

文章编号 1006-8147(2021)06-0603-05

论 著

白细胞介素-18 在 小鼠缺血性脑卒中的损伤作用及其机制

乌日吉木斯¹, 刘啸轩¹, 苏悦¹, 阎涛^{1,2}

(天津医科大学总医院 1.神经病学研究所; 2.神经内科, 天津 300052)

摘要 目的:探讨白细胞介素(IL)-18 在小鼠缺血性脑卒中的损伤作用及其机制。方法:采用C57BL/6J 成年雄性小鼠构建光化学法诱导局灶性大脑皮层缺血性脑卒中模型,随机分为对照组、脑梗死组、IL-18 分泌型结合蛋白(IL-18BP)治疗组,每组 18 只。术后 14 d 进行神经功能评分并进行 HE 染色测量小鼠脑梗死面积。术后 3 d 实时荧光定量 PCR 检测小鼠脑组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 的表达,流式细胞术检测小鼠脑组织中小胶质细胞表型。结果:与脑梗死组相比,IL-18BP 治疗组神经功能显著改善并且脑梗死面积显著降低($t=2.750, 2.235$, 均 $P<0.05$)。IL-18BP 治疗组脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达显著降低($t=3.091, 2.328, 3.443$, 均 $P<0.05$), IL-10 的表达升高($t=4.997, P<0.05$)。与脑梗死组相比,IL-18BP 治疗组脑组织中 M1 型小胶质细胞数量明显降低($t=4.779, P<0.05$), M2 型小胶质细胞数量明显升高($t=2.619, P<0.05$)。结论:在缺血性脑卒中,IL-18 可介导免疫炎症损伤并发挥调节作用。

关键词 缺血性脑卒中; 白细胞介素-18; 炎症; 小胶质细胞; 小鼠

中图分类号 R743.3

文献标志码 A

The injury effect of interleukin-18 in the mice with ischemic stroke and its mechanism

WU Ri-jimusi¹, LIU Xiao-xuan¹, SU Yue¹, YAN Tao^{1,2}

(1. Tianjin Neurological Institute; 2. Department of Neurology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To investigate the injury effect of interleukin-18 (IL-18) in mice with ischemic stroke and its mechanism.

Methods: C57BL/6J adult male mice were used to construct a photochemically induced ischemic stroke model, and they were randomly divided into sham group, stroke group, and IL-18BP (IL-18 secretion bound protein) treatment group, 18 mice in each group. Neurological function score was performed 14 days after operation, and cerebral infarct size was measured by H&E staining. The expression of inflammatory factors such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) in the brain tissues of mice was detected by Quantitative Real-time PCR 3 days after operation, and the microglial cell phenotype in the brain tissues of mice was detected by flow cytometry. **Results:** Compared with stroke group, neurological function was significantly improved and cerebral infarct size was significantly reduced ($t=2.235, P<0.05$) in the IL-18BP treatment group. The expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the IL-18BP treatment group was significantly decreased ($t=3.091, 2.328, 3.443$, all $P<0.05$), while the expression of IL-10 was increased ($t=4.997, P<0.05$). Compared with stroke group, the number of M1-type microglia was significantly decreased ($t=4.779, P<0.05$) and the number of M2 microglia was significantly increased ($t=2.619, P<0.05$) in the IL-18BP treatment group.

Conclusion: In ischemic stroke, IL-18 mediates immune inflammatory injury and plays a key regulatory role.

Key words ischemic stroke; interleukin-18; inflammation; microglia; mice

脑卒中是我国第一位死亡原因,具有高发病率、高复发率、高致残率、高死亡率的特点,显著增加了患者家庭和社会的经济负担。脑卒中的疗法主要集中于局部缺血区域神经元的保护和血流再通,但因为其治疗时间窗窄和技术要求高,只有极少数患者能够受益。卒中后组织损伤引发的免疫炎症反应贯穿卒中后各个阶段,如何通过干预免疫炎症以减轻脑卒中患者的脑损伤而改善预后,是未来卒中研究

