

抗坏血酸对创伤性脑损伤的保护作用

张 昊^{1,2,3}, 刘佰运^{1,2,3,4}, 茆 翔^{2,5}

摘要 目的 探讨抗坏血酸对颅脑创伤后引起的继发性脑损伤的保护作用。方法 将实验大鼠随机分为假手术+生理盐水组、假手术+抗坏血酸组、打击+生理盐水组、打击+抗坏血酸组,每组12只。建立中度颅脑损伤模型,颅脑创伤后24 h进行神经功能损伤评分,测定脑含水量及血脑屏障的通透性;采用Western blot法测定颅脑创伤后24 h的损伤侧脑组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和水通道蛋白4(AQP-4)的表达情况。结果 与打击+生理盐水组比较,打击+抗坏血酸组的神经功能损伤程度减轻($P < 0.05$),脑水肿程度降低($P < 0.05$),血脑屏障的破坏程度明显降低($P < 0.05$),TNF- α 和AQP-4的含量降低($P < 0.05$)。结论 抗坏血酸可以减轻打击后脑水肿和血脑屏障的破坏,起到脑保护的作用。

关键词 颅脑创伤;抗坏血酸;脑水肿;氧化应激

中图分类号 R 651.15

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1734-05

颅脑创伤是严重威胁人类健康的公害之一^[1]。机体遭受外伤性脑损伤后所发生的各种继发性脑损伤是导致迟发性神经元障碍和死亡的主要原因^[2]。创伤性脑水肿,血脑屏障的破坏和开放是外伤性脑损伤后发生的常见的继发性脑损伤^[3],在创伤早期即已发生,随着时间的推移进一步加重。最新研究^[4]表明,炎症反应在继发性脑损伤中起重要作用,造成血脑屏障的破坏,加重脑水肿的发生和发展。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是引起颅脑创伤后神经元损伤的主要介质之一。

2015-09-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81471238)

作者单位:¹安徽医科大学武警总医院临床学院,北京 100039

²北京市神经外科研究所颅脑创伤室、国家神经系统疾病临床医学研究中心、北京脑重大疾病研究院神经损伤与修复研究所、中枢神经系统损伤研究北京市重点实验室,北京 100050

³中国人民武装警察部队总医院神经创伤科,北京 100039

⁴首都医科大学附属北京天坛医院神经外科,北京 100050

⁵安徽医科大学第一附属医院神经外科,合肥 230022

作者简介:张 昊,男,硕士研究生;

刘佰运,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: liubaiyun1212@163.com

探讨如何减轻打击后继发性脑损伤及其可能的机制显得十分重要^[5]。抗坏血酸是一种抗氧化剂,能保持巯基酶的活性和谷胱甘肽的还原状态,防止自由基对人体的伤害。研究^[6]表明,抗坏血酸可延缓外伤后早期的氧化应激,延缓打击后病情的发展,在临床上补充抗坏血酸已成为减轻继发性脑损伤的重要方法。然而抗坏血酸对颅脑创伤的保护原理及机制为何,之前的试验研究却未有涉及。该实验将使用抗坏血酸对颅脑创伤后的大鼠进行干预,研究颅脑创伤加重的可能机制,并探讨抗坏血酸对颅脑创伤保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 成年健康雄性SD大鼠,重(270 \pm 15)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。实验动物随机分为假手术+生理盐水组、假手术+抗坏血酸组、打击+生理盐水组、打击+抗坏血酸组,每组12只。

