

· 基础研究 ·

亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注后白细胞髓过氧化物酶、环氧合酶-2 表达的影响

刘志超 李承晏 陈秋香

【摘要】目的 探讨亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注后白细胞髓过氧化物酶(MPO)、环氧合酶-2(COX-2)等炎症反应介质表达的影响。**方法** 将 48 只 Wistar 大鼠随机分为亚低温组和对照组,每组再分为 4 个亚组,每个亚组 6 只。应用改良线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,亚低温组大鼠给予亚低温治疗,对照组不作亚低温治疗。分别于缺血再灌注后 4,8,12,16 h 处死 1 个亚组。用免疫印迹及免疫组化方法观察各个亚组脑组织细胞间白细胞 MPO 的含量及 COX-2 的表达。**结果** 对照组缺血再灌注后 4,8,12,16 h 缺血区皮质及纹状体中白细胞 MPO 的含量与亚低温组相应时间段的数值比较,亚低温组均显著低于对照组($P < 0.01$)。对照组缺血再灌注后 4,8,12,16 h 缺血区皮质及纹状体中 COX-2 表达的相对灰质度值与亚低温组相应时间段的数值比较,亚低温组均显著低于对照组($P < 0.01$)。**结论** 亚低温能降低再灌注后不同时间脑组织细胞间白细胞 MPO 含量及 COX-2 的表达活性,减轻缺血区的炎症反应及脑组织的继发性损伤,提示亚低温对局灶性脑缺血区神经元有保护作用。

【关键词】 亚低温; 脑缺血; 再灌注; 白细胞髓过氧化物酶; 环氧合酶-2

The effects of mild hypothermia on the expression of myeloperoxidase and cyclooxygenase 2 in rats after cerebral ischemia and reperfusion LIU Zhi-chao, LI Cheng-yan, CHENG Qiu-xiang. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of mild hypothermia (MH) on the expression of myeloperoxidase (MPO) and cyclooxygenase 2 (COX 2) in rats after cerebral ischemia and reperfusion (CIR). **Methods** Forty-eight Wistar rats were randomly divided into four control groups ($n = 6$ in each) and four MH groups ($n = 6$ in each). CIR models were established by suture occlusion of the left middle cerebral artery. The rats in the MH groups, but not in the control groups, were treated with MH. Rats were killed at 4 h, 8 h, 12 h and 16 h after CIR. MPO expression was measured, along with the expression of COX 2 as measured by Western blotting and immunohistochemical methods. **Results** Compared with the control groups, MPO activity and the COX 2 expression in the cortex and striatum were significantly lower in all the MH groups at 4 h, 8 h, 12 h and 16 h after CIR. **Conclusion** MH treatment can protect neurons by decreasing MPO activity and COX 2 expression, alleviating inflammation and reducing secondary injuries after CIR.

【Key words】 Mild hypothermia; Brain ischemia; Reperfusion; Myeloperoxidase; Cyclooxygenase

有研究证实,在脑缺血再灌注后,急性期的炎症反应可加重脑组织的水肿,介导继发性的脑损伤^[1,2]。内皮黏附分子所介导的白细胞的黏附和渗出以及环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达都参与了脑组织缺血后炎症的发生和发展,而亚低温能抑制白细胞的黏附和渗出以及 COX-2 的表达,从而能减轻脑缺血再灌注后炎症反应,对脑缺血再灌注后神经元具有保护作用。我们通过大鼠大脑中动脉闭塞(middle artery occlusion, MCAO)模型,观察亚低温对再灌注后脑组织细胞间白细胞髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)及 COX-2 表达的影响,探讨亚低温的脑保护作用。

材料与方法

一、实验动物及分组

Wistar 大鼠 48 只,雌雄各半,体重为 250 ~ 300 g,由武汉医药工业研究所实验动物中心提供,随机分为亚低温组和对照组,每组 24 只。每组按缺血再灌注时间再分为 4 个亚组,每个亚组 6 只,分别于缺血再灌注后 4,8,12,16 h 处死 1 个亚组。

