

• 论著 •

地塞米松对脑损伤大鼠核转录因子-κB 水平的影响

杜晓冬 李国平 叶磊 刘鹏 曹钰

【摘要】 目的 探讨地塞米松对大鼠重度创伤性颅脑损伤(TBI)后脑组织中核转录因子-κB(NF-κB)的影响。方法 将 Wistar 大鼠随机分为 TBI 组和地塞米松治疗组,采用气体冲击致大鼠重度 TBI 模型。各组于术后 0、6、24、72、120 h 取 5 只大鼠活杀,取脑组织,苏木素-伊红(HE)染色观察脑组织病理学变化。免疫组化检测脑组织中 NF-κB 水平。结果 TBI 后 6 h 大鼠脑组织中 NF-κB 表达即显著升高($P < 0.05$),于伤后 24 h 达峰值($P < 0.01$),之后有所回降,至 120 h 仍维持较高水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。经地塞米松治疗后 6、24、72 h 脑组织中 NF-κB 显著低于 TBI 组(P 均 < 0.01)。结论 大鼠 TBI 后早期脑组织中 NF-κB 即反应性升高,并维持较高水平,引起炎症级联反应,导致 TBI 后继发性损伤。地塞米松可抑制 NF-κB,减轻紊乱的炎症细胞因子所致的继发性损伤,起到治疗与保护作用。

【关键词】 脑创伤; 地塞米松; 炎症反应; 核转录因子-κB

Experimental investigation on protective effect of dexamethasone therapy to traumatic brain injury in rats
DU Xiao-dong, LI Guo-ping, YE Lei, LIU Peng, CAO Yu. Department of Emergency, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China
Corresponding author: CAO Yu

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of dexamethasone on nuclear factor-κB (NF-κB) expression in brain tissue after traumatic brain injury (TBI). **Methods** Forty rats were randomly divided into two groups: dexamethasone treatment and no treatment, and severe brain injury was produced by gas percussion in both groups. At 0, 6, 24, 72 and 120 hours after injury, 5 rats of each group were executed and the histopathological changes in brain tissue in rats were observed by hematoxylin-eosin (HE) stain. The expression of NF-κB in brain tissue of rats was detected by immunohistochemical method. **Results** NF-κB expression was significantly up-regulated at 6 hours in brain tissue of rats after TBI ($P < 0.05$), reaching the highest level at 24 hours ($P < 0.01$). It showed a tendency to lower, but was still high at 120 hours after TBI ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After treatment with dexamethasone, NF-κB level was lowered at 6, 24 and 72 hours (all $P < 0.01$). **Conclusion** NF-κB expression is up-regulated in brain tissue in early period after TBI, and keeps on a high level, thus inducing inflammatory response to produce secondary injury to brain tissue. Dexamethasone shows protective effects by regulating the levels of NF-κB and prevents secondary injury which is caused by the inflammatory cytokines in rat brain tissue after TBI.

【Key words】 traumatic brain injury; dexamethasone; inflammatory response; nuclear factor-κB

重度创伤性颅脑损伤(TBI)有较高致残率和病死率,近年来随着急救意识不断增强,急救技术的进步及各种先进监护设备的应用,脑创伤病死率有所下降,但重度 TBI 后的继发性脑损伤仍是致残和死亡的重要原因。炎症反应在继发性脑损伤中发挥重要作用。研究证实,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。本实验拟通过检测大鼠重度 TBI 后脑组织中核转录因子-κB(NF-κB)水平,及使用地塞米松后其水平的变化,了解地塞米松在 TBI 中的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 主要设备及试剂:小型多功能生物撞击机、倒

置显微镜(NIKON,日本);NF-κB P65 兔抗鼠多克隆抗体、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色剂试剂盒、即用型链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)免疫组化试剂盒、柠檬酸抗原修复液(0.01 mol/L)、pH 值 6.0 的磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L)、Poly-L-Lysine(10×)多聚赖氨酸均由武汉博士德生物工程有限公司提供;地塞米松针剂(5 g/L,湖北天药业)。

