

. 实验研究 .

抑制 CKLF1 促进大鼠脑缺血后神经功能恢复

杨利超 顾建军 赵中甫 闫文涛 王冠军

【摘要】目的 探讨抑制 CKLF1 对局灶性脑缺血大鼠神经保护作用及其相关机制。**方法** 110 只成年 SD 大鼠按数字随机表法随机分为假手术组、模型组、低剂量 CKLF1 抗体组、中剂量 CKLF1 抗体组、高剂量 CKLF1 抗体组, 每组 22 只。采用大脑中动脉线栓法制作局灶性缺血再灌注模型。术后 24 h, 采用 Longa 评分法评定大鼠神经功能; 采用 Nissl 染色检测海马神经元存活率; 免疫组化染色检测海马组织 LC3-Ⅱ 表达; 实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹法检测海马组织 caspase-3 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 抑制 CKLF1 显著改善大鼠神经功能 Longa 评分 ($P<0.05$), 显著增加海马神经元存活率 ($P<0.05$), 显著降低海马组织 LC3-Ⅱ、caspase-3 表达水平 ($P<0.05$), 而且均呈剂量依赖性。**结论** 抑制 CKLF1 表达对局灶性脑缺血大鼠具有神经保护作用, 可能与调控自噬或凋亡有关。

【关键词】 局灶性脑缺血; 趋化素样因子 1; 神经保护; 细胞凋亡; 细胞自噬; 大鼠

【文章编号】 1009-153X(2019)10-0611-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.3

Neuroprotective effect of cerebral tissues after ischemia through downregulation of CKLF1 and its mechanism in SD Rats
YANG Li-chao¹, GU Jian-jun², ZHAO Zhong-fu¹, YAN Wen-tao¹, WANG Guan-jun¹. 1. Department of Neurosurgery, Xuchang Municipal Central Hospital, Xuchang 461000; 2. Advanced Center for Stroke, He'nan Province People's Hospital, Zhengzhou 450000, China

【Abstract】 Objective To investigate the neuroprotective effect of inhibition of chemokine-like factor 1 (CKLF1) on the cerebral tissues after focal ischemia and its mechanisms in rats. **Methods** One hundred and ten rats were randomly divided into 5 groups of 22 animals each, i.e. sham operation group, model group, low, middle and high dose of CKLF1 antibody-treated groups (they were experimental groups 1, 2 and 3 respectively). The focal cerebral ischemia model was made in all the groups except sham operation group. Longa scale was used to assess the neurological defect in the rats. The survival rates of hippocampus neurons were detected by Nissl staining technique. The levels of LC3-Ⅱ and caspase3 mRNA and protein expressions in the hippocampus tissues were determined respectively by immunohistochemical technique, real-time quantitative PCR and Western blotting. **Results** Longa scale scores were significantly higher in the model group than those in experimental group 1 ($P<0.05$), which were significantly higher than those in experimental group 2 ($P<0.05$), which were significantly higher than those in experimental group 3 ($P<0.05$), which were significantly higher than those in sham operation group ($P<0.01$). The survival rate of hippocampus neurons was significantly higher in the sham operation group than that in the experimental group 3 ($P<0.05$), which was significantly higher than that in the experimental group 2 ($P<0.05$), which was significantly higher than that in the experimental group 1 ($P<0.05$), which was significantly higher than that in the model group ($P<0.05$). The level of LC3-Ⅱ expression in the hippocampus tissues in the model group was highest and in the sham operation group was lowest. CKLF1 antibody inhibited the LC3 expression in the hippocampus tissues in a dose-dependent manner. The levels of caspase3 mRNA and protein expression in the hippocampus tissues were highest in the model group ($P<0.05$) and were lowest in the sham operation group ($P<0.05$), and CKLF1 antibody inhibited their expressions in a dose-dependent manner. **Conclusions** It is suggested that the inhibition of CKLF1 expression has a neuroprotective effect on the cerebral tissues in rats with focal ischemia and this neuroprotective effect may be fulfilled through the inhibition of caspase3 signaling pathway.

