

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0114-03

寒潮诱发高血压大鼠卒中发病前 CD62p和 细胞间黏附分子 1 的变化

夏鹏飞¹, 高帆², 聂亚雄¹

(南华大学附属第一医院 1 神经内科, 2 功能科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 高血压; CD62p 细胞间黏附分子 1; 大鼠

[摘要] 目的 研究血小板活化和血管内皮损伤标志物在脑卒中启动中的作用。方法 300 只 SD 大鼠分为模型组、假手术组和正常对照组, 其中假手术组再分为假手术和假手术 + 内皮损伤组; 模型组再分为高血压组、内皮损伤组和高血压 + 内皮损伤组; 在第 12 周时使用寒潮箱处理各组大鼠, 将各组大鼠再分为寒潮组和非寒潮组, 其中寒潮组分别在寒潮前及寒潮后检测 CD62p 阳性表达率, 免疫组织化学检测脑小血管细胞间黏附分子 1 的表达。结果 模型组大鼠 CD62p 阳性表达率和细胞间黏附分子 1 的表达量高于正常对照组和假手术组 ($P < 0.05$); 模型组大鼠经寒潮处理后 CD62p 阳性表达率和细胞间黏附分子 1 的表达量明显高于非寒潮组 ($P < 0.05$), 其中高血压 + 内皮损伤组 CD62p 阳性表达率和细胞间黏附分子 1 的表达量更高 ($P < 0.05$)。结论 长期的高血压损害了大鼠的内皮系统, 而寒潮可以使这种损害加重, 使其接近卒中前状态。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Changes of CD62p and Intercellular Adhesion Molecule-1 in Rats with Pro-Stroke Status Caused by Artificial Cold

XIA Peng-Fei¹, GAO Fan², and NIE Ya-Xiong¹

(1 Department of Neurology, 2 Department of Function, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Hypertension; CD62p; Intercellular Adhesion Molecule-1; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the contribution of platelet activation and the damage marker of blood vessel endothelium in stroke. **Methods** 300 SD rats were divided into three groups: model group, sham operated group and normal control group. The sham operated group were divided into sham operated group and sham operated + endothelium damage group. The model group were divided into hypertension group, endothelium damage group and hypertension + endothelium damage group. In the 12th week the rats were divided into artificial cold exposure (ACE) and non-ACE. Only ACE were endured by artificial climate cabinet. Blood samples were collected for measuring CD62p expression and brain tissues were got to analyse intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression. **Results** In model group, the CD62p and ICAM-1 expression were higher than other groups ($P < 0.05$); the CD62p and ICAM-1 expression in ACE (model group) were higher than non-ACE group ($P < 0.05$); the CD62p and ICAM-1 expression in hypertension + endothelium damage group was the highest in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Persistent hypertension could damage the endothelium system of rat. Artificial cold would worsen this damage and make it close to the state of pre-stroke.

流行病学调查、临床观察及动物实验发现, 在寒冷季节, 尤其是气温骤降的寒潮时, 脑卒中发病明显增多。然而, 我们利用人工寒潮研究不同血压水平大鼠脑卒中的发病时发现: 脑血管病变必须达到一定的严重程度 (血压 ≥ 220 mmHg) 时才具备易卒中的条件; ④在严重的脑血管病变基础上, 在寒潮的作用下, 更易于促发脑卒中^[1]。我们认为当满足其中一点而又未发生脑卒中时, 机体所处的状态可被

称为卒中前状态, 而且血压水平越高及经历寒潮而尚未发生脑卒中的大鼠就越接近卒中前状态。与一、二级预防一样, 卒中前状态也是脑卒中预防相当重要的阶段^[2]。

双肾双夹法制作的易卒中型肾血管性高血压大鼠 (stroke-prone renovascular hypertensive rats, RHR-SP) 模型研究表明, 血压缓慢升高, 其脑内动脉有管壁透明变性、纤维素样坏死、内外膜增生性改变, 甚至血管闭塞、微动脉瘤形成等病理改变, 在此基础上可自行发生脑梗死和脑出血^[3,4]。因此, 本研究采用 RHRSP 模型, 以及大鼠舌下静脉注射低密度脂蛋白 (LDL) 建立血管内皮损伤大鼠模型观察寒潮时

