论著

文章编号:1000-5404(2010)15-1638-04

过氧化物酶体增殖物激活受体γ激动剂吡格列酮对大鼠创伤性脑损伤的影响

邓永兵[1,2],唐文渊[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[1];400014 重庆,重庆市急救医疗中心神经外科[2])

【摘要】 目的 观察PPARγ激动剂吡格列酮对大鼠创伤性脑损伤的神经保护作用。方法 将72只SD大鼠按随机数字表法分为假致伤组、对照组、吡格列酮治疗组,每组24只。采用改良的Feeney法制作脑创伤模型,治疗组采用吡格列酮(10 mg/kg)灌胃,假致伤组和对照组用等量生理盐水灌胃。致伤后在相应时相点行大鼠神经功能评分后,用干湿质量法进行脑组织含水量测定,进行HE、Nissl及TUNEL染色观察脑组织损伤、迟发性神经元死亡及神经细胞凋亡程度。结果 ①在伤后48 h、5 d,治疗组的神经功能评分[分别为(2.12±0.58)、(1.67±0.78)]好于对照组[(2.67±0.65)、(2.25±0.62),$P<0.05$];②伤后24 h治疗组与对照组脑组织含水量差异无统计学意义[分别为(78.84±1.92)%、(79.21±2.20)%,$P>0.05$];③伤后48 h,治疗组迟发性神经元死亡(38.59±1.97)%和神经细胞凋亡数(31.67±4.76)明显低于对照组[分别为(51.25±4.01)%、(45.33±4.68),$P<0.05$]。结论 PPARγ激动剂吡格列酮能抑制创伤性脑损伤后的神经细胞凋亡,保护神经元,从而发挥神经保护作用。

【关键词】 PPARγ;吡格列酮;脑损伤;细胞凋亡;神经保护
【中图法分类号】 R-332;R651.15;R971 【文献标志码】 A

Effect of pioglitazone on nerves of rats following traumatic brain injury

Deng Yongbing[1,2], Tang Wenyuang[1] ([1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurosurgery, Chongqing First Aid Medical Center, Chongqing, 400014, China)

【Abstract】 Objective To study the neural protective effect of pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) agonist, on nerves of rats following traumatic brain injury (TBI). Methods Seventy-two male Sprague-Dawley rats were randomly divided into pioglitazone treatment group, sham operation group, and control group ($n=24$ rats in each group). Rats in pioglitazone treatment received pioglitazone gastric perfusion (10 mg/kg) while rats in sham operation group underwent normal saline gastric perfusion (10 mg/kg). A rat model of brain injury was established with the Feeney's free falling method. After neural function of rats was scored, water content in brain tissue was measured with the dry-wet weighing method. Injury of brain tissue, delayed death of neurons and apoptosis of nerve cells were observed with HE, TUNEL and Nissl's staining, respectively. Results The neural function score was higher in pioglitazone treatment group than in control group in 48 h and 5 d after TBI ($P<0.05$). No significant difference was found in brain tissue water content between pioglitazone treatment and control groups in 48 h after TBI [(78.84±1.92)% *vs* (79.21±2.20)%, $P>0.05$]. The number of delayed dead and apoptotic nerve cells was significantly lesser in pioglitazone treatment group than in control group in 48 h after TBI ($P<0.05$). Conclusion Pioglitazone can effectively inhibit the apoptosis of nerve cells, thus playing a role in protecting nerve cells of rats following TBI.

