

网络出版时间: 2018-5-23 14:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.010.html>

TNF- α 与 Ca^{2+} 在大鼠创伤性脑水肿中的相关性研究

何济民¹, 郑晓梅², 张 烨¹, 黄 浩¹, 官 明¹, 江 涌¹, 陈礼刚¹, 刘 亮¹

摘要 目的 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 与 Ca^{2+} 在颅脑创伤后脑水肿中的相关性及两者在脑水肿中与水通道蛋白 4 (AQP-4) 可能存在的关系。方法 采用自由落体打击法制造颅脑创伤动物模型,按处理方式分为 4 组:空白对照组、单纯处理组、环戊苯吡酮 (TNF- α 抑制剂) 处理组、尼莫地平 (Ca^{2+} 通道阻滞剂) 处理组,均采用 Western blot 法及 mRNA PCR 法检测各组脑组织中 TNF- α 、AQP-4 表达量及用比色法检测脑组织细胞内 Ca^{2+} 含量,同时影像学检测各组大鼠创伤后脑水肿程度。结果 ① 颅脑创伤后单纯处理组脑组织中 TNF- α 、AQP-4 表达量及 Ca^{2+} 含量明显较空白对照组增加,影像学提示脑水肿明显;② 环戊苯吡酮处理组与单纯处理组比较,大鼠脑组织中 TNF- α 、AQP-4 表达量明显降低,脑组织细胞内 Ca^{2+} 含量也下降,影像学提示脑水肿存在,但较单纯处理组大鼠脑水肿轻;③ 尼莫地平处理组与单纯处理组比较,大鼠脑组织细胞内 Ca^{2+} 含量明显降低, AQP-4 表达量明显降低,而 TNF- α 表达量无明显变化,影像学提示脑水肿存在,但较单纯处理组大鼠脑水肿较轻;④ 环戊苯吡酮处理组大鼠与尼莫地平处理组大鼠比较,经 Ca^{2+} 通道阻滞剂处理后大鼠脑水肿稍轻,但差异不明显。结论 颅脑创伤后脑组织中 TNF- α 表达量及 Ca^{2+} 含量明显增加, TNF- α 及 Ca^{2+} 参与脑组织水肿发生,且在创伤后脑水肿中 TNF- α 可能为 Ca^{2+} 上游信号, TNF- α 可能是通过影响脑细胞钙超载从而参与创伤后脑水肿的发生。

关键词 颅脑创伤; TNF- α ; Ca^{2+} ; TNF- α 抑制剂; Ca^{2+} 通道阻滞剂; 脑水肿

中图分类号 R 338.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0875-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.010

颅脑创伤是病死率和致残率最高的疾病之一。目前我国颅脑创伤的发病率在 200~300/10 万人,且国内外呈上升趋势^[1-2]。脑水肿是导致颅脑创伤患者后期死亡的关键因素。如何更好地认识创伤后脑水肿发生发展机制及缓解创伤后脑水肿是颅脑创

伤一直以来的重点。研究^[3-5]表明,炎症反应与颅脑创伤密切相关,脑组织的炎症反应于颅脑创伤后几分钟即开始。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症因子对脑水肿发挥重要作用^[6]。在创伤的脑细胞中 TNF- α mRNA 表达明显增加,潜在地导致继发性神经元损伤^[7-8]。细胞内钙超载是导致细胞死亡的重要途径,已经证实颅脑创伤后 Ca^{2+} 通道拮抗剂的使用具有与治疗性低温相似的保护作用^[9];同时已发现 Ca^{2+} 在 TBI 后脑细胞水肿及细胞死亡中具有重要作用^[10],下调钙传导蛋白表达显著改善了 TBI 模型中的神经元存活,更好地保留了神经功能^[11]。然而对于颅脑创伤所致脑水肿目前未见 TNF- α 与 Ca^{2+} 相互作用的相关报道,该研究通过分别抑制 TNF- α 表达及脑细胞 Ca^{2+} 超载来观察相应脑水肿程度,探究两者在脑水肿中的作用及相关机制,为创伤后脑水肿提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 动物 选择健康清洁级 SD 大鼠(雌雄无异) 80 只,体重 250~300 g,由西南医科大学 SPF 级实验动物中心提供。