[收稿日期] 2009-11-23 [修回日期] 2010-02-05

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目 (06c708)

[作者简介] 夏鹏飞, 副主任医师, 从事神经内科临床工作; 高帆, 硕士, 医师, 主要研究方向脑血管疾病; 聂亚雄, 博士后, 副主任医师, 从事神经内科临床工作。

CD62p和细胞间黏附分子 1(ICAM-1)的变化,探讨寒潮诱发高血压大鼠脑卒中发生的可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备及分组

应用双肾双夹法^[3]复制 RHRSP模型。选用体重 80~120 g 封闭群 SD 大鼠,术前 12 h 禁食,10% 水合氯醛 (250 mg/kg) 腹腔注射麻醉,用内径为 0.3 mm 的环型银夹分别钳夹双肾动脉起始部;假手术组只开腹分离肾动脉,不上银夹,其余步骤同前;正常对照组仅腹腔注射麻醉药。按照文献[5]使用大鼠舌下静脉注射 LDL 建立血管内皮损伤大鼠模型。在实验开始时按照随机数字表法将 300 只大鼠分为正常对照组 ($n=20$)、假手术组 ($n=20$)、假手术 + LDL 组 ($n=20$)、高血压组 ($n=80$)、LDL 组 ($n=80$) 及高血压 + LDL 组 ($n=80$)。各组再随机分为寒潮组和非寒潮组。

1.2 人工模拟寒潮

将上述寒潮组大鼠放入人工气候箱内调节相对湿度 70%, 20℃ 持续 12 h, 24℃ 持续 6 h, 使环境温度稳定在 24℃。然后 30 min 内将温度突然降至 4℃, 持续 12 h 后将温度升至 12℃ 维持 3 天。

1.3 标本取材和制备

每天观察大鼠的一般情况。以寒潮 3 天、出现偏瘫症状或意识障碍、死亡为研究终点, 舌下静脉取血 2 mL 置于枸橼酸钠抗凝的真空采血管中, 10 min 内完成 CD62p 抗体标记染色, 并在 2 h 内上机检测 CD62p 阳性表达率。已取血的大鼠, 经左心室向升主动脉插管, 剪开下腔静脉, 同时快速灌注肝素化生理盐水以清除血管内血液, 断头取脑, -20℃ 冷冻 10 min 后由嘴侧至尾侧每 2 mm 切成一冠状薄片, 固定于 4% 多聚甲醛溶液中至少 8 h, 取连续石蜡切片, HE 染色, 普通光学显微镜观察, 了解是否有卒中病灶。另外迅速分离、剪取胸主动脉段, 用 4% 甲醛固定 10 h, 然后置于 30% 蔗糖过夜 (大于 12 h)。主动脉在 -20℃ 下行横切片, 片厚 25 μm, 免疫组织化学染色、高清晰度病理图像分析系统分析脑小血管 ICAM-1 水平。发生脑卒中者被剔出卒中前状态分析。从各亚组中随机抽取 10 只无脑卒中大鼠的血样及脑组织样本检测。

1.4 CD62p 和细胞间黏附分子 1 检测

CD62p-PE、IgG1-PE 购于 Santa Cruz 公司, 流式细胞仪为 Beckman Coulter 公司 EPICS XL 型; 免疫组织化学检测 ICAM-1, 使用兔抗大鼠 ICAM-1 多克隆

抗体 (武汉博士德生物技术工程公司)。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用方差分析, 多个均数间的两两比较采用 SNK 法, 两样本均数比较采用 t 检验。

2 结果

模型组大鼠 CD62p 阳性表达率和 ICAM-1 的表达量高于正常对照组和假手术组 ($P < 0.05$); 模型组大鼠经寒潮处理后 CD62p 阳性表达率和 ICAM-1 的表达量明显高于非寒潮组 ($P < 0.05$), 其中高血压 + LDL 组 CD62p 阳性表达率和 ICAM-1 的表达量更高 ($P < 0.05$, 表 1 和图 1)。

