

炎症因子在大鼠脑缺血后 MMP 和 TIMP-1 致脑损伤中的作用

陈新云

(郑州市第三人民医院神经内科,河南 郑州 450000)

摘要:【目的】探讨肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIM P-1)在大鼠脑缺血再灌注后的动态变化及特点,阐明 TNF- α 、IL-1 β 在脑缺血大鼠 MMP 和 TIMP-1 引起脑损伤中的作用。【方法】雄性 SD 大鼠 56 只随机分为假手术组和缺血 2 h 再灌注 6、12、24、48、72 h 和 7 d 组。运用线栓法复制大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,采用 ELISA 法测定脑组织和血清 TNF- α 和 IL-1 β 含量,及脑组织中 MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的含量。【结果】与假手术组比较,血清和脑组织 TNF- α 和 IL-1 β 含量于缺血再灌注 6 h 明显增加(4.38 ± 0.73 vs 2.63 ± 0.14 、 5.28 ± 0.71 vs 3.46 ± 0.47 ; 22.34 ± 3.56 vs 12.13 ± 4.26 、 9.56 ± 0.85 vs 4.23 ± 0.83 ; $P < 0.05$),12 h 达到高峰,随后各时间点表达开始下降,至 7 d 与假手术组比较无明显差别。脑组织中 MMP-3、MMP-9 含量于再灌注 6 h 开始升高,24 h 明显升高($P < 0.05$),48 h 达高峰,随后逐渐下降,至再灌注 7 d 与假手术组比较无统计学意义,而脑组织中 TIMP-1 含量在再灌注各时间点均低于假手术组($P < 0.05$)。且血清和脑组织中 TNF- α 和 IL-1 β 含量与 MMP-3、MMP-9 的含量呈明显正相关($P < 0.05$),与 TIMP-1 含量呈负相关($P < 0.05$)。【结论】MMP-3、MMP-9 在脑缺血大鼠缺血再灌注早期水平即升高,提示 MMP-3 和 MMP-9 在脑缺血再灌注的发病过程中起着重要的作用,炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 可通过促进脑组织中 MMP-3、MMP-9 的生成,抑制 TIMP-1 的生成,进一步加重缺血后脑损伤。

关键词: 脑缺血再灌注;大鼠;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素 1 β ;基质金属蛋白酶;基质金属蛋白酶抑制剂

中图分类号: R74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)02-0230-05

Role of Inflammatory Factor in Brain Damage with Cerebral Ischemia Rat Caused by MMP and TIMP-1

CHEN Xin-yun

(Department of Neurology, The Third People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: 【Objective】 To study the content change of TNF- α , IL-1 β , MMP-3, MMP-9, and TIMP-1 in the rats after cerebral ischemia and reperfusion. To clarify the role of TNF- α and IL-1 β in brain damage with ischemia rat caused by MMP and TIMP-1. 【Methods】 The 56 male SD rats were randomly divided into sham-operation group and ischemia 2 h reperfusion 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 d group. The local cerebral ischemia reperfusion model was established by intraluminal thread occlusion of the middle cerebral arteries occlusion (MCAO), the level of TNF- α , IL-1 β , MMP-3, MMP-9, and TIMP-1 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 【Results】 Compared with sham-operation group, the content of TNF- α and IL-1 β in brain tissue and blood were significantly higher in reperfusion 6 h (4.38 ± 0.73 vs 2.63 ± 0.14 , 5.28 ± 0.71 vs 3.46 ± 0.47 ; 22.34 ± 3.56 vs 12.13 ± 4.26 , 9.56 ± 0.85 vs 4.23 ± 0.83 ; $P < 0.05$), and reached the peak at the 12th hour after reperfusion, and then fell down. MMP3 and MMP-9 content increased at the 6th hour after reperfusion. Till the 48th hour it reached the peak, and then fell down. The content of TIMP-1 in brain tissue were significantly lower in reperfusion group than that in the sham-operation group. And the content of TNF- α and IL-1 β were positively correlated with MMP-3 and MMP-9 ($P < 0.05$), negatively correlated with TIMP-1. 【Conclusion】 MMP-3 and MMP-9 play an important role in cerebral ischemia-reperfusion injury. Inflammatory factor can increases

收稿日期:2012-10-26

作者简介:陈新云,本科,副主任医师,研究方向:脑血管病的研究与治疗,E-mail: chenxinyun123789@163.com

the production of MMP-3 and MMP-9 in brain tissue, decrease the production of TIMP-1, and further promote the brain damage cause by ischemia reperfusion.

