

表没食子儿茶素没食子酸酯对大鼠创伤性脑水肿保护作用的研究

张铂^{1,2} 王兵² 曹书华² 王勇强²

(1. 天津市环湖医院重症医学科, 天津 300060;

2. 天津市第一中心医院重症医学科, 天津市急救医学研究所, 天津 300192)

【摘要】 目的 观察表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对大鼠创伤性脑损伤继发脑水肿的抑制作用及其机制。方法 选择 Wistar 大鼠 200 只,按随机数字表法分为假手术组(20 只)、模型组(90 只)和 EGCG 组(90 只),采用 Feeney 自由落体坠击法制备大鼠创伤性脑损伤模型;EGCG 组于制模后即刻腹腔注射 EGCG 生理盐水溶液 100 mg/kg(10 mL/kg);模型组给予等量生理盐水;均每 24 h 注射 1 次,连用 2 d。于给药后 24、48、72 h 测定各组大鼠脑组织含水量、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的变化,根据脑组织中伊文思蓝(EB)含量评价脑血管通透性,采用免疫组化法和蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定大鼠脑组织水通道蛋白-4(AQP₄)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的变化,并观察各组大鼠脑组织病理学改变。结果 与假手术组比较,模型组给药后各时间点脑组织含水量、MDA 水平均明显增加,SOD 水平明显降低,脑血管通透性增加;模型组制模后 24 h、72 h AQP₄、GFAP 阳性细胞表达评分(IHC 评分)均明显升高;AQP₄ 和 GFAP 蛋白表达水平〔积分吸光度(IA)〕明显升高,以制模后 72 h 变化更显著〔脑组织含水量:(89.71±0.94)%比(78.34±0.87)%,EB 的含量(μg/g):9.13±0.66 比 2.71±0.72,SOD(U/mg):63.53±12.57 比 130.85±9.91,MDA(nmol/mg):10.19±1.47 比 4.57±0.74,AQP₄ IHC 评分(分):8.81±1.75 比 2.76±0.82,GFAP 的 IHC 评分(分):9.47±1.32 比 6.71±0.52,AQP₄ 蛋白表达(IA 值):1.53±0.05 比 0.42±0.05,GFAP 蛋白表达(IA 值):1.45±0.05 比 0.62±0.04,均 P<0.01〕。与模型组比较,EGCG 组大鼠脑组织含水量、MDA 水平和 AQP₄、GFAP 的 IHC 评分及蛋白表达均显著下降,SOD 水平显著提高,血管通透性明显下降,以制模后 72 h 变化更显著〔脑组织含水量:(86.59±0.89)%,EB 的含量(μg/g):7.82±0.32,SOD(U/mg):107.58±10.87,MDA(nmol/mg):5.61±1.64,AQP₄ IHC 评分(分):6.92±0.71,GFAP 的 IHC 评分(分):6.71±0.52,AQP₄ 蛋白表达(IA 值):1.14±0.06,GFAP 蛋白表达(IA 值):1.21±0.07,均 P<0.01〕;免疫组化法检测 EGCG 组大鼠 AQP₄ 和 GFAP 的阳性细胞数减少,颜色变浅。结论 EGCG 对大鼠创伤性脑损伤继发脑水肿的抑制作用与降低血管通透性、增加 SOD 水平,降低 MDA 水平及 AQP₄ 和 GFAP 的表达有关。

【关键词】 表没食子儿茶素没食子酸酯; 创伤性脑水肿; 水通道蛋白-4; 胶质纤维酸性蛋白

A study on protective effects of epigallocatechin gallate on encephaledema following traumatic brain injury in rats Zhang Bo*, Wang Bing, Cao Shuhua, Wang Yongqiang. *Department of Critical Care Medicine, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

Corresponding author: Wang Yongqiang, Department of Critical Care Medicine, Tianjin First Center Hospital, Tianjin Institute of Emergency Medicine, Tianjin 300192, China, Email: svr_20061978@163.com

