

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.27.002

后处理对心肌缺血再灌注致脑损伤中炎症因子及 GFAP 的影响 *

刘 恋 夏中元[△] 袁 泉 赵 博 江 梦

(武汉大学人民医院麻醉科 武汉 湖北 430060)

摘要 目的:探讨缺血后处理对心肌缺血再灌注致脑损伤中炎症因子及胶质纤维酸性蛋白的影响。**方法:**24 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组(n=8),假手术组(Sham)、心肌缺血/再灌注组(IR)、后处理组(IPost)。结扎大鼠冠状动脉左前降支 30 min,复流 120 min 建立大鼠心肌缺血/再灌注模型。后处理组于再灌注前进行缺血后处理,再灌注 10 s,缺血 10 s,共 3 次。断头处死大鼠取脑组织,光镜下观察病理学结果,Western blot 检测炎症因子 IL-6、IL-8、IL-10,免疫组化法检测 GFAP。**结果:**与 Sham 组相比较,IR 组脑组织炎症因子 IL-6、IL-8 表达增加,IL-10 下降($P<0.01$),而后处理可以降低脑组织中 IL-6、IL-8 的表达,增加 IL-10 的表达($P<0.01$);与 Sham 组相比较,IR 组脑组织 GFAP 表达增多($P<0.05$),而后处理可以显著增加脑组织中 GFAP 的表达($P<0.01$)。**结论:**心肌缺血后处理可以减少脑组织中炎症因子的表达,增加 GFAP 的表达,从而起到脑保护作用。

关键词:缺血后处理;心肌缺血再灌注;炎症因子;胶质纤维酸性蛋白

中图分类号:R-33;R541;R614 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)27-5206-04

Effect of Post-conditioning in Brain Injury Induced by Myocardial IR on Inflammatory Factor and GFAP*

LIU Lian, XIA Zhong-yuan[△], YUAN Quan, ZHAO Bo, JIANG Meng

(Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the effect of post-conditioning in brain injury induced by myocardial I/R on inflammatory factor and GFAP. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were randomly allocated into 3 groups (n=8): group Sham, group IR, group IPost. Myocardial IR was induced by occlusion of the anterior descending branch of the left coronary artery for 30 min. group IPost received 3 cycles of 10 s reperfusion followed by 10 s ischemia at the end of myocardial ischemia. The rats were sacrificed at 120 min of reperfusion and the brains were removed for microscopic examination, inflammatory factors and GFAP. **Results:** Compared with group Sham, IL-6, IL-8 were significantly increased, IL-10 was down-regulated in group IR($P<0.01$). Post-conditioning can decrease IL-6, IL-8 and up-regulated IL-10($P<0.01$). When compared with group Sham, the expression of GFAP was higher in group IR($P<0.05$), however, the GFAP in group IPost is the most among these three groups($P<0.01$). **Conclusion:** Post-conditioning could protect brain by decreasing inflammatory factors, increasing GFAP, which both from brain injury induced by myocardial ischemia reperfusion.

Key words: Post-conditioning; Myocardial ischemia reperfusion; Inflammatory factor; GFAP

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541; R614 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)27-5206-04

前言

缺血再灌注损伤后,机体组织的自我修复是研究的热点之一。星形胶质细胞在中枢神经系统中发挥着支持神经元、分泌神经营养因子及免疫应答等重要功能^[1,2]。在中枢神经系统受损时,其发生活化进而使受损神经元得到修复。胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)作为构成神经胶质细胞的主要细胞骨架蛋白,其表达的高低可以反映胶质细胞的功能状态^[3,4]。

我们的前期研究^[5-7]发现心肌缺血再灌注会引起炎症因子和氧自由基的增多,脑部虽然有血脑屏障的保护,但是这些介

质仍可以通过机体内的血液再分布进入其他脏器并导致相应损伤,而后处理可以部分减轻再灌注损伤。因此,本研究拟观察心肌缺血再灌注致脑损伤后,后处理对脑组织的自我修复的保护作用,以期临床脑保护及修复提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

SD 大鼠购置于北京华阜康生物科技股份有限公司,IL-6、IL-8、IL-10、GFAP 购置于美国 Cell Signaling 公司,荧光二抗购置于美国 LI-COR 公司,DW-2000 型动物呼吸机购置于中国上海嘉鹏科技有限公司,BX50 显微摄影系统购置于日本 Olym-

* 基金项目:湖北省自然科学基金项目(2016CFB167);中央高校基本科研业务费专项基金项目(2042017kf0147)

