

·论著·

ICAM-1 单克隆抗体对新生大鼠 缺氧缺血性脑损伤作用的研究

王锁英¹, 宋韶鸣², 吴建农³, 卢小东⁴, 金胜利¹, 凌亚平¹

(1. 江苏大学附属医院儿科, 江苏 镇江 212001; 2. 南京市儿童医院新生儿科, 江苏 南京 210008; 3. 江苏大学附属医院病理科, 江苏 镇江 212001; 4. 江苏大学生命学院, 江苏 镇江 212013)

【摘要】目的 探讨细胞间粘附分子-1(ICAM-1)单克隆抗体对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的保护作用。**方法** 48只7d龄SD大鼠随机分为缺血缺氧组(A组)、ICAM-1单抗治疗组(B组)、生理盐水组(C组)和正常对照组(D组)。其中A组观察到再给氧后2h, 24h, 48h, 72h和168h处死, B, C, D组观察到再给氧后48h处死。应用免疫组织化学法和HE染色观察ICAM-1在不同时间脑组织的表达和脑组织中中性粒细胞浸润情况。**结果** A组再给氧2h, 脑微血管内皮细胞ICAM-1微弱表达, 24h后表达开始增加, 48h达到高峰, 同时受损脑组织中中性粒细胞浸润也随之增加。B组再给氧48h后, ICAM-1表达强度及中性粒细胞浸润比同时点缺血缺氧组明显降低。**结论** HIBD时ICAM-1的表达与中性粒细胞浸润密切相关, ICAM-1单抗对新生大鼠HIBD具有一定保护作用。

[中国当代儿科杂志, 2003, 5(5): 425-428]

【关键词】 细胞间粘附分子-1; 脑缺氧; 脑缺血; 新生鼠

【中图分类号】 R-33; R741 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2003)05-0425-04

Effect of Anti-ICAM-1 Antibody on Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Neonatal Rats

Suo-Ying WANG, Shao-Ming SONG, Jian-Nong WU, Xiao-Dong LU, Sheng-Li JIN, Ya-Ping LING. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China (Email: wang-suo-ying@eastday.com)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of anti-intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antibody on hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in neonatal rats. **Methods** Forty-eight SD neonatal rats were randomly assigned into four groups: HIBD group (Group A), anti-ICAM-1 antibody treatment HIBD group (Group B), normal saline treatment group (Group C) and normal control group (Group D). The rats in the Group A were sacrificed at 2, 24, 48, 72 and 168 hs respectively after resupply of oxygen, and the rats in the Group B and C were sacrificed at 48 h after treatment. The ICAM-1 expression of the brain was detected by immunohistochemical method at different time following the re-supply of oxygen. HE staining was used to observe neutrophil infiltration in the brain tissue and pathologic characteristics of brain cells. **Results** The expression of ICAM-1 was light at 2 h after the re-supply of oxygen and then increased at 24 h and reached its peak at 48 h in Group A. The neutrophil infiltration in the damage brain tissue of the Group A increased simultaneously. The expression of ICAM-1 and neutrophil infiltration in Group B significantly decreased compared with those of Group A at 48 h after the re-supply of oxygen. **Conclusions** The expression of ICAM-1 may be correlated with the neutrophil infiltration in hypoxic-ischemic brain tissue. The anti-ICAM-1 antibody might have protective effects against HIBD in the neonatal rat.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(5): 425-428]

Key words: Intercellular adhesion molecule-1; Cerebral anoxia; Cerebral ischemia; Neonatal rat

围产期窒息可合并脑、心、肝、肾等多器官损伤, 造成永久性神经损伤, 而缺血-再灌注损伤是其发病
其中缺氧缺血性脑损伤(HIBD)尤为常见, 严重者中常见的病理过程^[1]。目前 HIBD 尚无有效的治疗

