

局灶性脑缺血大鼠白细胞介素 10 的变化

陈荣华¹, 刘楠¹, 郑安¹, 余秀萍², 黄华品¹

(福建医科大学 1. 附属协和医院神经内科, 福建省福州市 350001; 2. 神经生物学中心, 福建省福州市 350004)

[关键词] 神经病学; 大鼠脑缺血后白细胞介素 10 的变化; 酶联免疫吸附法; 脑缺血; 白细胞介素 10; 大鼠; 中动脉闭塞

[摘要] 探讨脑缺血后不同时间血清和局部脑缺血组织白细胞介素 10 的变化。采用改良 Zea Longa 线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞模型, 在缺血不同时间, 应用双抗体夹心间接酶联免疫吸附法检测缺血组和假手术对照组大鼠受损脑组织及血清中白细胞介素 10 的浓度。结果发现, 缺血组脑组织白细胞介素 10 含量在大脑中动脉闭塞 3 h 处于较低水平, 与假手术对照组比较无明显变化 ($P > 0.05$); 6 h 达最低, 与假手术对照组比较变化显著 ($P < 0.01$), 随后逐渐升高 ($P < 0.05$); 血清中白细胞介素 10 含量在 3 h 最低, 与假手术对照组比较变化显著 ($P < 0.05$), 随后逐渐升高 ($P < 0.05$)。结果提示, 白细胞介素 10 对脑缺血损伤可能有保护作用。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Change of Interleukin-10 in Middle Cerebral Artery Occlusion of Rats

CHEN Rong-Hua¹, LIU Nan¹, ZHENG An¹, YU Xiu-Ping², and HUANG Hua-Pin¹

(1. Department of Neurology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; 2. Center of Neurobiology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

[KEY WORDS] Cerebral Ischemia; Interleukin-10; Rats; Middle Cerebral Artery Occlusion; Brain; Serum

[ABSTRACT] **Aim** To study the change of interleukin-10 (IL-10) in focal ischemia tissue of brain and serum in middle cerebral artery occlusion (MCAO) of rats. **Methods** The middle cerebral artery (MCA) was occluded for different time with modified Zea Longa's MCAO model. The level of interleukin-10 in focal ischemia tissue of brain and blood serum was measured with double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), both in ischemia group and in control group.

Results The content of interleukin-10 in focal ischemia tissue of brain was lower at 3 h after ischemia, compared with the control ($P > 0.05$), and it fell to the lowest degree at 6 h, compared with the control ($P < 0.01$), then it increased compared with the control ($P < 0.05$). The concentration of interleukin-10 in serum fell to the lowest degree at 3 h after ischemia compared with the control ($P < 0.05$), and then it increased slowly compared with the control ($P < 0.05$). **Conclusion** Interleukin-10 perhaps afford protection to the cerebral ischemia injury.

白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 是一种炎症抑制因子, 可由多种细胞如 Th2 细胞、B 细胞及巨噬细胞等合成和分泌。脑缺血后可产生完整的炎症反应^[1], 进而诱导细胞因子的表达。本研究拟通过建立大鼠局灶性脑缺血模型, 对脑缺血后不同时间局部脑缺血组织和血清中白细胞介素 10 的变化进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康成年 SD 大鼠, 雄性, 普通级, 共 42 只, 体重

250 ± 30 g, 由福建医科大学实验动物中心提供。按随机分组原则分成: ①假手术假手术对照组 ($n = 7$); ②缺血组: 大脑中动脉分别闭塞 3、6、12、24 和 48 h, 每个时间点 7 只。

1.2 栓线制备

取 4-0 单股尼龙线 40 mm, 直径 0.23 mm, 将头端 0.5 mm 加热成光滑球形, 在光镜下呈光滑圆球, 于线端 18.5 mm 处作标记, 75% 酒精清洁后置于肝素化生理盐水中备用。

1.3 动物模型制备

将大鼠以 2% 戊巴比妥钠 (35 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 仰卧固定于手术台上, 取颈部正中切口, 钝性分离甲状腺, 将其上翻并加以保护, 分离右侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA)、颈外动脉 (external carotid artery, ECA) 和颈内动脉 (internal carotid artery, ICA), 用丝线结扎 ECA 和 CCA 近心端, 于 ICA 置一动脉夹, 参照改良 Zea Longa 方法^[2,3], 于 CCA 近分

[收稿日期] 2003-07-24

[修回日期] 2003-11-05

[作者简介] 陈荣华, 男, 1978 年 9 月出生, 江苏省如皋市人, 在读硕士研究生, 研究方向为脑血管病。E-mail: rongy@tohot.org。刘楠, 男, 1963 年 4 月出生, 黑龙江省佳木斯市人, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 课题负责人, 通讯作者, 主要从事脑血管疾病及神经免疫性疾病的临床及基础研究。郑安, 男, 1939 年 8 月出生, 福建省福州市人, 教授, 主任医师, 主要从事脑血管病的临床研究。

