

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

令狐海瑞¹, 程世翔², 涂悦², 孙洪涛², 徐忠伟³, 魏向阳¹, 张赛²

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 武警部队脑创伤与神经疾病研究所, 武警后勤学院附属医院脑系科中心, 天津 300162; 3. 武警后勤学院细胞生物学教研室, 天津 300162)

【摘要】 目的 观察颅脑创伤(TBI)大鼠脑海马组织 β -淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的表达以及亚低温干预对 APP 表达的影响。**方法** 30 只 Wistar 大鼠按随机数字表法分为对照组、TBI 常温组[(37.0±0.5)℃]和 TBI 亚低温组[(32.0±0.5)℃], 每组 10 只。用液压冲击致伤法建立中度 TBI 动物模型, 常温或亚低温干预 6 h 后, 观察大鼠神经功能行为学变化, 苏木素-伊红(HE)染色观察海马组织病理学改变, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测海马区 APP mRNA 表达, 组织免疫荧光和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 APP、 β -淀粉样蛋白(A β)蛋白表达。**结果** 与对照组比较, TBI 常温组神经功能行为评分(分)明显降低(26.08±1.23 比 35.00±0.00), 脑海马组织存活神经元数量减少, APP 阳性神经元数量明显增加, APP mRNA 及相关蛋白表达均明显升高(APP mRNA: 1.491±0.122 比 0.711±0.082, APP 蛋白: 1.782±0.034 比 0.763±0.023, A β 蛋白: 1.321±0.240 比 0.092±0.002, 均 $P<0.05$)。与 TBI 常温组比较, TBI 亚低温干预能显著提高大鼠 TBI 后神经功能行为评分(32.29±1.31 比 26.08±1.23), 增加脑海马区存活神经元数量, 减少 APP 阳性神经元细胞数, APP mRNA 及其相关蛋白表达均显著降低(APP mRNA: 0.733±0.084 比 1.491±0.122, APP 蛋白: 0.653±0.026 比 1.782±0.034, A β 蛋白: 0.123±0.003 比 1.321±0.240, 均 $P<0.05$)。**结论** 大鼠 TBI 后的 APP 蓄积可能是发生继发性脑损伤(SBI)的机制之一, 亚低温可通过减少 APP 的生成来减轻 SBI 的程度, 起到神经保护作用。

【关键词】 颅脑创伤; β -淀粉样蛋白前体蛋白; 亚低温; 神经保护

The effects of mild hypothermia on expression of β -amyloid protein precursor in hippocampus of rats after traumatic brain injury LINGHU Hai-ru^{*}, CHENG Shi-xiang, TU Yue, SUN Hong-tao, XU Zhong-wei, WEI Xiang-yang, ZHANG Sai. *Tianjin Medical University Graduate School, Tianjin 300070, China

Corresponding author: ZHANG Sai, Institute of Traumatic Brain Injury and Nervous Diseases of Chinese People's Armed Police Forces; Department of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China, Email: zhangsai718@yahoo.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of mild hypothermia on expression of β -amyloid protein precursor (APP) in hippocampus of rats following traumatic brain injury (TBI). **Methods** Thirty Wistar rats were randomly divided into three groups: control group without TBI but with normothermia, TBI with normothermia [(37.0±0.5)℃] group and TBI with mild hypothermia [(32.0±0.5)℃] group (each $n=10$), the thermal treatment being for 6 hours in the three groups respectively. The TBI rat model was established by a fluid percussion device. The behavior scales of nerve function were estimated, then rats were sacrificed and the brain hippocampus tissues were prepared for hematoxylin and eosin (HE) staining to observe the changes of histopathology. The level of APP mRNA in the hippocampus was examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and protein expressions of APP and β -amyloid protein (A β) were analyzed by immunofluorescence and Western blotting, respectively. **Results** Compared with controls, the neural function behavior score was reduced significantly (26.08±1.23 vs. 35.00±0.00, $P<0.05$), the number of survival neurons of hippocampus was decreased, the number of positive neurons of APP was increased, and APP mRNA and related protein of APP also increased obviously in the TBI normothermia group (APP mRNA: 1.491±0.122 vs. 0.711±0.082, and APP protein: 1.782±0.034 vs. 0.763±0.023, A β protein: 1.321±0.240 vs. 0.092±0.002, all $P<0.05$). Compared with the TBI normothermia group, the neural function behavior score was improved significantly (32.29±1.31 vs. 26.08±1.23), the number of survival neurons of hippocampus was increased, and the number of positive neurons of APP, the expressions of APP mRNA and A β were decreased significantly in the TBI group treated with mild hypothermia (APP mRNA: 0.733±0.084 vs. 1.491±0.122, APP protein: 0.653±0.026 vs. 1.782±0.034, A β protein: 0.123±0.003 vs. 1.321±0.240, all $P<0.05$). **Conclusion** The accumulation of APP might be one of the factors which induce secondary brain damage, and mild hypothermia treatment, which plays a neural protective role, might reduce the formation of APP to ease secondary brain injury after TBI in rats.

