

肌肽对局灶性脑缺血大鼠外周血 IFN- γ 、IL-4 的影响

王爱红,朱洁,刘翠梅,徐桂华*

(南京中医药大学护理学院,江苏 南京 210023)

[摘要] 目的:研究肌肽对局灶性脑缺血大鼠外周血 IFN- γ 、IL-4 的影响。方法:将 30 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组(10 只)、模型组(10 只)和肌肽组(10 只)。模型组和肌肽组以线栓法建立大鼠右侧大脑中动脉缺血模型,肌肽组于造模后按体质量 1 g/(kg·d)予肌肽水溶液灌胃,其他两组予等量生理盐水灌胃。分别于术后清醒时、24 h、72 h 采用 Longa 评分法进行神经功能评分,于术后 24 h、72 h 用 ELISA 法测定外周血 IFN- γ 、IL-4,于术后 72 h 取脑组织进行病理组织形态学观察。结果:术后 72 h,肌肽组神经功能缺损评分较模型组降低($P < 0.05$);术后 72 h,3 组外周血 IFN- γ 水平有明显差异($P < 0.05$);术后 24 h 和 72 h 模型组外周血 IFN- γ 水平和 IFN- γ /IL-4 值明显低于假手术组(P 均 < 0.05),IL-4 明显高于假手术组($P < 0.05$);与模型组相比,术后 72 h 肌肽组 IFN- γ 、IFN- γ /IL-4 明显提高($P < 0.05$),IL-4 明显降低($P < 0.05$);脑缺血后,神经元重度坏死,大鼠大脑皮层病理性损伤明显,肌肽处理后,神经元继发性损伤有所减轻。结论:局灶性脑缺血大鼠存在外周免疫抑制,肌肽对脑缺血大鼠外周免疫抑制有调节作用,其机制可能与提高 IFN- γ 、IFN- γ /IL-4 值和降低 IL-4 有关。

[关键词] 肌肽;脑缺血;IFN- γ ;IL-4

[中图分类号] R392

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)09-1179-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20140906

Effects of carnosine on IFN- γ and IL-4 in peripheral blood of rats with focal cerebral ischemia

Wang Aihong, Zhu Jie, Liu Cuimei, Xu Guihua*

(Department of Nursing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of carnosine on peripheral blood IFN- γ and IL-4 in rats with focal cerebral ischemia. **Methods:** Thirty male SD rats were randomly divided into 3 groups: the sham-operated group ($n=10$), the model group ($n=10$) and the carnosine-treated group ($n=10$). The rat model of the right middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by suture method in model group and the carnosine-treated group. After making the MCAO model, the rats in the carnosine-treated group were lavaged with soluble carnosine once a day at the doses of 1 g/(kg·d) as the criteria of their body mass, and the same volume of normal saline was lavaged in the sham operation and the model group. The neurological function was scored with Longa 5-point scale at postoperative 24 h and 72 h. The levels of IFN- γ and IL-4 in peripheral blood were detected by ELISA method at 24 h and 72 h. Brain tissues were obtained for HE staining at postoperative 72 h and observed by pathological histology. **Results:** Compared with the model group, there were significant differences in the neurological outcome scores in the carnosine-treated group at 24 h and 72 h ($P < 0.05$). There was a significant decrease at 24 h and 72 h of the carnosine-treated group ($P < 0.05$). At 24 h and 72 h, compared with the sham-operated group, the level of IFN- γ and IFN- γ /IL-4 ratio were significant decreased ($P < 0.05$). The level of IL-4 was significant increased ($P < 0.05$). After cerebral ischemia, neurons in cerebral cortex of rats were severe necrosis and the pathological injury of cerebral cortex in rats was obvious. After carnosine treatment, secondary neuron injury mitigated. **Conclusion:** Peripheral immune suppression exists in rats with focal cerebral ischemia. Carnosine could has potential protective effective on peripheral immune suppression of MCAO rats and the mechanism could be IFN- γ , IL-4 and IFN- γ /IL-4 ratio elevation.

