因子 1 与脑缺血. 国外医学脑血管疾病分册,2001,9:162-164.
- [3] 廖维靖,刘淑红,范明线,等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良. 中华物理医学与康复杂志,2002,24:6345-6348.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. Stroke, 1989, 20:84-91.
- [5] 车玉琴. 脑缺血不同时期胰岛素样生长因子-1 在大鼠脑内的表达及其意义. 中国临床康复, 2004, 8:4516-4517.
- [6] 蒋向荣,陈治新,张莉娟,等. IGF-1 在肝纤维化大鼠中的表达及 IL-10 的干预作用. 中西医结合肝病杂志, 2003, 13:154-156.
- [7] Knusel B, Michel PP, Schwaber JS, et al. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factor I and II. J Neurosci, 1990, 10:558-570.
- [8] Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, et al. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. Brain Res Mol Brain Res, 1995, 29:1-14.
- [9] 刁尧,陈春梅,高杰,等. 胰岛素样生长因子-1 对局灶性脑缺血/再灌注脑损伤保护机制的研究. 中国现代医学杂志, 2006, 16:679-682.
- [10] 王丹,王建平,王金兰. 胰岛素样生长因子-1 对大鼠脑缺血再灌注损伤的作用机制研究. 实用神经疾病杂志, 2005, 8: 38-39.
- [11] Lemaire P, Revelant O, Bravo R, et al. Two mouse genes encoding potential transcription growth factors in cultured cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85:4691-4695.
- [12] 刘广义,王娜,刘红. 髓鞘相关生长抑制因子 Nogo-A 及胰岛素样神经生长因子受体在局灶性脑缺血再灌注损伤后大鼠脑组织的表达特征. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11:2633-2636.
- [13] Scheepens A, Sirimanne ES, Breier BH, et al. Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. Neuroscience, 2001, 104:677-687.
- [14] 徐忠信,何金婷,莽靖. 局灶性脑缺血及再灌注损伤 IGF-1 表达的动态变化. 吉林大学学报(医学版), 2005, 3:401-403.
- [15] Schwab S, Spranger M, Krempien S, et al. Plasma insulin-like growth factor-1 and IGF binding protein-3 levels in patients with acute cerebral ischemic injury. Stroke, 1997, 28:1744-1748.
- [16] Scheepens A, Sirimanne E, Beilharz E, et al. Alteration in the neural growth hormone axis following hypoxic-ischemic brain injury. Brain Res Mol Brain Res, 1999, 68:88-100.
- [17] 陈玉娟,刘学源,边伟红,等. 急性脑卒中患者血清 IGF-1 的动态变化及其临床意义. 放射免疫学杂志, 2006, 19:17-18.

(修回日期:2008-07-11)

(本文编辑:阮仕衡)

《中华物理医学与康复杂志》2008 年第 8 期 “继续教育园地”测试题

读杂志、获学分,本刊继续教育园地栏目每期推出,只要您每期阅读该栏目文章,正确填写答题卡寄回本刊编辑部,您就可获得国家 II 类继续教育学分,全年可获得 5 分。

测试题(文章见本期 570-573 页,答题卡见本期 522 页):

1. 我国对老年人的定义为:

- | | |
|-------------|-------------|
| A. ≥55 岁的人群 | B. ≥60 岁的人群 |
| C. ≥65 岁的人群 | D. ≥70 岁的人群 |

2. 老年病的特点包括:

- | | |
|-----------------|--------------|
| A. 一人多病 | B. 病情急、变化快 |
| C. 并发症多、易出现连锁反应 | D. 病情波动大 |
| E. 疗效差、病程长、恢复慢 | F. 易出现药物不良反应 |

3. 老年人的康复评定主要包括:

- A. 日常生活活动能力状况的评定

B. 是否存在废用和误用综合征的评定

- | | |
|--------------|------------|
| C. 功能障碍情况的评定 | D. 平衡功能的评定 |
| E. 社会背景情况的评定 | F. 生活质量的评定 |

4. 老年康复的目的为:

- | | |
|-------------|-----------|
| A. 提高生活自理能力 | B. 提高生活质量 |
| C. 提高活动能力 | D. 提高劳动能力 |

5. 老年病的重大病征包括为:

- | | | |
|-------|------------|---------|
| A. 痴呆 | B. 二便失禁 | C. 疼痛 |
| D. 心衰 | E. 退行性骨关节病 | F. 髋部骨折 |