

白细胞介素 8 在大鼠脑缺血再灌注损伤中的变化

韩英, 刘楠, 陈荣华, 郑安, 黄华品

(福建医科大学附属协和医院神经内科, 福建省福州市 350001)

[关键词] 神经病学; 脑缺血再灌注后白细胞介素 8 的变化; 酶联免疫吸附法; 白细胞介素 8; 大鼠; 中动脉闭塞

[摘要] 目的 探讨白细胞介素 8 在大鼠脑缺血再灌注损伤中的变化。方法 参照 Zea Longa 线栓法制作急性大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型, 将大鼠随机分为假手术组和脑缺血 1 h 再灌注 3、6、12、24 及 48 h 组, 采用双抗体夹心间接酶联免疫吸附法检测大鼠血清和脑组织中白细胞介素 8 的浓度。结果 血清中白细胞介素 8 含量于再灌注 3 h 达最高 ($P < 0.01$), 随后缓慢下降, 再灌注 24 h 降至对照水平; 脑组织中白细胞介素 8 含量于再灌注 6 h 达高峰 ($P < 0.01$), 再灌注 12 h 后下降, 但再灌注 6 h 与 12 h 之间无显著性差异。结论 白细胞介素 8 参与了脑缺血再灌注损伤的病理生理过程。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

The Changes of Interleukin-8 Content after Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

HAN Ying, LIU Nan, CHEN Rong-Hua, ZHENG An, and HUANG Hua-Pin

(Department of Neurology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

[KEY WORDS] Interleukin-8; Rats; Middle Cerebral Artery Occlusion; Ischemia-Reperfusion Injury; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

[ABSTRACT] **Aim** To study the change of the interleukin-8 (IL-8) content in blood and cerebrum after cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** With Zea Longa's thread method, cerebral ischemia-reperfusion injury model of rats was established. The rats were randomly divided into the groups as sham operated control group and ischemia-reperfusion 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h groups. The content of IL-8 in blood serum and brain tissue was detected by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The content of IL-8 in blood serum was increased significantly at 3 h after reperfusion ($P < 0.01$), and then went down. It reached the level of the control group at 24 h after reperfusion. The concentration of IL-8 in brain tissue was peaked at 6 h after reperfusion ($P < 0.01$), went down after 12 h reperfusion. Moreover, there is no difference between the group of 6 h after reperfusion and 12 h after reperfusion ($P > 0.05$). **Conclusion** IL-8 was involved in the pathophysiological course of cerebral ischemia-reperfusion injury.

脑缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤涉及到以细胞因子介导的急性局部炎症反应为特征的病理过程^[1,2]。近年来提出白细胞可能是缺血性脑血管病炎症反应的启动因素之一, 而中性粒细胞是缺血区白细胞浸润的最早的效应细胞。白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8) 是一种重要的趋化性细胞因子, 可趋化和激活中性粒细胞, 并参与了中性粒细胞和内皮细胞粘附过程的调节^[3,4], 在炎症过程中起重要作用。本文将对 IL-8 在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 36 只, 体重 250~300 g, 由福建医科大学实验动物中心提供。将大鼠随机分为假手术组和脑缺血再灌注组。缺血再灌注组 30 只, 随机分组为 5 个时间点组, 即缺血再灌注 3、6、12、24 和 48 h 组, 每个时间点 6 只。

1.2 栓线制备

取 4-0 单股尼龙线 50 mm, 直径 0.23 mm, 将头端 0.5 mm 涂上聚氨酯漆使其直径达 0.25 mm, 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

[收稿日期] 2004-08-25 [修回日期] 2005-02-27

[基金项目] 福建省教育厅科研基金 (K03022) 资助

[作者简介] 韩英, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事脑血管疾病研究, E-mail 为 chenfyhy@yahoo.com.cn。通讯作者刘楠, 主任医师, 硕士研究生导师, 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。陈荣华, 硕士研究生, 主要从事脑血管疾病研究。

carotid artery, ECA) 和颈内动脉(internal carotid artery, ICA), 结扎 ECA 和 CCA 近心端, 于 ICA 置一动脉夹, 参照改良 Zea Longa 方法^[5,6], 于 CCA 近分叉处剪一约 0.2 mm 的“v”形切口, 插入栓线。插入深度为 18.5 ± 0.5 mm, 使栓线进入大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA) 开口处, 到达大脑前动脉(anterior cerebral artery, ACA) 起始部, 阻断 MCA 的所有血供, 扎紧备线, 甲状腺复位, 关闭并缝合皮肤切口, 栓线外留 1 cm。再灌注时, 轻轻提拉线头, 直至有阻力感, 即栓线端至 CCA 切口处, 实现再灌注。假手术组手术过程同上, 将栓线插入 1 min 拔出。术中室温保持在 25 °C, 术后大鼠保温。

