

· 基础研究 ·

# 白细胞介素 23 在大鼠脑梗死模型中的表达

吴乃君<sup>1</sup>, 唐元海<sup>2</sup>, 金秀平<sup>1</sup>, 田清伟<sup>1</sup>, 魏剑芬<sup>1</sup>, 王颖<sup>1</sup>, 陈冬<sup>1</sup>, 马绍杰<sup>1</sup>, 贾伟<sup>1</sup>

(1. 河北联合大学附属医院内分泌科, 河北唐山 063000; 2. 河北省遵化市医院 064200)

**摘要:**目的 通过建立大鼠脑梗死模型, 探讨白细胞介素-23(IL-23)在大鼠脑梗死区域炎性损伤中的表达。方法 (1)将健康成年雄性 SD 大鼠 50 只随机分为脑梗死组和假手术组, 每组 25 只。脑梗死组按梗死后不同取材时间分为 6、24、48、72 h 及 7 d 5 个亚组, 每组大鼠 5 只; 假手术组按梗死组对应时间点分为 6、24、48、72 h 及 7 d 5 个亚组, 每组大鼠 5 只。(2)用线栓法制作左侧大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型。(3)采用 HE、免疫组化染色, 观察脑梗死区域光镜下形态学变化及 IL-23 的表达。(4)比较两组大鼠在同一时间点脑组织形态学变化及 IL-23 的表达。结果 (1)假手术组各时间点脑组织结构基本正常, 无明显水肿。脑梗死组 MCAO 术后 6 h 脑组织病变区域脑组织轻度水肿。24~48 h 水肿加重;(2)梗死组 IL-23 阳性细胞个数各时间点均高于假手术组, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。梗死组 IL-23 随着时间的延续变化, 在梗死后 6 h 表达增高, 并且在梗死后 48 h 达到高峰, 72 h 后阳性细胞数表达逐渐减少, 各时间点 IL-23 比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。结论 IL-23 在大鼠脑梗死区域表达均显著增高, 而且在 24~48 h 达高峰。

**关键词:** 白细胞介素 23; 脑缺血; 炎症反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.026

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)06-0584-02

## Experimental study on expression of IL-23 in rat cerebral infarction model

Wu Naijun<sup>1</sup>, Tang Haiyuan<sup>2</sup>, Jin Xiuping<sup>1</sup>, Tian Qingwei<sup>1</sup>,

Wei Jianfen<sup>1</sup>, Wang Ying<sup>1</sup>, Chen Dong<sup>1</sup>, Ma Shaojie<sup>1</sup>, Jia Wei<sup>1</sup>

(1. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China

2. Zunhua Municipal Hospital, Zunhua, Hebei 064200, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of IL-23 on the inflammatory lesion in rat cerebral infarction area by establishing the rat cerebral infarction model. **Methods** (1) 50 healthy male SD rats were randomly divided into 2 groups: infarction group (IS) and sham operation group (SH). The IS group was further divided into 5 subgroups ( $n=5$  each subgroup) according to the infarction duration of 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 d. The expression of IL-23 was measured by immunohistochemistry. (2) The rat model was established by using the occlusion method of left middle cerebral artery. (3) We studied the morphology changes after MCAO under light microscope, IL-23 expression by using HE staining, light microscope and immunohistochemistry. (4) Comparing changes of morphology, IL-23 expression of each group at the same time point. **Results** (1) The cellular structure was normal in sham operation group under light microscopy. There were swollen cells at 6 h after operation in the model group. There were large numbers of swollen cells after 24-48 h. (2) IL-23 positive cells were found after 6 h, reached peak after 24~48 h, and reduced after 72h. Compared with sham operation group, IL-23 positive cells expression was higher after 6h, 24 h, 48 h, 3 d and 7 d, showing significant difference ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** The expression of IL-23 is increased in rat cerebral infarction area and reaches the peak at 24~48h.