Key words: cerebral ischemia reperfusion; rat; TNF- α ; IL-1 β ; MMP; TIMP-1

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2): 230-234]

缺血性脑血管病是一种以脑循环血流量减少为特征的中枢神经系统疾病,其高的发病率、致残率和死亡率严重影响了人们的生存和生活质量,对其发病机制的研究一直是医学界的热点。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)是参与脑缺血再灌注损伤的重要炎症细胞因子之一,也是众多细胞因子的重要启动因子^[1-2]。基质金属蛋白酶(matix metalloproteinases, MMP)是分解细胞外基质的蛋白酶类中最重要的一类,可降解细胞外基质,破坏血脑屏障,参与脑水肿的形成和脑损伤的发生^[3-4]。有研究表明:MMP-9 和 MMP-3 在正常的脑组织中表达水平极低,在一些病理情况下,如炎症因子的刺激下可诱导其基因转录活性增强,导致其表达增加,加重脑损伤。但目前 MMP 与炎症因子在缺血性脑损伤中的相关性研究尚不多见。本研究探讨炎症因子与 MMP 在大鼠脑缺血再灌注后的动态变化及特点,阐明炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 在脑缺血大鼠 MMP 引起脑损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物来源及分组

健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 56 只(由新乡医学院实验动物中心提供),清洁级,体质量 250 ~ 270 g,随机分为假手术组和缺血再灌注组,其中脑缺血再灌模型组再随机分为缺血 2 h 再灌注 6、12、24、48、72 h 和 7 d 亚组,每组均为 8 只,假手术组只作颈部切开,分离颈总动脉暴露血管但不插栓线,缺血再灌注组按动物模型的方法处理。

1.2 动物模型的建立

参照 Longa 等的线栓法^[5],采用颈内动脉线栓法建立大鼠右侧大脑中动脉阻塞模型,暴露颈总动脉分叉,将 1 根顶端粘有石蜡的直径为 0.20 mm

左右尼龙丝线由颈外动脉插入,尼龙线头端加热制成直径约 0.28 mm 的光滑圆球,将线导入颈内动脉后,继续将尼龙线插入至其颅内段,当感到明显阻力时,即阻断了大脑中动脉的所有血液供应。大脑中动脉栓塞 2 h 后,抽出栓线,恢复大脑中动脉的血液灌注。待动物清醒后,按照 Longa 评分标准进行行为学评分:0 分,无神经病学征象;0.5 分,动物有竖毛,轻度运动低下症状;1 分,前肢屈曲且伴有运动障碍;2 分,行动不协调,屈曲姿势,行走时向偏瘫侧转圈;3 分,不能站立行走,向偏瘫侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失,昏睡。将合乎要求的大鼠纳入实验动物。1 分及以上即为成功模型,纳入统计范围,然后随机分组。

1.3 观察指标及测定

1.3.1 取材与处理 动物模型制作成功后分别在 6、12、24、48、72 h 和 7 d 时间点水合氯醛麻醉后剪尾取血,分离取血清,置-20℃保存。且各组大鼠取血后迅速断头取脑,除去小脑和脑干,分离缺血侧大脑半球,用冰凉的生理盐水洗净组织表面血液,脑组织称质量后倒入匀浆器中,按照 10% 比例加入生理盐水,进行冰上匀浆,4℃ 3 000 r/min ($r = 16$ cm)离心 10 min,取上清液分装-70℃保存待测。

1.3.2 血清和脑组织 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-3、MMP-9、TIMP-1 的检测 取血清和脑组织上清液 ELISA 法检测各组大鼠不同时间点 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-3、MMP-9、TIMP-1 的含量,试剂盒分别由美国 Adlitteram Diagnostic Laboratories 和美国 R&D 公司提供,采用美国 Hyperion MR III 型酶标仪测定,具体操作按说明书严格进行。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 12.0 进行统计学处理,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行组间检验,两组间样本均数比较采用 t 检验,相关性研究采用直线回归分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 1 各组大鼠血清和脑组织 TNF- α 和 IL-1 β 含量的动态变化Table 1 The content change of TNF- α and IL-1 β in serum and brain tissue in rats($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

