

从 ICAM-1 介导的炎症反应探讨下肢缺血再灌注对糖尿病大鼠坐骨神经的损伤机制

黄 达 李鸣镝 林 兰 郑亚琳 王秋虹

摘 要 **目的** 观察下肢缺血再灌注后糖尿病大鼠血清、坐骨神经组织中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和髓过氧化物酶(MPO)的表达情况,探讨下肢缺血再灌注对糖尿病大鼠坐骨神经的损伤机制。**方法** 24 只清洁级 SD 雄性大鼠,分为正常组($n=6$)和糖尿病组($n=18$),糖尿病组采用链脲佐菌素造模,饲养 1 个月后,选择部分糖尿病大鼠($n=9$)作为糖尿病缺血再灌注组,暂时阻断腹主动脉、髂总动脉和股动脉 3h,再灌注 7 天后检测各组大鼠血清、坐骨神经中 ICAM-1 和 MPO 的表达情况。**结果** 糖尿病缺血再灌注大鼠血清、坐骨神经组织中 ICAM-1 和 MPO 含量明显高于糖尿病大鼠和正常大鼠($P<0.01$)。**结论** 糖尿病大鼠下肢缺血再灌注通过提高血清、坐骨神经组织中 ICAM-1 和 MPO 的表达水平参与坐骨神经的损伤过程。

关键词 糖尿病 缺血再灌注 周围神经病变 ICAM-1

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Study in How the Ischemia-reperfusion of Diabetic Rats' Lower Limb Injures Sciatic Nerve from Inflammatory Response Mediated by ICAM-1. Huang Da, Li Mingdi, Lin Lan, Zheng Yalin, Wang QiuHong. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Abstract Objective To observe the expression level of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and myeloperoxidase (MPO) in serum and sciatic nerve tissue after ischemia-reperfusion, and study how the ischemia-reperfusion of diabetic rats' lower limb injures sciatic nerve. **Methods** Twenty-four male SD rats were divided into two groups: normal control group ($n=6$), diabetic group ($n=18$), and the model rats suffering from diabetes were induced by STZ. After feeding for one month, some of the model rats suffering from diabetes ($n=9$) were chosen as the ischemia-reperfusion group and kept abdominal aorta, common iliac artery and femoral artery blocked for 3 hours. After 7-day perfusion, the expression level of ICAM-1 and MPO in all rats' serum and sciatic nerve tissue was detected. **Results** ICAM-1 and MPO of serum and sciatic nerve in diabetic rats suffering from ischemia-reperfusion are higher obviously than those from normal control group and diabetic group without ischemia-reperfusion ($P<0.01$). **Conclusion** Ischemia-reperfusion in diabetic rats' lower limb can participate in the injury process of sciatic nerve by improving the expression level of ICAM-1 and MPO in serum and sciatic nerve tissue.

Key words Diabetes; Ischemia-reperfusion; Peripheral neuropathy; ICAM-1

缺血可以引起糖尿病大鼠严重的周围神经病变,缺血再灌注能够进一步加重神经细胞轴索变性并导致施万细胞凋亡^[1]。有研究表明,糖尿病周围神经组织在缺血再灌注中受损与氧化应激和炎症反应密切相关,其中炎性介质表达水平增高和炎性细胞黏附浸润是重要因素,但其损伤机制尚不完全清楚^[1-3]。本实验通过检测糖尿病大鼠下肢缺血再灌注后血清、坐骨神经组织中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和髓过氧化物酶(MPO)的表达情况以探讨周围神经缺血

再灌注的损伤机制。

材料与方法

1. 实验材料:清洁级 SD 雄性大鼠 24 只,体重 290~310g (北京华阜康生物科技股份有限公司提供),链脲佐菌素(Sigma 公司),Rat sICAM-1/CD54 ELISA 试剂盒(R&D Systems 公司),MPO 试剂盒(南京建成生物工程研究所),ICAM-1(G-5)(Santa 公司),7160 全自动生化仪(日本日立公司),STAT FAX 2100 全自动酶标仪(Awareness Technology 公司)。

