

# E- 选择素介导的大鼠脑缺血再灌注后继发炎症损伤的实验干预

盛文利<sup>1</sup>, 李锐<sup>2</sup>, 许晓伟<sup>1</sup>, 王彦莉<sup>1</sup>, 黄如训<sup>1</sup>, 曾进胜<sup>1</sup>

( 1. 中山大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080; 2. 宁波市医疗中心李惠利医院神经科, 浙江 宁波 315000 )

**摘要:** 【目的】通过在大鼠脑缺血后再灌注期间使用左旋精氨酸干预黏附分子 E- 选择素的表达从而减轻炎症损伤。【方法】先后复制易卒中中型肾血管性高血压大鼠(RHRSP)模型和右侧大脑中动脉缺血 2 h 再灌注(MCAO/R)线栓模型(n=192), 并设立 MCAO 假手术组(n=48)。入选 MCAO 大鼠随机分为 3 个组, 分别于缺血早期给予左旋精氨酸(n=72)、右旋精氨酸(n=48)和等体积生理盐水(n=72)。测定缺血侧脑组织 NO 代谢物含量、MPO 活性、间接免疫荧光染色和 RT-PCR 方法检测 E- 选择素表达。【结果】左旋精氨酸组缺血后至再灌注 0、4 和 8 h 后 NO 代谢物含量(52 ±12、81 ±34、131 ±27)高于相应时间段的盐水组(43 ±14、40 ±17、105 ±39)和右旋精氨酸组(38 ±13、34 ±16、109 ±29)。左旋精氨酸组大鼠缺血及再灌注早期 E- 选择素表达及 MPO 活性低于右旋精氨酸组和盐水组。【结论】大鼠脑缺血早期使用左旋精氨酸可以增加缺血区域 NO 含量, 减少缺血再灌注早期 E- 选择素的表达和中性粒细胞的浸润。

关键词: 脑梗死; E- 选择素; 左旋精氨酸(L- arg); 一氧化氮; 易卒中中型肾血管性高血压大鼠(RHRSP)  
中图分类号: R743.3 文献标识码: A 文章编号: 1672- 3554(2007)01- 0048- 06

## Experimental Intervention of Secondary Inflammation Injuries Induced by E- selectin During Cerebral Ischemia/reperfusion in Rats

SHENG Wen- li<sup>1</sup>, LI Rui<sup>2</sup>, XU Xiao- wei<sup>1</sup>, WANG Yan- li<sup>1</sup>, HUANG Ru- xun<sup>1</sup>, ZENG Jin- sheng<sup>1</sup>

( 1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat- sen University, Guangzhou 510080, China;  
2. Department of Neurology, Li Huili Hospital of Ningbo Medical Center, Ningbo 315000, China )

**Abstract:** 【Objective】 To evaluate whether L- arginine could decrease E- selectin expression and reduce inflammation damage during focal cerebral ischemia and reperfusion of the rat. 【Methods】 Middle cerebral artery occlusion and reperfusion (MCAO/R) model according Longa's method and sham operation model were made in the stroke-prone renovascular hypertensive rats(RHRSP). MCAO/R rats were randomly divided into 3 groups receiving L- arginine(n=72), D- arginine (n=48) or 0.9% saline vehicle(n=72). Nitrite(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrate(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and myeloperoxidase activity of ischemic brain tissue were detected, and the expression of E- selectin was measured by immunofluorescent staining and RT-PCR. 【Results】 At 0 h, 4 h and 8 h later of reperfusion, Nitrite(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) detected in the L- arginine of MCAO group(52 ±12, 81 ±34, 131 ±27) were higher than those in saline(43 ±14, 40 ±17, 105 ±39) or D- arginine(38 ±13, 34 ±16, 109 ±29) of MCAO groups. During the earlier time of ischemia/reperfusion, the expression of E- selectin, and myeloperoxidase activity in the groups of MCAO with L- arginine infusions, downregulated in contrast to the other two MCAO groups. 【Conclusions】 L- arginine administered in the early stage of ischemia can upregulate the NO, which can inhibit the expression of E- selectin.

