

## 脑缺血大鼠肺组织中 IL-6 的表达变化\*

谭燕<sup>1</sup>, 蒋淑一<sup>1</sup>, 但齐琴<sup>2</sup>, 夏宜兰<sup>1</sup>, 李劲涛<sup>3</sup>, 张云辉<sup>1△</sup>

1. 昆明理工大学附属昆华医院·云南省第一人民医院 呼吸内科(昆明 650032);

2. 四川大学华西医院 转化神经科学中心(成都 610041); 3. 昆明医科大学 神经科学研究所(昆明 650031)

**【摘要】** 目的 探讨脑缺血肺组织白细胞介素-6(IL-6)的表达变化。方法 将成年 SD 大鼠随机分为假手术组和脑缺血肺损伤组,用线栓法建立大脑中动脉堵塞脑缺血肺损伤模型。脑缺血后 24 h 取肺组织用 RT-PCR,48 h 用 Western blot 技术检测肺组织 IL-6 的表达量。脑缺血后 72 h 用免疫组织化学技术检测 IL-6 蛋白定位分布。结果 肺组织 IL-6 基因和蛋白表达在脑缺血肺组织明显增加,与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。IL-6 阳性染色主要位于气道上皮细胞和巨噬样细胞。结论 脑缺血后肺组织 IL-6 表达明显上调,提示 IL-6 与脑缺血肺损伤有一定关系。

**【关键词】** 脑缺血肺损伤 白细胞介素-6 大鼠

**IL-6 Expression in Lung of Rats Subjected to Brain Ischemia** TAN Yan<sup>1</sup>, JIANG Shu-yi<sup>1</sup>, DAN Qi-qin<sup>2</sup>, XIA Yi-lan<sup>1</sup>, LI Jin-tao<sup>3</sup>, ZHANG Yun-hui<sup>1△</sup>. 1. Department of Respiration, Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Science and Technology University, Kunming 650032, China; 2. Translational Neuroscience Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming 650031, China

△ Corresponding author, E-mail: yunhuizhang3188@126.com

**【Abstract】** Objective To study the expression changes of interleukin-6 (IL-6) in the lung of rats with brain ischemia. Methods Adult SD rats were divided into sham operation group and brain ischemia lung injury (BILI) group randomly. Focal cerebral ischemia inflammatory lung injury model was developed with intraluminal thread technique. RT-PCR was applied to detect the IL-6 expression level of lung at 24 h after brain ischemia. The IL-6 protein in lung at 48 h after brain ischemia was detected with Western blot. Immunohistochemistry method was used to demonstrate the IL-6 protein location in lung at 72 h after brain ischemia. Results Increased immunostaining, protein level and mRNA expression for IL-6 were found in lung at investigated time point after brain ischemia. Conclusion IL-6, as a crucial preinflammatory factor, could be related to airway inflammation in rats induced by brain ischemia.

**【Key words】** Brain ischemia lung injury IL-6 Rat

脑缺血 (brain ischemia, BI) 是严重威胁人类健康的脑部疾病,占脑血管病的 80%~85%,致死、致残率高<sup>[1]</sup>。开展其分子机制研究,寻找有效的肺损伤防治策略有重要的科学意义和临床应用价值。已知白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)是由单核巨噬细胞及 Th2 淋巴细胞产生<sup>[2]</sup>,在炎症反应中发挥重要作用。最近的资料还显示,IL-6 在肺挫伤患者血清高表达<sup>[3]</sup>,提示 IL-6 在肺挫伤后继发性肺损伤中发挥作用。有人认为,IL-6 可作为观察肺损伤治疗效果的参考指标<sup>[4,5]</sup>。尽管脑缺血引起肺损伤<sup>[5]</sup>已有报道,但 IL-6 是否与脑缺血肺损伤有关并不清

楚。本实验建立脑缺血肺损伤模型,用免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 研究脑缺血后肺组织 IL-6 蛋白、基因表达变化,为探讨 IL-6 与脑缺血肺损伤的关系提供实验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物与分组

成年 SD 大鼠 42 只,购自昆明医科大学实验动物中心,体质量(200±20)g。实验动物随机分为假手术组和脑缺血肺损伤组;每组 21 只动物,其中 5 只动物用于肺组织免疫组化染色检测 IL-6 的定位表达,8 只用于 RT-PCR 检测 IL-6 mRNA 表达,8 只用于 Western blot 检测 IL-6 蛋白表达。

