

二氯化钴预处理对大鼠脑梗死体积及 SDF-1 α /CXCR4 表达水平的影响

穆珊珊, 张春阳, 石秋艳, 王德龙, 刘春景, 陈 历

(华北理工大学附属医院神经内科, 河北省唐山市 063000)

[关键词] 脑梗死; 缺氧预处理; 二氯化钴; 梗死体积; 基质细胞衍生因子 1 α ; 趋化因子受体 4

[摘要] **目的** 观察二氯化钴预处理对大鼠脑梗死体积百分比、基质细胞衍生因子 1 α (SDF-1 α)/趋化因子受体 4(CXCR4)表达的影响;探讨缺氧缺血环境中 SDF-1 α /CXCR4 生物轴对脑的保护作用。**方法** 将 168 只成年雄性 SD 大鼠随机分为缺氧预处理组($n=84$)、模型组($n=84$)。按缺血后再灌注时间不同分为再灌注 6 h、24 h、3 天、5 天、7 天、14 天 6 个亚组。采用改良 Longa 方法制备局灶性脑缺血模型。观察缺氧缺血后脑组织病理学改变,通过氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法观察脑缺血后再灌注两组大鼠脑梗死体积百分比的变化;免疫组织化学法检测大鼠脑组织皮层区各个时间点 SDF-1 α 及 CXCR4 的表达变化。**结果** TTC 染色显示,缺氧预处理组及模型组大鼠 6 h 时即可见明显梗死灶,24 h 脑梗死体积趋于稳定。两组大鼠 24 h、3 天、5 天、7 天、14 天 5 个时间点脑梗死体积百分比比较,差异无统计学意义($P>0.05$);缺氧预处理组各时间点脑梗死体积百分比均明显小于模型组($P<0.05$)。免疫组织化学法结果显示,两组于脑缺血再灌注 6 h 皮层区 SDF-1 α 、CXCR4 表达明显增加,7 天表达至高峰,随后表达逐渐减少,14 天仍有表达。缺氧预处理组各时间点皮层区 SDF-1 α 、CXCR4 的阳性细胞数均显著多于模型组($P<0.05$)。**结论** 二氯化钴预处理能缩小脑梗死体积,其可能通过上调 SDF-1 α 、CXCR4 的表达水平,诱导脑缺氧耐受,促进间充质干细胞向缺血组织迁移,发挥脑保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Cobalt Dichloride Preconditioning on the Volume of Cerebral Infarction and the Expression of SDF-1 α /CXCR4 in Rats

MU Shan-Shan, ZHANG Chun-Yang, SHI Qiu-Yan, WANG De-Long, LIU Chun-Jing, and CHEN Li

(Department of Neurology, the Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000)

[KEY WORDS] Cerebral Infarction; Hypoxia Preconditioning; Cobalt Dichloride; Infarction Volume; Stroma Cell-derived Factor-1 α ; Chemokine Receptor 4

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of cobalt dichloride (CoCl_2) preconditioning on the cerebral infarction volume percentage and the expressions of stroma cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)/chemokine receptor 4 (CXCR4) in rats; To investigate the protective effect of SDF-1 α /CXCR4 biological axis in the brain of the hypoxic ischemic environment. **Methods** The 168 adult male SD rats were randomly divided into hypoxia preconditioning group ($n=84$) and model group ($n=84$). According to the time of reperfusion after ischemia, each group was divided into 6 subgroups: 6 h, 24 h, 3 d, 5 d, 7 d and 14 d subgroup. The focal cerebral ischemia model was prepared by modified Longa method. The pathological change of brain tissue was observed after hypoxia and ischemia. The change of cerebral infarction volume percentage was observed by triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining after reperfusion in two groups. The expressions of SDF-1 α and CXCR4 in cerebral cortex were detected by immunohistochemistry at each time point. **Results** TTC staining showed that visible infarction focus occurred at 6 h and cerebral infarction volume tended to be stable at 24 h in the hypoxia preconditioning group and the model group. There was no significant difference in cerebral infarction

