

缺血后处理局灶性脑缺血再灌注模型大鼠相关通路以及白细胞介素8的表达

李志行¹, 吕敬雷², 陈萍¹, 赵仁亮² (1青岛大学医学院, 山东省青岛市 266000; 2青岛大学附属医院神经内科, 山东省青岛市 266003)

文章亮点:

- 1 缺血后处理已成为防治缺血性卒中新的研究热点, 有研究证实缺血后处理能够激发内源性保护作用, 抑制缺血再灌注后的炎症反应, 但具体机制迄今尚未明确。
- 2 实验观察了缺血后处理对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Toll 样受体 4-核因子 κ B 信号转导通路以及白细胞介素 8 表达情况。

关键词:

实验动物模型; 脑及脊髓损伤动物模型; 脑缺血; 再灌注损伤; 缺血后处理; 炎症反应; 神经保护; 动物模型; SD 大鼠; Toll 样受体 4; 核因子 κ B; 白细胞介素 8

主题词:

组织工程; 脑缺血; 模型; 动物; 白细胞介素 8

基金资助:

青岛市科技局立项课题(14-2-3-14-nsh)

摘要

背景: 缺血后处理能够激发内源性保护作用, 抑制缺血再灌注后的炎症反应, 但具体机制目前尚不明确。
目的: 观察缺血后处理对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Toll 样受体 4-核因子 κ B 信号转导通路以及白细胞介素 8 表达的影响, 进一步阐述缺血后处理的神经保护机制。
方法: 将 110 只大鼠随机分为假手术组 10 只、模型组和缺血后处理组各 50 只, 将大鼠按照 Zea-Longa 法建立局灶性脑缺血再灌注模型, 再进行缺血后处理, 即大脑中动脉闭塞 2 h 后进行 3 个循环的再灌注 15 s/缺血 15 s, 设模型组和假手术组作对照。对各组进行神经行为学评分, TTC 染色测定脑梗死体积, 免疫组织化学法检测脑组织 Toll 样受体 4、核因子 κ B 和白细胞介素 8 蛋白表达, 原位杂交法检测其 mRNA 表达。
结果与结论: 模型组、缺血后处理组大鼠都出现神经行为学缺失及缺血侧大脑半球梗死。再灌注 6, 12, 24, 48, 72 h, 与模型组相比, 缺血后处理组大鼠神经行为学评分显著改善 ($P < 0.05$)、脑梗死体积明显减少 ($P < 0.05$)。模型组和缺血后处理组 Toll 样受体 4、核因子 κ B、白细胞介素 8 蛋白和 mRNA 表达于再灌注 6 h 时已升高, 24 h 达峰值。再灌注 6, 12, 24, 48, 72 h, 与模型组各对应时间点亚组比较, 缺血后处理组上述各因子表达均显著降低 ($P < 0.05$)。结果证实, 缺血后处理可抑制缺血再灌注引起的炎症反应, 通过抑制 Toll 样受体 4-核因子 κ B 信号转导通路和下调白细胞介素 8 的表达, 以此发挥神经保护作用。

李志行, 吕敬雷, 陈萍, 赵仁亮. 缺血后处理局灶性脑缺血再灌注模型大鼠相关通路以及白细胞介素 8 的表达[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(49):7938-7944.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.49.012

Effects of ischemic postconditioning on related pathways and interleukin 8 expression in rat models of focal cerebral ischemia/reperfusion

Li Zhi-xing¹, Lv Jing-lei², Chen Ping¹, Zhao Ren-liang² (1Qingdao University Medical College, Qingdao 266000, Shandong Province, China; 2Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Ischemic postconditioning may motivate endogenous protective effect and inhibit inflammatory response after ischemia/reperfusion, but the specific mechanism is still unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effects of ischemic postconditioning on Toll-like receptor 4/nuclear factor κ B signaling transduction pathway and interleukin 8 expression in rat models of focal cerebral ischemia/reperfusion, and further illustrate the neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning.

METHODS: One hundred and ten rats were randomly divided into sham group ($n=10$), model group ($n=50$) and ischemic postconditioning group ($n=50$). Focal cerebral ischemia/reperfusion rat models were established according to Zea-Longa method, and then subjected to ischemic postconditioning, i.e., middle cerebral artery occlusion for 2 hours followed by 3 cycles of 15-second reperfusion/15-second ischemia. Model group and sham group were set for comparison. In each group, rat neurobehavioral deficit scores were evaluated, and rat infarct volume was measured with TTC staining. The expression of Toll-like receptor 4, nuclear factor κ B and interleukin 8 protein in brain tissue was detected by immunohistochemistry. Their mRNA expression was detected by *in situ* hybridization.

