

腺分泌,25%由腮腺分泌,5%由舌下腺分泌及一些小涎腺组织分泌组成。分泌功能单位为腺泡和导管,增龄性变化,腺泡细胞变性,炎症,导管上皮肿胀,管腔狭窄,均导致唾液分泌减少,引起唾液量减少而黏稠。本实验结果显示雌激素水平降低,唾液腺组织变化。去势+雌激素组:腮腺腺泡有空泡性脂肪性变性,胞质染色淡;颌下腺的浆液性腺部分导管上皮变性出现黏液性空泡,管腔变小。去势组大鼠唾液腺变化更为严重,出现核固缩。

3. SOD 在唾液腺中的作用:SOD 是一种金属酶蛋白,是氧自由基的清除剂。Cu, Zn - SOD 又称 SOD1 是人体内超氧负离子自由基的专一清除剂,在体内自由基的产生与清除的动态平衡起关键作用。同时 Cu, Zn - SOD 具有抑制细胞凋亡,保护组织,防止退行性改变的作用^[10,11]。雌激素可提高机体抗氧化能力,并可对抗脂质过氧化反应,使氧自由基清除率增加、SOD 水平升高。本研究结果显示,对照组、假手术组大鼠唾液腺中 Cu, Zn - SOD 表达呈强阳性, Cu, Zn - SOD 在去势+雌激素组大鼠腮腺中较正常对照组的表达较弱,腮腺腺泡细胞为阳性表达,颌下腺中浆液性腺的导管上皮呈弱阳性,黏液性腺不着色,舌下腺不着色。去势组腮腺腺泡细胞只有较弱的阳性表达,颌下腺和舌下腺均无染色。3 部分结果均提示雌激素与 SOD 水平正相关,可提高机体的抗氧化能力,同时可能参与了唾液腺组织中抑制细胞凋亡作用,从而减少由于自由基等导致的脂质过氧化等细胞毒性反应和因细胞凋亡而致的组织变性而影响分泌功能。

参考文献

- 1 Shiraishi H, Oiki H, Murata K. Fatty degeneration of the parotid gland after ovariectomy. J Otolaryngol Jpn, 2000, 103: 539 - 546
- 2 Jensen JL, Barkvoll P. Clinical implications of the dry mouth. Oral mucosal diseases. Ann N Y Acad Sci, 1998, 842: 156 - 162
- 3 Taubert M, Davives EM, Back I. Mouth dryness Praxis, 2008, 97 (21): 1131 - 1132
- 4 Maier H, Tisch M. Mouth dryness and burning sensation of the oral mucosa: causes and possibilities for treatment. HNO, 2003, 51 (9): 739 - 747
- 5 Kusunoki T, Shiraishi H, Murata K, Nishida N, Tomura T. Apoptosis and estrogen on aging changes of female rat parotids. Aging cell Acta Med Kinki Univ, 2004, 29: 27 - 30
- 6 Yao X, Rarey KE. Detection and regulation of Cu, Zn - SOD and Mn - SOD in rat cochlear tissues. Hear Res, 1996, 96: 199 - 203
- 7 Koizumi T, Goto H, Tanaka H. Lecithinized superoxide dismutase suppresses free radical substrates during the early phase of burn care in rats. Journal of burn care & research: official publication of the American Burn Association, 2009, 30(2): 321 - 328
- 8 Faiz M, Acarin L, Peluffo H, Villapol S, Castellano B, González B. Antioxidant Cu/Zn SOD: expression in postnatal brain progenitor cells. Neuroscience letters, 2006, 401(1 - 2): 71 - 76
- 9 Leimola - Virtanen R, Salo T, Toikkanen S. Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands. Maturitas, 2000, 36 (2): 131 - 137
- 10 Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czeczot H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. Acta biochimica Polonica, 2009, 24(3): 125
- 11 González - García JA, Nevado J, García - Berrocal JR. Endogenous protection against oxidative stress caused by cisplatin: role of superoxide dismutase. Acta oto - laryngologica, 2009, 2: 509 - 518

(收稿:2009 - 11 - 19)

(修回:2009 - 12 - 15)

磷脂酶 A₂、白细胞介素 - 1β、金属蛋白酶组织抑制物 - 1 在创伤性脑损伤中的表达研究

李廷富 万立华 张 薇 傅登俊

摘要 目的 研究胞质型磷脂酶 A₂ (cPLA₂)、白细胞介素 - 1β (IL - 1β)、金属蛋白酶组织抑制物 - 1 (TIMP - 1) 在创伤性脑损伤中的表达以及作用。**方法** 以自由落体撞击伤大鼠模型为对象,用 RT - PCR 方法检测脑组织中 cPLA₂、IL - 1β、TIMP - 1