Group	Brain tissue		Serum	
	TNF- α	IL-1 β	TNF- α	IL-1 β
Sham	12.13 \pm 4.26	4.23 \pm 0.83	2.63 \pm 0.14	3.46 \pm 0.47
I/R 6 h	22.34 \pm 3.56 ¹⁾	9.56 \pm 0.85 ¹⁾	4.38 \pm 0.73 ¹⁾	5.28 \pm 0.71 ¹⁾
I/R 12 h	35.28 \pm 4.11 ¹⁾	13.46 \pm 1.69 ¹⁾	6.24 \pm 0.78 ¹⁾	8.34 \pm 1.25 ¹⁾
I/R 24 h	30.32 \pm 5.09 ¹⁾	11.48 \pm 2.31 ¹⁾	5.56 \pm 0.49 ¹⁾	7.61 \pm 1.04 ¹⁾
I/R 48 h	27.61 \pm 4.69 ¹⁾	8.89 \pm 1.02 ¹⁾	4.53 \pm 0.72 ¹⁾	5.39 \pm 0.66 ¹⁾
I/R 72 h	21.57 \pm 3.28 ¹⁾	7.62 \pm 0.67 ¹⁾	3.29 \pm 0.33 ¹⁾	4.93 \pm 0.57 ¹⁾
I/R 7 d	15.45 \pm 2.05	5.84 \pm 0.35	2.87 \pm 0.36	3.78 \pm 0.26
<i>F</i>	38.23	27.09	36.46	25.38
<i>P</i>	< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.05

1) Compared with sham-operation group, $P < 0.05$

表 2 各组大鼠脑组织 MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 含量的动态变化

Table 2 The content change of MMP-3, MMP-9, and TIMP-1 in brain tissue in rats

($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

Group	MMP-3	MMP-9	TIMP-1
Sham	5 8.3 \pm 6.7	74.8 \pm 9.1	76.4 \pm 6.1
I/R 6 h	74.3 \pm 8.0	93.3 \pm 12.4	68.9 \pm 8.2
I/R 12 h	86.3 \pm 10.4 ¹⁾	120.5 \pm 15.7 ¹⁾	42.4 \pm 5.6 ¹⁾
I/R 24 h	105.6 \pm 17.8 ¹⁾	164.4 \pm 23.8 ¹⁾	35.2 \pm 5.7 ¹⁾
I/R 48 h	133.3 \pm 22.7 ¹⁾	185.9 \pm 38.5 ¹⁾	26.7 \pm 4.3 ¹⁾
I/R 72 h	93.6 \pm 11.4 ¹⁾	138.3 \pm 15.7 ¹⁾	47.3 \pm 6.2 ¹⁾
I/R 7 d	72.2 \pm 9.6	94.3 \pm 11.6	67.3 \pm 7.5
<i>F</i>	56.32	64.87	42.65
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.05

1) Compared with sham-operation group, $P < 0.05$

2 结 果

2.1 各组大鼠脑缺血再灌注后血清和脑组织中 TNF- α 和 IL-1 β 含量的动态变化

假手术组大鼠血清和脑组织中 TNF- α 和 IL-1 β 含量较低,缺血再灌注 6 h 时 TNF- α 和 IL-1 β 含量已明显升高($P < 0.05$),至再灌注 12 h 达到高峰,随后逐渐下降,至 7 d 与假手术组比较无统计学意义(表 1)。

2.2 大鼠脑缺血再灌注后脑组织 MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 含量的动态变化

假手术组大鼠脑组织中 MMP-3、MMP-9 含量

均较低, MMP-3、MMP-9 含量于再灌注 6 h 开始升高, 24 h 明显升高($P < 0.05$), 48 h 达高峰, 随后逐渐下降, 至再灌注 7 d 与假手术组比较无统计学意义。而脑组织中 TIMP-1 含量在再灌注各时间点均低于假手术组, 见表 2。

2.3 炎症因子与 MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 水平的相关性分析

分别以 TNF- α 和 IL-1 β 为应变量, MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 为自变量进行相关分析, TNF- α 和 IL-1 β 与 MMP-3、MMP-9 含量成正相关 ($r = 0.628$ 、 0.547 和 0.539 、 0.824 , P 均 < 0.05), 与 TIMP-1 成负相关 ($r = 0.673$ 、 0.562 , $P < 0.05$)。

