

BDNF对脑缺血肺损伤大鼠肺组织IL-1 β 表达的影响*

荣 荣¹, 杨婷婷², 李劲涛³, 但齐琴⁴, 张云辉^{2 Δ}

1. 安徽省立医院 老年医学科(合肥 230001); 2. 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);
3. 昆明医科大学 神经科学研究所(昆明 650031); 4. 四川大学华西医院 转化神经科学中心(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨脑源性神经营养因子(BDNF)对脑缺血肺损伤肺水肿的影响及对白细胞介素-1 β (IL-1 β)表达的调节。方法 将SD大鼠随机分为假手术组、脑缺血肺损伤组、脑缺血肺损伤给予BDNF抗体处理组(BDNF抗体干预组),每组13只。于BDNF抗体干预后3d取大鼠肺组织样本,HE染色($n=5$)观察各组肺水肿及中性粒细胞浸润;免疫组化染色($n=5$)和Western blot技术($n=8$)检测脑缺血后肺组织IL-1 β 的定位与相对表达量。结果 气道上皮细胞和中性粒细胞可见IL-1 β 表达。BDNF抗体处理后3d,肺水肿及中性粒细胞浸润减轻;肺组织IL-1 β 表达明显减少,与脑缺血肺损伤组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 BDNF抗体处理可减轻脑缺血肺损伤大鼠肺组织水肿及降低IL-6的表达。

【关键词】 脑缺血肺损伤 白细胞介素-1 β 大鼠 脑源性神经营养因子

Effects of BDNF Antibody to Block IL-1 β Expression and Lung Injury in Rats Subjected to Brain Ischemia RONG Rong¹, YANG Ting-ting², LI Jin-tao³, DAN Qi-qin⁴, ZHANG Yun-hui^{2 Δ} . 1. Cadre's Ward, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China; 2. Department of Respiration, Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Science and Technology University, Kunming 650032, China; 3. Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming 650031, China; 4. Translational Neuroscience Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

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

【Abstract】 Objective To explore the effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) antibody to block lung injury and interleukin-1 β (IL-1 β) expression in the rats with brain ischemia. **Methods** Thirty nine SD rats were divided into sham group, brain ischemia lung injury (BILI) group, and BDNF antibody treated group. Inflammatory lung injury was induced by brain ischemia in the later two groups, and BDNF antibody was given through intraperitoneal injection to the rats for 3 days in BDNF antibody group. Lung tissue samples were harvested from the rats in each group at the 3rd day after brain ischemia. Lung edema degree was evaluated by HE staining. The protein expressions of IL-1 β in the lung tissues were measured by the methods of immunohistochemistry ($n=5$) and Western blot ($n=8$). **Results** The increased immunostaining of IL-1 β were found in the lung tissue at 3 days after brain ischemia, which indicated the upregulated expression of IL-1 β protein in the lung injury induced by cerebral ischemia. The block of BDNF antibody resulted in a significant decrease of IL-1 β expression, as well as the decrease of lung edema. **Conclusion** BDNF, as a crucial factor, could regulate airway inflammation injury in brain ischemia rats via activating IL-1 β expression.

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

脑缺血肺损伤指脑缺血过程中出现的肺部损害,机制不清。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是神经营养因子家族的主要成员^[1,2],与神经损伤修复关系密切^[3,4],且在多种非神经组织如皮肤、平滑肌细胞、骨骼肌以及其它结构细胞表达^[5,6]。但齐琴等^[7]的研究已显示BDNF和脑缺血肺损伤有关,但其发挥作用的分子机制不清楚,值得进一步研究。

炎症因子是机体发生严重创伤和感染时,效应细胞激活释放的炎症介质^[8,9],这些介质涉及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等。文献显示,肺组织在损伤后IL-1 β mRNA表达明显增加^[10],说明IL-1 β 在肺损伤中起着重要作用。然而,至今未见脑缺血肺损伤中BDNF调节IL-1 β 的报道。本实验用BDNF抗体封闭技术研究BDNF对IL-1 β 的影响,探讨BDNF在脑缺血肺损伤中的作用及其对炎症因子的调节机制。

1 材料与与方法

1.1 动物与分组

* 云南省自然科学基金(No. 2010ZC206)资助

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

成年 SD 大鼠 39 只,购自昆明医科大学实验动物中心,体质量 200~220 g。随机分为假手术组、脑缺血肺损伤组、脑缺血肺损伤给予 BDNF 抗体处理组(BDNF 抗体干预组)共 3 组。每组 13 只动物;其中每组 8 只用于 Western blot,5 只用于 HE 染色和免疫组化染色。