[收稿日期] 2015-05-29

[修回日期] 2015-11-13

[基金项目] 河北省卫生厅资助项目(ZL20140185)

[作者简介] 穆珊珊,在读硕士研究生,研究方向为脑血管疾病,E-mail 为 850069606@qq.com。张春阳,硕士,主治医师,研究方向为脑血管疾病。通讯作者石秋艳,硕士,主任医师,研究方向为脑血管疾病,E-mail 为 qiuyanshi@163.com。

volume percentage among 24 h, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d in two groups ($P>0.05$). Cerebral infarction volume percentage in the hypoxia preconditioning group was significantly less than that in the model group at each time point ($P<0.05$). The results of immunohistochemistry showed that the expressions of SDF-1 α and CXCR4 increased significantly in the two groups at 6 h, and the expressions were the highest at 7 d, followed by a gradual decrease, and the expression was still in existence at 14 d. The number of SDF-1 α and CXCR4 positive cells in the cortex of hypoxia preconditioning group was significantly higher than that in model group ($P<0.05$). **Conclusion** Cobalt dichloride preconditioning can reduce cerebral infarct volume, which may increase the expressions of SDF-1 α and CXCR4, induce brain hypoxia tolerance, promote the migration of mesenchymal stem cells to ischemic tissue, and play a protective role in the brain.

脑血管疾病以其高发病率、高致残率和高死亡率成为威胁人类身体健康的主要疾病,且其高致残率严重影响患者的生存质量,给家庭和社会带来严重的经济负担。其中,缺血性脑血管疾病约占全部脑血管病的3/4,是第一位致残/致死性疾病。目前治疗方法主要有溶栓、神经保护、康复等。研究发现脑缺氧预处理可通过各种途径刺激脑组织产生内源性神经保护机制,提高脑组织对之后较长时间、损害重的缺血性损伤的抵抗力,减轻神经功能缺损;国内外学者在研究大鼠大脑中动脉栓塞缺血再灌注模型时发现缺氧应激可激活神经元前体细胞的发生,诱导神经元前体细胞朝着梗死区域迁移,从而修复受损的神经组织^[1-2]。但细胞在缺血灶中的迁移机制尚未明确,目前对此迁移机制的研究多在离体海马脑片或细胞培养方面,在体研究少见。

本实验以二氯化钴(cobalt dichloride, CoCl_2)为干预手段,大鼠为干预对象,模拟细胞缺氧状态,通过氯化三苯基四氮唑(triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色法评价缺氧预处理对脑梗死体积的影响,免疫组织化学法检测缺氧预处理后脑梗死大鼠皮层区基质细胞衍生因子1 α (stroma cell-derived factor-1 α , SDF-1 α)/趋化因子受体4(chemokine receptor 4, CXCR4)表达水平的变化,阐明 CoCl_2 缺氧预处理后脑组织的保护机制及SDF-1 α /CXCR4表达与缺氧缺血脑组织的关系,为临床研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年雄性SD大鼠168只,鼠龄8周左右,体重200~250 g,清洁级[中国人民解放军军事医学科学院,许可证号:SCXK-(军)2009-003]。兔抗大鼠SDF-1 α /CXCR4多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),兔二步法检测试剂盒(SP9001)(北京中山金桥生物技术有限公司),SDS-PAGE凝胶配制

试剂盒(上海碧云天公司),RIPA蛋白裂解液(上海贝博公司),ECL显色液(MultiScience公司),TTC溶液(Sigma公司)等。

1.2 动物分组及处理

随机将168只大鼠分为缺氧预处理组及模型组,两组按缺血后再灌注时间不同分为再灌注6 h、24 h、3天、5天、7天、14天6个亚组。每个时间点14只大鼠,其中7只大鼠用于TTC染色,7只大鼠用于免疫组织化学检测。

