

· 基础研究 ·

# 缺血预处理对局灶性缺血大鼠脑梗死区周围 TLR4 及 GFAP 表达的影响\*

胡晓松<sup>1</sup>, 宋海星<sup>1</sup>, 刘静<sup>1</sup>, 杨拯<sup>1</sup>, 李鑫<sup>2△</sup>

(成都医学院:1. 基础医学实验教学中心;2. 人体解剖学教研室, 成都 610083)

**摘要:**目的 观察局灶性脑缺血预处理(CIP)对 Toll 样受体 4(TLR4)及胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响,探讨 TLR4 介导的炎性信号通路及星形胶质细胞活化在诱导脑缺血耐受(BIT)发生中的作用。**方法** 第 1 次脑缺血 20 min 作为预处理,72 h 后行持续 2 h 的第 2 次局灶性脑缺血。45 只 SD 雄性大鼠随机分为脑缺血预处理(CIP)组、大脑中动脉阻塞(MCAO)组、假手术(sham)组。MCAO 组第 1 次脑缺血以假手术代替,假手术组两次均为假手术。第 2 次脑缺血后每组又分再灌注 6、24、72 h 等 3 个时间段。光学显微镜下观察脑组织病理改变,免疫组织化学染色和图像分析评价各组 TLR4 及 GFAP 的表达。**结果** CIP 组 TLR4 阳性细胞数明显低于同时时间段的 MCAO 组,而 GFAP 阳性细胞数则均高于同时时间段的 MCAO 组( $P < 0.05$ )。TLR4、GFAP 在 CIP 组及 MCAO 组的表达高峰均分别出现于再灌注后 6、72 h。**结论** 短暂的 CIP 可能通过抑制 TLR4 炎症信号通路,明显激活反应性星形胶质细胞,从而诱导脑缺血耐受的发生。

**关键词:** 脑缺血预处理; 脑缺血耐受; Toll 样受体 4; 胶质纤维酸性蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.29.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)29-3076-03

## Effect of cerebral ischemic preconditioning on expressions of TLR4 and GFAP around infarct area following focal ischemia in rat brains\*

Hu Xiaosong<sup>1</sup>, Song Haixing<sup>1</sup>, Liu Jing<sup>1</sup>, Yang Zheng<sup>1</sup>, Li Xing<sup>2△</sup>

(1. Basic Medical Experimental Teaching Centre; 2. Department of Human Anatomy, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610083, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expressions of TLR4 and GFAP in the ischemic tolerance induced by focal cerebral ischemic preconditioning and discuss the role of TLR4 inflammatory signaling pathway and activated astrocytes in brain ischemic tolerance (BIT). **Methods** 20 min middle cerebral artery occlusion (MCAO) by intraluminal filament was used as cerebral ischemic preconditioning (CIP). The second MCAO was induced for 2 h and operated at 72 h after CIP. 45 male SD rats were randomly divided into 3 groups (15 in each group): sham operation group received twice sham surgery only, and the other 2 groups received the second MCAO followed by 6 h, 24 h, 72 h reperfusion with CIP or sham surgery respectively. At the end of reperfusion the expressions of TLR4 and GFAP were detected by immunohistochemistry method in each group. **Results** The rate of TLR4 positive cells in the brain of CIP group was significantly lower than that of MCAO group at every time point tested ( $P < 0.05$ ). On the contrary, the number of GFAP labeled cells in CIP group was more than that of MCAO group. The expressions of TLR4 and GFAP peaked at 6 h and 72 h respectively both in CIP group and MCAO group. **Conclusion** These findings support the transient CIP could decrease the expression of TLR4 and restrain the following inflammation, furthermore, CIP might facilitate the proliferation and activation of astrocytes around infarct area to induce brain ischemic tolerance.