2. 模型制备:(1)糖尿病大鼠模型制备:大鼠适应性饲养 1 周后,从 24 只 SD 大鼠中随机选择 6 只大鼠作为正常对照组,剩余 18 只大鼠禁食不禁水 12h,次日使用 pH 4.2 的柠檬酸盐缓冲液配制浓度为 2% 的链脲佐菌素(STZ)溶液,按 60mg/kg 的剂量腹腔注射,72h 后使用罗氏血糖仪测定大鼠尾尖血糖,以随机血糖持续 > 16.7mmol/L 作为糖尿病大鼠成模标

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173445)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院

通讯作者:林兰,主任医师、博士生导师,中国中医科学院首席研究员,电子邮箱:linlan05@163.com

准,3 只大鼠血糖值未达标,予以剔除,成功造模 15 只。(2) 下肢缺血再灌注模型制备^[3~5]:糖尿病大鼠饲养 1 个月后,从中随机选择 6 只大鼠作为糖尿病对照组,剩余 9 只糖尿病大鼠作为糖尿病缺血再灌注组,使用 3% 戊巴比妥钠麻醉,沿腹壁正中中线切开长约 3cm 切口,钝性剥离腹主动脉和右侧髂总动脉,使用动脉夹夹闭腹主动脉和右侧髂总动脉;另沿右侧腹股沟韧带剪开长约 2cm 切口,钝性剥离股动脉,使用动脉夹夹闭股动脉,造成大鼠右下肢中-重度缺血,计时 3h 后打开动脉夹恢复下肢血供,逐层缝合肌肉,皮肤。手术过程死亡 2 只大鼠,7 只造模成功。

3. 指标检测:手术 7 天后,3 组大鼠使用 3% 戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,3000r/min 离心 15min 分离血清,采用 Elisa 法检测血清 sICAM-1 水平,比色法检测血清 MPO 水平。截取右侧坐骨神经,一部分称重后匀浆,比色法检测坐骨神经 MPO 水平,一部分放入 10% 甲醛溶液中固定,制作石蜡切片后免疫组化染色,200 倍显微镜下拍照,每个坐骨神经标本横切面和纵切面各随机选取 3 个视野,横切面计数 ICAM-1 阳性微血管数,纵切面采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量积分光密度(IOD)。

4. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件,实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对于符合正态性和方差齐性的数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两两比较选择 LSD 检验;对于不满足正态性和方差齐性的数据,采用非参数检验

Kruskal-Wallis H 检验,两两比较采用 Nemenyi 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 血清 sICAM-1 和 MPO 水平:糖尿病大鼠下肢缺血再灌注后血清 sICAM-1 和 MPO 表达水平与正常大鼠和糖尿病大鼠比较均明显升高 ($P < 0.01$),糖尿病大鼠血清 sICAM-1 和 MPO 表达水平与正常大鼠比较明显升高 ($P < 0.01$,表 1)。

表 1 各组大鼠血清 sICAM-1 和 MPO 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	数量 (只)	sICAM-1 (pg/ml)	MPO (U/L)
正常组	6	2458.40 ± 361.62	21.09 ± 3.72
糖尿病组	6	6371.17 ± 515.06 *	42.36 ± 4.81 *
糖尿病缺血再灌注组	7	8658.66 ± 651.95 **	63.51 ± 5.39 **

与正常组比较, * $P < 0.01$;与糖尿病组比较, # $P < 0.01$

2. 坐骨神经 ICAM-1 和 MPO 水平:糖尿病大鼠下肢缺血再灌注后坐骨神经 ICAM-1 和 MPO 表达水平与正常大鼠和糖尿病大鼠比较均明显升高 ($P < 0.01$),糖尿病大鼠坐骨神经 ICAM-1 和 MPO 表达水平与正常大鼠比较升高 ($P < 0.05$,表 2、图 1 和图 2)。

表 2 各组大鼠坐骨神经 ICAM-1 和 MPO 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	数量 (只)	坐骨神经横切面	坐骨神经纵切面	坐骨神经匀浆 MPO
		ICAM-1 计数 (条)	ICAM-1 IOD 值	(U/g)
正常组	6	0.67 ± 0.59	0.56 ± 0.35	1.58 ± 0.21
糖尿病组	6	2.61 ± 1.04 *	5.44 ± 0.66 *	2.33 ± 0.21 **
糖尿病缺血再灌注组	7	7.14 ± 2.03 **	26.44 ± 7.45 **	4.23 ± 0.30 **

