

脑缺血肺损伤大鼠肺组织 TNF- α 的表达变化*

廖 凤¹, 但齐琴², 杜润芬¹, 李劲涛³, 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. 昆明医科大学 神经科学研究所(昆明 650031)

【摘要】 目的 探讨脑缺血后损伤肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达变化。方法 成年 SD 大鼠随机分为假手术组、脑缺血肺损伤组($n=13$),其中每组 5 只用于免疫组化检测 TNF- α 在肺的定位分布,余 8 只分别用于 RT-PCR 和 Western blot 检测 TNF- α mRNA 和蛋白水平变化。术后 24 h 取肺组织行 RT-PCR、术后 48 h 取肺组织行 Western blot 检测肺组织 TNF- α mRNA 和蛋白表达水平;术后 3 d 取肺组织行免疫组织化学染色检测肺组织内 TNF- α 的定位分布。结果 肺组织 TNF- α mRNA 和蛋白表达在脑缺血肺组织明显增加,与假手术组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。TNF- α 主要分布在气道上皮细胞和巨噬样细胞。结论 脑缺血后损伤肺组织 TNF- α 表达上调,提示其可能与脑缺血肺损伤炎症反应有关。

【关键词】 脑缺血肺损伤 肿瘤坏死因子- α 大鼠

Expression of TNF- α in Lung Tissue of Rats with Lung Injury Induced by Brain Ischemia LIAO Feng¹, DAN Qi-qin², DU Run-fen¹, LI Jin-tao³, ZHANG Yun-hui^{1 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. Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming 650031, China

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

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the lung tissue of rats with lung injury induced by brain ischemia. **Methods** The rat model of lung injury induced by brain ischemia was established. At 24 h, 48 h, 72 h after brain ischemia, lung tissues were harvested from each rats, the expressions of TNF- α mRNA and protein and its distributions in the lung tissue were measured by the methods of RT-PCR ($n=8$), Western blot ($n=8$), and immunohistochemistry ($n=5$), respectively. **Results** The increase of TNF- α mRNA and protein levels were found in the lung tissues after brain ischemia, when compared with sham group ($P<0.05$). The morphological study with immunohistochemical staining observed TNF- α positive reaction in epithelial cells and some macrophages in the lung tissues after brain ischemia. **Conclusion** The expression of TNF- α in the lung tissue could be upregulated in the rats with brain ischemia.

【Key words】 Brain ischemia lung injury TNF- α Rat

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)是一种重要的炎症因子,可以引发急性炎症反应。作为一种炎症介质^[1],TNF- α 主要由巨噬细胞、淋巴细胞和自然杀伤细胞产生,分为 α 、 β 、 γ 三型。TNF- α 除了能在体内引起某些肿瘤组织出血性坏死和在体外直接杀伤某些肿瘤细胞外,还有促进粒细胞吞噬、刺激单核细胞产生等生物学活性^[2]。文献显示,TNF- α 与炎症损伤直接相关,可引起机体器官损伤,尤其是肺组织^[3]。TNF- α 的产生能破坏 II 型上皮细胞,最终致肺表面活性物质的生成减少^[4]。而肺损伤后,血中 TNF- α 含量增高,血管通透性升高,中性粒细胞数量增加,巨噬细胞数量减少,蛋白含量增加,从而促进了急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的发生和发展^[5]。作为肺损伤重

要的致炎因子,TNF- α 在脑缺血导致的肺损伤中受到重视。脑缺血是神经内科常见多发病,常常导致神经功能障碍,影响生活质量^[6]。脑缺血还引起外周器官急性损害,出现肺充血水肿^[7],进而危及生命。脑缺血性中风诱发的急性肺水肿和急性肺炎已成为中风患者的一个主要死亡原因^[8]。前面的系列研究已经发现脑缺血肺损伤过程中可能涉及多种炎症因子(如 IL-1 β 、IL-6)表达,本实验进一步探讨脑缺血肺损伤和炎症因子 TNF- α 的关系。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

成年 SD 大鼠购自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组,每组 13 只;每组 5 只大鼠用于免疫组化,8 只分别用于 Western blot 和 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

1.2 脑缺血肺损伤模型制备

采用本实验室成功建立的造模方法^[7]:用1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,无菌条件用线栓法建立大脑中动脉堵塞脑缺血模型,造成中枢源性肺水肿。假手术组除未堵塞大脑中动脉外,其余与脑缺血肺损伤组相同。

1.3 样本获取

用于 RT-PCR 检测的大鼠于术后 24 h、用于 Western blot 检测的大鼠于术后 48 h 同前麻醉后先从颈动脉放血,然后立即开胸取肺-80 °C 冻存备用。免疫组织化学染色大鼠于术后 3 d 用 3.6% 水合氯醛腹腔注射麻醉后,40 g/L 多聚甲醛溶液心内灌注固定取肺组织,放入 40 g/L 多聚甲醛中后固定 4 h。入 15%、30% 蔗糖 PBS 梯度脱水过夜使组织块下沉。-20 °C 恒温冰冻切片(20 μ m)。