1.2 试剂及药品 抗坏血酸;10%水合氯醛;BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物公司);水通道蛋白4抗体(aquaporin-4, AQP-4)(ab9512,英国Abcam公司);大鼠TNF- α 的ELISA试剂盒(BMS622,美国eBioscience公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的建立 4组大鼠按400 mg/kg采用10%水合氯醛麻醉,取头皮正中切口,分离骨膜,暴露颅骨。在右侧前囟和人字缝尖中间,开直径为5 mm的骨窗,注意保持硬膜完整。将大鼠固定于立体定位仪上。将撞击锤(直径为4 mm)安置于颅窗内,紧贴硬膜。采用PinPoint™颅脑损伤撞击器,建立中度损伤的可控性皮质打击模型,打击条件:撞击速度2 m/s,撞击深度2.5 mm,接触时间85 ms。术后缝合创口。假手术组大鼠除不进行撞击外,其余手术操作同打击组。术中用恒温手术台维持实验大鼠肛温(37.0 \pm 0.5)℃。

1.3.2 给药 生理盐水和抗坏血酸均采用腹腔注射的给药途径。生理盐水注射剂量为5 ml/kg,抗坏血酸注射剂量为200 mg/kg,注射时间均为伤后即

刻开始。

1.3.3 神经功能缺损评分 在损伤后 24 h 对各组大鼠进行神经功能缺损评分,采用 18 分的神经功能量表从感觉试验、平衡试验、反射试验等方面评价实验大鼠的神经功能缺损程度。分数越高,神经功能缺损程度越重,采用双盲法对各组进行评分。

1.3.4 脑含水量的测定 在损伤后 24 h 测定大鼠的脑水肿程度^[7]。脑水肿通常通过脑含水量进行测定,采用干湿重的方法测量脑含水量。脑含水量(%) = [(湿重 - 干重) / 湿重] × 100%。

1.3.5 血脑屏障通透性的测定 采用伊文氏蓝(evans-blue, EB)测定血脑屏障的通透性,处死前 2 h 自股静脉注入 2% EB 溶液(20 mg/kg),平衡后取出脑组织,加甲酰胺溶液 3 ml,加盖避光于 54 °C 水浴箱中萃取 3 d,在紫外分光光度计下测量提取液的光密度(optical density, OD)值,使用分光光度计(620 ~ 680 nm)测得其 OD 值,计算大鼠脑组织中 EB 含量。

1.3.6 TNF-α 含量的测定 取打击同侧的海马组织,准确称取组织重量,剪碎标本,加入 PBS(pH = 7.0 ~ 7.4)充分混合,3 660 r/min 离心 20 min 后取上清液。切割标本,称取质量。加入 PBS 充分混合,混合后的缓冲液中可加入 1 μg/L 蛋白酶抑制剂。

1.3.7 Western blot 法检测 裂解的蛋白置于 100 °C 水浴 10 min 后,上样于 10% SDS-PAGE 中进行电泳;后将蛋白转印于硝酸纤维素膜上,将该膜浸于 50 g/L 奶粉的 1 × TBST 中室温轻摇 60 min 用于封闭非特异性结合位点,1 × TBST 洗 3 次,每次 5 min。加入兔抗大鼠 AQP-4 抗体,4 °C 孵育过夜,后移去一抗,1 × TBST 洗 3 次,每次 5 min。加入二抗(辣根过氧化物酶标记的抗羊和抗兔 IgG,1 : 5 000),室温孵育 1 h, ECL 光化学法显色并拍片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,对于连续变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;对于分级变量采用百分比(%)表示;对于连续变量,运用 Kolmogorov-Smirnov 检验方法对数据进行正态性检验,而后进行方差齐性的分析。对于两组正态连续变量,使用 *t* 检验进行比较。采用 ANOVA 方差分析及 post-hoc 检验或秩和检验对多组计量资料进行比较。

2 结果

2.1 神经功能损伤评分 24 h 后,假手术 + 生理盐水组的神经功能损伤评分为(1.0 ± 0.2)分,假手术 + 抗坏血酸组的神经功能损伤评分为(0.9 ± 0.3)分,打击 + 生理盐水组的神经功能损伤评分为(7.9 ± 2.1)分,打击 + 抗坏血酸组的神经功能损伤评分为(7.9 ± 2.1)分。打击 + 生理盐水组的神经功能损伤评分明显高于假手术 + 生理盐水组、假手术 + 抗坏血酸组和打击 + 抗坏血酸组($P < 0.05$)。假手术 + 生理盐水组、假手术 + 抗坏血酸组与打击 + 抗坏血酸组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