二、脑缺血再灌注动物模型制作及亚低温治疗

采用改良线栓法制作左侧大脑中动脉缺血再灌注模型^[3]。用 2% 戊巴比妥钠(45 mg/kg 体重)腹腔内注射麻醉。亚低温组大鼠用电子温度计插入肛门内 5 cm,定时监测深肛温,使肛温控制在 $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$,术后将大鼠置于 4°C 环境中,温度过高时给大鼠全身喷

酒稀释酒精降温或同时吹电风扇,温度过低时将大鼠置于室温(约 25℃)中自然复温,大鼠可以自由活动、饮水和进食。对照组大鼠置于室温下,不作亚低温处理。

三、主要试剂

MPO 检测试剂盒由南京建成生物有限公司提供;山羊抗 COX-2 和 actin 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。

四、标本取材

各组达到再灌注时间后,处死大鼠,断头取脑。在左半球自嗅结节前缘起,作冠状切片,其厚度依次为 1.5、3.0 和 4.0 mm。在 3.0 mm 的切片上分离皮质和纹状体,用于 MPO 的检测和蛋白的提取。4.0 mm 的脑组织用于制作冰冻切片(厚度约 7 μm),行免疫组化检测。

五、白细胞活性的检测

MPO 活性检测按照 MPO 试剂盒检测说明进行操作。MPO 酶活力单位计算: $MPO = (\text{测定管 A 值} - \text{对照管 A 值}) / 11.3 \times \text{取样量 (g)}$ 。

六、COX-2 免疫组化检测

用 SP 法检测 COX-2,冰冻切片用丙酮固定 10 min,然后以 0.3% H₂O₂-TBS 孵育 10 min,消除内源性辣根过氧化物酶活性,2% 兔血清室温封闭 30 min。加山羊 COX-2 多克隆一抗(1:100 稀释)4℃ 过夜。以生物素标记兔抗山羊二抗(1:200 稀释)室温孵育 1 h;再以辣根过氧化物酶标记链霉卵白素(1:100 稀释),室温孵育 1 h。DAB 显色后,用收木素复染。光镜下观察细胞呈棕黄色为阳性;如果胞核蓝色,胞质不着色则为阴性。阴性对照不加一抗,以 TBS 代替。

七、COX-2 相对灰质度的检测

用相对灰质度值来代表 COX-2 的蛋白表达,用 Western blot 检测蛋白表达;100 mg 纹状体或皮质组织加入 1 ml 细胞裂解液,手动匀浆,4℃ 条件下 12 000 × g 离心 30 min,取上清。采用 Lowry 法测定蛋白溶液的浓度,制备不连续 SDS 聚丙烯酰胺凝胶。按 100 μg 蛋白上样决定上样体积。电泳完毕后,将凝胶上的蛋白质转移至 PVDF 膜上,然后进行特异性抗原条带的检测。最后加入发光底物,以柯达医学专用胶片进行显像,根据凝胶成像分析系统,计算相对灰质度(相对灰质度 = 待测蛋白灰质度值/actin 灰质度值)。

八、统计学分析

实验资料用 SPSS 10.0 统计软件包进行正态分布检验,方差齐性检验及 q 检验。数据用($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、缺血再灌注后 MPO 活性的变化

亚低温组和对照组缺血再灌注后 4, 8, 12, 16 h MPO 活性在皮质及纹状体都有不同程度的增加,对照组增加更明显,2 组相应时间段 MPO 活性比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1 和表 2。

表 1 缺血再灌注后大鼠皮质 MPO 的变化($U/g, \bar{x} \pm s$)

组 别	缺血再灌注后			
	4 h($n_1 = 6$)	8 h($n_2 = 6$)	12 h($n_3 = 6$)	16 h($n_4 = 6$)
对照组	0.1782 ± 0.0251	0.2236 ± 0.0363	0.2469 ± 0.0482	0.2658 ± 0.0586
亚低温组	0.0275 ± 0.0038*	0.0983 ± 0.0122*	0.1057 ± 0.0362*	0.132 ± 0.0412*