3 讨 论

缺血性脑损伤是一个由多因素、多机制构成的级联损伤过程,炎症因子在这众多因素损害中起重要作用^[6]。其中 TNF- α 和 IL-1 β 是重要的炎性因子。TNF- α 主要由活化的巨噬细胞分泌,是一种重要的和最早产生的促炎细胞因子,是炎症反应的始动因素。它可以诱导其他炎性细胞因子的产生;可以增加内皮细胞的通透性;可直接破坏血脑屏障,导致血脑屏障通透性增加,引起脑细胞和胶质细胞肿胀、变性,释放各种神经毒性因子,加重脑损伤^[7-8]。由单核巨噬细胞合成分泌的急性炎症因子 IL-1 β 参与缺血损伤过程,其脑损伤作用是通过激活脑内的小胶质细胞,促进其释放细胞因子、自由基等实现的^[9]。本研究发现 TNF- α 和 IL-1 β 在大鼠缺血再灌注 6 h 开始升高,再灌注 12 h、24 h、48 h、72 h 明显高于假手术组,在再灌注 12 h 达到最高点,以后逐渐降低,至 7 d 与基本降至正常水平,在此期间表现了显著的炎性反应特征。

MMP 是一组降解细胞外基质的钙离子和锌离子依赖的金属蛋白内切酶家族,作用于血管基底膜成分,可降解血管周围基膜的 IV 型明胶胶原、层粘连蛋白、纤粘连蛋白等绝大部分细胞外基质^[9-11],与脑缺血后血-脑脊液屏障的破坏密切相关。血脑屏障的功能损伤,导致大量的水、电解质外流,大量的蛋白质外流,最终形成血管源性脑水肿和神经元损坏;如大量活化的白细胞通过破坏损伤的血脑屏障渗入到脑组织内,可释放许多细胞因子、炎症介质,加速神经元的损伤,加重缺血性脑损伤^[12]。在神经系统中最为重要的 MMP 为 MMP-9 和 MMP-3。MMP-9 又称明胶酶 B,主要由中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞和血管内细胞等合成与分泌,它能降解几乎所有的细胞外基质成分,破坏血管壁结构的完整性,破坏血脑屏障^[13]。MMP-3 也称前明胶酶,在细胞内以前体形式合成,激活状态下的 MMP-3 可降解多种细胞外基质成分,并可激活其他的 MMP,从而加重细胞外基质的降解,加重血脑屏障破坏、炎性反应、水肿形成等继发性脑损伤的

过程。本研究发现:在脑缺血再灌注早期(6 h)即出现 MMP-9 和 MMP-3 含量的升高,它们可以通过降解细胞外基质、破坏血脑屏障、促进脑水肿的形成及炎性细胞的浸润,加重缺血性脑损伤过程。而在正常生理情况下,血管细胞外基质成分的合成和降解保持着动态平衡,这种平衡依赖于 MMP 与金属蛋白酶组织抑制剂(matrix metalloproteinase inhibitor, TIMP-1)本身的平衡, MMP/TIMP 的失衡会影响到细胞外基质的合成与降解的平衡^[14]。本研究中 TIMP-1 在脑缺血后明显降低,而 MMP-9 和 MMP-3 明显升高, MMP/TIMP 的失衡导致了脑微血管结构完整性破坏和血脑屏障的损坏。

MMP-9 和 MMP-3 在正常的脑组织中表达水平极低,在一些病理情况下,如炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 的刺激下可诱导其基因转录活性增强,导致其表达增加^[15]。本研究结果显示, MMP-9、MMP-3 与 TNF- α 、IL-1 β 表达时相不同,但它们都在脑缺血灌注损伤中发挥着重要作用。目前 MMP-9、MMP-3 与 TNF- α 、IL-1 β 的相关性实验研究尚不多见,但我们认为 TNF- α 和 IL-1 β 不仅能直接损伤神经细胞,而且还可能通过促进 MMP 合成和分泌,从而降解血管基底膜,加重脑损伤。本研究显示 TNF- α 在缺血再灌注后 12 h 达高峰,而 MMP-9、MMP-3 和 TIMP-1 是在缺血再灌注 48 h 才达到高峰和低谷, MMP-3 和 MMP-9 在时相上略晚于 TNF- α 和 IL-1 β 的现象,这可能正是由于在缺血再灌注损伤中 TNF- α 和 IL-1 β 等炎症因子的诱导才使 MMP-9 及 MMP-3 的表达大量增加。本实验结果亦发现 TNF- α 和 IL-1 β 与 MMP-3、MMP-9、TIMP-1 含量存在相关性,表明在大鼠脑缺血再灌注损伤中, TNF- α 和 IL-1 β 能够诱导 MMP 蛋白的表达,抑制 TIMP-1 蛋白的表达,产生一系列级联反应,加重缺血性脑损伤。

参考文献:

- [1] 段立晖,张丽. 脑缺血再灌注损伤相关的免疫细胞因子[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(7): 651-653.
Duan LH, Zhang L. Cerebral ischemia reperfusion injury associated with immune cell factor [J]. J Med Postgr, 2004, 17 (7) : 651-653.