1.3 模型制备及分组

(1)缺氧预处理组:参照改良Longa方法^[3]及王乔生等^[4]改良方法制备局灶性脑缺血模型,分别于造模前48、24、2 h腹腔注射二氯化钴(30 mg/kg),造成3次化学缺氧,之后10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠。仰卧位固定大鼠,沿鼠腹侧颈部正中手术切口,分离左侧颈总动脉(CCA)及其分支颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。在距CCA分叉处及15 mm处结扎ECA,于分叉处5 mm用显微外科剪剪开ECA,将头端直径0.26~0.28 mm的自制线栓插入ECA并适度结扎固定,解开分叉处结扎线,在离分叉10 mm处剪断ECA,轻巧牵拉ECA使其与ICA几成一直线,将线栓导入ICA并沿其前行,行进长度为 15.5 ± 0.5 mm,当有阻力感时表明已堵塞大脑中动脉,此时加固结扎颈外动脉以防线栓滑脱,缺血2 h后拔出栓线形成再灌注。(2)模型组:除不予氯化钴外,步骤同缺氧预处理组。

模型入组标准:参考Longa 5分法^[3]进行评分:0分:无神经功能缺失症状,能正常活动;1分:提尾时不能完全伸展左侧前爪;2分:爬行时出现向左转圈;3分:行走时身体向偏瘫侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。评分在1~3分为造模成功,可作为本实验的研究对象,在手术过程中死亡或处死解剖后发现脑出血者剔除,重新选取大鼠造模,补充到相应组中。

1.4 TTC染色

断头取脑,剔除嗅脑、低位脑干及小脑,称重。

-20℃ 冷冻 10 min, 脑组织做冠状切片, 厚度为 2 mm 左右, 切成 5 片。脑片置于 1% TTC 溶液中, 37℃ 避光孵育 30 min。取出脑片用生理盐水冲洗 2 次, 10% 甲醛固定。正常脑组织呈玫瑰红色(正常区), 而脑梗死区呈苍白色(梗死区)。用眼科镊仔仔细分离苍白区和非苍白区, 参照文献[2]方法分别称重, 计算梗死区脑质量占全脑质量的百分比(%)作为梗死范围。公式如下: 梗死百分比(%) = 苍白区重量 / (苍白区重量 + 非苍白区重量) × 100%。

1.5 免疫组织化学染色

采用 SABC 法: (1) 各组大鼠脑组织经心脏灌注固定后, 以 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液后固定, 去离子水冲洗, 梯度乙醇脱水, 及二甲苯透明、浸蜡, 常规石蜡包埋, 取连续冠状脑组织切片 4 μm。(2) 切片常规脱蜡至水。(3) 3% H₂O₂ 室温 20 min 灭活内源性酶。(4) 微波修复抗原。(5) 滴加封闭液 30 min。(6) 滴加兔抗鼠 SDF 多克隆抗体(1:500)、兔抗鼠 CXCR4 多克隆抗体(1:500), 37℃ 孵育 1 h, 4℃ 过夜。(7) 复温后滴加生物素化羊抗兔 IgG, 37℃ 1 h。(8) 滴加 SABC, 37℃ 30 min。(9) DAB 显色 5 min。(10) 苏木素复染 2~3 min, 分化后充分蓝化, 脱水透明封片。除滴加封闭液步骤不洗外, 各步骤之间用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用 PBS 代替一抗作阴性对照。阳性细胞为: 细胞浆呈棕黄色的细胞(SDF-1α 和 CXCR4 蛋白阳性染色均位于细胞浆之中)。

1.6 统计学处理

所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学处理。各组同一时间点之间比较采用 *t* 检验, 组内不同时间点之间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑梗死体积百分比测定

缺氧预处理组及模型组大鼠 6 h 时即可见右侧大脑半球脑组织皮层区及基底节区的明显梗死灶, 且于 24 h 脑梗死体积趋于稳定。缺氧预处理组及模型组大鼠 24 h、3 天、5 天、7 天、14 天 5 个时间点脑梗死体积百分比比较, 差异无统计学意义(P>0.05); 缺氧预处理组各时间点脑梗死体积百分比均明显小于模型组(P<0.05; 表 1、图 1)。

