

## · 基础研究 ·

## IL-10 对脑出血大鼠 HSP70、caspase-3 表达的影响\*

蒋国红, 黄良国, 施迎兵

(遵义医学院附属医院神经内科, 贵州遵义 563003)

**摘要:**目的 观察白细胞介素 10(IL-10)对出血性颅脑损伤大鼠脑组织热休克蛋白 70(HSP70)、胱天蛋白酶 3(caspase-3)表达的影响,以探讨 IL-10 对出血性颅脑损伤的保护作用及机制。方法 96 只 SD 大鼠随机分为正常组(N 组)、模型组(M 组)、IL-10 低剂量组(L 组)、IL-10 高剂量组(H 组)。Ⅶ型胶原酶注射法制备颅脑损伤模型,记录各组 6 h、12 h、1 d、3 d、7 d 大鼠神经功能改善程度;免疫组化法测定 HSP70 和 caspase-3 的表达。结果 与 M 组比较,L 组和 H 组 HSP70 表达明显升高( $P < 0.01$ ),caspase-3 表达明显降低( $P < 0.01$ ),神经功能缺损评分明显下降( $P < 0.01$ ),且以 H 组更为显著( $P < 0.05$ )。结论 IL-10 可通过上调 HSP70 表达及抑制 caspase-3 表达对出血性颅脑损伤起保护作用。

**关键词:**脑出血;白细胞介素 10;胱天蛋白酶 3;HSP70 热休克蛋白类;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.19.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)19-1948-03

## Effect of IL-10 on expressions of HSP70 and caspase-3 after intracerebral hemorrhage in rats\*

Jiang Guohong, Huang Liangguo, Shi Yingbing

(Department of Neurology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**Abstract: Objective** To observe the effects of IL-10 on expression of HSP70 and caspase-3 after intracerebral hemorrhage in rats and study the neuroprotection mechanism of IL-10 for intracerebral hemorrhage. **Methods** 96 SD rats were randomly divided into four groups: normal group(group N), model group(group M), Low-dose IL-10 treatment group(group L) and high-dose IL-10 treatment group(group H). The intracerebral hemorrhage rat model was established by intracranial injection of Ⅶ collagenase. The recovery of rats' neurological function of all groups was recorded after 6 h, 12 h, 1 d, 3 d, 7 d; The expressions of HSP70 and caspase-3 were analyzed by immunohistochemistry. **Results** The expression of HSP70 in perihematoma in group L and H were up-regulated( $P < 0.01$ ), caspase-3 and the score of neurologic impairment were downregulated as compared to M group( $P < 0.01$ ). The above roles of IL-10 were more significant in group H( $P < 0.05$ ). **Conclusion** IL-10 plays protective role in hemorrhagic brain damage by upregulation of HSP70 and downregulation of caspases-3.

**Key words:** cerebral hemorrhage; interleukin-10; caspase-3; HSP70 heat-shock proteins; apoptosis

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是人类的常见病和多发病,其以较高的发病率、致残率和病死率严重地影响着人类的健康。细胞凋亡是出血性颅脑损伤的重要机制之一<sup>[1]</sup>。胱天蛋白酶 3(caspase-3)是目前已知的促凋亡蛋白,在细胞凋亡过程中起关键作用<sup>[2]</sup>;而热休克蛋白 70(heat shock proteins 70, HSP70)则作为一种细胞内源性保护蛋白,发挥着抑制细胞凋亡的作用。本实验拟探讨白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)对这两种蛋白在脑出血大鼠脑内表达的影响,为临床治疗脑出血提供新思路。

## 1 材料与方

**1.1 实验动物** 健康 SD 大鼠 96 只,清洁级,雌雄不拘,体质量 250~300 g,由第三军医大学大坪医院动物中心提供[许可证号 SCXK(渝)2007-0005]。实验大鼠随机分为正常组(N 组,  $n=6$ ),模型组(M 组,  $n=30$ ),IL-10 低剂量组(L 组,  $n=30$ ),IL-10 高剂量组(H 组,  $n=30$ )。除正常组外,其余各组分为造模后 6 h、12 h、1 d、3 d 及 7 d 这 5 个时间点,每个时间点随机选择 6 只大鼠进行检测。

**1.2 主要仪器与试剂** 大鼠脑立体定位仪(日本 SETA-GAYA-KU, TOKY),图像处理显微镜(德国 LEICA-DM 1000),石蜡切片机(德国 LEICA-RM-2145),IL-10(英国 Pep-

roTech EC 公司),Ⅶ型胶原酶(美国 Sigma BioScience 公司),caspase-3 及 HSP70 试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)。

