

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-02-0146-03

## 实验性大鼠脑出血后白细胞介素 2 和 8 表达的变化

田力<sup>1</sup>, 刘海峰<sup>2</sup>, 滕伟禹<sup>3</sup>

(1. 中国医科大学附属第二医院干诊科, 辽宁省沈阳市 110003; 2. 温州医学院附属第一医院急诊科, 浙江省温州市 325000; 3. 中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 神经病学; 脑出血后白细胞介素 2 和 8 的表达; 放射免疫法; 脑出血; 白细胞介素 2; 白细胞介素 8; 大鼠

[摘要] 目的 观察实验性大鼠脑出血后白细胞介素 2 和白细胞介素 8 的表达及其与脑出血后脑含水量变化的关系。方法 通过采用未抗凝新鲜自体股动脉血注入大鼠尾状核建立脑出血动物模型, 用放射免疫法测定脑出血后 6 h、12 h、24 h、3 天、6 天和 10 天等时间点白细胞介素 2 和白细胞介素 8 的表达, 用干重-湿重法测定脑出血后脑含水量的变化, 并与白细胞介素 2 和白细胞介素 8 进行相关分析。结果 与对照组比较, 血肿周围组织中白细胞介素 2 水平在脑出血后 6 h 和 1 天显著降低 ( $P < 0.01$ ), 3 天时轻度降低 ( $P > 0.05$ ), 6 天时达高峰 ( $P < 0.01$ ), 10 天时接近正常 ( $P > 0.05$ )。白细胞介素 8 水平在脑出血后 1 天和 3 天时显著升高 ( $P < 0.05$ ), 6 天时降至正常 ( $P > 0.05$ )。血肿周围组织含水量在脑出血后 6 h 轻度增加 ( $P > 0.05$ ), 1 天时增加显著 ( $P < 0.01$ ), 3 天时达高峰 ( $P < 0.01$ ), 10 天时基本恢复正常。白细胞介素 8 的变化与脑含水量的变化趋势一致 ( $R^2 = 0.861$ )。结论 白细胞介素 2 有利于抑制脑水肿的形成; 白细胞介素 8 可能参与实验性脑出血后血肿周围水肿的发生、发展。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

## The Expression of Interleukin-2 and Interleukin-8 after Intracerebral Hemorrhage in Rats

TIAN Li<sup>1</sup>, LIU Hai Feng<sup>2</sup>, and TENG Wei Yu<sup>3</sup>

(1. Ward of Cadre, the Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110003; 2. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000; 3. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Intracerebral Hemorrhage; Interleukin-2; Interleukin-8; Brain Edema; Rat; Radioimmunoassay Method

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of interleukin-2 (IL-2), interleukin-8 (IL-8) and their relations with cerebral water content in rats following intracerebral hemorrhage. **Methods** The rats were infused with autologous fresh blood taken from rat femoral artery into the right caudate nucleus IL-2 and IL-8 in the perihematoma and were determined with radioimmunoassay method over a time course ranging from 6 hours to 10 days. The brain water content was measured by dry-wet weight method. **Result** Compared with those in the control group, the levels of IL-2 in the perihematoma within 1 day after intracerebral hemorrhage (ICH) were significantly lower, slightly lower at 3-day point and highest at 6-day point, then gradually decreased; the levels of IL-8 in the perihematoma within 6 hours after ICH were not significantly different, highest in 1-day point and 3-day point, and gradually reduced to the normal level at 6-day point; the contents of edema in the perihematoma within 1 day slightly reduced, were highest at 3-day point, then gradually decreased and reached the normal levels at 6 days. **Conclusion**

IL-2 may benefit to decrease the formation and development of brain edema, accelerate the extinction of brain edema and facilitate the recovery of nervous system function; there was immunoreaction conducted by IL-8 which led to damage after ICH, and IL-8 may be related to the produce and development of brain edema.