2.2 SDF-1α 表达情况

缺氧预处理组及模型组大鼠皮层区脑组织均

可见 SDF-1α 表达阳性细胞, 且表达趋势大致相同, 6 h 阳性细胞逐渐增多, 7 天达高峰, 14 天仍有阳性细胞; 缺氧预处理组各时间点 SDF-1α 阳性细胞数均显著多于模型组(P<0.05; 表 2、图 2)。

表 1. 两组大鼠不同时间脑梗死体积百分比比较(n=7)

Table 1. The comparison of cerebral infarction volume percent between two groups in each time point (n=7)

时间	缺氧预处理组	模型组
6 h	20.05%±0.76% ^a	26.25%±0.65%
24 h	28.57%±0.61% ^{ab}	36.44%±0.73%
3 天	28.63%±0.60% ^{ab}	36.73%±0.45%
5 天	28.18%±0.78% ^{ab}	36.95%±0.71%
7 天	28.46%±0.88% ^{ab}	36.36%±0.71%
14 天	28.09%±0.73% ^{ab}	36.38%±0.57%

a 为 P<0.05, 与模型组比较; b 为 P<0.05, 与同组前一时间点比较。

表 2. 两组大鼠不同时间 SDF-1α 阳性细胞数比较(n=7, 个)

Table 2. The comparison of SDF-1α positive cells between two groups in each time point (n=7, number)

时间	缺氧预处理组	模型组
6 h	5.40±1.61 ^a	3.32±1.62
24 h	8.49±1.10 ^{ab}	5.98±2.65
3 天	12.14±2.48 ^{ab}	9.15±2.31
5 天	14.14±2.00 ^{ab}	11.97±1.63
7 天	17.52±3.08 ^{ab}	13.76±2.50
14 天	14.11±2.50 ^{ab}	11.06±1.63

a 为 P<0.05, 与模型组比较; b 为 P<0.05, 与同组前一时间点比较。

2.3 CXCR4 表达情况

缺氧预处理组及模型组大鼠皮层区脑组织均可见 CXCR4 表达阳性细胞, 且表达趋势大致相同, 6 h 阳性细胞逐渐增多, 7 天达高峰, 14 天仍有阳性细胞; 缺氧预处理组各时间点 CXCR4 阳性细胞数均显著多于模型组(P<0.05; 表 3、图 3)。

表 3. 两组大鼠不同时间点 CXCR4 阳性细胞数比较(n=7, 个)

Table 3. The comparison of CXCR4 positive cells between two groups in each time point (n=7, number)

时间	缺氧预处理组	模型组
6 h	8.20±2.26 ^a	5.74±1.23
24 h	10.67±1.75 ^{ab}	8.39±2.00
3 天	12.45±1.39 ^{ab}	10.33±1.84
5 天	14.88±2.15 ^{ab}	12.79±1.07
7 天	19.91±1.51 ^{ab}	17.33±2.68
14 天	17.59±1.95 ^{ab}	14.98±1.45

a 为 P<0.05, 与模型组比较; b 为 P<0.05, 与同组前一时间点比较。



图 1. CoCl_2 预处理对大鼠脑梗死体积百分比的影响 (TTC 染色) 自左至右, 第 1 列为模型组 6 h, 第 2 列为模型组 24 h, 第 3 列为缺氧预处理组 6 h, 第 4 列为缺氧预处理组 24 h。

Figure 1. The effects of CoCl_2 pretreatment on cerebral infarction volume percent in rats (TTC staining)

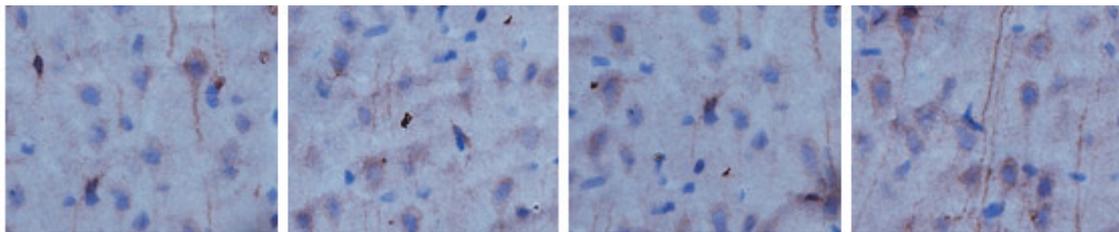


图 2. 免疫组织化学染色示 SDF-1 α 表达阳性细胞 (SABC, 400 \times) 自左至右为模型组 6 h, 模型组 7 天, 缺氧预处理组 6 h, 缺氧预处理组 7 天。

