

肌肽对局灶性脑缺血大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响

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:观察肌肽对局灶性脑缺血大鼠外周血中 T 淋巴细胞免疫功能的影响,探讨肌肽脑保护作用的免疫学机制。方法:将 36 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组(12 只)、模型组(12 只)和肌肽组(12 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。分别于造模后清醒时、缺血后 24、72 h 采用 Longa 评分法进行神经功能评分,于缺血后 24、72 h 流式细胞仪测定外周血 T 细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)水平,并计算 CD4⁺/CD8⁺值;于缺血后 72 h 用 TTC 染色测量脑梗死体积。结果:模型组与肌肽组均可见大脑中动脉供血区梗死灶,肌肽组梗死灶较模型组缩小($P < 0.05$);造模后清醒时、缺血后 24 h 的肌肽组神经功能缺损评分与模型组比较无差异($P > 0.05$),缺血后 72 h 肌肽组神经功能缺损评分较模型组降低($P < 0.05$);缺血后 24、72 h,模型组外周血 CD3⁺、CD4⁺及 CD4⁺/CD8⁺值明显低于假手术组($P < 0.05$),CD8⁺水平明显高于假手术组($P < 0.05$),缺血后 72 h 肌肽组 CD8⁺水平明显低于模型组($P < 0.05$)。结论:肌肽对脑缺血大鼠外周免疫抑制有调节作用,其机制可能与升高 CD3⁺水平、CD4⁺/CD8⁺值和降低 CD8⁺水平有关。

[关键词] 肌肽;脑缺血;T 淋巴细胞;免疫

[中图分类号] R743

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1333-04

doi:10.7655/NYDXBNS20141009

Effects of carnosine on T-lymphocyte immunity 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 effects of carnosine on peripheral blood T-lymphocyte immunity in MCAO rats and the neuroprotective mechanisms. **Methods:** Thirty-six male SD rats were randomly divided into three groups: the sham-operated group ($n=12$), the model group ($n=12$), and the carnosine-treated group ($n=12$). The middle cerebral artery occlusion model was established by suture method in the model group and the carnosine-treated group. After establishment of MCAO model, the rats in the carnosine-treated group were lavaged with soluble carnosine once a day at the dose of 1 000 mg/kg, and the same volume of normal saline was lavaged in the sham operation and model group. The neurological function was scored with Longa 5-point scale at baseline, 24 h and 72 h. The level of peripheral blood T-lymphocyte subset (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) was detected by flow cytometry at 24 and 72 h, and calculate CD3⁺/CD8⁺ ratio. The infarction volume was revealed by TTC stain at 72 h. **Results:** The infarction volume was detected in both of the model group and the carnosine-treated group. Compared with the model group, the infarction volume was smaller ($P < 0.05$); Compared with the model group, there was no significant different in the neurological outcome scores in the carnosine-treated group at baseline and 24 h ($P > 0.05$); however, there was a significant decrease at 72 h of the carnosine-treated group ($P < 0.05$); Compared with the sham-operated group, the level of CD3⁺, CD4⁺ and the CD4⁺/CD8⁺ ratio was significant decreased ($P < 0.05$) and the level of CD8⁺ was increased in the model group at 24 and 72 h ($P < 0.05$). Compared with the model group, the level of CD8⁺ was significant decreased in the carnosine-treated group at 72 h ($P < 0.05$). **Conclusions:** Carnosine could has potential protective effective on peripheral immune suppression of MCAO rats and the mechanism could be CD3⁺, CD4⁺/CD8⁺ elevation and CD8⁺ inhibition.

[Key words] carnosine; ischemic stroke; T-lymphocyte; immunity

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10):1333-1336]

[基金项目] 江苏省青蓝工程;江苏省优势学科(YSHL0201-26)

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

近年来脑缺血与 T 细胞亚群的联系受到重视。脑缺血后出现中枢神经损伤诱导的免疫抑制综合征,可引起 T 淋巴细胞免疫功能下降^[1-2]。应用免疫调节剂可以改善脑缺血后的免疫抑制^[3]。研究表明^[4-8],肌肽对脑缺血性损伤具有保护作用,并有剂量效应性,以 1 g/kg 剂量为最佳;但研究多集中于抗氧化和细胞凋亡机制的探讨。肌肽应用于其他疾病的免疫调节研究已有报道^[9],本研究拟观察肌肽对脑缺血大鼠外周血 T 淋巴细胞免疫功能的影响,探讨肌肽脑保护作用的免疫学机制。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性健康 SD 大鼠 36 只,体质量(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]。

