DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2019.06.008 ·论著:临床医学·

大鼠胸腺内注射MBP诱导免疫耐受对手术SBI引起的脑神经功能缺陷和脑水肿作用研究

姚 斌[1],洪晓雅[2*],尚福泰[2],惠亮亮[1],安旭生[1]
(南京医科大学附属淮安第一医院 1.重症医学科,2.麻醉科,江苏 淮安 223300)

摘 要: 为探讨大鼠胸腺内注射髓鞘碱性蛋白(MBP)诱导免疫耐受对手术脑受损(SBI)引起的脑神经功能缺损和脑水肿的影响。选取SD大鼠随机分为假手术组、SBI模型组和MBP处理组,模型组胸腺注射等渗盐水,MBP处理组注射MBP,采用改良神经功能缺陷评分(MNSS)评价各组大鼠神经功能,检测各组大鼠脑水肿体积及血清炎性因子,PCR检测脑组织FasL mRNA表达。结果显示大鼠胸腺内注射MBP诱导免疫耐受,可改善SBI大鼠的脑神经功能缺陷和脑水肿,减轻炎性反应,说明MBP通过诱导免疫耐受,减轻脑受损大鼠的脑神经功能缺陷和脑水肿。

关键词: 髓鞘碱性蛋白; 胸腺; 手术脑受损; 脑神经功能缺损; 脑水肿; 大鼠
中图分类号:R742 **文献标识码:**A

Effects of MBP immunization induced by thymus injection on SBI induced brain dysfunction and brain edema in rats

YAO Bin[1], HONG Xiaoya[2*], SHANG Futai[2], HUI Liangliang[1], AN Xusheng[1]
(1. *Department of Critical Care Medicine*, 2. *Department of Anesthesiology*, *Huaian First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University*, *Huaian* 223300, *Jiangsu*, *China*)

Abstract: To investigate the effect of intrathymic injection of myelin basic protein (MBP)-induced immune tolerance on brain neurological deficits and cerebral edema caused by surgical brain damage (SBI). SD rats were randomly divided into sham operation group, SBI model group and MBP treated group. The SBI model group and the MBP treated group was injected with isotonic saline and MBP, respectively. The neurological function of each group was evaluated by modified neurological deficit score (MNSS). The cerebral edema volume and serum inflammatory factors were detected. The expression of FasL mRNA in brain tissue was detected by PCR. The results showed that intrathymic injection of MBP induced immune tolerance in rats, which may improve brain neurological deficits and brain edema in SBI rats and reduce inflammatory response, hitting MBP may improve brain neurological deficits and brain edema in SBI rats by inducing immune tolerance.

Key words: myelin basic protein; thymus; surgical brain injury; cranial nerve function defect; brain edema; rat

手术脑受损(SBI)是指在实施神经外科手术过程中导致非疾病本身引成的神经系统免疫反应[1]。人们的正常机体内存在一些微量的抗脑抗体,但是当SBI破坏血脑屏障时,会释放出大量的脑抗原进入血液,刺激机体产生大量的脑抗体,激活免疫系统引起继发反应导致脑水肿、血脑屏障破坏及神经元死亡,进一步加重脑损伤[2]。目前临床上治疗继发性炎症反应比较新颖的方式是针对抗原特异性的诱导免疫耐受治疗方法[3]。胸腺是一个对于T淋巴细胞非常重要的场所。T淋巴细胞在其经历分化、发育和成熟阶段,它可以经过阴性选择获得自身免疫耐受特性,而胸腺表达的内源性蛋白质也会经过抗原提呈细胞提呈给淋巴细胞,诱导中枢免疫耐受[4]。髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)是在中枢神经系统中仅次于蛋白脂蛋白之后含量

收稿日期:2018-11-12;**修回日期:**2019-02-02
* **通信作者,**E-mail:250543326@qq.com.