基金项目:四川省科技厅基金项目[川科技(2006)6]

作者单位:646000 成都市第三人民医院检验科(李廷富);400016 重庆医科大学法医教研室(万立华);646000 泸州医学院附属医院康复科(张薇);610200 成都市双流县第一人民医院检验科(傅登俊)

通讯作者:刘继光,电子信箱:liujg5550@163.com

的 mRNA 表达变化。**结果** cPLA₂ 的 mRNA 在伤后 2h 表达升高,7 天达到高峰,以后下降,但直到 14 天时仍高于正常对照组水平。IL-1β 在伤后 1h 表达明显升高,5~8h 达到高峰,在伤后 72h 时降至正常对照组水平。TIMP-1 在伤后 2h 开始升高,48~72h 达到高峰,到 14 天时基本接近正常对照组水平。**结论** cPLA₂、IL-1β 和 Timp-1 在脑损伤后表达增加提示 cPLA₂、IL-1β 和 TIMP-1 参与了脑损伤过程并可能在其中发挥了重要作用。

关键词 磷脂酶 A₂ 白介素-1β 基质金属蛋白酶抑制剂-1 脑损伤

Study of the Expression of the Phospholipase A₂, Interleukin-1β and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 Following Traumatic Brain Injury. Li Tingfu, Wan Lihua, Zhang Wei, Fu Dengjun. Department of Clinical Laboratory, The Third People's Hospital of Chengdu, Sichuan 646000, China

Abstract Objective To investigate the expression of the cytosolic phospholipase A₂ (c-PLA₂), interleukin-1 beta (IL-1β), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in rat brain after injury. **Methods** The model of traumatic brain injury originally described by Feeney was employed. The mRNA was analyzed by RT-PCR. **Results** The mRNA of cytosolic phospholipase A₂ was increased at 2 hour and its peak was at 7 day. At 14 day, the level of cytosolic phospholipase A₂ mRNA was still in high level as compared to the control group. Likely, the enhancement expression of interleukin-1β was seen at the 1 hour and the peak time was from 5 to 8 hour. At 72 hour, it decreased to normal level. The expression of inhibitor of matrix metalloproteinase-1 was increased at the 2 hour, and the highest expression level was seen during 48 to 72 hour. It came down to normal level at 14 day after injury. **Conclusion** The augment of the expression of the cytosolic phospholipase A₂, interleukin-1β and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 following traumatic brain injury suggested that they participated in the pathogenesis of the traumatic brain injury, and may played roles in this pathophysiological process.

Key words Phospholipase A₂; Interleukin-1β; Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1; Brain; Injury

创伤性脑损伤中不仅有原发性的直接机械性损害,而继发性损伤是导致中枢神经功能持续障碍甚至死亡的主要原因。脑损伤后的许多因素如能量储备耗损、酸中毒、缺血、神经递质和钙离子介导的损害、氧自由基和脂质过氧化引起的细胞膜和细胞骨架退化以及炎症反应等与继发性脑损伤有密切关系。而磷脂酶 A₂ (PLA₂) 和白细胞介素-1β (IL-1β) 均为体内重要的致炎因子。基质金属蛋白酶及其抑制剂对胚胎发育、血管新生、炎症反应、组织修复和重塑胶原血管疾病以及肿瘤侵袭有重要影响。鉴于 IL-1、PLA₂, 基质金属蛋白酶及其抑制物在炎症创伤中的密切关系,本研究在我们前期用基因芯片筛选出的差异表达较大的创伤性脑损伤基因 IL-1、PLA₂ 和基质金属蛋白酶抑制物 (TIMP-1) 的基础上,再用 RT-PCR 的方法进一步验证其表达并观察其在损伤后的表达规律,为阐明其在脑损伤中的作用以及为法医寻找损伤时间推断标志物提供线索和依据。

材料与方 法

1. 实验动物: 健康 Wistar 大鼠,雌雄不限,250~300g,由重庆医科大学动物实验中心提供。

2. 主要设备与试剂: ①数字化凝胶成像仪 (Bio-RAD 公司); ②PTC-200 核酸扩增仪 (Peltier 公司); ③TRIzol (Invitrogen 公司 USA); ④cPLA₂ 引物序列为: 上游 5' - ATG CCC AGA CCT ACG ATT TA - 3'; 下游 5' - CT TCA TAC TTC TTT TGG GGA - 3', 引物扩增长度 737bp; ⑤IL-1β 的引物序列