1.2 试剂 TNF- α 抑制剂(环戊苯吡酮)由美国 MEC 公司提供; Ca^{2+} 通道阻滞剂(尼莫地平注射液)由德国拜耳医药保健有限公司提供; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、RIPA 总蛋白裂解液、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒、抗体洗脱液、显影定影液、脱脂奶粉均由阿斯本生物公司提供;蛋白酶抑制剂由上海玉博生物科技有限公司提供; RNA 提取试剂盒、标记蛋白由赛默非世尔科技(中国)有限公司提供。

1.3 制作颅脑创伤动物模型 将大鼠随机分成 4 组:空白对照组、单纯处理组、环戊苯吡酮(TNF- α 抑制剂)处理组、尼莫地平处理组。创伤处理模型参照 Feeney's 自由落体模型设计制作^[12]。将大鼠用 3% 水合氯醛腹腔内注射麻醉后,俯卧位于大鼠立体定位仪平台上,固定头部。备皮消毒后,沿右侧颅顶旁正中切口,分离骨膜,用简易颅骨钻在前囟

2018-01-18 接收

基金项目:四川省教育厅立项重点项目(编号:12ZA075)

作者单位:西南医科大学附属医院¹ 神经外科、² 神经内科,泸州 646000

作者简介:何济民,男,硕士研究生;

刘 亮,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: liulst@163.com

后 1.5 mm, 中线旁 2 mm 处钻一直径约 4 mm 的骨窗, 保持硬脑膜完整, 将撞杆头端置于骨窗硬膜外, 用 100 g 重的击锤从 50 cm 高处自由坠落冲击撞杆, 撞击能量为 500 J, 造成颅脑损伤。适量骨蜡填缝骨窗及缝合切开, 制作大鼠创伤性脑损伤模型。单纯处理组只单纯创伤处理; 环戊苯吡酮处理组于创伤后立即给予环戊苯吡酮 (1 mg/100 g), 以后每 24 h 同量腹腔给予 1 次, 持续 3 d; 尼莫地平处理组于创伤后立即给予尼莫地平 (0.5 mg/kg), 以后每 24 h 同量腹腔给予一次, 持续 3 d。

1.4 影像学检查及脑组织取材 各组大鼠 MRI 采集影像后颈椎脱臼处死, 根据 MRI 提示定位取出创伤区域脑组织, 每组大鼠脑组织分别取材检测 TNF- α 、AQP-4 与 Ca^{2+} 。

1.5 脑组织 TNF- α 、AQP-4 检测

1.5.1 Western blot 法检测 各组 TNF- α 、AQP-4 蛋白表达量 创伤区域取材的脑组织块用预冷的 PBS 缓冲液漂洗后剪成芝麻大小小块, 按照组织蛋白提取试剂中的步骤提取总蛋白溶液。使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。根据样品浓度确定上样量, 然后依次点样、电泳、孵育抗体、曝光检测, 最后 AlphaEaseFC 软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.5.2 Real-time PCR 法检测 TNF- α 、AQP-4 mRNA 表达量 创伤区域取材的脑组织块于液氮中保存, 于 1 ml 预冷的 TRIzol 中充分研磨, 依次按步骤提取 RNA, 第一链 cDNA 的合成采用逆转录试剂盒进行 (日本 TaKaRa 公司); 实时荧光定量 PCR 是在 Life technologies 公司的 StepOne™ Real-Time PCR 仪上完成, 每个样品均设 3 个复孔, 使用 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒进行 (日本 TaKaRa 公司), 最后采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。

1.5.3 免疫组化检测 TNF- α 、AQP-4 表达量 脑组织取材后依次经甲醛固定、石蜡包埋、切片、烘片、微波修复、封闭后, 每张切片加入约 50 μl 稀释的兔抗鼠一抗覆盖组织, 4 °C 过夜, PBS 清洗, 去除 PBS 液, 每张切片加 50 ~ 100 μl 山羊抗兔二抗, 37 °C 孵育 50 min。清洗后用 DAB 溶液显微镜控制显色。显色完全后, 苏木精复染, 氨水返蓝, 流水冲洗, 梯度酒精脱水干燥, 中性树胶封固后置于显微镜下取图。

1.6 脑组织 Ca^{2+} 检测 各组大鼠脑组织取出后立即用 PBS 冲洗 2 次, 并于 PBS 中剪成糊状, 转移至离心管离心, 离心后加入 0.25% 胰酶于 37 °C 恒温水浴箱中消化 40 min, 每隔 5 min 吹打 1 次, 消化完