【Key words】 peroxisome proliferator-activated receptor gamma; pioglitazone; brain trauma; apoptosis; neural protection

Corresponding author: Tang Wenyuan, Tel: 86-23-89011152

过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor-γ, PPARγ)是配体活化的核转录因子,属Ⅱ型核受体超家族成员。该受体被其配体激活后可以和特异的DNA反应元件结合,调控多种基因的转录和表达,参与体内多种生理和病理生理过程[1]。近年来,动物实验研究显示PPARγ被配体激活后对中枢神经系统疾病和缺血有神经保护作用[2,3],但对创伤性脑损伤的保护作用研究较少。

本实验用PPARγ激动剂(配体)吡格列酮治疗创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)大鼠模型,观察其神经功能缺失变化、脑水肿程度、神经细胞形态变

【通信作者】 唐文渊,电话:(023)89011152

化、神经细胞凋亡程度等，探讨 PPARγ 激动剂吡格列酮激活 PPARγ 后对创伤性脑损伤的神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

72 只健康雄性成年 SD 大鼠，体质量(250 ± 20) g，由重庆医科大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为假致伤组、对照组、吡格列酮治疗组，每组 24 只。

1.2 TBI 模型的制备

3.5% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉 SD 大鼠后，头部固定于立体定向仪。以前囟后 2 mm、中线右侧 2 mm 处为中心，作直径 5 mm 骨窗，硬脑膜保持完整。采用改良的 Feeney 自由落体脑创伤模型，质量为 25 g 的砝码从 40 cm 高度自由落下，通过撞击圆锥来打击硬膜，深度为 2 mm[4]。假致伤组也予以麻醉、固定和开颅，但不作自由落体砝码打击。

1.3 给药途径及剂量

分组后的 SD 大鼠于致伤前 12 h 禁食，4 h 禁水，治疗组大鼠在致伤前 0.5 h、致伤后 6、12、24 h 用吡格列酮 10 mg/kg 灌胃，假致伤组及对照组大鼠在相同时间点用等量生理盐水灌胃。

1.4 神经功能评价

致伤后 6、48 h 和 5 d，对大鼠的神经功能缺失进行评分：没有神经功能缺失记 0 分；不能完全伸展损伤对侧前爪记 1 分；爬行时出现向损伤对侧转圈记 2 分；行走时出现向损伤对侧倾倒记 3 分；无自发活动记 4 分[5]。

1.5 脑组织含水量测定

致伤后 24 h，麻醉大鼠，迅速断头取脑，将取出的脑组织放在 1 个内有生理盐水湿润的定性滤纸的培养皿中，去除皮质表面的软脑膜，分离损伤侧大脑皮质，置于预先已称量的 EP 管中，称量湿质量(W)。然后放入 80 ℃电热恒温箱中烘烤至恒重，再称干质量(D)(两次干质量之差≤0.2 mg)。按如下公式计算：脑组织含水量 = (W − D)/W × 100%

1.6 病理切片制作

致伤后 48 h，麻醉大鼠，迅速开胸暴露心脏，从左心室插管至主动脉根部，在右心耳剪开一小口做出口。4 ℃生理盐水 100 ml 快速灌注，之后稍减慢灌注速度直至流液清亮，换 4% 多聚甲醛 100 ml 快速灌注，之后稍减慢灌注速度继续固定，直至大鼠心肝肺颜色变浅变白、四肢僵硬。断头取脑，4% 多聚甲醛固定过夜。以脑皮层创伤处为中心按常规程序做厚度为 5 μm 的冠状石蜡切片。

1.7 损伤程度及迟发性神经元死亡测定

HE 染色：常规石蜡切片 HE 染色，封片，观察病变区及附近脑组织病理变化。

Nissl 染色：常规石蜡切片脱蜡，2% 硫堇水溶液 60 ℃温箱内染 30 ~ 40 min，蒸馏水洗，95% 酒精分色，显微镜下控制尼氏小体清晰为止，脱水，透明，封片。在光学显微镜下观察损伤脑皮层周围神经元细胞，每张切片(×400)在损伤脑皮层周围取相互不重叠的 5 个视野观察、照相，并分别行尼氏体脱失神经元和总神经元计数，计算尼氏体脱失神经元的百分率，从而反映迟发性神经元死亡程度。

1.8 神经细胞凋亡的测定(TUNEL 染色)