1.4 指标检测及方法

每只模型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 冰箱孵育过夜, 然后在超低温离心机中 2 000 r/min 离心, 分离血清、封存, 置 -20 °C 冰箱中待测; 同时, 依次用生理盐水及 4% 多聚甲醛各 200 mL 作心脏灌注、固定, 断头取脑; 距额极 2.5 mm 处分别向后切取 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, 超低温离心机中 2 000 r/min 离心, 取上封存, 置 -20 °C 冰箱中待测。IL-8 的测定采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。ELISA 试剂盒购自上海天呈生物科技有限公司, 严格按试剂盒说明书进行。

1.5 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 统计软件进行分析, 组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示统计学差异明显。

2 结果

2.1 血清白细胞介素 8 含量变化

血清中 IL-8 含量于再灌注 3 h 达最高($P < 0.01$), 随后缓慢下降, 再灌注 24 h 降至对照水平; 再灌注 3 h 组与再灌注 6 h 组和 12 h 组比较差异显著($P < 0.05$), 再灌注 3 h 组、6 h 组和 12 h 组与假手术组、再灌注 24 h 组及再灌注 48 h 组比较差异显著($P < 0.01$), 见表 1(Table 1)。

2.2 脑组织白细胞介素 8 含量变化

脑组织中 IL-8 含量于再灌注 6 h 达高峰($P < 0.01$), 再灌注 12 h 后下降, 且再灌注 6 h 与再灌注 12 h 之间差异无显著性($P > 0.05$); 再灌注 6 h 组与再灌注 3 h 组、24 h 组及 48 h 组以及假手术组比较差异显著($P < 0.01$), 见表 1(Table 1)。

表 1. 缺血再灌注后脑组织和血清白细胞介素 8 含量变化

Table 1. The changes of IL-8 content after cerebral ischemia-reperfusion injury

分 组	血清 (ng/L)	脑组织 (pg/g)
假手术组	0.54 ± 0.15	14.77 ± 0.60
再灌注 3 h	2.19 ± 0.74 ^a	18.05 ± 2.55 ^a
再灌注 6 h	1.02 ± 0.25 ^a	21.05 ± 1.50 ^b
再灌注 12 h	0.97 ± 0.24 ^a	19.93 ± 1.13 ^a
再灌注 24 h	0.54 ± 0.10	1.59 ± 0.75
再灌注 48 h	0.42 ± 0.17	1.16 ± 0.31

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 。

3 讨论

近年来, 随着人们对脑缺血再灌注损伤的认识, 脑缺血后的炎症反应越来越受到研究者的关注。其中导致脑缺血再灌注损伤的一个重要机制是: 脑缺血再灌注时, 白细胞与微血管内皮细胞间的粘附性增强, 白细胞粘壁、嵌塞并游离出微血管外进而释放大炎症因子, 造成组织损伤。中性粒细胞是缺血区白细胞浸润的最早的效应细胞^[7,8]。研究发现, 中性粒细胞在缺血区脑组织的浸润始于再灌注损伤 6 h, 24 h~48 h 达高峰^[9]。中性粒细胞浸润到脑缺血区后, 主要通过以下途径介导脑缺血再灌注损伤:

粘附和聚集, 造成微血管阻塞, 血流量降低; ④产生大量的氧自由基, 引起脂质过氧化反应, 这是再灌注损伤最重要的发生机制; ⑤释放白三烯和前列腺素等生物活性物质, 导致血管收缩; ⑥释放弹性蛋白酶, 降解细胞外基质成分, 导致间质水肿。

白细胞介素 8(IL-8) 系由 Yashimma 于 1987 年首次从脂多糖、植物血凝素(PHA) 刺激人单核细胞培养上清液中纯化, 并证实对中性粒细胞有趋化作用。IL-8 的分子质量只有 8 kDa~12 kDa, 共 72 个氨基酸, 含 2 个活性必需的二硫键。IL-8 主要由单核巨噬细胞、中性粒细胞产生的细胞因子, 脑内小胶质细胞、星形胶质细胞等也可分泌。IL-8 作为一种重要的中性粒细胞趋化和活化因子, 已被证实在各种急性炎症中起重要作用^[10]。体外实验表明 IL-8 可诱导中性粒细胞进入炎症灶, 诱导其变形、脱颗粒、释放溶酶体酶、呼吸爆发、产生超氧化物和过氧化氢, 加重组织的损伤^[11]。通过对脑缺血损伤的研究显示 IL-8 可吸引中性粒细胞进入脑缺血病灶^[12]。Yamasaki 等^[13] 研究结果提示缺血区 IL-8 浓度的升高早于中性粒细胞的浸润。Beech 等^[14] 在实验中发现趋化因子增多, 并由此引起的中性粒细胞聚集对脑

组织有害。我们先前的研究中曾发现 IL-8 是脑血管疾病患者血清和脑脊液中早期出现的一个细胞因子^[15], 这提示 IL-8 与脑血管疾病之间存在某种密切关系。