分,打击 + 抗坏血酸组的神经功能损伤评分为(7.9 ± 2.1)分。打击 + 生理盐水组的神经功能损伤评分明显高于假手术 + 生理盐水组、假手术 + 抗坏血酸组和打击 + 抗坏血酸组($P < 0.05$)。假手术 + 生理盐水组、假手术 + 抗坏血酸组与打击 + 抗坏血酸组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

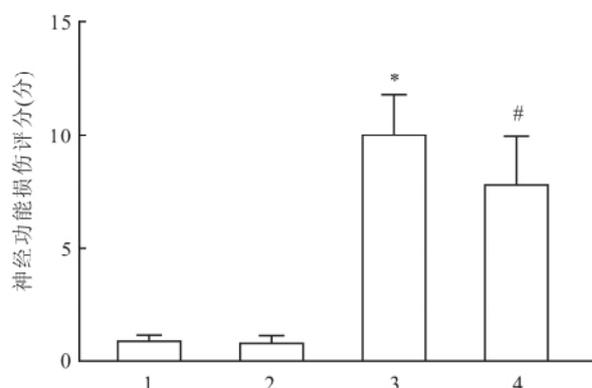


图 1 神经损伤评分

1: 假手术 + 生理盐水组; 2: 假手术 + 抗坏血酸组; 3: 打击 + 生理盐水组; 4: 打击 + 抗坏血酸组; 与其余 3 组比较: * $P < 0.05$; 与打击 + 生理盐水组比较: # $P < 0.05$

2.2 脑含水量 24 h 后,假手术 + 生理盐水组的脑含水量为(82.4 ± 0.1)%,假手术 + 抗坏血酸组的脑含水量为(82.8 ± 0.15)%,打击 + 生理盐水组的脑含水量为(83.6 ± 0.25)%,打击 + 抗坏血酸组的脑含水量为(82.9 ± 0.17)%。分别与假手术 + 生理盐水、假手术 + 抗坏血酸组比较,打击 + 生理盐水组和打击 + 抗坏血酸组脑含水量明显增加($P < 0.05$);但打击 + 抗坏血酸组脑含水量低于打击 + 生理盐水组($P < 0.05$),见图 2。

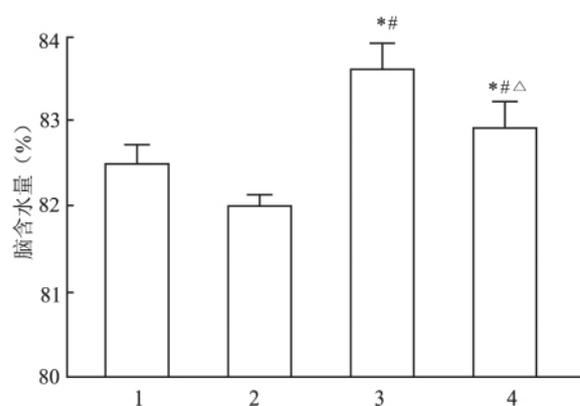


图 2 脑含水量的评分

1: 假手术 + 生理盐水组; 2: 假手术 + 抗坏血酸组; 3: 打击 + 生理盐水组; 4: 打击 + 抗坏血酸组; 与假手术 + 生理盐水组比较: * $P < 0.05$; 与假手术 + 抗坏血酸组比较: # $P < 0.05$; 与打击 + 生理盐水组比较: Δ $P < 0.05$