为: 上游: 5' CAT CTT TGA AGA AGA GCC CG - 3'; 下游: 5' GGG ATT TTT TCG TTG CTT GT - 3', 引物扩增长度 243bp; ⑥TIMP-1 的引物序列为: 上游: 5' - CCA CCT TAT TAT ACC AGC GTT ATG - 3'; 下游: 5' - GGC AAA GTG ATC GCT CTG - 3', 引物扩增长度 216bp; ⑦GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) 引物序列为: 上游: 5' - CCA TGG AGA AGG CTG GGG - 3'; 下游: 5' - CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC - 3', 引物扩增长度 195bp。以上引物序列均由 TaKaRa 公司合成。

3. 实验动物分组: Wistar 大鼠被随机分成损伤组、假手术组 (n=4)、正常对照组 (n=4)。损伤组被进一步分成 13 个小组,每组 4 只。动物采用改良 Feeny 模型,致伤后分别于 1h、2h、5h、8h、12h、24h、48h、72h、5 天、7 天、9 天、14 天用 4% 水合氯醛 (400mg/kg) 麻醉后断头取损伤区脑组织置于 -70℃ 保存备用。假手术组 (n=4) 仅作颅骨钻孔但不致伤,于术后 5h 麻醉断头处死,取与损伤组相应部位脑组织置于 -70℃ 保存备用。正常对照组脑组织标本取法,保存均与损伤组和假手术组相同。

4. 脑组织总 RNA 提取与 c-DNA 制备: 用 TRIzol 等试剂分别提取正常对照组、损伤组和假手术组的 RNA, 然后进行反转录得到各组的 c-DNA。

5. cPLA₂、IL-1β、TIMP-1 的扩增: 在各组的 PCR 反应管中均加入 GAPDH 的引物作为内标同时扩增。(1) cPLA₂ 的扩增条件: 95℃ 预变性 5min, 94℃、30s, 55℃、30s, 72℃、1min, 32 次循环, 最后 72℃、5min。(2) Timp-1 的扩增条件: 94℃ 预变性 4min, 94℃、45s, 59℃、45s, 72℃、1min, 30 次循环, 最后 72℃、10min。(3) IL-1β 的扩增条件: 94℃ 预变性 9min,

94℃、30s, 57℃、30s, 72℃、30s, 30次循环, 最后 72℃、7min。

6. PCR产物分析: 取 9μl PCR产物与 1μl 10×电泳上样缓冲液混匀, 加样于含有 EB 的 2.0% 琼脂糖凝胶, 进行电泳。用数字化凝胶成像仪进行成像扫描。并用 Quantity one 软件分别测定待测样品和内标的 GAPDH 光密度, 以其比值作相对半定量。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

结 果

1. 经 Bio-RAD 凝胶成像仪扫描、Quantity One 软件分析其相对光密度, 假手术组中的 cPLA₂, IL-1β, TIMP-1 与正常对照组中的 cPLA₂, IL-1β, TIMP-1 表达量无显著性差异。

2. cPLA₂ 表达增加见于伤后 2h。随着损伤经过时间增加, 其 mRNA 持速增加, 直到 7 天达到高峰, 以后下降, 直到 14 天时仍高于正常对照组 (图 1)。IL-1β 在损伤后 1h 表达明显升高, 伤后 5~8h 达到高峰, 随后下降, 在伤后 72h 时降至正常对照组水平 (图 2)。伤区皮质 TIMP-1 在伤后 2h 开始升高, 随着损伤时间延长 TIMP-1 表达逐渐增加, 在伤后 48~72h 达到高峰, 以后开始下降, 到 14 天时基本接近正常对照组 (图 3)。