Key words: cerebral infarction; E- selectin; L- arginine (L- arg); nitric oxide (NO); stroke-prone renovascular hypertensive rats (RHRSP)

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 48- 53; 58]

收稿日期: 2006-03-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39700048, 30271378); 广东省自然科学基金资助项目(06021225, 021866, 980066, 974151); 广东省科技计划攻关项目(2002C30603, 2005B31201013, 2005B50301009); 广东省卫生厅医学基金资助项目(A2002168)

作者简介: 盛文利(1964-), 男, 湖北省鄂州市人, 博士, 主任医师。E- mail: wenlisheng@hotmail.com

脑卒中是目前威胁人类健康的三大疾病之一, 具有发病率高、致残率高、死亡率高的特点, 给患者本人、其家庭和社会带来沉重负担。目前公认的缺血性脑卒中急性期有效的治疗方法是时间窗内溶栓治疗, 尽早恢复缺血区血流, 减轻脑缺血损伤。但是缺血损伤是一个多因素相互作用、相互影响的病理生理过程。除了缺血本身, 缺血导致的血液流变紊乱、凝血机制障碍以及白细胞浸润引起的炎症反应等均参与了组织损伤。再灌注血流带来氧气和葡萄糖, 可以缓解缺血损伤, 但却伴随着更为严重的白细胞阻塞血管及浸润组织现象, 使得组织损伤加重, 产生一系列继发事件。缺血后, 尤其伴随再灌注加重的炎症反应, 特别是血管内流动的白细胞黏附于血管内皮继而渗出到血管外组织, 对已缺血组织可造成二次损伤(secondary injury)<sup>[1,2]</sup>。在炎症中, 活化的内皮细胞表面表达 E-选择素(E-selectin)参与白细胞在血管内的慢速滚动, 便于随后的黏附和渗出活动。已有实验显示使用 E-选择素抗体抑制 E-选择素表达可减轻白细胞的黏附和浸润, 增加缺血区脑血流量和减小脑梗死体积<sup>[1]</sup>。本实验旨在通过在大鼠脑缺血再灌注过程中补充一氧化氮(nitric oxide, NO)前体物质左旋精氨酸(L-arginine, L-arg)增加组织中 NO, 观测 E-选择素的表达和反映中性粒细胞浸润程度的髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性的变化, 探讨缺血后 NO 对 E-选择素及炎症反应的影响, 为减轻脑缺血再灌注时的炎症损伤提供新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型制作及分组

质量 80~100 g 健康雄性 SD 大鼠 (n=192), 按照双肾双夹法复制易卒中中型肾血管性高血压大鼠(stroke-prone renovascular hypertensive rats, RHRSP)模型。选用术后 10~12 周、无自发性卒中表现、血压峰值稳定于 180 mmHg 以上, 质量为 350~450 g 的 RHRSP 鼠, 采用 Longa 法制作右侧大脑中动脉缺血再灌注(middle cerebral artery occlusion and reperfusion, MCAO/R)模型<sup>[2]</sup>。2 h 后将栓线拔至颈外动脉残段实现颈内动脉完全再灌注。假手术组大鼠仅将尼龙线插至距颈总动脉分叉处 1.0 cm 不入颅腔, 术后 2 h 将栓线拔至颈外

动脉残段。选择 MCAO 术后评分 1~3 分大鼠随机分为 3 组, 分别于 MCAO 术后 5 min 和再灌注 5 min 前经右侧股静脉缓慢注射 L-arg (BBI 公司 AB0205; 300 mg/kg; n=72) 或者等体积生理盐水(n=72) 或者右旋精氨酸(D-arginine, D-arg, 吉而生化公司 GLS - A20829; n=48)。4 组大鼠均于再灌注 0、4、8、12、24、48 h 取标本。在手术结束麻醉清醒后及处死前按照 Longa 5 分制法对大鼠进行行为学神经功能缺损评分<sup>[2]</sup>。

### 1.2 E-选择素免疫组织化学染色和定量分析

在相应时间点, 100 g/L 水合氯醛麻醉大鼠(30 mg/kg), 先后快速升主动脉灌注肝素化生理盐水(50 U/mL) 250 mL 和 40 g/L 多聚甲醛(pH 7.4) 200 mL, 开颅取脑。标本固定后移入梯度蔗糖溶液脱水。冰冻切片连续切片。正常兔血清室温封闭 15 min。滴加 0.01 mol/L PBS 1:400 稀释的山羊抗大鼠 E-选择素多克隆抗体(Santa Cruz 公司, SC-6939), 阴性对照不加一抗, 以 0.01 mol/L PBS 代替, 4 湿盒内孵育过夜。0.01 mmol/L PBS 洗涤 5 min  $\times$ 3 次。再滴加含有 10 g/L 伊文蓝的 0.01 mol/L PBS 1:200 稀释的异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)-兔抗山羊二抗(北京中山生物有限公司, ZF-0314)室温孵育 2 h。0.01 mol/L PBS 震荡洗涤 10 min  $\times$ 3 次。甘油缓冲液封片, 荧光显微镜下观察, 随机 5 个高倍视野拍照存盘。采用 Image pro plus 5.0 图像分析软件分析免疫荧光图片, 计算阳性区域平均灰度值。

