

大鼠颅脑损伤后脑 NF- κ B 的活性和 NF- κ B mRNA 表达的变化及意义

钱伟 钱志远 沈合春 郑达理

【摘要】 目的 观察颅脑损伤后不同阶段脑 NF- κ B 的活性和 NF- κ B mRNA 表达的变化,探讨其在颅脑损伤后继发性损伤中意义及相关机制。方法 建立颅脑损伤模型,通过光镜观察颅脑损伤后病灶周围脑组织变化,采用免疫组化方法检测脑组织中 NF- κ B 及 TNF- α 的表达情况,RT-PCR 检测 NF- κ B mRNA 表达情况。结果 颅脑损伤后不同阶段 NF- κ B 蛋白表达及 mRNA 表达明显高于对照组 ($P < 0.05$),并且 NF- κ B 表达水平与 TNF- α 呈正相关关系 ($r = 0.519, P < 0.05$),且与组织炎症损伤程度一致。结论 颅脑损伤后各时间点脑 NF- κ B 呈过度激活状态,与 TNF- α 水平的变化一致,且病理上颅脑损伤炎症损害严重程度相平行,这可能是颅脑损伤后继发性损伤发生的一个机制。

【关键词】 颅脑损伤; NF- κ B; 肿瘤坏死因子 α ; 继发性脑损伤

The change and significance of the activity of NF- κ B and the expression of NF- κ B mRNA after traumatic brain injury in rats QIAN Wei, QIAN Zhi-yuan, SHEN He-chun, ZHENG Da-li. Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China
Corresponding author: QIAN Zhi-yuan, Email: zyqian_0512@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the NF- κ B activity and expression of NF- κ B mRNA change after traumatic brain injury in rats, and to research the mechanism in secondary brain injury. **Methods** 48 male rats were randomly divided into Sham operation group (Sham group, $n = 6$) and traumatic brain injury group (STBI group, $n = 42$). The rat TBI model was established by improved Feeney method. The pathological change was observed through HE staining, and the activity of NF- κ B and TNF- α was judged by immunohistochemistry staining. The mRNA level of NF- κ B was detected by RT-qPCR. **Results** The activity of NF- κ B after traumatic brain injury was significantly higher ($P < 0.05$), and the activity of TNF- α was increased ($P < 0.05$). The activity of NF- κ B and TNF- α were positively correlated ($r = 0.519, P < 0.05$). The expression of NF- κ B in 3 h and 6 h were higher than that in the Sham group ($P < 0.05$), the rest had no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusions** The NF- κ B is excessively activated in traumatic brain injury, which is consistent with the change of TNF- α and the pathological change. The NF- κ B may play an important role in secondary brain injury.

【Key words】 Craniocerebral trauma; NF-kappa B; Tumor necrosis factor-alpha; Secondary brain injury

临床实践表明,颅脑损伤后继发性脑损伤的发生发展直接影响患者的预后,同时继发性损伤的延迟性也为颅脑损伤的治疗提供了一个“治疗窗”,因此如何阻止颅脑损伤后继发性损伤的出现和发展,一直是众多神经创伤研究者关注的热点^[1-2]。而 NF- κ B (nuclear factor-kappa B)是一种具有多向性转录激活功能的转录因子,主要作用是调控多种细胞因子,参与炎症、免疫、细胞凋亡等病理生理过程^[3]。本实验通过观察颅脑损伤后损伤灶周围脑组织 NF- κ B 及其相关炎性因子的表达变化,探讨 NF- κ B 在外伤后继发性脑损伤发生

发展中的作用及其机制。

材料与方

一、动物分组及试剂

健康成年雄性 SD 大鼠(苏州大学实验动物中心提供)共 48 只,体重 250 ~ 280 g。随机分为假手术组(Sham 组,6 只)和颅脑损伤组(TBI 组,42 只),各组按照外伤后处死的时间又分为 TBI-1 h、TBI-3 h、TBI-6 h、TBI-12 h、TBI-24 h、TBI-3 d 和 TBI-7 d 共 7 个亚组,每亚组各 6 只。NF- κ B 的引物序列由 Primer 引物设计软件设计、上海生工生物技术有限公司合成,一抗 NF- κ B-p65 (BS1253)购自 Bioworld 公司;二抗羊抗兔即用型 SABC(SA1022)、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司,TNF- α 免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司。