**Key words:** cerebral ischemic preconditioning (CIP); brain ischemic tolerance (BIT); TLR4; GFAP

近 10 年来人们对脑缺血临床治疗做了大量深入的研究,但真正能从基础研究应用到临床的神经保护治疗措施仍然甚少。脑缺血耐受 (brain ischemic tolerance, BIT) 是机体对损伤刺激固有的应激和防御反应,也是已知的内源性保护机制中作用最强大的。脑缺血预处理 (cerebral ischemic preconditioning, CIP) 是指预先给予一个短暂、非致死性的轻度脑缺血打击之后,将对致死性的缺血产生耐受<sup>[1]</sup>,但其作用机制目前仍不甚明了。星形胶质细胞 (astrocyte, AST) 作为神经元最重要的功能伙伴,虽然近年来 AST 在脑缺血领域得到广泛关注,但有关其在 BIT 中的作用却一直未得到足够的重视。本实验通过研究 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 及胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 在 CIP 后脑缺血梗死区周围的表达变化,旨在探讨 AST 活化在 BIT 诱导机制中的可能作用。

### 1 材料与方法

**1.1 动物分组** 健康 SD 大鼠, 雄性, 清洁级, 体质量 250~300 g 共 45 只。大鼠随机分为: (1) CIP 组, 给予 CIP 20 min, 3 d 后给予大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 2 h, 再灌注 6、24、72 h; (2) MCAO 组, 未行 CIP, 单纯暴露动脉处的解剖结构 20 min (假手术), 余同 CIP 组; (3) 假手术组, 两次均为假手术, 均为暴露解剖结构, 未进行缺血处理。每组各时间点 5 只。

**1.2 动物模型的制备** 大鼠术前 12 h 禁食不禁水, 以 4% 水合氯醛腹腔内注射麻醉 (7.5 mL/kg), 置仰卧位, 于颈部行长约 25.0 mm 常规纵行切口。暴露并钝性游离右侧颈总动脉 (CCA)、颈内动脉 (ICA) 及颈外动脉 (ECA), 结扎 ECA 远侧端, 动脉夹夹闭 CCA 近心端, 在结扎线近端距分叉 5 mm 处剪一约 0.2 mm 小口。用浸于  $2.5 \times 10^6$  U/L 肝素钠的长 6 cm、

直径 0.26 mm、头端圆钝的尼龙线从 ECA 残端插入,经 CCA 分叉部进入 ICA 约(19.0±0.5)mm,直至感觉有阻力时,即阻断大脑中动脉(MCA)入口处,结扎 ECA 近端。20 min 后轻轻抽出栓线约 10 mm 形成第 1 次再灌注,固定尼龙线并全层缝合切口。3 d 后再次麻醉大鼠,找到 ECA 结扎处,重新剪口插线阻断 MCA,结扎 ECA 的近心端,并留置尼龙线于体外,缝合皮肤。2 h 后抽出栓线,形成第 2 次再灌注。

**1.3 神经病学评分及 MCAO 模型成功的判断标准** MCAO 模型成功的纳入标准参照 Longa 法<sup>[2]</sup>,0 分:无神经功能缺损症状;1 分:轻度局灶性神经功能缺损(不能完全伸展右前肢);2 分:中度神经功能缺损(向右侧转圈);3 分,重度神经功能缺损(向右侧倾倒);4 分,不能自发行走,意识水平降低。动物出现神经功能缺损,无烦躁不安、抬头狂体征,评分在 1~3 分者纳入。

**1.4 取材制片** 大鼠脑缺血 2 h、于再灌注预定时间点麻醉后,用生理盐水经主动脉快速冲洗至右心耳流出液变清亮,迅速断头取脑(摒弃蛛网膜下腔出血者),立即置于-20℃冰箱冷冻 10 min,用脑切片器按 2 mm 厚度切片,选取距前囟点(Bregma)约 1.4~-0.6 mm 的脑片行免疫组织化学染色。4%多聚甲醛固定 12~24 h 后行脱水、透明、石蜡包埋。切片厚度 5 μm。

**1.5 固定、取材、切片** 动物在麻醉后开胸,经升主动脉插管,先用生理盐水 150 mL 冲去血液,继而灌注含 4%多聚甲醛的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.4) 300 mL,注毕立即取脑组织行后固定 6~24 h,石蜡包埋。

