

# L-选择素在缺血性脑卒中患者外周血中的表达及其意义

黄锦丰 凌国源 玉石 陈文斗

**【摘要】 目的** 探讨 L-选择素在缺血性脑卒中患者中的表达及其意义。**方法** 选择缺血性脑卒中患者(病例组)和正常健康体检者(对照组)各 50 例,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,运用半定量 RT-PCR 技术检测研究对象外周血中 L-选择素的表达水平。**结果** 与对照组比较,病例组 L-选择素水平明显升高( $2.96 \pm 0.71$  vs  $1.22 \pm 0.46$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** L-选择素在缺血性脑卒中患者外周血中表达增加,提示 L-选择素可能与缺血性脑卒中的发病有关。

**【关键词】** L-选择素 缺血性脑卒中 炎症

**【中图分类号】** R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)03-0154-03

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.03.002

**L-selectin in peripheral blood of patients with ischemic cerebral stroke and its significance** Huang Jin-feng, Ling Guoyuan, Yu Shi, et al. Department of Neurosurgery, the 303rd Hospital of PLA, Nanning 530021

**【Abstract】 Objective** To explore the expression of L-selectin in peripheral blood of patients with ischemic cerebral stroke, and the relationship between L-selectin and the ischemic stroke. **Methods** The expression of L-selectin in peripheral blood of 50 patients with ischemic cerebral stroke, as case group, and 50 normal subjects, as control group, was detected using the semi-quantitative RT-PCR technology, and the expression of glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the internal control. **Results** The expression of L-selectin in patients with ischemic cerebral stroke was significantly higher than that in normal subjects ( $2.96 \pm 0.71$  vs  $1.22 \pm 0.46$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** The expression of L-selectin was higher in patients with ischemic cerebral stroke. It is inferred that L-selectin was probably involved in the onset of ischemic cerebral stroke.

**【Key words】** L-selectin Ischemic cerebral stroke Inflammation

流行病学研究表明,中国每年有 150 万~200 万新发脑卒中的病例<sup>[1]</sup>。随着人口老龄化和经济水平的快速发展及生活方式的变化,缺血性脑卒中发病率明显上升,严重威胁人们的生存质量及生命安全。近十几年,脑卒中发病机制研究已获得诸多进展,炎性损伤机制在缺血性脑损伤中的作用受到广泛关注。其中炎性细胞浸润和相应细胞因子分泌在缺血性脑损伤中发挥着极为重要的作用<sup>[2]</sup>。炎症细胞因子 L-选择素是细胞黏附分子选择素家族的成员之一,它参与了白细胞的活化、炎症和创伤等过程,可使白细胞活化、变形,沿内皮细胞表面滚动、迁移并黏附于内皮细胞上<sup>[3]</sup>,还可以通过与配体或者

抗体的交联作用释放炎症介质介导炎症反应<sup>[4]</sup>。因此,本研究对缺血性脑卒中患者外周血中 L-选择素的表达进行检测,初步探讨 L-选择素和缺血性脑卒中的关系。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 选择 2014 年 3 月-2015 年 8 月在本院进行住院治疗的缺血性脑卒中患者 50 例作为病例组,所选患者均符合中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010 的诊断标准<sup>[5]</sup>,并经头颅 CT 或 MRI 检查证实,其中,男 23 例、女 27 例,年龄( $54.5 \pm 7.3$ )岁。同期选择到我院进行体检的正常健康体检者 50 例作为对照组,其中,男 22 例、女 28 例,年龄( $52.8 \pm 9.7$ )岁。所有研究对象在采血前 1 个月内无任何感染性疾病,2 组性别、年龄等临床资料具有

可比性( $P>0.05$ )。

## 1.2 方法

1.2.1 设计及合成引物 根据 GenBank 中查阅的基因序列,运用 primer 5.0 软件设计,引物均由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参。

L-选择素引物序列为:上游为 5'-ACAGT-CAGCCGC ATC TTCTTT-3',下游为 5'-CCAT-CACGCCACAGTTTCC-3',扩增片段长度为 651 bp;GAPDH 引物序列为:上游为 5'-ACAGT-CAGCCGCATCTTCTTT-3',下游为 5'-CCAT-CACGCCACAGTTTCC-3',扩增片段长度为 599 bp。

1.2.2 采集标本 所有研究对象均于清晨采集空腹外周静脉血 2 mL,置于 EDTA-k2 抗凝管中摇匀备用。

1.2.3 提取总 RNA 严格参照 RNeasy pure 血液总 RNA 提取试剂盒(离心柱型,目录号 DP433,天根有限公司)说明,在 4 h 内提取外周血总 RNA,并置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