Figure 2. Immunohistochemical staining showed SDF-1 α expression positive cells (SABC, 400 \times)

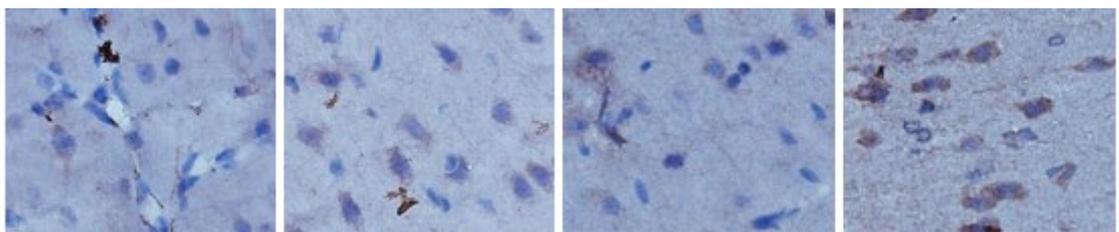


图 3. 免疫组织化学染色示 CXCR4 表达阳性细胞 (SABC, 400 \times) 自左至右为模型组 6 h, 模型组 7 天, 缺氧预处理组 6 h, 缺氧预处理组 7 天。

Figure 3. Immunohistochemical staining showed CXCR4 expression positive cells (SABC, 400 \times)

3 讨论

CoCl_2 作为常用的化学缺氧诱导剂, 在哺乳动物系统中应用广泛, 能够使机体产生类似于真正缺氧缺血下的一系列反应。氯化钴引起细胞缺氧的

机制主要涉及 4 个方面: (1) 钴离子直接取代与血红素相结合的二价铁离子, 使血红蛋白去氧; (2) 钴离子作为亚铁螯合酶的底物, 代替铁离子与原卟啉 IX 结合, 使细胞缺氧, 并能激活缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) (HIF-1 以二聚

体的形式存在,包括 α 和 β 亚基),这是由于 HIF-1 α 的稳定性和转录活性均受到细胞内氧含量的调控,常氧条件下通过泛素化-蛋白酶体系途径迅速降解^[5],低氧条件下稳定性增加;(3)钴离子能够占据与 HIF-1 α 降解有密切关系的脯氨酸羟化酶的铁离子位点,酶的活性减弱甚至丧失;(4)钴离子本身还可以与 HIF-1 α (羟化或未羟化均可)上的氧依赖降解区域相结合,从而减少 HIF- α 的泛素化而增加其积聚。以上几种机制均能使 HIF-1 α 积聚,且更加稳定。在肾脏研究中发现,CoCl₂ 诱导缺氧可显著增加 HIF-1 α 的表达,减轻肾脏组织损伤^[6]。本实验研究发现,CoCl₂ 缺氧预处理后大鼠脑梗死体积显著缩小,说明脑梗死大鼠经 CoCl₂ 预处理后可能是通过增加 HIF-1 α 积聚产生脑保护,促进神经功能修复。

