

脑缺血大鼠肺组织中 IL-1 β 的表达变化*

岳倩宇¹, 但齐琴², 荣 荣³, 陈 隽¹, 李劲涛⁴, 张云辉¹ Δ

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. 安徽省立医院 老年医学科(合肥 230001);

4. 昆明医科大学 神经科学研究所(昆明 650031)

【摘要】 目的 了解脑缺血肺损伤后肺组织中白细胞介素-1 β (IL-1 β)表达的变化,探讨其功能意义。方法 成年 SD 大鼠随机分为假手术组和脑缺血肺损伤组,采用线栓法建立大脑中动脉脑缺血肺损伤模型。于术后 24 h 用 RT-PCR($n=8$),48 h 用蛋白免疫印迹技术($n=8$)检测肺组织 IL-1 β 表达变化;术后 72 h 用免疫组织化学技术检测肺组织内 IL-1 β 的定位分布($n=5$)。结果 肺组织 IL-1 β 基因和蛋白表达在脑缺血后 24 h 及 48 h 明显增加,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。IL-1 β 主要分布在气道上皮细胞、巨噬细胞及中性粒细胞。结论 脑缺血肺损伤组织 IL-1 β 表达明显上调,提示 IL-1 β 可能在脑缺血肺损伤炎症反应中发挥作用。

【关键词】 脑缺血肺损伤 白细胞介素-1 β 大鼠

Expression Changes of IL-1 β in Lung of Rats Subjected to Brain Ischemia YUE Qian-yu¹, DAN Qi-qin², RONG Rong³, CHEN Jun¹, LI Jin-tao⁴, ZHANG Yun-hui¹ Δ . 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. Cadre's Ward, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China; 4. Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming 650031, China

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

【Abstract】 **Objective** To study the expression changes of interleukin-1 β (IL-1 β) 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. Lungs were harvested from rats at different time point respectively. RT-PCR (24 h), Western blot (48 h) and immunohistochemistry (72 h) were employed to detect the expressional changes and the distributions of IL-1 β in the lung tissues. **Results** IL-1 β immunohistochemical positive reaction was observed in epithelia cell and neutrophil as well as macrophage. Increased protein level and mRNA expression for IL-1 β were found in lung after brain ischemia compared with those of sham group. **Conclusion** IL-1 β , as a crucial inflammatory factor, could be associated with airway inflammation in lung following brain ischemia in rats.

【Key words】 Brain ischemia lung injury IL-1 β Rat

脑缺血已经成为严重威胁人类健康的三大疾病(脑血管病,心脏病,肿瘤)之首,严重影响生命质量^[1,2]。更为严重的是,脑缺血还引起全身其它系统损伤,其中肺是较易受损的器官^[2]。开展脑缺血肺损伤机制研究,对脑缺血肺损伤的防控有重要的科学意义和临床应用价值。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)是炎症反应过程中由巨噬细胞产生的主要致炎因子。其它产生 IL-1 β 的细胞还包括中性粒细胞、B 细胞、NK 细胞、成纤维细胞、内皮细胞等^[3]。已知 IL-1 β 可促进气道黏液高分

泌,与慢性阻塞性肺疾病发生、发展有关^[4,5]。但其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 RT-PCR、Western blot 和免疫组化研究肺组织 IL-1 β 基因、蛋白水平变化,了解 IL-1 β 在肺组织的细胞定位分布,为研究 IL-1 β 与脑缺血肺损伤的关系及其神经源性肺损伤防控提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

成年 SD 大鼠购买于昆明医科大学实验动物中心,体质量(200 \pm 20) g。随机分为假手术组和脑缺血肺损伤(BILI)组。每组 8 只用于肺组织 RT-PCR

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

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

检测 IL-1 β mRNA 的表达, 8 只用于 Western blot 检测 IL-1 β 蛋白的表达, 5 只用于免疫组化染色检测 IL-1 β 在肺组织表达的分布。

1.2 脑缺血肺损伤模型制备

用 1% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 仰卧固定于手术台, 无菌条件下进行颈部正中切口, 小心分离肌肉暴露左侧颈总动脉及其颈内、外动脉分支, 用线栓法建立大脑中动脉堵塞脑缺血模型。假手术组同前暴露颈内动脉, 但不用线栓塞, 其他均同脑缺血肺损伤组。