实验性中枢神经系统损伤研究发现, 炎性细胞因子直接参与了脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 后许多病理生理过程<sup>[1]</sup>。白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 和白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8) 是介导免疫反应的主要炎性细胞因子, 它们在脑出血

方面的报道非常少, 因此, 本实验对脑出血后脑组织中 IL-2、IL-8 的变化及其与脑含水量变化的关系进行了探讨。

## 1 材料与方法

## 1.1 动物及分组

健康雄性 Wistar 大鼠 33 只, 体重  $320 \pm 20$  g, 由中国医科大学实验动物部提供, 随机分为对照组 ( $n = 9$ ) 和实验组 ( $n = 24$ )。对照组分为 1 天组 ( $n = 4$ )

[收稿日期] 2005-04-08 [修回日期] 2005-10-30

[作者简介] 田力, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑出血后脑水肿发生机制, 联系电话为 024-83956368, E-mail 为 Tianlicmu2@126.com。刘海峰, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑出血后脑水肿发生机制。滕伟禹, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑出血后脑水肿发生机制, E-mail 为 tengweiyucmu@126.com。

和 3 天组 ( $n=5$ ); 实验组分为 6 h 组 ( $n=5$ )、1 天组 ( $n=5$ )、3 天组 ( $n=5$ )、6 天组 ( $n=5$ ) 和 10 天组 ( $n=4$ )。

### 1.2 动物模型的建立

参照张新江等<sup>[2]</sup>方法并改进。大鼠以 10% 水合氯醛腹腔麻醉, 固定于脑立体定向仪(江湾 iv 型)。无菌条件下头部正中纵形切口, 暴露前囟和冠状缝, 于前囟前 0.2 mm、中线右侧旁开 3 mm 处用直径 1 mm 的牙钻钻孔。用 1 mL 注射器经右侧股动脉抽取 200  $\mu$ L 自体血, 经颅骨的钻孔将注射器垂直插入颅内 6 mm(相当于尾状核的部位), 缓慢注血 100  $\mu$ L。对照组操作同实验组, 但不注血, 留针 10 min 后退针。各组动物在相应时间点经过量麻醉后断头取脑。经预实验证实模型成功的判定标准为: 术后沿针道冠状面切开脑组织可见血肿形成。

### 1.3 标本采集及处理

将鼠脑沿针道冠状切开, 从针道前后各切下一张厚约 1.5 mm 含有血肿的冠状脑片, 立即冷藏于  $-70^{\circ}\text{C}$  的冰箱。前者用于 IL-2 和 IL-8 水平的测定; 后者用于脑组织含水量的测定。将待测脑片分别放入 2 mL 离心管中, 加入生理盐水 1 mL, 冰浴, 充分搅动成匀浆,  $4^{\circ}\text{C}$  20 000 r/min 离心 20 min, 提取上清, 冷藏于  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

### 1.4 脑含水量的测定

先用电子分析天平(精确度为 0.000 1 g)称取后半脑片的湿重。再将待测的脑片放入  $100^{\circ}\text{C}$  烤箱中, 24 h 后取出称干重, 用(湿重-干重)/湿重  $\times$  100% 计算含水量。

### 1.5 白细胞介素 2 和 8 含量的测定

采用放射免疫法测定 IL-2 和 IL-8 的含量。试剂盒均由中国人民解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所提供, 严格按照试剂盒说明书进行操作, 并根据所示公式计算标准及待测样品结合百分率, 在半对数坐标纸上绘制标准曲线, 最后查出样品值即 IL-2、IL-8 的值。

### 1.6 统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。应用 SPSS10.0 统计学软件对所测定数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)及相关分析。

## 2 结果

### 2.1 各组脑组织中白细胞介素 2 和 8 的表达

与对照组比较, 血肿周围组织中 IL-2 水平于出血后 6 h 和 1 天显著降低 ( $P < 0.01$ ), 3 天时轻度降

低 ( $P > 0.05$ ), 6 天时明显升高达高峰 ( $P < 0.01$ ), 以后逐渐下降, 10 天时接近正常 ( $P > 0.05$ ), 即血肿周围 IL-2 水平于大鼠脑出血后开始下降至最低, 继而逐渐上升至高峰, 然后下降趋于正常。IL-8 水平于出血后 6 h 变化不明显 ( $P > 0.05$ ), 1 天、3 天时显著升高 ( $P < 0.05$ ), 6 天时降至正常 ( $P > 0.05$ ), 即血肿周围 IL-8 水平于大鼠脑出血后逐渐上升至高峰, 然后渐降趋于正常(表 1)。

表 1. 各组脑出血后不同时间点白细胞介素 2 和 8 以及脑含水量的变化( $\bar{x} \pm s$ )