1.2 模型制备

脑缺血肺损伤组和 BDNF 抗体干预组制备脑缺血肺损伤模型。采用本实验成功建立的造模方法^[7]:用 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)经腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定于手术台上,无菌条件下进行颈部正中切口,分离肌肉,暴露左侧颈总动脉及其颈内外动脉的分支,用线栓法堵塞大脑中动脉制作局灶性脑缺血模型。最后止血,缝合肌层和皮肤。假手术组未栓塞大脑中动脉,其余同手术组。

1.3 BDNF 抗体处理

按文献方法进行 BDNF 抗体注射^[6]。BDNF 抗体(由澳大利亚周兴福教授实验室提供)来自于羊血清冻干粉,用双蒸水溶解后,通过 0.2 μ m 滤器过滤除菌,使用浓度为 0.1 g/mL,剂量为 1 mL/100 g,术后立即腹腔注射,每天 1 次,持续 3 d。

假手术组和脑缺血肺损伤组用正常羊血清作对照,使用方法和剂量同 BDNF 抗体。

1.4 样本获取

用于 HE 染色和免疫组化染色的大鼠手术后 3 d 用 3.6%水合氯醛(10 mg/kg)由腹腔注射麻醉后,仰卧固定,用 40 g/L 多聚甲醛溶液心内灌注后,大鼠俯卧固定取材。取出的肺组织放入 40 g/L 多聚甲醛中后固定 4 h 后再放入 15%蔗糖-PBS 过夜,使组织块下沉。再放入 30%蔗糖-PBS 过夜,待其沉底后进行 -20 $^{\circ}$ C 恒温冷切片机连续切片,切片厚 20 μ m。用于 Western blot 的动物同前麻醉后先从颈动脉放血,然后立即开胸取肺, -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.5 HE 染色

HE 染色观察肺水肿及炎性细胞浸润。每侧取 3 张切片(200 \times)计算各组肺组织红细胞和中性粒细胞数量变化。

1.6 免疫组织化学染色

切片在 0.1 mol PBS 中漂洗 3 次(每次 5 min),3%过氧化氢孵育 30 min,入含 5%羊血清的 Triton X-100(0.3%)中 37 $^{\circ}$ C 反应 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,博澳森,1:200)于 4 $^{\circ}$ C 过夜。同前 PBS 漂洗 5 min \times 3 次,切片分别与 Reagent Kit SP

试剂盒(北京中杉)的试剂 I 和 II 于 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min。PBS 漂洗 5 min \times 3 次。入含 0.5 g/L 3,3-二氨基联苯胺和 0.01%过氧化氢的染色液中反应 10 min。观察棕色反应显色,适度后停止反应。梯度酒精脱水、透明、封片。显微镜下观察 IL-6 阳性细胞的分布。

1.7 Western blot

取各组肺组织 250 mg 用 1 mL RIPA 裂解液(碧云天,p0013c)裂解[每 50 mL 裂解液中加入鸡尾酒片(Roche,04693116001)1 片]。匀浆后再用超声破碎。低温离心(12000 r/min,15 min)后取上清液,BCA 法(碧云天,P009-2)测定蛋白样品浓度,算出每孔上样体积。加 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液煮沸变性 10 min。100 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳,75 V、4 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 IL-1 β 一抗(鼠源,1:500,天津三箭),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 10 min,3 次。TBS 稀释二抗(羊抗鼠 IgG,1:200,北京中杉金桥),室温孵育 24 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 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含量,进行组间比较。

1.8 统计学方法

采用单因素分差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果

光镜下,脑缺血肺损伤组肺组织明显充血,毛细血管和肺间质内充满大量红细胞,中性粒细胞明显增多,与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);而 BDNF 抗体干预后,肺水肿减弱,中性粒细胞浸润较脑缺血肺损伤组减少($P < 0.05$)。见附表。

附表 各组大鼠肺组织红细胞和中性粒细胞的比较($\bar{x} \pm s$)

Table Comparison of red blood cells and neutrophils in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Red blood cells (/HP)	Neutrophils (/HP)
Sham	5	17 \pm 1	5 \pm 1
BILI	5	88 \pm 10*	22 \pm 3*
BDNF block	5	33 \pm 9#	9 \pm 1#

* $P < 0.05$, vs. sham group; # $P < 0.05$, vs. BILI group

2.2 各组大鼠肺组织 IL-1 β 蛋白的分布

免疫组化染色结果显示(图 1),假手术组大鼠肺组织 IL-1 β 表达水平较低,IL-1 β 主要分布在气道上皮细胞。脑缺血肺损伤组肺组织内 IL-1 β 表达水平明显增加,除上皮外,一些巨噬细胞阳性染色。BDNF 抗体封闭后,肺组织内 IL-1 β 阳性染色减弱。

