

TBI 大鼠神经功能及凋亡基因表达的变化

谢文友 吴玉麟 杨燕汝 邵强

【摘要】 目的 探讨 TBI 大鼠神经行为学及凋亡基因 Bcl-2, Bcl-xl, Caspase-3, Bax 在 TBI 大鼠中的表达意义, 为了解 TBI 神经行为学变化提供分子依据。**方法** 40 只 SD 大鼠随机分为 5 组 ($n=8$): 假手术组、TBI 1 h 组、TBI 6 h 组、TBI 24 h 组、TBI 7 d 组。采用自由落体致大鼠皮质运动区脑损伤模型, 术后 1 d、3 d、5 d、7 d 行改良神经功能缺失表 (NSS) 评分, 观察动物运动和平衡功能缺损与恢复情况; 并于不同时间点开颅取脑组织, TUNEL 染色法观察脑组织细胞凋亡形态学变化, RT-PCR 检测出血周围脑组织 Bcl-2, Bcl-xl, Caspase-3, Bax 的表达。**结果** 与假手术组比较, TBI 组 NSS 评分明显增加 ($P<0.05$); 进而 TBI 组术后第 1 d、3 d、5 d、7 d 对比, NSS 评分又呈减少趋势, 各时间点间比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); RT-PCR 检测显示在被检测的 4 个凋亡因子中, 仅 Bcl-2 在脑外伤后 1 h 开始降低, 6 h 降到最低谷, 与假手术组相比, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。然后 24 h 开始回升, 到 7 d 时上升到最高峰, 与 6 h 组相比 ($P<0.05$)。TUNEL 染色发现 TBI 组术后 6 h 凋亡百分率显示有大量细胞凋亡, 而至 7 d 时, 凋亡百分率显著减少 ($P<0.05$)。**结论** 脑外伤诱导皮质细胞凋亡, 神经功能先下降, 而后有所恢复, 其可能与皮质 Bcl-2 先降后升有关。

【关键词】 大鼠脑挫伤; 凋亡基因; 神经功能评价

The change of nerve function and apoptotic gene expression after traumatic brain injury in rats XIE Wen-you. Department of neurosurgery, Yangjiang People's Hospital, Yangjiang, Guangdong, 529500, China.

【Abstract】 Objective Discuss neuroethology and significance of the expression of apoptotic gene Bcl-2, Bcl-xl, Caspase-3, Bax meaning in TBI rats, to provide molecular basis for understanding the neurological deficits in TBI rats. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into five groups ($n=8$): Sham group, traumatic brain injury 1h, traumatic brain injury 6h, traumatic brain injury 24h group, TBI 7d group. Feeney free falling method was used to establish TBI models. Neurological function were evaluated according to the modified neurological severity score (NSS) at 1, 3, 5, 5days. The movement and balance deficits and recovery of the animals were observed. And at different time point brain tissue were removed. TUNEL staining method was used to observe morphology. RT-PCR was used for the detection of Bcl-2, Bcl-xl, Caspase-3 and Bax expression in brain tissue around bleeding. **Results** Compared with the sham group, NSS score in TBI groups were significantly increased ($P<0.05$). Furthermore, NSS rates in TBI groups postoperative tended to decrease as the time went on and the differences among each time points were statistically significant ($P<0.05$). RT-PCR analysis showed that among the detected four-apoptotic factors, only Bcl-2 began to decrease at one hour after traumatic brain injury and got the lowest after 6 hours, there was a statistically significance when compared with the sham group ($P<0.05$). TUNEL staining found a large percentage of apoptosis in TBI group after 6h, at the 7th d, the percentage of apoptosis was significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusions** TBI-induced apoptosis in the cortex, the nerve function firstly reduces and then been restored, it may correlated with the expression of Bcl-2.