## 1.3 方法

**1.2.1 模型制备和给药方法** 实验大鼠术前 12 h 禁食,4 h 禁水,用 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,俯卧位固定于立体定位仪。局部消毒后“T”字形剪开颅顶皮肤,按《大鼠脑立体定位图谱》定位尾状核<sup>[3]</sup>,向大鼠右侧尾状核缓慢注入 0.5  $\mu$ L 胶原酶,留针 10 min 后缓慢拔出穿刺针,缝合皮肤,局部消毒。待动物苏醒后,放回笼内饲养,给予正常进食饮水,保持室温 37  $^{\circ}$ C 左右。N 组不做任何处理。其余各组造模成功后,M 组术后 3 h 以 1 mL 生理盐水腹腔注射,以后每天 1 次;L 组术后 3 h 将 IL-10(5  $\mu$ g/kg)加生理盐水至 1 mL 腹腔注射,以后每天 1 次;H 组术后 3 h 将 IL-10(30  $\mu$ g/kg)加生理盐水至 1 mL 腹腔注射,以后每天 1 次。

**1.2.2 神经功能缺损评分** 在各组相应时间点采用平衡木行走测试进行神经功能缺损评分<sup>[4]</sup>。该项目评分标准共分为 6 个等级。0 分:大鼠能跳上平衡木并在上面移动而不会掉下;1 分:大鼠能跳上平衡木并在上面移动,掉下概率小于或等于 50%;2 分:大鼠能跳上平衡木并在上面移动,掉下概率大于 50%;3 分:在健侧肢体帮助下能跳上平衡木,但受累的瘫痪肢

\* 基金项目:遵义医学院硕士启动基金[院字(2007)26 号]。

表 1 M、L、H 组大鼠不同时间点神经功能缺损评分比较( $\bar{x} \pm s$ , 分,  $n=6$ )

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	7 d
M 组	4.00±0.77	3.58±0.58	3.33±0.40	3.25±0.52	2.50±0.71
L 组	4.17±0.61	3.58±0.37	2.42±0.49▲	1.83±0.41▲	1.50±0.32▲
H 组	4.16±0.75	3.33±0.41	1.67±0.41▲☆☆	1.67±0.52☆	0.58±0.20▲☆☆

▲:  $P < 0.01$ , 与 M 组比较; ☆:  $P < 0.05$ , ☆☆:  $P < 0.01$ , 与 L 组比较。

表 2 各组不同时间点 HSP70 阳性细胞数表达比较( $\bar{x} \pm s$ , 个,  $n=6$ )

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	7 d
N 组	2.37±0.63	—	—	—	—
M 组	25.00±1.13	54.07±4.31	81.50±4.95	61.16±6.75	47.28±6.15
L 组	25.99±1.80	55.95±4.54	102.24±9.11▲	92.88±6.41▲	71.84±5.81▲
H 组	25.16±0.74	62.35±4.65▲☆☆	110.78±2.87▲☆☆	103.45±4.80▲☆☆	94.62±6.01▲☆☆

—: 表示此项无数据; ▲:  $P < 0.01$ , 与 M 组比较; ☆:  $P < 0.05$ , ☆☆:  $P < 0.01$ , 与 L 组比较。

表 3 各组不同时间点 caspase-3 阳性细胞数( $\bar{x} \pm s$ , 个,  $n=6$ )

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	7 d
N 组	1.72±0.86	—	—	—	—
M 组	25.97±3.99	54.62±5.01	112.65±9.31	92.47±5.24	60.65±5.26
L 组	26.00±2.37	48.13±1.70▲	88.44±2.24▲▲	64.05±5.82▲▲	41.83±4.15▲▲
H 组	25.42±0.90	46.70±1.23▲▲	78.71±2.06▲▲☆☆	53.27±4.85▲▲☆☆	29.52±3.68▲▲☆☆

—: 表示此项无数据; ▲:  $P < 0.05$ , ▲▲:  $P < 0.01$ , 与 M 组比较; ☆☆:  $P < 0.01$ , 与 L 组比较。

体不能帮助其向前移动; 4 分: 大鼠在平衡木上不能移动, 但不能掉下; 5 分: 将大鼠放在平衡木上即会掉下。评分越高, 神经功能缺损越重。

**1.2.3 检测方法** 在相应时间点用水合氯醛麻醉大鼠, 快速断头取脑。沿穿刺针道冠状面自上向下切开至尾状核处, 可见血肿灶。以穿刺点为中心, 冠状面取厚度 5 mm 脑组织置于 4% 多聚甲醛液中固定 4 h, 脱水后石蜡包埋。以血肿灶为中心制作厚度为 4  $\mu$ m 水平位脑组织切片待测。HSP70 和 caspase-3 免疫组织化学染色严格按照说明书步骤进行。在高倍光镜下( $\times 400$ ), 每张切片计数血肿周边不重叠 5 个视野阳性细胞数, 计算平均值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 神经功能缺损评分** 造模 1、3、7 d 后, L 组与 H 组大鼠神经功能缺损评分均明显低于 M 组( $P < 0.01$ ); 造模 1、3、7 d 后, H 组大鼠神经功能缺损评分明显低于较 L 组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 1。