### 1.3 RT-PCR 半定量检测 E-选择素 mRNA 表达

相应时间点, 100 g/L 水合氯醛麻醉大鼠(30 mg/kg), 迅速断头冰浴中开颅, 取缺血皮层相应部位组织 100 mg, 放入装有 1 mL Trizol (BBI 公司 SK 1410) 的匀浆器中, 冰浴中快速彻底匀浆, 严格按照试剂盒操作说明进行, 最后获取标本总 RNA。

DNase I (RMase-free, TaKaRa 大连宝生物工程有限公司 D2215) 消化 RNA 中的基因组 DNA, 步骤详见试剂盒操作说明。使用 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒 (MBI Fermentas # K1622) 将 RNA 逆转录为 cDNA。使用 Taq 酶 (TaKaRa 大连宝生物工程有限公司 DR100A) 进行 PCR 扩增。E-选择素上游引物序列 CTC TGC TCT CAC CTT TGT TC, 下游引物序列 GTC ACA TCT CTC GTC ATT CC, 扩增片断 372 bp; 内参照 GAPDH 上游引物序列 GGC AAG TTC AAT GGC ACA GT, 下

游引物序列 AAG GTG GAG GAA TGG GAG TT, 扩增片段 725 bp。PCR 扩增程序: 95 预变性 2 min, 94 变性 30 s, 54 退火 30 s, 72 延伸 30 s, 28 个循环, 最后 72 延伸 7 min。1.5 g/mL 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶于 0.5  $\mu$ g/mL 溴化乙锭染色 15 min 后 Labwork 凝胶成像系统紫外光下成像分析。配对基因电泳条带灰度值的比值(E-选择素/GAPDH)作为 E-选择素相对表达强度。

#### 1.4 大鼠缺血侧脑组织 NOx 含量测定

将 1.3 中大鼠剩余缺血侧脑组织立即放入液氮速冻, 然后冻存于 -80  $^{\circ}$ C; 测定时, 组织冰域中解冻, 立即称量湿重, 以 1:10 (m/V) 加入 5 mmol/L pH 6.0 的磷酸钾缓冲液冰域中匀浆; 然后留取 1/2 的匀浆液 1 000 r/min 离心 5 min; 然后按照试剂盒 (购自南京建成生物工程公司) 操作说明使用紫外分光光度法测定蛋白中 NOx 含量。NOx 含量 ( $\mu$ mol/g) = (测定管光密度 - 空白管光密度) / (标准管光密度 - 空白管光密度)  $\times$  标准品浓度 (20  $\mu$ mol/L)  $\div$  样本的蛋白含量 (g/L)。

#### 1.5 大鼠缺血侧脑组织 MPO 活性测定

将 1.4 中剩余 1/2 匀浆液参照 Peter 法<sup>[3]</sup>操作, 用 OD/(g $\cdot$ min) 表示 MPO 活性。

#### 1.6 统计学处理

全部数据采用 SPSS 13.0 for Windows 统计软件包进行统计分析。正态分布数据用均数  $\pm$  标准差表示; 多组间比较用单因素方差分析, 当方差分析差异具有统计学意义时进一步用 SNK-q 检验做两两比较。非正态分布数据用中位数 (Median) 表示, 统计分析采用非参数检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血压测定及脑缺血后大鼠神经功能缺损评分结果

各组术前血压比较差异无统计学意义。各缺血组大鼠自身配对, MCAO 复制成功大鼠清醒后及取材前神经功能缺损评分无改变, 各 MCAO 组间大鼠神经功能缺损评分差异无统计学意义。

表 1 各组神经功能缺损评分及术前血压

	n	BP/mmHg	Score
Sham	48	205 $\pm$ 22	0.0
MCAO/R + NS	72	199 $\pm$ 29	1.0
MCAO/R + L- arg	72	214 $\pm$ 23	1.5
MCAO/R + D- arg	48	201 $\pm$ 31	1.5

No significant difference of BP exists in any two groups and of score in MCAO/R groups.