【Key words】 Traumatic brain injury; Apoptotic genes; Neurological severity score

外伤性颅脑损伤 (Traumatic Brain Injury, TBI) 是致残率及致死率占全身各器官损伤之首的常见神经外科疾病^[1]。TBI 的病理生理过程与创伤后 24 小时兴奋性氨基酸、钙离子、自由基、细胞因子等在胞外明显增加, 星形胶质细胞、小胶质细胞激活导致神经元受损、功能障碍有关^[2-3]。细胞凋亡是细胞受到某种信号或某些因素刺激后发生的一种主动的、由多种基因蛋白参与的细胞程序性死亡。促凋亡基因如 Bax、Bak、Bad、Caspase-3 以及抑凋亡基因如 Bcl-2、Bcl-xl 等在细胞凋亡进程中发挥重要作用^[4-5]。过去的研究虽分析了凋亡因子与 TBI 的关系, 但争议较大, 说法不一; 而且没有在基因水平上进行不同时

间点比较的系统研究。本研究在既往研究的基础上系统研究了凋亡基因在 TBI 后的动态变化, 并观察了脑细胞凋亡指征及神经行为学变化, 为了解三者关系提供实验支持。

材料与方法

1. 材料: (1) 实验动物及分组: SD 成年健康雄性大鼠, 由昆明医科大学动物中心提供, 体重 220 g 左右。随机分为假手术组 (Sham 组只切开头皮和凿开颅骨); TBI 1 h 组; TBI 6 h 组; TBI 24 h 组; TBI 7 d 组。每组根据实验需要确定大鼠数量以满足实验要求, 每组其中至少 5 只动物用于 1 h、6 h、24 h、7 d 取材形态学检测, 存活 7 d 组和假手术组于术后第 1 d、3 d、5 d、7 d 进行 NSS 评分。(2) 设备: 显微镜; RT-PCR 仪。

2.方法:(1)脑外伤模型制备:采用改良的 Feeney 氏^[6]法自由落体撞击制作脑外伤模型。术后认真观察及护理大鼠,前 3 天每天一次给予青霉素 5 万单位腹腔注射防止感染。(2)大鼠的神经功能缺损评分:参照文献报道^[7]的神经功能缺损评分表(Neurological Severity Scores, NSS),对其细分后制作改良 NSS 评分表。分别于损伤后 1 d、7 d、14 d 由不了解实验分组情况、经过培训的研究人员,对各组大鼠进行神经功能缺损盲法评分。(3)原位末端标记法(TUNEL)染色:将动物麻醉,4%多聚甲醛心脏灌注固定,取各组脑组织后固定,将组织冰冻并切片。结果判定,被标记的凋亡细胞核呈深染的紫蓝色,以显微镜下 400 倍,每组 5 张切片任选 5 个视野,计算平均阳性细胞百分数。(4)大鼠损伤皮质周边区凋亡因子 mRNA 的 RT-PCR 检测:采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)半定量技术检测损伤皮质组织中多种细胞凋亡因子的基因表达(Bcl-2, Bax, Caspase-3 等)。BIO-R 脑外伤凝胶成像仪紫外模式下拍摄凝胶图片,以 β -actin 为内对照进行电泳条带光密度分析,灰度扫描,求得各目的条带与 β -actin

的相对比值,进行统计学分析。(5)样本获取:行为学检测组大鼠经心脏灌注,先行生理盐水冲洗血液,再用含 4%多聚甲醛的磷酸缓冲液灌注固定。取皮质用 4%多聚甲醛后固定 4~6 h,再浸泡在 20%蔗糖的磷酸缓冲液中 4℃过夜。连续冠状冰冻切片,片厚 20 μ m。后续用免疫酶组化染色检测细胞表达细胞因子情况。用于 RT-PCR 检测组大鼠经心脏灌注,先行生理盐水冲洗血液,于术后 1 h、6 h、24 h、7 d 取损伤周围皮质组织冻入-80℃冰箱备用。凋亡染色组大鼠于术后 6 h、7 d 灌注固定取皮质进行凋亡染色。