【Key words】 Focal cerebral ischemia; Chemokine-like factor 1; Neuroprotection; Caspase-3; LC3-Ⅱ

炎症反应、自由基损伤、氧化应激、线粒体结构

和功能异常及兴奋性氨基酸的毒性作用在缺血性脑卒中中发挥着重要作用^[1,2]。急性局灶性脑缺血可引发一系列神经生理病理改变,造成神经细胞坏死、凋亡、自噬、炎症和应激反应,破坏血脑屏障,形成脑水肿,升高颅内压,造成二次损伤,导致神经功能障碍^[3]。趋化因子参与脑缺血后继发性脑损伤的过程,促进炎性浸润和血脑屏障通透性的变化^[4]。趋化因子

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.10.011

作者单位:461000 河南,许昌市中心医院神经外科(杨利超、赵中甫、闫文涛、王冠军);450000 郑州,河南省人民医院高级卒中中心(顾建军)

通讯作者:王冠军,E-mail:guanjunli6951@sina.com

样因子 1(chemokine-like factor 1, CKLF1)是趋化因子家族一种新型半胱氨酸趋化因子基因,在许多炎症和自身免疫性疾病中发挥作用^[5]。近年有研究显示 CKLF1 表达与大脑皮质神经元和海马神经元损伤密切相关^[6,7]。本文探讨 CKLF1 在大鼠脑缺血中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 成年雄性SD大鼠 120 只,6~8 周龄,体重(180±20)g,购自中国中医科学院中药研究所,许可证号为SYXK(京)2015-0041。

按照数字随机表法随机分为 5 组:假手术组(24 只)、模型组(24 只)、CKLF1 抗体组(72 只);CKLF1 抗体组又进一步分为低、中、高剂量组,每组 24 只。造模过程中,2 只因麻醉意外死亡,8 只造模失败,剩余 110 只,所以调整为每组 22 只。

1.2 模型制作 腹腔注射 3.6%水合氯醛麻醉大鼠后,固定在脑立体定位仪上,沿颈部中线切一 3 cm 左右的切口,分离左侧颈总动脉并用眼科剪剪一小口,将线栓(北京沙东生物技术有限公司)于切口处插至大脑中动脉,遇有阻力时停止,用结扎线缚紧防止线栓滑出,45 min 后,拔出线栓。假手术组只分离颈总动脉,不插入线栓、不缚结扎线。

1.3 干预方法 CKLF1 抗体组:造模后 5 min,应用立体定向仪在大鼠左侧侧脑室用微量注射器注射 CKLF1 抗体(低、中、高剂量分别为 0.1、0.5、1 μg,均注射 5 μl;北京大学人类疾病基因研究中心,型号为 2636-4A)。注射部位坐标:前颅后 0.8 mm,中线左侧 1.5 mm,脑膜下 3.5 mm(仅注射一次)。模型组于脑室注射 1 μg 兔正常 IgG(5 μl;北京大学人类疾病基因研究中心,批号为 S10820303)。

1.4 神经功能评估 术后 24 h 采用 Longa 评分法评定大鼠神经功能^[8]。

1.5 海马神经元存活率评估 采用 Nissl 染色检测。术后 24 h 多聚甲醛灌注固定后,取海马组织,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片(厚度为 5 μm)。常规脱蜡至水后置于 55 ℃、1%甲苯胺蓝染液中染色 30 min,冲洗,脱水,透明,中性树胶封片。光镜下观察,细胞染色呈蓝紫色为阳性,选取 5 张切片计算神经元存活率。

1.6 免疫组化检测海马组织 LC3-II 表达水平 大鼠海马组织脱蜡至水后,3%过氧化氢孵育,PBS 冲洗,山羊血清封闭。滴加兔抗鼠 LC3-II 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号为 554106),4 ℃

过夜,复温后滴加 FITC 二抗,避光室温放置 1 h,DAB 显色后苏木精复染,常规酒精脱水二甲苯透明后,中性树胶封片,显微镜下观察染色结果。结果判断以染色越深代表 LC3-II 的表达水平越高。

1.7 qRT-PCR 检测海马组织 caspase-3 mRNA 表达 提取海马组织总 RNA,逆转录成 cDNA。Primer5.0 软件对 caspase-3 进行引物设计。caspase-3: F2-GGG GCT GAA ACC ACC AAT, R2-ACT GCA GCC CGC AG;以β-actin 为内参, F3-TGT TTG AGA CCT TGA ACA CCC, R3- AGG AAGG CTG GAA GAG TGC。在上海生工进行合成。利用 ABI7500 系统(Applied Biosystems)进行 qRT-PCR 反应,反应条件: 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 15s, 72 ℃ 15s, 共 35 个循环。用 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 相对表达水平。