【Abstract】 Objective To observe the inhibitory effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on encephaledema following traumatic brain injury (TBI) in rats and its mechanism. **Methods** 200 Wistar rats were randomly divided into three groups: sham operation ($n = 20$), model ($n = 90$) and EGCG ($n = 90$) groups. The classic Feeney free fall drop method was used to establish the model of TBI. In EGCG group, intraperitoneal injection of EGCG in normal saline 100 mg/kg (10 mL/kg) was immediately given to the rats after model establishment, and in model group, equal amount of normal saline was administered with the same method, once 24 hours for 2 days in all the groups. At 24, 48, and 72 hours after the administration in various groups, the changes of water content, superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) level in brain tissues were determined, cerebral vascular permeability was evaluated by evans blue (EB) content in the brain tissues, the changes of expressions of aquaporin-4 (AQP₄) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in brain tissues were determined by immunohistochemical and Western Blot, and the cerebral histopathological changes were observed in various groups. **Results** Compared with sham operation group, the water content, the vascular permeability and MDA level in brain tissues were significantly higher, while the cerebral SOD activity was significant lower in the model group; the scores of cells with positive AQP₄ and GFAP expressions (IHC score) were obviously increased at 24 hours and 72 hours after model establishment, and the levels of expressions of AQP₄ and GFAP

protein [integral absorbance (IA) value] were markedly enhanced in model group than those in the sham operation group, the changes being more remarkable at 72 hours after model formation [water content in brain tissues: $(89.71 \pm 0.94)\%$ vs. $(78.34 \pm 0.87)\%$, EB content ($\mu\text{g/g}$): 9.13 ± 0.66 vs. 2.71 ± 0.72 , SOD activity (U/mg): 63.53 ± 12.57 vs. 130.85 ± 9.91 , MDA (nmol/mg): 10.19 ± 1.47 vs. 4.57 ± 0.74 , IHC score of AQP₄: 8.81 ± 1.75 vs. 2.76 ± 0.82 , IHC score of GFAP: 9.47 ± 1.32 vs. 6.71 ± 0.52 , expression of AQP₄ protein (IA value): 1.53 ± 0.05 vs. 0.42 ± 0.05 , expression of GFAP protein (IA value): 1.45 ± 0.05 vs. 0.62 ± 0.04 , all $P < 0.01$]. Compared with the model group, the cerebral water content, MDA, IHC scores and protein expressions of AQP₄ and GFAP, and cerebral vascular permeability were significantly decreased, while the SOD activity was obviously increased in the EGCG group, and the changes being more significant at 72 hours after model establishment [water content of brain tissues: $(86.59 \pm 0.89)\%$, EB content ($\mu\text{g/g}$): 7.82 ± 0.32 , SOD activity (U/mg): 107.58 ± 10.87 , MDA (nmol/mg): 5.61 ± 1.64 , IHC score of AQP₄: 6.92 ± 0.71 , IHC score of GFAP: 6.71 ± 0.52 , expression of AQP₄ protein (IA value): 1.14 ± 0.06 , expression of GFAP protein (IA value): 1.21 ± 0.07 , all $P < 0.01$]. Immunohistochemical assay showed: the cerebral contents of AQP₄ and GFAP positive cells in the rats of EGCG group were decreased, and their color became lighter. **Conclusion** The inhibition of EGCG on encephaledema following TBI in rats is related to its effects of decreasing the cerebral vascular permeability, enhancing the level of SOD activity, depressing MDA level and the expressions of AQP₄ and GFAP.

[Key words] Epigallocatechin gallate; Encephaledema, traumatic; Aquaporin-4; Glial fibrillary acidic protein

创伤性脑损伤(TBI)是神经外科及重症医学科最常见的疾病之一,是世界范围内主要死亡及致残因素之一^[1];在外伤性死亡原因中居首位^[2]。创伤性脑水肿继发于创伤性脑损伤,是这一疾病最重要的病理生理反应^[3],一般系指血管源性脑水肿和细胞毒性脑水肿的混合^[4],是创伤致死和致残的主要原因^[5-7]。研究显示,对因脑创伤导致的脑水肿引起的高颅压的控制直接影响患者预后^[8-9]。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是茶多酚中儿茶素的一种,约占儿茶素总量的50%~80%,是儿茶素的核心物质。研究表明,EGCG是抗氧化作用最强的自由基清除剂之一,且具有很强的抗肿瘤、抗病毒,防治糖尿病、降血脂、减肥和神经元保护等功能^[10-13]。水通道蛋白-4(AQP₄)是中枢系统发现最早的水通道蛋白,广泛分布于中枢胶质界膜、室管膜、海马齿状回、下丘脑的视上核和室旁核及脑表面的软脑膜、小脑浦肯野细胞、脑微血管的细胞表面^[14-15]。其中在与毛细血管、蛛网膜和软脑膜直接接触的星形胶质细胞及其终足上AQP₄表达最为丰富,称之为极性分布,这也是AQP₄在中枢分布上最为显著的特点。这种分布特点提示AQP₄在维持大脑水平衡中起了重要作用,它是胶质细胞与脑脊液及血管间的水调节和转运的重要结构基础^[16-17]。本研究通过给创伤性脑损伤模型大鼠腹腔注射EGCG,探讨EGCG对大鼠创伤后脑水肿的影响,及其对创伤性脑水肿的防治作用和可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料:选择健康清洁级成年雄性Wistar大鼠200只,体质量 (180 ± 20) g,由天津医科大学实验动物中心提供,动物许可证号:SYXK 2014-0003,