[Key words] carnosine; cerebral ischemic; IFN- γ ; IL-4

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(09): 1179-1183]

[基金项目] 江苏省青蓝工程项目、江苏省优势学科资助项目(YSHL0201-26)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xgh_88@126.com

脑缺血后出现中枢神经损伤诱导的外周免疫抑制,引起淋巴细胞免疫功能下降^[1-3],Th1类细胞因子IFN- γ 、Th2类细胞因子IL-4分泌减少。免疫调节剂能改善脑缺血后的免疫抑制^[4]。研究表明,肌肽对脑缺血性损伤具有保护作用,并有剂量效应性,以1g/kg剂量为最佳^[5-9];但研究多集中于抗氧化和细胞凋亡机制的探讨^[5-9]。肌肽应用于其他疾病的免疫调节研究已有报道^[10],本研究通过制备大鼠大脑中动脉闭塞缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观察肌肽对脑缺血大鼠外周血IFN- γ 、IL-4的影响,以进一步探讨其抑制脑缺血损伤的免疫调节机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

雄性健康SD大鼠30只,体重(300±50)g,由南京中医药大学实验动物中心提供(合格证号:SCXK(浙)2008-0033)。

1.1.2 药物及试剂

肌肽(C9625, Sigma公司,美国);IFN- γ ELISA试剂盒(ELR-IL-4-00, Raybiotech公司,美国),IL-4 ELISA试剂盒(ELR-IFN γ -001, Raybiotech公司,美国);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid, TTC)(101382163, Sigma公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及给药

应用随机数字表法将大鼠随机分成假手术组、模型组和肌肽组。肌肽组于造模后按1g/(kg·d)予肌肽水溶液灌胃,每天2次。假手术组、模型组给予等量生理盐水灌胃,首次灌胃时间在造模后6h内。

1.2.2 大鼠大脑中动脉闭塞缺血模型制备

根据改良的Longa法制备大鼠右侧MCAO模型^[11]。假手术组大鼠术中不插栓线,手术过程同模型组。大鼠提尾后对侧前爪屈曲(即不能伸展左侧前肢),行走时向左侧旋转或向左侧倾倒,上述状况出现一种即造模成功。每组选造模成功大鼠10只进入实验。

1.2.3 神经功能缺损评分

参照Longa5分法^[11],于大鼠MCAO术后约2h清醒时、24h和72h时间点进行神经功能缺损评分。0分:无明显神经功能缺损;1分:轻微神经功能缺损,提尾倒悬时不能伸展左侧前肢;2分:中度局

灶性神经功能缺损症状,行走时向左侧旋转;3分:重度局灶性神经功能缺损症状,行走时向左侧倾倒;4分:不能自发行走,意识水平下降。

1.2.4 外周血IFN- γ 、IL-4检测

各组大鼠均在术后24h、72h时间点(完成神经功能缺损评分后)经眼眦采血,留取血标本。按试剂盒说明书进行操作,测定IFN- γ 、IL-4。

1.2.5 脑组织形态学观察

术后72h,各组随机取4只大鼠心脏灌注后断头取脑至培养皿中,切取视交叉前后各2mm厚的脑组织,放入4%多聚甲醛磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)中固定24h后,脱水透明,石蜡包埋切片,进行HE染色,对大脑皮质进行病理组织学检查。

1.2.6 脑组织切片TTC染色观察

术后72h,用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,迅速断头处死大鼠,冰皿上取脑,置于-20℃冰箱中冷冻20min,将其置于鼠脑专用切片模具中,切去嗅球和低位脑干,间隔2mm连续冠状切片5片,将脑片立即放于1%TTC溶液中,37℃恒温下避光染色30min,再用4%多聚甲醛固定24h,拍照,利用Image pro-Plus6.0图像处理软件计算每张切片的梗死面积和切片对侧正常半球的面积,梗死严重程度为梗死面积/对侧半球面积,结果用百分数表示。