李志行, 男, 1990 年生, 山东省青岛市人, 汉族, 青岛大学医学院在读硕士生。

通讯作者: 赵仁亮, 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 青岛大学附属医院神经内科, 山东省青岛市 266003

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)49-07938-07

稿件接受: 2015-09-07

http://www.crter.org

Li Zhi-xing, Studying for master's degree, Qingdao University Medical College, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Corresponding author: Zhao Ren-liang, M.D., Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Accepted: 2015-09-07

RESULTS AND CONCLUSION: Rats in the model and ischemic postconditioning groups all presented neurobehavioral deficits and cerebral hemisphere infarction on the ischemic side. At 6, 12, 24, 48 and 72 hours after reperfusion, the neurobehavioral deficit scores were significantly decreased in the ischemic postconditioning group compared with that in the model group ($P < 0.05$). The infarct volume of rats in the ischemic postconditioning group was significantly decreased compared with that in the model group ($P < 0.05$). The expression of Toll-like receptor 4, nuclear factor κ B and interleukin 8 protein and mRNA was increased at 6 hours after reperfusion and reached the peak at 24 hours after reperfusion. At 6, 12, 24, 48 and 72 hours after reperfusion, the expression of Toll-like receptor 4, nuclear factor κ B and interleukin 8 protein and mRNA was all significantly decreased in the ischemic postconditioning group compared with that in the model group ($P < 0.05$). The results confirm that ischemic postconditioning may inhibit inflammatory response induced by ischemia/reperfusion, and play its neuroprotective effect by inhibiting Toll-like receptor 4/nuclear factor κ B signaling transduction pathway and down-regulating the expression of interleukin-8.

Subject headings: Tissue Engineering; Brain Ischemia; Model, Animal; Interleukin-8

Funding: a grant from Qingdao Municipal Science and Technology Bureau, China, No. 14-2-3-14-nsh

Li ZX, Lv JL, Chen P, Zhao RL. Effects of ischemic postconditioning on related pathways and interleukin 8 expression in rat models of focal cerebral ischemia/reperfusion. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(49):7938-7944.

0 引言 Introduction

脑血管疾病是导致人类死亡的3大疾病之一,寻找针对脑缺血有效的保护措施一直是脑血管疾病的主要研究方向。Zhao等^[1]于2003年首次提出“缺血后处理”的概念,即组织或器官在缺血再灌注开始时,经历短暂、重复的缺血再灌注过程,可诱导器官自身的保护作用。Zhao等^[2]于2006年首次将缺血后处理的概念应用到脑保护中,使之成为防治缺血性卒中新的研究热点,但目前其作用机制尚未完全阐明。

研究表明,炎症反应是缺血再灌注损伤的重要机制之一^[3],许多生物活性物质在缺血再灌注后表达增加或活性上调,参与缺血再灌注损伤的病理生理过程。Toll样受体4 (Toll-like receptor, TLR4)是一种跨膜信号传递受体蛋白,主要在脑小胶质细胞内表达,受到相应刺激后会导致炎症细胞因子高水平表达,参与缺血性卒中的炎症反应,引起神经细胞死亡和神经功能损伤^[4-5]。核因子 κ B是这一过程关键的转录因子^[6-7],参与多种炎症递质及细胞因子的基因调控,与脑缺血后炎症反应密切相关^[8]。研究证实, Toll样受体4-核因子 κ B信号转导通路在脑组织缺血再灌注损伤炎症反应中发挥重要作用^[9-10],该通路的激活会导致白细胞介素8等炎症细胞因子大量释放^[11],参与缺血性脑损伤的病理生理过程^[12]。

实验旨在探讨缺血后处理对局灶性脑缺血再灌注大鼠Toll样受体4、核因子 κ B以及白细胞介素8蛋白和mRNA表达的影响,为缺血性脑血管病的防治提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 造模动物及材料 选用SPF级SD大鼠141只,体质量230-260 g,由青岛市药物检验所实验动物中心提供,许可证号: SCXK(鲁)20100010。实验前将动物置于实验室适应环境饲养1周,均自由进食、饮水,每日光照12 h,实验室室温(22±2) °C,相对湿度65%。实验过程符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求^[13]。

缺血后处理局灶性脑缺血再灌注模型制备实验用试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
2, 3, 5-三苯基氯化三苯基四氮唑(TTC), 焦碳酸二乙酯(DEPC)	美国 Sigma 公司
DAB 显色试剂盒, 细胞凋亡检测试剂盒	武汉博士德生物工程有限公司
“贵花田”牌鱼线, 直径 0.24 mm	日本株式会社
手术器械	上海跃进医疗器械厂
石蜡切片机	德国 Leica 公司
光学显微镜	日本 Olympus 公司
计算机图像分析软件	美国 Compix 公司
SPSS 19.0 软件	IBM SPSS software 公司

1.2 造模方法

1.2.1 分组 大鼠在造模时剔除31只,将剩余大鼠110只随机分为假手术组10只,模型组和缺血后处理组各50只,后2组大鼠根据再灌注时间分为6, 12, 24, 48, 72 h共5个亚组^[14],每亚组10只。各亚组随机选取4只大鼠用于测定脑梗死体积,其他6只用于制备石蜡切片。

1.2.2 局灶性脑缺血再灌注模型大鼠制备 实验于2013年9月至2014年12月在青岛大学医学院脑研所完成。参照Zea-Longa等^[15]线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型。