**Key words:** interleukin-23; cerebral ischemia; inflammatory

近来研究表明在脑缺血的病理过程中存在炎症和免疫反应, 炎性细胞因子的变化正受到广泛关注。缺血性脑损伤的神经细胞中有多种生化改变。白细胞介素 23(IL-23)是 2000 年发现的一种前炎性细胞因子, 隶属于 IL-12 分子家族, 可促进 T 细胞, NK 细胞分泌干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ), IL-1 $\beta$  和 IL-17 的分泌间接促进炎症的发生<sup>[1-2]</sup>。本研究以脑梗死大鼠模型为研究对象, 探讨 IL-23 在大鼠脑梗死区域的炎性反应中的表达情况。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 健康成年 SD 雄性大鼠 50 只, 体质量 250~280 g。将大鼠随机分为两组, 其中实验组(梗死组)25 只, 按梗死后不同取材时间分为 6、24、48、72 h 及 7 d 5 个亚组, 每组大鼠 5 只; 假手术组 25 只, 按梗死对应时间点分为 6、24、48、72 h 及 7 d 5 个亚组。

### 1.2 方法

**1.2.1 手术方法** 脑梗死组: 大鼠全部行左侧大脑中动脉栓塞缺血模型制备手术, 手术前大鼠禁水 6 h, 禁食 12 h。10%水

合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉, 完成大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型的制作。假手术组: 除不插线栓闭塞大脑中动脉外, 其余操作步骤均与实验组相同。

**1.2.2 动物模型入选标准** 造模后大鼠虽然有神经缺失症状, 但有下列情形之一者视为造模失败, 在后续实验中排除: (1) Zea Longa 评分标准进行评分, 0 分或者 4 分者; (2) 开颅发现并发蛛网膜下腔出血者; (3) 取材后, 脑组织标本 HE 染色无缺血病理改变者或者 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色无缺血改变者; (4) 未达观察时相点即死亡者。因上述原因导致各实验组动物数目不足预定数目者, 通过随机原则补齐动物并重新造模。

**1.2.3 标本采集和处理** 各组大鼠于各个规定时间点行过度麻醉后, 迅速断头取脑, 以视交叉为中心, 向后连续切成厚约 2 mm 的冠状脑片, 共 2 片。第一脑片行 TTC 染色观察脑梗死范围。第二脑片置 4%多聚甲醛中固定行石蜡包埋固定, 备作

表 1 不同时间点脑梗死组和假手术组 IL-23 的阳性细胞个数( $n=5, \bar{x} \pm s, \text{个/HP}$ )

| 组别   | 6 h                    | 24 h                    | 48 h                    | 72 h                    | 7 d                    |
|------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| 假手术组 | 2.40±0.55              | 2.42±0.41               | 2.38±0.65               | 2.44±0.60               | 2.39±0.49              |
| 梗死组  | 6.60±1.34 <sup>a</sup> | 14.00±3.54 <sup>a</sup> | 25.20±1.92 <sup>a</sup> | 18.60±1.82 <sup>a</sup> | 7.00±1.00 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与假手术组比较。

HE 染色和免疫组化染色。

**1.2.4 结果判定** 在光学显微镜下观察, IL-23 以细胞质内有棕黄色颗粒为阳性表达。不同时间点两组片在多功能显微镜下按照缺血侧皮质到髓质的顺序随机选取 3 个不重叠的 400 倍视野, 采用高清晰度彩色病理图像分析系统计数 IL-23 免疫反应阳性细胞数, 取其平均值为阳性细胞数。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS11.5 软件进行统计学处理。定量资料的简化表达形式为  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 脑组织形态学变化** 假手术组各时间点脑组织细胞的大小和形态结构基本正常, 无明显水肿; 神经细胞的细胞质丰富, 核膜清楚, 核仁清楚; 神经胶质细胞核仁清楚, 细胞质透亮或淡染。脑梗死组 MCAO 术后 6 h 脑组织病变区域神经元轻度水肿。24~48 h 水肿区域的神经细胞、神经胶质细胞四周间隙明显变宽, 多数细胞肿胀变形, 着色加深; 细胞质、细胞核界线明显不清, 部分细胞核固缩明显, 核膜结构模糊, 核仁不清或消失。3 d 后水肿呈减轻趋势。

**2.2 IL-23 免疫组化分析结果** 梗死组阳性细胞个数各时间点均高于假手术组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。梗死组 IL-23 随时间的延续变化在梗死后 48 h 达到高峰, 72 h 后阳性细胞数表达逐渐减少, 各时间点比较 IL-23 差异有统计学意义 ( $F = 97.588, P < 0.01$ )。见表 1。