1.3 统计学方法

采用SPSS18.0软件进行统计分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以Shapiro-Wilk法对数据进行正态性分析,以Levene Statistic法行方差齐性检验,IFN- γ 、IL-4和IFN- γ /IL-4数据呈正态及具有方差齐性,神经功能缺损评分不呈正态及方差齐性分布。多组间的比较采用单因素方差分析;神经功能缺损评分采用Mann-Whitney U检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肌肽对局灶性脑缺血大鼠神经功能缺损评分的影响

假手术组未见神经功能缺损表现,模型组与肌肽组均出现不同程度的肢体瘫痪;与模型组比较,肌肽组神经功能缺损评分MCAO术后24h无统计学差异($P > 0.05$,表1),72h明显降低($P < 0.05$,表2)。

2.2 肌肽对局灶性脑缺血大鼠血IFN- γ 的影响

术后24h,大鼠外周血中IFN- γ 表达水平3组间差异无统计学意义($F = 3.630, P = 0.054$),但模

表 1 术后 24 h 神经功能缺损评分

Table 1 Neurological deficits score in rats at postoperative 24 h

组别	神经功能缺损评分(例)				
	0分	1分	2分	3分	4分
模型组(n=10)	0	0	9	1	0
肌肽组(n=10)	0	1	8	1	0

表 2 术后 72 h 神经功能缺损评分

Table 2 Neurological deficits score in rats at postoperative 72 h

组别	神经功能缺损评分(例)				
	0分	1分	2分	3分	4分
模型组(n=10)	0	3	7	0	0
肌肽组(n=10)	0	8	2	0	0

型组、肌肽组与假手术组比较均明显降低 ($P < 0.05$)。术后 72 h,大鼠外周血中 IFN- γ 表达水平 3 组间差异有统计学意义 ($F = 4.872, P = 0.025$),模型组、肌肽组与假手术组比较有明显差异 ($P < 0.05$);肌肽组与模型组比较有明显升高 ($P < 0.05$, 表 3)。

表 3 各组外周血 IFN- γ 变化

Table 3 Changes of IFN- γ in peripheral blood in each groups (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	术后 24 h	术后 72 h
假手术组(n=10)	74 535.00 \pm 12 088.79	87 968.00 \pm 21 132.53
模型组(n=10)	62 109.00 \pm 6 237.61*	59 076.00 \pm 11 229.56*
肌肽组(n=10)	62 487.00 \pm 6 146.57*	91 200.00 \pm 14 478.48**

与假手术组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,** $P < 0.05$ 。

2.3 肌肽对局灶性脑缺血大鼠外周血 IL-4 的影响

术后 24 h、72 h 大鼠外周血中 IL-4 表达水平 3 组间差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。与假手术组比较,模型组 IL-4 有明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,术后 72 h 肌肽组 IL-4 明显降低($P < 0.05$, 表 4)。

表 4 各组外周血 IL-4 变化

Table 4 Changes of IL-4 in peripheral blood in each groups (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	术后 24 h	术后 72 h
假手术组(n=10)	86.10 \pm 48.69	73.81 \pm 38.41
模型组(n=10)	125.38 \pm 45.94*	120.86 \pm 79.52*
肌肽组(n=10)	123.09 \pm 22.99*	98.93 \pm 46.77**
F 值	0.969	0.671
P 值	0.412	0.551

与假手术组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,** $P < 0.05$ 。

2.4 肌肽对局灶性脑缺血大鼠外周血 IFN- γ /IL-4 的影响

术后 24 h、72 h,3 组大鼠外周血中 IFN- γ /IL-4 值比较无统计学差异(P 均 > 0.05);术后 24 h、72 h,与假手术组比较,模型组 IFN- γ /IL-4 值明显降低($P < 0.05$);术后 72 h 肌肽组 IFN- γ /IL-4 值明显高于模型组($P < 0.05$, 表 5)。

表 5 各组外周血 IFN- γ /IL-4 变化

Table 5 Changes of IFN- γ /IL-4 in peripheral blood in each groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	术后 24 h	术后 72 h
假手术组(n=10)	864.71 \pm 219.17	998.14 \pm 231.55
模型组(n=10)	498.49 \pm 138.69*	506.79 \pm 169.37*
肌肽组(n=10)	512.65 \pm 205.88*	898.59 \pm 174.77#
F 值	1.948	1.054
P 值	0.179	0.375