①模型组: 体积分数10%水合氯醛(30 mL/kg)腹腔注射麻醉后将实验用大鼠仰卧固定于手术台上,常规备皮消毒,颈部正中切口,钝性游离左侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,结扎颈外动脉远端及其分支,沿根部结扎颈内动脉颅外分支翼腭动脉,用动脉夹暂时夹闭颈总动脉及颈内动脉,在颈外动脉结扎线近端距分叉5 mm处剪一约0.2 mm小口并导入栓线,经颈总动脉分叉部沿颈内动脉缓慢推进,向前深入(18.5±2.0) mm,直至大脑中动脉起始处,遇阻力时停止,结扎颈外动脉近心端,松开颈总动脉和颈内动脉处动脉夹,将线尾埋于皮下,缝合皮肤切口,2 h后经颈外动脉轻轻抽出栓线至分叉处形成再灌注。②缺血后处理组: 拔除线栓前的手术过程与模型组相同。术后2 h将线栓拔出

5 mm, 15 s后再将线栓置入初始位置15 s, 如此重复3次再灌注/缺血循环。③假手术组仅给予暴露颈总动脉及分叉处的处理, 与以上两组的24 h亚组同时处死。在动物清醒状态下, 按Menzies等^[16]的方法进行评分, 以出现右前肢不能伸展、爬行时向右侧转圈并存活至规定时间点作为建模成功的标准。术中均使用白炽灯维持大鼠肛温在(37.0±0.5) °C, 术后单笼饲养。

1.3 神经功能评分 按Zea-Longa^[15]等级评分法对实验动物神经功能进行评分: 0级, 无神经功能缺损症状; 1级, 不能完全伸展右侧前肢; 2级, 爬行时向右侧旋转; 3级, 向右侧倾倒; 4级, 不能自发行走, 意识丧失。

1.4 脑梗死体积的测定 利用2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色法^[16]操作, 在规定时间内各亚组随机选取4只大鼠, 快速断头取脑, 用大鼠脑模具自额极2 mm向后连续等距切取5个冠状脑片, 间距2 mm。TTC 37 °C避光染色10 min, 置于40 g/L多聚甲醛的PBS中固定保存。正常脑组织染为红色, 梗死组织为白色。逐层拍照后, 用Adobe PhotoShop CS6计算各层梗死面积, 梗死体积=各层梗死面积之和×层间隔。

1.5 石蜡切片的制备 各亚组其他6只大鼠按规定时间点取材, 制备石蜡切片。以10%水合氯醛腹腔注射麻醉, 仰卧固定, 依次用生理盐水、体积分数4%甲醛溶液各250 mL经心脏灌注固定后断头完整取脑, 取前囟后3-6 mm间冠状脑组织, 常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。自视交叉后方开始连续冠状位切片, 厚度5 μm, 置于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 4 °C保存, 以备免疫组织化学与原位杂交使用。

1.6 免疫组织化学检测大鼠额顶叶皮质区Toll样受体4、核因子κB、白细胞介素8蛋白的表达 利用免疫组织化学SABC(strept-avidin-biotin complex)法检测Toll样受体4、核因子κB和白细胞介素8蛋白的表达。石蜡切片常规脱蜡至水, PBS洗3次; 体积分数3% H₂O₂灭活内源性酶; 热修复抗原, 将切片浸入0.01 mol/L的枸橼酸盐缓冲液, 微波炉加热沸腾、冷却滴加封闭液, 室温20 min, 甩去多余液体; 滴加1:200工作浓度的一抗(兔抗Toll样受体4, 核因子κB p65, 白细胞介素8单克隆抗体), 4 °C过夜; 滴加生物素化二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG), 37 °C孵育30 min; 滴加试剂SABC, 37 °C孵育30 min; DAB显色, 混匀DAB显色液加至切片。室温显色, 镜下控制反应时间。蒸馏水洗涤中止反应; 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 封固。光学显微镜下观察胞浆或胞核有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 所有切片均在同一光强度、同一放大倍数下进行, 每张切片先在低倍镜下随机选择额顶叶梗死灶周围区视野, 然后在高倍镜下(400倍视野)选择缺血灶周围5个不连续的视野计数阳性细胞, 取其平均值为该张切片的阳性细胞数。

1.7 原位杂交检测大鼠额顶叶皮质区Toll样受体4、核因子κB、白细胞介素8 mRNA 严格按照试剂盒说明操作: 切

片常规脱蜡至水, 灭活内源性酶; 滴加体积分数3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶暴露mRNA核酸片段; 后固定10 min; 滴加预杂交液, 样品置于湿盒恒温箱40 °C孵育2 h; 滴加杂交液, 恒温箱40 °C杂交过夜; 杂交后洗涤、滴加封闭液, 37 °C孵育30 min; 滴加生物素化鼠抗地高辛, 37 °C孵育60 min; 滴加SABC, 37 °C孵育20 min; 滴加生物素过氧化酶, 37 °C孵育20 min; DAB显色30 min, 水洗、封固。光学显微镜下观察阳性细胞胞浆呈棕黄色, 所有切片均在同一光强度、同一放大倍数下进行, 每张切片先在低倍镜下随机选择额顶叶梗死灶周围区视野, 然后在高倍镜下(×400)选择缺血灶周围5个不连续的视野计数阳性细胞, 取其平均值为该张切片的阳性细胞数。

1.8 主要观察指标 各组大鼠神经行为学评分、梗死体积、额顶叶皮质区Toll样受体4、核因子κB和白细胞介素8蛋白和mRNA阳性细胞计数。

1.9 统计学分析 采用SPSS 19.0软件包进行统计学处理, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组对应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和 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入141只大鼠, 造模剔除31只, 死亡动物通过随机原则补齐数量并重新造模, 造模成功率78%。最终纳入110只大鼠进入结果分析。造模流程图见图1。