1.8 免疫印迹法检测海马组织 caspase-3 蛋白表达 大鼠海马组织置于含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 细胞裂解液中匀浆,高速低温离心,分离上清液,加入上样缓冲液,沸水浴变性,配胶,电泳,转膜,封闭,一抗孵育 4 ℃ 下过夜,二抗孵育,ECL 发光试剂盒染色、显影。采用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统采集图像。采用 ImageJ 软件计算目的蛋白和内参蛋白灰度值,计算其比值,进行半定量分析。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 20.0 进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 CKLF1 对大鼠脑缺血后神经功能的影响 模型组 Longa 评分显著高于假手术组 (*P*<0.05), CKLF1 抗体组显著低于模型组 (*P*<0.05), 且随 CKLF1 抗体剂量增加而显著降低 (*P*<0.05)。见表 1。

2.2 抑制 CKLF1 对大鼠脑缺血后海马神经元存活率的影响 模型组海马神经元存活率显著低于假手术组 (*P*<0.05);CKLF1 抗体组海马神经元存活率显著

表 1 抑制 CKLF1 对脑缺血大鼠 Longa 评分的影响

组别	Longa 评分(分)
假手术组	0
模型组	3.64±0.09 [*]
CKLF1 抗体低剂量组	3.06±0.07 ^{*#}
CKLF1 抗体中剂量组	2.56±0.06 ^{*#&}
CKLF1 抗体高剂量组	2.12±0.04 ^{*#&@}

注:与假手术组比,* *P*<0.05;与模型组比,# *P*<0.05;与低剂量 CKLF1 抗体组比,& *P*<0.05;与中剂量 CKLF1 抗体组比,@ *P*<0.05;CKLF1. 趋化因子样因子 1

高于模型组($P<0.05$),且随 CKLF1 抗体剂量增加而显著提高($P<0.05$)。见图 1。

2.3 抑制 CKLF1 对大鼠脑缺血后海马组织 LC3-II 表达水平的影响 模型组海马组织 LC3-II 的表达水平明显高于假手术组($P<0.05$);CKLF1 抗体组海马组织 LC3-II 的表达水平显著低于模型组($P<0.05$),且随 CKLF1 抗体剂量增加而显著降低。见图 2。

2.4 抑制 CKLF1 对大鼠脑缺血后海马组织 caspase-3 mRNA 和蛋白表达水平的影响 模型组海马组织 caspase-3 mRNA 和蛋白表达水平显著高于假手术组($P<0.05$);CKLF1 抗体组海马组织 caspase-3

mRNA 和蛋白表达水平显著低于模型组($P<0.05$),且随 CKLF1 抗体剂量增加而显著降低($P<0.05$)。见图 3、4。

3 讨论

趋化因子对中性粒细胞、单核细胞等多种淋巴细胞具有趋化作用,因此能够介导多种炎症反应。CKLF1 是趋化因子家族的一员,与神经损伤密切相关。Kong 等^[9]研究表明,CKLF1 在缺血性脑卒中模型大鼠中大脑皮质和海马组织表达水平提高,C19 抗体阻断 CKLF1 作用具有神经保护作用^[9]。本研究结果显示,CKLF1 抗体显著改善局灶性脑缺血模型

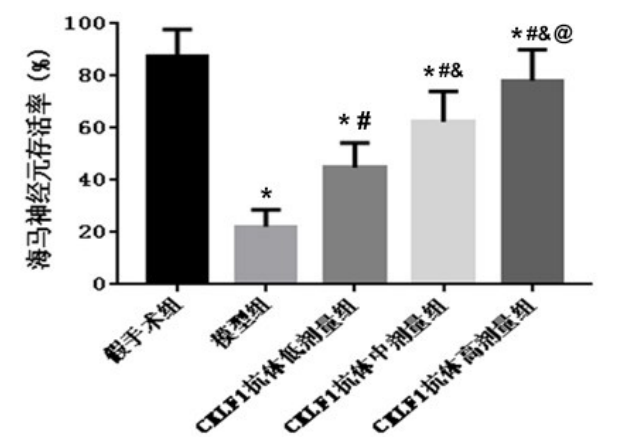


图 1 Nissl 染色检测大鼠海马神经元存活率与假手术组比,* $P<0.05$;与模型组比,# $P<0.05$;与低剂量 CKLF1 抗体组比,& $P<0.05$;与中剂量 CKLF1 抗体组比,@ $P<0.05$