#### 1.2 脑缺血肺损伤模型制备

大鼠用 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻

\* 云南省自然科学基金(No. 2010ZC206, No. 2011FZ272)资助

△ 通讯作者, E-mail: yunhuizhang3188@126.com

醉,仰卧位固定于手术台,无菌条件下进行颈部正中切口,暴露左侧颈总动脉及其颈内外动脉分支,用线栓法建立大鼠中动脉堵塞缺血肺损伤模型。最后止血,缝合肌层和皮肤。假手术组除不栓塞大鼠中动脉外,其余与脑缺血肺损伤组相同。

### 1.3 肺组织样本获取

术后 24 h、48 h 两组大鼠分别各取 8 只,用 3.6% 水合氯醛腹腔注射麻醉后,颈动脉放血,然后立即开胸取肺, -80 °C 冻存储备,分别用于 RT-PCR 和 Western blot 检测。术后 72 h,两组大鼠各 5 只用 40 g/L 多聚甲醛溶液心内灌注固定,取肺组织,放入 40 g/L 多聚甲醛中固定 4 h,入 15%、30% 蔗糖 PBS 梯度脱水过夜使组织块下沉。 -20 °C 恒温冷切片 (20  $\mu$ m),用于免疫组织化学染色。

### 1.4 RT-PCR<sup>[6]</sup>检测肺组织 IL-6 mRNA 的表达

用 Trizol 法分别提取假手术组和脑缺血组肺组织总 RNA,逆转录为 cDNA。采用 Primer premier 5.0 软件进行引物设计,由大连宝生物公司合成上、下游引物。以  $\beta$ -actin 为内对照( $\beta$ -actin 上游引物: 5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3', 下游引物: 5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3', 扩增片段长度: 227 bp), IL-6 mRNA 上游引物: 5'-TTCACAGAGGATACCACC-3', 下游引物: 5'-CAGAAGACCAGAGCAGAT-3', 扩增片段长度 252 bp。按以下反应条件进行 PCR 扩增: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 52 °C (IL-6) 和 52.5 °C ( $\beta$ -actin) 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次, 72 °C 总延伸 10 min。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增产物。凝胶成像系统 (BIO-RAD) 成像拍照。以目标条带与  $\beta$ -actin 产物光密度比值为相对表达量进行统计分析。

### 1.5 Western blot<sup>[7]</sup>检测肺组织 IL-6 蛋白的表达

取肺组织 250 mg 加 1 mL RIPA 裂解液 (碧云天, p0013c), 每 50 mL 裂解液中加入鸡尾酒片 (Roche, 04693116001) 1 片。匀浆, 超声破碎。12000 r/min, 15 min 低温离心, 取上清液, BCA 法 (碧云天, P009-2) 测定蛋白样品浓度, 计算每孔上样体积。加 5  $\times$  SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (Fermentas) 煮沸变性 10 min。100 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳 (北京六一, DYY-6C 型) 75 V, 2 h 分离蛋白。350 mA, 4 h 转至 PVDF 膜 (millipore)。TBST 配制 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。TBS 稀释 IL-6 一抗 (鼠源, 天津三箭), 1 : 500, 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 10 min, 3 次。TBS 稀释二抗 (羊抗鼠

IgG, 北京中杉金桥), 1 : 200, 室温孵育 2 h。TBST 洗膜 10 min, 3 次。使用化学发光显色液 (南京凯基, KGP1122) 于凝胶成像系统 (BIO-RAD, ET9970616AA) 显色。以  $\beta$ -actin 为内对照, 成像后获取图片, 测定光密度值, 用目标条带与  $\beta$ -actin 光密度比值反映蛋白相对表达量, 进行组间比较。

### 1.6 免疫组织化学染色<sup>[8,9]</sup>检测 IL-6 阳性细胞的分布

用 PBS 漂洗切片 3 次 (每次 5 min), 然后用 3% 过氧化氢孵育 30 min, 随后入含 5% 羊血清和 0.3% Triton X-100 中 37 °C, 30 min。转入含 2% 正常羊血清和 0.3% Triton X-100 的 I 抗 (兔多克隆 IL-6 抗血清 1 : 200) 4 °C 过夜。PBS 漂洗 5 min  $\times$  3 次, 用 SP 试剂盒的试剂 I 和 II 于 37 °C 下与切片反应 30 min。PBS 漂洗 5 min  $\times$  3 次。加入 3,3-二氨基联苯胺 (含 0.5 g/L) 显示, 用 0.01% 过氧化氢催化反应 10 min。显微镜下观察 (IL-6 阳性表达呈棕色反应), 梯度酒精脱水、透明、封片。拍照, 描述阳性细胞定位与分布。