毕后加入等量 DMEM 培养液终止消化, 以 1 000 r/min 离心 10 min, 去除上层液体, 加入 PBS, 吹打均匀后通过 300 目细胞筛, 取通过细胞筛后液体, 1 000 r/min 离心机中离心 5 min, 弃掉上清液, 然后加入完全 DMEM 培养液, 获得脑组织单细胞悬液。取 100 μl 脑组织悬液用台盼蓝染色后上镜检测细胞存活率, 若细胞存活率 > 95%, 为合格的单细胞悬液, 可以备用。将备用单细胞悬液放入 4 °C 台式离心机以 3 000 r/min 离心 5 min, 离心后去掉上清液, 加入 GENMED 裂解液充分混匀, 转移入预冷离心管强力旋涡震荡 15 s, 置于冰槽孵育 30 min 后于 4 °C 离心机 15 000 r/min 离心 10 min, 抽取上清液待检, 将待检液按照试剂盒说明顺序进行吸光度检测, 各组标本吸光度值, 然后根据公式计算检测的细胞内 Ca^{2+} 浓度: 检测样品浓度 = 标准曲线获得样品对应钙浓度 (mmol/L) $\times$ 样品稀释倍数。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 Ca^{2+} 浓度比较 结果显示, A 组脑组织中单纯处理组 Ca^{2+} 浓度最高, 其次为环戊苯吡酮处理组、尼莫地平处理组, 空白对照组 Ca^{2+} 浓度最低, 见图 1。

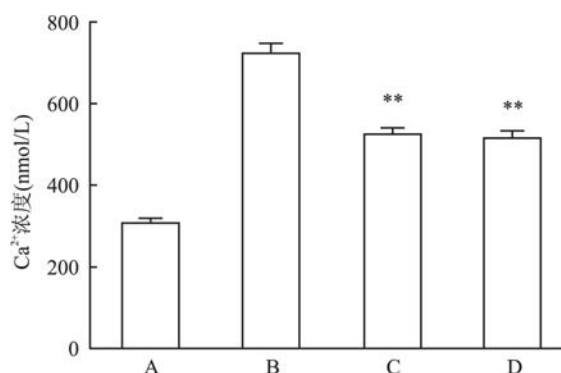


图 1 各组脑组织中细胞内 Ca^{2+} 浓度

A: 空白对照组; B: 单纯处理组; C: 环戊苯吡酮处理组; D: 尼莫地平处理组; 与单纯处理组比较: ** $P < 0.01$

2.2 各组创伤区脑组织中 TNF- α 表达 经过聚丙烯酰胺凝胶电泳后可见 TNF- α 和 GAPDH 两条带分别为 16 ku 和 37 ku, A 组中均有表达。与单纯处理组相比, 环戊苯吡酮处理组 TNF- α 蛋白表达量明显降低了 52.58% ($F = 1.41$, $P < 0.01$), 但仍明显高

于空白对照组,说明 TNF- α 抑制剂环戊苯吡酮可以降低创伤脑组织中 TNF- α 蛋白的表达;与单纯处理组相比,尼莫地平处理组 TNF- α 蛋白表达量变化不大($F = 1.30$, $P > 0.05$),提示 Ca^{2+} 通道阻滞剂尼莫地平并不能降低创伤脑组织中 TNF- α 蛋白的表达。

各组脑组织 TNF- α mRNA 表达情况:与单纯处理组扩增倍数相比,环戊苯吡酮处理组明显降低($F = 1.95$, $P < 0.01$),同样说明 TNF- α 抑制剂可以降低创伤脑组织中 TNF- α mRNA 的表达;与单纯处理组相比,尼莫地平处理组变化不大($F = 2.67$, $P > 0.05$),同样说明 Ca^{2+} 通道阻滞剂并不能降低创伤脑组织中 TNF- α mRNA 的表达。见图 2。

