

## 香烟烟雾对大鼠脑血管细胞黏附分子 1 表达及脑梗死体积的影响

孙 芸, 徐爱华, 庄 严, 柳忠兰

(中国医科大学附属第一医院, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 神经病学; 吸烟; 脑梗死体积; 血管细胞黏附分子 1; 大鼠

[摘要] 目的 为研究香烟烟雾对大鼠脑血管细胞黏附分子的表达及对大脑中动脉梗死体积的影响。方法 48 只大鼠随机分成大量吸烟组、小量吸烟组及对照组, 每组 16 只, 前 2 组吸烟 12 周后, 随机从三组中各取 8 只以免疫组织化学方法检测脑血管内皮细胞血管细胞黏附分子 1 表达; 余下 24 只用线栓大鼠大脑中动脉法建立脑梗死模型, 采用病理图像分析系统检测大鼠脑梗死相对体积。结果 与对照组比较, 吸烟大鼠血管细胞黏附分子 1 表达增加, 尤以大量吸烟组为甚(大量吸烟组灰度值为  $116 \pm 2$ , 小量吸烟组为  $123 \pm 2$ , 对照组为  $130 \pm 2$ ), 三组比较, 差异有显著性统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 吸烟大鼠脑梗死体积增加, 尤以大量吸烟组为甚(大量吸烟组脑梗死相对体积加权值是  $0.531 \pm 0.025$ , 小量吸烟组  $0.478 \pm 0.034$ , 对照组  $0.426 \pm 0.030$ ), 三组比较, 差异有显著性统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 香烟烟雾使大鼠脑血管内皮细胞血管细胞黏附分子 1 表达以及大鼠脑梗死体积均增加, 血管细胞黏附分子 1 表达增强可能是吸烟引起脑梗死的分子机制之一。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

吸烟是脑梗死的危险因素之一。血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 在脑梗死中起重要作用。研究吸烟对脑血管 VCAM-1 表达的影响, 对探讨吸烟致脑梗死的发生机制和指导临床治疗有潜在的价值。本实验通过观察吸烟对 VCAM-1 在大鼠脑血管内皮中表达及对大鼠脑梗死体积的影响, 探讨吸烟致脑梗死的分子机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物、分组及吸烟模型

健康雄性 Wistar 大鼠 48 只由中国医科大学实验动物部提供, 体重  $270 \sim 320$  g。随机分成三组: (1) 大量吸烟组 16 只, 体重  $287 \pm 27$  g, 燃烟 10 支/次; (2) 小量吸烟组 16 只, 体重  $287 \pm 29$  g, 燃烟 4 支/次, 上述 2 组均 2 次/天  $\times$  12 周; (3) 对照组 16 只, 体重  $289 \pm 32$  g。每组各 8 只大鼠建立脑梗死模型; 另 8 只检测脑血管内皮细胞 VCAM-1 的表达。吸烟组大鼠置于自制的“吸烟箱”( $80 \times 60 \times 60$  cm<sup>3</sup>) 中, 燃市售某品牌香烟; 对照组大鼠亦置于吸烟箱中同等时间。实验期间各组大鼠饲养条件一致。

#### 1.2 大鼠脑梗死模型的建立及梗死体积的测量

采用线栓鼠大脑中动脉法建立左侧脑梗死模型。参照文献[1]对大鼠术后神经功能进行评分, 以检测脑梗死程度。然后取脑, 自额极开始作冠状切片, 片厚 2 mm, 浸入 2% 的 TTC 染色液中 37℃ 孵育 30 min。采用病理图像分析系统测量脑梗死相对体积, 计算公式为: 脑梗死相对体积 = 平均梗死横截面积  $\times$  脑切片层数  $\times$  层厚 / 大脑总体积。为了消除脑水肿的影响, 梗死横截面积用对侧脑横截面积减去梗死侧正常组织横截面积求得。将所求得的相对体积百分比进行加权使其呈正态分布。

