

有可能为 MAGE-12 的 HLA-A2 限制性 CTL 表位进行初步筛选,发现符合 CTL 表位有 25 条,采用超基序法、量化基序法、多项式法、延展基序法与三维结构构建相结合进行量化分析,获得候选表位多肽分别为: ALSRKMAEL、KMAELVHFL、YILVTCLGL、GLLGDNQIV、FLWGPRAVLV(对照)。这一结果与张秀敏等^[11]预测 CTL 表位结果中有 2 条完全一致,分别为 ALSRKMAEL、GLLGDNQIV,与李艳秋等^[12]预测 CTL 表位结果中有 1 条完全一致,为 GLLGDNQIV。MAGE-12 亚家族 CTL 表位远程预测结果^[1,11-13]中有 3 条已被不同研究证实为 HLA-A2 限制性 CTL 表位,这一结果证实抗原表位预测方法可靠,与实验方法获得的结果具有平行性,其他候选表位有待进一步体外实验筛选、鉴定。与 MAGE-A 亚家族 HLA-A2 限制性 CTL 表位比较结果^[1],MAGE-12 的 CTL 表位 271~279,201~209,112~120 以及 MAGE-3 的 271~279,201~209,112~120 可作为共有表位。据报道,许多肿瘤在表达黑色素瘤抗原时往往不是单一表达,而是同时表达多种 MAGE-A 亚家族抗原^[4]。所以,通过 HLA-A2 限制性 CTL 表位预测结合表位序列同源性分析,有利于在肿瘤治疗性疫苗中选择合适的 CTL 表位,同时利用共有表位制成的肽疫苗可同时杀伤表达不同 MAGE-A 抗原的肿瘤细胞,为进一步研制更具广谱性的肿瘤抗原肽疫苗提供依据。

本研究采用超基序法、量化基序法、多项式法、延展基序法与三维结构构建联合应用的方案极大地提高了试验结果的预见性和成功率,减少确定 CTL 表位实验的盲目性,预测出的 4 个 HLA-A2 限制性 CTL 表位为 MAGE-12 的表位的可能性较大,经后续实验筛选、鉴定后,可用于基于 MAGE-12 的肿瘤治疗性多肽疫苗的设计研究。

参考文献

[1] 李艳秋,吴玉章. MAGE 家族研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志
• 临床免疫学与检验论著(全军检验大会优秀论文) •

志,2003,19(5):S73-84.
[2] 李艳秋,吴玉章,李建春,等. MAGE-12 的新 B 细胞表位抗原肽免疫原性作用研究[J]. 武警医学,2007,19(6):457-459.
[3] 李艳秋,董雪梅,李建春,等. MAGE-12 的新 B 细胞表位抗原肽的设计、合成及免疫原性研究[J]. 武警医学院学报,2007,16(3):216-221.
[4] 龙海霞,万瑾,王远强,等. 肿瘤抗原 MAGE-A 亚家族共同 B 细胞表位预测及分析[J]. 免疫学杂志,2009,25(5):572-587.
[5] 吴玉章. CTL 表位预测的方法学进展[J]. 第三军医大学学报,2000,22(10):988-992.
[6] Falk K, Rotzsehke O, Steranovic S, et al. Atlele-specific motifs revealed by sequencing of self peptides eluted from MHC molecules[J]. Nature,1991,351(6324):290-296.
[7] Ruppert J, Sidney J, Celis E, et al. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules[J]. Cell,1993,74(5):929-937.
[8] 李艳秋,吴玉章,倪兵,等. MAGE-12 的 B 细胞表位联合应用的免疫原性研究[J]. 免疫学杂志,2009,25(6):701-703.
[9] 王来,崔晶,王中全,等. 旋毛虫抗原分子克隆及其 T 细胞和 B 细胞表位预测[J]. 免疫学杂志,2007,23(1):30-33.
[10] 贺东亮,崔晓东,赵小珍,等. 过敏蛋白 TBb 的免疫活性鉴定及其表位预测[J]. 免疫学杂志,2009,25(2):137-144.
[11] 张秀敏,隋延仿,罗二平,等. 肿瘤抗原 MAGE-12 新的 HLA-A2 限制性细胞毒性 T 细胞表位的预测[J]. 现代肿瘤医学 2005,13(2):149-151.
[12] 李艳秋,吴玉章,贾正才,等. 肿瘤抗原 MAGE-12 表位及二级结构预测[J]. 免疫学杂志,2001,17(4):268-270.
[13] Marchand M. Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report[J]. Eur J Cancer,2003,39(9):70-74.