[收稿日期] 2002-12-27; [修回日期] 2003-04-17

[作者简介] 王锁英(1964-), 女, 硕士, 副主任医师。主攻方向: 围产医学。

[通讯作者] 王锁英, 江苏省镇江市江苏大学附属医院儿科, 邮编: 212001。

方法,支持和对症治疗是主要治疗手段。动物实验表明,通过各种方法阻止中性粒细胞进入受损组织或使其功能失活可防止缺血-再灌注引起的器官损伤^[2,3]。近年研究发现,细胞间粘附分子-1(ICAM-1)在中性粒细胞移行于受损脑组织中起重要作用^[4],主要通过结合配体介导白细胞与血管内皮细胞的牢固粘附^[5]。我们在建立新生大鼠 HIBD 模型的基础上,应用 ICAM-1 单克隆抗体(单抗)进行阻断治疗,观察缺氧缺血后不同时间脑组织 ICAM-1 的表达与中性粒细胞浸润及病理变化的关系,研究其治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验分组及动物模型的建立

48只7d龄SD大鼠,雌雄不限,体重(16.1±2.7)g,由江苏省实验动物中心提供,随机分为4组:缺氧缺血组(A组)、缺氧缺血后 ICAM-1 单抗治疗组(B组)、生理盐水组(C组)和正常对照组(D组)。缺氧缺血组按恢复给氧后的观察时间又分为2h,24h,48h,72h和168h组。ICAM-1 单抗组观察到恢复给氧后48h。每组6只,共48只。参照 Rice^[6]的方法制备 HIBD 模型,对生后7d的SD大鼠,乙醚麻醉后,结扎左侧颈总动脉。术毕将新生大鼠置自制容器中,持续输入8% O₂和92% N₂的混合气体入该容器,容器另一端以一塑料管道与外界相通,以保持容器内压力与大气一致及持续低氧状态。容器中置钠石灰以吸收 CO₂,缺氧时间为2h。ICAM-1 单抗由美国 BD 公司提供,批号为554966,用生理盐水将其配成0.05mg/ml注射液,于模型建立后0h,22h腹腔注射1mg/kg及0.5mg/kg。C组正常大鼠注射等容积生理盐水作治疗对照,观察48h处死。正常对照组也观察到48h

处死。

1.2 免疫组织化学及组织形态学观察

到规定时间将新生大鼠断头处死,立即取脑,生理盐水冲洗后迅速置10%中性福尔马林溶液中固定,经脱水、透明、包埋后在 Leica 病理切片机上行4μm切片,给予SABC法免疫组织化学检测,DAB染色观察 ICAM-1 的表达和 HE 染色观察脑组织白细胞浸润及脑细胞损伤的形态学变化。SABC 试剂盒及 DAB 染色试剂盒由上海华美生物工程公司提供。选用反应性增生淋巴结作 ICAM-1 的阳性对照,正常新生大鼠血清代替一抗作阴性对照。阳性标准:微血管内皮细胞胞膜和胞质呈弥漫性棕黄色为阳性,无阳性微血管内皮细胞为阴性。阳性微血管内皮细胞1%~25%为+,26%~50%为++,51%~75%为+++,>76%为++++。

1.3 统计方法

对资料进行多个样本比较的秩和检验(Kruskal-Wallis法),组间比较采用多样本两两比较的秩和检验(Nemenyi法)。

2 结果

2.1 缺氧缺血后脑组织 ICAM-1 表达的变化

在脑组织切片中 ICAM-1 免疫阳性染色可见于微血管的内皮细胞上,表现为血管壁深染。48h后B组、C组及D组脑组织 ICAM-1 的表达为-~+,而明显的免疫阳性染色(+++~++++)出现在A组(H_C=15.10, P<0.01)。见表1。A组再给氧2h ICAM-1 微弱表达(-~+);24h后表达开始增加(++~++++);48h达到高峰(+++~++++),其免疫阳性微血管数明显高于其它时间点(H_C=12.24, P<0.05),见图1;以后 ICAM-1 表达逐渐下降,168h明显减少(-~+)。见表2。

表1 各组48h ICAM-1 表达的变化

Table 1 Expression of ICAM-1 in each group 48 h after the re-supply of oxygen

ICAM-1 分级	A组	B组	C组	D组	合计	秩次范围	平均秩次
-		3	4	4	11	1~11	6
+		3	2	2	7	12~18	15
++							
+++	1				1	19	19
++++	5				5	20~24	22
Ri	129	63	54	54			
ni	6	6	6	6			
-Ri	21.5	10.5	9	9			