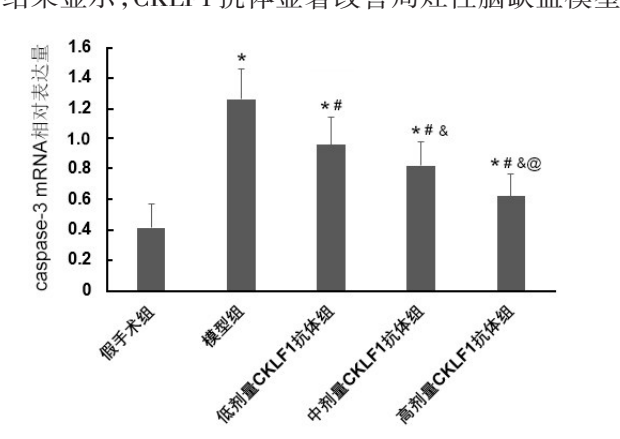


图 3 海马组织 caspase-3 mRNA 相对表达量与假手术组比,* $P<0.05$;与模型组比,# $P<0.05$;与低剂量 CKLF1 抗体组比,& $P<0.05$;与中剂量 CKLF1 抗体组比,@ $P<0.05$

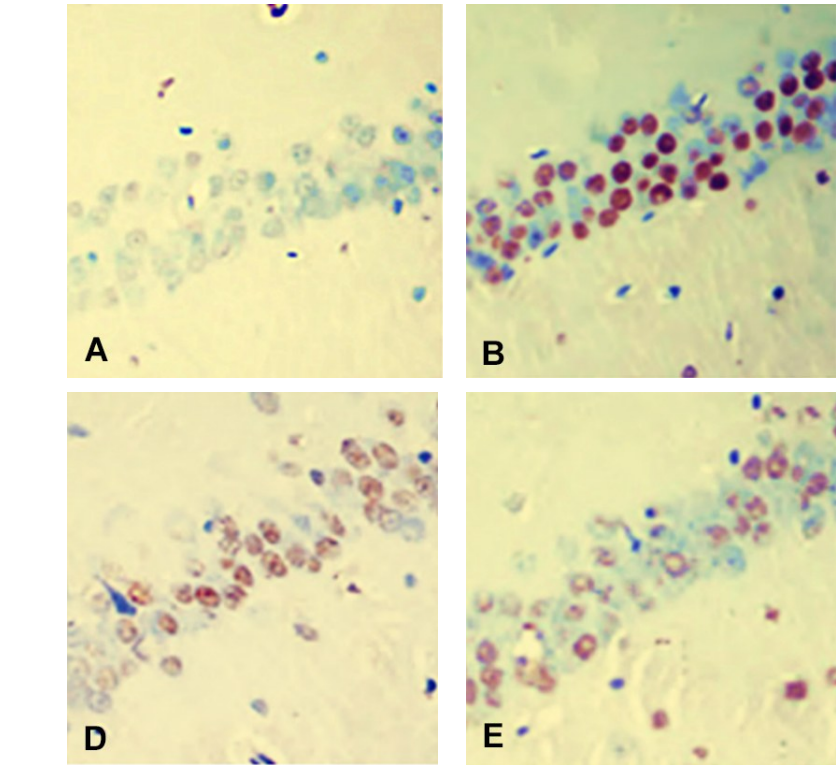


图 2 免疫组化染色检测海马组织 LC3-II 蛋白表达水平($\times 400$)
A. 假手术组;B. 模型组;C. 低剂量 CKLF1 抗体组;D. 中剂量 CKLF1 抗体组;E. 高剂量 CKLF1 抗体组