1.2.4 逆转录 RNA 采用 Fermentas 公司生产的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit # K1622 逆转录试剂盒,并严格参照说明书操作。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,操作步骤及反应条件:加入模板 RNA 10  $\mu\text{L}$ ,oligo (dT)18 primer 1  $\mu\text{L}$ ,Rnasefree- $\text{H}_2\text{O}$  1  $\mu\text{L}$ ,放入梯度 PCR 仪  $65^{\circ}\text{C}$  5 min 后取出,再加入  $5\times$  Reaction Buffer 4  $\mu\text{L}$ ,RiboLock RNase Inhibitor 1  $\mu\text{L}$ ,10 mM dNTP Mix 2  $\mu\text{L}$ ,RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase 1  $\mu\text{L}$ ,再放入梯度 PCR 仪  $42^{\circ}\text{C}$  60 min。逆转录成的 cDNA 放于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

1.2.5 PCR 扩增反应体系 以 GAPDH 基因为内参,反应体系共 25  $\mu\text{L}$ ,其中模板 cDNA 1  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,Rnasefree- $\text{H}_2\text{O}$  10 ml,  $2\times$  Taq PCR Master Mix 12  $\mu\text{L}$ 。反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $61.5^{\circ}\text{C}$  (内参为  $58^{\circ}\text{C}$ ) 退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 40 个循环后,最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

1.2.6 电泳及半定量分析 取目的基因与内参的扩增产物各 5  $\mu\text{L}$ ,置于同一块 1.5% 的琼脂糖凝胶上分孔电泳 35 min,电压 120 V;电泳结束后采用 Bio-Rad 凝胶图像分析仪对琼脂糖凝胶拍照并保存;采用 Quantity One 4.5.0 软件对琼脂糖照片上

的特异性条带进行灰度扫描,以 GAPDH 产物作校正,计算目的基因与内参 GAPDH 的灰度比。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据比较采用成组  $t$  检验方法,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 总 RNA 的鉴定 全血总 RNA 用经紫外分光光度计检测,  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值均在 1.8~2.0,表明所提 RNA 的纯度较高,蛋白质和 DNA 污染少。从凝胶电泳上可以清晰看到 28S、18S、5S RNA 三条带。图 1。

2.2 2 组 L-选择素的表达水平比较 病例组 L-选择素表达的灰度比为  $2.96 \pm 0.71$ ,对照组为  $1.22 \pm 0.46$ ,2 组比较有明显差异( $P < 0.01$ )。在凝胶电泳图上可以清晰的看出,L-选择素在病例组中的条带亮度强于对照组。图 2。

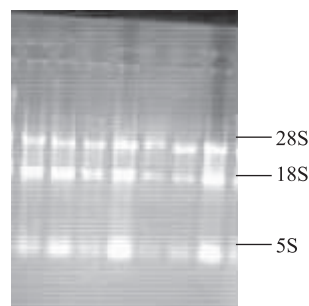


图 1 全血总 RNA 凝胶电泳

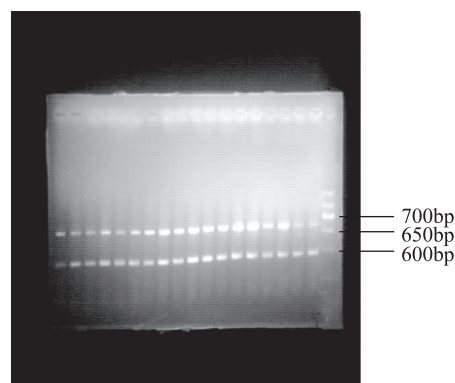


图 2 从右向左看,1 泳道为 Marker,2-12 泳道为病例组 L-选择素和 GAPDH 的 RNA 表达水平,13-19 泳道分别为对照组 L-选择素和 GAPDH 的 RNA 表达水平

## 3 讨论

缺血性脑卒中是脑部血管狭窄或管腔闭塞等原因引起的脑部血液供应障碍,使局部脑组织发生不

可逆性损害,导致脑组织缺血、缺氧性坏死的一种疾病。近十几年来,很多研究表明炎症与缺血性脑卒中密切相关,炎症可通过促进动脉粥样硬化的发生而导致缺血性脑卒中。动脉粥样硬化斑块的破裂、血小板聚集及血栓形成是缺血性脑卒中的主要发病机制,其中斑块的破裂及继发性血栓是最重要的始动环节<sup>[6]</sup>。目前普遍认为急性缺血性脑血管事件的发生与否主要取决于粥样斑块的稳定性,与血管的狭窄程度并无直接关系。而随着对动脉粥样硬化发生、发展研究的深入,越来越多的证据表明其可能是一种炎症性疾病<sup>[7]</sup>。炎症反应的激活可导致斑块的不稳定,触发急性缺血性脑卒中的发生。