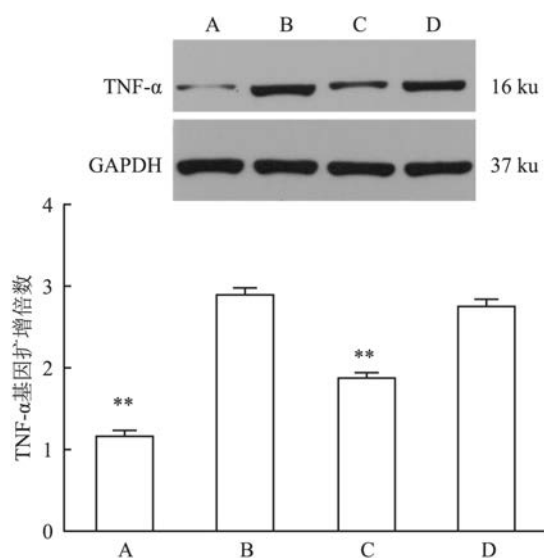


图2 Western blot 法检测各组脑组织内 TNF- α 蛋白表达量

A: 空白对照组; B: 单纯处理组; C: 环戊苯吡酮处理组; D: 尼莫地平处理组; 与单纯处理组比较: ** $P < 0.01$

2.3 各组创伤区脑组织中 AQP-4 表达 不同处理组中创伤脑组织经 Western blot 蛋白检测可见,与单纯处理组相比,环戊苯吡酮处理组明显降低,尼莫地平处理组也明显降低($F = 1.32, 4.12$, $P < 0.01$),但较空白对照组仍较高。说明 TNF- α 抑制剂环戊苯吡酮和 Ca^{2+} 通道阻滞剂尼莫地平平均可以一定程度影响创伤脑组织中 AQP-4 蛋白的表达,见图 3。

由图 3、4 可见, AQP-4 在 4 组中均有表达,空白对照组 AQP-4 表达最低,单纯处理组最高,环戊苯吡酮处理组、尼莫地平处理组较单纯处理组均明显降低,但较空白对照组仍高;图 4 为各组脑组织 AQP-4 表达情况,与图 5 各组脑组织 AQP-4 基因表达情况相比,各组对比变化趋势大致相同,且空白对照组、环戊苯吡酮处理组、尼莫地平处理组各组与单

纯处理组相比差异均有统计学单纯处理意义,环戊苯吡酮处理组和尼莫地平处理组较单纯处理组 AQP-4 表达明显降低。说明 TNF- α 抑制剂环戊苯吡酮和 Ca^{2+} 通道阻滞剂尼莫地平平均可以抑制水肿蛋白在脑组织中的表达。

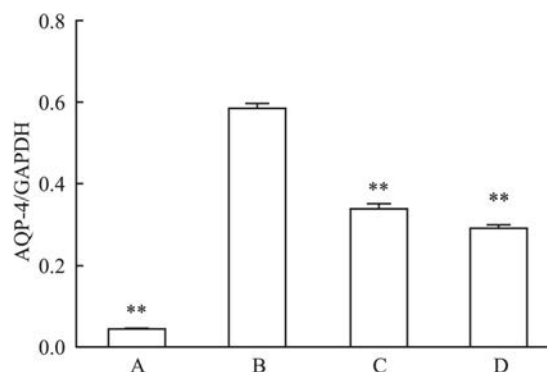


图3 Western blot 法检测各组脑组织内 AQP-4 蛋白表达量

A: 空白对照组; B: 单纯处理组; C: 环戊苯吡酮处理组; D: 尼莫地平处理组; 与单纯处理组比较: ** $P < 0.01$

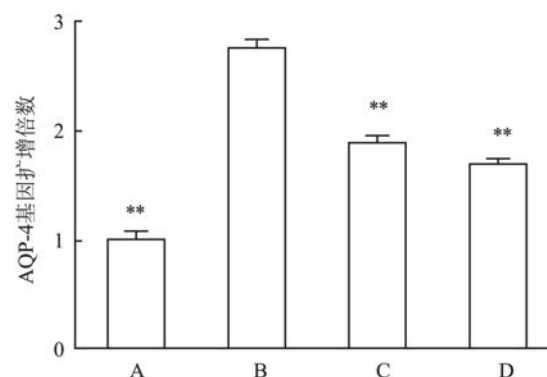
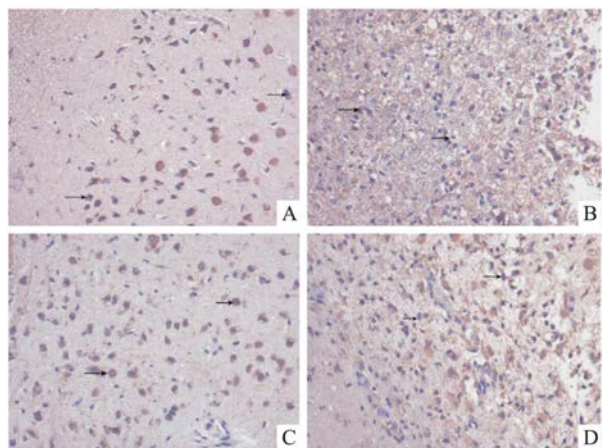