实验前适应性饲养3d,饲养温度 (21 ± 1) ℃,湿度 $(60 \pm 5)\%$ 。EGCG购自美国Sigma公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物有限公司;AQP₄及神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体购自美国Cell Signaling公司。

1.2 动物分组与模型制备:随机取20只大鼠作为假手术组;余180只大鼠按随机数字表法均分为模型组和EGCG组,每组以脑损伤后时间点再随机均分为24、48、72h共3个亚组,每个亚组30只大鼠。采用Feeney自由落体法^[18]复制大鼠脑损伤模型。EGCG组于制模后即刻腹腔注射EGCG生理盐水溶液10mL/kg,每24h注射1次,连续给药2d。模型组于模型制备后即刻腹腔注射生理盐水10mL/kg,每24h注射1次,连续给药2d。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 脑组织标本制备:假手术组、模型组、EGCG组分别于术后24、48和72h处死大鼠,开颅取损伤侧大脑半球,用pH值7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2遍,均分后,一部分用10%中性甲醛水溶液固定,另一部分置于-80℃超低温冰箱保存待测。

1.3.2 总蛋白提取:取脑组织200mg,加1mL免疫印迹(Western)、免疫沉淀(IP)细胞裂解液和20μL苯甲基磺酰氟(PMSF)制备组织匀浆,吸取中间层液体转移至小离心管(EP)中,冰上静置,每10min用超声波混匀10s,共5次。4℃离心30min,取上清液用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度,-80℃冰箱中保存备用。

1.3.3 脑含水量测定:取损伤侧大脑半球,称湿质量后置于100~110℃的烤箱中烘烤24h至恒质量

后称干质量,按公式计算脑组织含水量:脑组织含水量(%)=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.3.4 脑血管通透性测定:测定前 2 h 经大鼠股静脉缓慢注入 2.5% 伊文思蓝(EB)2 mL/kg。测定时麻醉大鼠,开胸经左心室至升主动脉插管,生理盐水快速冲净血液后断头取脑,取损伤侧大脑半球脑组织浸泡在甲酰胺溶液中,避光,60℃水浴 24 h,待组织中色素全部浸出,离心取上清液,用分光光度计在波长 620 nm 处测定吸光度(A)值。根据标准曲线计算 EB 含量以确定脑血管通透性变化。

1.3.5 脑组织 SOD 水平的测定:取损伤侧大脑半球皮质组织 100 mg,置于 9.9 mL PBS(pH 值 7.4)中高速匀浆,离心取上清液 5 μL,按试剂盒说明书操作测定 SOD 活性。

1.3.6 脑组织 MDA 水平的测定:取损伤侧大脑半球皮质组织 100 mg,加 pH 值 7.4 的 PBS 至 10 mL,制备组织匀浆,离心取上清液 5 μL,按试剂盒说明书测定 MDA 活性。

1.3.7 免疫组化法(IHC)检测脑细胞 AQP₄ 和 GFAP 表达:根据文献^[19]报道的方法进行 AQP₄ 和 GFAP 的免疫组化染色及评分。

1.3.8 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测脑细胞 AQP₄ 和 GFAP 表达:蛋白样品用 5× 上样缓冲液稀释使上样量为 60 μg,100℃煮沸变性 5 min。上样后行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),5% 浓缩胶 80 V、30 min,12% 分离胶 110 V、60 min,聚偏二氟乙烯(PVDF)膜于冰水浴中预转膜(80 mA、110 min),置 PVDF 膜于 5% 脱脂奶粉中,摇床室温封闭 1 h。加一抗[1:1 000,用含吐温 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBST)稀释]封闭,37℃水浴 30 min,摇床混匀 30 min 后 4℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次(每次 10 min)后加二抗(1:10 000,用 TBST 稀释),37℃孵育 1 h,摇床混匀 30 min, TBST 洗膜 3 次(每次 10 min)。使用增强化学发光(ECL)液覆盖 PVDF 膜,用 Bio-Rad 凝胶成像系统成像,拍摄目的条带,Quantity One 软件进行半定量分析。分别以 AQP₄ 和 GFAP 和内参 β-肌动蛋白(β-actin)的积分吸光度(IA)值比值进行统计学分析。