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 冻存备用, 分别用于 RT-PCR 和 Western blot 检测。术后 72 h, 两组大鼠各 5 只用 3.6% 水合氯醛由腹腔注射麻醉后, 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 μ m)。

1.4 RT-PCR^[6] 检测肺组织 IL-1 β mRNA 的表达

取术后 24 h 大鼠肺组织, 用 TRIzol 试剂参照说明提取总 RNA, 逆转录成 cDNA。以 2 μ L cDNA 作为模板, 上、下游引物各 1 μ L。IL-1 β mRNA, 引物序列为: 上游 5'-TGTGACTCGTGGATGAT-3'; 下游 5'-TGCTTGAGAGGTGCTGAT-3', 扩增片段长度 420 bp。 β -actin, 上游 5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3', 下游 5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3', 扩增片段长度 227 bp。引物由 TaKaRa 公司合成。按下列条件扩增: 94 °C 5 min 后, 94 °C 变性 30 s、52.5 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 总延伸 10 min。取 20 μ L PCR 产物用含 0.5 μ g/mL EB 的 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 电压 110 V, 时间 25 min。BIO-RAD 凝胶成像仪紫外模式下拍摄凝胶图片 (β -actin 为内对照) 进行电泳条带光密度分析, 用目的条带与 β -actin 条带的光密度比值作为目的基因的相对表达量。

1.5 Western blot^[7] 检测肺组织 IL-1 β 蛋白的表达

取各组术后 48 h 肺组织用 RIPA 裂解液 (碧云天, p0013c) 进行裂解。水浴匀浆后超声破碎。12000 r/min, 低温离心 15 min 后取上清液。BCA 法 (碧云天, P009-2) 测定蛋白样品浓度, 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, 2 h 转至 PVDF 膜 (millipore)。TBST 配制 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。TBS 稀释 IL-1 β 一抗 (鼠源, 天津三箭, 1:200), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 10 min, 3 次。TBS 稀释二抗 (羊抗鼠, 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 (南京凯基, KGP1122), 凝胶成像系统 (BIO-RAD, ET9970616AA) 成像、拍照。以 β -actin 为内对照, 成像后获取图片, 测定光密度值, 用目标条带与 β -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^[8,9] 检测 IL-1 β 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-1 β 抗血清 1:200, 博奥森) 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) 显色, 用 0.01% 过氧化氢催化反应 10 min。显微镜下观察 IL-1 β 棕色反应, 梯度酒精脱水、透明、封片。拍照, 描述阳性细胞分布。

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 肺组织 IL-1 β mRNA 的表达变化

RT-PCR 结果 (图 1) 显示, 假手术组肺组织能检测到 IL-1 β mRNA 表达。在 420 bp 处可见阳性条带, 与预期 PCR 产物长度相符。但脑缺血后, 肺组织 IL-1 β mRNA 表达水平明显升高, 与假手术组的较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 肺组织 IL-1 β 蛋白的表达变化

Western blot 结果显示, IL-1 β 蛋白在假手术组肺组织有表达。脑缺血肺组织 IL-1 β 蛋白表达水平升高, 与假手术组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 IL-1 β 蛋白在肺组织中的分布和变化