与假手术组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,** $P < 0.05$ 。

2.5 肌肽对脑缺血大鼠脑组织病理变化的影响

术后 72h 大鼠皮质病理组织学检查:假手术组中大鼠脑实质各层结构清晰,神经细胞未见肿胀、空泡变性,核正常,无核固缩,神经细胞未见坏死,形态结构正常,未见明显病理性损伤;模型组大鼠大脑皮层神经元重度坏死,神经元数目明显减少,细胞核固缩,胞体缩小变形,间质水肿,血管周间隙明显增宽;肌肽组肌肽处理后,可见大脑皮层神经元轻度变性坏死,神经元数目减少得到改善,细胞核固缩、胞体缩小变形、间质水肿、血管周间隙增宽得到明显改善(图 1)。

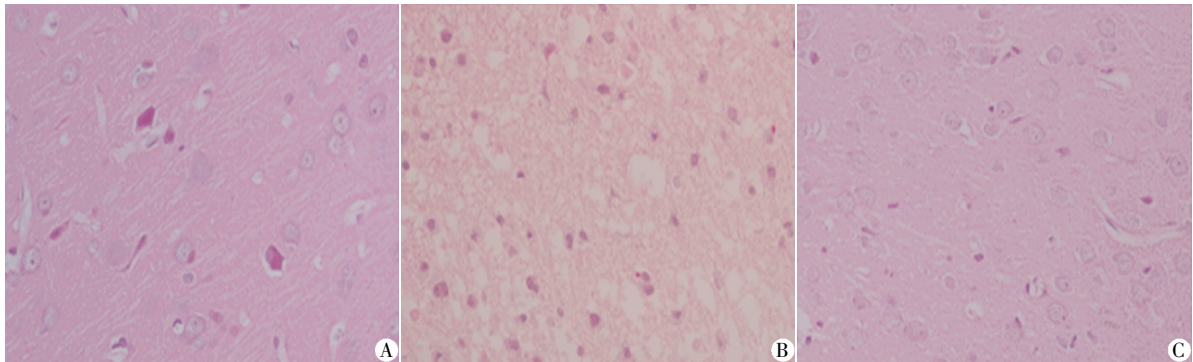
2.6 大鼠脑组织切片 TTC 染色结果

图 2 提示,假手术组 TTC 染色呈红色,为正常脑组织,未见梗死灶;模型组与肌肽组 TTC 染色呈苍白色为梗死灶;脑梗死体积比较,肌肽组梗死灶较模型组明显减小($P < 0.05$)。

3 讨论

缺血后继发性脑损伤是缺血性脑血管疾病最终致残的关键因素和疾病发展变化的核心,脑组织血液灌注不足,发生缺氧缺血的病理生理演变过程^[12],最终导致神经元死亡和神经功能受损。由图 1 所示,模型组大鼠神经元重度坏死,有明显病理性损伤;表 1 显示,模型组、肌肽组均出现不同程度的肢体功能障碍。