2.3 血脑屏障通透性 打击 + 生理盐水组和打击 + 抗坏血酸组的 EB 含量均高于假手术 + 生理盐水组和假手术 + 抗坏血酸组 ($P < 0.05$) ,而打击 + 抗坏血酸组的 EB 含量低于打击 + 生理盐水组 ($P < 0.05$) ,见图 3。

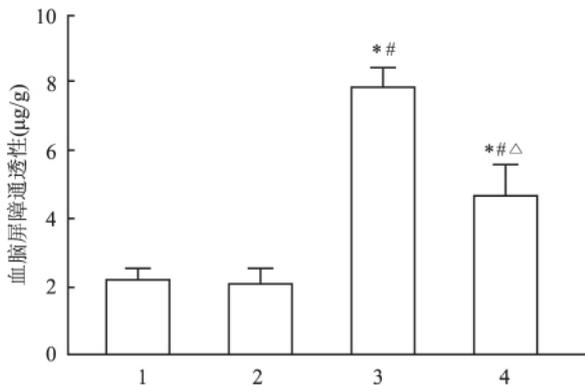


图3 血脑屏障的通透性

1: 假手术 + 生理盐水组; 2: 假手术 + 抗坏血酸组; 3: 打击 + 生理盐水组; 4: 打击 + 抗坏血酸组; 与假手术 + 生理盐水组比较: * $P < 0.05$; 与假手术 + 抗坏血酸组比较: # $P < 0.05$; 与打击 + 生理盐水组比较: Δ $P < 0.05$

2.4 TNF-α 的含量 分别与假手术 + 生理盐水和假手术 + 抗坏血酸组比较 ,打击 + 生理盐水组和打击 + 抗坏血酸组 TNF-α 表达明显增加 ($P < 0.05$) ; 与打击 + 生理盐水比较 ,打击 + 抗坏血酸组 TNF-α 表达减少 ($P < 0.05$) ,见图 4。

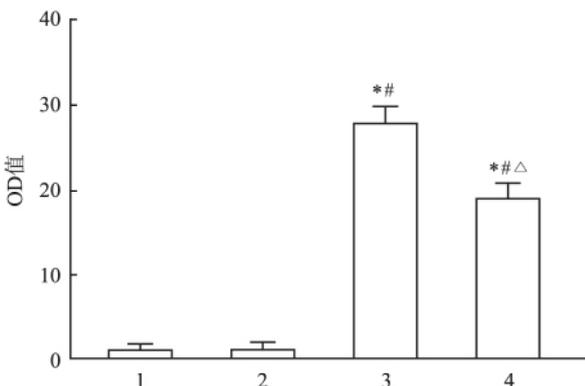


图4 TNF-α 的含量

1: 假手术 + 生理盐水组; 2: 假手术 + 抗坏血酸组; 3: 打击 + 生理盐水组; 4: 打击 + 抗坏血酸组; 与假手术 + 生理盐水组比较: * $P < 0.05$; 与假手术 + 抗坏血酸组比较: # $P < 0.05$; 与打击 + 生理盐水组比较: Δ $P < 0.05$

2.5 AQP-4 的含量 分别与假手术 + 生理盐水和假手术 + 抗坏血酸组比较 ,打击 + 生理盐水组和打击 + 抗坏血酸组 AQP-4 表达明显增加 ($P < 0.05$) ; 与打击 + 生理盐水组比较 ,打击 + 抗坏血酸组 AQP-4 表达减少 ($P < 0.05$) ,见图 5。