3.统计学方法:数据以($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 17.0 统计学软件对所得数据进行单因素方差和 *t* 检验进行分析。

结 果

1.神经行为学 NSS 评分:TBI 组大鼠神经行为学评分在术后第 1 d、3 d、5 d、7 d 均高于 Sham 组($P<0.01$),TBI 组术后第 7 d 的 NSS 评分低于第 1 d,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 术后各组大鼠神经行为学评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
Sham 组	8	0.44±0.42	0.44±0.42	0.38±0.35	0.25±0.46
TBI 组	8	9.50±0.71 ^②	9.38±0.92 ^②	8.94±0.42 ^②	8.44±0.68 ^{①②}

注:与 TBI 组第 1 天相比,① $P<0.05$;与 Sham 组相比,② $P<0.01$

2.Sham, TBI6h 组, TBI7d 组细胞凋亡比较:假手术组几乎无凋亡细胞,而 TBI 组见大量细胞凋亡。脑外伤组大脑区阳性凋亡细胞的病理变化是染色质固缩边集、细胞质浓缩,胞浆内出现浓染颗粒,核膜也可出现,质膜分隔胞质,可形成凋亡小体。假手术组(图 1A)见少量细胞凋亡小体,而 TBI6 h 组(图 1B)呈现显著细胞凋亡,凋亡阳性细胞百分数与假手术组相比差异有统计学意义($P<0.05$),进而 TBI 7 d 组(图 1C),凋亡阳性细胞百分数和 TBI 6 h 相比,又明显减少($P<0.05$)。

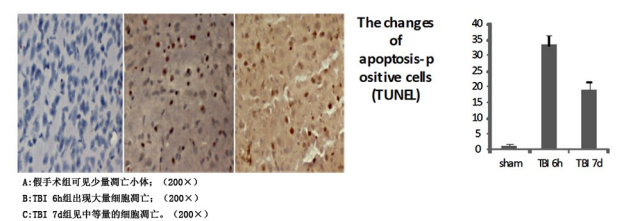


图 1 SHAM、TBI 6h、TBI 7d 组染色结果

3.损伤皮质组织中多种细胞凋亡因子的基因表达的比较:在检测的 4 个因子中,仅 Bcl-2 基因在 TBI 后 1 h 即开始下调,到第 6 h 下调到最低谷,与假手术组相比,有统计学意义($P<0.05$)。随后到第 24

h, Bcl-2 表达开始上调。而至第 7 天时, Bcl-2 上调明显超过 6 h 水平(差异有统计学意义, $P<0.05$),并达到假手术组水平($P>0.05$)。说明 Bcl-2 呈现先降后升。而后回到正常水平的趋势。其它基因均未见明显变化。(见图 2)。

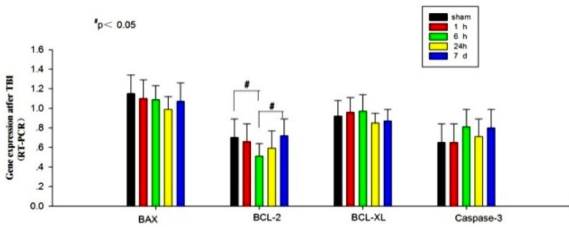


图 2 损伤皮质组织中多种细胞凋亡因子的基因表达的比较

讨 论

本实验采用自由落体撞击造成大脑皮质运动区损伤,用 NSS 评分判定大鼠神经功能, TUNEL 染色法检测细胞凋亡的改变,神经免疫组化定位, RT-PCR 测定 Bcl-2, Bax, Bcl-xl, Caspase-3, Bax 基因表达情况。结果发现 TBI 组术后第 1 d、3 d、5 d、7 d NSS 评分呈减少趋势($P<0.05$)。伤后 7 天较伤后 6 h 脑损伤周边区 TUNEL 阳性细胞百分比显著减少