肌肽(货号 C9625, Sigma 公司,美国);Anti-rat CD3 (APC)CD3 抗体(货号 17-0030-82,批次 E16086-102, eBioscience 公司,美国);Anti-rat CD4(FITC)CD4 抗体(货号 201505,批次 B167824, Biolegend 公司,美国);Anti-rat CD8 (PE)CD8a 抗体(货号 201705,批次 B148634, Biolegend 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及给药

将大鼠随机分成 3 组,即假手术组、模型组和肌肽组。肌肽组于造模后按体质量 1 g/(kg·d)予肌肽水溶液灌胃,每天 2 次。假手术组、模型组予等量生理盐水灌胃,首次灌胃的时间应在造模后的 6 h 内。

1.2.2 大鼠局灶性脑缺血模型(MCAO)制备

根据改良的 Longa 法^[10]制成大鼠右侧大脑中动脉缺血模型。假手术组手术过程同模型组,但不阻塞血管。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行走时向左侧倾倒,上述状况出现一种即造模成功。缺血后 24、72 h 每个时点每组选造模成功大鼠 6 只进入实验。

1.2.3 神经功能缺损评分

参照 Longa^[10]5 分法,于大鼠大脑缺血后清醒时以及缺血后 24、72 h 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:提尾倒悬时不能伸展左侧前肢;2 分:行走时向左侧旋转;3 分: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 TTC 染色测量脑梗死体积

缺血后 72 h,将实验大鼠用 10%水合氯醛麻醉后,断头放血,迅速取脑,置于冷生理盐水中洗净组

织表面血液,后迅速放入-20℃冰箱内 20 min,取出后切除额极,自视交叉水平开始,间隔 2 mm,做等距离连续 5 个冠状脑切片。将切片立即置于 2% TTC 溶液中,于 37℃避光孵育 30 min,用 10%福尔马林 4℃避光固定 24 h 后,肉眼观察白色梗死灶及正常红色脑组织并扫描成像,利用 Image pro-Plus6.0 图像处理软件计算每张切片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。

1.2.5 外周血 T 细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)检测

各组大鼠均在缺血后 24、72 h (完成神经功能缺损评分后)经腹主动脉采血,按试剂盒说明书分离和保存血清。使用美国 Beckman 流式细胞仪 FC500MPL 测定 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)水平,并计算 CD4⁺/CD8⁺值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本均数间的比较采用成组设计的 *t* 检验,多个样本均数间的比较采用单因素方差分析,组间两两均数比较用 LSD 法, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组各时点神经功能缺损评分

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,造模后清醒时、缺血后 24 h 肌肽组神经功能缺损评分无统计学差异($P > 0.05$),缺血后 72 h 肌肽组神经功能缺损评分降低($P < 0.05$,表 1)。

表 1 各组各时点神经功能缺损评分比较

组别	缺血后 24 h	缺血后 72 h
模型组	2.08 ± 0.61	2.01 ± 0.63
肌肽组	2.06 ± 0.41	1.02 ± 0.11*

与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 TTC 染色测量脑梗死体积

假手术组未见梗死灶,模型组与肌肽组均可见明显梗死灶。与模型组[(40.47 ± 21.01)%]比较,肌肽组[(15.78 ± 12.72)%]脑梗死体积缩小($P < 0.05$,图 1)。

2.3 各组各时点外周血 T 细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)水平及 CD4⁺/CD8⁺值