二、创伤性脑损伤模型的建立

采用 Feeney 法制作颅脑损伤模型:大鼠用 3.3% 水合氯醛按 1 ml/100 g 腹腔注射麻醉,俯卧位固定头部,去毛,无菌条件下用磨钻在人字缝右前 2 mm、中线旁 2 mm 处钻孔,直径约 5 mm,保持硬脑膜完整,25 g 砝码沿高 40 cm 的自由落体导引管落下直接撞击右顶硬脑膜上,撞击能量为 1000 g·cm,深度为 5 mm。对照组仅切开头皮和颅骨开窗。在规定的时间点处死动物,对照组和手术组 3 只大鼠断头处死后,无菌留取大鼠损伤灶周围脑组织约 50 mg,放入盛有 1 ml Trizol 的冻存管中密封后迅速置于 -80 °C 冰箱中保存备用,以检测 NF-κB mRNA 水平。3 只大鼠心脏灌注 4% 多聚甲醛(100 ml/100 g),待无色液体流出后断头取脑,沿挫伤灶中心切取厚约 2 mm 左右的大脑标本置于 4% 多聚甲醛中固定,以行病理学检测。

三、检测方法

1. 实时荧光定量 PCR 检测脑组织中 NF-κB 的 mRNA 相对表达量:由 Pubmed 检索大鼠 NF-κB 全长序列,引物序列由 Primer 引物设计软件设计、上海生工生物技术有限公司合成,以管家基因 β-actin 作为内参照,按实时荧光定量 PCR 具体步骤进行分析。

2. 免疫组织化学染色检测 NF-κB 表达:按免疫组织化学试剂盒说明书染色(试剂盒由武汉博士德公司提供)。在 10×20 镜下取 5 个视野,借助实验细胞计数器对创伤侧皮质内神经细胞计数,阳性细胞显示为棕色或棕黑色,计算各视野内阳性细胞数占该视野内总细胞数的百分率后,求出平均值。采取双盲法 3 人分别计数后求平均值而得出实验数据。

3. 免疫组织化学染色检测 TNF-α 表达:方法同 NF-κB 表达检测。

4. 石蜡切片常规 HE 染色:结果于 10×20 倍光学显微镜下观察。

四、统计学分析

用 Graphpad Prism 5.0 及 SPSS 17.0 软件进行数据处理,结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,均数间比较采用 *t* 检验,组间比较经方差齐性检验示方差齐,进行单因素方差分析,相关分析采用直线相关的积差相关分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

1. 损伤灶周围脑组织中 NF-κB 活化水平:假手术组(Sham 组)可见细胞核为正常染色,呈蓝色,TBI 组与假手术组对比,TBI-1 h NF-κB(p65)即在病灶周围组织少量细胞核中表达,呈黄色,TBI-3 h 染色细胞核增多,呈黄褐色,为强表达;TBI-6 h ~ 24 h 细胞核染色进一步