### 2.2 间接免疫荧光染色检测 E-选择素表达情况

在免疫荧光显微镜下, 假手术组无 FITC 激发的黄绿色荧光信号出现。缺血 2 h 可见黄绿色棒状、条状或者点状阳性信号出现, 主要局限于缺血的右侧顶叶皮层, 尾壳核和部分颞叶, 海马区也有少量表达。再灌注 12 h 表达达到高峰, 在 24 h 已明显下降, 48 h 仅有少量表达。同一时间, 缺血各组与假手术组相比, 差异均具有统计学意义。并且, MCAO/R + L- arg 组再灌注 4 h、8 h 时表达量低于 MCAO/R + 盐水组和 MCAO/R + D- arg 组, 其余时间点组间无差异 (表 2、图 1)。

表 2 缺血侧脑组织 E-选择素免疫染色

	n	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
Sham	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MCAO/R + NS	6	87.4 $\pm$ 2.6	151.4 $\pm$ 3.4	186.9 $\pm$ 1.0	178.2 $\pm$ 2.7	103.6 $\pm$ 1.1	76.8 $\pm$ 3.9
MCAO/R + L- arg	6	83.5 $\pm$ 2.5	134.7 $\pm$ 6.1 <sup>1),3)</sup>	174.4 $\pm$ 3.3 <sup>2),4)</sup>	172.3 $\pm$ 1.5	98.3 $\pm$ 1.4	69.2 $\pm$ 1.6
MCAO/R + D- arg	4	79.8 $\pm$ 1.2	156.7 $\pm$ 1.5	189.8 $\pm$ 2.2	180.6 $\pm$ 2.4	106.7 $\pm$ 1.4	72.1 $\pm$ 4.5
F		2.87	4.33	5.20	3.1	2.94	3.18
P		0.10	0.04	0.03	0.06	0.09	0.08

SNK-q test: 1), 2) vs MCAO/R + NS group, P=0.03, 0.04, respectively; 3), 4) vs MCAO/R + D- arg group, P=0.02, 0.04 respectively

### 2.3 RT-PCR 检测 E-选择素 mRNA 表达情况

各缺血组缺血 2 h E-选择素 mRNA 即有少



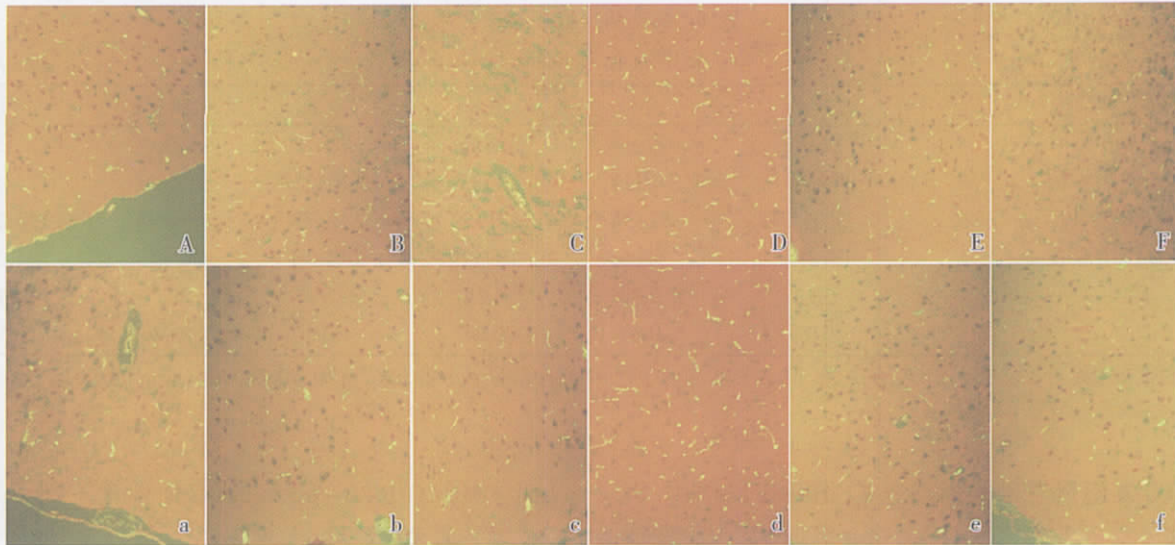


图 1 缺血侧脑组织 E-选择素免疫荧光染色

Fig.1 Immunoeexpression of E-selectin in ischemic hemisphere (×200)