(收稿日期:2012-08-09)

IL-6 在蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛发病机制中作用的研究*

胡晓芳¹,袁 笑^{1,2},王玉红¹,苏 晓^{1,2},张英辉¹,郑 伟¹

(1. 沈阳军区总医院检验科,辽宁沈阳 110840;2. 辽宁医学院研究生院,辽宁锦州 121001)

摘要:目的 探讨 IL-6 与蛛网膜下腔出血(SAH)后脑血管痉挛(CVS)之间的相关性。方法 分别检测 SAH 患者和健康者外周血和脑脊液(CSF)白细胞(WBC)、白细胞介素-6(IL-6)水平。结果 SAH 患者外周血 WBC、中性粒细胞百分比(NE%)和 CSF WBC、多个核细胞数均高于对照组($P<0.05$);血清和 CSF IL-6 水平也显著高于对照组($P<0.05$)。SAH 患者痉挛组外周血 WBC、NE%与未痉挛组比较无统计学意义($P>0.05$),WBC、多个核细胞数显著高于未痉挛组($P<0.05$),血清和 CSF IL-6 显著高于未痉挛组($P<0.05$)。SAH 患者痉挛组外周血 WBC、NE%和 CSF WBC、多个核细胞数在第 1、2、3、5、7 天均显著高于对照组($P<0.05$);SAH 患者痉挛组血清和 CSF IL-6 水平在第 1、2、3、5、7 天也均显著高于对照组($P<0.05$)。结论 SAH 后患者机体存在高强度全身和局部炎症,其中局部炎症与 CVS 的发生密切相关。而 CSF 中高水平的 IL-6 可能正是通过诱导局部炎症来介导 CVS 的发生。与此同时,在 CVS 发生后患者血清和 CSF IL-6 水平的持续升高可能正是通过维持高强度的炎症进而参与 CVS 的发生。

关键词:蛛网膜下腔出血; 脑血管痉挛; 炎症; 白细胞; 白细胞介素 6

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 20. 018 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)20-2474-04

脑血管痉挛(CVS)是蛛网膜下腔出血(SAH)后一种常见并发症,是蛛网膜下腔中脑动脉持续性狭窄的病理状态^[1]。CVS 的发生与动脉瘤破裂密切相关,也常见于外伤性脑损伤后^[2]。CVS 引起血供中断导致的神经缺失、梗死和不可逆的

* 基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(201102240)。

脑损伤,正是造成 SAH 患者预后不佳的重要因素。每年世界范围内约有 100 万人因 CVS 死亡或严重致残。用于治疗 CVS 的费用高达数百万美元^[3],因此充分阐明 CVS 发病机制已成为目前需要解决的重点课题。研究显示,炎症是介导 SAH 后脑血管痉挛发生的重要病理基础,其在动脉狭窄过程中发挥着举足轻重的作用^[4]。然而,目前关于炎症介导 CVS 的发生机制尚不明确,尤其是全身炎症和局部炎症在 CVS 发生中的作用尚未阐明。本研究以 SAH 后 CVS 患者为研究对象,系统观察全身及局部炎症的动态变化,尤其聚焦于探讨脑脊液(CSF)中特征性炎症标志物的变化特点,以期探索 SAH 后 CVS 发生机制,进而为 CVS 的诊断、治疗提供新的理论和试验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 11 月至 2012 年 1 月本院神经外科和急诊科收治的 SAH 患者共 60 例,男 27 例、女 33 例,平均年龄(55.77±10.72)岁;脑血管痉挛组 30 例,未痉挛组 30 例。入组标准:患者均有脑血管造影、颅脑 CT 和(或)MRI 等影像证据,诊断符合全国第 4 次脑血管会议制定的《脑血管疾病分类(1995)》中 SAH 诊断标准^[5]。排除肝肾疾病、糖尿病、恶性肿瘤、甲状腺功能异常、妊娠和炎症性疾病等。对照组共 60 例,男 29 例、女 31 例,平均年龄(47±6.42)岁,随机选自同期体检健康者,肝功、肾功、血糖、血脂及其他相关指标均在参考范围内,并排除肝脏、肾脏、内分泌和心脑血管疾病。