图4 各组脑组织中 AQP-4 基因扩增对比

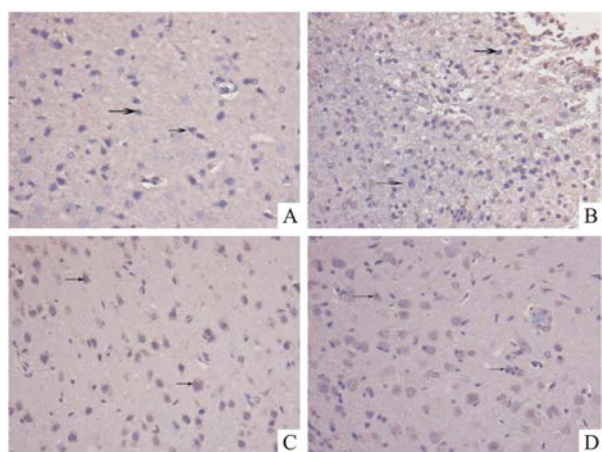
A: 空白对照组; B: 单纯处理组; C: 环戊苯吡酮处理组; D: 尼莫地平处理组; 与单纯处理组比较: ** $P < 0.01$

2.4 各组大鼠脑组织免疫组化结果 图 5、6 分别为各组大鼠脑组织 TNF- α 、AQP-4 的免疫组化图,箭头所指为目标染色所在。图 5 可见经 TNF- α 抑制剂处理的大鼠脑组织 TNF- α 表达比单纯创伤大鼠有明显降低,尼莫地平处理组较单纯处理组似乎变化不大;图 6 可见经环戊苯吡酮和尼莫地平处理过的大鼠脑组织较单纯处理组脑组织 AQP-4 均明显减少。此结果与 Western blot、PCR 检测结果一致。

2.5 各组大鼠脑组织影像学检测结果 图 7A 为正常大鼠颅脑影像,图 7B 为单纯处理组大鼠脑组织影像,创伤后未经任何处理,伤后 3 d 可见脑组织水肿仍较明显;图 7C 为经 TNF- α 抑制剂环戊苯吡酮处理过,伤后 3 d 影像最大水肿层面比($4.26 \pm$

图5 TNF- α 的免疫组化图 苏木精染色 $\times 400$

A: 空白对照组; B: 单纯处理组; C: 环戊苯吡酮处理组; D: 尼莫地平处理组

图6 AQP-4的免疫组化图 苏木精染色 $\times 400$

A: 空白对照组; B: 单纯处理组; C: 环戊苯吡酮处理组; D: 尼莫地平处理组

0.61) / (24.6 $\pm$ 0.97) 提示较单纯创伤组最大水肿层面比(8.74 $\pm$ 1.09) / (24.5 $\pm$ 0.85) 明显减小, 有好转($F=3.98$ $P<0.01$), 说明抑制 TNF- α 表达可以降低脑水肿; 图 7D 为经钙通道阻滞剂尼莫地平处理过后影像, 最大水肿层面比(3.78 $\pm$ 0.72) / (24.4 $\pm$ 0.64) 同样提示较单纯处理组最大水肿层面比(8.74 $\pm$ 1.09) / (24.5 $\pm$ 0.85) 明显减小, 水肿有好转($F=2.30$ $P<0.01$), 说明抑制钙通道可以降低脑水肿。见图 7。

3 讨论

急性颅脑损伤后继发性脑水肿程度对患者预后至关重要, 许多炎症因子参与了颅脑创伤后脑水肿过程。创伤后炎症细胞因子在脑组织中过表达, 使神经元赖以生存的环境改变, 可导致神经元变