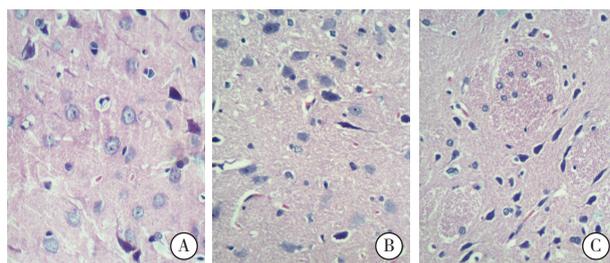
1.3.9 病理学观察:各组大鼠于制模 72 h 后断头处死,甲醛内固定后取出大脑,然后再用甲醛外固定,石蜡常规包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察各组大鼠脑损伤后的病理学变化。

1.4 统计学处理:使用 SPSS 17.0 统计软件。计量

资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用方差分析和 *q* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织病理学改变(图 1):假手术组脑皮质结构完整,未见脑组织结构破坏,HE 染色可见细胞大小形态一致,神经元细胞结构完好;模型组大鼠可见脑组织结构破坏,创面形成,神经元细胞减少,可见大量红细胞及少量胶质细胞;EGCG 组脑皮质结构破坏,创面愈合形成瘢痕灶,可见少许红细胞残留,胶质细胞数量减少及神经元细胞增加。



A: 假手术组; B: 模型组; C: EGCG 组

图 1 各组大鼠脑损伤后 72 h 脑组织病理学改变 (HE 染色 高倍放大)

2.2 脑组织含水量和脑血管通透性(表 1):模型组大鼠脑损伤后 24、48、72 h 脑组织含水量和脑血管通透性均进行性上升,于 72 h 达峰值,且显著高于假手术组;EGCG 组较模型组明显下降(均 $P<0.01$)。

2.3 脑组织 SOD 和 MDA 水平(表 1):模型组大鼠脑损伤后 24、48、72 h 脑组织 SOD 水平较假手术组同期显著下降,MDA 则显著升高(均 $P<0.01$);EGCG 组各时间点 SOD 较模型组同期显著上升,MDA 则显著降低(均 $P<0.01$)。

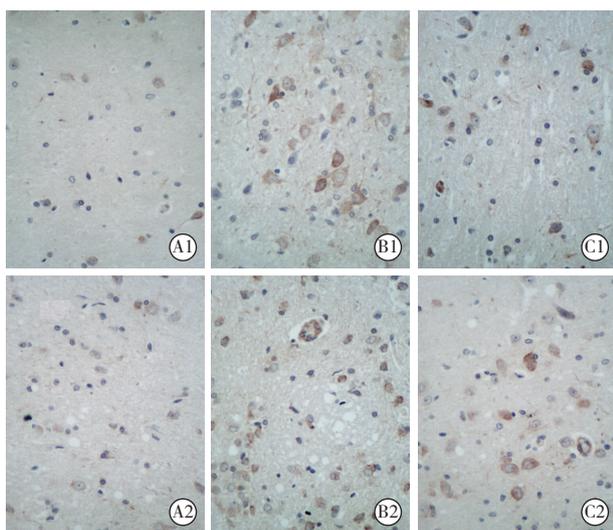
2.4 IHC 检测脑组织 AQP₄ 表达(表 1;图 2):假手术组脑组织中仅可见少量散在的 AQP₄ 阳性细胞。模型组制模后 24 h、72 h 脑组织中可见大量的 AQP₄ 阳性细胞存在且颜色较深;AQP₄ 阳性细胞表达评分明显高于假手术组(均 $P<0.01$)。EGCG 组较模型组 AQP₄ 阳性细胞数减少,且颜色稍浅;AQP₄ 阳性细胞表达评分明显低于模型组(均 $P<0.01$)。

2.5 IHC 检测脑组织 GFAP 表达(表 1;图 3):假手术组脑组织中可见少量 GFAP 阳性细胞。模型组制模后 24 h、72 h 脑组织中可见大量 GFAP 阳性细胞存在且颜色较深;GFAP 阳性细胞表达评分明显高于假手术组(均 $P<0.01$)。EGCG 组较模型组脑组织中 GFAP 阳性细胞数减少,且颜色稍浅;GFAP 阳性细胞表达评分明显低于模型组(均 $P<0.01$)。

表 1 各组大鼠制模后不同时间点脑组织含水量、EB、SOD、MDA、AQP₄、GFAP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

