

· 论 著 ·

地塞米松对放射性脑水肿大鼠中性粒细胞 CD 18 表达的抑制作用

王来兴¹, 何晓文², 周晓平^{1*}, 胡小吾¹, 刘建民¹, 肖作平³, 伏肃华³, 刘永明³

(1. 第二军医大学长海医院神经外科, 上海 200433; 2. 海军医学研究所新药研究中心, 上海 200433; 3. 长海医院放射治疗科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 研究地塞米松对放射性大鼠脑损伤的影响。方法: SD 大鼠 20 只, 雌雄各半, 体质量 (250 ± 50) g, 随机分成 4 组, 每组 5 只。未接受照射和地塞米松治疗的正常对照组, 接受照射但未接受地塞米松治疗的实验对照组均进行生理盐水肌注, 注射量与地塞米松剂量相等。另外 2 组接受照射+ 1 或 5 mg/kg 地塞米松治疗。自照射前 3 d 开始肌注地塞米松或生理盐水, 直至照射后 2 周, 10MeV X 射线 30 Gy 照射大鼠全脑, 14 d 后取大鼠脑组织观察病理改变。颈总动脉取血, 梯度离心, 取中性粒细胞层, Northern 杂交分析测定血液中性粒细胞 CD 18 mRNA 表达水平, 流式细胞术测定膜蛋白数量。结果: 大鼠脑组织接受照射后, 光镜下出现明显的细胞损伤改变, 血液中性粒细胞 CD 18 mRNA 表达水平和膜蛋白数量在照射后较未照射组均有明显提高 ($P < 0.01$)。在照射前后, 2 个地塞米松治疗组细胞的损伤程度减轻, 1 mg/kg 地塞米松治疗组 CD 18 的表达明显受抑制 ($P < 0.05$), 5 mg/kg 地塞米松治疗组的抑制作用更加明显 ($P < 0.01$)。结论: 地塞米松可通过抑制 CD 18 表达的方式减轻放射性脑水肿。

[关键词] 地塞米松; 放射性脑水肿; 中性粒细胞; CD 18

[中图分类号] R 818.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X (2004)09-0970-04

Inhibition effect of dexamethasone on CD 18 expression in neutrophils of rats with brain radiation edema

WANG Lai-Xing¹, HE Xiao-Wen², ZHOU Xiao-Ping^{1*}, HU Xiao-Wu¹, LU Jian-Min¹, XIAO Zuo-Ping³, FU Su-Hua³, LU Yong-Ming³ (1. Department of Neurosurgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. New Drug Research Center, Navy Medical Institute, Shanghai 200433; 3. Department of Radiotherapy and Radio-oncology, Changhai Hospital, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of dexamethasone (Dex) on brain edema in irradiated rats. **Methods:** Twenty SD rats were divided into 4 groups at random ($n = 5$). Group 1 was the normal control, Group 2 was irradiated without Dex, Group 3 was irradiated with 1 mg/kg Dex, and Group 4 was irradiated with 5 mg/kg Dex. The rats in Group 1 and 2 were administered intramuscularly with normal saline. Brain damage was induced by linear accelerator at single dose of 30 Gy by 10 MeV electron. Dex (1, 5 mg/kg), beginning 3 d before and ending 14 d after irradiation, was administered intramuscularly into irradiated rats every 24 h. Brain of irradiated rats underwent histological examination for evaluation of the radiation-induced vasculopathy, brain edema, and gliosis. The expression of CD 18 of the rat neutrophils was measured 2 weeks after irradiation. **Results:** After irradiation, microscopic evidences of obvious brain damage was found, and the level of CD 18 mRNA and expression of membrane protein of blood neutrophil increased significantly ($P < 0.01$), but were significantly inhibited after use of Dex. The protective effect of high-dose Dex on brain tissue damage and down-regulation of CD 18 expression were more obvious than those of lower-dose Dex. **Conclusion:** Dexamethasone can protect the radiation-induced injury and brain edema changes by inhibiting expression of CD 18 in rats.