2.2 模型稳定性 神经行为学评分和梗死体积检测显示: 缺血再灌注后, 模型组和缺血后处理组都出现不同程度神经功能缺失, 缺血后处理组大鼠在各时间点的神经行为评分较模型组相应亚组显著降低($P < 0.05$); 组内比较, 模型组和缺血后处理组各亚组间评分差异无显著性意义($P > 0.05$; 表1)。

TTC染色显示, 假手术组未见梗死灶, 模型组和缺血后处理组可见白色梗死灶, 主要位于额、顶、颞叶皮质, 与模型组相应亚组比较, 缺血后处理组各亚组梗死体积明显减小($P < 0.05$; 图2); 组内比较, 模型组和缺血后处理组各亚组间梗死体积差异有显著性意义($P < 0.05$), 模型组和缺血后处理组24 h亚组的梗死体积明显大于其他亚组($P < 0.05$; 表1)。

2.3 局灶性脑缺血再灌注模型大鼠额顶叶皮质区Toll样受体4、核因子κB、白细胞介素8蛋白和mRNA的表达 假手术组大鼠额顶叶皮质区有少量Toll样受体4蛋白和mRNA阳性细胞。模型组和缺血后处理组阳性细胞在大鼠缺血侧额、顶叶梗死灶周围区表达显著增高, 再灌注6 h时表达已升高, 24 h达到高峰; 缺血后处理组各亚组Toll样受体4蛋白和mRNA阳性细胞数显著低于模型组相应亚组($P < 0.05$; 表2, 图3); 组内比较, 模型组各亚组间差异有显著性意义($P < 0.05$), 模型组中24 h亚组Toll样受体4蛋白和mRNA阳性细胞

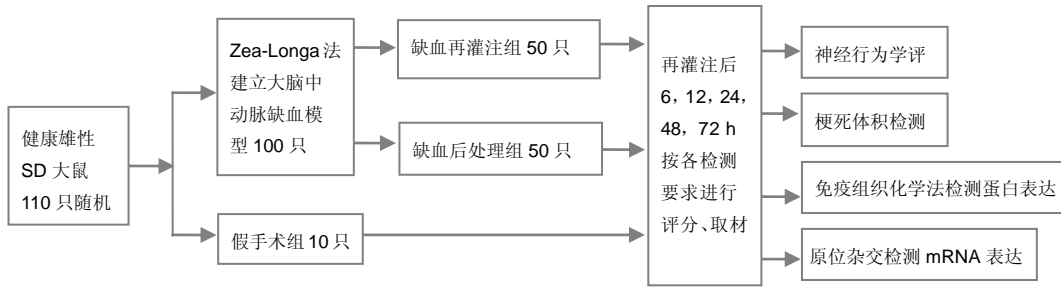


图 1 实验流程图
Figure 1 Experimental flowchart

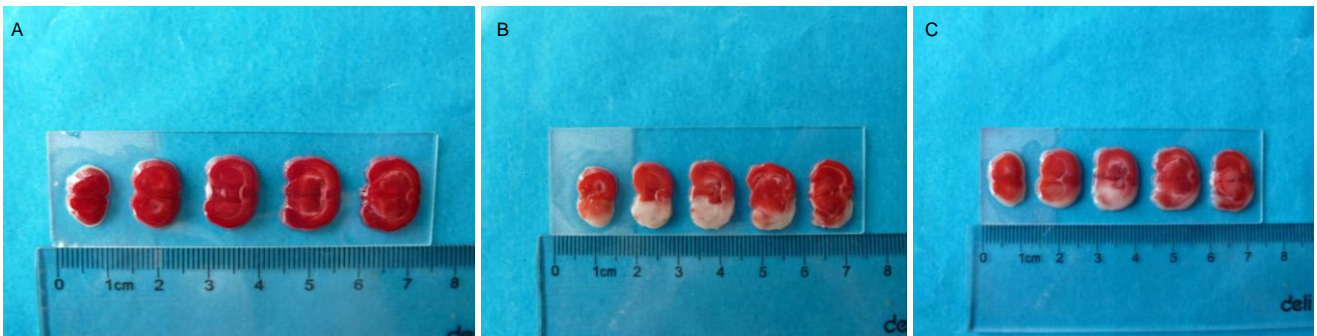


图 2 再灌注 24 h 大鼠脑组织 TTC 染色结果
Figure 2 TTC staining results in brain tissue of rats at 24 hours after reperfusion
图注: 图中 A 为假手术组, B 为模型组, C 为缺血后处理组。与模型组相比, 缺血后处理组各亚组梗死体积明显减小。