**2.2 IL-10 对血肿周围组织 HSP70 表达的影响** N 组血肿周围组织 HSP70 表达很少, 其余 3 组造模 6 h 后 HSP70 表达即有增加, 造模 1 d 达高峰, 之后逐渐下降, 造模 7 d 后仍有较高表达。造模 12 h 及 1、3、7 d 后, H 组 HSP70 表达高于 L 组及 M 组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。造模 6、12 h 后, L 组 HSP70 表达与 M 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 造模 1、3、7 后, L 组 HSP70 表达明显高于 M 组( $P < 0.01$ )。见表 2, 封 2 图 1~4。

**2.3 IL-10 对血肿周围组织 caspase-3 表达的影响** caspase-3

在 N 组表达很少, 其余 3 组造模 6 h 后表达开始增加, 造模 1 d 达高峰, 之后逐渐下降。造模 12 h 后, H 组与 L 组 caspase-3 表达水平均低于 M 组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); H 组与 L 组之间比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ); 造模 1、3、7 d 后, D、L、H 3 组间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 3, 封 2 图 5~8。

**3 讨 论**

IL-10 是重要的炎症抑制因子, 在体内存在多种活性。近年来研究表明 IL-10 参与了神经细胞凋亡过程<sup>[5]</sup>, 可为神经损伤修复提供适宜的微环境<sup>[6]</sup>, 具有神经保护作用<sup>[7]</sup>。既往研究多集中于缺血性脑血管病方面, 对出血性颅脑损伤研究较少。颅脑出血后导致的损伤机制复杂, 其组织损伤是多因素参与、多途径进行的复杂过程, 目前仍缺乏有效的治疗方法。脑出血后会引系统性的抗炎反应, 诱导 IL-10 水平升高, 对脑微循环起保护作用<sup>[8]</sup>, 但应激产生的 IL-10 不足以抑制脑出血后继发炎症反应及凋亡的有害作用<sup>[4]</sup>。本研究通过应用外源性 IL-10 治疗脑出血大鼠, 观察 IL-10 对 HSP70、caspase-3 表达的影响, 探讨 IL-10 对出血性脑损伤的脑保护作用及其机制。

HSP 是一个庞大的糖蛋白超基因家族, 具有分子伴侣、调控细胞周期和参与应激等广泛的生物学功能, 对缺血性损伤有保护作用<sup>[9]</sup>, 其中 HSP70 在应激条件下合成最为迅速。正常情况下, HSP70 mRNA 在细胞内有稳定表达, 但很快被降解, 所以正常脑组织中 HSP70 mRNA 及蛋白质含量极少。在脑出血等应急状态下, 当其他蛋白合成受抑制时, HSP70 表达反而增加<sup>[10]</sup>。

本研究发现, 在脑出血早期 HSP70 及 caspase-3 均有较高表达, 1 d 达高峰, 此后逐渐降低。阳性细胞的细胞核及胞质中均可见到棕黄色、棕色或棕褐色颗粒。应用 IL-10 进行干预

后, HSP70 表达更明显, 且有量效关系, 而 caspase-3 表达则相反。这表明 IL-10 与 HSP70 及 caspase-3 的表达存在密切关系。高表达的 HSP70 除起到分子伴侣及对抗内源性损伤因子毒性而起到脑保护作用外, 抑制神经细胞凋亡也是其重要的脑保护机制<sup>[11]</sup>。HSP70 可通过抑制蛋白激酶 c-jun 氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK)和 P38 的活性, 抑制 caspase-3 表达, 干扰细胞色素 C 与凋亡蛋白酶激活因子-1 (apoptosis protease activating factor-1, Apaf-1) 结合, 阻断凋亡小体的形成, 从而抑制细胞凋亡<sup>[12]</sup>。说明 HSP70 抗凋亡作用可能是通过抑制 caspase-3 活性实现的。