### 1.7 统计学方法

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用配对 *t* 检验进行组间比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脑缺血肺组织 IL-6 mRNA 的表达变化

RT-PCR 结果显示 (图 1), 假手术组能检测到 IL-6 mRNA 表达。在 252 bp 处可见阳性条带, 与

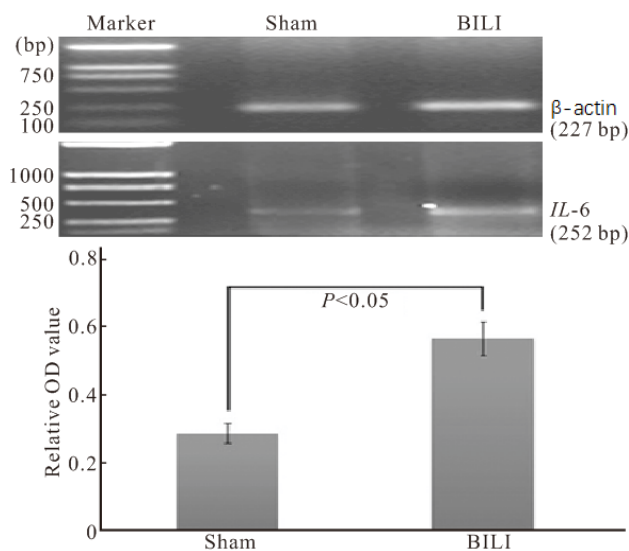


图 1 IL-6 基因在脑缺血 24 h 后大鼠肺组织高表达

Fig 1 IL-6 mRNA expression in lung of rats at 24 h after brain ischemia

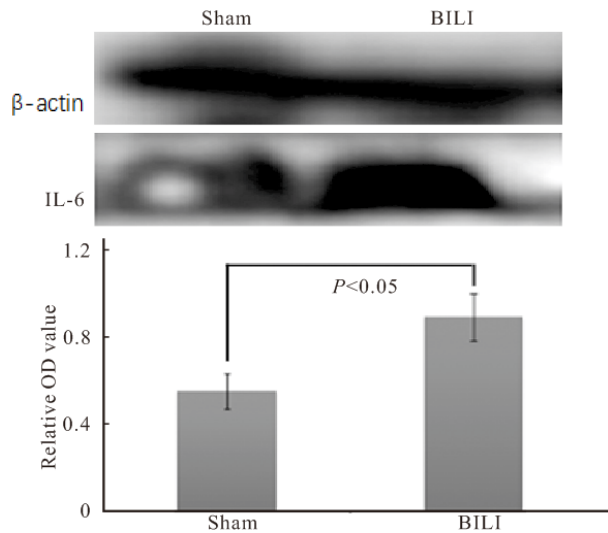


图2 IL-6在脑缺血肺组织表达变化

Fig 2 IL-6 expression in lung of rats at 48 h after brain ischemia

预期PCR产物长度相符。在脑缺血后,肺组织IL-6 mRNA表达水平明显升高,与假手术组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