**1.6 免疫组织化学染色** 免疫组织化学采用即用型二步法,TLR4(1:200,Abcam 公司)及 GFAP(1:500,Chemicon 公司),二步法试剂 PV-6002 由北京中杉金桥生物公司(美国 Zymed 公司分装产品)提供。阴性对照用正常血清代替一抗。

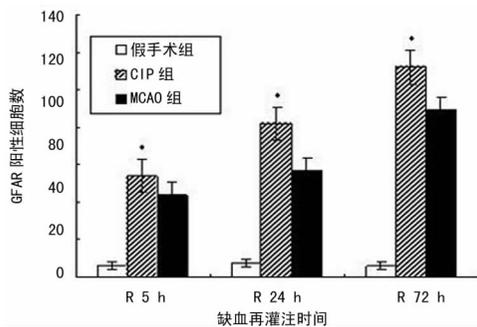
**1.7 图像分析及统计学处理** 阳性表达为结构完整、定位明确的着色较深(棕褐色)的细胞。切片在统一放大倍数(×400)下,随机选 6 个视野,输入 Image pro-plus6.0 图像分析系统,记取平均阳性细胞数。实验结果行方差分析,两两比较采用 *q* 检验。

**2 结 果**

**2.1 各组大鼠脑梗死灶周围 GFAP 的表达** 镜下 GFAP 阳性细胞可见两种类型,一种胞核肿胀、突起粗短、深染,主要分布于梗死区周围;另一种突起长而纤细,主要分布于缺血侧胼胝体、非缺血侧脑组织。此外,小血管和微血管壁,脑血管脉络膜和室管膜上皮亦有表达。假手术组 GFAP 表达较少,且较弱,少量小血管和微血管内皮细胞呈阳性反应。再灌注 6 h,即见 GFAP 明显表达,并随再灌注时间延长,有表达逐渐增强的趋势,再灌注 72 h 达到峰值。在缺血梗死区周围 GFAP 阳性细胞呈围绕梗死区的多层分布,突起深染、粗短,少数突起伸长、交织(彩插 II 图 1)。此外,侧脑室背外侧角可见较多沿胼胝体长轴平行排列的 GFAP 阳性细胞,突起较长,多伸向缺血梗死区。与 MCAO 组比较,同时间段 CIP 组 GFAP 阳性细胞数目明显较多(*P*<0.05)。据观察再灌注对照侧室管膜下区、纹状体、胼胝体等部位亦有 GFAP 胶质细胞样表达,但数目较缺血侧明显减少见图 2。

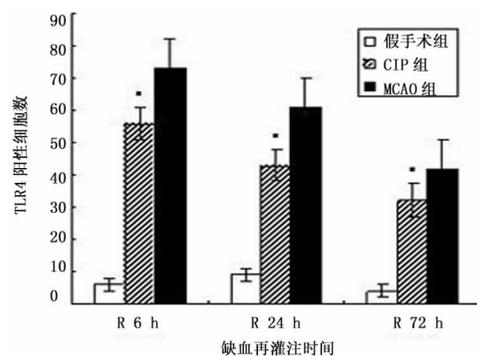
**2.2 各组大鼠脑梗死灶周围 TLR4 的表达** TLR4 阳性细胞主要表达于缺血侧纹状体、胼胝体、大脑皮质等处的神经胶质细胞、神经元及炎细胞等处。假手术组仅见微血管壁及脉络丛上皮、室管膜上皮等处的弱表达,TLR4 阳性表达产物在胞质。再灌注 6 h 起,在 MCAO 组,即见 TLR4 明显表达,并达高峰。再灌注 72 h 组梗死灶周围见较多成簇分布、体积增大

胞浆较淡的小胶质细胞,即格子细胞(gitter cell),多数胞浆中有 TLR4 颗粒状表达。此外,TLR4 胶质细胞样阳性细胞可见核肿胀及较短突起,颗粒细胞及锥体神经元均见 TLR4 的胞浆表达(彩插 II 图 3)。CIP 组 TLR4 与相应时间段 MCAO 组比较,均明显下降(*P*<0.05),见图 4。随再灌注时间延长,TLR4 表达逐渐降低。