1.2 实验动物及分组:健康 Wistar 大鼠,雌雄不限,体重 220~250 g,由四川大学华西医学中心动物实验中心提供。按随机数字表法将大鼠分为 TBI 组和地塞米松治疗组两组,每组又分为 0、6、24、72、120 h 时间点,每亚组 5 只。

1.3 大鼠重度 TBI 模型制备及给药:参照文献[1]方法进行。术前大鼠禁食 12 h,自由饮水。以速眠新(0.8 ml/kg)肌肉注射麻醉大鼠。俯卧位固定于立体

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003 0603.2009.06.014

基金项目:四川省科技重点项目(06kj1-15)

作者单位:610041 四川成都,四川大学华西医院急诊科

通信作者:曹钰

定向仪上,头颅正中偏左矢状切开皮肤,显露左顶部,剥离骨膜暴露颅骨,于中线左侧旁开 2 mm 与前囟后角 2 mm 交点处钻孔(直径 3 mm),露出硬脑膜,并保持其完整无损。将动物脑表面与气体冲击机冲击管口距离定为 5 mm,气源压力为 650 kPa,波宽(60.0±0.3)ms,随即进行致伤。致伤后大鼠出现短暂的四肢抽搐,呼吸暂停数秒,说明致伤成功。伤后创口彻底止血,用骨蜡封闭骨窗,缝合头皮。地塞米松组术后立即腹腔给予地塞米松 6 mg/kg。

1.4 检测指标及方法:术后 0、6、24、72、120 h 再次麻醉动物,断头取脑,迅速用多聚甲醛水溶液固定,24 h 后常规石蜡包埋,连续切片,片厚 5 μm,部分切片行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察脑组织病理学改变;另一部分切片进行免疫组化染色,采用 SABC 法检测 NF-κB 表达,操作步骤按试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司提供)说明书进行。SimplePIC 彩色图文分析系统检测 NF-κB 表达,阳性细胞呈棕黄色或褐色。每张切片高倍镜(×400)下选取 5 个不同视野,记录每个视野阳性细胞数,取平均值作为阳性细胞计数并照相;测定免疫组化阳性染色的平均吸光度(A)值。

1.5 统计学处理:数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用分析软件 SPSS 11.0 进行统计分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学观察

2.1.1 TBI 组:肉眼可见脑组织局部膨出骨窗,伤区脑皮质表面挫裂伤,有点片状出血灶、充血、肿胀。光镜下观察:伤后 6 h 皮质神经细胞、胶质细胞水肿;伤后 24 h 组织结构紊乱,局部出血、水肿,神经细胞大量变性、坏死,可见大量无定形空泡,有炎性细胞浸润(彩色插页图 1a);伤后 72 h 组织水肿、充血明显,结构疏松,伴有细胞坏死、溶解后形成的空泡,可见大量炎性细胞,血管扩张,创伤区出血减少;伤后 120 h 病变一直持续存在,可观察到损伤迹象,坏死脑组织内可见泡沫样巨噬细胞,散在分布的多形核细胞,在正常组织和挫伤灶交界处可见小的出血灶,血管内的血细胞出现淤积。

2.1.2 地塞米松组(彩色插页图 1b):地塞米松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 TBI 组明显减轻。

2.2 NF-κB 表达(表 1;彩色插页图 2):TBI 组伤后 6 h 脑组织中 NF-κB 表达即明显升高,24 h 达到峰

值,72 h 开始回降,持续到 120 h 仍高于术前($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。地塞米松组 NF-κB 阳性细胞数无论是细胞质内还是核内,都比 TBI 组明显减少;术后 6、24、72 h NF-κB 阳性细胞数明显少于 TBI 组(P 均 < 0.01);地塞米松组各时间点 A 值较 TBI 组明显下降,差异有统计学意义。