[KEY WORDS] dexamethasone; radiative brain edema; neutrophil; CD 18

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 970-973]

* 立体定向放射广泛应用于颅内疾病的治疗, 对脑血管畸形、脑转移瘤、松果体区肿瘤、听神经瘤、脑膜瘤有明确疗效, 但部分患者在治疗后可发生病变周围脑组织放射性脑水肿, 发病率最高可达 32.14%^[1]。放射性脑水肿治疗非常困难, 且治疗效果不理想。地塞米松对外伤性和缺血性脑水肿有良好的治疗和预防作用, 但其治疗机制尚不十分清楚。本研究观察地塞米松对放射性脑水肿大鼠中性粒细胞 CD 18 表达的抑制作用, 以探讨放射性脑水肿的发生机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 凝胶 DNA 回收试剂盒, DNA 地高辛标记及酶联检测试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司); 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的鼠抗人 CD 18 单抗; 非相关性 FITC 标记抗体 (Immuno tech); 地

* [作者简介] 王来兴 (1967-), 男 (汉族), 硕士, 讲师, 主治医师。
E-mail: wanglaixing@yahoo.com

* Corresponding author. E-mail: zhouxp@online.sh.cn

塞米松(Sigma), RU 38486(ROUSSEL UCLAF 公司)用无水乙醇配成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} mol/L; pGEM-3Zf(+)/Hae marker(华美生物工程公司)。

1.2 动物分组及处理 SD大鼠20只,由我校实验动物中心提供,雌雄各半,体质量(250 ± 50) g。随机分成4组,每组5只。正常对照组(未接受照射和地塞米松治疗)、实验对照组(接受照射,但未接受地塞米松治疗)均进行生理盐水肌注,注射量与地塞米松剂量相等。另外2组接受照射+1或5 mg/kg地塞米松治疗。自照射前3 d开始肌注地塞米松或生理盐水,直至照射后2周。大鼠以氯胺酮麻醉后,取俯卧位,用西门子(型号M7445)直线加速器,10 MeV X线垂直照射全脑,射野 $3.0 \text{ cm} \times 3.5 \text{ cm}$,剂量率3 Gy/min,接受剂量30 Gy。于照射2周后,所有动物经麻醉后断头处死,取脑组织光镜下进行病理观察;颈总动脉取血,Percoll(Pharmacia公司)梯度离心,取中性粒细胞层计数。

1.3 细胞总RNA的提取与鉴定 采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步抽提法。测定RNA样品在波长260 nm和280 nm的光密度(D)。根据 $1 D_{260}$ 相当于 $40 \mu\text{g/ml}$ RNA确定RNA的量,根据 D_{260}/D_{280} 比值判断RNA样品的纯度。

1.4 RNA逆转录 反应总体积为10 μl ,反应体系:RNA 2 μl (投入量200~1000 ng),MgCl₂ 2 μl (终浓度5 mmol/L),10 \times RT buffer 1 μl (终浓度1 mmol/L),dNTP 1 μl (终浓度1 mmol/L),RNAasin 0.3 μl (1.2 U/ μl),RTase 0.6 μl (0.54 U/ μl),随机引物 0.5 μl (2.5 $\mu\text{mol/L}$),无酶水2.6 μl 。逆转录条件为:20 10 min,42 60 min,99 5 min。在PCR仪中进行。

1.5 CD18 cDNA的扩增引物碱基序列及扩增片段长度 βMG 为正义:5'-ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA-3',反义:5'-TAC TTC AAA CCT

CCA TGA TG-3(120 bp);CD18为正义:5'-AGG CTC TGA TCC ACC TGA GC-3',反义:5'-TCA CCA ACC TCA AGC CCT CC-3(379 bp)。PCR引物逆转录产物1 μl (投入量相当于RNA 5~100 ng),PCR稀释液3 μl ,10 \times PCR buffer 1.6 μl (终浓度1 mmol/L),MgCl₂ 0.4 μl (终浓度1.5 mmol/L),上、下游引物均为0.5 μl (终浓度0.25 $\mu\text{mol/L}$),³²P-Dctp 0.2 μl (7.4×10^4 Bq),Taq DNA聚合酶0.5 μl (总量1 U),补充无酶水至总体积20 μl 。PCR采用热启动法,即先于99 变性8 min,降至80 时再加入Taq DNA聚合酶。PCR反应条件为:94 1 min,63 1 min,72 1 min,扩增20~32个循环,最后72 延伸10 min。

1.6 β 微球蛋白(βMG) cDNA的扩增 基本同CD18 cDNA的扩增条件,MgCl₂终浓度为2.0 mmol/L,退火温度改为55 ,扩增20~32个循环,最后72 延伸10 min。PCR产物进行6%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,放射自显影(置于-80 过夜),洗片,密度扫描定量。