与假手术组相比,模型组大鼠缺血后 24、72 h 外周血 CD3⁺、CD4⁺水平及 CD4⁺/CD8⁺值明显低于假手术组

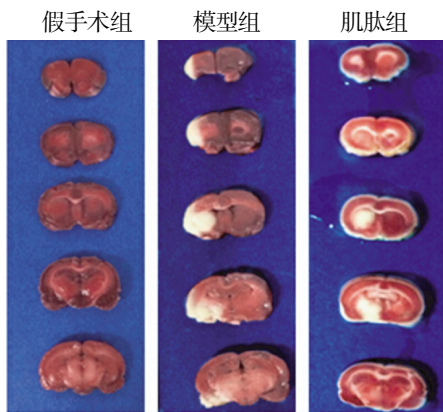
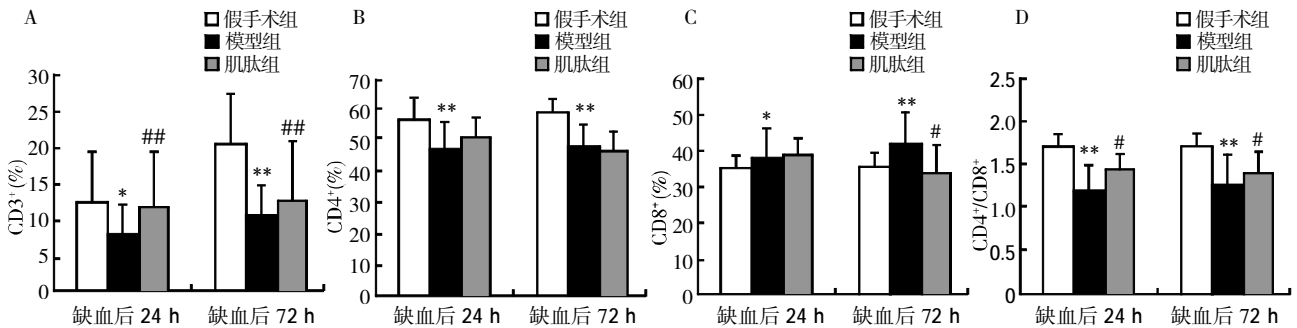


图 1 各组 TTC 染色结果

Figure 1 TTC stain of brains of each group



与假手术组相比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相比# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 2 各组各时点外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 水平及 CD4⁺/CD8⁺ 值比较

Figure 2 Comparison of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in each group

血液灌注不足,发生缺氧、缺血的病理生理演变过程,最终导致神经元死亡和神经功能受损。

本研究结果表明,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,假手术组未见梗死灶,模型组与肌肽组均可见明显梗死灶(图 1),与模型组比较,造模清醒时神经功能缺损评分无统计学差异($P > 0.05$),说明本次实验造模成功,且肌肽组与模型组两者具有可比性;与模型组比较,缺血后 72 h 肌肽组神经功能缺损评分降低、脑梗死体积缩小(P 均 < 0.05)。表明肌肽能不同程度改善缺血大鼠的神经功能障碍、减少脑梗死体积,能减轻缺血后继发性损伤。与既往研究一致^[4,11-12]。

缺血后继发性脑损伤激发了系列免疫级联反应,引起了严重的外周免疫抑制^[13]。其特点是严重、持久的淋巴细胞减少和功能改变^[2]。淋巴细胞主要指 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞,T 淋巴细胞亚群的数量和活性是细胞免疫功能的直接反映,在细胞免疫中起着重要的调节作用,主要由 CD3⁺(反映淋巴细胞的总体水平)、CD4⁺(辅助性 T 淋巴细胞)和 CD8⁺

($P < 0.05$),CD8⁺水平明显高于假手术组($P < 0.05$)。

与模型组相比,肌肽组大鼠缺血后 24、72 h 外周血 CD3⁺水平明显高于模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$);而缺血后 24、72 h 外周血 CD4⁺水平、缺血后 24 h 的 CD8⁺水平与模型组比较,无明显差异 ($P > 0.05$);缺血后 72 h 外周血 CD8⁺水平明显低于模型组($P < 0.05$);肌肽组大鼠缺血后 24、72 h,外周血 CD4⁺/CD8⁺值明显高于模型组($P < 0.05$,图 2)。

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

(杀伤性 T 淋巴细胞)等主导;体内 CD4⁺、CD8⁺保持一定的比例,一起参与免疫应答过程,CD4⁺/CD8⁺值能初步评估机体免疫状态,比值降低,提示免疫调节功能和 T 细胞活化异常,细胞免疫功能受损,是机体病变程度和预后不良的重要标志之一;比值增大,提示免疫应答的正调节占优势^[14-15]。脑缺血后下丘脑-垂体-肾上腺轴功能活动增强、内皮素增加、肾上腺皮质激素增加、白细胞从外周血和脾脏快速渗入脑组织,导致外周血 CD3⁺、CD4⁺水平下降^[16]。

