

• 研究报告 •

急性脑损伤大鼠脑组织核转录因子- κ B 活性及肿瘤坏死因子- α 表达的变化

肖国民 危静

【关键词】 脑损伤,急性; 核转录因子- κ B; 肿瘤坏死因子- α ; 大鼠

本研究旨在观察大鼠急性脑损伤后脑组织核转录因子- κ B(NF- κ B)活性及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)蛋白表达的变化,探讨 NF- κ B 活化在脑损伤后继发性脑水肿中的作用;并给应用 NF- κ B 特异性抑制剂吡咯烷二硫基甲酸酯(PDTC)治疗提供佐证。

1 材料与与方法

1.1 动物分组:SD 大鼠 44 只,雌雄不拘,体重 250~300 g,由浙江大学实验动物中心提供。随机分为假手术对照组(8 只)、创伤组(18 只)和 PDTC 治疗组(18 只)。后两组又随机分为术后 6、24 和 72 h 3 个亚组,每组 6 只。PDTC 组伤后立即腹腔注射 PDTC(美国 Sigma 公司)100 mg/kg;对照组和创伤组则注射等量生理盐水。各组动物于相应时间点断头取脑,脑组织标本-70℃保存待测。

1.2 动物模型制备:采用自由落体致伤法制备大鼠脑外伤模型。大鼠以 20 g/L 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,俯卧位,固定头部,矢状切开头皮,显露右顶骨,在人字缝前 2 mm、右侧中线旁 2 mm 处用牙钻钻一个小孔,扩大骨窗至 5 mm×5 mm,撞杆头端置于右顶骨硬膜外,采用 20 g 重击锤沿外周套管从 30 cm 高处自由落下冲击撞杆,造成右顶叶局限性脑损伤,止血后缝合头皮。对照组仅切开头皮,打开骨窗,不致伤。

1.3 脑组织 NF- κ B 活性测定:核蛋白提取参照 Ichikawa 等^[1]方法,取左侧大鼠脑组织约 0.5 g,4℃下经过磷酸盐缓冲

液(PBS)充分洗涤后称重,加 5 倍体积 0.1 mol/L KH₂PO₄ (pH 7.4)缓冲液,冰浴中匀浆,4℃下离心(13 000×g) 15 min,弃上清液,沉淀中加入 3 倍体积的细胞浆裂解液〔内含 4-羟乙基哌嗪乙烷磺酸(HEPES)20 mmol/L、N-十二烷酰肌氨酸钠(NaVa)0.1 mmol/L、KCl 10 mmol/L、二硫苏糖醇(DTT) 1 mmol/L、苯甲基磺酰氟化物(PMSF) 1 mmol/L、乙二胺四乙酸(EDTA) 1 mmol/L、体积分数为 10%的甘油〕,冰上孵育 10 min,4℃离心(8 723×g) 5 min,沉淀中加 3 倍体积细胞核裂解液(HEPES 20 mmol/L、KCl 10 mmol/L、NaVa 0.1 mmol/L、DTT 1 mmol/L、PMSF 1 mmol/L、EDTA 1 mmol/L、20%甘油、NaCl 420 mmol/L)混匀,冰上孵育 20 min,4℃下离心(10 306×g) 10 min,取上清于-20℃保存待测。

凝胶电泳迁移率分析法(EMSA)测定脑组织中 NF- κ B 活性(试剂盒购自美国 Promega 公司):脑组织核蛋白 100 μ l, γ -³²P(北京亚辉生物医学工程公司)标记的 NF- κ B 探针 2 μ l,结合缓冲液 4 μ l,加无核酶水至结合反应总体积为 18 μ l,室温下孵育 20 min,加样于质量分数为 4%的凝胶中,在 0.5 mol/L 的磷酸盐(TBE)缓冲液中电泳。加样前预电泳 30 min,加样后在 100 V 电压中电泳 2 h,直到溴酚蓝到达凝胶底部。电泳完毕后取出凝胶,-70℃放射自显影,72 h 洗片,Tiger 90 图像扫描仪扫

描,图像输入计算机,应用图像分析系统分析,以积分灰度值表示脑组织 NF- κ B 活性。

1.4 脑组织匀浆 TNF- α 蛋白测定:取少量创伤灶附近脑皮质,称重后,加入 5 倍体积 0.1 mol 醋酸,煮沸 10 min,匀浆 15 min,离心(×3 500 g)15 min,取上清,沉淀加入 0.1 mol 醋酸 1 ml 匀浆,离心,取上清,混合上清后加入抑肽酶,放射免疫分析法(RIA)测定 TNF- α 蛋白含量,试剂盒由北京北方生物技术研究所提供,严格按说明书操作。

1.5 脑组织含水量测定:取脑伤灶后缘约 2 mm 处脑皮质约 5 mm×5 mm×5 mm 大小,电子天平称湿重后,置真空恒温干燥箱,100℃烘烤 24 h,称干重。计算脑组织含水量。脑组织含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.6 病理形态学观察:取脑损伤灶前缘约 2 mm 处脑皮质,约 5 mm×5 mm×5 mm 大小,立即经体积分数为 4%的中性甲醛固定,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,切片厚约 6 μ m,脱蜡后,用苏木素-伊红(HE)染色法,光镜下观察。