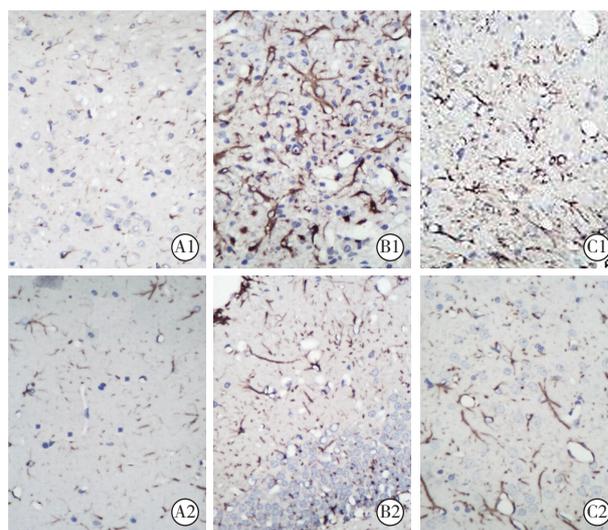
组别	制模后 时间	动物数 (只)	含水量 (%)	EB ($\mu\text{g/g}$)	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)	AQP ₄		GFAP	
							IHC 评分(分)	蛋白(IA 值)	IHC 评分(分)	蛋白(IA 值)
假手术组	24 h	7	78.25±0.81	2.71±0.69	131.30±11.37	4.34±0.81	2.81±0.73	0.43±0.04	3.17±0.62	0.63±0.04
	48 h	6	78.40±0.64	2.72±0.71	127.44±10.05	4.01±0.69	未检测	0.41±0.06	未检测	0.61±0.03
	72 h	7	78.34±0.87	2.71±0.72	130.85±9.91	4.57±0.74	2.76±0.82	0.42±0.05	3.21±0.53	0.62±0.04
模型组	24 h	30	85.31±1.26 ^a	5.69±0.67 ^a	74.21±12.45 ^a	9.45±1.51 ^a	6.58±1.32 ^a	1.36±0.07 ^a	7.83±1.61 ^a	1.37±0.06 ^a
	48 h	30	87.46±1.18 ^a	7.51±0.67 ^a	70.56±12.34 ^a	9.09±1.44 ^a	未检测	1.47±0.08 ^a	未检测	1.42±0.07 ^a
	72 h	30	89.71±0.94 ^a	9.13±0.66 ^a	63.53±12.57 ^a	10.19±1.47 ^a	8.81±1.75 ^a	1.53±0.05 ^a	9.47±1.32 ^a	1.45±0.05 ^a
EGCG 组	24 h	30	83.28±0.94 ^b	4.11±0.30 ^b	99.32±10.87 ^b	6.92±1.29 ^b	4.51±0.52 ^b	0.92±0.04 ^b	5.38±0.73 ^b	0.94±0.03 ^b
	48 h	30	84.57±0.91 ^b	6.13±0.29 ^b	110.49±11.45 ^b	6.44±1.41 ^b	未检测	1.06±0.07 ^b	未检测	1.16±0.04 ^b
	72 h	30	86.59±0.89 ^b	7.82±0.32 ^b	107.58±10.87 ^b	5.61±1.64 ^b	6.92±0.71 ^b	1.14±0.06 ^b	6.71±0.52 ^b	1.21±0.07 ^b

注：与假手术组同期比较，^a $P < 0.01$ ，与模型组同期比较，^b $P < 0.01$



A: 假手术组; B: 模型组; C: EGCG 组; 1 为 24 h; 2 为 72 h

图 2 各组大鼠脑损伤后 24 h、72 h 脑组织 AQP₄ 阳性细胞表达水平 (IHC 高倍放大)



A: 假手术组; B: 模型组; C: EGCG 组; 1 为 24 h; 2 为 72 h

图 3 各组大鼠脑损伤后 24 h、72 h 脑组织 GFAP 阳性细胞表达水平 (IHC 高倍放大)

2.6 Western Blot 检测脑细胞 AQP₄ 表达(表 1;图 4): 模型组脑组织 AQP₄ 表达量随时间延长呈上升趋势, 各时间点表达量与假手术组比较明显增加(均 $P < 0.01$)。EGCG 组各时间点脑组织 AQP₄ 表达量变化趋势与模型组相似, 但较模型组降低(均 $P < 0.01$)。