的重点方向之一^[1]。白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)是一种多效性促炎细胞因子,也被称为干扰素 γ 诱导因子,能够被半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(cysteine-requiring aspartate protease, caspase-1)激活成为成熟有活性的糖蛋白,在固有免疫和获得性免疫中起关键作用,在人体各种免疫细胞中均有广泛表达^[2]。研究表明,IL-18 参与多种神经系统疾病,包括视神经脊髓炎谱系疾病、多发性硬化、脑内出血等^[3-4]。然而,尚不明确 IL-18 在缺血性脑卒中的作用机制。因此,本研究通过光化学法诱导局灶性大脑皮层缺血性脑卒中模型,探讨 IL-18 在缺血

基金项目 天津市自然科学基金重点项目(17JCZDJC36100)

作者简介 乌日吉木斯(1996-),女,硕士在读,研究方向:神经病学;

通信作者:阎涛, E-mail: taoyan@tmu.edu.cn。

性脑卒中的损伤作用及其机制,对将来临床治疗缺血性脑卒中提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 成年雄性 C57BL/6J 小鼠, 20~22 g, 7~8 周龄; 购买自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物[许可证号: SCXK(京)2016-0006, 批号: 110011200109844553]全部饲养于天津医科大学总医院神经病学研究所动物实验中心 SPF 级专业鼠房。小鼠随机分为对照组、脑梗死组、IL-18 分泌型结合蛋白(IL-18BP)治疗组(IL-18BP 是一种分泌的糖蛋白, 通过与 IL-18 结合并阻断其生物学活性而充当 IL-18 拮抗剂, 购自美国 R&D 公司), 每组 18 只。IL-18BP 治疗组在造模后 1 h、24 h 及 48 h 腹腔注射 IL-18BP(4 μ g/次), 而对照组和脑梗死组分别注射等量的生理盐水。所有小鼠提供充足的食物和水, 并维持昼夜节律的稳定。

1.2 实验方法

1.2.1 缺血性脑卒中模型 本实验采用光化学法诱导局灶性大脑皮层缺血性脑卒中模型。主要步骤: 称重小鼠, 在手术前 5 min 行腹腔注射给予玫瑰红染料(50 mg/kg, 0.9%生理盐水溶解, 光敏感物质, 可在绿光诱导下诱导特定区域的血管阻塞)。腹腔注射 5%水合氯醛(70 μ L/10 g)麻醉小鼠, 之后将麻醉好的小鼠固定于立体定位仪上, 下方需放置小鼠体温维持板用以维持体温, 红霉素眼药膏涂抹小鼠双眼予以保护。沿颅骨中缝切开小鼠颅骨表面皮肤, 约 1 cm, 充分暴露小鼠颅骨表面, 利用棉签清除所需要诱导梗塞部位的颅骨外骨膜并标记。将绿光光源的光纤头部固定于标记部位, 在光纤头部与小鼠颅骨间放置中空的黑色橡胶垫来防止光线露出。开启绿光光源照射 20 min, 期间注意小鼠生命体征。照射结束后取下光纤头部, 生理盐水冲洗颅骨表面, 缝合切口, 利用碘伏再次对缝合伤口消毒, 维持小鼠体温至彻底清醒, 恢复自由进食水。

1.2.2 动物处理 分别于第 3 天和第 14 天处死小鼠, 深度麻醉小鼠后进行冰磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)心脏灌注, 后取出脑组织。第 14 天的脑组织制成石蜡标本, 进行后续染色。第 3 天的脑组织, 分别用于 RNA 提取和流式细胞术检测。

1.2.3 神经功能评分 采用改良神经功能缺损量表评分(modified neurological severity score, mNSS)和足错步实验(foot-fault test), 通过评价其运动功能以及感觉功能, 判断缺血性脑损伤后损伤程度和恢复情况。分别于造模后第 1、3、7、14 天进行神经功能评分。