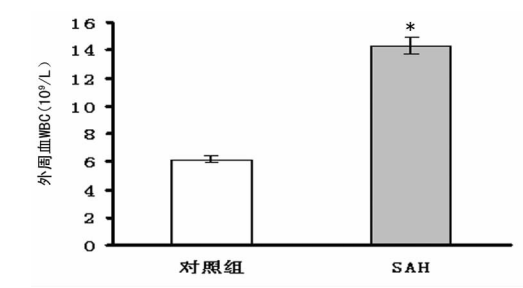
1.2 仪器与试剂 全血细胞检测仪(美国贝克曼库尔特公司),白细胞介素-6(IL-6)检测试剂盒(北京爱迪博生物有限公司)。

1.3 方法 所有研究对象均空腹 12 h 以上,分别于第 1、2、3、5、7 天采集 3 mL 未抗凝静脉血和 3 mL EDTA-K₂ 抗凝静脉血,并行腰椎穿刺抽取 5 mL CSF 标本。采用抗凝静脉血进行全血细胞检测。未抗凝静脉血 1 h 内 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清标本,用于 IL-6 水平检测。2 mL CSF 用于显微镜计数检测,3 mL CSF 1 h 内 3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,用于 IL-6 水平检测。

1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件包进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行统计学处理。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAH 患者和健康者比较 SAH 组外周血白细胞(WBC)、中性粒细胞百分比(NE%)和 CSF 中 WBC、多个核细胞数与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1~4。SAH 组血清和 CSF IL-6 水平与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5~6。

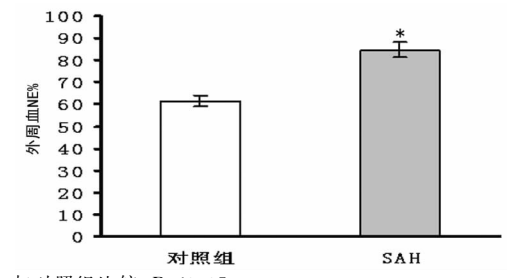


*:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 SAH 组外周血 WBC 与对照组比较

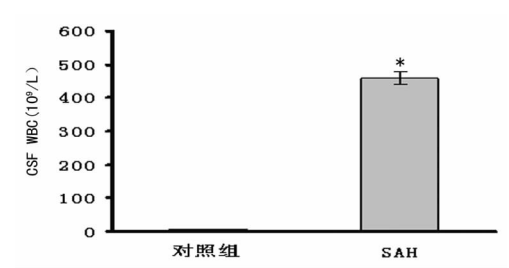
2.2 SAH 患者痉挛和未痉挛组比较 SAH 患者痉挛组外周血 WBC、NE% 与未痉挛组相比,差异无统计学意义($P >$

0.05);SAH 患者痉挛组 CSF WBC 和多个核细胞数与未痉挛组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 7~10。SAH 患者痉挛组血清和 CSF IL-6 与未痉挛组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 11~12。



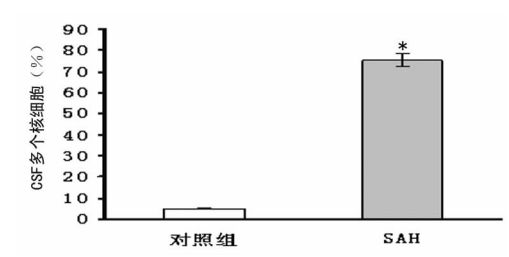
*:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 SAH 组外周血 NE%与对照组比较



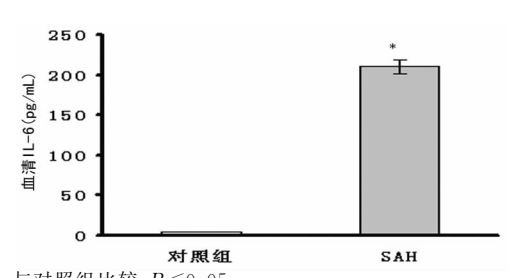
*:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 SAH 组 CSF WBC 与对照组比较