1.7 统计学处理:数据均以均数±标准差(\bar{x} ±s)表示,采用 SPSS 统计软件进行两组均数间比较,t 检验及方差分析。

2 结果

2.1 脑组织含水量变化(表 1):假手术对照组各时间点脑组织含水量差异均无显著性(P 均>0.05),伤后各时间点脑组织含水量均显著增高(P<0.05或

表 1 3 组动物不同时间点脑组织含水量、NF- κ B 活性及 TNF- α 蛋白含量的比较(\bar{x} ±s)

组别	动物数 (只)	脑组织含水量(%)			NF- κ B 活性($\times 10^4$)			TNF- α 蛋白含量(μ g/L)		
		伤后 6 h	伤后 24 h	伤后 72 h	伤后 6 h	伤后 24 h	伤后 72 h	伤后 6 h	伤后 24 h	伤后 72 h
假手术对照组	8	68.45±5.21	69.91±8.25	70.65±1.41	3.00±0.11	2.46±0.83	3.83±0.79	40.81±12.46	39.87±8.75	39.63±5.12
创伤组	18	76.69±6.83*	89.50±5.03*	79.79±7.84**	25.74±2.51**	35.17±2.97**	28.31±1.32**	236.63±5.32**	253.78±15.80**	262.38±5.86**
PDTC 组	18	71.79±13.74 Δ	81.63±7.73* Δ	77.52±10.58* Δ	4.01±0.36 $\Delta\Delta$	3.46±1.48 $\Delta\Delta$	5.03±4.04 $\Delta\Delta$	44.37±17.46 $\Delta\Delta$	45.89±6.23 $\Delta\Delta$	40.24±9.45 $\Delta\Delta$

注:与假手术对照组比较:*P<0.05,**P<0.01;与创伤组比较: Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01

基金项目:浙江省杭州市医药卫生科技项目资助(2003B013)

作者单位:310015 杭州师范学院医学院附属医院神经外科

作者简介:肖国民(1962-),男(汉族),江西省赣州市人,副教授,副主任医师。

$P < 0.01$), 伤后 24 h 最高。PDTC 治疗后脑组织含水量显著减少 ($P < 0.05$); 与假手术对照组比较, 伤后 6 h 脑组织含水量差异无显著性 ($P > 0.05$), 24 和 72 h 略有增加 (P 均 < 0.05)。

2.2 脑组织 NF- κ B 活性和 TNF- α 蛋白含量变化 (表 1): 假手术对照组各时间点脑组织 NF- κ B 活性和 TNF- α 蛋白水平差异无显著性 (P 均 > 0.05), 并维持在较低水平; 创伤后二者均明显升高 (P 均 < 0.01), 其中 NF- κ B 活性于伤后 24 h 达高峰。PDTC 治疗后二者均显著降低 (P 均 < 0.01), 与假手术对照组比较略有增高, 但差异无显著性 (P 均 > 0.05)。

2.3 病理形态学观察: 假手术对照组各时间点细胞结构完整、清晰, 细胞间质无水肿; 创伤组大鼠软脑膜表面及分子层脑组织变性、崩解, 并可见散在出血点。外颗粒层锥体细胞胞浆水肿, 部分细胞呈空泡变性, 轴索变短, 方向紊乱, 细胞体明显肿胀, 核固缩, 结构不清, 呈不规则形状, 细胞周围间隙水肿, 细胞核变性, 部分细胞坏死。PDTC 治疗组细胞损伤明显减轻, 出血减少且较轻, 细胞变性减轻, 细胞坏死明显减少, 细胞水肿仍存在, 但较创伤组明显减轻。

3 讨论

在颅脑损伤后继发性脑水肿过程中, 炎性介质和细胞因子发挥了重要作用; 多种促炎细胞因子在脑损伤后高度表达, 并与脑损伤严重程度密切相关^[2]。NF- κ B 活化是机体效应细胞大量释放促炎细胞因子, 导致组织发生过度炎症反应和组织损伤的关键环节^[3]。NF- κ B 是一种具有多向性转录激活功能的调节因子, 可以被多种刺激物 (如应激、炎症、氧自由基、细胞因子等) 激活, 其主要作用是调控编码多种细胞因子、趋化因子、生长因子、细胞黏附分子、免疫受体、氧化应激相关酶、转录因子、急性时相蛋白等, 参与免疫、炎症、细胞凋亡等生理和病理过程中的基因表达调控^[4]。诱生型 NF- κ B 是主要由 P50 和 P65 两个亚基以同源或异源二聚体形式组成的一组真核细胞转录因子^[5]。正常生理状态下, NF- κ B 与其抑制因子 I κ B 蛋白家族中成员相结合而滞留于细胞质中, 不具有转录活性^[6]。细胞受到刺激后, 启动细胞第二信使系统, I κ B 磷酸化及泛素化, 发生降解并与 NF- κ B 解离, NF- κ B 激