作者简介:刘恋(1991-),硕士,研究方向:围术期脑保护,E-mail: elysiall@foxmail.com

[△] 通讯作者:夏中元(1965-),博士,主任医师,研究方向:围术期脏器保护,E-mail: xiazhongyuan2005@aliyun.com

(收稿日期:2017-01-30 接受日期:2017-02-25)

pus 公司。

1.2 实验分组

雄性 SD 大鼠(SPF 级)24 只,体重 200-220 g,采用随机数表法分为 3 组,(1) 假手术组 (Sham)、(2) 心肌缺血 / 再灌注组 (IR)、(3)缺血后处理组(IPost)。

1.3 心肌缺血再灌注模型

大鼠腹腔注射 3 %戊巴比妥钠(50 mg/kg),固定后连接心电图导联,行气管切开,呼吸机通气,分离股静脉并置管。开胸结扎冠状动脉左前降支(LDA),心电图见到明显的 ST 短抬高(>0.12 mV),心前区变白,则认为造模成功。结扎时间为 30 min,松开线结再灌注 120 min 后取脑组织。再灌注成功标准^[8,9]:ST 段回落,心尖恢复红润。结扎时间为 30 min,松开线结再灌注 120 min 后取脑组织。假手术组只穿线,不结扎 LAD。后处理组于再灌注前进行缺血后处理,再灌注 10 s,缺血 10 s,重复 3 次。

1.4 指标检测

(1)制备石蜡切片,置于 4 %多聚甲醛溶液中固定 24 h,HE 染色,光镜($\times 400$)下观察病理学结果;(2)Western blot 法检测炎症因子 IL-6、IL-8、IL-10;脑组织用裂解液提取蛋白,测定蛋白

浓度,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白,冰浴转膜后,脱脂奶粉室温封闭 1-2 h,一抗 4 ℃孵育过夜,次日荧光二抗孵育 1 h 后 TBST 清洗,红外成像系统扫描,读取灰度值;(3)免疫组化法检测 GFAP:切片入水,3 %H₂O₂ 孵育 10 min,加入 GFAP 多克隆抗体,4 ℃孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,37 ℃孵育 20 min;滴加 SP,37 ℃孵育 20 min,DAB 显色,苏木素复染,常规脱水,透明,干燥,封片。

1.5 统计学处理

所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据分析均采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行,组间比较采用方差分析。P<0.05 则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌缺血再灌注后脑组织病理切片

光镜下(400 倍),在假手术组中,皮层神经元胞浆丰富,排列整齐,核圆而碱染呈蓝色。IR 组中,皮层神经元结构遭到破坏。胞浆空泡化,呈分布不均匀的淡红色,胞核固缩。IPost 组中,细胞结构基本恢复正常,大多数神经元胞膜完整,胞核清晰。

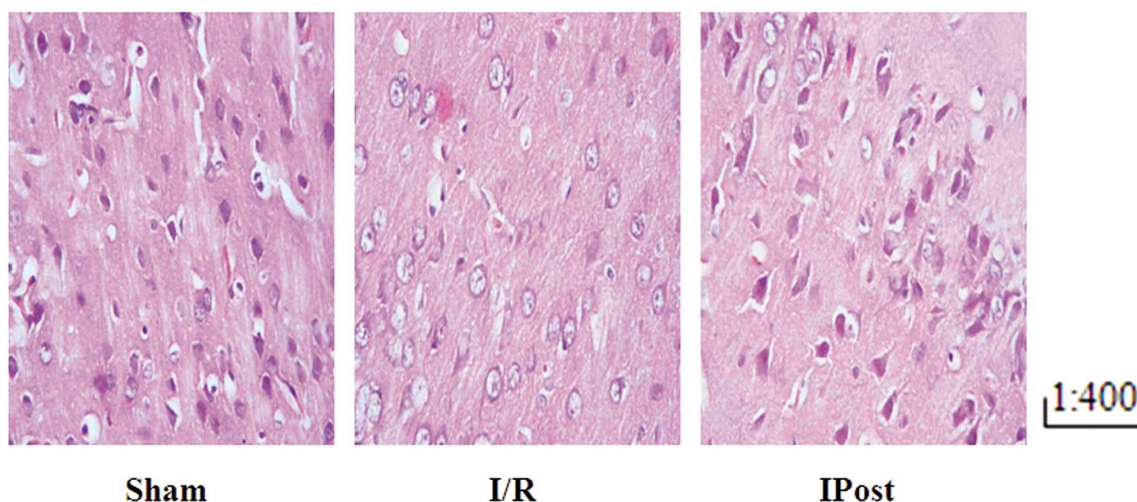


图 1 三组大鼠脑组织 HE 染色

Fig. 1 H&E staining of the brain in three groups

2.2 心肌缺血再灌注后脑组织炎症因子

缺血再灌注损伤能引起脑组织炎症因子 IL-6、IL-8 表达水平增加,IL-10 表达下降(P<0.01);而缺血后处理可以降低脑组

织中炎症因子 IL-6、IL-8 的表达,增加 IL-10 的表达(P<0.01)。见表 1,图 2。

表 1 三组大鼠脑组织中炎症因子表达的比较(n=8, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expressions of inflammatory factor in three groups(n=8, $\bar{x} \pm s$)