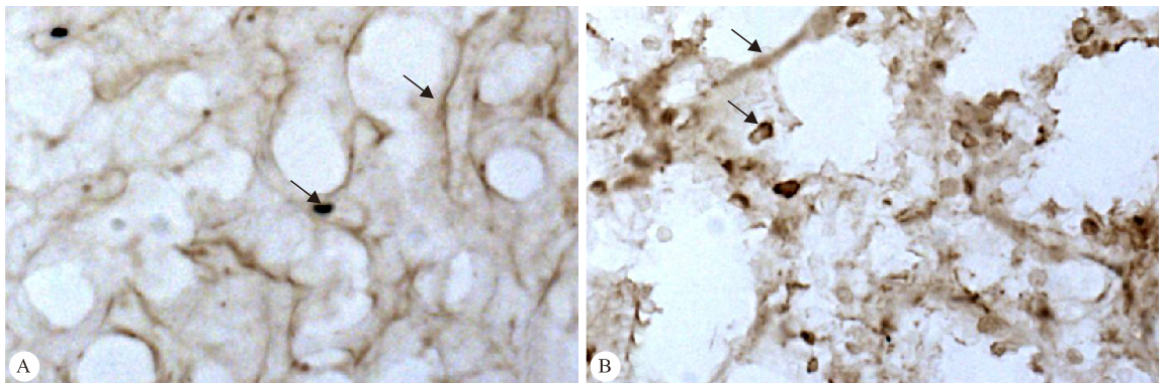


图3 IL-6在脑缺血肺损伤组织分布。SP ×200

Fig 3 IL-6 expression in lung of rats at 72 h after brain ischemia. SP ×200

A: Sham group; B: BILI group

视<sup>[5]</sup>。但目前,缺氧缺血性脑损伤引起的急性肺损伤的发病机制仍研究较少。IL-6是多效性的细胞因子,参与炎症在内的许多中枢神经系统和外周疾病,直接涉及损伤和修复过程。IL-6在脑缺血发挥着双重作用,在急性期作为炎症介质和在亚急性期及以后的阶段则起神经营养介质作用<sup>[10]</sup>。文献报道,脑损伤大鼠血清中S100蛋白和IL-6水平升高,而采用重组人促红细胞生成素(EPO)治疗后,大鼠血清中S100蛋白和IL-6水平显著降低<sup>[11]</sup>。提示IL-6在大脑损伤后发挥了作用,EPO抑制S100和IL-6合成,减少分泌可能是降低炎症反应的一个机制。在肺组织,药理阻断和基因敲除IL-6致小鼠肺部炎症减弱,而用腺苷增强IL-6信号转导可促进慢

## 2.2 脑缺血肺组织IL-6蛋白表达变化

Western blot结果显示(图2),IL-6蛋白在假手术组肺组织有表达。与假手术组比较,脑缺血肺组织IL-6蛋白表达水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 2.3 IL-6蛋白在肺组织中的分布和变化

免疫组化染色结果显示(图3),正常大鼠肺组织IL-6表达水平较低,肺气道上皮细胞呈IL-6弱阳性反应。脑缺血后肺组织气道上皮IL-6表达水平明显增加,同时一些巨噬样细胞呈阳性染色。

## 3 讨论

本实验建立了脑缺血肺损伤模型,用RT-PCR和蛋白免疫印迹技术检测肺组织IL-6的定位与表达量。结果发现IL-6在气道上皮细胞和巨噬样细胞表达,脑缺血肺组织内IL-6表达明显增加,提示IL-6可能在脑缺血肺损伤中发挥重要作用。

脑缺血肺损伤已引起临床和实验室高度重

性肺疾病发生<sup>[12]</sup>。说明IL-6在肺炎中起促进作用。通过检测肺灌洗蛋白浓度和细胞计数、肺湿/干质量比、肺的细胞死亡、组织学炎症评分(LIS)和髓过氧化物酶(MPO)浓度来评估IL-6在肺损伤中的作用,发现干扰IL-6表达或信号有利于抑制上述炎症反应。即IL-6干扰策略可能是未来治疗肺炎的手段之一。研究证实,IL-6与肺部炎症形成和血管通透性增加即肺水肿形成有关<sup>[12,13]</sup>。本实验发现IL-6在脑缺血肺损伤组织高表达,说明IL-6在脑缺血肺损伤机制中发挥了重要作用,从而为通过干预IL-6信号来实现脑缺血肺损伤的防治提供了参考依据。

(下转第917页)