A,B,C,D,E,F: MCAO/R+NS group MCAO2h/R 0,4,8,12,24,48 h respectively; a,b,c,d,e,f: MCAO/R+L-arg group MCAO2h/R 0,4,8,12,24,48 h respectively

量表达, 再灌注 8-12 h 左右达到高峰, 24 h 下降, 48 h 仅少量表达。缺血 2 h MCAO/R +L-arg 组 E-选择素 mRNA 表达量低于 MCAO/R +盐

水组, 其余各时间 MCAO/R 组间无差异 (表 3, 图 2)。

表 3 缺血侧脑组织 E-选择素 mRNA 的表达

Table 3 Expression of E-selectin mRNA in ischemic hemisphere ( $\bar{x} \pm s$ , relative expression)

	n	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
Sham	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MCAO/R + NS	6	0.88 ± 0.07	0.95 ± 0.09	1.03 ± 0.10	1.13 ± 0.02	0.92 ± 0.06	0.75 ± 0.03
MCAO/R + L- arg	6	0.80 ± 0.04 <sup>1,2)</sup>	0.94 ± 0.06	1.06 ± 0.06	1.12 ± 0.05	0.91 ± 0.09	0.74 ± 0.06
MCAO/R + D- arg	4	0.86 ± 0.05	0.96 ± 0.04	1.04 ± 0.02	1.12 ± 0.10	0.90 ± 0.04	0.75 ± 0.01
F		6.37	2.50	3.71	2.64	2.83	3.27
P		0.02	0.11	0.06	0.11	0.10	0.08

SNK- q test, 1) vs MCAO/R + NS group, P=0.04; 2) vs MCAO/R+D- arg group, P=0.03

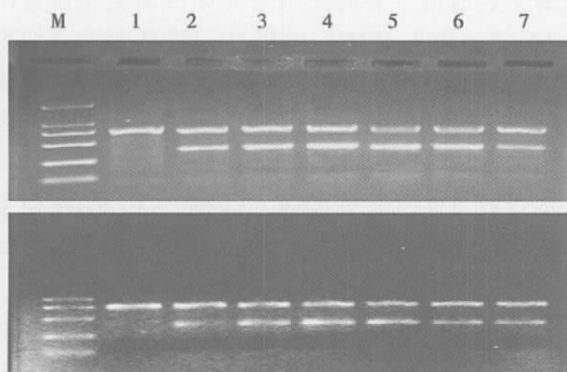


图 2 缺血侧脑组织 E-选择素 mRNA

Fig.2 mRNA of E-selectin in ischemic brain

A: MCAO/R+NS; B: MCAO/R+L-arg; 1:sham, 2-7: MCAO2h/R 0,4,8,12,24,48 h respectively

#### 2.4 紫外分光光度法检测缺血侧脑组织 NO<sub>x</sub> 含量

假手术组脑组织内有少量 NO<sub>x</sub>, 3 个缺血组各时间点的 NO<sub>x</sub> 量均高于假手术组。手术后 NO<sub>x</sub> 含量逐渐升高, 再灌注 24 h 后下降。MCAO/R + L- arg 组的缺血 2 h 和再灌注 4, 8 h 的 NO<sub>x</sub> 含量较 MCAO/R+盐水组和 MCAO/R+D- arg 组升高, MCAO/R+D- arg 组与手术+ 盐水组数据无明显差异 (表 4)。

#### 2.5 紫外分光光度法检测缺血侧脑组织 MPO 活性

假手术组未缺血脑组织内有少量 MPO 活性,

表 4 缺血侧脑组织 NO<sub>x</sub> 含量  
Table 4 NO<sub>x</sub> in ischemic hemisphere

	n	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
Sham	4	32 ±1	29 ±4	26 ±10	28 ±12	31 ±8	23 ±5
MCAO/R + NS	6	43 ±4	40 ±7	105 ±39	136 ±15	307 ±27	128 ±53
MCAO/R + L- arg	6	52 ±2 <sup>1),4)</sup>	81 ±34 <sup>2),5)</sup>	131 ±27 <sup>3),6)</sup>	141 ±37	274 ±23	135 ±25
MCAO/R + D- arg	4	38 ±3	34 ±6	109 ±29	132 ±18	290 ±15	124 ±11
F		5.12	5.38	4.15	2.79	3.21	2.91
P		0.03	0.03	0.04	0.10	0.08	0.09