表2 A组不同时间点 ICAM-1 表达的变化
Table 2 Expression of ICAM-1 in Group A of various time points

ICAM-1	2 h	24 h	48 h	72 h	168 h	合计	秩次范围	平均秩次
-	2				1	3	1~3	2
+	4			1	5	10	4~13	8.5
++		2		2		4	14~17	15.5
+++		4	1	3		8	18~25	18.5
++++			5			5	26~30	28
Ri	38	105	158.5	95	44.5			
ni	6	6	6	6	6			
Ri	6.33	17.50	26.42	15.83	7.42			

2.2 缺氧缺血后脑组织白细胞浸润及脑细胞损伤的形态学变化

C组及D组未见脑组织白细胞浸润及脑细胞的损伤。A组再给氧后2h可见少量的脑细胞水肿、界限不清;再给氧24h后出现点状坏死灶;48h~72h除上述改变外,脑组织可见片状坏死灶;168h缺氧缺血性损伤逐渐好转。A组随着再给氧时间延长,缺氧缺血后的脑组织白细胞浸润明显,并在48h~72h达高峰(图2),其浸润主要集中在脑微血管壁及变性坏死区周围。

2.3 ICAM-1 单抗对 ICAM-1 的表达和中性粒细胞浸润及脑细胞形态的影响

B组再给氧48h ICAM-1 表达强度低于A组($D=66, P<0.05$),见表1和图3;中性粒细胞浸润及脑细胞损伤程度也减轻,见图4。

3 讨论

本研究表明,腹腔注射 ICAM-1 单抗可显著降低 HIBD 后 48 h 受损脑组织微血管内皮细胞 ICAM-1 的表达和中性粒细胞浸润,与有关文献相似^[7,8]。但应用 ICAM-1 单抗是否可能导致明显缺氧缺血性损害的延迟出现尚待进一步研究确定。

中性粒细胞在缺氧缺血性脑组织的出现,不仅是损伤的结果,而且可加重损伤^[9]。当建立 HIBD 模型后再给氧,缺血脑组织出现血流再灌注,血流中所含的炎症介质使内皮细胞受到刺激,结果 ICAM-1 表达上调,当 ICAM-1 与白细胞上的配体结合后,促进了白细胞的牢固粘附、活化和渗出,因此白细胞浸润也开始出现,并随着再灌注时间的延长,二者同

步加强并达到高峰。白细胞粘附于微血管内皮细胞表面,一方面可机械地堵塞微血管通道,影响组织的血液供应,另一方面活化的以及进入组织内的白细胞可释放大量的毒性氧自由基和蛋白水解酶、细胞因子等炎症介质,损害局部血管,导致局部血管通透性增加,造成组织水肿,脑细胞变性,并吸引更多的白细胞进入组织,形成恶性循环,直到组织完全破坏。

ICAM-1 属于免疫球蛋白超家族成员,可在内皮细胞和白细胞中表达。正常情况下,内皮细胞 ICAM-1 呈不表达或低表达状态,当受刺激后表达明显增加,而其上调的机制目前尚未明了,可能与组织缺氧缺血后产生细胞因子、PAF、活性自由基等物质有关^[10]。我们的研究还发现,应用 ICAM-1 单抗治疗 HIBD 后脑细胞损伤亦减轻,推测 ICAM-1 单抗可能通过抑制中性粒细胞与内皮细胞的粘附和由此引起的炎症反应改善血液循环。

综上所述,应用 ICAM-1 单抗治疗新生大鼠 HIBD 可显著减少内皮细胞表达 ICAM-1 和受损脑组织中中性粒细胞的浸润,并可减轻脑细胞的损伤。上述这些结果表明,ICAM-1 单抗可部分阻断血管内皮细胞与白细胞的粘附,提示 ICAM-1 单抗对新生大鼠 HIBD 可能有一定保护作用。

(全部图片见封Ⅲ)。

[参 考 文 献]