第二丰富的蛋白质,但是在胸腺中并不表达[5]。所以本文拟在大鼠胸腺内注射 MBP 诱导免疫耐受,观察其能否减轻 SBI 引起的脑神经功能缺陷和脑水肿。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 SD 大鼠 30 只,体重 260 ~ 300 g,雌雄各半,购自苏州工业园区爱尔麦特科技有限公司,许可证号:SDK(苏)2009-0001;饲养室温 22 ~ 25 ℃,湿度 35% ~ 50%,自由摄食及饮水,适应性喂养 1 周后进行试验,随机分为假手术组、模型组和 MBP 处理组,每组 10 只。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠 SBI 模型制备 经腹腔注射 100 g/L 水合氯醛麻醉后备皮,安装立体定向仪,头部消毒。无菌条件下,正中矢状位切开头皮,暴露颅骨,于矢状缝右侧 2 mm、冠状缝后 1 mm 处开直径 4 mm 骨窗,尖刀切开硬脑膜后锐性切除大小 2 mm×3 mm × 3 mm 脑组织,止血后逐层缝合,随后,大鼠取仰卧位,无菌条件下沿颈部正中切开皮肤和皮下组织,仔细分离肌肉,沿胸部正中剪开胸骨柄,暴露胸腺。在直视下,模型组和 MBP 处理组分别每侧胸腺注射 50 μL 等渗盐水和 MBP(1 mg/mL)。止血后逐层缝合皮下组织和皮肤[6]。

假手术组:照同样方法开骨窗,但保持硬脑膜完整,暴露胸腺只进行空针穿刺,未注射任何物质。

1.2.2 大鼠神经系统行为评价 造模后的 1 天、7 天和 14 天,对大鼠进行神经系统行为评价(MNSS),评分包括 5 个方面:提尾反射(0 ~ 3 分)、行走测试(0 ~ 3 分)、感觉测试(0 ~ 2 分)、平衡测试(0 ~ 6 分)、反射缺失和反常运动(0 ~ 4 分),大鼠缺失 1 项反射或不能完成测试即计相应分数,分数越高,损伤越重。

1.2.3 大鼠脑水肿体积检测 造模后的 1、7 和 14 天,对大鼠行头部 MRI 扫描,并利用交互式分割算法分割每个断面,获得每个断层图像的边缘,计算每个截面的面积并乘以该断层厚度即可获得水肿部分体积。

1.2.4 血清炎性因子检测 造模术后 1、3、7、14、21 天心脏穿刺取血 800 μL,分离血清 -80 ℃保存,ELISA 法检测 IL-1、IL-2 和 TGF-β 浓度。

1.2.5 PCR 检测 (1)组织总 RNA 提取:用 TRIzol 试剂盒提取匀浆后的脑组织的 RNA(按照说明步骤进行),然后用紫外分光光度计进行定量,并保存在 -70℃ 冰箱备用;(2)逆转录合成 cDNA:以 Oligo (dT)18 为引物,反应体积 2 μL,补 DEPC 处理的水至终体积 25 μL,按说明操作。-20 ℃ 冻存;(3) PCR 扩增,上游引物为 5′-GGAATGGGAAGACA-CATATGGAACTGC-3′,下游引物 5′-CATATCTGGC-CAGTAGTGCAGTAATTC-3′,25 u12xSYBR GREEN MIX 和 cDNA2 μL,200 μmol 上下游引物,补 ddH20 至 50 μL,然后以 50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min 的反应条件,进行 50 个循环(95 ℃ 15 s,退火温度 30 s,72 ℃ 30 s)进行 PCR 扩增。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS19.0 软件,MNSS 评分、脑水肿体积、炎症因子及 mRNA 表达采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较使用重复测量方差分析或方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 各组大鼠 MNSS 评分比较

三组随时间延长,MNSS 评分有所降低;模型组和 MBP 处理组处理后 7d、14d MNSS 评分明显高于假手术组,其中 MBP 处理组处理后 7 天、14 天 MNSS 评分明显低于模型组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 MNSS 评分比较

组别	处理前	处理后(分)		
		1 天	7 天	14 天
假手术组	5.83±0.72	5.75±0.87	2.01±0.48[a]	1.23±0.15[a]
模型组	5.92±0.81	5.80±0.90	4.98±0.81[a]	4.16±0.68[a]
MBP 处理组	5.86±0.90	5.77±0.91	3.44±0.73[ab]	2.15±0.71[ab]

与假手术组比较[a]$P<0.05$;与模型组比较[b]$P<0.05$($n=10$).