SNK- q test, 1), 2), 3) vs MCAO/R + NS group, P=0.04, 0.04, 0.02, respectively; 4), 5), 6) vs MCAO/R+D- arg group, P=0.04, 0.03, 0.03 respectively

MCAO/R 组随着缺血时间延长 MPO 逐渐增加。再灌注 4, 8 h 时 MCAO/R+L- arg 组的 MPO 活性低于同一时间点 MCAO/R+盐水组。MCAO/R+盐水

组与 MCAO/R+D- arg 组的 MPO 含量差别不具有统计学意义(表 5)。

表 5 缺血侧脑组织 MPO 活性测定  
Table 5 Myeloperoxidase activity in ischemic hemisphere

	n	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
Sham	4	1.1 ±4.6	1.9 ±7.8	0.7 ±4.4	2.1 ±2.3	1.4 ±1.6	0.9 ±4.6
MCAO/R + NS	6	72.0 ±6.4	135.1 ±1.2	205.7 ±7.6	214.7 ±1.7	407.3 ±3.1	587 ±4.4
MCAO/R + L- arg	6	68.3 ±2.7	113.3 ±9.4 <sup>1),3)</sup>	180.7 ±2.0 <sup>2),4)</sup>	195.0 ±5.3	423.0 ±2.0	579.1 ±0.9
MCAO/R + D- arg	4	64.9 ±1.1	141.0 ±1.4	195.6 ±7.3	200.4 ±6.7	410.9 ±3.2	580.4 ±3.6
F		2.46	3.99	4.82	1.74	2.19	2.97
P		0.11	0.04	0.03	0.15	0.13	0.09

SNK- q test, 1), 2) vs MCAO/R + NS group, P=0.01, 0.03, respectively; 3) 4) vs MCAO/R+D- arg group, P=0.04, 0.04 respectively

### 3 讨 论

#### 3.1 动物模型

高血压是脑卒中最重要危险因素之一, 大多数脑梗塞患者有高血压和相应的脑血管基础病变。选择与人类脑卒中基础病变相近的高血压动物模型来研究脑梗塞的发病机制、发病后的病理生理改变等内容更为合理。RHRSP 模型能够模拟人类高血压进展过程及高血压性脑血管病变, 以其为基础研究脑血管事件结果更接近临床。故本试验选用 RHRSP 复制脑缺血再灌注模型, 观察缺血后黏附分子 E- 选择素的变化。

#### 3.2 脑缺血/再灌注 E- 选择素的表达

炎症(inflammation)是对抗外源性和内源性损伤因子所发生的防御反应。这种防御反应在脑缺血急性期却有潜在的危害。脑缺血后血管内的白细胞黏附于血管壁, 随后释放有毒物质损伤邻近

的内皮细胞, 并进一步迁移至缺血部位, 引起血脑屏障破坏, 水肿和组织细胞死亡, 造成 2 次损伤(secondary injury)。这种炎症与再灌注的相关性可能使得缺血性脑卒中急性期溶栓治疗的有效性受到影响。E- 选择素是黏附分子系列中选择素家族的一名成员主要的作用是介导白细胞在血管内的“慢速滚动”, 而这一作用被证明更利于白细胞的黏附<sup>[4]</sup>。E- 选择素只表达于被一些细胞因子, 如肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ ), 刺激而活化的内皮细胞表面, 表达具有一定的时间期限, 其调节主要在转录水平实现。在本实验中, 缺血脑组织内 E- 选择素的 mRNA 与蛋白均呈现一致的先升高后降低的动态变化, 这与以往的实验结果一致<sup>[5]</sup>。

在实验中我们遇到极个别假手术组大鼠标本较大血管内皮有免疫荧光染色阳性信号, 考虑可能是栓线插入颈内动脉后脑血管痉挛及动脉内膜机械损伤等原因所致, 通过加强栓线头端处理和操作中尽量减少血管牵拉等措施力求减少