	IL-6	IL-8	IL-10
Sham	1.0	1.0	1.0
IR	6.6 $\pm$ 0.5 ^a	7.9 $\pm$ 0.4 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^a
IPost	3.5 $\pm$ 0.3 ^{ab}	3.9 $\pm$ 0.6 ^{ab}	1.3 $\pm$ 0.2 ^{ab}

Note: compared with group Sham: ^aP<0.01, compared with group IR: ^bP<0.01.

2.3 心肌缺血再灌注后脑组织 GFAP 的表达

与假手术组相比较,缺血再灌注损伤能引起脑组织 GFAP 表达增多 (P<0.01); 而缺血后处理可以显著增加脑组织中 GFAP 的表达(P<0.01)。见图 3,4。I/R 组散在分布 GFAP 阳性的星形胶质细胞,分布较稀疏,胞体较小,突起细小,而 IPost 组有

大量密集的,GFAP 阳性纤维互相交织的,胞体较大、突起粗长的反应性星形胶质细胞。

3 讨论

星形胶质细胞是中枢神经系统最主要的胶质细胞,在正常

情况下发挥着支持神经元、分泌神经营养因子、参与递质代谢、物质运输、血脑屏障形成及免疫应答等作用^[1,10]。在中枢神经系统受损时,其发生活化反应进而使受损神经元得到修复,促进轴突再生,并填充缺损神经组织^[11,12]。

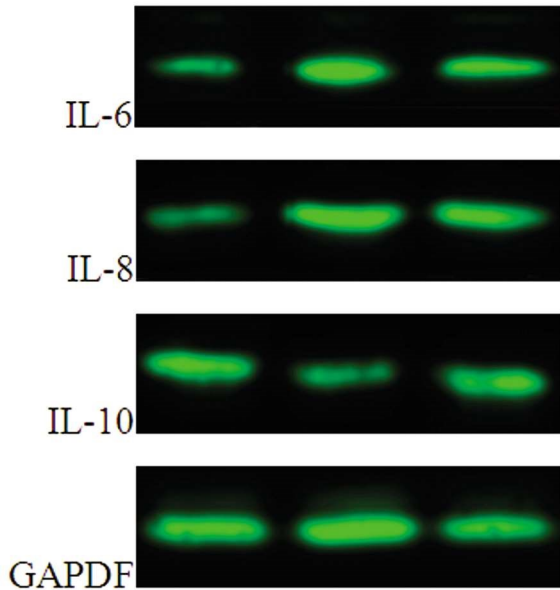


图2 三组大鼠脑组织中炎症因子 western blot 表达条带

Fig.2 The western blot of inflammatory factor in three groups

胶质纤维酸性蛋白是星形胶质细胞的主要成分,是构成神经胶质细胞的主要细胞骨架蛋白,在维持星形胶质细胞的形态和功能上有重要作用^[3,13]。在中枢神经系统正常组织中 GFAP 的表达水平较低,当中枢神经系统损伤导致星形胶质细胞反应性增生时,GFAP 的表达上调^[4,15]。因此,GFAP 被视为星形胶质细胞增生和胶质瘢痕形成的敏感又可靠的指标。

本研究结果显示:缺血再灌注后,皮层神经元结构遭到破坏,胞浆空泡化,呈分布不均匀的淡红色,胞核固缩,炎症因子 IL-6,IL-8 表达水平显著增加,而抗炎因子 IL-10 表达下降。结果表明:心肌缺血再灌注会引起炎症因子的增多,这些介质可以通过机体内的血液分布到脑组织并导致相应损伤。

本研究结果显示:缺血再灌注损伤能引起脑组织 GFAP 表达增多,而缺血后处理可以显著增加脑组织中 GFAP 的表达。GFAP 作为客观反应星形胶质细胞增生程度和脑梗死后脑组织病变程度的指标。其增生是脑梗死后的正常过程,对神经修复和功能重建发挥着有利作用^[16,17]。但同时应注意星形胶质细胞的过度增生和胶质瘢痕形成对损伤修复的不利影响,其中最典型的是抑制轴突的再生^[18-20]。并可产生活性氧,释放毒性物质,分泌有害细胞因子,破坏血脑屏障。