加深,提示 NF-κB 表达增高,至 TBI-7 d 仍见病灶周围组织的细胞核呈黄褐色,说明 NF-κB 从 TBI-3 h ~ 7 d 一直持续强表达状态(图 1)。同时 NF-κB 阳性率较对照组有统计学差异($P < 0.05$),但各时间点阳性率无统计学差异($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 各组大鼠损伤灶周围脑组织 NF-κB 阳性、NF-κB mRNA 相对表达量及脑组织中 TNF-α 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NF-κB 阳性	NF-κB mRNA	TNF-α
对照组(Sham 组)	6	9.87 ± 1.32	1.00 ± 0.18	12.07 ± 1.01
颅脑损伤组(TBI 组)				
1 h	6	19.79 ± 0.31 ^b	1.08 ± 0.05	24.16 ± 1.82 ^b
3 h	6	19.45 ± 0.42 ^b	3.67 ± 0.75 ^a	30.25 ± 2.18 ^b
6 h	6	22.38 ± 0.12 ^b	2.26 ± 0.47 ^a	23.34 ± 1.15 ^b
12 h	6	21.63 ± 0.24 ^b	1.19 ± 0.21	20.83 ± 2.13 ^b
24 h	6	20.89 ± 0.17 ^b	0.98 ± 0.16	18.24 ± 2.09 ^a
3 d	6	19.78 ± 0.23 ^b	1.11 ± 0.08	20.20 ± 1.53 ^b
7 d	6	19.90 ± 0.10 ^b	1.13 ± 0.11	20.77 ± 2.71 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

2. 损伤灶周围脑组织中 NF-κB mRNA 表达水平变化:与 Sham 组比较,TBI-1 h 时 TBI 组大鼠损伤灶周围脑组织 NF-κB mRNA 的表达开始升高,但无统计学意义($P > 0.05$)。但 TBI-3 h 即迅速达到高峰,约为假手术组的 3 倍多,随后迅速下降,于 TBI-12 h 时接近 Sham 组,但仍高 Sham 组并持续至 TBI-7 d;与 Sham 组相比,TBI-3 h、TBI-6 h 两个时间点的差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 1,图 2,3)。

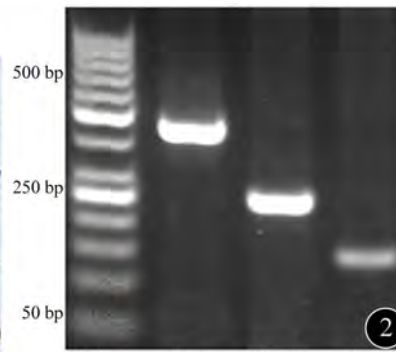
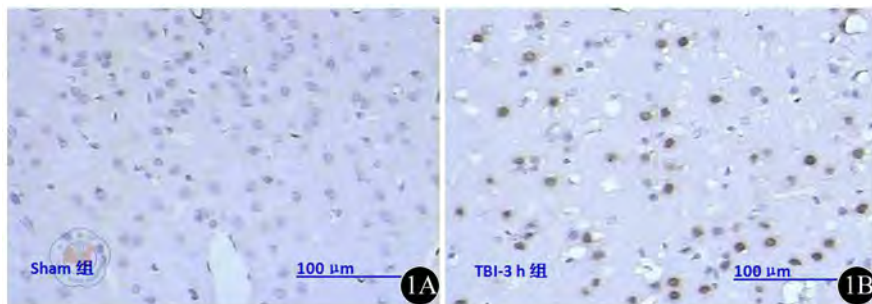
3. 损伤灶周围脑组织的病理改变:伤后早期即可见暗红色病灶,损伤侧脑组织较对侧明显肿胀,损伤处有硬膜下血肿、蛛网膜下腔出血表现,病灶轴断面可见脑挫裂伤,裂伤处出血,同侧脑室内也有出血表现。通过病理切片发现,伤后 1 ~ 3 h 即可见炎症改变并逐渐加重,12 h 后病灶出现大量炎性细胞浸润,24 h ~ 3 d 可见挫伤灶细胞液化坏死,广泛的炎性细胞浸润,水肿明显,细胞间质疏松,水肿带细胞形成空泡,细胞核固缩(图 4)。

4. 损伤灶周围脑组织中 TNF-α 表达水平:与 Sham 组比较,TBI-1 h 时 TBI 组大鼠损伤灶周围脑组织中 TNF-α 即明显升高,于 TBI-3 h 达高峰,随后逐渐下降,然后保持 TBI-24 h 时水平至 TBI-7 d;与 Sham 组比较,7 个时间点的差异均有统计学意义($P < 0.05$)(表 1,图 5)。