表 1 两组大鼠脑组织 NF-κB 阳性表达($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	NF-κB 阳性表达(个)				
	伤后 0 h	伤后 6 h	伤后 24 h	伤后 72 h	伤后 120 h
TBI 组	55.0±4.4	110.0±8.2 ^a	120.0±10.5 ^b	109.0±9.2 ^a	76.0±7.4 ^a
地塞米松组	55.0±4.4	84.0±6.9 ^{ac}	90.0±5.6 ^{ac}	72.0±4.5 ^{ac}	68.0±7.1

注:与本组伤后 0 h 比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 TBI 组比较,^c $P < 0.01$

3 讨论

原发性重度 TBI 可引发一系列级联反应,这些反应一旦被激活即可进一步加剧脑组织内环境紊乱,从而导致继发性损伤。在这些级联反应中,血管通透性增加,离子平衡紊乱,氧化应激,兴奋毒性损伤,炎症反应及线粒体功能障碍等是导致脑水肿、颅内压升高、脑组织灌注不足、神经细胞死亡及神经功能损害的主要原因^[2]。其中,炎症反应不仅导致 TBI 后继发性损伤,还可能参与创伤后修复过程,对重度 TBI 的预后起重要调节作用,是近年来 TBI 临床及实验研究中倍受关注的热点之一。

脑内炎症反应包括分子水平和细胞水平两部分,前者如细胞因子,后者如血源性白细胞及小胶质细胞,两者均具有促炎/抗炎反应的特性,发挥神经损害/保护作用。血源性白细胞尤其是中性粒细胞在 TBI 后向受损脑组织内聚集,在继发性脑损伤中起重要作用。小胶质细胞是 TBI 后最早作出反应的非神经元细胞,是 TBI 后中枢神经系统脑内炎症细胞因子的主要来源之一。细胞因子是一类可溶性多肽,与炎症反应、免疫活化及炎性细胞分化和死亡密切相关。正常情况下,人体含量极微,在各种因素刺激如感染、外伤后,其表达可急剧增加。研究表明 TBI 后细胞因子反应性升高,并参与了 TBI 继发性损伤和损伤修复全过程^[2-3]。NF-κB 是炎症反应中关键性的转录因子,它的活化是机体效应细胞大量释放肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等促炎细胞因子,导致组织过度炎症反应和损伤的关键环节之一^[4]。

目前关于抑制 NF-κB 活性药物大概有以下几种^[5-8]:①抗氧化剂:抗氧化剂之所以被作为 NF-κB 抑制剂而得到深入研究,是因为活性氧被认为是引

起NF-κB激活的重要中介分子,直接使用氧化剂如H₂O₂就能使某些细胞的NF-κB激活;引起NF-κB活化的刺激物亦能引起氧化物剧增;抗氧化剂在体内多种环境下都能抑制NF-κB活化,增强内源性抗氧化防御机制,抑制NF-κB的激活。②蛋白小体抑制剂:当I-κBα被磷酸化和泛素化后能被26S蛋白小体降解。蛋白小体抑制剂能阻断细胞培养液中NF-κB激活,阻止其进入细胞核。③皮质激素:皮质激素强大的抗炎作用部分是通过抑制NF-κB活化而实现的,而它抑制NF-κB活化是通过两条途径实现的:糖皮质激素受体能直接作用于NF-κB的RelA,从而抑制其与DNA结合,地塞米松能增加I-κBα mRNA的表达并促进功能性I-κBα蛋白质的合成。④内毒素耐受性的诱导:内毒素耐受是指内毒素预刺激能使内毒素引起的反应减轻。经内毒素预处理后的内毒素耐受性巨噬细胞将关闭细胞因子的基因表达,包括TNF-α、白细胞介素-6(IL-6)和IL-8等。