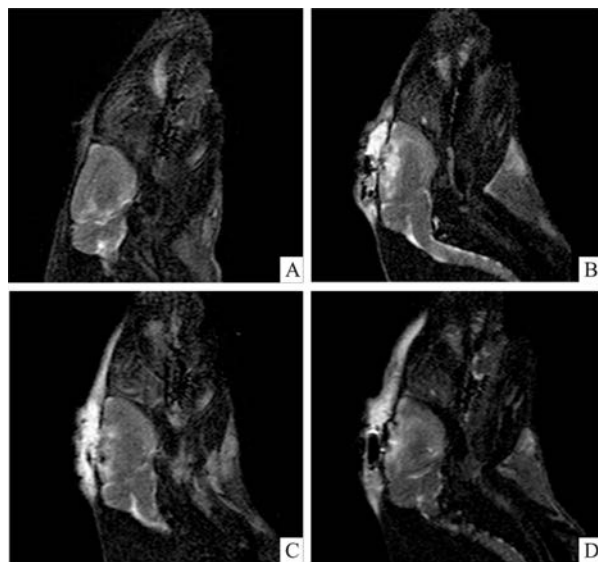


图7 各组大鼠脑组织 MRI 检查

A: 空白对照组; B: 单纯处理组; C: 环戊苯吡酮处理组; D: 尼莫地平处理组

性^[13]。TNF- α 是参与颅脑创伤后脑水肿重要的炎症因子, 在颅脑创伤早期及继发性炎症反应中高表达, 过度炎症反应时, TNF- α 可改变血管内壁通透性, 释放大量的自由基, 促发细胞毒性脑水肿, 增加血脑屏障通透性, 诱发脑水肿、炎症坏死及脑部微循环障碍^[14]。研究^[6] 证明在不同程度颅脑损伤后第 5 天为 TNF- α 表达量高峰, 并且其表达量与水肿程度呈相关性。同时, Ca^{2+} 是神经细胞内重要的第二信使, 其在调节细胞黏附、细胞间通讯、酶活性、膜通透性、细胞代谢和多种蛋白激酶的活化中具有重要作用。细胞内外 Ca^{2+} 浓度存在很大差异, 维持细胞内外钙浓度稳定是细胞各项功能正常的基础, 细胞内钙超载是导致细胞死亡的重要途径^[15]。许多研究都已证明这两者在颅脑创伤后脑水肿中都起着重要作用。为探讨两者在创伤后脑水肿中的相关性及两者是否存在信号通路上的联系, 笔者通过不同药物处理分别减少 TNF- α 和 Ca^{2+} 在创伤后脑组织中的含量来控制实验组。

已有研究^[16-18] 证明, 创伤后脑组织 AQP-4 表达量与脑水肿严重程度呈直线关系, 所以可以通过 AQP-4 表达量及影像学等客观指标来探究不同因素影响下创伤后脑水肿的情况。通过对空白对照组和单纯处理组两组各指标及影像学的对比, 显示在颅脑创伤后可出现脑水肿, 创伤后组脑组织中 TNF- α 和 AQP-4 表达量及细胞内 Ca^{2+} 浓度明显增加, 这说明 TNF- α 、细胞内 Ca^{2+} 浓度及 AQP-4 与创伤后脑水

肿具有相关性;通过 TNF- α 抑制剂环戊苯吡酮处理后,再与单纯处理组比较,结果显示采用环戊苯吡酮处理组的创伤脑组织 TNF- α 、AQP-4 表达量及细胞内 Ca^{2+} 浓度都降低,且差异具有统计学意义。同时影像学提示环戊苯吡酮处理创伤组脑水肿较单纯处理组有明显降低,这说明在颅脑创伤后 TNF- α 的表达可影响细胞内 Ca^{2+} 浓度及 AQP-4 表达量;采用 Ca^{2+} 通道阻滞剂尼莫地平处理后,通过与单纯处理组比较,结果显示,采用尼莫地平处理的脑组织细胞内 Ca^{2+} 浓度及 AQP-4 表达量明显降低,影像学也提示脑水肿较单纯处理组有明显降低;但其处理后的脑组织中 TNF- α 的表达量与单纯创处理相比并没有明显变化;这种现象提示在创伤后脑组织中 Ca^{2+} 浓度的变化可以影响脑组织中 AQP-4 的表达及影响脑水肿,但并不能影响脑组织中 TNF- α 的表达。