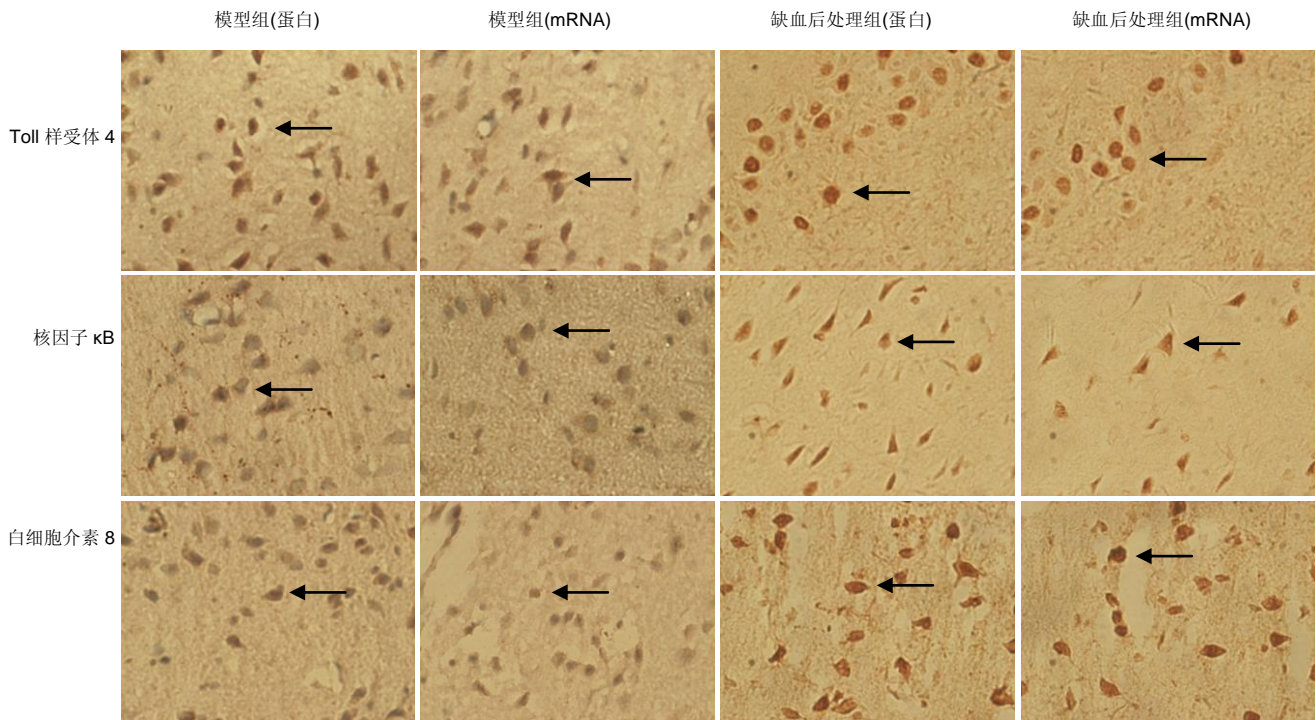


图 3 再灌注 24 h 各组大鼠额顶叶皮质区 Toll 样受体 4、核因子 κB、白细胞介素 8 蛋白(免疫组织化学染色)和 mRNA 的表达(原位杂交, ×400)
Figure 3 Toll-like receptor 4, nuclear factor κB, interleukin 8 protein (immunohistochemistry) and mRNA expression in the frontoparietal cortex of rats in each group at 24 hours after reperfusion (In situ hybridization, ×400)
图注: 模型组和缺血后处理组 Toll 样受体 4、核因子 κB、白细胞介素 8 蛋白和 mRNA 表达于再灌注 24 h 达峰值, 模型组上述因子表达均高于缺血后处理组。箭头处为阳性细胞。

表1 模型组和缺血后处理组大鼠神经功能评分和脑组织梗死体积

(x±s)

Table 1 Neurobehavioral deficit scores and infarct volume of rats in the model and ischemic postconditioning groups

指标	组别	再灌注时间 (h)				
		6	12	24	48	72
神经功能评分 (n=10, 分)	模型组	2.2±0.6	2.3±0.5	2.5±0.5	2.2±0.6	1.9±0.3
	缺血后处理组	1.4±0.7 ^a	1.5±0.7 ^a	1.8±0.4 ^a	1.5±0.5 ^a	1.1±0.3 ^a
脑梗死体积 (n=4, mm ³)	模型组	179.9±9.5	183.1±11.8	209.8±12.1 ^b	181.4±11.6	175.4±10.9
	缺血后处理组	156.5±10.2 ^a	159.2±10.0 ^a	187.9±8.8 ^{ab}	160.9±9.4 ^a	151.3±7.0 ^a

表注: 与模型组相比, ^aP < 0.05; 与同组内其他4个时间点组相比, ^bP < 0.05。

表2 模型组和缺血后处理组大鼠额顶叶皮质区 Toll 样受体 4(TRL4)、核因子 κB、白细胞介素 8 蛋白和 mRNA 阳性细胞计数变化

(x±s, n=6, 个/400 倍视野)

Table 2 Positive cell counts of Toll-like receptor 4, nuclear factor κB, interleukin 8 protein and mRNA in the rat frontoparietal cortex in the model and ischemic postconditioning groups