($P < 0.05$), Bcl-2 表达水平在 TBI 后 1 h 即开始下调,到第 6 h 下调到最低谷,与假手术组相比($P < 0.05$)。随后到第 24 h, Bcl-2 表达开始上调。而至第 7 天时, Bcl-2 上调明显超过 6 h 水平($P < 0.05$)。而 Bcl-xl, Caspase-3, Bax 无显著变化($P > 0.05$)。结果提示: Bcl-2 可能与细胞凋亡、神经功能的恢复有相关性;证实 Bcl-2 在 TBI 后细胞凋亡中发挥重要作用。

近年来的研究证实细胞凋亡参与了脑损伤后病理生理演变的全过程。Bcl-2 基因家族与颅脑损伤转归的关系越来越受学者们的关注, Bcl-2 基因及其家族成员在 TBI 后引起的细胞凋亡中起重要作用,它们共同构成一个非常复杂的相互作用网络,调控细胞凋亡^[8]。

Bcl-2 是内源性抗凋亡因子,在脑损伤后,存活神经细胞中的 Bcl-2 表达增高, Bcl-2 是脑损伤后神经细胞的一种保护因素,因此,理解它的细胞抗凋亡机制非常重要^[9]。在本研究中,假手术组见少数凋亡细胞,而 TBI 6 h 组见大量细胞凋亡,到第 7 d 观察可见少量凋亡细胞。说明 TBI 后先有大量细胞凋亡,而后凋亡细胞可能被清除而至 7 d 逐渐减少。有学者用大鼠建成脑损伤模型也发现随时间推移细胞凋亡逐渐减少,同时脑梗死面积也明显减少^[10]。

本实验研究发现,大脑皮质 Bcl-2 基因在 TBI 后 1 h Bcl-2 即开始下调,到第 6 h 下调到最低谷,而到第 24 h Bcl-2 又开始上调,至第 7 d 时,已回到正常水平。说明 Bcl-2 先降低后上升,其改变可能参与了内、外源性凋亡通路中调控^[11]。需提及的是,本研究中 Caspase-3, Bax, Bcl-xl 因子表达未见明显变化。说明在 TBI 早期,这些因子没有参与修复过程。Xiong M 等人用低温治疗脑损伤大鼠,发现 Bcl-2 上调,减少细胞凋亡。而抑制 Bcl-2 表达时,则逆转这种结果^[12]。Zhou HZ^[13]等人发现 Bax 在中枢神经系统损伤的 6 h, 3 d, 7 d 并没有显著变化,文献报道支持本实验结果。提示脑外伤后抗凋亡因子 Bcl-2 在这个过程发挥了作用。然而关于凋亡基因在脑挫伤后的表达差异已有不同报道,学者发现大鼠 TBI 2 h 后,皮质 Bcl-2 开始下降^[14]。Lee^[15]等人发现大鼠 TBI 后 1-2 天皮质的 Bax 显著增加,4 天后渐下降和 Bcl-2 明显上调。文献报导凋亡因子的表达与本研究不同。

抗凋亡因子 Bcl-2 能够通过抑制细胞凋亡,促进神经行为学的恢复^[16]。本实验结果显示,大鼠给予自由落体撞击伤后,大部分模型颅窗出血严重,行止血后,挫伤部位脑组织肿胀,膨出开颅窗口,后逐渐减弱消失。行为学观察显示,手术组与假手术组

相比麻醉清醒后当天,大部分大鼠发生抽搐、瘫痪、不能正常行走。NSS 评分发现,脑损伤大鼠四肢与躯干失去平衡功能,容易跌落。术后 1 天, TBI 组较假手术组 NSS 评分明显增加,而 TBI 组术后第 1 d, 3 d, 5 d, 7 d 对比, NSS 评分呈减少趋势,说明 TBI 后神经功能先受损,而随着时间的推迟,神经功能有所恢复。提示神经功能的恢复可能与 Bcl-2 的表达有关。文献报道支持本实验结果,说明脑外伤后 Bcl-2 先降低后回升,促进中枢神经系统的功能恢复。