1.2.4 苏木紫和伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色 小鼠脑组织保存于 4%组织固定液中固定 24 h 后, 进行后续脱水石蜡包埋后制备成石蜡切片。脑切片行 HE 染色, 测量脑梗死面积大小。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测炎症指标 使用实时荧光定量 PCR 技术检测 IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-6 和 IL-10 的表达水平。在第 3 天处死小鼠, 取新鲜脑组织, 加入 TRIzol 裂解液, 研碎充分, 制备 RNA, 检测其浓度及纯度保证在可用范围内。使用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。由生工生物工程(上海)股份有限公司负责合成引物。引物浓度稀释至 10 μ mol/L。20 μ L 的反应体系由 2.5 μ L 的 cDNA、1 μ L 的正向引物、1 μ L 的反向引物、5.5 μ L 的无酶水和 10 μ L 的 SYBR green PCR Master Mix 组成。在 Option 2Real-Time PCR 检测系统进行定量分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

分子		引物序列(5'→3')
IL-1 β	上游引物	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC
IL-1 β	下游引物	GAACGTACACACCAGCAGGTTA
TNF- α	上游引物	TACTCCAGGTTCTCTTCAAGG
TNF- α	下游引物	GGAGGTTGACTTTCTCTCTGTA
IL-6	上游引物	TGATGCACTTGCAGAAAACA
IL-6	下游引物	ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC
IL-10	上游引物	CTGGACAACATACTGCTAACCG
IL-10	下游引物	GGGCATCACTTCTACCAGGTAA
GAPDH	上游引物	GCCAAGGCTGTGGGCAAGGT
GAPDH	下游引物	TCTCCAGCGCGCACGTCAGA

注: IL: 白细胞介素; TNF- α : 肿瘤坏死因子- α

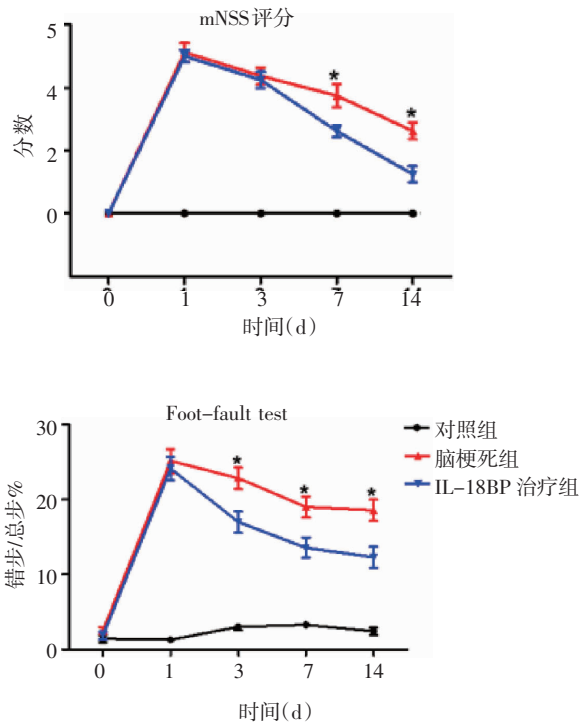
1.2.6 流式细胞术 在造模后第 3 天处死小鼠, 收集脑组织以制备单细胞悬液。将脑组织在冰冷的 PBS 中切成小块。将组织碎片与胶原酶 D4(1 g/L, Sigma-Aldrich)和 Dispase(1 g/L, Roche)孵育, 并在 37 $^{\circ}$ C 消化 60 min。使匀浆通过 70 μ m 过滤器, 并将滤液以 2 000 r/min 离心 3 min。离心的细胞重悬于 30% Percoll(GE)中, 然后以 700 r/min 离心 10 min。用冰 PBS 以 2 000 r/min 洗涤沉淀 10 min。将单细胞悬液与以下荧光标记的抗体孵育: 分别孵育 CD45、CD11b、CD86 和 CD206 抗体。其中, CD45 $^{+}$ CD11b $^{+}$ CD86 $^{+}$ 标记 M1 型小胶质细胞, CD45 $^{+}$ CD11b $^{+}$ CD206 $^{+}$ 标记 M2 型小胶质细胞。流式细胞仪数据从 FACS Aria 流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)收集, 并使用 Flowjo_V 10 进行分析。

1.3 统计学处理 利用 Graphpad Prism 5.0 进行统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示结果。两组独立样本比较采用