TUNEL 染色按 Roche 公司提供的 TUNEL 试剂盒步骤进行。中性树胶封片、干燥后，在光学显微镜下观察呈棕黄色或褐色的凋亡阳性细胞。每张切片在光学显微镜下(×400)在损伤脑皮层周围取相互不重叠的 5 个视野观察、照相，并行凋亡细胞计数，取其平均值为该切片的平均凋亡细胞数。

1.9 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行完全随机设计方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 神经功能评价

致伤前所有大鼠神经功能均正常，没有神经功能缺失，记 0 分。致伤后 6 h，对照组与吡格列酮治疗组间无统计学差异($P > 0.05$)。致伤后 48 h、5 d，对照组与吡格列酮治疗组间差异存在统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 大鼠神经功能评分比较($n = 24$, $\bar{x} \pm s$)

组别	伤后 6 h	伤后 48 h	伤后 5 d
对照组	3.08 ± 0.67	2.67 ± 0.65	2.25 ± 0.62
治疗组	2.92 ± 0.67	2.12 ± 0.58[a]	1.67 ± 0.78[a]

a：$P < 0.05$，与对照组比较

2.2 脑组织含水量测定

致伤后 24 h，假致伤组脑组织含水量为(75.24 ± 1.37)%，与对照组(79.21 ± 2.20)% 和吡格列酮治疗组(78.84 ± 1.92)% 相比均有统计学差异($P < 0.05$)；而对照组与吡格列酮治疗组间无统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 损伤程度及迟发性神经元死亡测定

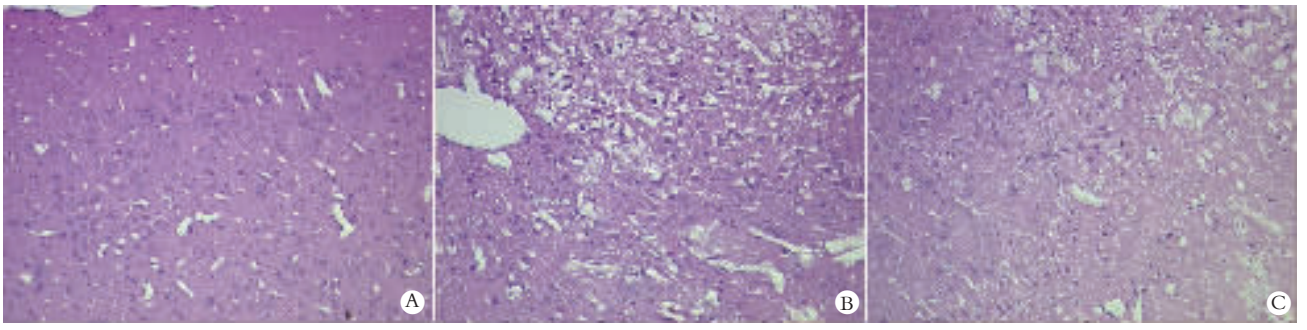
2.3.1 常规 HE 染色　致伤后 48 h，假致伤组脑组织结构完整，细胞核染成均匀的蓝黑色，形态规则，大小较为一致，胞核及核仁清晰可见，胞质呈嗜酸性红染。对照组及治疗组大脑损伤侧皮质可见不同程度的挫裂，脑组织结构紊乱、淡染，纤维样结构不连续、断裂及空泡化，神经细胞肿胀，细胞质染色淡，部分细胞核染色质浓缩，较多中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润。见图 1。

2.3.2 Nissl 染色　致伤后 48 h，假致伤组神经元蓝染，细胞排列规则，胞体形态正常，核周尼氏小体丰富，尼氏体呈深蓝色粗大密集的颗粒，尼氏体脱失不明显。对照组及吡格列酮治疗组损伤区周围神经元减少，有较多神经元皱缩变形，尼氏小体减少或消失，尼氏体脱失明显，残存的细胞尼氏体为浅蓝色；吡格列酮治疗组尼氏体脱失神经元少于对照组。见图 2。各组尼氏体脱失神经元百分率见表 2。各组间尼氏体脱失神经元百分率差异显著($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠尼氏体脱失细胞率、细胞凋亡数比较($n = 12$, $\bar{x} \pm s$)