注:与对照组相应时间段比较,* $P < 0.01$

表 2 缺血再灌注后大鼠纹状体 MPO 的变化($U/g, \bar{x} \pm s$)

组 别	缺血再灌注后			
	4 h($n_1 = 6$)	8 h($n_2 = 6$)	12 h($n_3 = 6$)	16 h($n_4 = 6$)
对照组	0.2682 ± 0.0460	0.2765 ± 0.0459	0.2217 ± 0.0356	0.1906 ± 0.0321
亚低温组	0.0883 ± 0.0238*	0.0952 ± 0.0217*	0.0840 ± 0.0264*	0.0632 ± 0.0202*

注:与对照组相应时间段比较,* $P < 0.01$

二、COX-2 在大鼠缺血再灌注脑组织的表达

缺血再灌注后对照组和亚低温组大鼠的皮质和纹状体缺血边缘区都有 COX-2 免疫阳性神经元,且随着缺血时间的延长,2 组的 COX-2 免疫阳性神经元越多,对照组增多的更明显,且亚低温组 COX-2 免疫阳性神经元具有正常神经元的形态特点,胞核和胞仁清晰可辨,仅见轴突和细胞体轻度水肿,而对照组 COX-2 免疫阳性神经元出现了不可逆损伤性改变,神经细胞固缩,核仁消失,有的还出现细胞核溶解。2 组相应时间段代表 COX-2 的蛋白表达活性的相对灰质度值比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 3 和表 4。

表 3 缺血再灌注后大鼠皮质 COX-2 相对灰质度的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	缺血再灌注后			
	4 h($n_1 = 6$)	8 h($n_2 = 6$)	12 h($n_3 = 6$)	16 h($n_4 = 6$)
对照组	1.5083 ± 0.1160	1.5691 ± 0.2712	1.7953 ± 0.3322	1.8108 ± 0.3669
亚低温组	0.6407 ± 0.0902*	0.8135 ± 0.1247*	0.9509 ± 0.1345*	0.9782 ± 0.1534*

注:与对照组相应时间段比较,* $P < 0.01$

表 4 缺血再灌注后大鼠纹状体相对灰质度的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	缺血再灌注后			
	4 h($n_1 = 6$)	8 h($n_2 = 6$)	12 h($n_3 = 6$)	16 h($n_4 = 6$)
对照组	2.367 ± 0.2219	2.5033 ± 0.2606	2.2785 ± 0.2252	1.9333 ± 0.2100
亚低温组	1.0501 ± 0.2667*	1.1430 ± 0.2578*	1.135 ± 0.2656*	0.9735 ± 0.2353*

注:与对照组相应时间段比较,* $P < 0.01$

讨 论

在脑缺血再灌注后的继发性脑损伤中,炎症反应扮演了重要角色。白细胞的黏附和渗出,COX-2

等炎性介质的参与都促使和加重了神经元损伤的发生和发展。研究发现,中性粒细胞的渗出和浸润能加重脑缺血后再灌注区神经元的损伤,从而使缺血范围扩大,症状加重^[4-6]。

有研究证实,亚低温对脑缺血后神经元有保护作用^[7,8]。降低脑温已作为一项抢救措施成功地应用于急性缺血缺氧性脑病(如溺水、电击性休克)中。亚低温的脑保护作用机制十分复杂,它不但能降低脑部代谢,还能抑制一些损伤因子的产生和释放,并能减轻缺血再灌注后炎症反应,从而减轻继发性脑损伤,保护神经元^[9-12]。本实验旨在通过大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,观察亚低温治疗对 MPO、COX-2 表达的影响,探讨亚低温的脑保护作用。