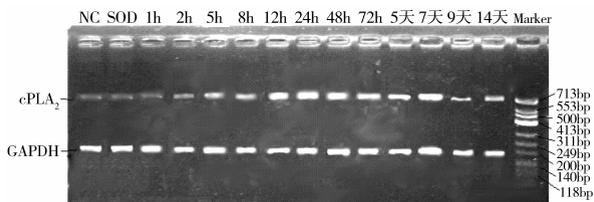


图 1 脑损伤后伤区皮质 cPLA₂ 在不同损伤时间点时的表达变化

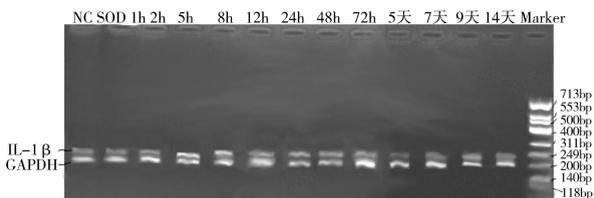


图 2 脑损伤后伤区皮质 IL-1β 在不同损伤时间点时的表达变化

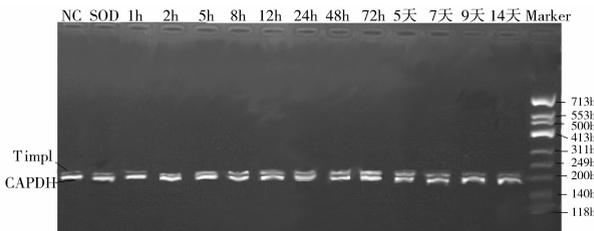


图 3 脑损伤后伤区皮质 TIMP-1 在不同损伤时间点时的表达变化

讨 论

磷脂酶 A₂ 是一类水解甘油磷脂 Sn-2 酯酰键的水解酶。其家族成员众多, 根据其在细胞内外的分布一般分为两大类。即细胞外磷脂酶 A₂ 和胞内性磷脂酶 A₂。在正常生理情况下, 对保持细胞膜功能的完整性; 维持细胞功能具有极为重要的作用。病理情况下, 磷脂酶 A₂ 过度表达、激活将导致细胞膜损伤, 细胞凋亡或坏死^[1]。磷脂酶 A₂ 受多种因素调控。IL-1β、IL-6、TNF-α 可上调其表达, 糖皮质激素可下调其表达。本次研究发现, cPLA₂ 于伤后 2h 表达增加, 并随时间增加而加强, 在伤后 2 周内均处于高表达状态。而 IL-1β 表达升高早于 cPLA₂, 在伤后 1h 即开始升高。这一结果从表达时程上支持 IL-1β 可能促进 cPLA₂ 表达上调。值得注意的是 IL-1β 表达升高持续时间较短而 cPLA₂ 表达持续 2 周处于高表达状态, 这一结果提示 cPLA₂ 表达的增加除了 IL-1β 外可能还有其他因素使 cPLA₂ 表达增加。此外, 有人观察到脑外伤后 15min PLA₂ 活性就开始升高, 也就是活性的升高早于 cPLA₂ 表达的增加。这一现象提示 PLA₂ 在脑损伤后的调控除了转录水平的调控外还可能有翻译后水平的调控。cPLA₂ 在中枢神经系统有重要作用, 利用基因敲除技术发现, 缺失 cPLA₂ 基因的大鼠较野生型大鼠更耐受脑缺血与再灌注损伤, 其神经细胞死亡数显著低于野生型大鼠。另有人在大鼠海马脑片培养的缺血模型中使用 cPLA₂ 抑制剂 AACOCF₃, 发现 AACOCF₃ 呈剂量依赖性的阻止神经细胞死亡^[2]。因此, 控制磷脂酶 A₂ 活性或表达可能是一种潜在的治疗脑损伤后继发性损害的靶标。

IL-1β 在中枢神经系统有多种作用。一方面可引起脑组织水肿和神经元迟发性死亡并加重脑损伤后的病理生理过程, 而使用 IL-1β 抑制剂能够减少脑损伤后的损伤面积和水肿的严重程度, 另一方面它又可启动创伤愈合过程如纤维化和血管再生。此外, IL-1β 还可刺激其他致炎因子如 IL-6, TNF-α, 集落刺激因子 (CSFs) 以及自身的表达。本实验进一步证实 IL-1β 在脑损伤后早期就有表达的增加, 且早于其他细胞因子的表达这可能与启动炎症反应有关。此外, 本实验发现 IL-1β 在伤后表达持续时间较短, 在伤后 72h 即接近正常水平。有研究表明^[3], 脑损伤后 3 天伤区中性粒细胞聚集达到高峰, 而此时 IL-1β 表达水平接近正常, 提示中性粒细胞表达的 IL-1β 可能不是主要来源。