\*: *P*<0.05, 与 MCAO 组比较。

图 2 不同再灌注时间段 GFAP 阳性细胞数( $\bar{x}\pm s, n=5$ )



\*: *P*<0.05, 与 MCAO 组比较。

图 4 不同再灌注时间段 TLR4 阳性细胞数( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

**3 讨 论**

脑缺血后,炎症反应是神经元死亡的重要机制,并贯穿整个脑缺血损伤的始终<sup>[3]</sup>。TLR4 作为门户蛋白启动机体的炎症链式反应,在跨膜信号转导受体家族 TLRs 中占有重要的位置<sup>[4]</sup>。研究表明,TLR4 主要通过识别结合细菌 LPS、HSPs、HMGB1、透明质酸等配体介导 MyD88 依赖和 TRIF 依赖的信号转导通路,从而诱导 IL-1、IL-6、IL-12、IL-8、IL-10、TNF-α 及 IFN-γ、MMP-9、iNOS、COX-2 等与脑缺血密切相关的炎性介质的释放<sup>[5-6]</sup>。

CIP 可激发机体内源性神经保护机制,从而减轻脑缺血再灌注损伤的严重程度。本实验结果显示,与假手术组比较,CIP 组及 MCAO 组的 TLR4 表达均于缺血再灌注早期(6 h)即达峰值,并随再灌注时间延长呈下降趋势;与 MCAO 组比较,同时间段 CIP 组 TLR4 阳性细胞数目均显著,结果证实预先给予一次短暂的 CIP 即可在脑缺血损伤早期抑制 TLR4 介导的炎性信号通路的过度活化。此外,本研究结果表明,TLR4 主要表达于缺血侧纹状体、胼胝体、大脑皮质等处,阳性细胞主要为小胶质细胞,与 Laflamme 和 Rivest<sup>[7]</sup>报道结果不同的是,本实验还发现 TLR4 在以上脑区的神经元和 AST 表达,该结果与 Tang 等<sup>[8]</sup>报道的一致。作为非传统意义上的炎症反应细胞,神经元和 AST 表达炎性信号蛋白分子,的确使人费解。有研究发现<sup>[9]</sup>,神经元 TLR4 激活后,可引起 P38-JNK/AP-1 通路活化、炎性因子释放、脂质过氧化、凋亡等损伤过程,而

TLR4 缺陷小鼠的皮质神经元在体外糖剥夺培养中有更高的生存率<sup>[8]</sup>, 结果表明神经元自身分布的 TLR4 对其存活有重要影响。

生理状态下, AST 在提供 CNS 代谢和营养支持、维持正常神经元功能、参与血脑屏障、调节突触活性等方面发挥重要作用<sup>[10-12]</sup>。脑缺血后, 兴奋性谷氨酸释放、胞外离子失衡、即早基因(c-fos, c-jun 等)的表达上调等因素引起 AST 的广泛激活并表达其标志蛋白 GFAP, 活化的 AST 向神经元传递乳酸盐、丙酮酸盐、糖原等能量物质, 并积极清除细胞外兴奋性氨基酸, 从而发挥微调节神经元微环境作用。此外, AST 还可通过合成 NGF、减少自由基形成、抑制白细胞和血小板的黏附聚集、抑制细胞凋亡、减少钙超载等效应, 以及参与神经突触的生成等环节发挥神经保护和促神经修复的作用<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, 无论 CIP 组还是 MCAO 组, 随着再灌注时间延长, 脑梗死灶周围 GFAP 的表达均有增加趋势, 与 MCAO 组比较, 同时段 CIP 组 GFAP 阳性细胞数目明显较多, 鉴于 AST 在神经元保护中的重要作用, 有理由相信这种早期 CIP 引发的 AST 活化参与了 BIT 的发生过程。同时, 本实验也提示 GFAP 表达上调的激发与维持并不完全依赖 TLR4 信号通路的活化, 该过程是否有其他 TLRs(如 TLR2、TLR9)参与、AST 的 GFAP 表达增强与其神经保护功能的具体机制等问题尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Plamondon H, Davignon G, Khan S. Cerebral ischemic preconditioning induces lasting effects on CA1 neuronal survival, prevents memory impairments but not ischemia-induced hyperactivity[J]. *J Behav Brain Res*, 2008, 189(1):145-147.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Calson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-86.
- [3] 龚彪, 李长清, 黄剑. 大鼠线栓法局灶性脑缺血/再灌注模