2.3 各组大鼠肺组织 IL-1 β 蛋白水平的变化

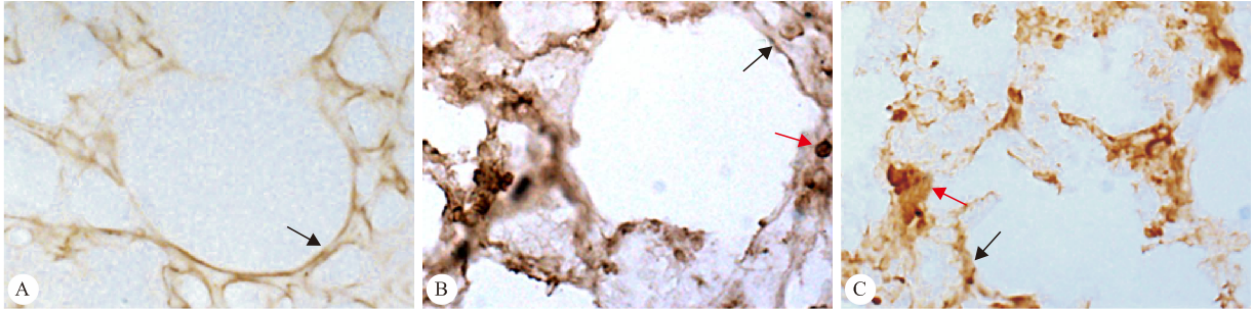


图 1 IL-1 β 在脑缺血肺损伤组织的分布(黑色箭头示上皮细胞阳性,红色箭头示巨噬细胞阳性)。SP \times 200

Fig 1 IL-1 β expression in lung of rats at day 3 after brain ischemia (black arrow: endothelial cells; red arrow: macrophages). SP \times 200

A: Sham group; B: BILI group; C: BDNF block group

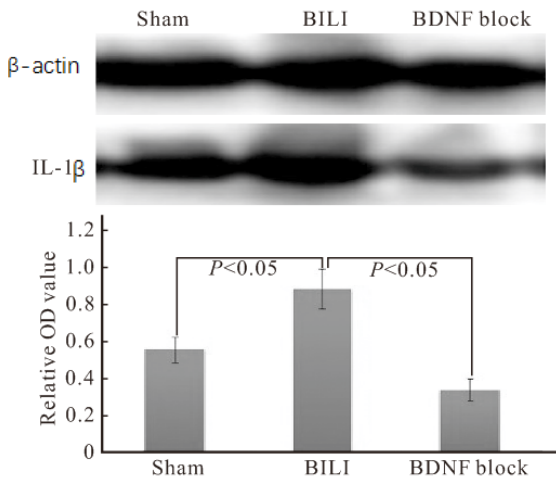


图 2 IL-1 β 在脑缺血肺损伤组织的表达变化(Western blot 结果)

Fig 2 IL-1 β in lung of rats at day 3 after brain ischemia, indicated by Western blot

3 讨论

本实验中,我们发现脑缺血肺损伤后,给予 BDNF 抗体治疗可有效减少炎症因子 IL-1 β 的水平,并减轻肺水肿,这说明 IL-1 β 可能受 BDNF 调控,而且 BDNF 抗体治疗有利于减轻肺水肿。BDNF 是重要的神经营养因子^[11-14],其生物学作用不仅涉及神经损伤修复,而且涉及疼痛。研究显示,在炎症疼痛过程中,BDNF 是一个重要的致痛因子^[15,16]。但是 BDNF 如何发挥致炎作用仍不清楚。

本实验观察到,脑缺血肺损伤中有明显肺充血、

Western blot 结果显示(图 2),IL-1 β 蛋白在假手术组肺组织有表达(0.57 ± 0.08)。脑缺血肺损伤组肺组织 IL-1 β 蛋白表达水平升高(0.89 ± 0.09),与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。BDNF 抗体干预有效减少肺组织 IL-1 β 蛋白水平(0.37 ± 0.06),与脑缺血肺损伤组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

水肿,而 BDNF 阻断可减少水肿且下调 IL-1 β 表达,提示 BDNF 通过调节炎症因子影响肺炎症反应。在生物大分子发挥作用的过程中,蛋白质才是执行功能的主体。要检测蛋白质的功能有 2 种办法,一是用 RNA 干扰来观察抑制蛋白后的结果;二是直接用抗体封闭抗原来阻断蛋白的作用。本实验中,当 BDNF 抗体中和 BDNF 分子后,肺组织红细胞及中性粒细胞数减少,同时 IL-1 β 水平明显下降。这说明 BDNF 可能通过 IL-1 β 影响肺水肿。