表 1 各组 CD62p 阳性表达率和 ICAM-1 表达量比较

分 组	CD62p	ICAM-1
正常对照组		
非寒潮组	1.00% \pm 0.5%	12.74 \pm 2.61
寒潮组	0.92% \pm 0.63%	16.57 \pm 2.15
假手术组		
非寒潮组	0.98% \pm 0.39%	11.84 \pm 2.70
寒潮组	1.04% \pm 0.60%	12.98 \pm 2.04
假手术组 + LDL 组		
非寒潮组	3.31% \pm 0.61%	23.04 \pm 4.35
寒潮组	4.35% \pm 0.63%	30.62 \pm 3.62
高血压组		
非寒潮组	5.18% \pm 0.72% ^a	30.64 \pm 4.32 ^a
寒潮组	9.40% \pm 0.76% ^{ab}	35.14 \pm 4.26 ^{ab}
LDL 组		
非寒潮组	3.50% \pm 0.45% ^a	25.29 \pm 3.82 ^a
寒潮组	5.01% \pm 0.41% ^{ab}	32.72 \pm 4.01 ^{ab}
高血压 + LDL 组		
非寒潮组	7.08% \pm 0.57% ^{ac}	40.72 \pm 4.17 ^{ac}
寒潮组	9.14% \pm 0.42% ^{abc}	45.65 \pm 5.34 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$ 与正常对照组和假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与同组非寒潮组比较; c 为 $P < 0.05$ 与模型组其它两组比较。

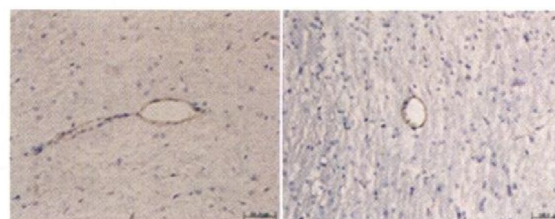


图 1 寒潮后 ICAM-1 在胸主动脉中的表达 左为正常对照组, 右为高血压 + LDL 组。

3 讨论

我们既往的研究发现 RHRSP 大鼠损伤的主要是细小动脉中膜层,造成血管壁肥厚,管腔变窄。而大鼠具有抗动脉粥样硬化的遗传特性决定其不容易造成慢性动脉内膜损伤,与人类高血压动脉粥样硬化的病理改变有较大区别。为了弥补该模型与人类高血压动脉粥样硬化性脑卒中的发病机制不同,本研究采用大鼠舌下静脉注射 LDL 建立血管内皮损伤大鼠模型,结果发现寒潮诱导下 CD62p 阳性表达率和 ICAM-1 表达量较其它组为高,故该改良的脑卒中发病模型更接近人类的实际发病情况。

CD62p 是目前所知反映血小板活化与释放最特异的标志物,在炎症和血管栓塞中起着重要作用。CD62p 在血小板和内皮细胞中合成,分别存在于血小板的 α 颗粒和内皮细胞的棒状小体中,它可以介导血小板紧密牢固地黏附于内皮细胞,以及血小板中性粒细胞、血小板单核细胞的连接,使中性粒细胞激活,释放多种活性酶、细胞因子等血管活性物质,损伤内皮细胞,引起基底膜通透性增加、细胞外基质增生、纤溶活性下降、纤维蛋白原沉积等多种生物学效应,启动血栓形成过程^[6]。CD62p 持续表达能启动血管壁不可逆的炎症反应,导致内皮功能紊乱,从而进一步促进血小板活化^[7]。长期慢性高血压时,血流对内膜的切应力增大,内皮细胞受损加重,血液中脂蛋白渗入,内膜增厚,粥样硬化斑块形成,导致血管更狭窄。在血流动力学作用下粥样硬化斑块可破裂、溃疡、出血,诱发血栓形成,引起动脉闭塞及其供血区脑梗死^[8]。ICAM-1 是一种淋巴细胞功能相关抗原 1 的配体,可以介导白细胞与血管内皮细胞之间的黏附及白细胞穿出血管壁。正常动脉内皮及斑块以外的内膜平滑肌细胞不表达或轻微表达 ICAM-1,而在动脉粥样硬化病变中内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞表达 ICAM-1 明显上调,其中脂纹病变的表达量最大。内皮细胞激活后 ICAM-1 从内皮细胞释放出来,血浆中 ICAM-1 水平可反应内皮损伤的程度。它又是体内的一种促炎细胞因子,参与多种白细胞的黏附与聚集,并参与脂质代谢,在炎症反应、动脉粥样硬化及血栓形成中起着重要作用。研究提示 ICAM-1 与脑卒中常见的危险因素之间的密切关系^[9-10],ICAM-1 已被认为是急性缺血性脑卒中中独立的预测因子^[11]。高血压病和内皮细胞功能障碍之间有密不可分的关系,高血压是内皮损伤的始动因素之一^[12]。内皮损伤程度可以反映高血压