我们采用皮质激素地塞米松处理大鼠TBI,观察脑组织NF-κB在TBI后各时间点的表达,探讨其对颅脑创伤的保护作用。本研究结果显示,地塞米松组动物在损伤后脑组织NF-κB表达较TBI组明显下降。随着NF-κB的激活,脑水肿加重;地塞米松能使损伤后大鼠脑组织的NF-κB表达明显下降,脑水肿减轻,各时间点与TBI组比较有显著差异。已有研究显示地塞米松能增加I-κBα mRNA的表达并促进功能性I-κBα蛋白质的合成,而NF-κB与其抑制蛋白IκB形成复合物,以无活性形式存在于胞质中,因此地塞米松能使活化的NF-κB失活,抑制TNF-α等促炎细胞因子的表达,减轻TBI后的炎症反应,从而发挥脑保护作用^[9]。本研究提示地塞米松能抑制脑损伤后的炎症反应,减轻脑水肿。Sullivan等^[10]发现敲除TNF-α受体大鼠脑损伤后NF-κB活性也降低,神经元和血脑屏障损害减轻。

综上所述,创伤应激反应与过度炎症反应是重

度TBI后的两个基本病理生理变化,二者相互作用、互为因果,积极采取措施减轻或避免这些变化是提高重度创伤治愈率、减少伤残率的关键。地塞米松能抑制NF-κB活化,下调TNF-α,阻断炎症级联反应;抑制炎性细胞活化,使炎症细胞因子合成释放减少;抑制炎性细胞向创伤区脑组织聚集浸润,减轻继发性缺氧缺血性炎症反应等多种途径,共同作用,抑制或阻断过度炎症反应,从而减轻或避免TBI后继发性损伤,促进TBI的恢复。

参考文献

[1] 刘海鹏,尹志勇,王正国. 颅脑局部冲击伤——一种新的颅脑损伤模型. 中华实验外科杂志,1999,16(1):91.
 [2] Clark RSB, Kochanek PM. Brain injury. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2001: 210-225.
 [3] Miller CH, Quattrocchi KB, Frank EH, et al. Humoral and cellular immunity following severe head injury: review and current investigations. Neurol Res, 1991, 13(2): 117-124.
 [4] Fairchild KD, Singh IS, Patel S, et al. Hypothermia prolongs activation of NF-kappaB and augments generation of inflammatory cytokines. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(2): C422-431.
 [5] Hang CH, Shi JX, Li JS, et al. Expressions of intestinal NF-kappaB, TNF-alpha, and IL-6 following traumatic brain injury in rats. J Surg Res, 2005, 123(2): 188-193.
 [6] 毛定安, 杨于嘉, 俞燕. 热休克蛋白70对感染性脑水肿核转录因子-κB及其抑制蛋白的影响. 中国危重病急救医学, 2005, 17(11): 644-646.
 [7] 刘刚, 付爱军, 李建群. 弥漫性脑损伤后大鼠肠黏膜病理变化的动态观察及核转录因子-κB的表达. 中国危重病急救医学, 2005, 17(9): 555-557.
 [8] 肖国民, 危静. 急性脑损伤大鼠脑组织核转录因子-κB活性及肿瘤坏死因子-α表达的表变. 中国危重病急救医学, 2005, 17(5): 307-308.
 [9] Baldwin AS Jr. The NF-kappaB and IkappaB proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol, 1996, 14: 649-683.
 [10] Sullivan PG, Bruce-Keller AJ, Rabchevsky, et al. Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors traumatic brain injury. J Neurosci, 1999, 19(15): 6248-6256.