对实验结果的影响。

### 3.3 脑缺血后早期补充 NO 可减少 E-选择素表达

本实验使用硝酸还原酶将样品中硝酸根离子还原为亚硝酸根离子,测定样品中硝酸盐的量来反映 NO 浓度的高低。正常情况下内皮细胞持续低量的合成、释放 NO,调节微循环,维持血管处于舒张状态,所以假手术组脑组织内有少量 NO 存在。缺血后 NO 波动性变化:NO 含量随着再灌注时间延长明显增加,至再灌注 24 h 后下降。补充 NO 生理性的前体 L-arg 后,缺血 2 h 和再灌注后 4 h、8 h 时脑组织 NO 的含量增加更加明显。并且该组缺血 2 h 的 E-选择素 mRNA 表达下降,在再灌注 4、8 h,免疫荧光染色显示 E-选择素表达下降, MPO 活性也明显低于其他两个 MCAO/R 组。D-arg 为 L-arg 的旋光异构体,不能生成 NO,补充 D-arg 无上述变化。这个结果提示补充 L-arg 增加的 NO 在相应的时间段很可能抑制 E-选择素表达,并且使得相应的中性粒细胞在缺血侧脑组织的浸润减轻。不过实验中选用的 Longa 评分较为粗糙,不能精确显示 MCAO 后各组神经功能缺损评分与相应时间取材时功能缺损评分差异。

NO 抑制 E-选择素的作用机制尚不清楚,可能与核因子 B (nuclear factor - kappa B, NF- $\kappa$ B) 有关。在 E-选择素基因的转录调控中,细胞因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 或 LPS 等刺激细胞后,被信号诱导激活的 I $\kappa$ B 激酶(I $\kappa$ B kinase, I $\kappa$ K) 通过磷酸化及随后的泛素化作用降解 NF- $\kappa$ B 的抑制蛋白 I $\kappa$ B (inhibitory NF- $\kappa$ B), 活化的 NF- $\kappa$ B 快速移位进入细胞核内,结合到 E-选择素基因的相应位点,并与结合于 E-选择素基因启动子上游序列 TGACATCA 的复合物 NF-ELAM1 协同启动下游特异性的 E-选择素基因的转录。NO 还可以干预引起 NF- $\kappa$ B 活化的一些信号途径,通过抑制蛋白酶活性妨碍信号诱导的 I $\kappa$ B 的降解,NO 还作为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除剂和抗氧化剂能抑制其他自由基激活 NF- $\kappa$ B<sup>[9]</sup>。所以本实验 L-arg 产生的 NO 发挥抑制 E-选择素的功能可能与 NO 抑制 NF- $\kappa$ B 有关。

大量实验提示脑缺血后 NO 具有保护和损伤双重功效。脑缺血早期 NO 具有扩张局部血管,增加血供作用。缺血后期表达的大量 NO 可以与一

些化学分子发生不可逆的化学反应生成一系列的衍生物,如与超氧阴离子反应生成过氧化亚硝酸根,后者具有强氧化作用,调节重要调节蛋白质的酪氨酸硝基化,抑制细胞线粒体氧化呼吸。另外还能介导兴奋性氨基酸神经毒性作用,损伤 DNA 等作用加重组织损伤。目前认为 NOS 是决定其双重作用的关键因素。不同亚型的 NOS 在脑缺血损伤中的作用不同:eNOS 合成释放的 NO 具有神经保护性,而源于 nNOS 和 iNOS 的 NO 则具有神经毒性。脑缺血后 NOS 同工酶 eNOS 首先表达,其后为 nNOS,而 iNOS 为非钙离子依赖性酶,其表达在脑缺血后(>6 h) 较长一段时间后才能发生<sup>[7]</sup>。本实验中在缺血早期补充 L-arg 后 NO 的增加可能以前两种酶作用为主,早期 NO 的保护性可能与其抑制 E-选择素等炎症介质有一定的关系。

补充 L-arg 使得 NO 增加,但是 MPO 活性的短时间降低并不能完全由 NO 抑制了 E-选择素解释。一些研究发现 NO 可以降低中性粒细胞对 FMLP 的趋化性<sup>[8]</sup>,抑制 VCAM-1 等黏附分子<sup>[9]</sup>的表达。所以本实验中补充 NO 降低 E-选择素的表达只是相应时间点 MPO 活性降低的一部分原因。

本实验发现脑缺血早期使用 L-arg 可以短期增加再灌注时 NO 生成,明显抑制缺血后 E-选择素表达,减轻脑缺血后早期白细胞浸润,这为临床溶栓治疗后进一步加强脑保护治疗可以提供一些的思路。