指标	组别	再灌注时间(h)				
		6	12	24	48	72
TRL4 蛋白	模型组	12.6±1.2	13.5±1.4	16.4±1.7 ^b	13.7±1.6	12.4±1.3
	缺血后处理组	8.3±1.4 ^a	8.7±1.2 ^a	10.6±1.5 ^a	9.2±1.7 ^a	8.4±1.3 ^a
TRL4 mRNA	模型组	12.3±1.4	13.9±1.5	16.7±1.8 ^b	13.4±1.2	12.6±1.3
	缺血后处理组	10.1±1.2 ^a	11.2±1.4 ^a	13.7±1.5 ^a	11.5±1.2 ^a	9.8±1.3 ^a
核因子 κB 蛋白	模型组	9.9±1.6	10.8±1.2	14.4±1.6 ^b	10.6±1.8	9.6±1.4
	缺血后处理组	7.8±1.4 ^a	8.2±1.8 ^a	9.1±1.1 ^a	8.5±1.4 ^a	7.7±1.3 ^a
核因子 κB mRNA	模型组	13.6±1.2	14.4±1.4	17.8±1.6 ^b	13.7±1.4	12.7±1.3
	缺血后处理组	10.6±1.3 ^a	12.2±1.4 ^a	14.7±1.5 ^{ab}	11.5±1.2 ^a	10.7±1.1 ^a
白细胞介素 8 蛋白	模型组	16.2±1.4	17.2±1.2	20.7±1.6 ^b	16.9±1.8	15.9±1.4
	缺血后处理组	13.1±1.6 ^a	13.5±1.6 ^a	14.0±1.3 ^a	13.8±1.5 ^a	13.0±1.2 ^a
白细胞介素 8 mRNA	模型组	18.8±1.4	19.6±1.2	23.0±1.4 ^b	13.7±1.4	12.7±1.3
	缺血后处理组	15.1±1.4 ^a	16.4±1.3 ^a	18.9±1.2 ^{ab}	15.7±1.5 ^a	14.9±1.2 ^a

表注: 与模型组相比, ^aP < 0.05; 与同组内其他4个时间点组相比, ^bP < 0.05。

显著高于其他时间点亚组($P < 0.05$)。缺血后处理组Toll样受体4蛋白阳性细胞数在各亚组间的差异无显著性意义($P > 0.05$), 但mRNA阳性细胞数在各亚组间的差异有显著性意义($P < 0.05$), 缺血后处理组中24 h亚组Toll样受体4 mRNA阳性细胞数较其他亚组显著升高($P < 0.05$), 见表2。

假手术组大鼠额顶叶皮质区核因子κB蛋白和mRNA阳性细胞呈低水平。再灌注6 h, 后模型组和缺血后处理组阳性细胞数已升高, 24 h达高峰, 集中分布在大鼠脑额顶叶梗死灶周边区。缺血后处理各亚组核因子κB蛋白和mRNA阳性细胞数较模型组相应亚组显著降低($P < 0.05$; 表2, 图3); 组内比较, 模型组各亚组间差异有显著性意义($P < 0.05$), 模型组中24 h亚组核因子κB蛋白和mRNA阳性细胞显著高于其他亚组($P < 0.05$)。缺血后处理组中核因子κB蛋白阳性细胞数在各亚组间的差异无显著性意义($P > 0.05$), 但其mRNA阳性细胞数在各亚组间的差异有显著性意义($P < 0.05$), 缺血后处理组中24 h亚组核因子κB mRNA阳性细胞数较其他亚组显著升高($P < 0.05$; 表2)。

假手术组大鼠额顶叶皮质区白细胞介素8蛋白和mRNA阳性细胞呈散在分布。模型组和缺血后处理组阳性细胞在梗死灶周围区表达显著增高, 再灌注6 h表达已升

高, 24 h达到高峰; 缺血后处理组各亚组白细胞介素8蛋白和mRNA阳性细胞数显著低于模型组相应亚组($P < 0.05$; 表2, 图3); 组内比较, 模型组各亚组间差异有显著性意义($P < 0.05$), 模型组中24 h亚组白细胞介素8蛋白和mRNA阳性细胞显著高于其他亚组($P < 0.05$)。缺血后处理组白细胞介素8蛋白阳性细胞数在各亚组间的差异无显著性意义($P > 0.05$), 但mRNA阳性细胞数在各亚组间的差异有显著性意义($P < 0.05$), 缺血后处理组中24 h亚组白细胞介素8 mRNA阳性细胞数较其他亚组显著升高($P < 0.05$; 表2)。

3 讨论 Discussion

作为一种后处理措施, 缺血后处理可抑制缺血再灌注后的炎症反应, 减少组织细胞坏死及凋亡, 能够激发内源性保护作用^[3, 6, 22], 其主要作用机制为: 改善脑血流量和能量代谢, 维持血脑屏障的完整性; 抑制脂质过氧化, 减少氧自由基的生成; 抑制Caspase-3活性以及抑制细胞色素C从线粒体易位; 抑制炎症递质生成等^[18-21]。Zhao等^[2]于2006年的研究中分别对3组大鼠的双侧颈总动脉夹闭15, 30, 60 min, 夹闭后均开放30 s, 然后予以缺血后处理, 即双侧颈总动脉夹闭10 s/开放30 s, 循环3次。结

果发现, 脑梗死体积分别减少80%, 51%和17%, 证实缺血后处理能诱导机体自身的神经保护功能。2007年有研究采用大鼠局灶性脑缺血模型, 发现缺血后处理发挥神经保护作用的最佳时间为再灌注15 s/缺血15 s, 循环3次^[22]。文章参阅国内外文献, 经过反复预实验, 通过对大鼠进行神经行为学评分, 测量脑梗死体积明确脑对缺血耐受的改变, 证实3个循环的再灌注15 s/缺血15 s 缺血后处理措施能够起到最佳的神经保护作用。