【Key words】 Traumatic brain injury; β -amyloid protein precursor; Mild hypothermia; Neural protection

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.02.005

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30872668); 武警后勤学院科研项目(WYZ201002, WYM201119)

通信作者: 张赛, Email: zhangsai718@yahoo.com

颅脑创伤 (TBI) 后的继发性脑损伤 (SBI) 可引起多种损伤因子的生成和释放, 进而导致脑细胞损害, 破坏血脑屏障以及诱发和加重脑水肿。近年来的相关研究证实, β -淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 作为一种继发性脑损伤因子, 在 TBI 后 SBI 的病理进程中发挥着重要作用, 其在 TBI 后的高表达状态与伤情严重程度、伤后认知功能障碍和中枢神经系统的病理生理改变密切相关^[1]。同时, APP 作为急性脑损伤特异性血清标志物, 通过检测其表达水平, 可以早期判断伤情变化。本实验通过观察 TBI 及亚低温干预后大鼠脑海马组织中 APP 的表达变化, 探讨 TBI 致病机制及亚低温的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: 30 只健康雄性 Wistar 大鼠由军事医学科学院实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK-(军) 2007-004, 体质量 300~315 g, 按随机数字表法分为对照组、TBI 常温组和 TBI 亚低温组, 每组 10 只, 其中对照组除不给予 TBI 外, 余处理过程同 TBI 常温组。

1.2 中度 TBI 模型的建立: 腹腔注射 10% 水合氯醛 (3 ml/kg) 麻醉大鼠, 将头部固定于立体定向仪上, 自双眼连线后 0.5 cm 沿头部正中中线处切开头皮约 2.5 cm, 于大鼠前囟后 3 mm, 矢状缝右旁开 2 mm 处钻孔, 打开 4 mm² 的圆形骨窗, 操作中避免损伤硬脑膜。将自制打击管用增强型牙科磷酸锌水门汀严密固定在骨窗边缘, 待大鼠清醒后采用液压冲击致伤装置以 $(1.9 \sim 2.0) \times 10^2$ kPa 的压力打击大鼠大脑建立中度 TBI 模型, 作用时间 21~23 ms。对损伤后呼吸、心搏骤停的动物用小动物呼吸机辅助呼吸及胸外按压, 待生命体征平稳后缝合头皮。

本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 亚低温处理及动物行为学观察: 在生命体征平稳后, TBI 亚低温组大鼠即可给予乙醇擦浴和冰袋降温, 在伤后 10~15 min 内将肛温降至 (32.0 ± 0.5) °C, 维持 6 h 后即进行自然复温 (必要时使用温毯辅助), 在 45~60 min 内将温度恢复至 (37.0 ± 0.5) °C; TBI 常温组大鼠的肛温始终维持于 (37.0 ± 0.5) °C。参考 Faden 等^[2] 方法对 TBI 大鼠进行神经功能行为评分, 评分包括 3 项, 每项 0~5 分 (重伤~正常), 正常记为 35 分。行为学观察完成后处死大鼠, 从中随机选部分大鼠取伤侧海马组织, 生理盐水清洗后置于 -80 °C 冰箱保存备用; 选部分大鼠取全脑组织, 迅速浸泡于 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋后, 再于海马包埋

平面处行连续切片 (片厚 4 μ m)。

1.4 苏木素-伊红 (HE) 染色观察海马组织病理学改变: 二甲苯浸泡切片脱蜡 50 min 后依次梯度乙醇水化, 用苏木素染料溶液染细胞核 30 min, 流水冲洗 1 min 后, 用伊红溶液染细胞质 30 min, 再用氨水乙醇溶液返蓝 1 min。流水冲洗 1 min 后, 梯度乙醇脱水, 二甲苯溶液透明 5 min, 封片。独立实验 3 次后显微镜下观察。

1.5 免疫荧光染色检测阳性神经元数量: 组织切片浸泡于二甲苯中脱蜡 50 min, 依次梯度乙醇水化, 95 °C 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液温波修复 10 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 3 次, 用 2% 兔血清封片。加兔抗大鼠 APP 一抗 (1:50, 美国 Epitomics 公司), 4 °C 过夜。PBS 冲洗 3 次后用 4', 6- 联苯 -2- 苯基吲哚二盐酸盐 (DAPI) 37 °C 避光染色 20 min, 随即用罗丹明标记山羊抗兔二抗 (1:50) 37 °C 避光染色 20 min。PBS 冲洗 3 次后加抗淬灭剂封片。荧光显微镜下观察, Image Pro Plus 6.0 软件分析结果。