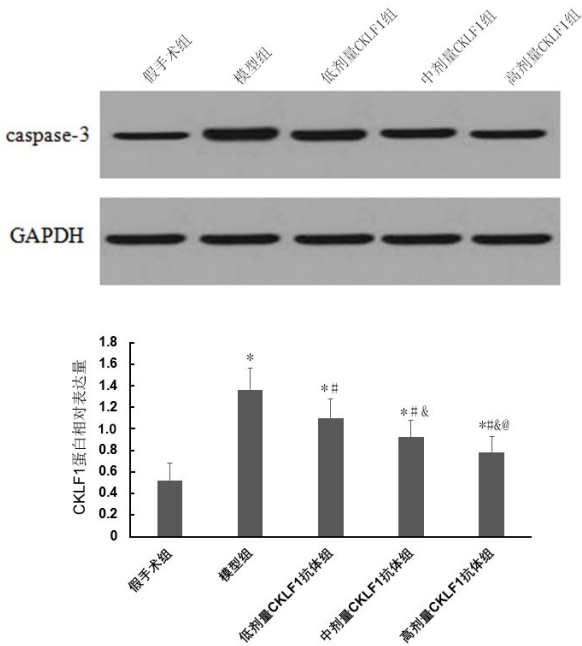


图4 海马组织 caspase-3 蛋白相对表达量与假手术组比,* $P<0.05$;与模型组比,# $P<0.05$;与低剂量 CKLF1 抗体组比,& $P<0.05$;与中剂量 CKLF1 抗体组比,@ $P<0.05$

大鼠神经功能($P<0.05$),可能与 CKLF1 抑制神经元凋亡或自噬有关。

LC3 是一种自噬相关蛋白,有 I 型和 II 型之分;未发生自噬时,主要以 LC3-I 的形式存在;当自噬发生时,LC3-I 经泛素化修饰形成 LC3-II,因此,LC3-II 是判断自噬活性的重要分子标记物^[10]。本研究结果显示,着 CKLF1 抗体剂量增加,海马自噬标志蛋白 LC3-II 表达水平均显著降低,说明脑缺血后 CKLF1 可通过调控神经元自噬发挥神经保护作用。

Caspase 家族与细胞凋亡密切相关,caspase-3 参与多种信号通路,并调控下游信号分子的表达。研究表明,下调局灶性脑缺血组织 caspase-3 表达水平,能够抑制脑组织损伤和神经细胞凋亡,从而起到神经保护作用^[11,12]。本研究结果显示 CKLF1 也可能通过调控神经元凋亡参与脑缺血后神经损伤过程。

综上所述,抑制 CKLF1 对局灶性脑缺血大鼠具有神经保护作用,可能与调控自噬或凋亡有关。

【参考文献】

[1] Yao X, Derugin N, Manley GT, *et al.* Reduced brain edema and infarct volume in aquaporin-4 deficient mice after

transient focal cerebral ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 584: 368-372.

[2] Lee K, Park JW, Lee B, *et al.* Pathologic factors of brain edema in acute ischemic stroke research [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 15(1): 1-5.

[3] Zhen Y, Ding C, Sun J, *et al.* Activation of the calcium-sensing receptor promotes apoptosis by modulating the JNK/p38 MAPK pathway in focal cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(2): 911-921.

[4] Chen C, Chu SF, Liu DD, *et al.* Chemokines play complex roles in cerebral ischemia [J]. *Neurochem Int*, 2017, 112 (5): 146-158.

[5] Yi Z, Wang Y, Xuan Z, *et al.* C19, a C-terminal peptide of CKLF1, decreases inflammation and proliferation of dermal capillaries in psoriasis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13890-13901.

[6] Kong LL, Hu JF, Zhang W, *et al.* Expression of chemokine-like factor 1 after focal cerebral ischemia in the rat [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 505(1): 14-8.

[7] Kong LL, Hu JF, Zhang W, *et al.* C19, a C-terminal peptide of chemokine-like factor 1, protects the brain against focal brain ischemia in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 508(1): 13-16.

[8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[9] Kong LL, Wang ZY, Hu JF, *et al.* Inhibition of chemokine-like factor 1 protects against focal cerebral ischemia through the promotion of energy metabolism and anti-apoptotic effect [J]. *Neurochem Int*, 2014, 76(10): 91-98.

[10] Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury [J]. *Nat Med*, 1999, 5(8): 943-946.

[11] Kanbak G, Kartkaya K, Ozcelik E, *et al.* The neuroprotective effect of acute moderate alcohol consumption on caspase-3 mediated neuroapoptosis in traumatic brain injury: The role of lysosomal cathepsin L and nitric oxide [J]. *Gene*, 2013, 512(2): 492-495.

[12] 冯磊,胡丽娟,王海云,等. 外源性硫化氢对大鼠局灶性脑缺血再灌注时神经元凋亡的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(1): 116-119.

(2018-01-16收稿,2018-03-13修回)