研究发现^[7],HIF-1 α 在损伤组织中对 SDF-1 α 、CXCR4 有调控作用。Ceradini 等^[8]在研究低氧环境中的局部损伤组织时也发现,低氧可激活对缺氧敏感的转录因子 HIF-1 α ,上调 SDF-1 α 表达。本实验结果显示,缺氧预处理后脑卒中大鼠脑组织皮层区 SDF-1 α 表达显著增加;这与 Grierson 等^[9]、Wang 等^[10]的研究结果类似。而 SDF-1 α 是 CXC 类趋化蛋白,是已知能与受体 CXCR4 特异结合并能启动它的天然趋化因子,SDF-1 α 只有与其特异性受体 CXCR4 结合,构成 SDF-1 α /CXCR4 生物轴才能在生理和病理过程中发挥作用^[11]。在研究局灶性脑缺血损伤模型中发现,移植的神经干细胞可以在 SDF-1 α /CXCR4 的趋化下到达脑缺血区参与神经修复,且 CXCR4 受体的阻断剂 AMD3100 能够有效阻断干细胞的迁移,这也说明 SDF-1 α /CXCR4 在脑缺血大鼠干细胞的迁移过程中发挥重要作用;Wen 等^[12]的研究也间接证实了这一点。内源性骨髓间充质干细胞也可能随 SDF-1 α /CXCR4 浓度梯度到达缺氧部位,参与新生血管的生成、神经组织的修复^[13-14]。

本实验结果显示,CoCl₂ 缺氧预处理后脑梗死大鼠梗死体积显著缩小,脑组织中 SDF-1 α 、CXCR4 的表达显著增加;随着脑梗死时间的推移,SDF-1 α 、CXCR4 表达逐渐增加,7 天达高峰,14 天仍有阳性表达,二者变化趋势在时间上一致;这与 Shen 等^[15]的研究结果类似。综上所述,CoCl₂ 造成化学缺氧,可能通过上调 SDF-1 α /CXCR4 生物轴的表达,促进骨髓间充质干细胞的迁移,从而起到神经修复的作用。SDF-1 α /CXCR4 生物轴将成为治疗脑梗死新的

干预靶点,但其具体作用机制及干预措施尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Siniscalco D, Giodano C, Galderisi U, et al. Long-lasting effect of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice[J]. *Front Integr Neurosci*, 2011, 5(1): 79-87.
- [2] Aldhmesh A, Zaher W, Al-Nbaheen M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells: basic biology and current clinical use for tissue regeneration[J]. *Ann Saudi Med*, 2012, 32(1): 68-77.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [4] 王乔生,符晖,曾红科. 线栓法大鼠局灶性脑缺血模型的改进与评价[J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 5(40): 291-294.
- [5] Takeda K, Cowan A, Fong GH. Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system [J]. *Circulation*, 2007, 116(7): 774-781.
- [6] Yu XF, Lu CL, Liu H, et al. Hypoxic preconditioning with cobalt of bone marrow mesenchymal stem cells improves cell migration and enhances therapy for treatment of ischemic acute kidney injury [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): 62 703-710.
- [7] Gong QM, Quan JJ, Jiang HW, et al. Regulation of the stromal cell-derived factor-1 alpha-CXCR4 axis in human dental pulp cells [J]. *J Endod*, 2010, 36(9): 1 499-503.
- [8] Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1 [J]. *Nat Med*, 2004, 10(3): 858-864.
- [9] Grierson R, Meyer-Rüsenberg B, Kunst F, et al. Endothelial progenitor cells and plasma vascular endothelial growth factor and stromal cell-derived factor-1 during ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013, 29(6): 530-538.
- [10] Wang Y, Huang J, Li Y, et al. Roles of chemokine CXCL12 and its receptors in ischemic stroke [J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(5): 166-172.
- [11] 杨志峰,杨清玲,陈昌杰. 趋化因子 SDF-1 与受体 CXCR4 的研究进展 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(1): 58-61.
- [12] Wen J, Zhang JQ, Huang W, et al. SDF-1 α and CXCR4 as therapeutic targets in cardiovascular disease [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2012, 2(1): 20-28.
- [13] 杨丹,王继华. 肿瘤血管供应模式及其分子机制 [J]. *中南医学科学杂志*, 2014, 3(42): 196-200.
- [14] 余刚,夏红利,李敏才. CXCR4⁺骨髓间充质干细胞迁移与氧化型低密度脂蛋白致内皮细胞损伤 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(8): 805-808.
- [15] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(1): 6-13.

(此文编辑 曾学清)