型的改进[J]. *重庆医学*, 2006, 35(4):313-316.

- [4] 金生, 张大志, 陈压西. Toll 样受体研究进展与临床免疫[J]. *重庆医学*, 2004, 33(9):1423-1424.
- [5] Kielian T. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis[J]. *J Neurosci Res*, 2006, 83(5):711-713.
- [6] Hyakkoku K, Hamanaka J, Tsuruma K, et al. Toll-like receptor 4(TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2010, 171(2):258-261.
- [7] Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram negative bacterial cell wall components[J]. *Mol Immunol*, 2005, 42(2):155-157.
- [8] Tang SC, Arumugam TV, Xu X, et al. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104(6):798-801.
- [9] Thiruma V, Arumuga M, Okun E, et al. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury[J]. *Shock*, 2009, 32(1):4-6.
- [10] Feeney CJ, Stys PK. Astrocyte: response to injury[J]. *J Encyc of Neurosci*, 2009, 58(7):837-839.
- [11] 张敬军. 星形胶质细胞的研究[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(7):788-790.
- [12] Benarroch EE. Astrocyte-neuron interactions: Implications for epilepsy[J]. *J Neurology*, 2009, 73(16):1323-1325.
- [13] Moxon-Emre I, Schlichter LC. Evolution of inflammation and white matter injury in a model of transient focal ischemia[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69(1):1-3.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-21)

(上接第 3075 页)

- 素诱发多器官功能障碍综合征模型制备[J]. *江苏医药*, 2005, 31(6):448-451.
- [4] Ouyang HW, Cao T, Zou XH, et al. Mesenchymal stem cells sheets revitalize nonviable dense grafts; implications for repair of large bone and tendon defects[J]. *Transplant*, 2006, 82(2):170-174.
- [5] Sim WY, Park SW, Park SH, et al. A pneumatic micro cell chip for the differentiation of human mesenchymal stem cells under mechanical stimulation[J]. *Lab Chip*, 2007, 7(12):1775-1778.
- [6] Wang X, Dong Z, Zhong XH, et al. Transforming growth factor-beta1 enhanced vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(3):548-550.
- [7] Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Clin Lab*, 2007, 53(1):81-84.
- [8] Benayahu D, Akaviau D, Shur I. Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells[J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(2):173-179.
- [9] Lange C, Bassler P, Lioznov MV, et al. Hepatocytic gene

expression in cultured rat mesenchymal stem cells[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(1):276-279.

- [10] Wang PP, Wang JH, Yan ZP, et al. Expression of hepatocyte like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(3):712-716.
- [11] John ML, Wang PP, Carol KL, et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro coculture and intra-portal transplantation models[J]. *J Immunol Methods*, 2005, 305(1):39-47.
- [12] 冯刚, 罗利琼, 陈焕朝. 骨髓间充质干细胞在肝脏疾病中的研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(20):2814-2816.
- [13] 杨媛媛, 周诺. 骨髓间充质干细胞作为组织工程种子细胞的研究进展[J]. *广西医学*, 2010, 32(5):586-589.
- [14] Di Campli C, Zocco MA, Saulnier N, et al. Safety and efficacy profile of G-CSF therapy in patients with acute on chronic liver failure[J]. *Dig Liver Dis*, 2007, 39(12):1071-1076.
- [15] 冯吉, 陈东风. 骨髓间充质干细胞的旁分泌作用[J]. *重庆医学*, 2011, 40(13):1332-1333.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-22)