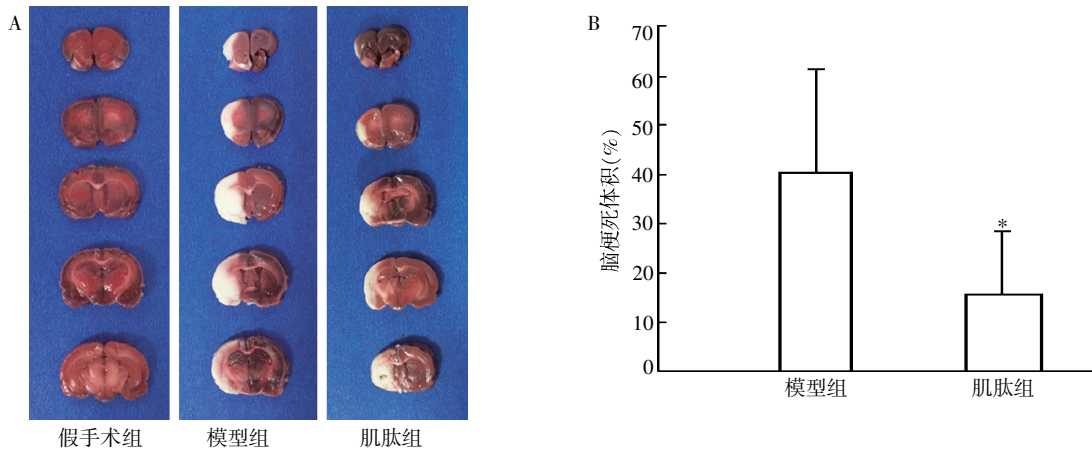
肌肽是由 β -丙氨酸和 L-组氨酸组成的二肽,存在于脊椎动物的骨骼肌和大脑等组织中,肌肽最早在 1900 年由前苏联学者 Gulewitsch 和 Amiradzibi 从牛肉提取物中检测到,是目前为止发现的结构最简单的生物活性肽之一,具有抗氧化、抗炎症、清除



A:假手术组;B:模型组;C:肌肽组

图 1 肌肽对脑缺血大鼠脑组织病理变化的影响(HE,× 400)

Figure 1 The effect of Carnosine on pathology in ischemia rats(HE,× 400)



与模型组比较, * $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 2 各组 TTC 染色结果(A)及脑梗死体积(B)比较

Figure 2 TTC staining(A) and infarct size(B) in rats in each group

自由基、抗糖基化、调节生理 pH 值、免疫调节等生物学作用^[13]。

多项研究表明,肌肽具有减轻脑缺血后组织损伤的作用^[13-16]。本研究中提示,经肌肽处理后的肌肽组神经元继发性损伤有所减轻,肌肽能不同程度改善脑缺血大鼠的神经功能,进一步证实了肌肽的脑保护作用。

机体免疫 T 细胞分为 CD4⁺和 CD8⁺细胞亚群,两种细胞亚群相互作用维持机体的正常免疫功能。CD4⁺T 细胞,又称为辅助 T 细胞(Th 细胞),通过分泌细胞因子来调节机体免疫功能,具有辅助 T 淋巴细胞转变为效应细胞,辅助 B 淋巴细胞生成抗体等作用,起到诱导和辅助细胞和体液免疫的作用。Th1 和 Th2 细胞是 CD4⁺Th 细胞的两种亚类,Th1 细胞主要产生促炎症细胞因子 IFN- γ 、IL-2 等,可促进细胞免疫;Th2 细胞主要分泌抗炎细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6 等,抑制 Th1 细胞分泌细胞因子,促进体液免疫反应。Th1 和 Th2 细胞维持在一定的平衡状态

是维持正常免疫功能的重要因素,当机体 Th1/Th2 细胞平衡失调,并向 Th1 或 Th2 转化时,称为 Th1 或 Th2 漂移,向 Th1 免疫应答偏移会导致机体损伤,向 Th2 免疫应答偏移则使机体处于免疫抑制状态^[17-19]。

脑缺血局部促炎症细胞因子增加,通过激活交感肾上腺髓质系统,导致快速持久的细胞免疫功能抑制,主要表现为血液、脾和淋巴结中 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞等免疫细胞数量减少,TNF- α 和 IFN- γ 等细胞因子水平降低、IL-4 升高、Th1/Th2 转换^[4,20-21]。

本研究中,脑缺血大鼠外周血 IFN- γ 降低、IL-4 升高、Th1/Th2 细胞平衡失调(IFN- γ /IL-4 降低)、向 Th2 漂移,出现免疫抑制状态。与既往研究相比,再次证实了脑缺血后存在外周免疫抑制^[2-4]。予肌肽处理后,降低的 IFN- γ 、IFN- γ /IL-4 呈上升趋势,升高的 IL-4 呈下降趋势,与模型组比较均在 72 h 有统计学差异($P < 0.05$)。提示,肌肽通过提高外周血 IFN- γ 、降低 IL-4、提高 IFN- γ /IL-4,从而调整 Th1/