综上,创伤后脑组织中 TNF- α 、细胞内 Ca^{2+} 浓度变化都可以影响脑水肿的变化,且在相互影响上, TNF- α 和细胞内 Ca^{2+} 浓度变化是单向作用的, TNF- α 表达可以影响细胞内 Ca^{2+} 浓度变化,但是细胞内 Ca^{2+} 浓度变化并不能影响组织中 TNF- α 表达。提示在颅脑创伤后 TNF- α 对脑水肿的影响可能是通过 TNF- α 影响细胞内 Ca^{2+} 浓度来调节 AQP-4 表达量,从而参与颅脑创伤后脑水肿的发生;在影响脑水肿的信号通路中 TNF- α 可能是 Ca^{2+} 的上游信号。这为进一步治疗创伤后脑水肿提供新的依据。

参考文献

- [1] 马定军,刘佰运,郝淑煜,等. 颅脑创伤数据库平台的建立与初步应用[J]. 中华神经外科杂志, 2014, 30(2): 159-61.
- [2] Jones P G, Kool B, Dalziel S, et al. Time to cranial computerized tomography for acute traumatic brain injury in paediatric patients: effect of the shorter stays in emergency departments target in New Zealand[J]. J Paediatr Child Health, 2017, 53(7): 685-90.
- [3] Balu R. Inflammation and immune system activation after traumatic brain injury[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2014, 14(10): 484.
- [4] Jha M K, Lee H W, Kim S Y, et al. Innate immune proteins as biomarkers for CNS injury: critical evaluation (W02013119673 A1) [J]. Expert Opin Ther Pat, 2015, 25(2): 241-5.
- [5] Frugier T, Morganti-Kossmann M C, O'Reilly D, et al. In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury[J]. Neurotrauma, 2010, 27(3): 497-507.
- [6] 王佳,张红玉. 不同程度颅脑损伤后炎症因子的表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 3(26): 72-5.
- [7] Salvador E, Burek M, Förster C Y. Stretch and/or oxygen glucose deprivation (OGD) in an *in vitro* traumatic brain injury (TBI) model induces calcium alteration and inflammatory cascade[J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 323.
- [8] Baratz R, Tweedie D, Wang J Y, et al. Transiently lowering tumor necrosis factor- α synthesis ameliorates neuronal cell loss and cognitive impairments induced by minimal traumatic brain injury in mice[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 45.
- [9] Kim J Y, Kim N, Yenari M A, et al. Hypothermia and pharmacological regimens that prevent overexpression and overactivity of the extracellular calcium-sensing receptor protect neurons against traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2013, 30(13): 1170-6.
- [10] Weber J T. Altered calcium signaling following traumatic brain injury[J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 60.
- [11] Rao W, Zhang L, Peng C, et al. Downregulation of STIM2 improves neuronal survival after traumatic brain injury by alleviating calcium overload and mitochondrial dysfunction[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(11): 2402-13.
- [12] 李成长. Feeney's 脑外伤模型造模体会[J]. 医药前沿, 2013(26): 318-9.
- [13] Ahn M J, Sherwood E R, Prough D S, et al. The effects of traumatic brain injury on cerebral blood flow and brain tissue nitric oxide levels and cytokine expression[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(10): 1431-42.
- [14] 郭梅凤,孙宝玲. 急性颅脑损伤患者血清 TNF- α 和 IL-2 水平的变化及临床意义[J]. 实用临床医学, 2012, 13(3): 1-3.
- [15] 李燕华,孙善全. 大鼠脑出血后 AQP4 mRNA 的表达与 Ca^{2+} 关系的探讨[J]. 中国急救医学, 2003, 23(7): 1-3.
- [16] Finnie J W, Blumbergs P C, Manavis J. Aquaporin-4 expression after experimental contusional injury in an ovine impact-acceleration head injury model[J]. J Clin Neurosci, 2011, 18(7): 947-50.
- [17] Gandham E J, Vasudevan P, Moorthy R K, et al. Cortical Aquaporin-4 in relation to brain oedema and neurological function of cortical cryo-injured mice[J]. J Clin Neurosci, 2017, 44: 294-9.
- [18] Lv Q, Fan X, Xu G, et al. Intranasal delivery of nerve growth factor attenuates aquaporins-4-induced edema following traumatic brain injury in rats[J]. Brain Res, 2013, 1493: 80-9.