5. NF-κB 活化水平与 TNF-α 表达水平的相关性:在 TBI 组中 NF-κB 活化水平与损伤灶周围脑组织中 TNF-α 水平的呈正相关($r = 0.519$, $P < 0.05$)(表 1)。

讨 论

继发性脑损伤发生于颅脑损伤后数小时至数天,



Maker β-actin NF-κB TNF-α

图1 TBI后不同时间点细胞核NF-κB表达(×200)。Sham组细胞核为正常染色,呈蓝色。与Sham组对比,TBI-3 h病灶周围组织部分细胞核呈黄褐色,表现出强阳性表达 图2 TBI-3 h损伤灶周围脑组织β-actin、NF-κB、TNF-α PCR产物电泳条带

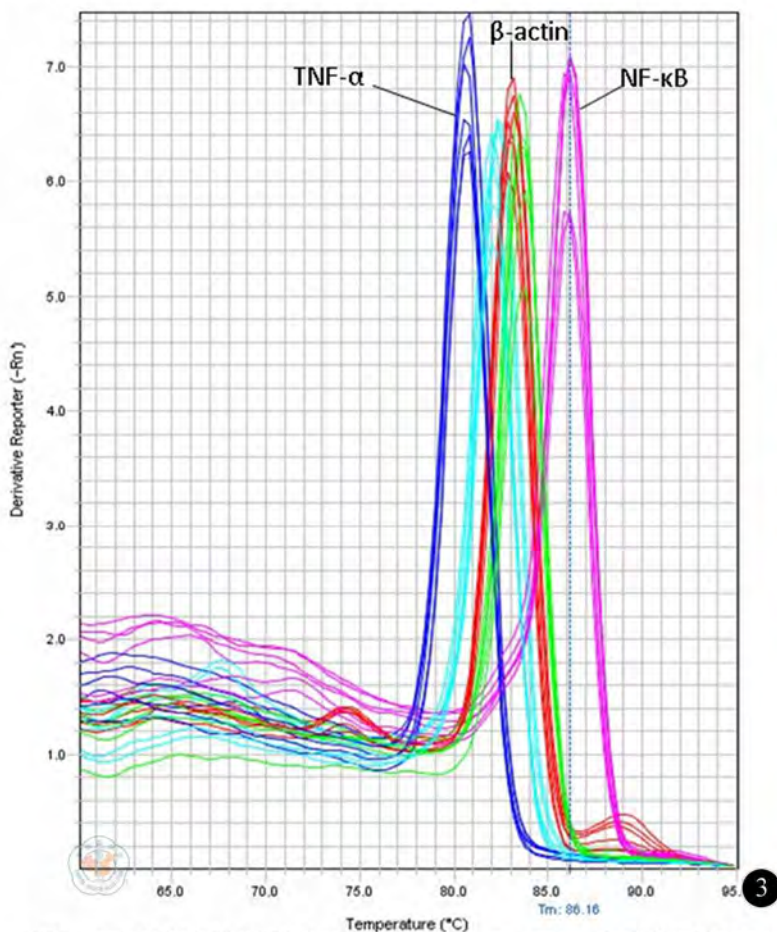
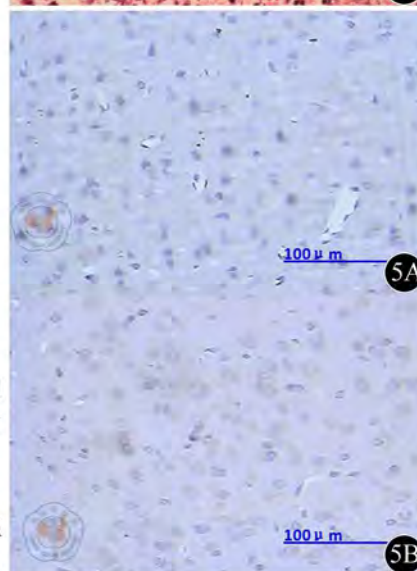
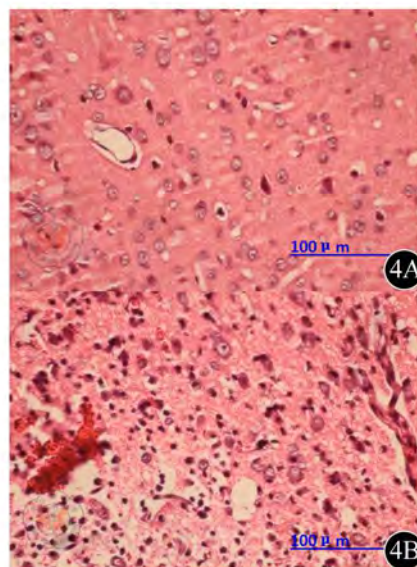