## 3 讨 论

脑组织对缺血缺氧损害非常敏感, 阻断血流 30 s 脑代谢即发生改变。1 min 后神经原功能活动停止, 脑动脉闭塞导致缺血超过 5 min 可发生脑梗死。缺血后神经元损伤具有选择性, 轻度缺血时某些神经元丧失, 完全持久缺血时各种神经元、胶质细胞及内皮细胞均坏死<sup>[3-5]</sup>。

IL-23 广泛参与体内免疫过程, 对多种免疫细胞的分化发育、增殖以及炎症反应起重要调节作用, IL-23 信号转导所结合的主要是 JAK-STAT 分子, 主要与 STAT3 结合发挥作用<sup>[6]</sup>。研究证明, IL-23 在诱导对维持关节和大脑的自身免疫性炎症性疾病有重要作用。IL-23 对中枢神经系统的影响目前研究较多的是实验性自身免疫性脑脊髓膜炎 (EAE) 和多发性硬化 (MS)。Parhan 和 Chinica<sup>[7]</sup> 在大鼠 EAE 的研究中证实, 中枢神经系统的小胶质细胞和激活的吞噬细胞产生的 IL-23 在 EAE 的发病中起决定作用。外周侵入的炎症细胞虽然也可以分泌 IL-23, 但是对 EAE 的发病影响较小。另有研究证实, 在动物自发性关节炎模型中, IL-23 能活化 TH17 细胞通过 NF-KB 信号通路和 STAT3 信号通路诱导 IL-17 的产生<sup>[8-10]</sup>。这在 EAE 的模型中也得到证实。这些提示 IL-23 参与了免疫性炎症反应, 并通过诱导 IL-17 的产生加重了这些免疫性疾病的炎症损伤。已经证实, 脑梗死过程存在炎症和免疫反应。所以作者检测了 IL-23 在脑梗死大鼠的表达情况。

本实验结果显示, 在大鼠脑梗死模型中, 梗死区域的 IL-23 表达明显增高, 并且在梗死后 48 h 达到高峰, 提示 IL-23 参与了脑缺血炎症反应。说明脑缺血后吞噬细胞和小胶质细胞处于激活状态, 推测脑梗死发生后, 由于脑组织发生缺血和坏死, 产生了大量的抗原, 这些抗原刺激免疫系统, 同时伴有大量炎症细胞的浸润和激活, 引起强烈的免疫应答过程, 致使吞噬细胞、小胶质细胞被激活, 产生前炎症细胞因子 IL-23, 其参与了脑缺血后的炎症反应。

## 参考文献:

- [1] Guo ZL, Hu L L, Di Z, et al. IL-17 expression after cerebral ischemia of the rat[J]. J Apoplexy Nervous, 2002, 19 (2): 270-272.
- [2] 李国忠. 人缺血脑组织中 IL-17 的表达及来源[J]. 中风及神经疾病杂志, 2006, 23(6): 662-664.
- [3] 屠永华, 李岚. 炎症细胞因子与脑缺血[J]. 中国临床康复, 2003, 7(1): 49-50.
- [4] Becher B, Durell BG, Noelle RJ. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Clin Invest, 2003, 112(8): 1186-1191.
- [5] Rothwell NL, Hopkins SJ. Cytokines and nervous system II: actions and mechanisms of action[J]. J Trends Neurosci, 2001, 223(3): 130-136.
- [6] 徐芬. IL-23 的研究进展[J]. 医学分子生物学杂志, 2004, 1(5): 302-305.
- [7] Parham C, Chirica M. A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12Rbeta1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R [J]. J Immunol, 2002, 168(11): 5699-5708.
- [8] Becher B, Durell BG, Noelle RJ. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Clin Invest, 2003, 112(8): 1186-1191.
- [9] Cho M, Kim H. STAT 3 and NF-KB Signal Pathway is Required for IL-23-Mediated IL-17 Production in Spontaneous Arthritis Animal Model IL-1 Receptor Antagonist-deficient Mice [J]. J Immunology, 2006, 176 (9): 5652-5660.
- [10] Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 rives a pathogenic T cell population that induce autoimmunity inflammation[J]. J Exp Med, 2005, 201(2): 233-240.

(收稿日期: 2011-09-02 修回日期: 2011-11-23)