非配对 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠脑梗死后神经功能情况 与脑梗死组比较,在第7天和14天,IL-18BP 治疗组小鼠 mNSS 评分显著降低($t=2.750, P<0.05; t=3.789, P<0.05$),见图1。与脑梗死组比较,在造模后的第3、7、14天,IL-18BP 治疗组小鼠的足错步实验评分显著降低($t=2.518, P<0.05; t=2.767, P<0.05; t=3.114, P<0.05$),见图1。



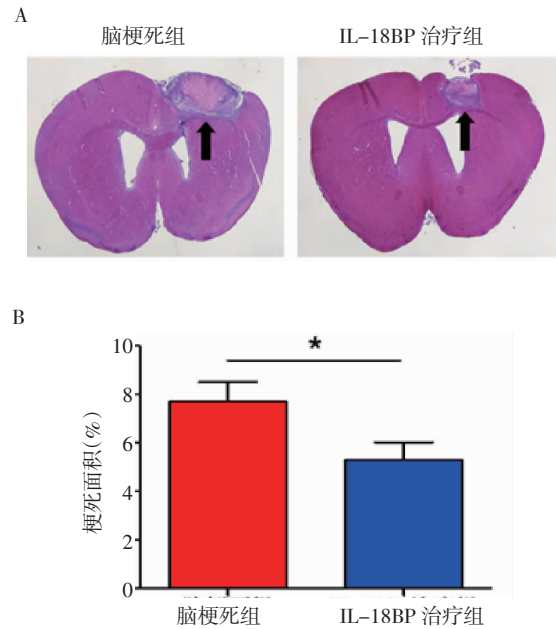
注:mNSS:改良神经功能缺损量表评分;IL-18BP:IL-18 分泌型结合蛋白;与 IL-18BP 治疗组相比, $*P<0.05$

图1 IL-18 对缺血性卒中小鼠神经功能恢复的影响

Fig1 Effect of IL-18 on neurological function recovery in ischemic stroke mice

2.2 各组脑梗死面积情况 与脑梗死组比较,IL-18BP 治疗组脑梗死面积显著降低($t=2.235, P<0.05$),见图2。

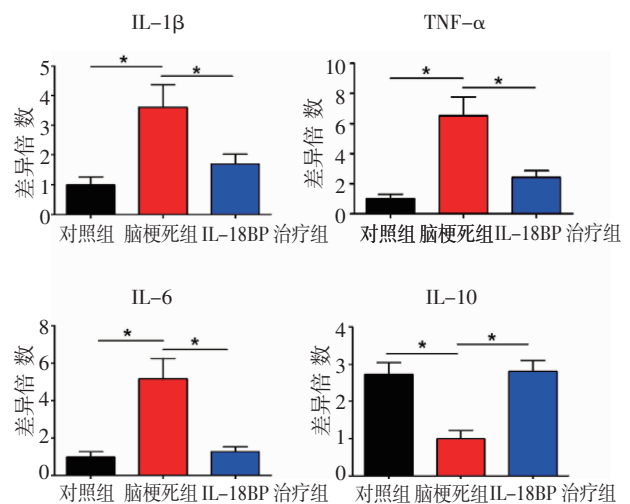
2.3 各组小鼠脑组织中炎症因子的表达 与对照组比较,脑梗死组小鼠脑组织中的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平升高($t=4.289, P<0.05; t=3.276, P<0.05; t=3.687, P<0.05$),IL-10 的水平降低($t=3.134, P<0.05$),见图3。而与脑梗死组比较,IL-18BP 治疗组小鼠脑组织中的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平显著降低($t=3.091, P<0.05; t=2.328, P<0.05; t=3.443, P<0.05$),IL-10 的水平显著升高($t=4.997, P<0.05$),见图3。



注:A:缺血性卒中后脑组织 H&E 染色($10\times$),箭头:脑梗死部位;B:与 IL-18BP 治疗组比较, $*P<0.05$;IL-18BP:IL-18 分泌型结合蛋白