图3 TBI-3h损伤灶周围脑组织β-actin、NF-κB、TNF-α等荧光定量PCR溶解曲线(左侧蓝色曲线为TNF-α溶解曲线,中间红色为β-actin溶解曲线,右侧粉红色为NF-κB溶解曲线) 图4 TBI-3 d组(4B)与Sham组(4A)局部对比(×200)。挫伤区细胞液化坏死,广泛的炎性细胞浸润(箭头所示为多核中性粒细胞);水肿明显,细胞间质疏松,水肿带细胞形成空泡,细胞核固缩 图5 (5A) TBI后不同时间点细胞核TNF-α表达(×200)。Sham组(5A)细胞核为正常染色。与Sham组对比,TBI-3 h(5B)病灶周围组织细胞质呈淡黄色,提示TNF-α开始表达



包括神经递质的释放、氧自由基的产生、钙调节的损伤、线粒体功能的障碍、炎症反应和细胞坏死凋亡自噬等,是颅脑损伤患者死亡和致残的主要原因^[4]。其中炎症反应机制是研究的热点,TNF- α 作为主要的促炎性因子之一,在继发性脑损伤中的作用日益受到关注^[5-7],且最新研究发现,减少损伤脑组织中TNF- α 的表达,可改善神经元损伤及神经功能缺陷^[8]。

在炎症反应通路中,NF- κ B通路作为细胞内重要细胞信号转导通道,在细胞免疫、炎症、分化、凋亡等方面起着重要的作用^[3]。研究发现NF- κ B广泛存在于各种神经细胞中,例如神经元,星形细胞,小胶质细胞和少突胶质细胞,且在神经元胞体,突触前区域、突触后区域及胞核内都存在可诱导型NF- κ B^[9-10]。生理情况下NF- κ B同其抑制因子I κ B α 结合以无活性状态存在于细胞质内;疾病过程中,内毒素、脂多糖、磷脂酶A、溶血磷脂酰胆碱、氧化应激代谢产物、病毒、缺血-再灌注等均可使I κ B α 和NF- κ B分离,NF- κ B便迅速活化,然后进入细胞核,与其靶基因上的启动子或增强子结合而调节基因转录,激活与细胞应激相关的基因和炎症早期反应基因,如细胞因子、生长因子、细胞黏附分子和一些在健康和疾病状态下产生的急性蛋白因子^[11]。