分 组		IL-2	IL-8	脑含水量(%)
对照组	1 天	44.3 $\pm$ 5.8	7.8 $\pm$ 1.0	78.2 $\pm$ 0.6
	3 天	43.6 $\pm$ 5.4	8.7 $\pm$ 0.7	77.7 $\pm$ 0.7
	6 天	19.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	6.4 $\pm$ 1.1	78.0 $\pm$ 2.3
实验组	1 天	17.2 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	80.4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
	3 天	37.5 $\pm$ 4.5	11.4 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>	82.5 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>
	6 天	109 $\pm$ 10.7 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 1.1	78.3 $\pm$ 1.2
	10 天	68.2 $\pm$ 10.3	7.1 $\pm$ 1.7	78.5 $\pm$ 0.4

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

### 2.2 各组脑含水量的变化

与对照组比较, 血肿周围组织含水量在脑出血后 6 h 轻度增加 ( $P > 0.05$ ); 1 天时增加显著 ( $P < 0.01$ ), 3 天时达高峰 ( $P < 0.01$ ), 以后逐渐下降, 10 天时基本恢复正常水平(表 1, Table 1)。

### 2.3 白细胞介素 2 和 8 与脑含水量的相对关系

白细胞介素 2 水平高峰落后于脑含水量的高峰期 ( $r = 0.424$ ,  $P = 0.477$ ), IL-8 的含量变化与脑含水量的增减变化趋势一致 ( $r = 0.928$ ,  $P = 0.023$ )。

## 3 讨论

脑出血后血肿周围水肿的发生、发展是导致脑组织缺血、缺氧的根源。研究表明, 多种炎性细胞因子在脑出血后水肿形成、发展和消退及脑出血恢复期发挥重要作用<sup>[3-5]</sup>。

白细胞介素 2 具有外周血和中枢神经系统双重来源<sup>[6, 7]</sup>。在外周血, IL-2 可诱导迟发型超敏反应; 在中枢神经系统, 神经元、胶质细胞等受到多种刺激(外伤、感染等)时可产生 IL-2。在众多的炎性细胞因子中, IL-2 对维持机体正常免疫功能起主要作用, 这是由于 IL-2 不仅通过和靶细胞上特异性高亲和力的 IL-2 受体(interleukin 2 receptor, IL-2R)结合, 促进细胞毒性淋巴细胞(cellular toxic lymphocyte, CTL)

和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)增殖,增强巨噬细胞的杀伤功能,影响干扰素、肿瘤细胞因子的水平,而且还促进B淋巴细胞的增殖和分化。近来研究表明,中枢神经系统中广泛存在IL-2样物质及其受体<sup>[8]</sup>;IL-2能刺激少突胶质细胞的增殖和成熟,并能剂量依赖性地提高神经元的存活率;IL-2是一种神经营养因子,对中枢神经系统外伤引起的神经元损伤有预防和修复作用。实验研究发现脑出血急性期血清中IL-2水平明显低于正常对照组的原因在于脑出血后神经-免疫-内分泌系统的结构和功能异常<sup>[9, 10]</sup>。但较为深入的研究目前还很少。我们的实验显示,血肿周围脑组织中IL-2水平于出血后1天显著降低,3天时轻度降低,6天时明显升高,以后逐渐降低;IL-2水平高峰期落后于脑水肿的高峰期( $R^2=0.179$ )。分析原因可能是:在脑出血初期脑组织因受到血肿周围水肿所致的缺血、缺氧等刺激而影响神经-免疫-内分泌调节网络,抑制了免疫反应,神经元不能及时通过胶质细胞向免疫细胞提呈抗原,T细胞、胶质细胞等不能迅速产生IL-2,随着时间的推移,神经元、胶质细胞等被激活并大量分泌IL-2,机体的免疫调节机制逐渐增强,有利于抑制脑水肿的发展,加速脑水肿的消退并有助于促进神经系统功能的恢复。

白细胞介素8是一种由中性粒细胞、单核细胞、多型核白细胞及内皮细胞等多种细胞合成与释放的多源型细胞因子。各种刺激信号如缺血、缺氧、损伤等通过激活胞浆中的核转录因子抑制蛋白(I $\kappa$ B)激酶,使I $\kappa$ B降解,核转录因子 $\kappa$ B游离于胞浆中,随后移位至胞核内,与DNA分子上炎症反应蛋白调节基因中启动子区域的核转录因子 $\kappa$ B结合位点结合,从而启动各种炎症反应基因转录,生成各种炎症反应蛋白mRNA。这些炎症反应蛋白包括肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、IL-6、IL-8和细胞间粘附分子1等<sup>[5, 7]</sup>。IL-8能促进白细胞浸润、聚集、细胞粘附,产生大量自由基并促进脂质过氧化和细胞因子的释放失调,导致脑毛细血管内皮细胞及基底膜损害,诱发血管源性水肿的发生和神经元损伤<sup>[10, 11]</sup>。研究发现,白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与脑水肿关系密切,它们通过核转录因子 $\kappa$ B使巨噬细胞和中性粒细胞分泌IL-6、IL-8等细胞因子和粘附分子发挥作用<sup>[5, 7, 12]</sup>。王怀立等<sup>[13]</sup>通过应用脂多糖建立大鼠脑水肿动物模型证实IL-8参与了血脑屏障的破坏,