叉处剪一约 0.2 mm 侧“V”形切口,插入栓线,插入深度约 18.5 ± 0.5 mm,使栓线进入 ICA,越过大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)开口处,到达大脑前动脉(anterior cerebral artery, ACA)起始部,阻断大脑中动脉的所有血液来源,扎紧备线,甲状腺复位,关闭并缝合皮肤切口。缺血组大鼠将大脑中动脉分别闭塞 3、6、12、24 及 48 h。假手术对照组手术过程将栓线插入后随即拔出。术中室温保持在 25°C 。术后大鼠保温。

1.4 标本收集

每只造模成功的大鼠在规定的时点过度麻醉,开胸暴露心脏,自右心房取血 2 mL, 4°C 过夜,然后 $2\,000\text{ g/min}$ 离心 20 min,取上清封存,置于 -20°C 冰箱待测;同时,用 0.9% 生理盐水及 4% 多聚甲醛各 200 mL 作心脏灌注固定,断头取脑,分开两侧大脑半球,在右侧距额极 2.5 mm 处向后切取 2.5 mm 脑组织,称重,按 0.1 g:1 mL 的比例加 4% 多聚甲醛作脑组织匀浆, $2\,000\text{ g/min}$ 离心 20 min,取上清封存,置于 -20°C 冰箱待测。

1.5 白细胞介素 10 的测定

白细胞介素 10 的测定采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司,试剂盒的使用严格按照说明书进行。

1.6 统计学方法

应用 SAS 6.12 软件进行 t 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

缺血组脑组织白细胞介素 10 含量在大脑中动脉闭塞 3 h 与假手术对照组比较没有明显变化,在以后的几个时间点均比假手术对照组为高($P < 0.05$);血清中白细胞介素 10 含量与假手术对照组比较明显升高($P < 0.05$; 表 1, Table 1)。缺血组脑组织白细胞介素 10 含量在大脑中动脉闭塞 3 h 处于较低水平,至 6 h 达最低,随后逐渐升高;血清中白细胞介素 10 含量在 3 h 最低,随后逐渐升高(图 1, Figure 1)。

3 讨论

白细胞介素 10 是一种单肽链糖蛋白,其 cDNA 序列中含有一个编码 178 个氨基酸的开放读码框架。白细胞介素 10 成熟分子为 160 个氨基酸的肽链,相对分子质量为 18.7×10^3 (18.7 kD)。白细胞

表 1. 脑缺血后缺血脑组织和血清白细胞介素 10 含量变化
Table 1. The changes of IL-10 in focal ischemia tissue of brain and serum in MCAO of rats

分 组	脑组织 (pg/g)	血清 ($\mu\text{g/L}$)
假手术对照组	20.76 ± 1.52	20.02 ± 2.26
缺血组		
3 h	18.91 ± 1.69	19.85 ± 2.09^a
6 h	17.63 ± 2.13^b	23.62 ± 2.07^a
12 h	23.75 ± 2.58^a	27.65 ± 2.03^a
24 h	27.80 ± 1.57^a	34.77 ± 3.84^a
48 h	33.40 ± 2.92^a	44.67 ± 4.32^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与假手术对照组相比。

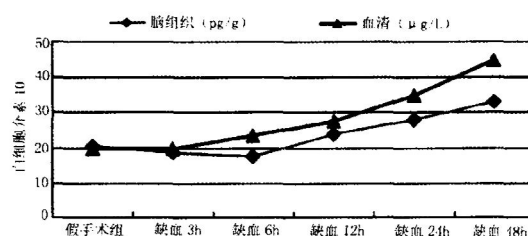


图 1. 脑缺血后缺血脑组织和血清白细胞介素 10 含量变化趋势图

Figure 1. The tendency of IL-10 in brain and serum after MCAO

介素 10 主要是由 Th2 细胞合成,例外 Th0 细胞、某些 Th1 细胞、单核/巨噬细胞、B 细胞、活化的肥大细胞及一些非淋巴细胞如角化细胞等。白细胞介素 10 具有多种生物学作用,如促进 B 细胞成熟分化增殖,浆细胞成熟并产生抗体,抑制 Th1 细胞活化增殖,抑制 Th1 细胞合成分泌细胞因子如干扰素 γ 、白细胞介素 1、白细胞介素 3、肿瘤坏死因子 β 和 GM-CSF 等^[4]。

脑缺血后受损局部脑组织和血清中白细胞介素 10 含量的变化随时间变化而改变。实验发现大鼠中动脉闭塞后,大脑中动脉供血区脑组织白细胞介素 10 含量在 3 h 时与假手术对照组相比没有明显差异,在 6 h 时与假手术对照组比较明显降低,以后逐渐升高且大于初始值。大鼠血清中白细胞介素 10 含量在 3 h 处于较低水平,在 6 h 最低,以后逐渐升高并大于初始值,与 Li 等^[5]的研究结果相似。此外,国外研究发现脑血管病患者血清中白细胞介素 10 高水平表达^[6]。动物实验和临床研究发现,脑缺血后缺血局部及血清中前炎性分子增多,由于这些