综上所述,通过研究脑外伤后 Bcl-2、Bcl-xl、Caspase-3 蛋白和 Bax 基因调控表达、神经功能缺损以及行为学改变,为进一步研究脑外伤的自我修复机制,探讨中枢神经系统的可塑性提供重要参考指标,从而为临床治疗脑外伤提供更有利的理论支持。

参 考 文 献

- [1] Walker PA, Shah SK, Harting MT, et al. Progenitor cell therapies for traumatic brain injury: barriers and opportunities in translation [J]. Dis Model Mech, 2009, 2(1-2): 23-38.
- [2] McIntosh TK, Juhler M, Wieloch T, et al. Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury [J]. Neurotrauma, 1998, 15: 731-769.
- [3] Gao J, Prough DS, McAdoo DJ, et al. Transplantation of primed human fetal neural stem cells improves cognitive function in rats after traumatic brain injury [J]. Exp Neurol, 2006, 201(2): 281-292.
- [4] Clark RS, Chen J, Watkins SC, et al. Apoptosis suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats [J]. Neurosci, 1997, 17(23): 9172-9182.
- [5] Festuccia C, Gravina GL, D'Alessandro AM, et al. Azacitidine improves antitumor effects of docetaxel and cisplatin in aggressive prostate cancer models [J]. Endocr Relat Cancer, 2009, 16(2): 401-413.
- [6] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat [J]. Brain Res, 1981, 211(1): 67-77.
- [7] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. Stroke, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [8] Hoh NZ, Wagner AK, Alexander SA, et al. BCL2 genotypes: functional and neurobehavioral outcomes after severe traumatic brain injury [J]. Neurotrauma, 2010, 27(8): 1413-1427.
- [9] Hasnan J, Yusof MI, Pamitri TD, et al. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus [J]. Singapore Med J, 2010, 51(1): 50-55.
- [10] Takeshima Y, Nakamura M, Miyake H, et al. Neuroprotection with intraventricular brain-derived neurotrophic factor in rat venous occlusion model [J]. Neurosurgery, 2011, 68(5): 1334-1341.
- [11] Rami A, Jansen S, Giessler I, et al. Post-ischemic activation of caspase-3 in the rat hippocampus: evidence of an axonal and dendritic localization [J]. Neurochem Int, 2003, 43(3): 211-223.
- [12] Xiong M, Cheng GQ, Ma SM, et al. Post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain [J]. Neurochem Int, 2011, 58(6): 625-633.
- [13] Zhou HZ, Lv TM, Shen P, et al. Protective effects of nerve growth factor vs Danshen on hippocampal neuron against global ischemia-reperfusion injury in gerbils [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2011, 31(6): 965-969.
- [14] Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, et al. Mild traumatic brain

injury induces apoptotic cell death in the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl - 2 immunoreactivity [J]. Neuroscience, 2002, 110(4) : 605-616.

[15] Lee JS, Han YM, Yoo DS, et al. A molecular basis for the efficacy of magnesium treatment following traumatic brain injury in rats [J]. Neurotrauma, 2004, 21(5) : 549-561.

[16] Yu WR, Liu T, Kiehl TR, et al. Human neuropathological and animal model evidence supporting a role for Fas - mediated apoptosis and inflammation in cervical spondylotic myelopathy [J]. Brain, 2011, 134(5) : 1277-1292.