#### 参考文献:

- [1] HUANG J, CHOUDHRI T F, WINFREE C J, et al. Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke [J]. Stroke, 2000, 31(12):3047-3053.
- [2] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [3] BRADLEY P P, PRIEBAT D A, CHRISTENSEN R D, et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker [J]. J Invest Dermatol, 1982, 78(3):206-209.
- [4] KUNKEL E J, LEY K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow

(下转第 58 页 to page 58)

- member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator [J]. *Science*,1999,285(5425):260-263.
- [2] CROWLEY J E, TREML L S, STADANLICK J E, et al. Homeostatic niche specification among naive and activated B cells: a growing role for the BLYS family of receptors and ligands [J]. *Immunol*, 2005,17(3):193- 199.
- [3] ZHANG X, PARK C S, YOON S O, et al. BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors [J]. *Int Immunol*, 2005,17(6):779- 788.
- [4] KHARE S D, SAROSI I, XIA X Z, et al. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL - 1 transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2000,97(7):3370- 3375.
- [5] GROSS J A, JOHNSTON J, MUDRI S, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B- cell autoimmune disease [J]. *Nature*,2000,404(6781): 995- 999.
- [6] CHEEMA G S, ROSCHKE V, HILBERT D M, et al. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune - based rheumatic diseases [J]. *Arthritis Rheum*, 2001,44(6):1313- 1319.
- [7] COLLINS C E, GAVIN A L, MIGONE T S, et al. B lymphocyte stimulator (BLYS) isoforms in systemic lupus erythematosus: disease activity correlates better with blood leukocyte BLYS mRNA levels than with plasma BLYS protein levels [J]. *Arthritis Res Ther*,2005,8(1):R6 [Epub ahead of print].
- [8] CARTER R H, ZHAO H, LIU X, et al. Expression and occupancy of BAFF - R on B cells in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*,2005,52(12):3943- 3954.
- [9] RAHMAN Z S, MANSER T. B cells expressing Bcl- 2 and a signaling- impaired BAFF- specific receptor fail to mature and are deficient in the formation of lymphoid follicles and germinal centers [J]. *J Immunol*,2004,173(10):6179- 6188.
- [10] FU L, LIN- LEE Y C, PHAM L V, et al. Constitutive NF- kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLYS survival pathway in aggressive B - cell lymphomas [J]. *Blood*, 2006,107(11):4540- 4548.
- [11] 叶玉津, 尹培达, 余学清. 系统性红斑狼疮患者 B 细胞刺激因子的表达及其临床意义[J]. *中华风湿病学杂志*,2004,8(7):392- 395.
- [12] NARDELLI B, BELVEDERE O, ROSCHKE V, et al. Synthesis and release of B- lymphocyte stimulator from myeloid cells [J]. *Blood*,2001,97(1):198- 204.
- [13] PARK Y B, LEE S K, KIM D S, et al. Elevated interleukin- 10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 1998,16(3):283- 288.
- [14] LEVY Y, BROUET J C. Interleukin - 10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl- 2 protein [J]. *J Clin Invest*,1994, 93(1):424- 428.
- [15] LLORENTE L, RICHAUD P Y, GARCIA P C, et al. Clinical and biologic effects of anti - interleukin - 10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*,2000,43(8): 1790- 1800.

(编辑 黄小延)

(上接第 53 页 from page 53)

- leukocyte rolling in vivo [J]. *Circ Res*,1996,79(6):1196- 1204.
- [5] PATEL K D, CUVELIER S L, WIEHLER S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment [J]. *Semin Immunol*, 2002,14(2):73- 81.
- [6] CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X, et al. New insights into the role of Nuclear Factor - kB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases [J]. *Clin Chem*,1999,45(1):7- 17.
- [7] HOLTZ M L, CRADDOCK S D, PETTIGREW L C. Rapid expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases during post - ischemic reperfusion in rat brain [J]. *Brain Res*,2001, 898(1):49- 60.
- [8] MOILANEN E, VUORINEN P, KANKAANRANTA H, et al. Inhibition by nitric oxide - donors of human polymorphonuclear leukocyte functions [J]. *Br J Pharmacol*,1993,109(3):852- 858.
- [9] KHAN B V, HARRISON D G, OLBRYCH M T, et al. Nitric oxide regulated vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox - sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996,93(17):9114- 9119.

(编辑 刘清海)