患者病情严重程度^[13]。而在各模型亚组中,寒潮组 CD62p 阳性表达率和 ICAM-1 表达量较非寒潮组升高,提示寒潮可刺激 CD62p 和 ICAM-1 的表达,加重脑血管内皮损害,促进脑卒中的发作。

由于本研究为随机选取不同大小的脑血管进行研究,因而反应了颅内动脉的总体变化。研究表明,CD62p 和 ICAM-1 的变化可能是寒潮诱发脑卒中的作用机制之一。CD62p 和 ICAM-1 在模型组大鼠中的表达升高,可能是因为它在卒中前状态中起重要作用。从本研究也可发现,长期严重高血压患者脑血管内皮的功能失调,有诱因(如寒潮)发生时,内皮调控功能衰竭,更易诱发脑卒中。因此除了及早有效地控制高血压,改善血管内皮功能有可能成为预防高血压脑卒中的新的药物靶点。

[参考文献]

- [1] 林健雯,施晓耕,廖松洁,等. 人工寒潮时不同血压水平大鼠脑卒中发病的实验研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2005, 31(3): 180-184
- [2] 黄如训,陈立云,刘冰,等. 巴曲酶预防气温骤降所致脑卒中的实验研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2005, 31(2): 104-107
- [3] 林健雯,施晓耕,廖松洁,等. 人工寒潮诱发大鼠脑卒中发病前的凝血和纤溶系统功能的改变[J]. 血栓与止血学杂志, 2008, 14(3): 108-112
- [4] 王东,蒋湘莲,聂亚雄. 高血压大鼠模型的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 14(3): 271-276
- [5] Feng Q, Lu X, Jones DL, et al. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice [J]. *Circulation*, 2001, 104: 700-704
- [6] Massberg S, Gruner S, Konrad I, et al. Enhanced in vivo platelet-adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice [J]. *Blood*, 2004, 103: 136-142
- [7] Patrik H, Suzanne Fatchi Moghadam, et al. Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia [J]. *Stroke*, 2006, 37: 2283-2287
- [8] Jie Pan, Angelos Aristideis Konstantas, Brian Bateman, et al. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging and potential therapies [J]. *Neuroradiology*, 2007, 49: 93-102
- [9] Ronen Sumagin, Ingrid H. A role for ICAM-1 in maintenance of leukocyte-endothelial cell rolling interactions in inflamed arterioles [J]. 2007, 293: H2 786-798
- [10] Simundic AM, Basic V, Topic E, et al. Soluble adhesion molecules in acute ischemic stroke [J]. *Clin Invest Med*, 2004, 27(2): 86-92
- [11] Zeller JA, Lenz A, Eschenfelder CC, et al. Platelet-leukocyte interaction and platelet activation in acute stroke with and without preceding infection [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1519-1523
- [12] Spencer CG, Martin SG, Fehden DG, et al. Relationship of homocysteine to marker 8 of platelet and endothelial activation in "high risk" hypertensives: a substudy of the Anglo- and Indian Cardiac Outcomes Trial [J]. *Int J Cardiol*, 2004, 94(2-3): 293-300
- [13] Ando H, Zhou J, Macova M, et al. Angiotensin II/AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats [J]. *Stroke*, 2004, 35: 1726-1731

(此文编辑 文玉珊)