Study on the correlation between TNF- α and Ca^{2+} in traumatic brain edema in rats

He Jimin¹, Zheng Xiaomei², Zhang Ye¹, et al

(¹Dept of Neurosurgery, ²Dept of Neurology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

Abstract Objective To investigate the relationship between tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Ca^{2+} in cere-

网络出版时间: 2018-5-23 14:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.011.html>

普伐他汀钠对 LPS 诱导的中性粒细胞 NE 释放及活性的影响

陈雨虹 戴敏 梅晓冬

摘要 目的 研究普伐他汀钠对细菌脂多糖(LPS)诱导的人外周血中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)释放及活性的影响。方法 采用Ficoll密度梯度离心法分离培养人外周血中性粒细胞,瑞氏染色法鉴定中性粒细胞及胞内嗜天青颗粒,使用LPS刺激中性粒细胞脱颗粒,提取细胞上清液,应用比色法检测上清液中过氧化物酶(MPO)活性以确定合适的刺激时间和浓度后,给予中性粒细胞LPS刺激同时予以普伐他汀钠处理,使用ELISA法检测细胞培养上清液NE含量,比色法检测NE活性。结果 LPS刺激后中性粒细胞培养上清液中NE的含量和活性均明显增高。普伐他汀钠处理后的细胞培养上清液中NE明显降低($P < 0.05$)。结论 普伐他汀

钠能降低LPS刺激导致的中性粒细胞脱颗粒,降低NE释放量及其活性。

关键词 普伐他汀钠;中性粒细胞弹性蛋白酶;脂多糖;过氧化物酶

中图分类号 R 452

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0880-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.011

中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)是一种存在于中性粒细胞嗜天青颗粒中的丝氨酸蛋白酶,基因结构为ELA2,是在19号染色体短臂末端区域内含50个碱基的片段,含有218种氨基酸和4个二硫键,是丝氨酸蛋白酶家族的一份子。当中性粒细胞暴露于各种细胞因子和趋化因子刺激下时可释放NE,如肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素IL-8、C5a、细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和来自细菌壁FMLP的三肽^[1]。

2017-12-14 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1308085MH115)

作者单位:安徽医科大学附属安徽省立医院呼吸内科,合肥 230001

作者简介:陈雨虹,女,硕士研究生;

梅晓冬,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: hfmxd@sina.com

bral edema after traumatic brain injury and its possible relationship with aquaporin 4 (AQP-4) in brain edema. **Methods** The animal models of traumatic brain injury were established by free-fall attack method and divided into four groups according to the treatment methods: blank control group, simple treatment group, cyclobutepan (TNF- α inhibitor) treatment group, nimodipine (Ca²⁺ channel blockers) treatment group. Western blot and PCR were used to detect the expression of TNF- α and AQP-4 expression in each group and the Ca²⁺ concentration in brain tissue was detected by GENMED cell Ca²⁺ concentration assay. At the same time, the degree of brain edema in traumatic rats in each group was detected by pathological examination. **Results** ① After traumatic brain injury, the expression of TNF- α , AQP-4 and the content of Ca²⁺ in the brain tissue of rats treated with traumatic brain injury were significantly higher than those in the blank control group. ② Compared with the group treated with cyclopentanone alone, the expression of TNF- α and AQP-4 in the brain tissue of rats decreased significantly, while the content of Ca²⁺ in the brain tissue decreased. The brain edema was found by imaging, the brain edema of rats in treatment group was light. ③ The content of Ca²⁺ in brain tissue of nimodipine-treated group was significantly lower than that of the untreated group, the expression of AQP-4 was significantly decreased, while the expression of TNF- α had no significant change. Imaging showed cerebral edema, but more than the simple treatment of rats brain edema lighter. ④ Compared with nimodipine-treated rats, the rats treated with cyclopentanone had slightly lighter brain edema after treatment with Ca²⁺ channel blocker, but the difference was not obvious. **Conclusion** The expression of TNF- α and Ca²⁺ in brain tissue are significantly increased after traumatic brain injury. TNF- α and Ca²⁺ are involved in brain edema, and TNF- α may be Ca²⁺ upstream signal in brain edema after trauma. TNF- α may be involved in post-traumatic brain edema by affecting brain cell calcium overload.

Key words traumatic brain injury; TNF- α ; Ca²⁺; TNF- α inhibitor; Ca²⁺ channel blockers; brain edema