1.7 CD18 mRNA的Northern杂交和流式细胞术检测膜蛋白数量 将提取的细胞总RNA RT-PCR扩增,得到的CD18 cDNA片段经测序确定后,用琼脂糖电泳凝胶纯化回收,按照凝胶DNA回收试剂盒说明书操作。将回收得到的CD18 cDNA片段用缺口平移法标记Northern杂交探针的标记及杂交后的酶联检测都按DNA-地高辛标记检测盒的说明书操作。流式细胞术分析检测膜蛋白数量,采用免疫荧光直接标记法。

1.8 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 血细胞计数 见表1。

表1 照射14 d后各组大鼠血细胞计数

Tab 1 Blood cell counts in each group

(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Group	Control	Irradiated control	Irradiated+ 1 mg/kg Dex	Irradiated+ 5 mg/kg Dex
RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	8.70 \pm 0.15	8.50 \pm 0.16	8.90 \pm 0.16	8.30 \pm 0.14
WBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	10.00 \pm 2.01	13.00 \pm 0.85	11.00 \pm 2.03	14.00 \pm 1.29
Neutrophil (%)	22.00 \pm 0.82	26.00 \pm 1.51	24.00 \pm 1.58	26.00 \pm 0.74
Eosinophil (%)	2.20 \pm 1.23	3.10 \pm 0.95	3.00 \pm 0.97	2.20 \pm 1.54
Basophil (%)	0.50 \pm 0.58	0.40 \pm 0.49	0.60 \pm 0.56	0.40 \pm 0.54
Lymphocytes (%)	73.00 \pm 2.02	68.00 \pm 2.24	70.00 \pm 1.95	69.00 \pm 2.43
Monocytes (%)	2.30 \pm 1.54	2.50 \pm 1.67	2.40 \pm 1.56	2.40 \pm 1.62
Platelets ($\times 10^3/\text{ml}$)	1 240.00 \pm 9.31	1 352.00 \pm 10.42	1 152.00 \pm 11.45	1 174.00 \pm 8.94
Hemoglobin ($\beta\text{g}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	154.00 \pm 1.36	158.00 \pm 1.25	149.00 \pm 2.01	136.00 \pm 2.31

经方差分析, 4 组间均未见明显差异, 说明本组应用剂量的地塞米松对血细胞计数不造成影响。

2.2 病理观察结果 光镜下可见实验对照组脑组织出现片状水肿液化坏死, 血管间隙明显肿胀增大, 神经细胞核肿胀, 核质比例明显失调, 神经髓鞘严重变性(图 1A)。2 个地塞米松治疗组有明显的改善(图 1B、1C)。

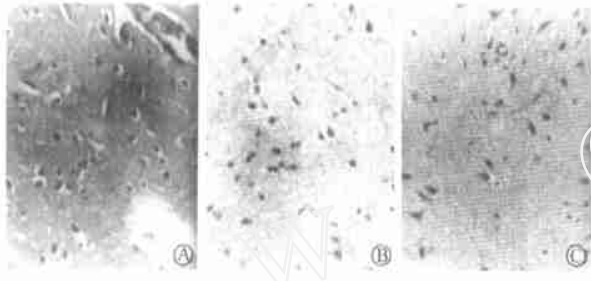


图 1 接受照射的 3 组大鼠脑组织病理学改变

Fig 1 Pathologic changes of irradiated brain tissue in rats (×400)

A: Irradiated control; B: Irradiated+ 1 mg/kg Dex; C: Irradiated+ 5 mg/kg Dex

2.3 CD18 mRNA 的鉴定 2% 的琼脂糖电泳结果显示, 扩增得到的目的片段的大小(CD18 379 bp, βMG 120 bp)与引物设计所应得的片段长度一致, 而且经基因测序证实 PCR 扩增产物为 CD18 cDNA 片段。

2.4 地塞米松对 CD18 mRNA 表达的抑制作用 Northern 杂交分析结果表明, 实验对照组大鼠在接受照射后血液中性粒细胞 CD18 mRNA 表达水平有明显提高, 而 2 个地塞米松治疗组 CD18 mRNA 的表达明显受抑, 而且随着地塞米松浓度增大, 这种抑制作用更加明显(图 2)。

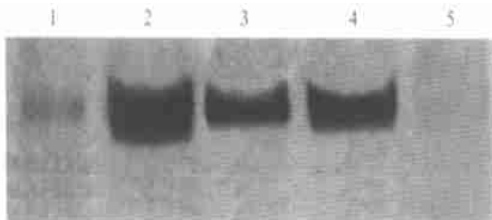


图 2 Northern 杂交分析 Dex 对放射性脑水肿大鼠中性粒细胞 CD18 mRNA 表达的抑制作用

Fig 2 Northern blot showing inhibited CD18 mRNA expression in neutrophils of irradiated rats by Dex