本实验发现脑缺血 1 h 再灌注 3 h 血清中 IL-8 含量达最高, 12 h 后逐渐下降, 24 h 达对照组水平。而缺血区脑组织 IL-8 含量在 3 h 已有较高表达, 到 6 h 达高峰, 12 h 后下降, 但再灌注 6 h 组与 12 h 组之间无明显差别, 即其高峰区位于再灌注后 6~12 h。表明脑组织与血清中 IL-8 含量变化时相不一致, 与 Yamasaki 等的研究一致。且缺血区脑组织 IL-8 含量远远高于血清中 IL-8 含量, 提示脑源性 IL-8 的存在, 可能与中枢神经系统损伤后星形胶质细胞、小胶质细胞受刺激增殖, 大量产生 IL-8 有关。IL-8 在脑血管内外的高浓度差可吸引大量的中性粒细胞通过血脑屏障进入炎症灶, 进一步加重脑组织的损伤。实验中还发现缺血区脑组织 IL-8 含量于 12 h 后下降, 且低于对照组, 这可能是: 一方面, 生理状态下脑组织能产生一定量的 IL-8, 参与维持脑组织的功能代谢; 另一方面, IL-8 参与炎症的发展, 以及机体调动自身的调控系统, 并且在其它细胞因子的相互作用下, 使 IL-8 的含量逐渐降低。

白细胞介素 8 (IL-8) 自发现以来, 在趋化性细胞因子中一直是一个比较活跃的研究领域, 本研究发现 IL-8 在脑缺血再灌注早期明显升高, 提示在缺血早期可通过应用抗 IL-8 抗体或 IL-8 拮抗剂来阻断中性粒细胞活化、与血管内皮细胞粘附, 减少炎症介质的释放、减轻缺血再灌注损伤程度, 可能对脑缺血再灌注损伤有保护作用, 为目前治疗缺血性脑血管病开辟了一条新的途径。

[参考文献]

[1] Beamer NB, Coul BM, Clark WM, Hazel JS, Silberger JR. Interleukin 6 and

interleukin 1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol*, 1995, **37** (6): 800-804

- [2] Fassbender K, Rossol S, Kammer T, Daffertshofer M, Wirth S, Dollman M, et al. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci*, 1994, **122** (2): 135-139
- [3] Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophil. *J Clin Invest*, 1989, **84** (4): 1045-1049
- [4] Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin 8. *Science*, 1991, **254** (5028): 99-102
- [5] Enrique Zea Longa, Weinstein PR, Carlson S, Cummins Robert. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, **20** (1): 84-91
- [6] 陈荣华, 刘楠, 郑安, 余秀萍, 黄华品. 局灶性脑缺血大鼠白细胞介素 10 的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (7): 622-624
- [7] Chen L, Vicaut E, Sercombe RL. Polymorphonuclear leukocyte activation induces cerebral hypoperfusion in rats in the absence of previous ischemic reperfusion damage. *Neurosci Lett*, 2002, **331** (3): 203-207
- [8] Masada T, Hua Y, Xi G, Yang Y, Hoff JT, Keep RF. Attenuation of intracerebral hemorrhage and thrombin-induced brain edema by over expression of interleukin 1 receptor antagonist. *J Neurosurg*, 2001, **95** (4): 680-686
- [9] Yamagami S, Tamura M, Hayashi M, Endo N, Tanabe H, Katsura Y, et al. Different production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats. *J Leukoc Biol*, 1999, **65** (6): 744-749
- [10] Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*, 1994, **56** (5): 559-564
- [11] Schroder JM, Mrowitz U, Christophers E. Purification and partial biologic characterization of human lymphocyte-derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity. *J Immunol*, 1988, **140** (10): 3534-3540
- [12] Kostulas N, Kividakk P, Huang Y, Matusiewicz D, Kostulas V, Link H. Ischemic stroke is associated with a systemic increase of blood mononuclear cells expressing interleukin 8 mRNA. *Stroke*, 1998, **29** (2): 462-466
- [13] Yamasaki Y, Matsuo Y, Matsuura N, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin 8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rat. *Stroke*, 1995, **26** (2): 318-323
- [14] Beech JS, Reckless J, Mosedale DE, Grainger DJ, Williams SC, Menon DK. Neuroprotection in ischemic reperfusion injury: an anti-inflammatory approach using a novel broad-spectrum chemokine inhibitor. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, **21** (6): 683-689
- [15] 刘楠, 郑安, 叶钦勇, 陈玉玲, 陈荣华. 急性脑梗死患者脑脊液肿瘤坏死因子、白细胞介素 6 和 8 的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (1): 44-46

(此文编辑 文玉珊)

《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》 (生物医药类)一览表(2003 年度)

波谱学杂志

肠外与肠内营养

成都中医药大学学报

创伤外科杂志

大连医科大学学报

第二军医大学学报

第三军医大学学报

第四军医大学学报

第一军医大学学报

电子显微学报

东南大学学报医学版

耳鼻咽喉头颈外科

放射免疫学杂志

放射学实践