1.4 RT-PCR

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。取 2 μ L cDNA 作为模板,加上、下游引物各 1 μ L,用半定量 RT-PCR 检测肺组织中 TNF- α mRNA 的表达。引物序列为: TNF- α , 上游 5'-GAACTCCAGGC GGTGTCT-3', 下游 5'-CTGCTTGGTGGTTTG CTA-3', 扩增片段长度 230 bp。用 β -actin 作为内参照,序列: 上游 5'-GTAAAGACCTCTATGC CAACA-3', 下游 5'-GGACTCATCGTACTCCTG CT-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进行电泳条带光密度分析,以目的条带与 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^[9]

将各组肺组织匀浆后超声破碎,低温离心(12000 r/min,15 min),取上清液用 BCA 法测定蛋白样品浓度。用 100 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳 75 V、2 h 分离蛋白。350 mA、2 h 转至 PVDF 膜。TBST 配制 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。TBS 稀释 TNF- α 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 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。拍照后用 TNF- α 目标条带与 β -actin 的光密度比值反映目标蛋白的相对表达量。

1.6 免疫组织化学染色

按常规 SP 二步法进行免疫组化染色。一抗为兔多克隆 TNF- α 抗血清(1:200,博澳森),二抗为羊抗兔 IgG(1:200,北京中杉)。用 3,3'-二氨基联苯胺(0.5 g/L)棕色反应显色 5 min。观察 TNF- α 阳性细胞分布。阴性对照用 PBS 代替一抗,其余步骤不变。

1.7 统计学方法

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 TNF- α mRNA 的表达变化

经 RT-PCR 扩增及电泳后,230 bp 处观察到 TNF- α mRNA 阳性条带,与预期 PCR 产物长度相符。脑缺血肺损伤组电泳图上 TNF- α mRNA 条带亮度增加,相对定量分析显示肺组织 TNF- α mRNA 表达水平升高(0.71 ± 0.08),与假手术组(0.38 ± 0.04)的差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 TNF- α 蛋白的表达变化

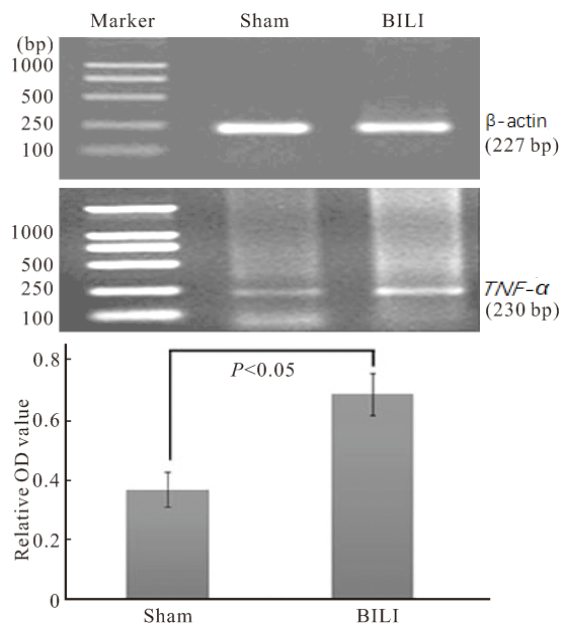


图1 脑缺血肺损伤后 24 h 肺组织 TNF- α mRNA 表达变化
Fig 1 Change of TNF- α mRNA in lung tissues of rats at 24 h after brain ischemia lung injury (BILI)

Western blot 结果(图 2)显示,脑缺血肺损伤组

肺组织 TNF- α 蛋白表达水平升高(1.83 ± 0.15),与假手术组(1.19 ± 0.11)的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

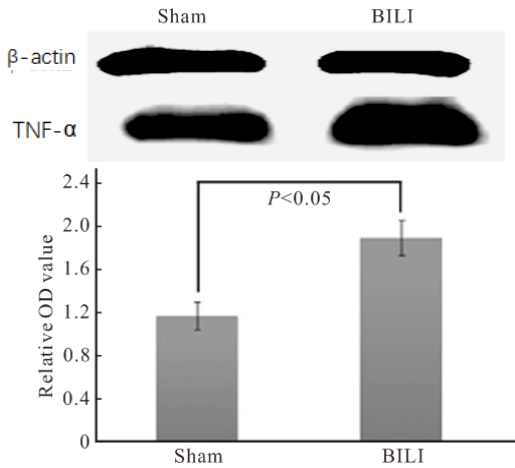


图 2 TNF- α 蛋白在脑缺血肺损伤后 48 h 肺组织中的表达变化

Fig 2 TNF- α expression in lung of rats at 48 h after brain ischemia lung injury (BILI)