1.6 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测海马组织 APP mRNA 表达: 采用 TRIzol 法提取组织总 RNA, 逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增。APP 上游引物: 5'-GTGCGCATGGTGGACCCCAA-3', 下游引物: 5'-CCCAGACCCTGGTTCGAGTGGT-3', 产物扩增大小 429 bp; β -肌动蛋白 (β -actin) 上游引物: 5'-ATGGTCTACATGTTCCAGTA-3', 下游引物: 5'-TCAGATCCACAACGGATACA-3', 产物扩增大小 540 bp。反应体系为 25 μ l (上游引物 1 μ l, 下游引物 1 μ l, cDNA 1 μ l, 2 \times Taq 酶 12.5 μ l, 去离子水 9.5 μ l), 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环。将产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 重复 3 次, 用凝胶成像分析系统对条带扫描进行分析, 计算 APP 产物条带平均吸光度 (A) 值, 以 β -actin 为内参, 计算 APP mRNA 相对含量。

1.7 蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 检测 APP 及 β -淀粉样蛋白 (A β) 蛋白表达: 100 mg 组织样本加入 1 ml 2 \times 十二烷基硫酸钠 (SDS) 缓冲液 [1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液 (Tris-HCl), 1% SDS, 50% 丙三醇, pH 值 6.8] 裂解组织, 冰上研磨后置于 4 °C 裂解 30 min, 离心 25 min, 用蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物公司提供) 定量蛋白。95 °C 变性 5 min 后取 85 μ g 蛋白样品在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 中进行电泳, 将胶上的蛋白质带转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上 (转

移条件: 300 mA, 1 h, 0.2 μm), 用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h。分别加入兔抗大鼠一抗 APP (1:50)、Aβ(1:500) 和 β-actin (1:2000, 英国 Abcam 公司), 4℃孵育过夜。采用含吐温 20

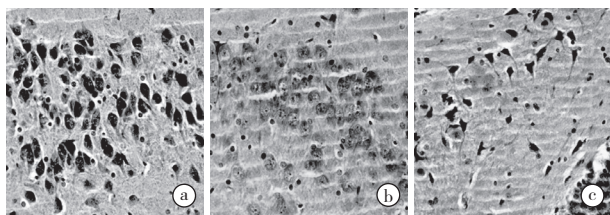
的 Tris-HCl 缓冲溶液 (PBST) 洗膜 3 次后用羊抗兔二抗 (1:2000, 美国 KLP 公司) 孵育 2 h, PBST 缓冲液洗膜 4 次。滴加荧光显影液, 暗室压片、曝光、显影、定影, 独立实验重复 3 次, Bandscan 5.0 软件分析, 结果用灰度值比值表示。

1.8 统计学处理: 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠神经功能行为评分 (表 1): 与对照组比较, TBI 常温组神经功能行为评分显著下降 ($P < 0.05$); TBI 亚低温组神经功能行为评分则高于 TBI 常温组 ($P < 0.05$), 但仍低于对照组 ($P > 0.05$)。

2.2 HE 染色观察大鼠神经细胞形态变化 (图 1): 对照组神经细胞形态结构正常。TBI 常温组部分神经元肿胀、变性、坏死, 呈空泡样变, 伴有明显核固缩、核碎裂, 存活神经元数量减少。TBI 亚低温组神经细胞结构清晰, 神经元胞体收缩呈三角形, 核染嗜酸性增强, 并伴有突触形成。



(a): 对照组; (b): TBI 常温组; (c): TBI 亚低温组

图 1 光镜下观察各组大鼠神经元形态 (HE, 中倍放大)

2.3 免疫荧光染色检测 APP 表达变化: 对照组细胞染色清晰, 胞膜未见 APP 沉积; TBI 常温组残存正常细胞少, 细胞形态改变, 且胞膜有明显的 APP 沉积; TBI 亚低温组正常细胞减少, 胞膜 APP 沉积明显减少。与对照组比较, TBI 常温组 APP 阳性神经元数量显著增加。TBI 亚低温组 APP 阳性细胞数量与对照组比较变化不明显, 但与 TBI 常温组比较则显著减少。