- [2] 向赞, 刘晓文, 刘新文, 等. 全脑缺血再灌注后大脑皮质及海马白细胞介素-1 β 的变化[J]. 中国临床康复, 2002, 6(1): 50-51.
Xiang Z, Liu XW, Liu XW, et al. Global cerebral ischemia reperfusion in cerebral cortex and hippocampus after book of interleukin -1 β changes [J]. Chi J Clin Rehab, 2002, 6 (1):50-51.
- [3] Lee SR, Tsyji K, LO E H. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 2004, 24(3): 671-678.
- [4] Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA, et al. Multiple roles for MMP and TIMPs in cerebral ischemia [J]. Glia, 2005, 50(4): 329-39.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] Liu K, Sun T, Wang P, et al. Effects of erythropoietin on blood-brain barrier tight junctions in ischemia-reperfusion rats [J]. J Mol Neurosci, 2012, 22(1): 123-128.
- [7] 李新玲, 周永, 黄怀宇, 等. 地塞米松对大鼠局灶性脑缺血再灌注模型 TNF- α 和 IL-1 β 的影响[J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(2): 198-200.
Li XL, Zhou Y, Huang HY, et al. Effect of dexamethasone on rats with focal cerebral ischemia reperfusion model of TNF- α and IL-1 β [J]. Chin J Immunol, 2011, 24 (2): 198-200.
- [8] 杨小霞, 李国前, 王杰华, 等. 血栓心脉宁片对大鼠脑缺血再灌注肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(11): 1363-1365.
Yang XX, Li GQ, Wang JH, et al. Thrombosis Xinmaining on cerebral ischemia reperfusion in rats TNF- α [J]. Combin TCM Western Med Cardiovasc Cerebrovas Dis J, 2011, 9 (11): 1363-1365.
- [9] 车玉琴, 任玉峰, 高杰, 等. IGF- II 对大鼠脑缺血/再灌注损伤后海马 TNF- α 含量的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2009, 25(2): 249-250.
Che YQ, Ren YF, Gao J, et al. IGF- II on rat cerebral ischemia / reperfusion injury in hippocampal TNF- α content influences [J]. Chin J Appl Physiol, 2009, 25 (2): 249-250.
- [10] Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, et al. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(4): 697-709.
- [11] 龚家明, 罗勇, 蒋开夫. 电刺激小脑顶核对局灶性脑缺血大鼠脑组织核因子- JB? 基质金属蛋白酶-9 表达的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2010, 5(1): 17-20.
Gong JM, Luo Y, Jiang KF. Cerebellar fastigial nucleus electric stimulation on focal cerebral ischemia in the rat brain nuclear factor - JB , the expression of matrix metalloproteinase -9 effect of [J]. Neural Inj Funct Reconstr, 2010, 5 (1): 17-20.
- [12] Tu XK, Yang WZ, Liang RS, et al. Effect of baicalin on matrix metalloproteinase-9 expression and blood-brain barrier permeability following focal cerebral ischemia in rats[J]. Neurochem Res, 2011, 36(11): 2022-2028.
- [13] 郝玉金, 王建平, 刘春岭, 等. 黄体酮对脑梗死大鼠脑部 MMP-9、TIMP-1 表达及血脑屏障通透性的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2010, 13(1): 11-13.
Hao YJ, Wang JP, Liu CL, et al. Effect of progesterone on brain infarction in rat brain MMP-9, TIMP-1 expression and blood-brain barrier permeability in the rat [J]. Chin J Pract, 2010, 13 (1): 11-13.
- [14] 王静云, 王国峰, 赵仁亮. 脑缺血预处理对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障通透性和基质金属蛋白酶-9 表达的影响[J]. 国际脑血管病杂志, 2010, 12(9): 668-673.
Wang JY, Wang GF, Zhao RL. brain ischemic preconditioning on cerebral ischemia reperfusion blood-brain barrier permeability in rats and the expression of matrix metalloproteinase -9 effect of [J]. Int J Cerebrovasc Dis, 2010, 12 (9): 668-673.
- [15] 刘晓勇, 张世明. 大鼠脑缺血再灌注后 MMP-9 的表达及人工合成 E-选择素的干预作用[J]. 中国临床神经科学, 2010, 18(2): 119-125.
Liu XY, Zhang SM. After cerebral ischemia reperfusion in rats and the expression of MMP-9 and E-selectin synthetic intervention effect [J]. Chin J Clin Neurosci, 2010, 18 (2): 119-125.

(编辑 刘清海)