Th2 细胞的平衡失调,改善了脑缺血后外周免疫抑制,并可能与肌肽累积药量或用药的累积时间有关。其原因可能是肌肽通过降低活性氧的表达,增加抗氧化酶活性,减少大脑组织神经细胞凋亡,抗自由基作用,减轻了脑缺血引起的中枢神经损伤,从而改善了由中枢神经损伤诱导的外周免疫抑制^[5-14]。

综上所述,肌肽既具有脑保护作用,又能通过调节外周血 IFN- γ 、IL-4 水平,调节脑缺血后外周免疫抑制,但肌肽发挥免疫调节作用所需时间、持续时间以及最佳有效剂量还需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke[J]. *Nat Med*, 2009, 15(2):192-299
- [2] Wang HX, Mei YW. The effect of hyperglycemia on blood brain barrier of rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *JNMU*, 2005, 19(5):241-246
- [3] Meisel C, Schwab JM, Prass K, et al. Central nervous system injury induced immune deficiency syndrome[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(10):775-786
- [4] Xiong X, Gu L, Li L, et al. Gycyrrhizin protects against focal ischemia and attenuates peripheral immunosuppression in rats[J]. *Stroke*, 2011, 43(30):e67-e68
- [5] Wang JP, Yang ZT, Liu C, et al. L-carnosine inhibits neuronal cell apoptosis through signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway after acute focal cerebral ischemia[J]. *Brain Res*, 2013, 1507(1):125-133
- [6] Bae ON, Serfozo K, Baek SH, et al. Safety and efficacy evaluation of carnosine an endogenous neuroprotective agent for ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2013, 44(1):205-212
- [7] Rajanikant GK, Zemke D, Senut MC, et al. Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice[J]. *Stroke*, 2007, 38(11):3023-3031
- [8] Eksetine P, Kiray M, Ergur B. Carnosine attenuates oxidative stress and apoptosis in transient cerebral ischemia in rats[J]. *Acta Biologica Hungarica*, 2009, 60(2):137-148
- [9] Cheng J, Wang F, Yu DF, et al. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1):184-94
- [10] Horii Y, Shen J, Fujisaki Y, et al. Effects of L-carnosine on splenic sympathetic nerve activity and tumor proliferation[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 510(1):1-5
- [11] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91
- [12] 邹浩军, 林莉莉, 孙雪竹, 等. 甲磺酸桂哌齐特对缺血再灌注脑损伤大鼠的保护作用[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2013, 33(10):1396-1399
- [13] Guiott O A, Calderan A, Ruzza P, et al. Carnosine and carnosine related antioxidants: review [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(20):2293-2315
- [14] Dobrotad, Fedorovat, Stvolinskys, et al. Carnosine protects the brain of rats and Mongolian gerbils against ischemic injury after-stroke-effect[J]. *Neurochem Res*, 2005, 30(10):1283-1288
- [15] Shen Y, He P, Fan YY, et al. Carnosine protects against permanent cerebral ischemia in histidine decarboxylase knockout mice by reducing glutamate excitotoxicity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(5):727-735
- [16] Eksetin CP, Kiray M, Ergur BU. Carnosine attenuates oxidative stress and apoptosis in transient cerebral ischemia in rats[J]. *Acta Biologica Hungarica*, 2009, 60(2):137-148
- [17] Pinteaux E, Rothwell NJ, Boutin H. Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia [J]. *Glia*, 2006, 53(5):551-556
- [18] Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(3):464-479
- [19] Chapman KZ, Dale VQ, Denes A, et al. A rapid and transient peripheral inflammatory response precedes brain inflammation after experimental stroke [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(11):1764-1768
- [20] Prass K, Braun JS, Dimagi U, et al. Stroke propagates bacterial aspiration to pneumonia in a model of cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2006, 37(10):2607-2612
- [21] Chamorro A, Urra X, Planas AM. Infection after acute ischemic stroke a manifestation of brain-induced immunodepression [J]. *Stroke*, 2007, 38(3):1097-1103

[收稿日期] 2014-06-06