

## · 简 报 ·

## 大鼠脑缺血/再灌注损伤中环磷酸胺干预研究

张怀波<sup>1</sup>, 雷万龙<sup>1</sup>, 姚志彬<sup>1</sup>, 刘 勇<sup>2</sup>

(1. 中山医科大学人体解剖学和神经生物学教研室, 广东 广州 510089;

2. 西安医科大学神经生物学教研室, 陕西 西安 710061)

关键词: 环磷酸胺/治疗应用; 再灌注损伤; 脑缺血

中图分类号: R322.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0118-02

脑缺血再灌注过程中白细胞浸润, 粘附分子高表达及炎症介质或细胞因子水平升高, 均显示与炎症反应和免疫密不可分, 白细胞粘附浸润是缺血性脑损伤的发生及发展的重要因素, 而细胞间粘附分子及其介导的白细胞和血管内皮细胞粘附是白细胞粘附浸润的关键<sup>[1]</sup>, 但其详细机制仍不清楚。本课题通过研究免疫抑制剂环磷酸胺干预实验在脑缺血再灌注损伤中作用, 以期进一步探讨大鼠脑缺血/再灌注损伤的免疫机制, 为脑中风的预防和治疗提供基础资料。

## 1 材料和方法

## 1.1 实验动物及分组

实验用SD大鼠50只, 3~4月龄, 体质量250~300g, 分为正常对照组、环磷酸胺处理组、缺血再灌注组(缺血1h, 再灌注6h); 预防组(做模型前两天经股静脉注射环磷酸胺, 1.6mg/只, 每日1次); 治疗组(缺血1h再灌注前经股静脉注射环磷酸胺1.6mg/只), 每组各10只, 由西安医科大学实验动物中心提供。

## 1.2 模型及取材

采用Barone法<sup>[2]</sup>制做大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型, 并对某些步骤进行了修改。其主要步骤为: 对大鼠施200g/L乌拉坦(剂量为0.6mL/100g)腹腔注射麻醉后, 从颞区入颅, 暴露右侧大脑中动脉, 在嗅沟上方用9-0的无创伤缝合线吊其主干, 高度为1~2mm, 缺血1h后抽出缝线, 此时始再灌注6h, 并依次缝合颞肌和皮肤。

大鼠脑缺血/再灌注后, 在麻醉下开胸, 用40g/L多聚甲醛(0.01mol/L PB配制)常规灌注、固定、开颅取脑。对固定之后的大脑恒冷箱冰冻切片(厚16 $\mu$ m)和石蜡切片(8 $\mu$ m)用于染色实验。

## 1.3 常规HE染色

用石蜡切片常规脱蜡至水, HE染色、脱水、透明、封片。

## 1.4 免疫组化ABC法

冰冻切片于室温干燥后入冷丙酮10min, 依次滴加体积分数0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37 $^{\circ}$ C 15min, 体积分数0.3% Triton X-100 37 $^{\circ}$ C 15min, 体积分数3%马血清(0.01mol/L PBS配制), 37 $^{\circ}$ C 1h, 滴加抗大鼠巨噬细胞特异性抗体ED-2(1:1000), 4 $^{\circ}$ C 24h。生物素标记IgG(1:200) 37 $^{\circ}$ C 2h。ABC(1:200) 37 $^{\circ}$ C 2h, DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温显色5min。每步间用0.01mol/L PBS pH 7.4洗3次, 每次5min, 常规脱水、透明、封片。阴性对照片用PBS代替I抗。

## 1.5 原位杂交法

按文献[3], 依次进行菌株活化及质粒提取(碱裂解法)后, 限制性内切酶消化质粒, 得到性内I-CAM-1 cDNA片段, 然后进行地高辛标记。将石蜡切片进行杂交前处理和预杂交; 滴加1:1000地高辛抗体, 37 $^{\circ}$ C 5h, NBT闭光显色4~10h, 终止反应后脱水、透明, 封片。技术对照杂交液中不加探针。

## 1.6 定量分析

以相同的光亮强度和放大倍数对反应后的切片进行光镜观察, 用C6型光镜网格尺对阳性细胞(网格尺内的细胞个数)计数, 用图像分析仪对原位

收稿日期: 2000-03-25

基金项目: 西安医科大学回国人员启动基金资助项目(1994)

作者简介: 张怀波(1968-), 男, 河南濮阳人, 博士, 现在中山医科大学人体解剖学教研室做博士后工作。

杂交阳性杂交体的面积值进行图像分析 ( $\mu\text{m}^2$ /每个视野)。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 运用方差分析,  $q$  检验判断结果。