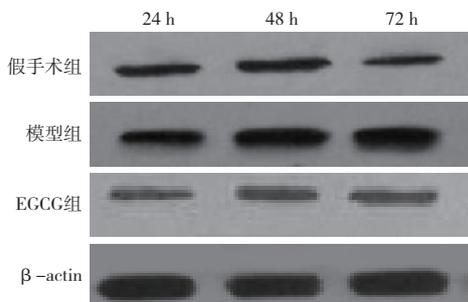


图 4 Western Blot 检测各组大鼠脑损伤后 24、48、72 h 脑组织 AQP₄ 表达水平

2.7 Western Blot 检测脑细胞 GFAP 表达(表 1;图 5): 模型组脑组织 GFAP 表达量随时间延长呈上升趋势, 各时间点表达量与假手术组比较明显增加(均 $P < 0.01$); EGCG 组各时间点 GFAP 表达量变化趋势与模型组相似, 但低于模型组(均 $P < 0.01$)。

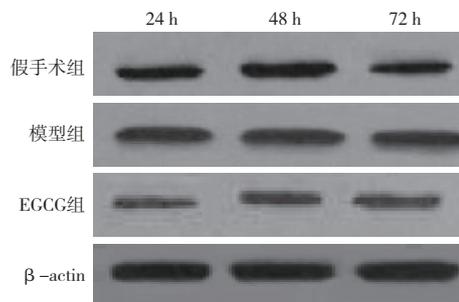


图 5 Western Blot 检测各组大鼠脑损伤后 24、48、72 h 脑组织 GFAP 表达水平

3 讨论

本研究采用经典的 Feeney 自由落体坠击伤大鼠模型,符合临床常见的加速性颅脑损伤,是研究创伤性脑水肿较理想的动物模型。

EGCG 是从绿茶中提取的主要活性成分,晚近多项研究提示,EGCG 能透过血脑屏障,减少氧自由基所致神经细胞损伤和细胞凋亡^[20-21],保护神经细胞,具有潜在治疗神经退行性疾病的价值^[22]。能增加外伤性脑损伤后大鼠的神经干细胞数目^[23],并可提高神经细胞存活率,具有神经保护作用^[24]。已有研究探讨了在大鼠大脑半球梗死和创伤性脊髓损伤模型中 EGCG (50~100 mg/kg) 拮抗脑和脊髓水肿的作用,并得到阳性结果^[25]。目前,国内外鲜有 EGCG 治疗创伤性脑水肿的基础研究,但上述研究结果提示,EGCG 对创伤性脑水肿具有潜在的防治作用,并为本研究提供了充分的理论依据。

本研究中 EGCG 组脑组织水含量较模型组显著降低,这与 Lee 等^[26]报道的 EGCG 可显著降低沙鼠脑梗死后脑水肿的结论是一致的。说明,EGCG 在脑损伤早期即可拮抗脑水肿,并且对脑水肿有长时间缓解作用。血管源性脑水肿主要表现为血脑屏障损伤和脑微循环障碍,毛细血管通透性增加,本研究中 EGCG 组大鼠脑血管通透性显著低于模型组大鼠,可能为 EGCG 在血管源性脑水肿中发挥作用的机制。脑外伤时氧自由基可直接损伤神经细胞,导致膜磷脂和蛋白质的过氧化反应并损伤 DNA,亦可引发脂质过氧化反应,与脑外伤后的“二次损伤”过程密切相关。MDA 作为生物体内自由基作用于脂质发生过氧化反应的氧化终产物,能引起蛋白质、核酸等生命大分子交联聚合,且具有细胞毒性;而 SOD 作为自由基清除剂,是一种有效的神经保护物质。本研究显示,EGCG 组大鼠脑组织 SOD 活性显著高于模型组,而 MDA 水平显著低于模型组,考虑 EGCG 可通过增加自由基清除而减轻继发的神经细胞损伤,发挥脑组织保护作用。

AQP₄ 是水通道蛋白家族中的一员,在神经系统有广泛表达,与脑水肿的形成密切相关^[6, 27-28]。GFAP 具有维持星形细胞形态和功能、调节细胞代谢和形成、维护血脑屏障、产生和释放神经营养因子等的作用,血清中浓度上升水平与创伤性脑损伤严重程度呈正相关^[29-30]。有研究应用共聚焦显微镜进行双重标记检测,可见 AQP₄ 与 GFAP 共同存在^[31-33]。本研究中免疫组化法和 Western Blot 均显示模型组大鼠脑组织在脑损伤后 24~72 h AQP₄ 表