- [1] Fellman T, Raivio KO. Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia [J]. *Pediatr Res*, 1997, 41 (5): 599-606.
- [2] Liu P, Xu B, Quilley J, Wong PY. Peroxynitrite attenuates hep-

- atic ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279(6): C1970-1977.
- [3] Hayashi S. Effects of LTB₄ receptor antagonist on myonephropathic metabolic syndrome; an experimental study [J]. *Kurume Med J*, 2000, 47(1): 63-72.
- [4] McKeating EG, Andrews PJ, Mascia L. Leukocyte adhesion molecule profiles and outcome after traumatic brain injury [J]. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1998, 71(2): 200-202.
- [5] Oreopoulos GD, Hamilton J, Rizoli SB, Fan J, Lu Z, Li YH, et al. In vivo and in vitro modulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression by hypertonicity [J]. *Shock*, 2000, 14(3): 409-414.
- [6] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.
- [7] Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin A. Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule [J]. *J Neurosurg*, 1991, 75(4): 623-627.
- [8] Rentsch M, Post S, Palma P, Lang G, Menger MD, Messmer K. Anti-ICAM-1 blockade reduces postsinusoidal WBC adherence following cold ischemia and reperfusion, but does not improve early graft function in rat liver transplantation [J]. *J Hepatol*, 2000, 32(5): 821-828.
- [9] Zhang RL, Chopp M, Li Y, Zaloga C, Jiang N, Jones ML, et al. Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. *Neurology*, 1994, 44(9): 1747-1751.
- [10] Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, Brandtzaeg P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule in human intestinal microvascular endothelial cells [J]. *J Immunol* 1996, 156(7): 2558-2565.

(本文编辑:俞燕)

· 消息 ·

欢迎订阅 2004 年中国当代儿科杂志

中国当代儿科杂志是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊和国际权威检索机构《俄罗斯文摘》(AJ)收录期刊,是《中国医学文摘·儿科学》引用的核心期刊,同时被中国学术期刊(光盘版)、北京大学图书馆、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》和《万方数据-数字化网络期刊》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著、疑难病研究、临床研究、实验研究、儿童保健、小儿外科、药物与临床、经验交流、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为双月刊,国际开本,80页,亚光铜版纸印刷,逢双月15日出版,向国内外公开发行人。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价12元,全年72元。邮发代号:42-188。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路141号中国当代儿科杂志编辑部 邮编:410008

电话/传真:0731-4327402 Email: xyped@public.cs.hn.cn 网址: www.cjcp.org

ICAM-1 单克隆抗体对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤作用的研究

(正文见第 425 页)

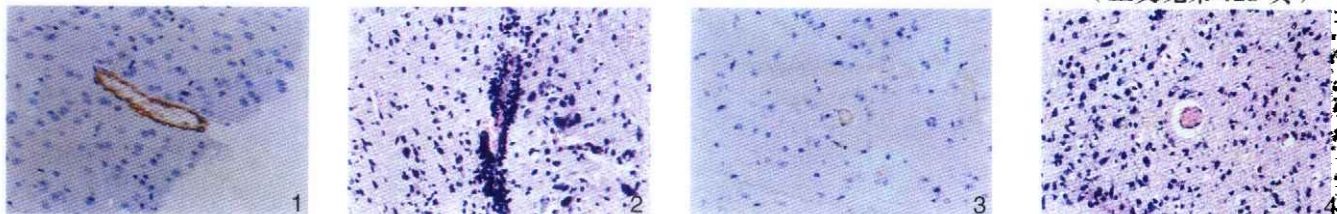


图 1 A 组再给氧 48 h 脑组织 ICAM-1 阳性表达 (× 400)

Figure 1 Positive expression of ICAM-1 in the brain of Group A 48 hs after the re-supply of oxygen

图 2 A 组再给氧 48 h 脑组织中中性粒细胞浸润及脑细胞损伤 (HE × 400)

Figure 2 Infiltration of neutrophil and damage of encephalic cells in the brain of Group A 48 hs after the re-supply of oxygen

图 3 B 组 ICAM-1 单抗治疗后 48 h 脑组织 ICAM-1 阳性表达 (× 400)