## 2 结果

脑缺血再灌注组神经元损伤的形态改变学以红神经元、影神经元、扇贝状染元为主; 预防组以肿胀神经元和扇贝壳状神经元为主; 而治疗组神经元与缺血灌注组形态学比较改变不明显, 而正常对照组和环磷酸腺苷处理组则无病理学改变。

免疫组化染色显示阳性巨噬细胞呈棕黄色, 聚集于胞浆内, 呈圆形、椭圆形, 随血管的走行、分支而分布, 巨噬细胞聚集于血管内、血管周围和脑实质内以损伤侧的皮质和基底节区为多, 脑损伤的边缘带比中央区更多。缺血再灌注组、预防组、治疗组损伤侧皮质区、基底节区 ED-2 阳性细胞数均比正常对照组和环磷酸腺苷处理组显著增加 ( $P < 0.05$ ), 预防组比缺血再灌注组损伤侧皮质区、基底节区 ED-2 阳性细胞数显著减少 ( $P < 0.05$ ), 但治疗组和缺血再灌注组间 ED-2 阳性细胞数无显著差别 ( $P > 0.05$ ); 结果还显示损伤侧基底节区巨噬细胞的聚集较损伤侧皮质区多 ( $P < 0.05$ )。

ICAM-1 mRNA 阳性杂交反应血管呈深蓝色, 正常对照组的脑血管呈阴性反应。杂交反应阳性血管主要存在于损伤侧大脑皮质缺血区, 主要见于微血管, 较大的血管反应弱, 未见其它细胞的表达。原位杂交结果显示脑缺血再灌注组血浆 ICAM-1 和脑血管 ICAM-1 mRNA 表达高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 但预防组、治疗组与缺血再灌注组无明显差异。

## 3 讨论

Chopp 等<sup>[4]</sup> 对大鼠大脑中动脉缺血再灌注后的神经元按照损伤程度轻重进行分类可分为: ①肿胀神经元; ②扇贝壳状神经元; ③红神经元; ④影神经元; ⑤凋亡神经元。本实验采用了此种分类方法。我们的实验结果可以提示: 预先给予环磷酸腺苷处理, 对神经元损伤具有保护作用。

缺血再灌注组脑缺血区有大量白细胞、巨噬细胞聚集和浸润现象, 在预先给予免疫抑制剂环磷酸腺苷干预后, 脑缺血区的白细胞、巨噬细胞聚集, 浸润

减少, 缺血后给予免疫抑制剂, 脑缺血区的白细胞、巨噬细胞聚集浸润减少不明显。这可以证实: ①白细胞、巨噬细胞的聚集和浸润参与了脑缺血再灌注损伤免疫机制; ②可能通过抑制白细胞功能减轻神经元损伤。基础研究和临床观察显示, 大脑基底节区对缺血反应敏感, 但对其原因所知甚少, 认为可能与血管的构筑特点有关, 研究发现该区域血管以直角发出、在基底节内蜿蜒行程并形成密集的血管网。从血管代谢方面的研究证实, 该区域血管具有老龄血管的特征, 即 ATP 酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性低, 并认为此因素是易发生中风的原因<sup>[5]</sup>。

脑缺血诱导内皮细胞和白细胞活化, 分别表达 ICAM-1 和淋巴功能因子 (LFA-1) 等细胞粘附分子。ICAM-1 与 LFA-1 互为配体, 二者结合是白细胞粘附、聚体和迁移的基础<sup>[6]</sup>。本结果却显示: 正常对照组和环磷酸腺苷处理组 ICAM-1 mRNA 不表达, 缺血再灌注组表达明显升高, 但与预防组和治疗组之间无显著性差异。提示环磷酸腺苷对神经元的保护作用可能是通过抑制白细胞表面粘附分子表达实现的, 这仍还须进一步的探讨和研究。

### 参考文献:

- [ 1 ] Lindsberg P J, Carpen O, Paetau A, *et al.* Endothelial ICAM-1 express associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke [ J ]. *Circulation*, 1996, 94(5): 939.
- [ 2 ] Barone F C, Schmidt D B, Hillegass L M, *et al.* Reperfusion increases neutrophils and leukotriene  $\beta_4$  receptor binding in rat focal ischemia [ J ]. *Stroke*, 1992, 23(9): 1337.
- [ 3 ] 季代金, 张亚历. 分子生物学常用实验方法 [ M ]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 128~141.
- [ 4 ] Li Y, Chopp M, Powers C, *et al.* Apoptosis and protein expression after cerebral ischemia in rat [ J ]. *Brain Res*, 1997, 765(2): 301.
- [ 5 ] Rieke G K, Cannon M S. A histochemical study of cerebral cortical vessels and ganglionic vessels of the caudatoputamen in aging normotensive rats [ J ]. *Stroke*, 1985, 16(2): 285.
- [ 6 ] Matsuo 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.

(编辑 张敏瑞)