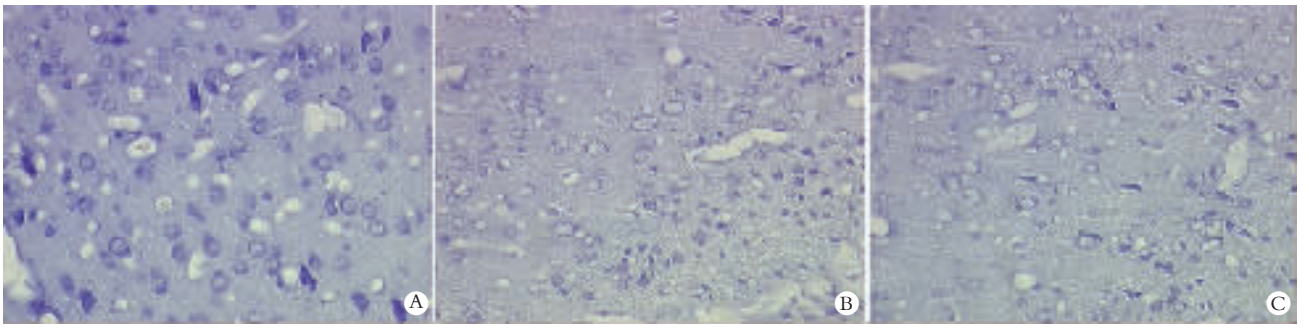
组别	尼氏体脱失细胞率(%)	凋亡细胞数
假致伤组	8.65 ± 1.23	16.83 ± 2.04
对照组	51.25 ± 4.01[a]	45.33 ± 4.68[a]
治疗组	38.59 ± 1.97[ab]	31.67 ± 4.76[ab]

a：$P < 0.05$，与假致伤组比较；b：$P < 0.05$，与对照组比较



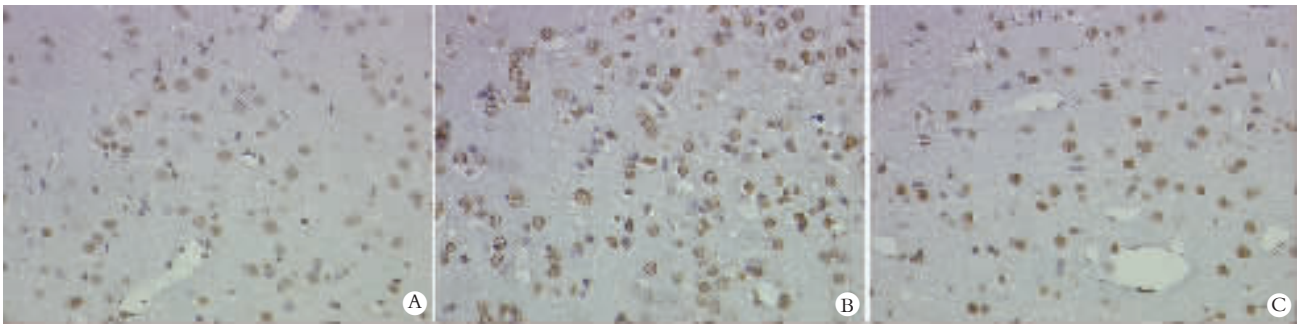
A:假致伤组;B:对照组;C:治疗组

图1 各组大鼠创伤性脑损伤后48 h脑皮层损伤区周围观察 (HE ×200)



A:假致伤组;B:对照组;C:治疗组

图2 各组大鼠创伤性脑损伤后48 h脑皮层损伤周围尼氏体脱失观察 (Nissl ×400)



A:假致伤组;B:对照组;C:治疗组

图3 各组大鼠创伤性脑损伤后48 h脑皮层损伤区周围凋亡神经细胞观察 (TUNEL ×400)