#### 1.3 血管细胞黏附分子 1 表达的检测

一抗为兔抗大鼠 VCAM-1 多克隆抗体(博士德公司)、SABC 试剂盒(博士德公司), 具体操作按试剂盒说明进行。采用显微图像分析系统采集免疫组织化学后的脑切片图像并对血管内皮进行灰度分析。灰度值小表明 VCAM-1 表达强; 反之, 表达弱。

#### 1.4 数据处理及统计学分析

用 SPSS11.5 软件对各组数据行单因素方差分析(ANOVA), 组间变量行两两比较的 SNK 法分析。

### 2 结果

#### 2.1 大鼠脑梗死体积的变化

正常脑组织经 TTC 染色呈红色, 梗死脑组织呈白色。与对照组比较, 吸烟组脑梗死体积明显增加

[收稿日期] 2004-12-22 [修回日期] 2005-11-02

[基金项目] 卫生部科学研究基金资助项目(98-1-196); 辽宁省自然科学基金资助(9801500303)

[作者简介] 孙芸, 硕士, 医师, 现在大连医科大学附属第二医院工作, E-mail 为 hualiqilai@eyou.com。徐爱华, 硕士研究生。通讯作者柳忠兰, 教授, 主要从事脑血管病发病机制研究, E-mail 为 liu zhonglan@163.com。

( $P < 0.05$ ), 尤以大量吸烟组为甚( $P < 0.05$ , 表 1)。

表 1. 3 组大鼠脑梗死体积和血管细胞粘附分子 1 的表达

分 组	n	脑梗死相对 体积加权值	VCAM-1 表达 灰度值
对照组	8	0.426 ± 0.030	130.33 ± 1.88
小量吸烟组	8	0.478 ± 0.034 <sup>a</sup>	123.06 ± 1.68 <sup>a</sup>
大量吸烟组	8	0.531 ± 0.025 <sup>ac</sup>	116.08 ± 2.38 <sup>ac</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与小量吸烟组比较。

## 2.2 血管细胞粘附分子 1 的表达变化

阳性染色(棕黄色)主要见于小动脉内皮细胞(图 1), 可见各组大鼠脑血管内皮细胞均表达 VCAM-1。与对照组比较, 吸烟组表达明显增强( $P < 0.05$ ), 尤以大量吸烟组为甚( $P < 0.05$ , 表 1)。



图 1. 大量吸烟大鼠脑血管细胞黏附分子 1 免疫组织化学染色( $\times 400$ )

## 3 讨论

正常情况下, VCAM-1 微量表达于脑血管内皮细胞, 当血管内皮病理损害时, 核因子  $\kappa B$  向核内移行与 VCAM-1 启动子结合, 上调 VCAM-1 表达; 同时黏附于血管内皮的白细胞释放大量细胞因子, 如白细胞介素 1、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$  干扰素等, 在这些细胞因子刺激作用下, VCAM-1 表达大幅度提高<sup>[2]</sup>。徐皓亮等<sup>[2]</sup>研究发现, VCAM-1 在脑缺血后 6 h 出现, 12 h 达高峰。周华东等<sup>[3]</sup>研究发现, 主要是血清可溶性 VCAM (soluble VCAM-1, sVCAM-1) 在脑血管内皮表达, 脑梗死体积越大, 其水平越高。Cybulsky 等<sup>[4]</sup>研究发现, 是 VCAM-1 而不是细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成早期起作用。这些均提示 VCAM-1 的表达增加是脑血栓形成及 As 的早期事件。

Hackman 等<sup>[5]</sup>发现, 吸烟者血清 sVCAM-1 和可溶性 ICAM (soluble ICAM, sICAM-1) 水平高于非吸烟者。本文发现吸烟鼠脑血管内皮细胞 VCAM-1 表达明显高于对照组。这表明在吸烟等危险因素作用下, 脑血管内皮细胞通过表达 VCAM-1 和 ICAM-1, 进