细胞外基质是由一系列生物大分子组成的动态网络结构,在组织中起连接、支持和填充作用,对细胞的生长、分化、黏附和迁移均有重要影响。此外,基质金属蛋白酶及其组织抑制物广泛参与了兴奋性神经细胞损伤、脑出血、脑缺血与再灌注损伤、冻伤、细菌和病毒性脑膜炎等病理过程。本实验发现 TIMP-1 在脑损伤后 2h mRNA 水平开始升高,在 48~72h 达到高峰,到 14 天时恢复正常水平。这一结果证实了我们前期的 cDNA 芯片结果。TIMP-1 的 mRNA 水平在伤后增加提示 TIMP-1 参与了脑损伤后的病理过程。有研究认为 IL-1 β 可刺激 TIMP-1 的表达。本实验发现 TIMP-1 的表达增加晚于 IL-1 β ,从表达时程上支持这一观点^[4]。最近, Tan^[5] 对海马细胞的研究表明, TIMP-1 具有保护海马神经元对抗谷氨酸的兴奋性毒性作用,能显著降低谷氨酸所致的细胞凋亡和死亡数量,并呈剂量依赖性。另有一些研究表明, TIMP-1 具有促细胞生长特性,同时在局限性中枢神经系统损伤中有积极作用^[6]。因此, TIMP-1 在脑损伤后表达增加可能是一种自身保护机制,与神经细胞的抗损伤修复有关。

综上所述,我们的结果证实脑损伤可引起 cPLA₂、IL-1 β 和 TIMP-1 表达增加,并呈现出时间依赖性的变化。cPLA₂、IL-1 β 可能参与了脑损伤后的继发性细胞损害过程, TIMP-1 在脑损伤后表达增加

可能对神经细胞有保护作用。此外,脑损伤后引起的 cPLA₂、IL-1 β 和 TIMP-1 表达时序性变化现象对于法医实践中损伤时间的推断有一定帮助作用。

参考文献

- 1 Kolko M, Rodriguez de Turco E B, Diemer N H, et al. Neuronal damage by secretory phospholipase A₂: modulation by cytosolic phospholipase A₂, platelet-activating factor, and cyclooxygenase-2 in neuronal cells in culture. *Neurosci Lett*, 2003, 338(2): 164-168
- 2 Arai K, Ikegaya Y, Nakatani Y, et al. Phospholipase A₂ mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional difference of neuronal vulnerability. *Eur. J. Neurosci*, 2001, 13(12): 2319-2323
- 3 Chatzipanteli K, Alonso O F, Kraydieh S, et al. Importance of post-traumatic hypothermia and hyperthermia on the inflammatory response after fluid percussion brain injury: Biochemical and immunocytochemical studies. *J. Cereb. Blood Flow. Metab*, 2000, 20: 531-542
- 4 Suryadevara R, Holter S, Borgmann K, et al. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by astrocytes: links to HIV-1 dementia. *Glia*, 2003, 44(1): 47-56
- 5 Tan H K, Heywood D, Ralph G S, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 inhibits excitotoxic cell death in neurons. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 22(1): 98-106
- 6 Jaworski D M. Differential regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA expression in response to intracranial injury. *Glia*, 2000, 30: 199-208

(收稿:2009-12-14)

(修回:2009-12-25)

广州北郊南昆山自然保护区卫氏并殖吸虫 超高度疫源地首报

陆予云 邝浩成 沈浩贤 龙小山 罗健留

摘要 目的 调查广州北郊南昆山自然保护区并殖吸虫流行分布状况。方法 采集调查点山溪中螺蛳 2012 只,溪蟹 63 只,收集疫源地野山猫粪便 3 份,2 只人工感染家猫粪便 2 份。检查并殖吸虫尾蚴、囊蚴和虫卵。解剖人工感染虫卵阳性猫,查找并殖吸虫成虫。**结果** 螺蛳体并殖吸虫尾蚴感染率为 0.15%(3/2000)。螺种为放逸短沟蜷。蟹体卫氏并殖吸虫囊蚴感染率为 100%(59/59)。感染度:2~516 个囊蚴/只蟹,2~10 个囊蚴/克蟹。蟹种为平和华溪蟹。2 份野山猫粪便检出并殖吸虫卵,感染率为 66.66%(2/3)。解剖两只人工感染阳性猫检获卫氏并殖吸虫成虫 11 条。**结论** 首次发现广州北郊南昆山自然保护区存在严重卫氏并殖吸虫流行,为超高度疫源地(I 级)。鉴于卫氏并殖吸虫是我国主要致病并殖吸虫,该疫源地属国家级自然保护区,也是 4A 旅游区及著名的避暑胜地,游人如误饮用生山泉水,具有感染卫氏并殖吸虫的潜在危害,必须引起高度重视。

关键词 广州北郊 并殖吸虫 囊蚴 平和华溪蟹 感染度 保虫宿主

基金项目:广东省医学科研基金项目资助(A2009-248)

作者单位:510925 广州医学院从化学院(陆予云、龙小山、罗健留);广东省从化市疾病预防控制中心(邝浩成);广州医学院形态实验中心(沈浩贤)

通讯作者:陆予云,电子邮箱:luyuyun55@yahoo.com.cn