免疫组化染色结果显示, 正常大鼠肺组织 IL-1 β 表达水平较低, IL-1 β 主要分布在气道上皮细胞。

脑缺血后肺组织内 IL-1 β 表达水平明显增加,一些颗粒样细胞也呈现了阳性染色。从形态学看,这些细胞应是中性粒细胞和巨噬细胞。见图 3。

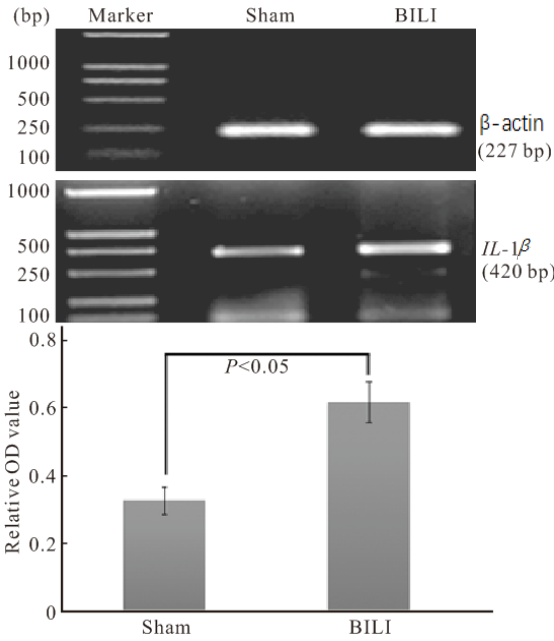


图 1 IL-1 β mRNA 表达变化

Fig 1 RT-PCR products of IL-1 β mRNA

3 讨论

本实验中,我们同前建立了脑缺血肺损伤模型。术后 24 h 用 RT-PCR,48 h 用蛋白免疫印迹,72 h 用免疫组化检测肺组织 IL-1 β 的定位与表达量,结果发现与假手术组比较,肺组织 IL-1 β 基因和蛋白表达在脑缺血后肺组织明显增加。IL-1 β 主要分布在气道上皮细胞,胞浆染色为主。同时,一些颗粒样细胞(从形态辨认属于炎性细胞中的巨噬细胞和中性粒细胞)也有染色。结果说明脑缺血肺损伤组织 IL-1 β 表达上调,提示其可能在脑缺血肺损伤炎症

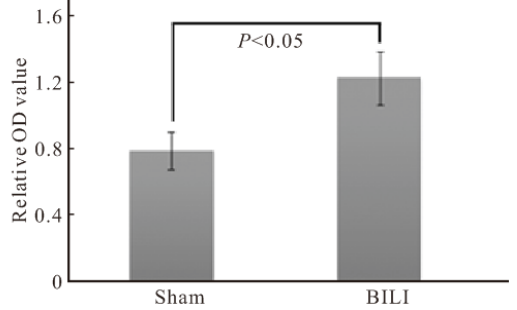
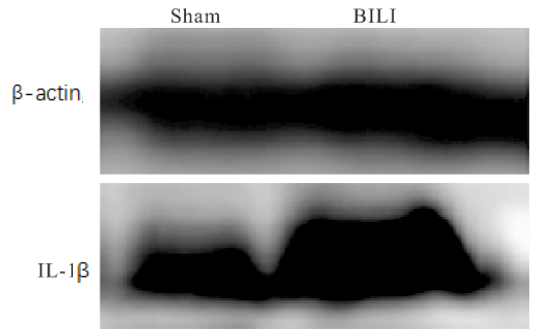


图 2 IL-1 β 在脑缺血肺组织表达变化

Fig 2 IL-1 β expression in lung of rats after brain ischemia

反应中发挥作用。脑缺血可引起多器官损害,是一个复杂的病理过程。肺是其中一个易受损的组织^[2]。至今,脑缺血引起肺损伤的发病机理仍不清楚。分析可能与脑缺血引起肺炎症反应及毛细血管通透性增加有关^[10]。而炎症反应可能有双向作用,一方面有利于消除感染和修复损伤组织,另一方面也可能造成组织损伤。IL-1 β 是一个重要的促炎症因子,在新生儿慢性肺损伤和支气管发育不良中有重要作用^[11]。在永久的大脑中动脉闭塞模型中,IL-1 β 在损伤 24 h 达到高峰^[12]。而使用 IL-1 β 受体拮抗剂抑制 IL-1 β 可有效治疗急性中风^[2],即抑制 IL-1 β 对大脑有保护作用。然而,IL-1 β 在脑缺血肺损伤中的表达变化至今未见报道。