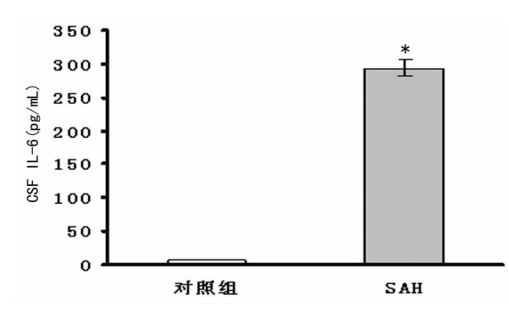
*:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 SAH 组 CSF 多个核细胞与对照组比较



*:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 SAH 组血清 IL-6 与对照组比较



*:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 6 SAH 组 CSF IL-6 与对照组比较

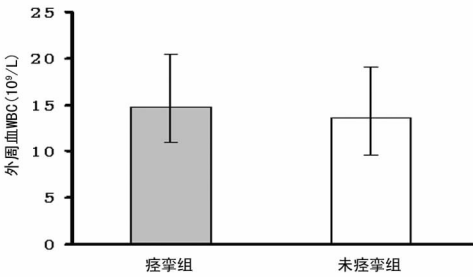


图 7 卒中与未卒中组外周血 WBC 比较

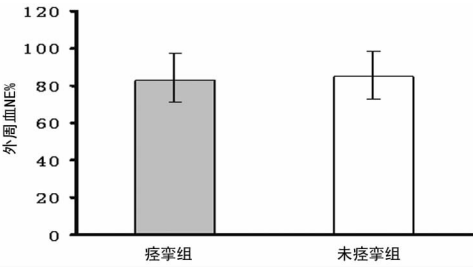
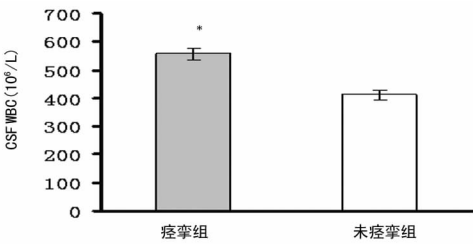
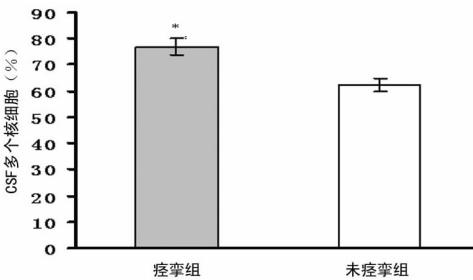


图 8 卒中与未卒中组外周血 NE% 比较



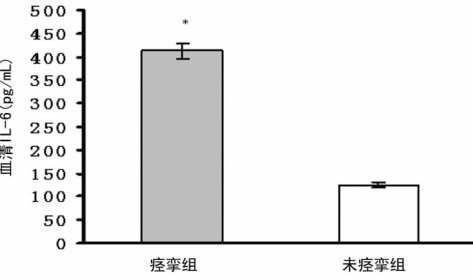
* : 与未卒中组比较, $P < 0.05$ 。

图 9 CSF WBC 卒中与未卒中比较



* : 与未卒中组比较, $P < 0.05$ 。

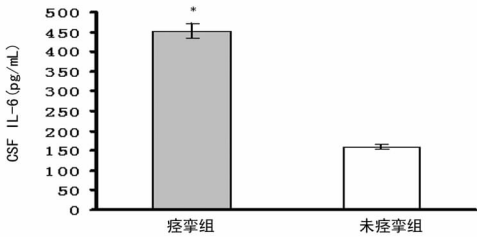
图 10 卒中与未卒中组 CSF 多个核细胞数比较



* : 与未卒中组比较, $P < 0.05$ 。

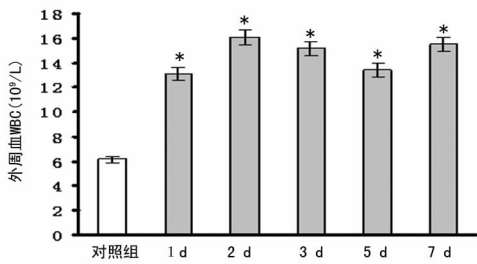
图 11 卒中与未卒中组血清 IL-6 比较

16。SAH 患者卒中组血清和 CSF IL-6 水平在第 1、2、3、5、7 天与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 17~18。