与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与糖尿病大鼠比较, # $P < 0.01$

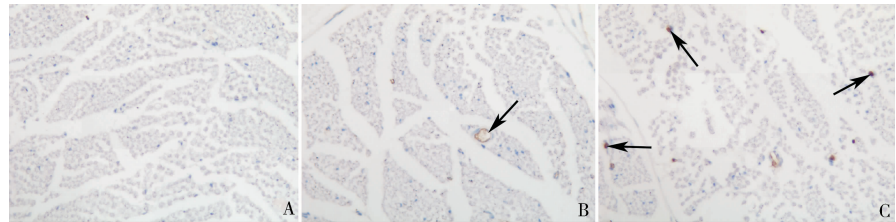


图 1 3 组大鼠坐骨神经横切面免疫组化 ICAM-1 表达 (×200)

A. 正常组大鼠;B. 糖尿病组大鼠;C. 糖尿病缺血再灌注组大鼠

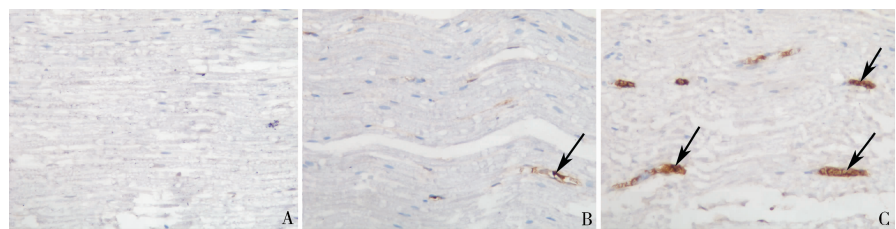


图 2 3 组大鼠坐骨神经纵切面免疫组化 ICAM-1 表达 (×200)

A. 正常组大鼠;B. 糖尿病组大鼠;C. 糖尿病缺血再灌注组大鼠

讨 论

糖尿病周围神经病变是糖尿病最常见的慢性并发症之一,与糖尿病周围血管病变密切相关。糖尿病周围血管病变病理特征为动脉粥样硬化斑块、血栓形成,造成动脉管腔狭窄、闭塞,引起周围神经缺血性损伤,在外科手术治疗过程中常引起周围神经缺血再灌注损伤,加重糖尿病周围神经病变。在骨外科,肢体骨室筋膜综合征切开减压后、肢体主要供血动脉断裂修补后均可引起周围神经的缺血再灌注损伤^[6]。由于糖尿病患者机体内存在明显的氧化应激和炎症反应,缺血再灌注对糖尿病患者周围神经组织的损伤更为严重,往往引起严重的周围神经病变^[7,8]。以往研究表明,缺血再灌注引起周围神经损伤与炎症细胞浸润密切相关^[3~5]。但并未揭示炎症细胞的浸润原理和对周围神经的损伤机制,对临床的指导意义有限,本实验选择检测 ICAM-1 和 MPO 的表达水平旨在揭示上述机制并为临床治疗提供依据。

ICAM-1 是一类大小约为 (76 ~ 114) kDa 的细胞表面单链跨膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族成员,主要介导细胞之间以及细胞与基膜之间的黏附反应。静息状态下,ICAM-1 在血管内皮细胞、白细胞上呈低水平表达。炎症状态下,ICAM-1 的表达水平迅速上调^[9]。ICAM-1 的受体包括淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1) 和单核细胞黏附分子-1 (Mac-1), LFA-1 主要介导中性粒细胞与血管内皮细胞之间的黏附,Mac-1 主要介导单核细胞与血管内皮细胞之间的黏附,可见血管内皮细胞 ICAM-1 表达升高会促进炎症细胞的黏附与浸润^[10]。据此推断,在缺血再灌注诱发炎症反应的状态下,可能通过提高血管内皮细胞 ICAM-1 的表达水平介导炎症细胞的黏附与浸润。MPO 是由中性粒细胞、单核-吞噬细胞分泌的含血红素辅基的血红素蛋白酶,属于血红素过氧化物酶超家族成员,其表达水平代表中性粒细胞的功能状态,是评价中性粒细胞在各种组织中浸润程度的可靠指标^[11]。其主要功能是利用过氧化氢和氯离子产生次氯酸盐,形成具有氧化能力的自由基,在炎症状态下,MPO 催化生成过量的氧化剂,导致氧化应激增强和氧化性组织损伤。据此推断,缺血再灌注导致炎症细胞浸润后,可能通过释放过量的 MPO 参与坐骨神经损伤。