(收稿日期: 2016-10-08)

(本文编辑: 葛杰)

过敏性紫癜肾炎合并肺炎支原体感染患儿免疫功能变化

陈彩燕 邱慧英

【摘要】 目的 通过检测合并肺炎支原体(MP)感染的过敏性紫癜肾炎(HSPN)患儿免疫功能水平探讨MP感染HSPN的免疫学发病机制。方法 182例急性期HSP患儿根据MP-IgM检测分组HSP-MP⁺ 68例、HSP-MP⁻ 114例,HSP-MP⁺组根据有无肾脏损害分组HSPN-MP⁺ 13例、NHSPN-MP⁺ 55例,同期25例健康儿童为对照组。通过流式细胞仪免疫荧光法检测外周血免疫细胞(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺、CD16⁺CD56⁺),速率散射比浊法检测免疫球蛋白(IgG、IgM、IgA)和补体(C₃、C₄)血清水平。结果 HSP-MP⁺组和HSP-MP⁻组CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺较对照组下降且有统计学意义($P<0.05$),CD8⁺、CD19⁺水平上升且有统计学意义($P<0.05$);HSP-MP⁻组较HSP-MP⁺组CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺下降CD16⁺CD56⁺、上升有统计学意义($P<0.05$)。HSPN-MP⁺组和NHSPN-MP⁺组CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平较对照组下降且有统计学意义($P<0.05$),CD19⁺水平上升且有统计学意义($P<0.05$);HSPN-MP⁺组和NHSPN-MP⁺组间比较无差异($P>0.05$)。HSP-MP⁺组和HSP-MP⁻组IgA较对照组上升且有统计学意义($P<0.05$),C₃下降且有统计学意义($P<0.05$),HSP-MP⁺组较HSP-MP⁻组IgM升高,C₃下降更加显著($P<0.05$)。HSPN-MP⁺组和NHSPN-MP⁺组IgM、IgA较对照组上升且有统计学意义($P<0.05$),C₃下降有统计学意义($P<0.05$),C₄三组间无差异($P>0.05$)。HSPN-MP⁺组和NHSPN-MP⁺组间比较除IgM水平升高有统计学意义($P<0.05$),余比较无差异。结论 HSP患者均存在免疫功能紊乱,过敏性紫癜合并肺炎支原体感染主要表现为体液免疫紊乱,其中IgM水平的升高可作为MP感染合并HSPN的高危因素之一。

【关键词】 过敏性紫癜; 过敏性紫癜肾炎; 肺炎支原体感染; 细胞免疫; 体液免疫; 补体

A study on immune function of children with Henoch - Schonlein purpura nephritis complicated by Mycoplasma infection CHEN Cai - Yan. Department of Pediatrics, Zhongshan Hospital affiliated Xiamen University, Xiamen, Fujian, 361004, China.

【Abstract】 **Objective** To explore the correlation between MP infection and HSPN in immunity in the children with HSPN by observing the changes of the immune function. **Methods** 68 MP - IgM positive HSP children (HSP - MP⁺ group), 114 MP - IgM negative HSP children (HSP - MP⁻ group), 25 healthy children (control group) were enrolled, the HSP - MP⁺ group were divided into the group of HSPN (HSPN - MP⁺ group) and the group of NHSPN (NHSPN - MP⁺ group) according to whether the patients combined with kidney injury. The activity of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺ and CD16⁺CD56⁺ were detected by flow cytometry. The plasma immunoglobulin IgG, IgM and IgA, as well as complements C3 and C4 were detected by automatic biochemistry analyzer. **Results** Compared with the controls, the levels of CD3⁺, CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ significantly decreased in HSP group ($P<0.05$), while CD8⁺ and CD19⁺ increased ($P<0.05$). The levels of CD4⁺/CD8⁺, CD16⁺CD56⁺ and CD19⁺ of HSP - MP⁻ group showed significant different when compared with the HSP - MP⁺ group ($P<0.05$). The CD3⁺, CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ level of the HSPN - MP⁺ group were lower than the NHSPN - MP⁺ group, however, the level of CD19⁺ was higher than NHSPN - MP⁺ group, the differences were statistically significant. Compared with the controls, the levels of IgA significantly increased in HSP group ($P<0.05$), C3 level significantly decreased ($P<0.05$). The levels of IgA、C3 and C4 of the HSP - MP⁺ group showed significant different when compared with the HSP - MP⁻ group. Compared with the controls, the levels of IgM and