2.3 TNF- α 蛋白分布

免疫组化染色结果显示,假手术组大鼠肺组织 TNF- α 表达水平较低,仅少量上皮细胞阳性染色。脑缺血肺损伤组肺组织上皮细胞 TNF- α 染色明显增加,此外,出现一些巨噬样细胞阳性染色。见图 3。

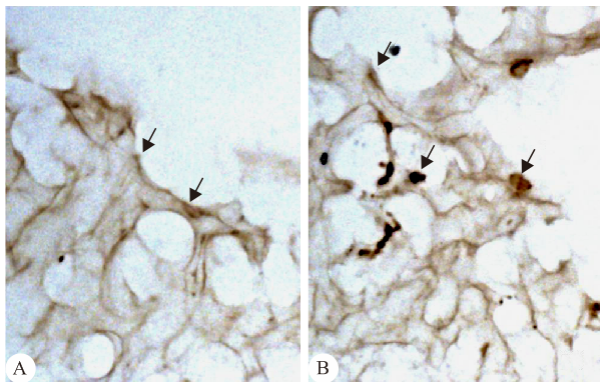


图 3 TNF- α 在脑缺血肺损伤后 3 d 肺组织的分布(↑)。SP $\times 200$

Fig 3 TNF- α distribution in lung of rats at day 3 after brain ischemia (↑). SP $\times 200$

A: Sham group; B: Brain ischemia lung injury group

3 讨论

本实验发现,脑缺血肺损伤后肺组织 TNF- α 表达明显增加,提示 TNF- α 与脑缺血肺损伤炎症反应有关。脑缺血肺损伤是一个复杂的反应过程,炎症因子在其中扮演重要角色。文献报道,脑缺血引起

的肺部炎症反应可能与毛细血管通透性增加有关^[10]。我们前面的研究已发现脑缺血肺损伤与 IL-1 β 和 IL-6 表达有关,本实验进一步探讨了脑缺血肺损伤病理过程与 TNF- α 的关系。

TNF- α 是由被激活的巨噬细胞合成的细胞因子。其主要作用是调节免疫细胞的功能,作为一种内源性致热源,TNF- α 可诱导发热、细胞凋亡、败血症(通过诱导 IL-1 和 IL-6 的生成)、恶病质、炎症反应以及抑制肿瘤的生成和病毒复制等。研究发现,脑缺血后 24 h 内在肺中免疫神经调节肽 MSH 快速上调,但用 CBA 小鼠炎症因子试剂盒和 CBA 小鼠 Th1/Th2 Kit 试剂盒并未测出培养的肺巨噬细胞和脾脏细胞中 TNF- α 分泌水平有明显改变^[11],血清 TNF- α 水平也未发生变化^[12]。这说明,血管巨噬细胞能分泌 TNF- α ,但其水平太低可能检测不到。另一可能是体外情况与体内不同,体外巨噬细胞没有体内的免疫调节机制,所以可能激活程度不够,致 TNF- α 水平较低检测不到。然而,在体内急性脑缺血后头 3 d 的脑组织中,TNF- α 水平却明显上调^[13],TNF- α 在缺血脑组织上调,一方面是能诱导抗缺血损伤蛋白表达,并与缺血耐受性的信号调节通路有关^[14];另一方面,TNF- α 还能促进小鼠脑缺血模型中未成熟的少突细胞的凋亡^[15]。因此,TNF- α 与脑缺血损伤有密切关系。本实验中,我们发现脑缺血后肺组织 TNF- α 表达上调,提示 TNF- α 与脑缺血肺损伤有关。在脑缺血肺损伤组织,TNF- α 基因表达激活可能是导致蛋白表达上调的主要原因。免疫组化染色观察到一些上皮和巨噬样细胞 TNF- α 阳性,说明上皮细胞和巨噬样细胞是生成 TNF- α 的主要来源。

综上,本实验为探讨 TNF- α 在脑缺血肺损伤中的作用提供了实验依据,结果提示 TNF- α 与脑缺血肺损伤有关,但 TNF- α 在脑缺血肺损伤的具体角色和作用信号通路尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 李欢送. 核因子- κ B 在急性胰腺炎肺损伤中作用的研究进展. 国外医学外科学分册, 2004; 31(1): 44-47.
- López-Aguilar J, Quilez ME, Martí-Sistac O, *et al.* Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury. *Intensive Care Med*, 2010; 36(2): 347-355.
- 关永东, 刘劫慧, 徐立等. 急性有机磷农药中毒 TNF- α , NO 的水平变化与临床意义. *中国急救医学*, 2003; 23(2): 88-89.
- 刘红菊, 李元桂, 毛文光等. 肿瘤坏死因子对急性肺损伤兔的

- 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- α and TNF- α receptors in cerebral arteries following cerebral ischemia in rat. *J Neuroinflammation*, 2011;8:107.
 - 14 Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, *et al.* TNF- α 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- α /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- α 、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