活, 由胞质移位至胞核^[7], 与 DNA 上启动子区域相应靶基因位点结合, 而启动一系列免疫和炎症反应相关基因转录程序, 诱导众多细胞因子如白细胞介素-1 (IL-1)、IL-6、IL-8 和 TNF- α 等高表达。NF- κ B 分布于多种类型细胞中, 在神经系统中也广泛存在^[8]。Nanaka 等^[9]报道, 在创伤性脑损伤大鼠大脑皮质中, 伤后数小时内 NF- κ B 活性显著增高, 并至少持续 24 h 维持在高水平。本实验研究中发现, 假手术对照组脑组织 NF- κ B 活性处于低水平; 大鼠急性脑损伤后, 脑组织 NF- κ B 活性显著增强, 伤后 6 h 即增高, 伤后 24 h 达高峰。提示 NF- κ B 活化参与了脑损伤后继发性脑损伤过程。

TNF- α 是较早释放、具有多种生物学效应的重要促炎细胞因子, 在炎症反应过程中可激活细胞因子级联反应, 诱导白细胞介素类 (ILs) 和次级炎症介质 (如花生四烯酸代谢产物、氧自由基、脂质过氧化物等) 的合成。神经系统中星形细胞、血管内皮细胞、小胶质细胞以及神经元均可产生 TNF- α ^[10]。TNF- α 在脑组织中呈现高表达, 具有神经毒性, 可以加速神经细胞的死亡^[11]。TNF- α 也是 NF- κ B 活化的重要刺激物之一, 可促进 NF- κ B 活化, 最终引发过度组织炎症反应和损伤。本研究中, 急性脑损伤大鼠伤后脑组织 TNF- α 蛋白高度表达, 脑组织水肿也明显增加。经 PDTC 干预后, NF- κ B 活化受到抑制, 脑组织中 NF- κ B 活性和 TNF- α 蛋白表达均明显减低, 脑组织水肿有所减轻。说明 NF- κ B 活化与 TNF- α 表达关系密切。有学者研究发现, TNF- α 受体敲除的大鼠发生脑损伤后神经元和血-脑屏障损害减轻, NF- κ B 活性也降低^[12]。证实由于 NF- κ B 活化, 使 NF- κ B 编码 TNF- α 等许多促炎细胞因子表达增加, 对神经细胞产生毒性作用, 导致脑水肿形成和加重。因此, 应用 NF- κ B 活化抑制剂可能为治疗颅脑损伤后继发性脑水肿提供一种有效的治疗方法。

参考文献:

- 1 Ichikawa K, DeGroot L J, Refetoff S, et al. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured human fibroblasts: improved method of isolation, partial characterization, and interaction with chromatin [J]. *Metabolism*, 1986, 35: 861-868.

- 2 Stover J F, Schoning B, Sakowitz O W, et al. Effects of tacrolimus on hemispheric water content and cerebrospinal fluid levels of glutamate, hypoxanthine, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha following controlled cortical impact injury in rats [J]. *J Neurosurg*, 2001, 94: 782-787.
- 3 刘振桐. 核因子- κ B 与全身炎症反应综合征 [J]. *中国危重病急救医学*, 2000, 12: 631-632.
- 4 Baeuerle P, Baltimore D. NF- κ B: Ten years after [J]. *Cell*, 1996, 87: 13-20.
- 5 Baskwin A S Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights [J]. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14: 649-683.
- 6 Beg A A, Baldwin A S Jr. The I κ B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF- κ B transcription factors [J]. *Genes Dev*, 1993, 10: 427-433.
- 7 Beg A A, Ruben S M, Schinman R I, et al. I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- κ B: a mechanism for cytoplasmic retention [J]. *Genes Dev*, 1992, 9: 1899-1913.
- 8 Korner M, Rattner A, Mauxion F, et al. A brain specific transcription activator [J]. *Neuron*, 1989, 3: 563-572.
- 9 Nanaka M, Chen X H, Pierce J E S, et al. Prolonged activation of NF- κ B following traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1999, 16: 1023-1034.
- 10 Connor T J, Song C, Leonard B E, et al. An assessment of the effects of central interleukin-1 beta, -2, -6, and tumor necrosis factor-alpha administration on some behavioural neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat [J]. *Neuroscience*, 1998, 84: 923-933.
- 11 Suzumura A, Ito A, Yoshikawa M, et al. Ibuprofen suppresses TNF alpha production by glial cells functioning mainly as type II phosphodiesterase inhibition in the CNS [J]. *Brain Res*, 1999, 837 (1-2): 203-212.
- 12 Sullivan P G, Bruce-Keller A J, Rabchevsky A G, et al. Exacerbation of damage and altered NF- κ B activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury [J]. *J Neurosci*, 1999, 19: 6248-6260.

(收稿日期: 2004-06-25)

修回日期: 2005-02-26)

(本文编辑: 郭方)