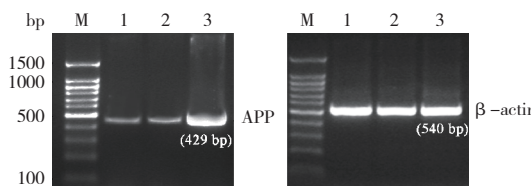
2.4 RT-PCR 检测 APP mRNA 表达 (表 1; 图 2): TBI 常温组 APP mRNA 表达较对照组显著升高 ($P <$

表 1 亚低温对 TBI 大鼠神经功能行为评分、APP mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	行为评分 (分)	APP mRNA	APP 蛋白	Aβ 蛋白
对照组	10	35.00 ± 0.00	0.711 ± 0.082	0.763 ± 0.023	0.092 ± 0.002
TBI 常温组	10	26.08 ± 1.23 ^a	1.491 ± 0.122 ^a	1.782 ± 0.034 ^a	1.321 ± 0.240 ^a
TBI 亚低温组	10	32.29 ± 1.31 ^b	0.733 ± 0.084 ^b	0.653 ± 0.026 ^b	0.123 ± 0.003 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 TBI 常温组比较, ^b $P < 0.05$

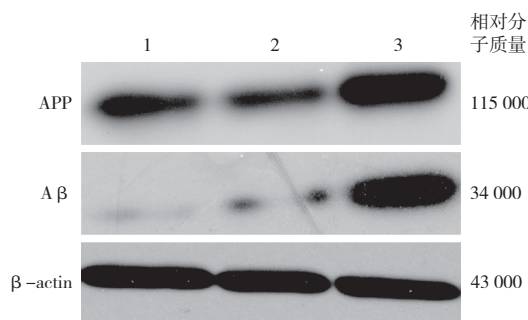
0.05); 而给予亚低温处理后, 其表达量较 TBI 常温组显著降低 ($P < 0.05$), 且与对照组比较变化不明显 ($P > 0.05$)。



M: DNA Marker; 1: 对照组; 2: TBI 亚低温组; 3: TBI 常温组

图 2 RT-PCR 检测各组大鼠脑组织 APP mRNA 表达

2.5 Western blotting 检测 APP、Aβ 蛋白表达 (表 1; 图 3): 与对照组比较, TBI 常温组 APP 和 Aβ 蛋白表达明显升高 (均 $P < 0.05$)。TBI 亚低温组 APP 和 Aβ 蛋白表达与对照组比较变化不明显, 但均较 TBI 常温组显著降低 (均 $P < 0.05$)。



1: 对照组; 2: TBI 亚低温组; 3: TBI 常温组

图 3 Western blotting 检测各组大鼠脑海马组织 APP 和 Aβ 蛋白表达

3 讨论

研究表明 APP 与阿尔茨海默病 (AD) 的发生密切相关, 其病理状态下的酶切产物 Aβ 是 AD 主要病理改变老年斑 (SP) 的主要成分, 具有神经毒作用的 Aβ 在 AD 发病过程中可以随着 APP 表达上调而增多^[3-4]。近年来的研究显示, Aβ 作为神经毒性物质在 TBI 后随 APP 增多也呈现高表达^[1,5], 相关实验也证实了 TBI 与 AD 发生呈明显正相关^[5], 就此提示 TBI 后 APP 的蓄积与由此导致的 Aβ 高表达共同加重了 SBI, 本实验也予以进一步的证实。

APP 是一种具有受体样结构的大分子跨膜糖蛋白,由高尔基体产生并由轴突的快速轴浆运输通道运输^[6-7]。TBI 后可导致神经元、胶质细胞损伤,轴索扭曲、肿胀、断裂,细胞骨架崩解,轴浆外溢聚集,血脑屏障破坏或功能障碍,此特殊病理结构被认为是 APP 在 TBI 后大量积聚的重要原因,并与损伤程度呈明显正相关^[8-9]。本实验中 TBI 大鼠脑组织 APP 呈现高表达可进一步证实此结论。TBI 后 APP 蓄积对脑神经功能的损伤主要表现为:① APP 在病理状态下可以经过 β 和 γ 分泌酶水解后形成大量具有神经毒作用的 $A\beta$ (1-42) 和 $A\beta$ (1-40),发挥主要致病性的是 $A\beta$ (1-42)^[10-11]。APP 在神经细胞外聚集后可促进神经细胞骨架改变进而导致细胞直接损伤,也可增强或放大各种伤害性刺激如低糖、兴奋性毒性、氧化应激、细胞内钙失衡、炎症反应等间接细胞损害效应^[12-13]。② TBI 后所引起的炎症反应可使神经元细胞损伤加重,神经细胞损伤后 APP 蓄积增多,病理状态下 APP 高表达本身就具有促神经细胞凋亡和损伤的作用^[14-15]。各种因素的共同作用导致恶性循环的形成,从而使 APP 进一步增加,同时 APP 的损害性作用放大,神经功能损伤加剧。