至今,已发现 BDNF 与肺损伤有关。如慢性阻塞性肺气肿时,血清 BDNF 增加^[17];肺纤维化时,肺肉芽肿有 BDNF 和其受体 trkB 表达^[18];而在肺部炎症反应患者的痰液中,也发现 BDNF 表达明显上调^[19];最近还发现,脑缺血肺水肿中,肺组织 BDNF 表达上调^[7]。这些均说明 BDNF 参与肺损伤反应。本实验通过 BDNF 抗体封闭,发现 BDNF 能调节 IL-1 β 表达,而且有效减轻肺充血,从而为证实 BDNF 通过影响炎症因子参与中枢源性肺损伤提供了新的线索,为今后寻找脑缺血肺损伤的干预治疗策略提供了神经营养因子和炎症因子干预的新思路。

参 考 文 献

- 1 Chen J, Qi JG, Zhang W, et al. Electro-acupuncture induced NGF, BDNF and NT-3 expression in spared L6 dorsal root ganglion in cats subjected to removal of adjacent ganglia.

- Neurosci Res, 2007; 59(4): 399-405.
- 2 Ba YC, Dai P, Zhou HL, *et al.* Spatiotemporal changes of NGF, BDNF and NT-3 in the developing spinal cords of embryonic chicken. *Neurochem Res*, 2010; 35(2): 273-278.
 - 3 Zhu JM, Zhao YY, Chen SD, *et al.* Functional recovery after transplantation of neural stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischaemia. *J Int Med Res*, 2011; 39(2): 488-498.
 - 4 Lee DH, Geyer E, Flach AC, *et al.* Central nervous system rather than immune cell-derived BDNF mediates axonal protective effects early in autoimmune demyelination. *Acta Neuropathol*, 2012; 123(2): 247-258.
 - 5 Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in clinical diagnostics: pathophysiology and laboratory investigation. *Clin Chim Acta*, 2005; 352(1-2): 49-74.
 - 6 Sariola H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci*, 2001; 58(8): 1061-1066.
 - 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 李洪霞, 张进川, 赵亚力等. 急性肺损伤大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-1ra mRNA 的表达及药物干预. *解放军医学杂志*, 2005; 30(4): 306-309.
 - 9 王晓琳, 刘 荣, 董晓军等. 大鼠肝缺血再灌注后急性肺损伤的实验研究. *解放军医学杂志*, 2002; 27(3): 231-233.
 - 10 颜光涛, 郝秀华, 薛 辉等. 白介素-1 β 及其受体拮抗蛋白在肠缺血一再灌注所致急性肺损伤中的作用研究. *中国危重病急救医学*, 2001; 13(12): 710-713.
 - 11 Diógenes MJ, Neves-Tomé R, Fucile S, *et al.* Homeostatic control of synaptic activity by endogenous adenosine is mediated by adenosine kinase. *Cereb Cortex*, 2012 Sep 20. [Epub ahead of print]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
 - 12 Yi LT, Li J, Li HC, *et al.* Ethanol extracts from *Hemerocallis citrina* attenuate the decreases of brain-derived neurotrophic factor, TrkB levels in rat induced by corticosterone administration. *J Ethnopharmacol*, 2012; 144(2): 328-334.
 - 13 Ta ş ç I I, Kabul HK, Aydogdu A. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) in cardiometabolic physiology and diseases. *Anadolu Kardiyol Derg*, 2012 Sep 18. [Epub ahead of print]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
 - 14 Li C, Wang T, Jiang N, *et al.* Steady and fluctuant methods of inhibition of acetylcholinesterase differentially regulate neurotrophic factors in the hippocampus of juvenile mice. *Exp Ther Med*, 2012; 3(2): 269-272.
 - 15 Grau JW, Huie JR, Garraway SM, *et al.* Impact of behavioral control on the processing of nociceptive stimulation. *Front Physiol*, 2012; 3: 262.
 - 16 Bagge J, Danielson P, Forsgren S. *In situ* hybridization studies favouring the occurrence of a local production of BDNF in the human Achilles tendon. *Histol Histopathol*, 2012; 27(9): 1239-1246.
 - 17 Loza MJ, Watt R, Baribaud F, *et al.* Systemic inflammatory profile and response to anti-tumor necrosis factor therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 2012; 13: 12.
 - 18 Dagnell C, Grunewald J, Kramar M, *et al.* Neurotrophins and neurotrophin receptors in pulmonary sarcoidosis-granulomas as a source of expression. *Respir Res*, 2010; 11: 156.
 - 19 Hope-Gill BD, Hilldrup S, Davies C, *et al.* A study of the cough reflex in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003; 168(8): 995-1002.

(2012 - 07 - 16 收稿, 2012 - 09 - 20 修回)

编辑 余 琳