综上所述,心肌缺血后处理可以减少脑组织中炎症因子的表达,增加 GFAP 的表达,从而起到脑保护作用,但要同时注意 GFAP 的过度增生带来的不利影响。

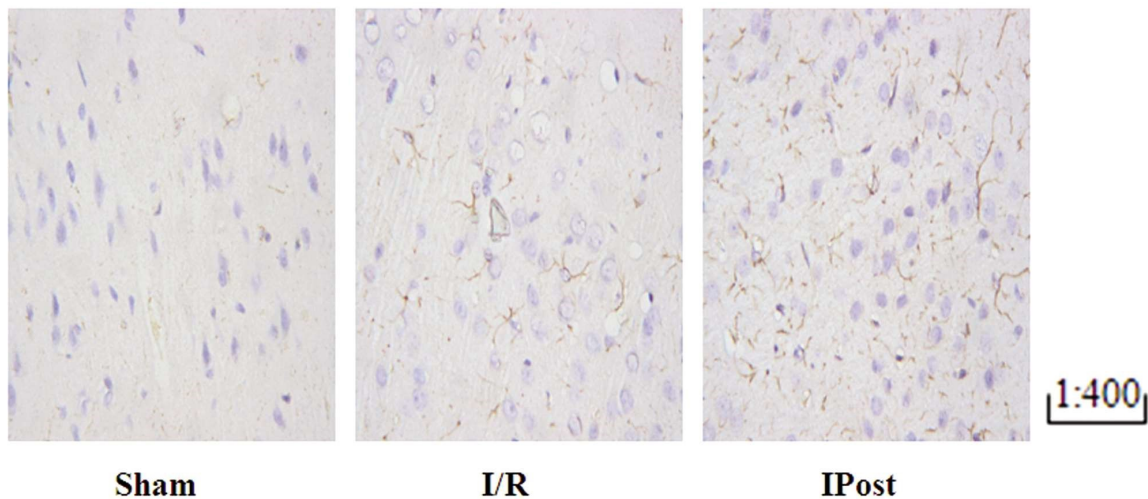


图3 三组大鼠脑组织中 GFAP 表达的比较

Fig.3 GFAP of the brain in three groups

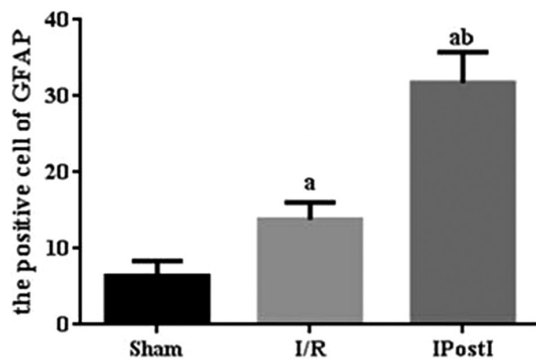


图4 三组大鼠脑组织中 GFAP 表达的比较

Fig.4 The expressions of GFAP in brain in three groups

Note: compared with group Sham: ^aP<0.01, compared with group IR:

^bP<0.01.

参考文献(References)

- [1] Anderson MA, Burda JE, Ren Y, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration [J]. Nature, 2016, 532 (7598): 195-200
- [2] Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, et al. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion[J]. EMBO J, 2016, 35(3): 239-257
- [3] Choi HB, Gordon GR, Zhou N, et al. Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase[J]. Neuron, 2012, 75(6): 1094-1104
- [4] Hinton DJ, Lee MR, Jang JS, et al. Type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein expression in the striatum[J]. Brain Behav, 2014, 4(6): 903-914