Toll样受体4是一种跨膜信号传递受体蛋白, 其在胞内与接头蛋白髓样分化因子结合(MyD88), 通过MyD88依赖途径, 转位到细胞核, 进而启动促炎细胞因子转录^[23]。该信号传导通路可归纳为: Toll样受体4→MyD88→白细胞介素1受体相关激酶(IRAK)→肿瘤坏死因子受体相关因子6(TrAF6)→ κ IB→核因子 κ B活化^[24]; 经上述信号传导通路激活核因子 κ B后, 白细胞介素1、白细胞介素6、白细胞介素8、部分黏附分子及肿瘤坏死因子等炎性细胞因子的大量释放, 参与炎症反应以及细胞凋亡^[4, 25]。动物实验证实, Toll样受体4缺陷大鼠缺血再灌注后的脑梗死体积和神经功能缺损评分明显低于Toll样受体4功能正常大鼠^[26-27]。冯蕊等^[28]通过建立血栓性脑缺血模型, 在缺血4 h时夹闭缺血侧颈总动脉5 min, 再通5 min, 重复3个循环, 发现缺血后处理可减轻脑缺血造成的神经元损伤, 与对照组相比, 缺血后处理组4 h及24 h时Toll样受体4蛋白表达明显减少。文章发现模型组梗死灶周围区域Toll样受体4、核因子 κ B蛋白6 h表达明显升高, 24 h达高峰后开始下降。Toll样受体4、核因子 κ B mRNA的表达趋势与蛋白的表达基本一致, 与以往报道结论相符^[10], 证实Toll样受体4-核因子 κ B信号转导通路在脑缺血再灌注损伤中具有关键作用。

炎症级联反应是脑缺血再灌注损伤机制中的重要环节。研究表明, 许多生物活性物质例如白细胞介素 1β 、白细胞介素6、黏附分子和肿瘤坏死因子 α 等在缺血再灌注后表达增强或活性上调^[29-30], 导致血脑屏障破坏, 影响脑内微环境的相对稳定^[31-32]。白细胞介素8又称嗜中性粒细胞因子, 是一种趋化炎性细胞因子, 可以促进炎性细胞趋化和诱导细胞增殖。白细胞介素8主要由巨噬细胞和上皮细胞分泌, 其主要生物学作用是趋化并激活中性粒细胞, 增强中性粒细胞溶酶体酶活性和吞噬作用^[33]。中性粒细胞与白细胞介素8接触后发生形态学变化, 定向游走到反应部位并释放一系列活性产物, 这一过程可导致机体产生局部炎症反应, 达到杀菌和损伤细胞的目的^[34-36]。白细胞介素8在缺血再灌注损伤过程中趋化中性粒细胞, 介导、加重局部炎症反应^[35]。实验观察了缺血后处理后Toll样受体4-核因子 κ B信号转导通路以及下游炎性因子白细胞介素8表达的动态变化并与模型组以及假手术组进行比较。结果表明缺血再灌注可激活Toll样受体4-核因子 κ B信号转导通路, 上调脑组织白细胞介素8的表达, 启动和强化局部炎症反应, 加重脑损伤。

研究分析显示, 缺血后处理组与模型组相比大鼠Toll

样受体4、核因子 κ B、白细胞介素8阳性细胞数显著减少, 脑梗死体积缩小, 神经行为学评分得到改善, 提示缺血后处理可在脑缺血后抑制Toll样受体4-核因子 κ B信号转导通路, 减少白细胞介素8等炎性细胞因子的释放, 启动内源性保护机制, 介导神经保护作用, 提高机体对脑缺血耐受。文章仅观察了Toll样受体4-核因子 κ B信号转导通路以及白细胞介素8表达的动态变化, 在今后的研究中可进一步检测该信号转导通路上游及下游细胞因子的变化趋势以及明确通路中其他途径的作用, 更详尽地阐述缺血后处理抑制炎症反应的相关机制。

综上所述, Toll样受体4-核因子 κ B信号转导通路及下游炎性因子白细胞介素8在缺血再灌注损伤中起到重要作用。缺血后处理可能通过抑制该转导通路激发内源性保护作用, 减少白细胞介素8等相关炎性因子的表达, 从而起到神经保护作用。由于缺血后处理实施于脑缺血后, 可控性强, 具有重要的临床应用价值, 深入开展缺血后处理的实验性研究将为缺血性卒中的治疗提供新途径。

致谢: 衷心感谢青岛大学医学院郭云良、沈若武老师对实验的指导与帮助, 同时也十分感谢青岛大学医学院脑研所对本次实验的大力支持。

作者贡献: 实验设计者为赵仁亮和李志行。实验实施者为李志行、吕敬雷和陈萍。李志行成文。赵仁亮教授审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

学术术语: 缺血后处理的作用? 即组织或器官在长时间缺血后再灌注开始时, 经历短暂、重复的缺血再灌注过程, 可诱导器官自身的保护作用。

作者声明: 文章第一作者及通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(2):H579-H588.
- [2] Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(9):1114-1121.