本实验结果证实,缺血再灌注后糖尿病大鼠坐骨神经 ICAM-1 和 MPO 表达水平显著升高,其中 ICAM-1 定位于坐骨神经血管内皮细胞,通过增强

与中性粒细胞和单核-吞噬细胞的黏附,导致炎症细胞浸润,炎症细胞释放过量的 MPO,催化生成大量氧自由基,破坏生物膜,引起坐骨神经轴索变性和施万细胞凋亡。此外发现,与正常大鼠比较,糖尿病大鼠血清 sICAM-1 和 MPO 表达水平增高,缺血再灌注能够进一步提高糖尿病大鼠血清 sICAM-1 和 MPO 的表达水平。血清中 sICAM-1 是由细胞表面的 ICAM-1 经蛋白酶裂解、脱落进入血液而来,MPO 是由中性粒细胞、单核-吞噬细胞分泌而来,二者水平可以间接反应全身氧化应激和炎症反应状态。由此表明,糖尿病大鼠机体内存在明显的氧化应激和炎症反应状态,缺血再灌注通过加重机体的氧化应激和炎症反应造成组织器官损伤。实验结果提示临床上可以通过使用药物抑制 ICAM-1 与 MPO 的表达水平以减少下肢缺血再灌注对坐骨神经的损伤,下肢缺血再灌注对坐骨神经的其他损伤机制有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Nukada H, Lynch CD, McMorran PD. Aggravated reperfusion injury in STZ-diabetic nerve[J]. J Peripher Nerv Syst, 2002, 7(1): 37-43
- 2 Nukada H, McMorran PD, Baba M, et al. Increased susceptibility to ischemia and macrophage activation in STZ-diabetic rat nerve[J]. Brain Res, 2011, 1373: 172-182
- 3 柯铁, 陈文昌, 施作霖, 等. 炎症细胞介导坐骨神经缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 福建医药杂志, 2008, 30(6): 83-84
- 4 Alipour M, Gholami MR, Jafari AI, et al. Intraperitoneal aminoguanidine improves sciatic nerve ischemia-reperfusion injury in male sprague-dawley rats[J]. Cell Mol Neurobiol, 2011, 31(5): 765-773
- 5 Wang Y, Schmeichel AM, Iida H, et al. Ischemia-reperfusion injury causes oxidative stress and apoptosis of Schwann cell in acute and chronic experimental diabetic neuropathy[J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(11-12): 1513-1520
- 6 柯铁, 陈文昌. MK-801 对大鼠坐骨神经缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 福建医药杂志, 2012, 34(1): 64-67
- 7 任春久, 张瑶, 崔为正, 等. 氧化应激在 2 型糖尿病发病机制中的作用研究进展[J]. 生理学报, 2013, 65(6): 664-673
- 8 兰丽珍, 弓军胜, 谭芳, 等. 2 型糖尿病患者血糖波动对炎症反应的影响[J]. 山西医科大学学报, 2013, 44(6): 449-451
- 9 林庆宾, 张俐. CAM-1 在脊髓缺血再灌注损伤中的作用进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(12): 68-70
- 10 Sarecka-Hujar B, Zak I, Krauze J. Interactions between rs5498 polymorphism in the ICAM1 gene and traditional risk factors influence susceptibility to coronary artery disease[J]. Clin Exp Med, 2009, 9(2): 117-124
- 11 李成山, 刘超, 李妍怡. 大剂量岷当归对大鼠脑缺血再灌注损伤 MPO 表达的影响[J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(4): 118-119

(收稿日期: 2014-01-12)

(修回日期: 2014-01-21)