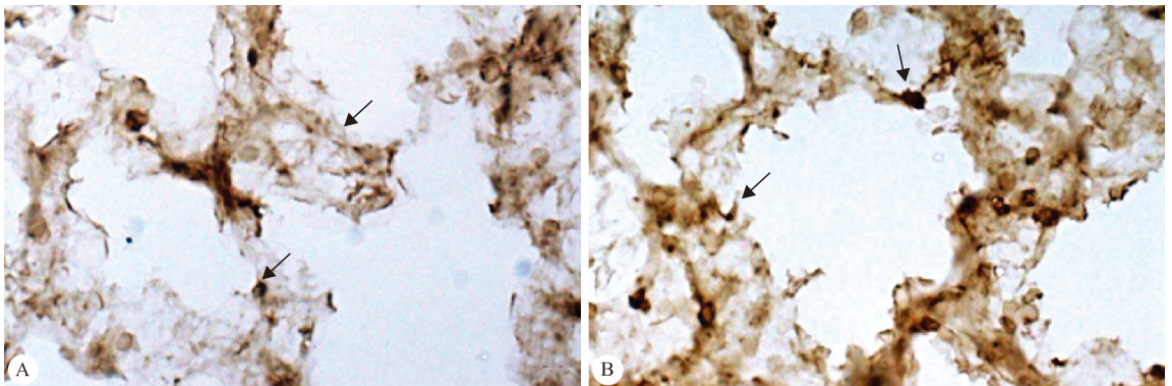


图 3 IL-1 β 在脑缺血肺损伤组织分布。SP \times 200

Fig 3 IL-1 β expression in lung of rats at 72 h after brain ischemia. SP \times 200

A: Sham group; B: BILI group

本实验发现,IL-1 β 表达在脑缺血肺组织明显上调。提示 IL-1 β 可能是脑缺血肺损伤的调节因素之一。文献显示,IL-1 β 受体 R1 弹性蛋白酶是诱导肺部炎症的重要信号。在免疫缺陷(NALP3)小鼠中,使用 IL1R 的拮抗剂降低 IL-1 β 及炎症反应,进而减轻急性炎症和肺气肿^[13]。应用 IL-1 β 受体抑制剂博来霉素可延缓肺损伤^[14]。在内毒素(LPS)-肺炎杆菌引起的肺损伤中,通过释放 IL-1 β 受体的拮抗剂,可以减轻 IL-1 β 引起的肺损伤^[15],说明 IL-1 β 在肺炎反应中有作用。IL-1 β 还在上皮细胞表达,提示 IL-1 β 还可能调节肺上皮和毛细血管通透性,促进炎症渗出,在肺水肿中发挥作用。已证明,IL-1 β 可促进血管通透性增加,加速炎症反应^[16]。结合本研究的发现,推测 IL-1 β 在脑缺血肺炎反应中可能是一个重要的调节因子。

本实验为研究 IL-1 β 在脑缺血肺损伤中的作用提供了重要的实验依据,研究结果可为寻找脑缺血肺损伤抗炎治疗新方法提供参考。

参 考 文 献

- 1 刘青青,郭虹,王少峡等. 脑缺血损伤机制的研究进展. 中华中医药学刊,2012;30(6):46-48.
- 2 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.
- 3 Cohan VL, Scott AL, Dinarello CA, *et al.* Interleukin-1 is a mucus secretagogue. *Cell Immunol*,1991;136(2):425-434.
- 4 Sapey E, Ahmad A, Bayley D, *et al.* Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonists in stable COPD. *J Clin Immunol*,2009;29(4):508-516.
- 5 Chaouat A, Savale L, Chouaid C, *et al.* Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. *Chest*, 2009; 136(3):678-687.
- 6 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.

- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 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 Denes A, Pinteaux E, Rothwell NJ, *et al.* Interleukin-1 and stroke: biomarker, harbinger of damage, and therapeutic target. *Cerebrovascular Diseases*,2011;32(6):517-527.
- 12 Skifter DA, Allegrini PR, Wiessner C, *et al.* Similar time-course of interleukin-1 beta production and extracellular-signal-regulated kinase (ERK) activation in permanent focal brain ischemic injury. *Metab Brain Dis*,2002;17(3):131-138.
- 13 Couillin I, Vasseur V, Charron S, *et al.* IL-1R1/MyD88 signaling is critical for elastase-induced lung inflammation and emphysema. *J Immunol*,2009;183(12):8195-8202.
- 14 Mato N, Fujii M, Hakamata Y, *et al.* Interleukin-1 receptor-related protein ST2 suppresses the initial stage of bleomycin-induced lung injury. *Eur Respir J*,2009;33(6):1415-1428.
- 15 Herold S, Tabar TS, Janssen H, *et al.* Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011;183(10):1380-1390.
- 16 张清华,陈玲,蒋知新. 炎症细胞因子对人脐静脉内皮细胞分泌 VEGF、ICAM-1 的影响. 心血管康复医学杂志,2009;18(2):93-97.

(2012-07-06 收稿,2012-09-28 修回)

编辑 沈进