局部合成分泌的前炎性介质如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和白细胞介素6等引起局部炎症反应的发生。炎性分子导致细胞粘附分子的激活进而引起白细胞从外周血中吸附到大脑缺血局部组织并激活^[7]。进入局部组织的单核细胞和部分脑组织细胞参与白细胞介素10的合成。文献[8,9]报道了类似结果。正常情况下,细胞因子间的网络调节处于一种相对的动态平衡中,脑缺血发生后,首先以促进炎症发生的炎性介质合成为主,随着炎症的加重这种平衡向合成抗炎性细胞因子偏移。无论体内和体外实验均表明白细胞介素10具有抑制多种如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和白细胞介素6等促炎性介质合成和分泌的作用,白细胞介素10具有潜在的抗炎作用^[10-14]。有研究发现,脑缺血后白细胞介素10变化晚于肿瘤坏死因子和白细胞介素1等,而且随着白细胞介素10的升高肿瘤坏死因子及白细胞介素1明显降低。在一定的程度上支持白细胞介素10对肿瘤坏死因子及白细胞介素1的合成具有抑制作用^[12]。本实验同时发现大脑中动脉闭塞后,白细胞介素10无论在血清或在脑组织都是先降低后升高,且大于初始值。炎症和抗炎是一个相互作用的过程,且抗炎在炎症反应发生后随即出现,早期促炎作用较强,而抑制炎症反应的作用较弱,随着炎症反应的进行,抗炎作用逐渐加强,促炎作用在达到高峰后逐渐减弱,抗炎和促炎作用趋于一个相对的动态平衡,因此时促炎作用仍较正常值高,其平衡点也必然处于较高水平。因而推测脑缺血发生早期,白细胞介素10即发挥其抗炎作用参与抑制促炎介质如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和白细胞介素6等合成和分泌,但早期白细胞介素10合成和分泌较少而消耗较多,因而白细胞介素10水平降低。随着白细胞介素10合成和分泌的增多,肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和白细胞介素6等合成和分泌在达到高峰后逐渐下降,白细胞介素10与肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 及白细胞介素6等细胞因子之间的相互作用处于一个相对的动态平衡点,且此平衡点高于正常水平,因而有可能白细胞介素10测定

值高于初始值。

综上所述,我们认为大鼠大脑中动脉闭塞后,脑缺血局部组织和血清中白细胞介素10的含量随时间的变化而改变。脑缺血缺血局部脑组织和血清中白细胞介素10先降低后升高,白细胞介素10对脑缺血损伤可能有保护作用。但是对于脑缺血后白细胞介素10变化的机制以及白细胞介素10对脑缺血损伤的保护机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Perini F, Morra M, Alecci M, Galloni E, Marchi M, Toso V. Temporal profile of serum anti-inflammatory and pro-inflammatory interleukins in acute ischemic stroke patients. *Neurol Sci*, 2001, 22 (4): 289-296
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91
- [3] 王春霞, 刘春风, 包士尧. 大鼠局灶性缺血再灌注模型改良后的实验研究. *苏州医学院学报*, 1999, 19: 124-125
- [4] Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin-10. *Immunol Today*, 1992, 13: 198-200
- [5] Li HL, Kostulas N, Huang YM, Xiao BG, van der Meide P, Kostulas V, et al. IL-17 and IFN-gamma mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neuroimmunol*, 2001, 116 (1): 5-14
- [6] Van Exel E, Gussieklo J, de Craen AJ. Inflammation and stroke: the Leiden 85-Plus Study. *Stroke*, 2002, 33 (4): 1135-1138
- [7] Stanimirovic D, Shapiro A, Wong J, Hutchison J, Durkin J. The induction of ICAM-1 in human cerebrovascular endothelial cells (HCEC) by ischemia-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC adhesion. *J Neuroimmunol*, 1997, 76 (1-2): 193-205
- [8] 刘楠, 郑安, 叶钦勇, 余启胜, 黄华品. 脑血管病患者血清 TNF、IL-8 的变化及临床意义. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 1998, 5 (4): 220-222
- [9] 刘楠, 郑安, 叶钦勇, 陈玉玲, 陈荣华. 急性脑梗死患者脑脊液 TNF、IL-6 和 IL-8 的水平变化研究. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (3): 88-89
- [10] Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophage. *J Immunol*, 1991, 147: 3815-3822
- [11] Vila N, Castillo J, Davalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro A. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke*, 2003, 34 (3): 671-675
- [12] Zhai QH, Futrell N, Chen FJ. Gene expression of IL-10 in relationship to TNF-alpha, IL-1beta and IL-2 in the rat brain following middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci*, 1997, 152 (2): 119-124
- [13] Pelidou SH, Kostulas N, Matusiewicz D, Kivisaak P, Kostulas V, Link H. High levels of IL-10 secreting cells are present in blood in cerebrovascular diseases. *Eur J Neurol*, 1999, 6 (4): 437-442
- [14] Gunnert CA, Berg DJ, Faraci FM, Feuerstein G. Vascular effect of lipopolysaccharide are enhanced in interleukin-10-deficient mice. *Stroke*, 1999, 30: 2191-196

(此文编辑 文玉珊)