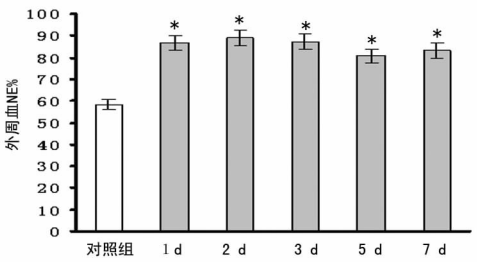
* : 与未卒中组比较, $P < 0.05$ 。

图 12 卒中与未卒中组 CSF IL-6 比较



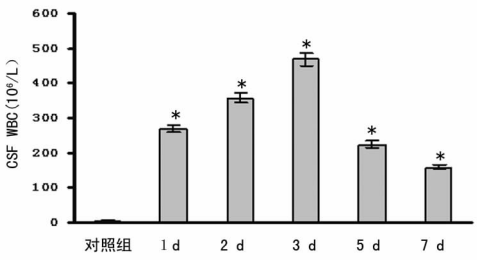
* : 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 13 卒中组外周血 WBC 动态比较



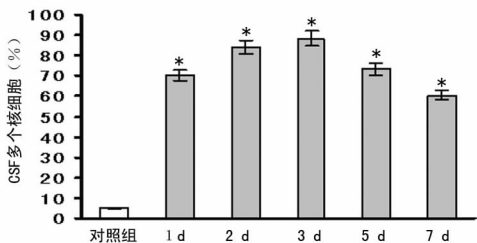
* : 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 14 卒中组外周血 NE% 动态比较



* : 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

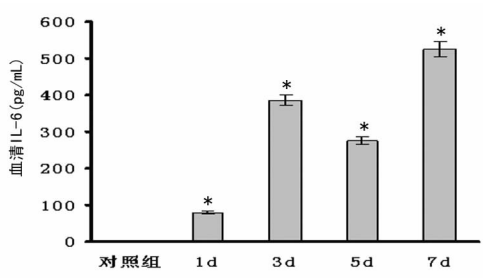
图 15 卒中组 CSF WBC 动态比较



* : 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

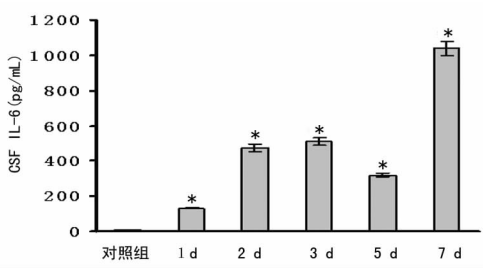
图 16 卒中组 CSF 多个核细胞数动态比较

2.3 SAH 患者卒中组各指标动态比较 SAH 患者卒中组外周血 WBC、NE% 和 CSF WBC、多个核细胞数水平在第 1、2、3、5、7 天与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 13~



*: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 17 痉挛组血清 IL-6 动态比较



*: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 18 痉挛组 CSF IL-6 动态比较

3 讨 论

CVS 是 SAH 患者最常见并发症,其发病率高达 30%~90%,也是患者致死、致残的主要原因。目前关于 CVS 的发生机制尚未充分阐明。迄今研究显示,炎症在 SAH 后 CVS 的发病中发挥着重要作用。然而,关于其介导 CVS 发生的具体机制尚未明确,尤其缺乏理想的炎症标志物评估 CVS 发生过程中的炎症状态^[6]。

炎症是指具有血管系统的活体组织对损伤因子的防御反应。研究显示,炎症作为一种重要机制参与了脑血管疾病的发生,并成为独立的危险因素^[4]。本研究结果显示,SAH 患者外周血 WBC、NE% 和 CSF WBC、多个核细胞数水平均明显高于对照组 ($P < 0.05$),提示 SAH 后患者存在全身和局部炎症。其可能机制为:SAH 后脑组织受损,儿茶酚胺和类固醇激素等分泌增加,促使 WBC 活化,引起大量炎症物质浸润,影响脑血流量、损害脑实质及破坏血脑屏障导致微循环堵塞、脑缺血加重,启动炎症^[7-8]。此外,本研究进一步显示,血清和 CSF IL-6 水平均高于对照组 ($P < 0.05$),提示 SAH 后患者机体炎症状态与 IL-6 密切相关。