L-选择素属黏附分子选择素家族的成员之一,表达于所有的中性粒细胞和单核细胞,血液和骨髓中大部分 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、嗜酸粒细胞及部分自然杀伤细胞(NK)上。主要介导白细胞与内皮细胞间的选择性识别、黏附,在淋巴细胞归巢、白细胞炎性渗出等过程中起重要作用<sup>[8]</sup>。而白细胞与内皮细胞的黏附在动脉粥样硬化形成过程中发挥着重要的作用。已有研究表明,L-选择素与动脉粥样硬化过程密切相关。Devaraj S<sup>[9]</sup>及我国学者赵学礼等<sup>[10]</sup>的研究均发现:2 型糖尿病合并大血管病变者与正常对照者相比 L-选择素水平显著增高,推测 L-选择素可能是糖尿病患者动脉粥样硬化的早期标志物。刘佳<sup>[11]</sup>根据自己的研究结果认为 L-选择素与树突状细胞表达的配体相结合后通过 TLR4 通路促进 DCs 成熟,促进了动脉粥样硬化的发生和发展。还有研究证实,L-选择素在原发性高血压患者外周血中的表达也显著增高<sup>[12]</sup>,而高血压已证实是动脉粥样硬化的高危因素。Wei YS 等<sup>[13]</sup>研究还发现 L-选择素基因的 P213S 多态性及其血清水平均与缺血性脑卒中相关。本研究结果表明,与对照组比较,缺血性脑卒中患者外周血中 L-选择素 RNA 的表达水平明显升高,这提示 L-选择素可能与缺血性脑卒中的发病相关。L-选择素可通过介导白细胞沿内皮细胞表面滚动、迁移和黏附,并通过与  $\beta_2$  整合素的黏附加强作用,使白细胞活化、聚集并粘附在内皮表面,从而参与血管炎症的发生发展,促进血管的粥样硬化及斑块形成。而且持续的炎症反

应进一步催化了斑块的不稳定性,最终导致缺血性脑卒中的发生。

炎症反应是缺血性脑损伤的重要病理生理机制之一,参与缺血性脑卒中的发生、发展,并与其严重危及生命的并发症相关。本研究结果提示 L-选择素可能与缺血性脑卒中的发病有关,为探究缺血性脑卒中的炎症机制提供了线索。

## 参 考 文 献

- [1] 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南(2010)[J]. 中国临床医生,2011,39(11):68-74.
- [2] NilupulPM, MaHK, ArakawaS, et al. Inflammation following stroke[J]. J Clin Neurosci, 2006, 13(1): 1-8.
- [3] Simon SI, Cherapanov V, Nadra I, et al. Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18[J]. J Immunol, 1999, 163(5): 2891-2901.
- [4] 陈翠霞, 崔凌凌, 尚新, 等. L-选择素在白细胞活化中的作用[J]. 生命科学, 2010, 22(1): 79-83.
- [5] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. 中国全科医学, 2011, 14(12B): 4013-4017.
- [6] Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization[J]. Stroke, 2006, 37(7): 1923-1932.
- [7] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27(1): 165-197.
- [8] 李英俊, 臧丽, 张乃生, 等. L-选择素分子结构及功能的研究进展[J]. 动物医学进展, 2005, 26(1): 1-5.
- [9] Devaraj S, Chan AV, Jialal I. alpha-Tocopherol supplementation decreases plasminogen activator inhibitor-1 and p-selectin levels in type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Care, 2002, 25(3): 524-529.
- [10] 赵学礼, 王芳. 血清 L-选择素、一氧化氮及低密度脂蛋白胆固醇在 2 型糖尿病大血管病变中的作用[J]. 临床荟萃, 2008, 23(7): 489-490.
- [11] 刘佳. L 选择蛋白介导人单核细胞源性树突状细胞在动脉粥样硬化中的作用[D]. 大连: 大连医科大学, 2012.
- [12] 欧阳云, 张海英, 吴华贝, 李虹, 卢世玲, 申颖, 谭爱花, 高勇, 莫曾南. L-选择素在原发性高血压患者外周血中的表达及其意义[J]. 广西医学, 2013, 11: 1429-1431.
- [13] 欧阳云, 张海英, 吴华贝, 等. L-选择素在原发性高血压患者外周血中的表达及其意义[J]. 广西医学, 2013, 35(11): 1429-1431.
- [14] Wei YS, Lan Y, Meng LQ, et al. The association of L-selectin polymorphisms with L-selectin serum levels and risk of ischemic stroke[J]. J Thromb Thrombolysis, 2011, 32(1): 110-115.

(2016-02-19 收稿 2016-05-04 修回)