- [3] 王岭, 孙丽, 高焕民, 等. 胡黄连苷II对大鼠脑缺血再灌注损伤后炎症反应影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2011, 47(1): 62-64.
- [4] Hamanaka J, Hara H. Involvement of Toll-like receptors in ischemia-induced neuronal damage. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2011;11(2):107-113.
- [5] Li XQ, Wang J, Fang B, et al. Intrathecal antagonism of microglial TLR4 reduces inflammatory damage to blood-spinal cord barrier following ischemia/reperfusion injury in rats. *Mol Brain.* 2014;7:28.
- [6] Pradillo JM, Fernández-López D, García-Yébenes I, et al. Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning. *Neurochem.* 2009;109(1):287-294.
- [7] Liang J, Luan Y, Lu B, et al. Protection of ischemic postconditioning against neuronal apoptosis induced by transient focal ischemia is associated with attenuation of NF- κ B/p65 activation. *PLoS One.* 2014;9(5):e96734.
- [8] Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 2007;184(1-2):53-68.
- [9] Feng R, Li S, Li F. Toll-like receptor 4 is involved in ischemic tolerance of postconditioning in hippocampus of tree shrews to thrombotic cerebral ischemia. *Brain Res.* 2011;1384: 118-127.
- [10] Gao Y, Fang X, Sun H. Toll-like receptor 4-mediated myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway is activated by cerebral ischemia-reperfusion in hippocampal CA1 region in mice. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(10):1665-1671.
- [11] Bhattacharyya S, Gill R, Chen ML, et al. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NF κ B-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2008;283(16):10550-10558.
- [12] Kostulas N, Kivisäkk P, Huang Y, et al. Ischemic stroke is associated with a systemic increase of blood mononuclear cells expressing interleukin-8 mRNA. *Stroke.* 1998;29(2): 462-466.
- [13] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006.
- [14] 吕敬雷, 王国峰, 王鹏, 等. 缺血后处理下调脑缺血再灌注大鼠白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 表达[J]. 国际脑血管病杂志, 2012, 20(2):135-141.
- [15] Loggia EZ, Weinstein PR, Carson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20(1):84-91.
- [16] Menzies SA, Hoff JT, Betz A. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery.* 1992;31(1):100-106.
- [17] 谢惠芳, 徐如祥, 陈中灿. 线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的改进[J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(4):340-342.
- [18] Wang JY, Shen J, Gao Q, et al. Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke.* 2008;39(3):983-990.
- [19] Ren HC, Gao XW, Niu G, et al. Delayed Postconditioning Protects against Focal Ischemic Brain Injury in Rats. *PLoS One.* 2008;3(12):e3851.
- [20] Wang JK, Wu HF, Zhou H, et al. Postconditioning with sevoflurane protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury involving mitochondrial ATP-dependent potassium channel and mitochondrial permeability transition pore. *Neurol Res.* 2015;37(1):77-83.
- [21] Yang F, Zhang X, Sun Y, et al. Ischemic postconditioning decreases cerebral edema and brain blood barrier disruption caused by relief of carotid stenosis in a rat model of cerebral hypoperfusion. *PLoS One.* 2013;8(2):e57869.
- [22] 孙静, 董海龙, 栾琪, 等. 缺血后处理减轻大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤最佳方案[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(24):2214-2216.
- [23] He Y, Zhou AL, Jiang W. Toll-like receptor 4-mediated signaling participates in apoptosis of hippocampal neurons. *Neural Regen Res.* 2013;8 (29): 2744-2753
- [24] Li XQ, Wang J, Fang B, et al. Intrathecal antagonism of microglial TLR4 reduces inflammatory damage to blood-spinal cord barrier following ischemia/reperfusion injury in rats. *Mol Brain.* 2014;7:28.
- [25] Hu YE, Mao JH, Zhang Y, et al. Role of Toll-like receptor 4 in inflammatory reactions of hippocampal neurons. *Neural Regen Res.* 2013;8 (16): 1465-1472.
- [26] Cao CX, Yang QW, Lv FL. Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res.* 2007;353(2):509-514.
- [27] Hyakkoku K, Hamanaka J, Tsuruma K, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 2010;171(1):258-267.
- [28] 冯蕊, 李树清. 缺血后适应对脑缺血树鼯海马TLR4表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(6):1048-1052.
- [29] Wasserman JK, Yang H, Schlichter LC. Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs aged rats. *Eur J Neurosci.* 2008;28(7):1316-1328.
- [30] Zwagerman N, Plumlee C, Guthikonda M, et al. Toll-like receptor-4 and cytokine cascade in stroke after exercise. *Neurol Res.* 2010;32(2):123-126.
- [31] Ding Y, Clark JC. Cerebrovascular injury in stroke. *Neurol Res.* 2006;28(1):3-10.
- [32] Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007;97(5):738-747.
- [33] Owens T, Babcock AA, Millward JM, et al. Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Res Rev.* 2005;48(2):178-184.
- [34] Masumoto T, Yokoi K, Mukaida N, et al. Pivotal role of interleukin-8 in the acute respiratory distress syndrome and cerebral reperfusion injury. *J Leukoc Biol.* 1997;62(11): 581-587.
- [35] Zeng L, Wang Y, Liu J, et al. Pro-inflammatory cytokine network in peripheral inflammation response to cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2013;548:4-9.
- [36] Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, et al. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science.* 1991;254(5028):99-102.