- 肺表面活性物质含量的影响. 华中科技大学学报(医学版), 2001;30(6):550-552.
- 5 杨红, 斯琴, 孙仁宇. 肺血管内皮细胞在大鼠急性肺损伤发生中的作用. 中国病理生理杂志, 2000;16(9):831-834.
  - 6 曾靖, 黎晓, 黄志华. 脑缺血再灌注损伤与炎症反应关系的研究进展. 时珍国医国药, 2011;2(3):698-700.
  - 7 但齐琴, 戴萍, 王盛兰等. 脑缺血肺损伤大鼠肺组织中脑源性神经营养因子的表达变化. 四川大学学报(医学版), 2012;43(6):897-900.
  - 8 陈光福, 汤先堂. 老年人急性脑血管病并发肺炎临床分析. 中华老年医学杂志, 1989;18(8):43-44.
  - 9 Xiyang YB, Liu S, Liu J, *et al.* Roles of platelet-derived growth factor-B expression in the ventral horn and motor cortex in the spinal cord-hemisected rhesus monkey. *J Neurotrauma*, 2009;26(2):275-287.
  - 10 韩宁, 张永. 参麦注射液对急性脑缺血并发肺损伤大鼠血清 TNF-A 及 IL-8 的影响. 中华中医药学刊, 2009;27(4):756-758.
  - 11 Schulte-Herbrüggen O, Quarcoo D, Brzoska T, *et al.* Alpha-MSH promotes spontaneous post-ischemic pneumonia in mice via melanocortin-receptor-1. *Exp Neurol*, 2008;210(2):731-739.
  - 12 Ormstad H, Aass HC, Lund-Sørensen N, *et al.* Serum levels of cytokines and C-reactive protein in acute ischemic stroke patients, and their relationship to stroke lateralization, type, and infarct volume. *J Neurol*, 2011;258(4):677-685.
  - 13 Maddahi A, Kruse LS, Chen QW, *et al.* The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  receptors in cerebral arteries following cerebral ischemia in rat. *J Neuroinflammation*, 2011;8:107.
  - 14 Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, *et al.* TNF- $\alpha$  pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997;17(5):483-490.
  - 15 Yang Y, Jalal FY, Thompson JF, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 mediates the death of immature oligodendrocytes via TNF- $\alpha$ /TACE in focal cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation*, 2011;8:108.

(2012-07-16 收稿, 2012-09-20 修回)

编辑 余琳

(上接第 909 页)

### 参 考 文 献

- 1 周盛年, 孙弦, 韩永涛等. 神经干细胞与脑缺血治疗的相关研究. 中国卒中杂志, 2008;3(5):381-384.
- 2 Neveu WA, Allard JB, Dienz O, *et al.* IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens. *J Immunol*, 2009;183(3):1732-1738.
- 3 陈勇兵, 陈如坤. 肺挫伤患者炎性细胞因子白细胞介素 6、白细胞介素 8 的变化及临床意义. 江苏医药, 2002;28(9):685-686.
- 4 张青, 徐剑钺. 内毒素致伤大鼠肺组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的 mRNA 表达及 NF-IL6 活化研究. 中国危重病急救医学, 2001;9:523-526.
- 5 但齐琴, 戴萍, 王盛兰等. 脑缺血肺损伤大鼠肺组织中脑源性神经营养因子的表达变化. 四川大学学报(医学版), 2012;43(6):897-900.
- 6 Xiyang YB, Liu S, Liu J, *et al.* Roles of platelet-derived growth factor-B expression in the ventral horn and motor cortex in the spinal cord-hemisected rhesus monkey. *J Neurotrauma*, 2009;26(2):275-287.
- 7 Yang HJ, Yang XY, Ba YC, *et al.* Role of neurotrophin 3 in spinal neuroplasticity in rats subjected to cord transection. *Growth Factors*, 2009;27(4):237-246.
- 8 Qin DX, Zou XL, Luo W, *et al.* Expression of some neurotrophins in the spinal motoneurons after cord hemisection in adult rats. *Neurosci Lett*, 2006;410(3):222-227.
- 9 Li XL, Zhang W, Zhou X, *et al.* Temporal changes in the expression of some neurotrophins in spinal cord transected adult rats. *Neuropeptides*, 2007;41(3):135-143.
- 10 Suzuki S, Tanaka K, Suzuki T. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009;29(3):464-479.
- 11 Bian XX, Yuan XS, Qi CP. Effect of recombinant human erythropoietin on serum S100B protein and interleukin-6 levels after traumatic brain injury in the rat. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2010;50(5):361-366.
- 12 Pedroza M, Schneider DJ, Karmouty-Quintana H, *et al.* Interleukin-6 contributes to inflammation and remodeling in a model of adenosine mediated lung injury. *PLoS One*, 2011;6(7):e22667.
- 13 Gurkan OU, He C, Zielinski R, *et al.* Interleukin-6 mediates pulmonary vascular permeability in a two-hit model of ventilator-associated lung injury. *Exp Lung Res*, 2011;37(10):575-584.

(2012-07-13 收稿, 2012-09-12 修回)

编辑 沈进