(收稿日期:2009-01-15 修回日期:2009-05-07)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

丙酮酸乙酯对脓毒症大鼠小肠黏膜免疫屏障的影响

最近一期美国《创伤杂志》报告了丙酮酸乙酯(EP)对脓毒症大鼠小肠黏膜免疫屏障影响的研究结果。研究人员将雌性Wistar大鼠随机分为假手术组、盲肠结扎穿孔术(CLP)组和EP治疗组;观察给予EP后动物存活率及细菌移位情况,并且应用光学显微镜、免疫组化、流式细胞术和酶联免疫吸附实验等技术测定小肠黏膜屏障和免疫屏障的各项指标。结果发现:脓毒症能引起小肠形态改变和免疫功能抑制;给予EP能提高小肠微绒毛内CD4⁺T淋巴细胞、肠系膜淋巴结与脾内CD4⁺T淋巴细胞比值以及脾脏淋巴细胞的增殖能力,促进γ-干扰素和白细胞介素-4的释放,减少肠道细菌移位,使脓毒症大鼠的生存率从37.1%提高至57.1%。因此研究者认为,EP能够改善脓毒症大鼠小肠的黏膜屏障和免疫功能,可以作为免疫调节剂用于治疗脓毒症。

杨明星, 编译自《J Trauma》, 2009, 66(5): 1355-1364; 胡森, 审校

体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞定向分化的研究

(正文见340页)

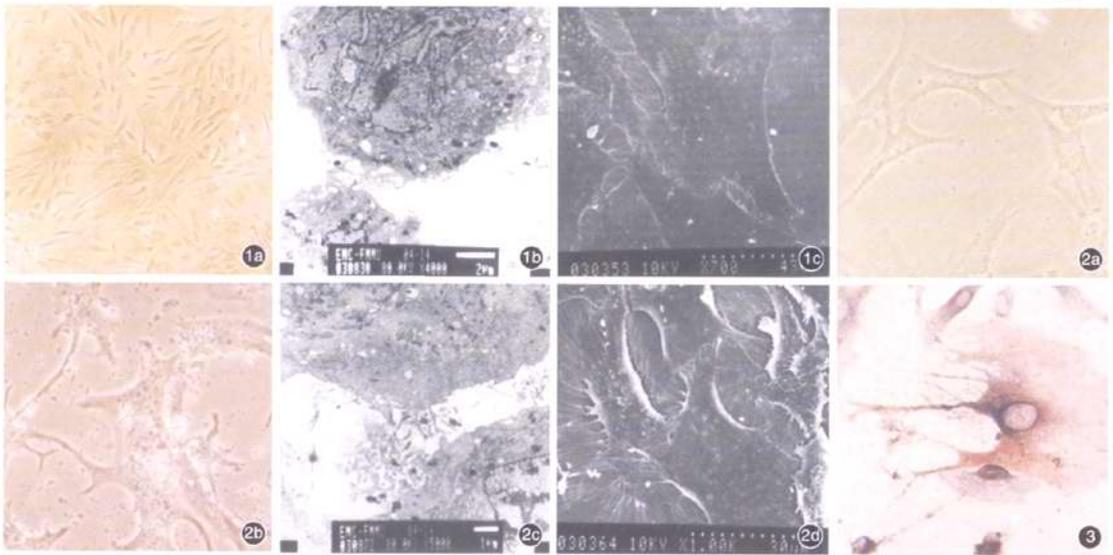


图1a 倒置显微镜下观察大鼠传2代MSCs排列整齐有序, 杂质细胞少见 $\times 40$ 图1b 透射电镜下观察MSCs核大, 核型不规则, 细胞内含有丰富的粗面内质网和线粒体 $\times 4000$ 图1c 扫描电镜下MSCs细胞扁平, 胞质突起粗大, 微绒毛较少, 细胞间连接粗大 $\times 700$ 图2a 倒置显微镜下观察MSCs与心肌细胞混合后培养1d MSCs开始变形, 细胞体变小, 胞核、核仁清晰可见, 胞体周边细长, 伸出长的突起, 细胞内出现黑色颗粒物质 $\times 100$ 图2b 倒置显微镜下观察大鼠MSCs与心肌细胞混合后细胞间连接 $\times 200$ 图2c 透射电镜下观察混合培养后细胞呈中间型细胞 $\times 5000$ 图2d 扫描电镜下观察混合培养细胞呈中间型细胞 $\times 1000$ 图3 免疫组化染色胞核BrdU与胞质actin均着色的双阳性细胞 $\times 400$