本研究发现,大鼠脑缺血再灌注后,在缺血区皮质和纹状体中亚低温组和对照组脑缺血再灌注后 4, 8, 12, 16 h MPO 活性在皮质及纹状体都有不同程度的增加,对照组增加更明显,2 组相应时间段 MPO 活性比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。对照组和亚低温组脑缺血再灌注后大鼠的皮质和纹状体缺血边缘区都有 COX-2 免疫阳性神经元,且随着缺血时间的延长,2 组的 COX-2 免疫阳性神经元越多,对照组增多得更明显,且亚低温组 COX-2 免疫阳性神经元具有正常神经元的形态特点,胞核和胞仁清晰可辨,仅见轴突和细胞体轻度水肿,而对照组 COX-2 免疫阳性神经元出现了不可逆损伤性改变,神经细胞固缩,核仁消失,有的还出现细胞核溶解。2 组相应时间段代表 COX-2 的蛋白表达活性的相对灰质度值比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。这些结果表明,亚低温能减少大鼠脑缺血再灌注后缺血区脑组织内白细胞的渗出和浸润、抑制白细胞 MPO 和 COX-2 等炎症介质的生成及表达。

本研究证实,亚低温能抑制脑缺血再灌注后炎症反应,从而减轻继发性脑损伤,具有神经保护作用。但由于观察时间较短,超过脑缺血再灌注后 16 h 的结果有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Zhang RL, Chopp M, Chen H, et al. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci*, 1994, 125:3-10.
- 2 Zhang GH, Lu P, Wang YL. Effects of dipfluzine on expressions of E-selectin, P-selectin, and ICAM-1 in brain ischemia-reperfusion rats. *Yao Xue Xue Bao*, 2005, 40:1091-1095.
- 3 蒋海山, 陆兵勋, 姬仲, 等. 线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的改良. *第一军医大学学报*, 2004, 10:1120-1122.
- 4 Zhang W, Smith C, Monette R, et al. Indomethacin and cyclosporin A inhibit in vitro ischemia-induced expression of ICAM-1 and chemokines in human endothelial cells. *Acta Neurochir Suppl*, 2000, 76:47-53.
- 5 Koh SH, Chang DI, Kim HT, et al. Effect of 3-aminobenzamide, PARP inhibitor, on matrix metalloproteinase-9 level in plasma and brain of ischemic stroke model. *Toxicology*, 2005, 214:131-139.
- 6 Pei Z, Cheung RT. Pretreatment with melatonin exerts anti-inflammatory effects against ischemia/reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J Pineal Res*, 2004, 37:85-91.
- 7 刘志超, 李承晏, 董红娟, 等. 亚低温对大鼠急性脑梗死后脑组织内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA 及血浆 ET 变化的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:662-664.
- 8 刘志超, 李承晏, 叶心国. 亚低温治疗重症脑血管病疗效观察. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23:232-234.
- 9 Van Hemelrijck A, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, et al. Post-ischemic mild hypothermia inhibits apoptosis in the penumbral region by reducing neuronal nitric oxide synthase activity and thereby preventing endothelin-1-induced hydroxyl radical formation. *Eur J Neurosci*, 2005, 22:1327-1337.
- 10 Kelly S, Cheng D, Steinberg GK, et al. Mild hypothermia decreases GSK3 β expression following global cerebral ischemia. *Neurocrit Care*, 2005, 2:212-217.
- 11 Van Hemelrijck A, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, et al. Neuroprotective effect of N-acetyl-aspartyl-glutamate in combination with mild hypothermia in the endothelin-1 rat model of focal cerebral ischaemia. *J Neurochem*, 2005, 95:1287-1297.
- 12 Zhao H, Yenari MA, Cheng D, et al. Biphasic cytochrome c release after transient global ischemia and its inhibition by hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25:1119-1129.

(修回日期:2006-11-21)

(本文编辑:松 明)

本刊办刊方向:

立足现实; ; 关注前沿; ; 贴近读者; ; 追求卓越