Figure 3 Positive expression of ICAM-1 decreased in the brain of Group B 48 hs after the re-supply of oxygen

图 4 B 组 ICAM-1 单抗治疗后 48 h 脑组织中中性粒细胞浸润及脑细胞损伤 (HE × 400)

Figure 4 Infiltration on neutrophil and damage of encephalic cells alleviated in the brain of Group B 48 hs after the re-supply of oxygen

急性脑缺血小鼠脑组织中转化生长 - β_1 的表达及意义

(正文见第 429 页)



图 1 原位杂交 TGF- β_1 在正常组小鼠脑组织无表达 (× 400)

Figure 1 No expression of TGF- β_1 mRNA in the brain of control group

图 2 原位杂交 TGF- β_1 在模型组小鼠脑组织中高表达 (× 400)

Figure 2 High expression of TGF- β_1 mRNA in the brain of model group

婴儿溃疡性结肠炎 1 例

(正文见第 486 页)

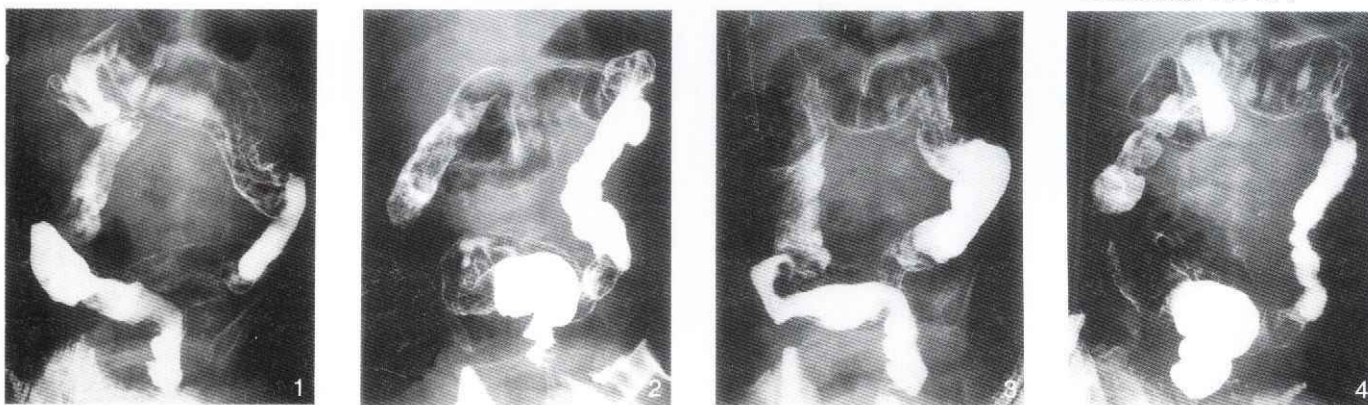


图 1~4 婴儿溃疡性结肠炎钡灌肠摄片

可见乙状结肠袋消失, 管腔变细, 肠管壁不规则呈锯齿样改变; 横结肠袋消失, 管腔扩张, 脾曲结肠壁呈鹅卵石样改变。

蓝色橡皮大疱痣综合征 1 例误诊分析

(正文见第 487 页)

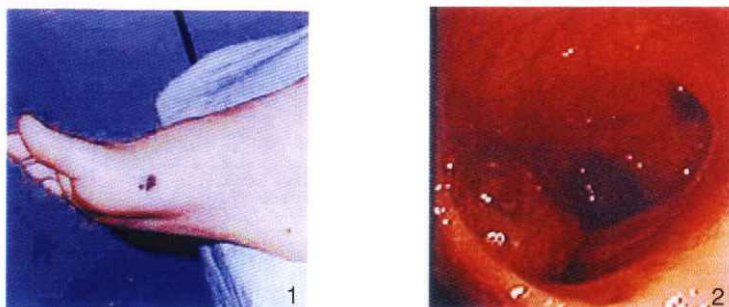


图 1 右足蓝黑色囊性血管瘤

图 2 胃镜示幽门旁囊性肿块