2.2 各组大鼠脑水肿体积比较

模型组和 MBP 处理组处理后 7 天脑水肿体积达到高峰;模型组和 MBP 处理组处理后 1、7、14 天脑水肿体积明显高于假手术组,其中 MBP 处理组处理后 1、7、14 天脑水肿体积明显低于模型组。见表 2。

2.3 各组血清 IL-1、IL-2 和 TGF-β 水平

模型组和 MBP 处理组随时间延长,IL-1、IL-2 和 TGF-β 水平有所降低;模型组和 MBP 处理组处理后 1、7、14 天,IL-1、IL-2 和 TGF-β 水平明显高于假手术组,其中 MBP 处理组处理后 1、7、14 天,IL-

1、IL-2和TGF-β水平明显低于模型组。见表3~5。

表2 各组大鼠脑水肿体积比较 (mm²)

组别	处理前	处理后		
		1天	7天	14天
假手术组	11.21±1.22	11.24±1.16	12.20±1.20	12.06±1.30
模型组	11.42±1.32	34.41±2.12[a]	84.03±5.15[a]	61.15±9.22[a]
MBP处理组	11.32±1.29	29.89±2.20[ab]	68.46±7.87[ab]	41.60±10.15[ab]

与假手术组比较[a]$P<0.05$;与模型组比较[b]$P<0.05$.

表3 各组血清IL-1水平比较 (pg/mL)

组别	处理前	处理后		
		1天	7天	14天
假手术组	13.38±1.92	13.34±1.80	13.44±1.90	13.46±1.55
模型组	13.40±1.82	30.40±2.15[a]	24.41±3.22[a]	19.87±2.11[a]
MBP处理组	13.43±1.91	25.51±3.03[ab]	20.02±2.81[ab]	17.61±2.03[ab]

与假手术组比较[a]$P<0.05$;与模型组比较[b]$P<0.05$($n=10$).

表4 血清TGF-β水平 (pg/mL)

组别	处理前	处理后		
		1天	7天	14天
假手术组	44.18±4.11	44.20±3.46	44.15±2.90	45.50±2.44
模型组	44.60±3.92	70.41±2.90[a]	62.28±2.78[a]	56.61±3.03[a]
MBP处理组	44.45±4.03	61.25±2.79[ab]	53.34±2.90[ab]	49.94±3.10[ab]

与假手术组比较[a]$P<0.05$;与模型组比较[b]$P<0.05$($n=10$).

表5 血清IL-2水平 (pg/mL)

组别	处理前	处理后		
		1天	7天	14天
假手术组	15.83±2.01	15.80±1.91	15.74±1.87	15.70±1.60
模型组	15.78±1.95	35.46±2.80[a]	30.42±2.76[a]	22.15±2.03[a]
MBP处理组	15.80±2.00	30.44±3.28[ab]	24.08±2.90[ab]	18.16±1.87[ab]

与假手术组比较[a]$P<0.05$;与模型组比较[b]$P<0.05$($n=10$).

2.4 各组脑组织FasL mRNA表达

MBP处理组脑组织FasL mRNA相对表达量为(0.876±0.112),明显高于假手术组和模型组。见表6。

表6 各组脑组织FasL mRNA表达

组别	FasL mRNA相对表达	F	P
假手术组	0.101±0.037		
模型组	0.097±0.040	23.122	<0.05
MBP处理组	0.876±0.112[ab]		

与假手术组比较[a]$P<0.05$;与模型组比较[b]$P<0.05$($n=10$).