是造成脑水肿的重要细胞因子之一。脑出血后IL-8的变化尚未见报道。我们的实验结果表明:血肿周围组织中IL-8水平于出血后6h无明显变化,1天至3天升高达高峰,6天后降至正常水平。提示脑出血后血肿周围存在IL-8介导的免疫反应,并产生损伤作用;另外还发现血肿周围组织含水量在脑出血后1天增加显著,3天时达高峰,以后逐渐下降;IL-8的水平变化与脑含水量的增减变化趋势一致( $R^2=0.861$ ),这提示IL-8可能与实验性脑出血后血肿周围水肿的发生、发展有关。

总之,IL-2和IL-8与脑出血后血肿周围的免疫反应密切相关,在脑出血早期通过升高血肿周围IL-2、降低血肿周围IL-8水平可能为治疗脑出血提供一个新的有效的方法。

#### [参考文献]

- [1] Farkas G, Marton J, Magy Z, Mandi Y, Takaes T, Deli MA, Abraham CS. Experimental acute pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in the rat: a potential role for tumor necrosis factor and interleukin-6[J]. *Neurosci Lett*, 1998, **242** (3): 147-150
- [2] 张新江, 殷小平, 易黎, 张苏明, 方思羽, 卢广. 大鼠缓慢注射自体血脑出血模型[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2002, **19** (5): 299-301
- [3] Kim JS, Yoon SS, Kim YH, Ryu JS. Serial measurement of interleukin-6, transforming growth factor- $\alpha$ , and S-100 protein in patients with acute stroke[J]. *Stroke*, 1996, **27** (4): 1553-557
- [4] Mayne M, Ni W, Yan HJ, Xue M, Johnston JB, Del Bigio MR, et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor-1 $\alpha$  expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2001, **32** (1): 240-248
- [5] Jin X, Zhao H, Wang JF, Fang LB, Lin JY, Gao Y. Influence of beta-endorphin on function of immune system of patients with cerebral hemorrhage[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2003, **83** (16): 1409-412
- [6] Awatsuji H, Furukawa Y, Nakajima M, Furukawa S, Hayashi K. Interleukin-2 as a neurotrophic factor for supporting the survival of neurons cultured from various regions of fetal rat brain[J]. *J Neurosci Res*, 1993, **35** (3): 305-311
- [7] Wulczyn FG, Krappmann D, Scheiderei C. The NF- $\kappa$ B/rel and I $\kappa$ B gene families: mediators of immune response and inflammation[J]. *J Mol Med*, 1996, **4** (2): 749-769
- [8] Mukaida N, Mastsumoto T, Yokoi K, Harada A, Matsushima K. Inhibition of neutrophil mediated acute inflammation injury by antibody against interleukin-8 (IL-8)[J]. *Inflamm Res*, 1998, **47** (suppl3): 151-157
- [9] Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor- $\kappa$ B in cytokine gene regulation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, **17** (1): 3-9
- [10] 张越林, 刘瑛, 师蔚. 高血压脑出血患者细胞免疫及IL-2、SiF-2R表达的意义[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2002, **23** (6): 555-557
- [11] 邹晓毅, 方思羽, 袁光固, 沈关心. 出血性脑卒中患者外周血T淋巴细胞产生白细胞介素-2能力的研究[J]. *华西医科大学学报*, 1997, **28** (3): 304-306
- [12] Yamasaki Y, Itoyama Y, Kogure K. Involvement of cytokine production in pathogenesis of transient cerebral ischemic damage[J]. *Keio J Med*, 1996, **45**: 225-229
- [13] 王怀立, 高东培, 芦军萍, 赵晓明, 高铁铮. TNF- $\alpha$ 和IL-8在脂多糖致大鼠脑水肿中的表达[J]. *免疫学杂志*, 2002, **18** (6): 440-446

(此文编辑 朱雯霞)