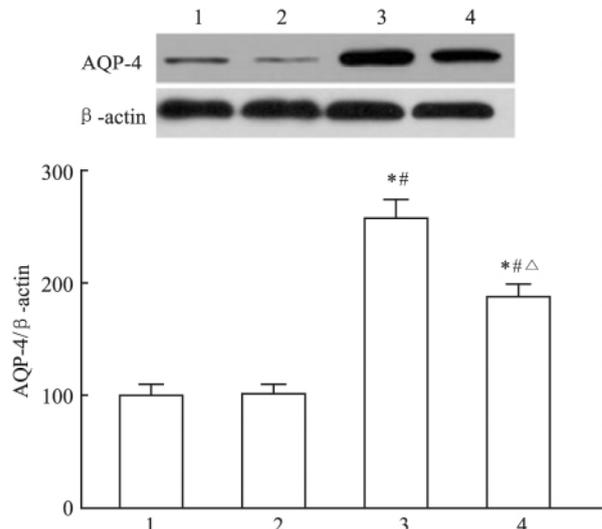


图5 AQP-4 含量

1: 假手术 + 生理盐水组; 2: 假手术 + 抗坏血酸组; 3: 打击 + 生理盐水组; 4: 打击 + 抗坏血酸组; 与假手术 + 生理盐水组比较: * $P < 0.05$; 与假手术 + 抗坏血酸组比较: # $P < 0.05$; 与打击 + 生理盐水组比较: Δ $P < 0.05$

3 讨论

颅脑创伤致残率、致死率高 ,给社会和家庭带来巨大负担 ,近几年学者们主要集中研究颅脑创伤后的继发性脑损伤 ,尤其是颅脑创伤后的缺血低氧性损伤^[8]。本实验表明 ,打击 + 生理盐水组的神经功能损伤评分、脑组织含水量、血脑屏障的通透性、TNF-α 和 AQP-4 的含量明显高于假手术 + 生理盐水和假手术 + 抗坏血酸组 ,而打击 + 抗坏血酸组在给予抗坏血酸治疗后 ,各项指标均明显降低;说明抗坏血酸能够抑制颅脑创伤后脑水肿的发展 ,降低颅内压的进一步升高和神经元的死亡;降低血脑屏障的破坏 ,减轻脑组织的炎症反应 ,从而抑制颅脑创伤后继发性脑损伤的进一步发展。

炎症反应被认为在颅脑创伤后继发性脑损伤的发生中起关键作用。TNF-α 参与中神经系统的免疫应答和炎症反应。研究^[9]表明颅脑创伤后 ,TNF-α 在脑内局部的浓度迅速升高 ,通过活化了脑内的星形胶质细胞和小胶质细胞 ,继而引起一系列的损伤变化。本实验结果显示 ,抗坏血酸在创伤性脑损伤引起的继发性脑损伤中可以通过抑制炎症因子 TNF-α 的表达 ,从而减轻脑水肿和血脑屏障的破坏。

AQP-4 在脑组织中广泛分布于星形胶质细胞终突的末端 ,在介导水跨胞膜的流动中起着关键作用。研究^[10]表明 AQP-4 表达量的高低 ,与脑水肿产生及脑组织损伤呈正相关性。星形胶质细胞膜上的 AQP-4 蛋白增加 ,可促进足突的水肿 ,导致血脑屏障

结构进一步被破坏,加重继发性脑损伤。本实验结果进一步说明了抗坏血酸可以抑制 AQP-4 的表达,减少血脑屏障紧密连接的分解及完整性的破坏,降低血脑屏障的开放及减轻脑水肿。