图2 HE 染色检测小鼠脑梗死面积

Fig2 The infarct size detected by HE staining

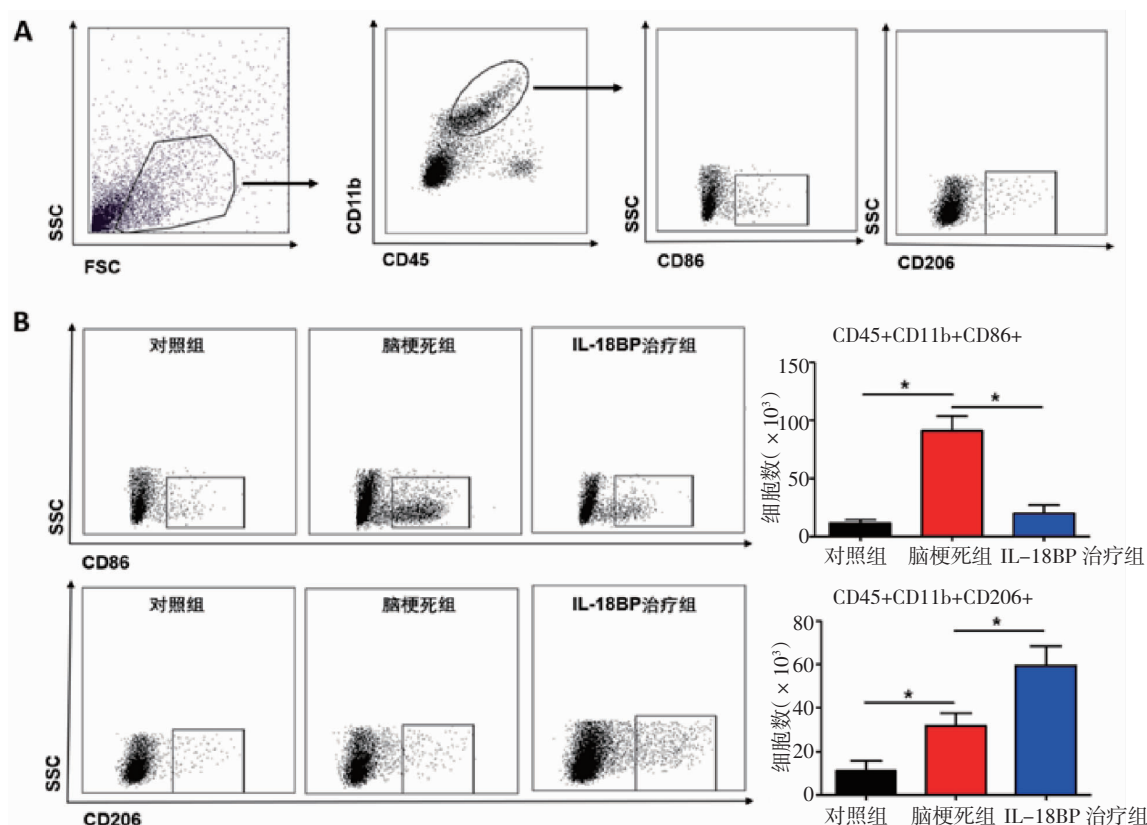


注:IL:白细胞介素;TNF- α :肿瘤坏死因子- α ;与脑梗死组相比, $*P<0.05$

图3 小鼠脑组织内炎症因子表达变化

Fig3 The change of inflammatory factors in brain tissue of mice

2.4 各组小鼠脑组织内小胶质细胞表型变化 与对照组比较,脑梗死组 M1 型小胶质细胞数量显著增加($t=5.971, P<0.05$),M2 型小胶质细胞数量增加($t=2.823, P<0.05$)。与脑梗死组比较,IL-18BP 治疗组 M1 型小胶质细胞数量明显降低($t=4.779, P<0.05$),M2 型小胶质细胞数量明显升高($t=2.619, P<0.05$)。



注:IL-18BP:IL-18 分泌型结合蛋白;A:CD45⁺CD11b⁺CD86⁺ 细胞群和 CD45⁺CD11b⁺CD206⁺ 细胞群的门控策略;B:来自各组小鼠的每 10⁶ 个脑细胞悬浮液中 CD45⁺CD11b⁺CD86⁺ 细胞数量以及 CD45⁺CD11b⁺CD206⁺ 细胞数量,柱状图总结各组小鼠在造模后 3 d 治疗的结果;与对照组或与脑梗死组相比,* P<0.05