而介导白细胞与内皮细胞黏附, 并与 P 选择素、E 选择素等相互作用, 白细胞在血管壁形成小栓子, 阻塞血管, 形成血栓。

文献[6]报道, 吸烟可致脑细胞凋亡; 脑梗死体积增大<sup>[7]</sup>; 这提示吸烟可加重脑损伤。本组观察结果与之一致。其机制可能与吸烟致脑 VCAM-1 表达上调致小血管阻塞有关。

吸烟引起血管内皮 VCAM-1 表达增加, 其机制可能是脑血管内皮细胞形态改变<sup>[8]</sup>, TNF- $\alpha$  表达上调<sup>[9]</sup>。另外烟雾中有害成份如尼古丁、焦油、CO、NO 等刺激进一步损伤血管内皮。长期吸烟导致血液中 CO 含量增多, CO 与血红蛋白结合后不再解离, 导致氧解离曲线左移, 致使脑组织(脑血管内皮)长期处于乏氧状态, 血管内皮细胞乏氧、肿胀甚至死亡。烟雾吸入后, 其有害成份可刺激炎性细胞释放大量炎性因子, 一些因子如 TXA<sub>2</sub>, 可随血液进入血脑屏障引起脑血管的收缩<sup>[8]</sup>, 导致脑血流量的减少, 从而致使血管内皮细胞乏氧而受损。但血管内皮损伤后, 其如何促进 VCAM-1 表达增加, 具体机制仍不清楚。

本实验揭示了脑血管内皮 VCAM-1 表达增加是随着吸烟数量的增加而增加, 脑梗死的危险度也随之增加。研究发现, 戒烟可使 ICAM-1 mRNA 表达下调, 大鼠脑梗死体积明显减小<sup>[7]</sup>, 提示戒烟可减少脑梗死的发生, 减轻脑梗死后脑损伤。另外, 通过抑制 VCAM-1 的过量表达, 也可减少脑梗死的发生。包括: (1) 抑制致炎因子的释放; (2) 单 g 隆抗体直接阻断, 但由于脑梗死的发生需众多因子参与, 效果想必不甚理想; (3) 控制 VCAM-1 基因的表达。这些方法对预防、治疗脑梗死具有重要的意义。

## [参考文献]

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, **20** (1): 84-91
- [2] 徐皓亮, 冯亦璞. 黏附分子与脑缺血后炎症. *生理科学进展*, 2000, **31** (3): 257-260
- [3] 周华东, 陈曼娥, 王东. 急性脑梗塞血清可溶性血管细胞黏附分子的变化及意义. *中华内科杂志*, 1997, **36** (11): 748-750
- [4] Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*, 2001, **107** (10): 1255-262
- [5] Hackman A, Abe Y, Insull W Jr, Pownall H, Smith L, Dunn K, et al. Level of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation*, 1996, **93** (7): 1334-338
- [6] 李华, 柳忠兰, 薛喜峰. 吸烟大鼠脑细胞凋亡与 FAS 蛋白表达. *中风与神经疾病杂志*, 2003, **20** (3): 216-218
- [7] 柳忠兰, 孙大勇, 李华, 冯昱. 烟雾吸入对大鼠脑血管内皮细胞细胞间黏附分子 1 表达及脑梗死体积的影响. *中华神经科杂志*, 2003, **36** (5): 370-373
- [8] 柳忠兰, 孙大勇, 冯昱, 拱忠影, 耿建红. 吸烟鼠脑血管内皮细胞间黏附分子 1 的表达在动脉粥样硬化形成中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 392-394
- [9] 刘淑杰, 柳忠兰, 刘菲. 烟草烟雾吸入对大鼠脑组织 TNF- $\alpha$  和脑血管内皮细胞 E-selectin 的影响. *中风与神经疾病杂志*, 2003, **20** (2): 181 (此文编辑 胡必利)