抗坏血酸为显示抗坏血酸生物活性的化合物的通称,是一种在氧化还原代谢反应中起调节作用的抗氧化剂,其烯二醇结构具有电子供体的特征,在与自由基相结合后,首先失电子生成抗坏血酸自由基,紧接着再次失电子,形成稳定的去氢抗坏血酸,从而起到了清除自由基的功效^[11]。本实验表明抗坏血酸较好地消除了自由基对神经细胞的损害,减少了细胞毒性脑水肿;降低了血脑屏障的破坏,从而减少了血中大分子物质及水分从脑血管内渗出从而进入脑组织内后累积于脑细胞外间隙造成的血管源性脑水肿,起到了颅脑创伤后的保护作用。本研究结果提示,打击加重的可能机制为:当机体遭受外伤性脑损伤时,处于低氧状态,通过酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化产物,如醛基、酮基、羟基、羧基、氢过氧基以及新的氧自由基。脂质过氧化还通过链式或链式支链反应,放大活性氧的作用,造成各种继发性脑损伤,颅脑创伤后的氧化应激反应在继发性脑损伤中起重要的作用。抗坏血酸作为一种抗氧化剂,通过自身与自由基的结合反应和保护其他抗氧化剂的途径,有效的防止自由基对人体的伤害^[12],起到了抗氧化应激的作用。因此抗坏血酸对减轻颅脑创伤后的继发性脑损伤具有较好的神经功能保护作用。本实验为抗坏血酸进一步应用于临床治疗提供了重要的实验依据,为颅脑创伤的临床治疗提供了新思路,但涉及的具体机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 张赛,李建国. 神经创伤新进展 4 [M]. 天津:南开大学出版社 2012.
- [2] Gerber L M, Ni Q, Hartl R, et al. Impact of falls on early mortality from severe traumatic brain injury [J]. J Trauma Manag Outcomes, 2009, 3: 9.
- [3] McConeghy K W, Hatton J, Hughes L, et al. A review of neuroprotection pharmacology and therapies in patients with acute traumatic brain injury [J]. CNS Drugs, 2012, 26(7): 613-36.
- [4] 张小年,张皓. 创伤性颅脑损伤国内研究进展 [J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(2): 101-3.
- [5] Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals [J]. Am J Clin Nutr, 1991, 54(6 Suppl): 1119S-24S.
- [6] Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, et al. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities and motor and cognitive functions [J]. J Neurotrauma, 2008, 25(4): 324-33.
- [7] del Zoppo G J, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(8): 879-94.
- [8] Kniessel U, Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier [J]. Cell Mol Neurobiol, 2000, 20(1): 57-76.
- [9] Ashman T A, Gordon W A, Cantor J B, et al. Neurobehavioral consequences of traumatic brain injury [J]. Mt Sinai J Med, 2006, 73(7): 999-1005.
- [10] Fujimoto S T, Longhi L, Saatman K E, et al. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2004, 28(4): 365-78.
- [11] Pierce D R, Cook C C, Hinson J A, et al. Are oxidative mechanisms primary in ethanol induced Purkinje neuron death of the neonatal rat? [J]. Neurosci Lett, 2006, 400(1-2): 130-4.
- [12] Yamamoto M, Ramirez S H, Sato S, et al. Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells [J]. Am J Pathol, 2008, 172(2): 521-33.

The protective effect mechanisms about ascorbic acid on traumatic brain injury in rats

Zhang Hao^{1,2,3}, Liu Baiyun^{1,2,3,4}, Mao Xiang^{2,5}

(¹General Hospital of Armed Police Forces Clinical College of Anhui Medical University, Beijing 100039;

²Neurotrauma Laboratory, Beijing Neurosurgical Institute, Capital Medical University, China National Clinical Research Center for Neurological Diseases, Nerve Injury and Repair Center of Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing Key Laboratory of Central Nervous System Injury, Beijing 100050; ³Dept of Neurotrauma, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039; ⁴Dept of Neurosurgery, Beijing Tian Tan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050; ⁵Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the protective effect of ascorbic acid on secondary brain injury caused by trau-