图 4 流式细胞术检测各组小鼠脑组织 M1/M2 型小胶质细胞的变化

Fig 4 The changes of M1/M2 type microglia in the brain tissue of mice detected by flow cytometry

3 讨论

卒中导致神经元细胞死亡,并激活损伤相关的分子模式,释放的因子在受伤的大脑区域引起局部炎症^[5-6]。这种局灶性大脑炎症会加剧血-脑屏障损害、微血管衰竭、脑水肿、氧化应激并直接导致神经元细胞死亡,从而加剧继发性脑损伤^[1]。IL-18 在缺血性脑损伤中发挥重要作用,参与炎症反应的启动与扩增。IL-18 启动的单核细胞中促炎因子和趋化因子可介导免疫细胞向缺血损伤部位募集,触发炎症级联反应,加剧缺血后的损伤^[7]。IL-18 mRNA 在成年大鼠脑缺血后的晚期被诱导^[8],参与脑卒中后脑内炎症的诱导和发展^[9]。在脑卒中患者中,血清 IL-18 水平升高与颅脑计算机断层扫描中低密度区域的范围以及功能障碍相关^[3]。研究表明用抗 IL-18 单克隆抗体或 IL-18BP 可改善缺血再灌注引起的心肌损伤^[10-11]。本研究通过光化学法诱导局灶性大脑皮层缺血性脑卒中模型,应用 IL-18BP 阻断 IL-18 作用并评估神经功能及脑梗死面积变化。结果显示,IL-18BP 治疗脑梗死小鼠后不仅能改善小鼠神经功能障碍,还能显著降低脑梗死面积。

卒中后大脑中多种细胞类型可产生炎症介质,包括细胞因子和趋化因子。细胞因子是中枢神经系统各种病理条件下神经炎症和急性、慢性神经退行性变的重要介质。在急性缺血性卒中的小鼠模型中,缺血后急性期在对侧半球中观察到的一系列细胞因子,包括 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和转化生长因子- β ,是各种神经病理条件下神经炎症的重要介质^[11-6]。对脑出血发作后 2 h 至 5 d 死亡的 30 例脑出血患者的大脑进行组织病理学病例对照研究,发现对侧海马中的核因子- κ Bp65 亚基、巨噬细胞炎症蛋白 2 和基质金属蛋白酶-9 上调^[1]。因此细胞因子介导的神经炎症与神经元细胞死亡和不良结果相关。研究表明,腹腔注射 IL-18BP 可改善炎症反应,促进血管再生修复^[12]。本研究应用 IL-18BP 阻断 IL-18 作用,实时荧光定量 PCR 检测脑组织中炎症因子表达。发现 IL-18BP 治疗脑梗死小鼠可通过降低 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平,增加抗炎因子 IL-10 的表达,从而改善卒中后的神经功能损伤。

小胶质细胞是脑内表达炎症体基因的主要细胞,占中枢神经系统细胞的 10%~15%^[13-14]。活化的

小胶质细胞/巨噬细胞由于其 M1/M2 表型不同,在脑卒中后神经损伤中发挥着双刃剑的作用^[15]。通常被认为具有神经毒性的 M1 型小胶质细胞表达促炎因子,具有清除死细胞和组织碎片的功能^[16];而被认为具有神经保护和修复作用的 M2 型小胶质细胞主要表达抗炎和生长因子,修复受损的脑组织^[17-18]。血-脑屏障破坏也可能与小胶质细胞的激活状态密切相关。有实验已经显示脑卒中后,炎症性小胶质细胞通过上调包括 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 在内的促炎性细胞因子而大大降低了血-脑屏障的完整性^[19]。小胶质细胞还可以与星形胶质细胞或脑微血管内皮细胞相互作用。活化的小胶质细胞通过直接吞噬内皮细胞并引起血管解体,最终导致血-脑屏障的破坏,进一步引入循环免疫细胞并增加其对脑实质的浸润^[20]。本研究应用 IL-18BP 阻断 IL-18 作用,应用流式细胞术检测脑组织中小胶质细胞表型变化,发现 IL-18BP 治疗脑梗死小鼠后可通过促进小胶质细胞表型由促炎表型 M1 向抗炎表型 M2 转化,从而减少促炎因子的分泌,增加抗炎因子的分泌,改善卒中后的炎症反应。但其具体影响的信号通路尚未明确,有待今后进一步完善。