3 讨 论

开颅手术一般都会有较大的创口,由此会导致免疫细胞攻击一些暴露出的具有免疫耐受的神经组织,继而激活小胶质细胞,并释放一些炎性因子[7]。此外脑组织中的部分蛋白和血液中的淋巴细胞会由于血脑屏障的破坏而互相交换地方,调节性T细胞在抗原与免疫细胞的接触诱导下会向TH1细胞转化[8]。巨噬细胞会被炎症因子诱导游动到损伤组织周围释放炎症因子,进一步造成机体发生炎症反应,产生免疫应答,加重脑损伤。MBP是一种强碱性膜蛋白,由脊椎动物神经系统(CNS和PNS)的细胞合成的[9]。当中枢神经系统受到损害,血脑屏障遭到破坏时,血清中的MBP含量就会明显增高,有研究[10]证明,MBP可以诱导机体产生自身免疫疾病,还能自主免疫保护中枢神经系统,所以MBP能减轻脑损伤带来的危害。

MNSS评分是评价神经功能的重要方式,其分数越高,说明神经功能损害越严重,实验通过对各组大鼠进行MNSS评分,我们发现随着时间的延长,各组的MNSS评分都明显的下降,且三组MNSS评分由高到低依次为模型组、MBP处理组和假手术组,说明三组大鼠都有一定的神经缺陷,但是对于脑损伤的大鼠来说,注射MBP可以改善神经缺陷。MRI检测脑水肿体积可以反映SBI后神经系统损伤程度及恢复程度,由实验结果我们可以看出,模型组和MBP处理组处理后7天脑水肿体积达到高峰,且三组脑水肿的程度由高到低依次是模型组、MBP处理组和假手术组,也进一步说明了MBP具有降低神经损伤、利于恢复的作用[11]。IL-1是一种细胞因子,是当机体发生感染时由单核细胞、内皮细胞、成纤维细胞等细胞产生的,集落刺激因子、血小板生长因子等细胞因子可以在IL-1的刺激下分泌增加,参与免疫应答和组织修复[12]。IL-2主要是由活化的T细胞产生的一种重要的促炎因子,它可以趋化CD4+T细胞和CD8+T细胞到达损伤部位建立器官特异性的免疫反应。TGF-β即转化生长因子,它属于调节细胞生长和分化的TGF-β超家族,对细胞的生长、分化和免疫功能都有重要的调节作用,可以在同种异体移植耐受或自身免疫耐受中起到作用[13]。本实验结果显示,随时间延长,MBP处理组较模型组IL-1、IL-2和TGF-β水平有所降低,说明向胸腺注射MBI可以减轻炎症反应。介导哺乳动物细胞调亡的途径有多种,而Fas/Fasl的相互作用

介导途径就是其中之一[14]。它在胸腺选择、免疫豁免等许多重要的生理过程发挥着重要的作用。其主要在 CD4+CD8+早期阶段介导细胞凋亡,经过阴性选择后的胸腺细胞可以清除自身反应性细胞来获得中枢免疫耐受,并经自分泌方式诱导 T 细胞自身凋亡维持外周细胞免疫耐受。实验结果显示 MBP 处理组的 FaslmRNA 明显的高于模型组和假手术组,说明胸腺注射 MBP 可以术后 Fasl 的表达,促进 T 细胞的凋亡,诱导免疫耐受[15]。

综上所述,大鼠胸腺内注射 MBP 诱导免疫耐受可以减轻 SBI 引起的脑神经功能缺陷和脑水肿,并且降低炎症反应发生的概率。

参考文献:

[1] 苏海, 张毅, 苏祖禄,等. 抗脑抗体对创伤性脑损伤后血脑屏障和脑水肿的影响[J]. 中华创伤杂志, 2015,31(5):467-70.

[2] 刘兴宇, 甄艳凤, 崔建忠,等. MAPKs 阻滞剂 U0126 对创伤性脑损伤大鼠学习记忆功能的影响及机制探讨[J]. 山东医药, 2016,56(18):21-4.

[3] 刘勇, 亢建民, 张明超,等. 门静脉注射髓鞘碱性蛋白诱导免疫耐受的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2016,33(4):975-8.

[4] 李华伟, 张临友. 胸腺瘤病人免疫系统相关改变的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2016,5(2):275-8.

[5] 高敏, 李吕力, 韦俊杰,等. 阿托伐他汀片对脑缺血再灌注大鼠髓鞘碱性蛋白和神经胶质纤维酸性蛋白及神经元特异性烯醇化酶的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2017,33(4):327-9.

[6] 杨伟健, 王宏, 张博,等. 胸腺内注射脑抗原致免疫耐受治疗大鼠手术脑损伤[J]. 中华创伤杂志, 2016,32(6):542-6.