Omi/HtrA2在窒息后血清诱导人近曲肾小管上皮细胞凋亡中的作用

(正文见346页)

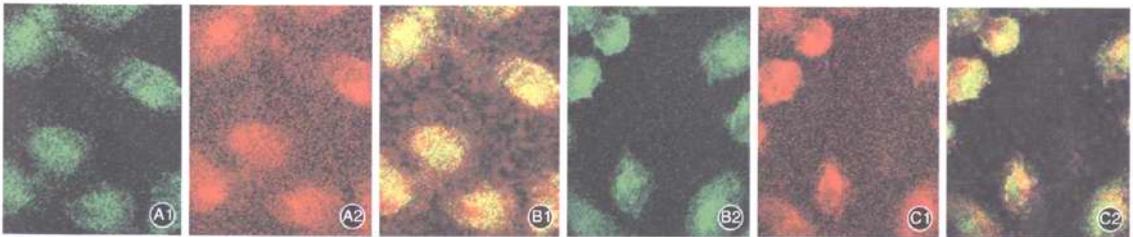


图1 窒息后血清诱导HK-2细胞对Omi/HtrA2转位的影响 A: 绿色通道, B: 红色通道, C: 合成, 1: 空白对照组, 2: 窒息组 激光共聚焦显微镜下观察, 空白对照组Omi/HtrA2荧光染色后呈现绿色荧光, 与线粒体染色后的红色荧光几乎完全重叠, 图片叠加重叠后呈现黄色荧光图片, Omi/HtrA2位于线粒体内, 未发生胞内转位; 而窒息血清攻击后Omi/HtrA2绿色荧光与线粒体红色荧光发生错位, Omi/HtrA2由线粒体内转位到胞质中 $\times 400$

地塞米松对脑损伤大鼠核转录因子- κ B 水平的影响

(正文见364页)

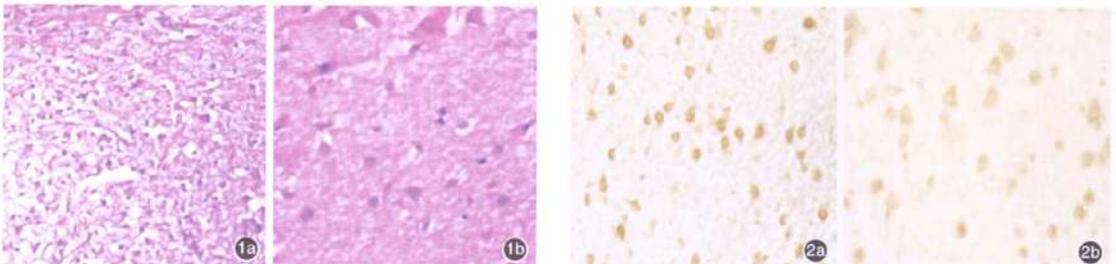


图1 光镜下观察大鼠脑组织病理学改变 TBI组(a) 伤后24h组织结构紊乱, 局部出血, 组织水肿, 神经细胞大量变性、坏死, 可出现大量无定形空泡, 创伤区可见炎性细胞, 地塞米松组(b) 伤后24h细胞损伤明显减轻, 出血减少且较轻, 细胞变性减轻, 细胞坏死明显减少, 细胞水肿仍存在, 但较TBI组明显减轻 HE $\times 200$ 图2 光镜下观察大鼠脑组织NF- κ B阳性表达 TBI组(a) 术后24h脑组织中NF- κ B阳性表达明显; 地塞米松组(b) 阳性表达明显轻于TBI组 免疫组化 $\times 400$