组织因子途径抑制物-2 抑制人前列腺癌细胞的上皮间质转化

刘树瀚¹, 宣强¹, 谈宜傲¹, 吴本鹤¹, 孙凌峰¹, 乔龙标¹, 翟路路², 孙友文¹, 周林玉¹

摘要 目的 探讨组织因子途径抑制物-2(TFPI-2)对人前列腺癌细胞上皮间质转化的影响。方法 将人前列腺癌细胞株 PC3M 进行培养,并分为 3 组,分别转染 TFPI-2 基因真核表达载体、空载体及不转染,细胞划痕实验和细胞侵袭小室实验检测 3 组细胞的迁移能力和侵袭能力,用转化生长因子- β 1(TGF- β 1)处理细胞,倒置相差显微镜下观察 3 组细胞形态,Western blot 法和逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法分别检测转染组、转染空载体组及未转染组上皮间质转化标志物-E 钙黏素(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)和 snail 在蛋白和 mRNA 水平上的表达量。结果 细胞划痕实验和细胞侵袭小室实验结果显示,转染 TFPI-2 基因真核表达载体的 PC3M 细胞迁移率较低($P < 0.05$),侵袭细胞数较少($P < 0.05$);显微镜下观察显示转染组细胞大多呈上皮型,转染空载体组及未转染组细胞大多呈间叶型;Western blot 法和 RT-PCR 法检测结果显示,无论在蛋白水平还是 mRNA 水平,转染组较转染空载体组及未转染组 E-cadherin 表达产物较多,vimentin 和 snail 蛋白表达产物较少,差异有统计学意义($P < 0.05$),转染空载体组及未转染组差异无统计学意义。结论 TFPI-2 可以抑制人前列腺癌细胞的上皮间质转化,这是其抑制前列腺癌细胞侵袭与转移的可能机制之一,为基因及生物靶向治疗前列腺癌提供新的思路和方向。

关键词 组织因子途径抑制物-2;前列腺癌;上皮间质转化
中图分类号 R 737.25
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1738-06

前列腺癌是世界范围内第二常见的男性恶性肿瘤^[1],在美国其发病率已经跃居第一位^[2]。近年来,前列腺癌在我国的发病率也迅速增长,日益威胁老年男性健康。肿瘤的侵袭、转移以及复发是前列腺癌患者死亡的重要原因,因此,探索其发生的潜在机制并积极寻找有效的治疗方法已成为人类医学研究的热点。近年来研究^[3]显示,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是促进包括前列腺癌在内的恶性肿瘤侵袭和转移的关键因素之一。组织因子途径抑制物-2(tissue factor pathway inhibitor-2, TFPI-2)在抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、转移以及肿瘤血管生成等一系列生理和病理过程中扮演着重要角色,大多数学者认为 TFPI-2 作为一种广谱蛋白酶抑制剂,是通过抑制纤溶酶、胰蛋白酶、基质金属蛋白酶等多种蛋白酶降解细胞外间质来发挥作用的,但其是否通过抑制 EMT 从而抑制前列腺癌的侵袭与转移,目前国内外并无研究。该研究首次将 TFPI-2 与前列腺癌细胞 EMT 联系起来,在形态学上及分子水平上观察 TFPI-2 对前列腺癌细胞 EMT 是否有影响,为明确肿瘤的侵袭、转移机制以及寻找新的治疗策略提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料

2015-08-28 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MH181)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹ 泌尿外科、² 胆胰外科,合肥 230001

作者简介:刘树瀚,男,硕士研究生;

周林玉,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhouliny6@126.com;

宣强,男,副主任医师,责任作者,E-mail:93873951@qq.com

matic brain injury and its possible mechanism. **Methods** The rats were randomly divided into sham + saline group, sham + ascorbic acid group, hit + saline group and hit + ascorbic acid groups. Moderate traumatic brain injury model was established, 24 hours after traumatic brain injury, the neurological injury score, brain water content and permeability of blood brain barrier were evaluated. 24 hours after traumatic brain injury, the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and aquaporin 4 (AQP-4) in damaged brain tissue were evaluated by Western blot method. **Results** Compared with the hit + saline group, the hit + ascorbic acid group's degree of neurologic injury mitigated and brain edema reduced, the extent of damage to blood brain barrier reduced significantly, TNF- α and AQP-4 reduced. **Conclusion** Ascorbic acid can reduce brain edema and fight against the destruction of the blood brain barrier.

Key words traumatic brain injury; ascorbic acid; brain edema; oxidative stress