1: Control; 2: Irradiated control; 3: Irradiated+ 5 mg/kg Dex; 4: Irradiated+ 1 mg/kg Dex; 5: Negative control

2.5 地塞米松对 CD18 蛋白表达的抑制作用 流式细胞术分析结果显示正常对照组、实验对照组、1 mg/kg 地塞米松治疗组、5 mg/kg 地塞米松治疗组

的膜蛋白数量(平均荧光强度, MFI)分别为: 240.98 ± 42.39、876.43 ± 80.97、660.84 ± 35.43、322.99 ± 27.29。各照射组膜蛋白数量显著高于正常对照组(P < 0.01); 1、5 mg/kg 地塞米松治疗组则显著低于实验对照组(P < 0.05, P < 0.01)。

3 讨论

临床上对已发生放射性脑水肿的患者, 借鉴了对外伤性脑水肿和缺血性脑水肿的治疗方案, 一般常规应用 20% 甘露醇溶液加上地塞米松脱水治疗, 尚无预防其发生的应对措施^[2,3]。本结果表明, 不论是单纯照射组还是照射+ 地塞米松组, 红细胞计数、白细胞计数及其分类、血小板和血红蛋白的数值差异不明显。射线对血细胞计数的影响缘于骨髓抑制, 而放疗所致的骨髓抑制一般发生在放疗后期。本组可能由于照射后观察时间较短(为照射后 2 周), 因此 4 组之间的血细胞计数差异不明显。

病理组织学检查发现大鼠脑组织受 X 线照射后出现放射性损伤改变, 包括大片脑组织液化坏死、细胞核肿胀、髓鞘变性等, 而地塞米松治疗组这些变化明显改善, 表明地塞米松能减轻大鼠脑组织受 X 线照射后出现的损伤程度。Tada 等^[4]用磁共振扫描观察到小剂量地塞米松(1 mg/kg)可明显减小猴脑受辐射后 1 周至 1 个月时放射性脑水肿范围, 亦明显减弱了辐射后 3 个月坏死灶周边的增强后强化环, 但统计学处理未见显著差异。本研究从病理组织学角度也初步证实了这一结论。

CD18 能够调节白细胞的黏附、趋化和游走, 而且通过与其在内皮细胞上的配体(ICAM-1 等)的黏附激活白细胞, 释放具有活性的氧代谢产物和蛋白水解酶, 引起内皮细胞的损伤或脱落, 使毛细血管通透性增高^[5,6]。本研究发现大鼠接受照射后, 血液中性粒细胞 CD18 mRNA 表达水平和膜蛋白数量均有明显提高, 提示放射性脑水肿的发生可能与 CD18 介导的血管内皮细胞损伤、毛细血管通透性增高有关, 为进一步探讨放射性脑水肿的发生机制提供了理论依据。

地塞米松是糖皮质激素(glucocorticoid, GC)类药物, 糖皮质激素具有抗炎和免疫抑制作用, 能够抑制多种因素引起的包括整合素 β 亚族 β 亚基 CD18 在内的多种黏附分子的数量升高^[7,8], 抑制白细胞与内皮细胞的亲和力的增强, 广泛应用于临床急慢性炎症的治疗^[9]。本研究发现地塞米松可以明显抑制 CD18 的表达, 当地塞米松浓度增大至 5 mg/kg 时, 这种抑制作用更加明显。说明地塞米松

防治放射性脑水肿的作用机制之一为抑制了CD18的表达,妨碍了CD18介导的导致血管内皮细胞损伤或脱落的连锁反应。

地塞米松在对放射性脑水肿的防治中,其抑制CD18表达的作用机制可能有以下几方面:(1)地塞米松可能通过与中性粒细胞的细胞膜整合,使细胞膜变硬,干扰当细胞被激活时CD18由细胞内储存池转位到细胞膜表面的过程;(2)地塞米松能够抑制炎症或创伤时细胞因子如TNF、IL-2、IFN等和趋化因子如IL-8等的分泌,而细胞因子和趋化因子都会引起CD18表达,促进中性粒细胞和内皮细胞的黏附;(3)地塞米松能够抑制在内皮细胞上的配体(ICAM-1等)的表达。另外地塞米松能够抑制由于中性粒细胞和内皮细胞的黏附产生的白三烯、NO,这些物质不仅是使毛细血管通透性增加,而且还能促进CD18表达增高。

[参考文献]

- [1] 王如秘,王守森.放射外科迟发性反应的有关问题[J].中国微侵袭神经外科杂志,1998,3(3):222-224.
- [2] Chang JH, Chang JW, Choi JY, et al. Complications after gamma knife radiosurgery for benign meningiomas[J]. *J Neurosurg Psychiatry*, 2003, 74(2): 226-230.