研究表明,脑梗死大鼠外周血 T 淋巴细胞数量及其分泌的炎性细胞因子在 MCAO 后 24、72 h 变化最为明显^[17-18],故本研究选择这 2 个时间点为观测时点。图 2 提示,脑缺血后大鼠免疫功能下降,模型组缺血后 24、72 h 外周血 CD3⁺水平及 CD4⁺/CD8⁺值明显低于假手术组 ($P < 0.05$),CD8⁺水平明显高于假手术组($P < 0.05$),而 CD4⁺水平则无明显差异,可能是脑缺血后 T 淋巴细胞亚群向 CD8⁺T 淋巴细胞方向偏移,发生了以免疫抑制为主的效应,这与既往研究一致^[19]。

与模型组相比,肌肽组缺血后 24、72 h 外周血

CD3⁺水平及 CD4⁺/CD8⁺值明显提高($P < 0.05$),表明肌肽处理后明显提高脑缺血大鼠 CD3⁺水平、CD4⁺/CD8⁺值。此外,肌肽组与模型组相比,脑缺血 24、72 h CD4⁺水平、缺血后 24 h CD8⁺水平无明显差异($P > 0.05$),但缺血后 72 h CD8⁺水平有明显降低($P < 0.05$),其可能原因是,肌肽主要作用于 CD8⁺T 淋巴细胞,降低了其水平,提高了 CD4⁺/CD8⁺值,使机体免疫应答趋向正调节,从而提高脑缺血大鼠的细胞免疫功能。

综上所述,肌肽对脑缺血大鼠既具有脑保护作用,又能调节外周血 T 淋巴细胞水平,对脑缺血后外周免疫抑制具有调节作用。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): 192-199
- [2] 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
- [3] Xiong X, Gu L, Li L, et al. Gycyrhizin protects against focal ischemia and attenuates peripheral immunosuppression in rats[J]. *Stroke*, 2011, 43(30): e67-e68
- [4] 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, 15(7): 125-133
- [5] 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
- [6] 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
- [7] Pekcetin C, Kiray M, Erqur BU, et al. Carnosine attenuates oxidative stress and apoptosis in transient cerebral ischemia in rats[J]. *Acta Biologica Hungarica*, 2009, 60(2): 137-148
- [8] 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): 184-194
- [9] Yuko H, Jiao S, Yoshiyuki F, et al. Effects of L-carnosine on splenic sympathetic nerve activity and tumor proliferation[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 510(1): 1-5
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91
- [11] Dobrota D, Fedorova T, Stvolinsky S, 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
- [12] 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
- [13] Vogelgesang A, Dressel A. Immunological consequences of ischemic stroke: immunosuppression and autoimmunity[J]. *J Neuroimmunol*, 2011, 231(1-2): 105-110
- [14] Biondo PD, Goruk S, Ruth MR, et al. Effect of CVT-E002 (COLDFX) versus a ginsenoside extract on systemic and gut-associated immune function[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(8): 1134-1142
- [15] Mehrzad J, Zhao X. T lymphocyte proliferative capacity and CD4⁺/CD8⁺ ratio in primiparous and pluriparous lactating cows[J]. *J Dairy Res*, 2008, 75(4): 457-465
- [16] Andersson J. The inflammatory reflex-introduction[J]. *J Int Med*, 2005, 257(2): 122-125
- [17] Chang L, Chen Y, Li J, et al. Cocaine and amphetamine-regulated transcript modulates peripheral immunity and protects against brain injury in experimental stroke[J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(2): 260-269
- [18] 张金华, 闫福岭. 脑梗死大鼠外周血促炎/抗炎细胞因子的动态变化[J]. *中华脑血管病杂志*, 2010, 4(2): 88-94
- [19] Collier CP, Mattersteig G, Wong EW, et al. Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression[J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3): 1098-1111

[收稿日期] 2014-06-19