达显著上升,而经 EGCG 处理后可显著降低其表达,提示 TBI 后 EGCG 的抗水肿作用机制之一可能与降低 AQP₄ 表达水平有关。中枢神经系统损伤后可有细胞水肿,且星形胶质细胞的水肿较之神经元更为严重^[34-36]。EGCG 下调 AQP₄ 表达水平对减轻 TBI 大鼠的脑水肿非常有益。GFAP 是星形胶质细胞的特异标志物。对于 TBI 患者,脑水肿对创伤区域脑组织及因脑水肿而受压的周边脑组织具有严重影响,虽然相关治疗方法的研究有很多^[37-39],但 EGCG 对创伤性脑水肿治疗效果的研究较少。本研究显示,EGCG 可显著减低 TBI 后 24~72 h 脑组织 GFAP 蛋白表达水平,可能对消除 TBI 后星形胶质细胞肿胀有益。此外病理组织切片显示,EGCG 可促进创面愈合与红细胞的吸收,减少胶质细胞数量,增加神经元细胞数量。

综上所述,本研究显示 EGCG 组较模型组脑组织 AQP₄ 和 GFAP 表达下降,SOD 水平上升,MDA 水平下降,血管通透性下降,脑组织水含量减少。考虑 EGCG 通过下调脑组织 AQP₄ 蛋白表达水平,减轻 TBI 后细胞毒性脑水肿;通过维持 SOD 水平、减低 MDA 水平,增强 TBI 后脑组织氧自由基的清除,降低二次损伤程度,保护脑组织,降低脑血管通透性,减轻 TBI 后血管源性脑水肿;此外,EGCG 还可能通过下调 GFAP 蛋白水平而消除 TBI 后星形胶质细胞肿胀。

参考文献

- [1] Kelly JF, Ritenour AE, McLaughlin DF, et al. Injury severity and causes of death from Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom: 2003-2004 versus 2006 [J]. J Trauma, 2008, 64 (2 Suppl): S21-S27.
- [2] 潘仁龙. 亚低温在重型颅脑损伤患者中的应用[J]. 中华危重病急救医学, 2004, 16(11): 650-650.
- [3] 张丽娜, 关宏, 佟建洲, 等. 中重度颅脑损伤患者脑脊液中可溶性神经趋化蛋白含量的变化及临床意义[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19(3): 162-164.
- [4] 令狐海瑞, 程世翔, 涂悦, 等. 亚低温干预对颅脑创伤大鼠 β -淀粉样蛋白前体蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(2): 75-78.
- [5] Cohadon F, Richer E, Castel JP. Head injuries: incidence and outcome [J]. J Neurol Sci, 1991, 103 Suppl: S27-31.
- [6] Papadopoulos MC, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin water channels and brain edema [J]. Mt Sinai J Med, 2002, 69(4): 242-248.
- [7] Moe SE, Sorbo JG, Sogaard R, et al. New isoforms of rat Aquaporin-4 [J]. Genomics, 2008, 91(4): 367-377.
- [8] 隆云, 刘大为. 严重脑损伤的颅内压、脑血流监测及目标性治疗[J]. 中华危重病急救医学, 1998, 10(4): 246-248.
- [9] 钟兴明, 郑惠民. 急性颅内高压患者颅内压反跳因素的探讨[J]. 中华危重病急救医学, 1997, 9(6): 340-341.
- [10] 陈义, 汪小钢, 宛晓春. 没食子儿茶素没食子酸酯制备新工艺的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(3): 364-368.
- [11] 毛小强, 那万里, 赵丹, 等. 茶多酚对前列腺癌 PC-3M 细胞增