- [3] Singh VP, Kansai S, Vaishya S, et al. Early complications following gamma knife radiosurgery for intracranial meningiomas[J]. *J Neurosurg*, 2000, 93 (Suppl 3): 57-61.
- [4] Tada E, Matsumoto K, Kinoshita K, et al. The protective effect of dexamethasone against radiation damage induced by interstitial irradiation in normal monkey brain [J]. *Neurosurgery*, 1997, 41(1): 209-217.
- [5] Wu H, Prince JE, Brayton CF, et al. Host resistance of CD18 knockout mice against systemic infection with *Listeria monocytogenes*[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(10): 5986-5993.
- [6] Clatterbuck RE, Gailoud P, Ogata L, et al. Prevention of cerebral vasospasm by a humanized anti-CD11/CD18 monoclonal antibody administered after experimental subarachnoid hemorrhage in nonhuman primates[J]. *J Neurosurg*, 2003, 99(2): 376-382.
- [7] Filep JG, Delalandre A, Payette Y, et al. Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils[J]. *Circulation*, 1997, 96(1): 295-301.
- [8] Roets E, Burvenich C, Diez-Fraile A, et al. Evaluation of the role of endotoxin and cortisol on modulation of CD18 adhesion receptors in cows with mastitis caused by *Escherichia coli*[J]. *Am J Vet Res*, 1999, 60(5): 534-540.
- [9] Farrell RJ, Kelleher D. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease[J]. *J Endocrinol*, 2003, 178(3): 339-346.

[收稿日期] 2004-01-10

[修回日期] 2004-05-17

[本文编辑] 沈志宏,曹静

· 个案报告 ·

盆腔原始神经外胚层瘤一例报告

Peripheral primitive neuroectodermal tumor: a case report

崔伟¹, 高小峰²

(1. 第二军医大学学员一旅13队,上海200433; 2. 长海医院泌尿外科,上海200433)

[关键词] 盆腔肿瘤; 神经外胚层瘤

[中图分类号] R 737.14

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)09-0973-01

*1 临床资料 患者男性,33岁,因“尿频、尿急1月余,B超发现盆腔肿块6d”于2003年11月18日入院。患者1个月前无明显诱因出现尿频、尿急,无明显尿痛,无畏寒、发热,在当地医院给予抗生素抗感染治疗(具体不详)症状无缓解,后患者出现肛门坠胀,大便次数增多(每日3次以上,大便形状变扁)。2003年11月12日患者因胆结石在当地医院行B超检查,发现盆腔巨大囊实性肿块,14.9 cm × 10.7 cm × 11.2 cm。遂来我院就诊。入院查体:腹部稍膨,腹壁软,无压痛及反跳痛,下腹部可扪及一直径约12 cm大小的包块,质中,固定。辅助检查:B超(2003-11-12):(1)盆腔囊实性肿块,以囊性为主;(2)左肾轻度积水;(3)胆囊结石。CT(2003-11-12):盆腔囊实性肿瘤,平滑肌脂肪瘤可能性大。入院后经积极术前准备,于2003年11月24日在全麻下行盆腔肿块切除术,术中见巨大紫褐色肿块位于盆腔,触之呈囊实性,与腹膜严

重粘连,打开囊壁,吸出1 000 ml陈旧血性液体,取出囊内大量坏死组织,切除与囊壁粘连的腹膜,沿囊壁钝性加锐性向下分离,结扎髂内动、静脉,见肿块与髂外静脉无粘连,肿块侵及膀胱左侧壁肌层,切除部分膀胱壁,取出肿块送病理。缝合腹膜、膀胱,蒸馏水、5-FU冲洗盆腔。术后病理回报为原始神经外胚层瘤(PNET),镜检见肿瘤细胞体积小,大小较一致,类圆形或立方多边形,胞质较少或裸核样,核深染,异形瘤细胞排列成片,弥漫散在,或围绕血管形成乳头状结构,或排列成菊形团状,呈弥漫性生长,可见坏死。免疫组化:NSE(+),CD99(+),VIM(+)

(下转第980页)

* [作者简介] 崔伟(1980-),男(汉族),硕士生,住院医师