- [5] 赵博, 高文蔚, 侯家保, 等. 缺血后处理减轻心肌缺血再灌注引起的脑损伤的机制[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(11): 2352-2354
Zhao Bo, Gao Wen-wei, Hou Jia-bao, et al. Mechanism of post-conditioning in brain injury induced by myocardial ischemia/reperfusion [J]. Chin J Exp Surg, 2013, 30(11): 2352-2354
- [6] 赵博, 冷燕, 吴晓静, 等. JAK2/STAT3 信号通路在糖尿病大鼠心肌缺血再灌注诱发脑损伤中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(2): 211-213
Zhao Bo, Leng Yan, Wu Xiao-jing, et al. Role of JAK2/STAT3 signaling pathway in brain injury induced by myocardial ischemia-reperfusion in diabetic rats[J]. Chin J Anesthesiol, 2016, 36(2): 211-213
- [7] 赵博, 夏中元, 高文蔚, 等. 缺血后处理对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注诱发脑损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2014, 34(1): 82-84
Zhao Bo, Xia Zhong-yuan, Gao Wen-wei, et al. Effect of ischemic postconditioning on brain injury induced by myocardial ischemia-reperfusion in diabetic rats[J]. Chin J Anesthesiol, 2014, 34(1): 82-84
- [8] Xue R, Lei S, Xia ZY, et al. Selective inhibition of PTEN preserves ischaemic post-conditioning cardioprotection in STZ-induced Type 1 diabetic rats: role of the PI3K/Akt and JAK2/STAT3 pathways [J]. Clin Sci (Lond), 2016, 130(5): 377-392
- [9] Xu J, Li H, Irwin MG, et al. Propofol ameliorates hyperglycemia-induced cardiac hypertrophy and dysfunction via heme oxygenase-1/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway in rats[J]. Crit Care Med, 2014, 42(8): e583-594
- [10] 杨杰, 李华栋, 王宏瑜, 等. 星形胶质细胞糖代谢对神经元的支持及保护作用[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(9): 1793-1795
Yang Jie, Li Hua-dong, Wang Hong-yu, et al. Glucose Metabolism of Astrocytes Support and Protect Neurons [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(9): 1793-1795
- [11] Stevens B, Muthukumar AK. Cellular neuroscience. Differences among astrocytes[J]. Science, 2016, 351(6275): 813
- [12] Lee HH, Park SC, Choe IS, et al. Time Course and Characteristics of Astrocyte Activation in the Rat Brain after Injury[J]. Korean J Neurotrauma, 2015, 11(2): 44-51
- [13] Jahn HM, Scheller A, Kirchhoff F. Genetic control of astrocyte function in neural circuits[J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 310
- [14] Chaboub LS, Deneen B. Astrocyte form and function in the developing central nervous system [J]. Semin Pediatr Neurol, 2013, 20(4): 230-235
- [15] Deka H, Sarmah R, Sharma A, et al. Modelling and Characterization of Glial Fibrillary Acidic Protein [J]. Bioinformation, 2015, 11(8): 393-400
- [16] Ennen CS, Huisman TA, Savage WJ, et al. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling[J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 205(3): 251.e1-7
- [17] Zhang R, Pei H, Ru L, et al. Bone morphogenetic protein 7 upregulates the expression of nestin and glial fibrillary acidic protein in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Biomed Rep, 2013, 1(6): 895-900
- [18] Al-Jarrah MD, Jamous M. Effect of endurance exercise training on the expression of GFAP, S100B, and NSE in the striatum of chronic/progressive mouse model of Parkinson's disease[J]. Neuro Rehabilitation, 2011, 28(4): 359-363
- [19] Tao J, Zheng Y, Liu W, et al. Electro-acupuncture at LI11 and ST36 acupoints exerts neuroprotective effects via reactive astrocyte proliferation after ischemia and reperfusion injury in rats [J]. Brain Res Bull, 2016, 120: 14-24
- [20] Wang N, Zhang Y, Wu L, et al. Puerarin protected the brain from cerebral ischemia injury via astrocyte apoptosis inhibition [J]. Neuropharmacology, 2014, 79: 282-289

(上接第 5213 页)

- [23] Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor-1 [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5-6): 993-998
- [24] Eberlin L S, Tibshirani R J, Zhang J, et al. Molecular assessment of surgical-resection margins of gastric cancer by mass-spectrometric imaging [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(7): 2736-2741
- [25] Yoon C, Park D J, Schmidt B, et al. CD44 expression denotes a subpopulation of gastric cancer cells in which Hedgehog signaling promotes chemotherapy resistance [J]. Clinical Cancer Research, 2014, 20(15): 3974-3988
- [26] Gavine P R, Ren Y, Han L, et al. Volitinib, a potent and highly selective c-Met inhibitor, effectively blocks c-Met signaling and growth in c-MET amplified gastric cancer patient-derived tumor xenograft models[J]. Molecular oncology, 2015, 9(1): 323-333
- [27] Zhang L L, Liu J, Lei S, et al. PTEN inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer via downregulation of FAK expression [J]. Cellular signalling, 2014, 26(5): 1011-1020
- [28] Cao W, Yang W, Fan R, et al. miR-34a regulates cisplatin-induced gastric cancer cell death by modulating PI3K/AKT/survivin pathway [J]. Tumor Biology, 2014, 35(2): 1287-1295
- [29] Jeong S M, Xiao C, Finley L W S, et al. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism [J]. Cancer cell, 2013, 23(4): 450-463