- 殖与凋亡的影响[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(2): 170-173.
- [12] 傅颖, 梅松, 陈建国, 等. 茶多酚对高脂大鼠体重及血清中脂代谢水平的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(11): 2506-2508.
- [13] 陈悦, 刘秋慧. 茶多酚对豚鼠心肌细胞钙电流及动作电位的影响[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(3): 190-192.
- [14] Romeiro RR, Romano-Silva MA, De Marco L, et al. Can variation in aquaporin 4 gene be associated with different outcomes in traumatic brain edema? [J]. Neurosci Lett, 2007, 426(2): 133-134.
- [15] Sorani MD, Zador Z, Hurowitz E, et al. Novel variants in human Aquaporin-4 reduce cellular water permeability [J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(15): 2379-2389.
- [16] Venero JL, Vizuete ML, Machado A, et al. Aquaporins in the central nervous system [J]. Prog Neurobiol, 2001, 63(3): 321-336.
- [17] Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke [J]. Nat Med, 2000, 6(2): 159-163.
- [18] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat [J]. Brain Res, 1981, 211(1): 67-77.
- [19] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. Cancer, 2000, 89(12): 2637-2645.
- [20] Hou RR, Chen JZ, Chen H, et al. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on paraquat-induced apoptosis in PC12 cells [J]. Cell Biol Int, 2008, 32(1): 22-30.
- [21] Kim JS, Kim JM, O JJ, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression and cell death by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a green tea catechin, in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease [J]. J Clin Neurosci, 2010, 17(9): 1165-1168.
- [22] Hugel HM, Jackson N. Redox chemistry of green tea polyphenols: therapeutic benefits in neurodegenerative diseases [J]. Mini Rev Med Chem, 2012, 12(5): 380-387.
- [23] Itoh T, Imano M, Nishida S, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases the number of neural stem cells around the damaged area after rat traumatic brain injury [J]. J Neural Transm, 2012, 119(8): 877-890.
- [24] Cho HS, Kim S, Lee SY, et al. Protective effect of the green tea component, L-theanine on environmental toxins-induced neuronal cell death [J]. Neurotoxicology, 2008, 29(4): 656-662.
- [25] Lee SY, Kim CY, Lee JJ, et al. Effects of delayed administration of (-)-epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol on the changes in polyamine levels and neuronal damage after transient forebrain ischemia in gerbils [J]. Brain Res Bull, 2003, 61(4): 399-406.
- [26] Lee H, Bae JH, Lee SR. Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils [J]. J Neurosci Res, 2004, 77(6): 892-900.
- [27] 李慧, 陈圣刚, 陈吉相. 地塞米松对大鼠脑水通道蛋白 4 表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2007, 19(6): 369-370.
- [28] 陈俊, 陈寿权, 李章平, 等. 七叶皂苷对心肺复苏后大鼠脑水肿期水通道蛋白 4 mRNA 变化的作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(4): 245-249.
- [29] Zoltewicz JS, Scharf D, Yang B, et al. Characterization of Antibodies that Detect Human GFAP after Traumatic Brain Injury [J]. Biomark Insights, 2012, 7: 71-79.
- [30] Gwak YS, Kang J, Unabia GC, et al. Spatial and temporal activation of spinal glial cells: role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats [J]. Exp Neurol, 2012, 234(2): 362-372.
- [31] Hsu MS, Seldin M, Lee DJ, et al. Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus [J]. Neuroscience, 2011, 178: 21-32.
- [32] 郭富强, 徐玉川, 陈隆益, 等. 脑出血患者血肿周围组织水通道蛋白-4 表达与脑水肿及病理超微结构变化的关系[J]. 中华危重病急救医学, 2008, 20(11): 674-677.
- [33] 周保纯, 刘励军, 郭梅凤, 等. 亚低温对心搏骤停大鼠大脑皮质水通道蛋白 4 基因表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2010, 22(2): 113-114.
- [34] Oshio K, Binder DK, Yang B, et al. Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord [J]. Neuroscience, 2004, 127(3): 685-693.
- [35] 杨细平, 涂悦, 张赛, 等. 七叶皂苷钠对重型颅脑创伤患者脑脊液肿瘤坏死因子- α 及白介素-6 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18(6): 329-332.
- [36] Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, et al. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling [J]. Neurosurg Focus, 2007, 22(5): E2.
- [37] 李春阳, 李林, 魏海峰, 等. 局灶性脑缺血大鼠血瘀证相关指标和脑损伤病理生理的动态变化[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(5): 259-263.
- [38] Tourdias T, Mori N, Dragonu I, et al. Differential aquaporin 4 expression during edema build-up and resolution phases of brain inflammation [J]. J Neuroinflammation, 2011, 8: 143.
- [39] 高剑峰, 朱长连, 李建生. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血/再灌注海马内源性神经干细胞增殖分化的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(1): 26-29.

(收稿日期: 2015-03-30)
(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对图表的要求

作者投稿时,原稿中若有图表,每幅图表应紧随文字叙述之后排。每幅图表应冠有准确的图表题。说明性的文字应置于图表下方注释中,并在注释中标明图表中使用的全部非公知公用的缩写。图不宜过大,最大宽度半栏图不超过 7.5 cm,通栏图不超过 16.5 cm,高宽比例以 5:7 为宜。以计算机制图者应提供原始图片(eps、spv、pdf 格式)。照片图要求有良好的清晰度和对比度;图中需标注的符号(包括箭头)请用另纸标上,不要直接写在照片上。每幅图的背面应贴上标签,注明图号、方向及作者姓名。若刊用人像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能被辨认出系何人的部分。大体标本照片在图内应有尺度标记。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。森林图另附 word 文档,重点标目词宜用中文表述。若使用其他刊物的原图表,应注明出处,并附版权所有同意使用该图表的书面材料。

表格建议采用三横线表(顶线、表头线、底线),如遇有合计和统计学处理内容(如 t 值、 P 值等),则在此行上面加一条分界横线;表内数据要求同一指标保留的小数位数相同,一般比可准确测量的精度多一位。