近年来研究表明, caspase 家族在凋亡过程中起重要作用。已有许多证据表明脑细胞缺血死亡与 caspase-3 活化有关。在细胞凋亡过程中 caspases-3 处于核心位置, 认为 caspase-3 是 caspase 级联瀑布下游最关键的凋亡蛋白酶, caspase-3 的激活可以认为是细胞凋亡的标志<sup>[13]</sup>。本研究发现, 应用 IL-10 干预后各组 caspase-3 水平自 12 h 起开始降低, 且随 IL-10 剂量增大下降更显著。这提示脑出血后 IL-10 升高可能使 caspase-3 表达受到抑制, 减少神经细胞凋亡, 从而起到促进神经功能恢复, 保护神经细胞的作用。IL-10 对 caspase-3 抑制作用可能表现为两方面: (1) IL-10 可通过上调 HSP70 表达来抑制 caspase-3 表达, 从而减少细胞凋亡, 起到神经保护作用; (2) IL-10 可以直接抑制 caspase-3 诱导的细胞凋亡, 认为 IL-10 是一种有效的 caspase-3 抑制剂, 可以抑制 caspase-3 活性<sup>[14]</sup>, 并通过阻止 caspase-3 参与由兴奋性氨基酸诱导的细胞凋亡<sup>[15]</sup>。

神经功能恢复是脑出血治疗的最终目标, 也是评价药物疗效的重要指标。本研究大鼠行为学评分结果表明, 应用 IL-10 干预后 1、3、7 d L 组及 H 组大鼠运动功能较 M 组明显改善, 而 IL-10 高剂量组改善更明显, 其分值随治疗时间的延长而逐渐下降, 此变化趋势与 HSP70 表达增加及 caspase-3 表达下降的变化结果相吻合。表明应用 IL-10 可通过上调 HSP70 表达及抑制 caspase-3 表达, 减少脑出血后神经细胞凋亡, 从而显著降低脑出血后神经功能评分, 促进脑出血后神经功能恢复。这可能是 IL-10 对出血性脑损伤的保护作用机制之一。

#### 参考文献:

- [1] Zhang XQ, Zhang ZM, Yin XL, et al. Exploring the optimal operation time for patients with hypertensive intracerebral hemorrhage; tracking the expression and progress of cell apoptosis of prehematomal brain tissues[J]. *Chin Med J*, 2010, 123(10):1246-1250.
- [2] Avramovich-Tirosh Y, Amit T, Bar-Am O, et al. Therapeutic targets and potential of the novel brain-permeable multifunctional Iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drug, M-30, for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Neurochem*, 2007, 100(2):490-502.
- [3] Paxinos G, Watson C. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 诸葛启训, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 6.
- [4] 孙皓, 郭富强, 王多姿, 等. 脑出血大鼠脑组织白介素-10 和半胱氨酸蛋白酶-3 表达的改变[J]. *临床神经病学杂志*, 2010, 23(1):31-33.
- [5] Xu AJ, Zhu W, Tian F, et al. Recombinant adenoviral expression of IL-10 protects beta cell from impairment induced by pro-inflammatory cytokine[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 344(1-2):163-171.
- [6] Morita Y, Takizawa S, Kamiguchi H, et al. Administration of hematopoietic cytokines increases the expression of anti-inflammatory cytokine (IL-10) mRNA in the subacute phase after stroke[J]. *Neurosci Res*, 2007, 58(4):356-360.
- [7] Shi W, Wang Z, Pu J, et al. Changes of blood-brain barrier permeability following intracerebral hemorrhage and the therapeutic effect of minocycline in rats[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 110(Pt 2):61-67.
- [8] Londoño D, Carvajal J, Arguelles-Grande C, et al. Interleukin 10 protects the brain microcirculation from spirochetal injury[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008, 67(10):976-983.
- [9] Manaenko A, Fathali N, Chen H, et al. Heat shock protein 70 upregulation by geldanamycin reduces brain injury in a mouse model of intracerebral hemorrhage[J]. *Neurochem Int*, 2010, 57(7):844-850.
- [10] Fang HY, Ko WJ, Lin CY. Inducible heat shock protein 70, interleukin-18, and tumor necrosis factor alpha correlate with outcomes in spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. *J Clin Neurosci*, 2007, 14(5):435-441.
- [11] 邱烈, 管勤, 袁英. HSP70 对组织细胞的保护[J]. *重庆医学*, 2009, 38(15):1977-1980.
- [12] Yousuf S, Atif F, Ahmad M, et al. Selenium plays a modulatory role against cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat hippocampus[J]. *Brain Res*, 2007, 1147(25):218-225.
- [13] Jie X, Wei CZ, Xu CQ, et al. Rifampicin protects PC12 cells against MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis and inhibits the expression of an synuclein multimer[J]. *Brain Res*, 2007, 30(1139):220-225.
- [14] Li JQ, Qi HZ, He ZJ, et al. Cytoprotective effects of human interleukin-10 gene transfer against necrosis and apoptosis induced by hepatic cold ischemia/reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2009, 157(1):e71-e78.
- [15] Xi GH, Richard FK, Julian TH. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage[J]. *Lancet Neurol*, 2006, 5(1):53-63.

(收稿日期: 2011-08-10 修回日期: 2012-01-29)