本研究结果显示,CVS 患者外周血 WBC 和 NE% 水平与未痉挛组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。值得关注的是,CSF WBC 和多个核细胞数水平均显著高于未痉挛组 ($P < 0.05$),提示局部炎症在 CVS 的发病机制中可能发挥着重要作用。IL-6 是一种具有多种生物学功能的细胞因子,参与机体多种组织细胞的生长分化和功能调节,在免疫和炎症中发挥重要作用。有研究证实,脑组织细胞损伤坏死,产生大量抗原刺激免疫系统,大量炎症细胞浸润和激活,引起强烈的免疫应答,致使单核-巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞等被激活,产生大量 IL-6,促使炎症发生^[9-10]。本研究结果显示,CVS 患者血清和 CSF IL-6 水平均显著高于未痉挛组 ($P < 0.05$),提示 IL-6 可能通过介导炎症参与 CVS 的发生。IL-6 介导 CVS 发生的机制可能为:SAH 后 IL-6 异常升高刺激各种组织和细胞不断合成和释放内皮素,促进血小板生成素的活性,使 C-反应蛋白水平升高,阻碍前列腺素 I₂ 的产生等作用,引起血管收缩,最终诱导

CVS 的发生。此外,炎症因子还可由血管内皮细胞和巨噬细胞等在 IL-6 诱导下产生,以协同刺激血管内皮细胞不断合成和释放炎症介质^[11]。因此可推测,SAH 后 CVS 的发生可能正是 IL-6 对于炎症级联放大作用的结果。

本研究结果进一步显示,CVS 患者外周血 WBC 和 NE% 在发病后第 1 天开始升高,第 3 天达高峰,并持续至第 7 天,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此提示,CVS 的发生依赖于患者机体高强度炎症的持续存在。更为重要的是,CVS 患者血清和 CSF IL-6 水平与 WBC 呈相同的变化趋势,由此进一步提示,IL-6 可能正是介导高强度炎症持续存在的关键效应分子。

综上所述,SAH 后患者机体存在高强度全身和局部炎症,其中局部炎症与 CVS 的发生密切相关。而 CSF 中高水平的 IL-6 可能正是通过诱导局部炎症来介导 CVS 的发生。与此同时,在 CVS 发生后患者血清和 CSF IL-6 水平的持续升高可能正是通过维持高强度的炎症进而参与 CVS 的发生。

参考文献

- [1] Clark JF, Loftspring M, Wurster WL, et al. Chemical and biochemical oxidations in spinal fluid after subarachnoid hemorrhage [J]. Front Biosci, 2008, 13(13): 1806-1812.
- [2] Pasqualin A, Vivenza C, Rosta L, et al. Cerebral vasospasm after head injury [J]. Neurosurgery, 1984, 15(6): 855-858.
- [3] Zhang YF, Clark JF, Pyne-Geithman G, et al. Study in CSF for putative biomarkers to predict cerebral vasospasm [J]. Metallomics, 2010, 2(4): 628-637.
- [4] Vergouwen MD, Ilodigwe D, Macdonald RL, et al. Cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage contributes to poor outcome by vasospasm-dependent and -independent effects [J]. Stroke, 2011, 42(4): 924-929.
- [5] 全国第 4 次脑血管会议. 各类脑血管疾病诊断要点 [J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379.
- [6] Aminmansour B, Ghorbani A, Sharifi S, et al. Cerebral vasospasm following traumatic subarachnoid hemorrhage [J]. J Res Med Sci, 2009, 14(6): 343-348.
- [7] 解旭东, 冀风云, 汪明慧, 等. 白细胞、血小板动态变化与蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的关系 [J]. 河南实用神经疾病杂志, 2003, 6(1): 15-16.
- [8] McGirt MJ, Mavropoulos JC, McGirt IY, et al. Leukocytosis as an independent risk factor for cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosurg, 2003, 98(10): 1222-1226.
- [9] Hariri RJ, Chang VA, Barie PS, et al. Traumatic injury induces interleukin-6 production by human astrocytes [J]. Brain Res, 1994, 636(1): 139-143.
- [10] Woodroffe MN, Sama GS, Wadhe M, et al. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo micridialyses: evidence of a role for microglia in cytokine production [J]. J Neuroimmunol, 1991, 33(3): 227-236.
- [11] Muller B, Peri G, Doni A, et al. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients [J]. Crit Care Med, 2001, 29(7): 1404-1407.

(收稿日期: 2012-08-09)