[7] 官瑞婷, 高宏志, 梁双吟. 七氟烷麻醉抑制急性创伤性颅脑损伤患者围手术期炎症介质的表达[J]. 中国免疫学杂志, 2017,33(10):1537-40.

[8] 王一凡, 杨霄鹏, 曾志磊,等. 姜黄素对脑缺血再灌注损伤大鼠 MMP-2 活性和血脑屏障通透性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016,36(2):280-2.

[9] YANNAKAKIS M, SIMAL C, TZOUPIS H, et al. Design and synthesis of non-peptide mimetics mapping the immunodominant myelin basic protein (MBP83-96) Epitope to function as T-cell receptor antagonists[J]. Int J Mol Sci, 2017,18(6):1215.

[10] 路星星, 王军, 孟孟,等. Sox17 和 MBP 在未成熟大鼠感染性脑损伤中的表达[J]. 神经解剖学杂志, 2017,33(1):80-4.

[11] 张娜娜, 程世翔, 衣泰龙,等. 不同剂量右美托咪定对创伤性脑损伤小鼠急性期脑水肿的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2017,3(12):1202-6.

[12] 孙恺, 张秀萍, 宋林杰,等. 糖尿病合并脑缺血再灌注损伤小鼠模型制作及其炎症因子表达分析[J]. 中华神经医学杂志, 2016,15(2):123-9.

[13] NAKANO N, TSUCHIYA Y, KAKO K, et al. TMED10 interferes with TGF-β signaling by disrupting TGF-β receptor complex formation[J]. JBC, 2017,292(10):jbc. M116. 769109.

[14] 王晓丽, 韩翠艳, 李宏铃,等. Fas/FasL 信号途径参与 17-羟-岩大戟内酯 B 诱导 U251 细胞凋亡[J]. 中药药理与临床, 2017,4(1):46-9.

[15] 范宗静, 唐杰, 谢连娣,等. 人心脏微血管内皮细胞缺血再灌注损伤 Fas/FasL 系统的表达及黄芪多糖的干预研究[J]. 中华中医药杂志, 2016,3(11):4672-4.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 588 页)

[8] 李丽,刘燕,张羽,等. 稽留流产患者血清及绒毛组织中 IL-17、IL-35 的表达[J]. 临床误诊误治,2019,32(4):88-91.

[9] 冯晓玲,贾丹,张杨,等. 补肾活血方对不明原因复发性流产患者外周血中 IL-2、IL-6 的影响[J]. 中华中医药学刊,2019,1(1):1-14.

[10] 李李,何淑贞,蒲育栋. 不明原因复发性流产与外周血清 TNF-α 及 IL-10 的相关性分析[J]. 中国实用医药,2019,14(5):69-70.

[11] 冯晓玲,谷玥儒,张杨. 不明原因复发性流产患者蜕膜及外周血中 IL-15、IL-22 的表达及补肾活血方对其影响的观察[J]. 上海中医药杂志,2019,53(2):68-71.

[12] 马丽亚,张大伟,张颖,等. 庞氏安胎汤对先兆流产大鼠血清免疫因子及激素水平的影响[J]. 中医杂志,2019,60(2):159-62.

[13] 张运霖. 米非司酮联合米索前列醇治疗稽留流产的临床疗效[J]. 临床合理用药杂志,2019,12(9):93-4.

[14] 孙波娜,孙富艳. 米非司酮配伍米索前列醇不同方案行早孕药物流产的疗效[J]. 中国性科学,2019,28(3):106-9.

[15] 张坤,安洪宾. 米索前列醇联合利多卡因在高危妊娠人工流产中的镇痛及宫颈扩张效果研究[J]. 中国实用医药,2019,14(2):107-8.

[16] 吴慧英. 人工流产术前口服或阴道放置米索前列醇疗效分析[J]. 实用妇科内分泌杂志(电子版),2018,5(36):144-5.

[17] 何洁,徐玉萍,李海燕. 坤灵丸配伍米非司酮、米索前列醇药物流产的临床应用价值分析[J]. 实用妇科内分泌杂志(电子版),2018,5(34):69-71.

(本文编辑:蒋湘莲)