综上所述,缺血性脑卒中后 IL-18 介导了免疫反应而引起卒中后的继发性免疫炎症性损伤。IL-18 主要通过介导小胶质细胞从促炎表型向抗炎表型转化,影响脑卒中后神经功能的恢复。本研究揭示了 IL-18 在脑卒中的免疫炎症性损伤中发挥关键的调节作用,为临床脑梗死救治提供新的视角和治疗方法。

参考文献:

- [1] SHI K, TIAN D C, LI Z G, et al. Global brain inflammation in stroke[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(11): 1058
- [2] REX DAB, AGARWA L N, PRASAD TSK, et al. A comprehensive pathway map of IL-18-mediated signalling [J]. *J Cell Commun Signal*, 2020, 14(2): 257
- [3] ALTENDAHL M, MAILLARD P, HARVEY D, et al. An IL-18-centered inflammatory network as a biomarker for cerebral white matter injury[J]. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0227835
- [4] FELDERHOFF-MUESER U, SCHNIDT O I, OBERHOLZER A, et al. IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration?[J]. *Trends Neurosci*, 2005, 28(9): 487
- [5] SHICHITA T, ITO M, MORITA R, et al. MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1[J]. *Nat Med*, 2017, 23(6): 723
- [6] LIESZ A, DALPKE A, MRACSKO E, et al. DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(2): 583
- [7] OUZOUNIDIS N, GIAKOSTIDIS A, POUTAHIDIS T, et al. Interleukin 18 binding protein ameliorates ischemia/reperfusion-induced hepatic injury in mice [J]. *Liver Transpl*, 2016, 22(2): 237
- [8] JANDER S, SCHROETER M, STOLL G. Interleukin-18 expression after focal ischemia of the rat brain: association with the late-stage inflammatory response [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(1): 62
- [9] MORI I, HOSSAIN M J, TAKEDA K, et al. Impaired microglial activation in the brain of IL-18-gene-disrupted mice after neuroviral influenza A virus infection [J]. *Virology*, 2001, 287(1): 163
- [10] VENKATACHALAM K, PRABHU S D, REDDY V S, et al. Neutralization of interleukin-18 ameliorates ischemia/reperfusion-induced myocardial injury [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(12): 7853
- [11] XIAO H, LI H, WANG J J, et al. IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon beta-adrenergic insult[J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(1): 60
- [12] RODRIGUEZ-MENOCAL L, FARIDI M H, MARTINEZ L, et al. Macrophage-derived IL-18 and increased fibrinogen deposition are age-related inflammatory signatures of vascular remodeling [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(5): H641
- [13] WANG J, XING H, WAN L, et al. Treatment targets for M2 microglia polarization in ischemic stroke[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 518
- [14] FENG Y, HE X, LUO S, et al. Chronic colitis induces meninges traffic of gut-derived T cells, unbalances M1 and M2 microglia/macrophage and increases ischemic brain injury in mice[J]. *Brain Res*, 2019, 1707: 8
- [15] LIU X, LIU J, ZHAO S, et al. Interleukin-4 is essential for microglia/macrophage M2 polarization and long-term recovery after cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 498
- [16] LIU R, DIAO J, HE S, et al. XQ-1H protects against ischemic stroke by regulating microglia polarization through PPARgamma pathway in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 57: 72
- [17] LI W, LI L, CHOPP M, et al. Intracerebral hemorrhage induces cardiac dysfunction in mice without primary cardiac disease[J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 965
- [18] JIANG C T, WU W F, DENG Y H, et al. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke(Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(5): 2006
- [19] PAN W, KASTIN A J. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier [J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 83(6): 363
- [20] KANAZAWA M, KAWAMURA K, TAKAHASHI T, et al. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke[J]. *Brain*, 2015, 138(Pt 7): 1932

(2021-02-26 收稿)