本实验进一步探讨了亚低温干预所起到的脑保护作用。亚低温的脑保护机制主要包括:降低氧耗进而减少脑内乳酸蓄积^[16-17],抑制内源性毒性产物的损伤作用,影响跨膜离子通道从而抑制 Ca^{2+} 内流,减少神经细胞结构蛋白破坏以促进神经细胞结构和功能修复,抑制脑损伤和缺血缺氧后的炎症反应等^[18-19]。TBI 后的亚低温治疗是针对病理状态下 APP 的异常代谢、运输途径和由此引发的级联反应进行干预。本实验的组织免疫荧光染色、RT-PCR 及 Western blotting 结果均证实,给予亚低温干预后,TBI 大鼠的 APP 表达明显降低,通过有效降低 TBI 后 APP 的高表达,继而减轻由脑创伤后 $A\beta$ 高表达所造成的 SBI。

综上,TBI 后能造成大鼠 APP 高表达,亚低温治疗可降低 APP 高表达状态,进而减少大鼠脑创伤后 $A\beta$ 的生成,减少 SBI。后续研究将进一步证实亚低温与 β -分泌酶和脑损伤之间的关系。

参考文献

[1] Chen XH, Siman R, Iwata A, et al. Long-term accumulation of amyloid-beta, beta-secretase, presenilin-1, and caspase-3 in damaged axons following brain trauma. *Am J Pathol*, 2004, 165 (2): 357-371.

- [2] Faden AI, Demediuk P, Panter SS, et al. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*, 1989, 244 (4906): 798-800.
- [3] Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, et al. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 2002, 59 (9): 1381-1389.
- [4] Holsinger RM, Mclean CA, Beyreuther K, et al. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 2002, 51 (6): 783-786.
- [5] Blasko I, Beer R, Bigl M, et al. Experimental traumatic brain injury in rats stimulates the expression, production and activity of Alzheimer's disease beta-secretase (BACE-1). *J Neural Transm*, 2004, 111 (4): 523-536.
- [6] Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. *Acta Neuropathol*, 1994, 87 (1): 55-62.
- [7] Blumbergs PC, Scott G, Manavis J, et al. Staining of amyloid precursor protein to study axonal damage in mild head injury. *Lancet*, 1994, 344 (8929): 1055-1056.
- [8] Leclercq PD, Stephenson MS, Murray LS, et al. Simple morphometry of axonal swellings cannot be used in isolation for dating lesions after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 2002, 19 (10): 1183-1192.
- [9] Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, et al. Ultrastructural localization of amyloid protein precursor in the normal and postischemic gerbil brain. *Brain Res*, 1995, 672 (1-2): 187-195.
- [10] Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*, 2006, 13 (3): 385-392.
- [11] Gasparini L, Ongini E, Wilcock D, et al. Activity of flurbiprofen and chemically related anti-inflammatory drugs in models of Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 48 (2): 400-408.
- [12] Fernández A, Llacuna L, Fernández-Checa JC, et al. Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity. *J Neurosci*, 2009, 29 (20): 6394-6405.
- [13] Abramov AY, Canevari L, Duchon MR. Changes in intracellular Calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J Neurosci*, 2003, 23 (12): 5088-5095.
- [14] Niwa K, Kazama K, Younkin SG, et al. Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiol Dis*, 2002, 9 (1): 61-68.
- [15] Kienlen-Campard P, Tasiaux B, Octave JN. The processing and biological function of the human amyloid precursor protein (APP): lessons from different cellular models. *Exp Gerontol*, 2000, 35 (6-7): 843-850.
- [16] 王国兴,谢苗荣,刘凤奎,等.亚低温治疗在脑复苏中的应用及影响预后因素分析. *中国危重病急救医学*, 2010, 22 (10): 602-605.
- [17] 王永谦,王维平,张健生,等.亚低温治疗对急性重型颅脑损伤患者局部脑氧饱和度及脑脊液乳酸的影响. *中国危重病急救医学*, 2002, 14 (3): 160-162.
- [18] Truettner JS, Suzuki T, Dietrich WD. The effect of therapeutic hypothermia on the expression of inflammatory response genes following moderate traumatic brain injury in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 138 (2): 124-134.
- [19] 王卫民,姜启周,程军,等.选择性脑亚低温治疗重型颅脑损伤疗效的研究. *中国危重病急救医学*, 2002, 14 (1): 35-37.

(收稿日期:2012-09-30)

(本文编辑:李银平)