本研究提示颅脑损伤后损伤灶周围组织中TNF- α 表达水平明显高于对照组,变化趋势基本是稍下降后又逐渐升高,而且继发性脑损伤后7d仍保持增高水平,这与国内外研究结果基本一致^[12-13]。同时TNF- α 水平变化与组织损伤变化一致,提示TNF- α 介导组织损伤。而NF- κ B活性早期开始就明显升高,但变化趋势比较平缓,考虑NF- κ B在重型颅脑损伤早期便迅速活化,然后进入细胞核,与其靶基因上的启动子或增强子结合而调节基因转录,激活与细胞应激相关的基因和炎症早期反应基因,并表达TNF- α ,这提示NF- κ B在颅脑损伤的发生、发展过程中发挥着重要作用,和Hang等^[12]在大鼠大脑皮质挫伤模型中结果一致,并证实了Tao等^[14]对NF- κ B在颅脑损伤后作用的研究。但本次研究提示,损伤灶周围组织中NF- κ B mRNA在3h和6h两时间点有表达差异,其余各时间点表达差异不明显,提示NF- κ B的活性并非完全由NF- κ B mRNA表达所决定。在3h和6h时间点转录水平提高,可以使NF- κ B表达的数量越多,一定程度上就可提高NF- κ B的活性,但是,3h到7d的过程中NF- κ B呈强表达,可见NF- κ B的活性变化是多因素影响的。可能同时TNF- α 也可以通过激活NF- κ B诱导激酶(NIK)和丝裂原蛋白激酶的激酶1(MEKK1),从而使IKK磷酸化而

激活,激活后的IKK再使I κ B磷酸化,后者最后被蛋白酶降解,从而使NF- κ B游离出来而活化,进一步激发并维持炎症反应,并成为继发性损伤的始动因子^[15-16]。

颅脑损伤后NF- κ B存在高度活化,并长时间维持,且通过上调TNF- α 的表达直接或间接导致颅脑的损伤。如何抑制NF- κ B活性、减少NF- κ B活化因素、阻断NF- κ B活化途径,可能是降低TNF- α 水平、减轻继发性脑损伤的有效方法。因此NF- κ B可能成为颅脑损伤后继发性炎症治疗新的药理学靶点,为脑外伤临床治疗提供新的思路和方法。

参 考 文 献

- [1] Park E, Bell JD, Baker AJ. Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? CMAJ, 2008, 178: 1163-1170.
- [2] 沈合春, 钱志远. 神经血管单元与创伤性脑损伤. 中华创伤杂志, 2010, 26: 957-960.
- [3] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1: a1651.
- [4] Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, et al. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. Nat Rev Neurol, 2010, 6: 393-403.
- [5] Bermpohl D, You Z, Lo EH, et al. TNF alpha and Fas mediate tissue damage and functional outcome after traumatic brain injury in mice. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27: 1806-1818.
- [6] Cederberg D, Siesjo P. What has inflammation to do with traumatic brain injury? Childs Nerv Syst, 2010, 26: 221-226.
- [7] Oshima T, Lee S, Sato A, et al. TNF-alpha contributes to axonal sprouting and functional recovery following traumatic brain injury. Brain Res, 2009, 1290: 102-110.
- [8] Miao X, Liu X, Yue Q, et al. Deferoxamine suppresses microglia activation and protects against secondary neural injury after intracerebral hemorrhage in rats. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2012, 32: 970-975.
- [9] Memet S. NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. Biochem Pharmacol, 2006, 72: 1180-1195.
- [10] Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. Biochim Biophys Acta, 2005, 1745: 287-299.
- [11] Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. Nat Immunol, 2011, 12: 695-708.
- [12] Hang CH, Shi JX, Li JS, et al. Concomitant upregulation of nuclear factor- κ B activity, proinflammatory cytokines and ICAM-1 in the injured brain after cortical contusion trauma in a rat model. Neurol India, 2005, 53: 312-317.
- [13] 张卫民, 雷鹏, 贺建勋. N-乙酰半胱氨酸对大鼠颅脑损伤后炎症因子表达的影响. 中华神经外科疾病研究杂志, 2009, 8: 43-46.
- [14] Tao L, Chen X, Qin Z, et al. Could NF-kappaB and caspase-3 be markers for estimation of post-interval of human traumatic brain injury? Forensic Sci Int, 2006, 162: 174-177.
- [15] Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. Cell Metab, 2011, 13: 11-22.
- [16] Young AM, Campbell EC, Lynch S, et al. Regional susceptibility to TNF-alpha induction of murine brain inflammation via classical IKK/NF-kappaB signalling. PLoS One, 2012, 7: e39049.

(收稿日期: 2012-11-08)

(本文编辑: 郝锐)