2.4 神经细胞凋亡

致伤后48 h,假致伤组在皮质及海马区域有极少数凋亡神经细胞分布。对照组和吡格列酮治疗组在损伤侧脑皮层周围有数量较多的凋亡神经细胞;对照组凋亡神经细胞明显多于吡格列酮治疗组。见图3。各组凋亡神经细胞计数见表2。假致伤组凋亡神经细胞明显低于对照组及吡格列酮治疗组,吡格列酮治疗组凋亡神经细胞低于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

创伤性脑损伤有较高的死亡率和病残率。其急性期的炎症反应、细胞凋亡、氧化应激反应、离子通道的失衡、脑水肿、谷氨酸盐的过度释放等病理过程会导致大量的神经细胞死亡,导致继发性脑损害,是脑损伤病情严重预后不良的重要因素[6,7]。因此,针对阻止这些病理机制发生的措施对减轻继发性脑损害,保护神经功能,减轻创伤性脑损伤后遗症是非常有益的。

PPARγ激动剂可通过多种途径增强抗炎基因转录、表达,抑制炎症反应,发挥神经保护作用。Tureyen等[8]研究显示,PPARγ激动剂激活PPARγ后能直接阻止细胞因子的信号转导通路,抑制小胶质细胞的激活,减少嗜中性粒细胞、巨噬细胞的渗入,减弱炎症基因的表达,增强抗氧化酶的活性和增加热休克蛋白的表达,起到神经保护作用。Hyong等[9]证实,PPARγ激动剂罗格列酮可明显抑制髓过氧化物酶(MPO)的活性,减少TNF-α、IL-1β的表达,抑制脑损伤后的炎症反应。Yi等[10]研究证实,PPARγ激动剂罗格列酮治疗创伤性脑损伤小鼠可明显减少脑挫伤面积。Park等[11]在用PPARγ激动剂治疗脊髓损伤鼠实验中也得出可明显减少脊髓挫伤面积的结论。有研究在脑缺血

实验模型中,注入外源性 PPARγ 激动剂罗格列酮治疗后,Caspase-3、H_2O_2 的含量减少,抑制了神经细胞的坏死和凋亡,减少了脑梗死面积[12]。PPARγ 可通过以下信号转导途径,抑制炎症反应、氧化应激反应。①PPARγ 活化的途径:PPARγ 直接与配体结合,配体调节 PPARγ 磷酸化状态并参与 MARK 和 PI3K 活性调节;② PPARγ 激活和调节靶基因转录表达途径:包括配体激活 PPARγ、活化 PPARγ 与 PPARγ 反应元件(PPRE)相互作用,通过调节基因转录和翻译等生物学效应参与脂类代谢,细胞增殖、分化和凋亡等;③ PPARγ 影响其他转录因子及信号途径:如在炎症反应中竞争抑制 NF-κB、激活蛋白-1(AP-1)、JAK-STAT 等途径。

在本实验中,我们分别在致伤后 6、48 h、5 d 对各组大鼠进行神经功能评分。我们的实验结果显示吡格列酮治疗组在伤后 48 h、5 d 评分显著高于对照组($P<0.05$),可以看出 PPARγ 激动剂吡格列酮能改善创伤性脑损伤后的神经功能缺失。在伤后 6 h,估计吡格列酮未达到有效血药浓度,未能有效发挥神经保护作用而导致对照组与治疗组间差异无统计学意义。

本实验通过 Nissl 染色显示吡格列酮治疗组尼氏体脱失神经元百分率明显低于对照组($P<0.05$)。这说明吡格列酮治疗创伤性脑损伤大鼠可保护受损神经元,减少迟发性神经元死亡,减轻脑损伤程度,和文献[11]报道一致。同时我们用 TUNEL 试剂盒进一步行神经细胞的凋亡检测,证实吡格列酮治疗组与对照组比较能明显减少损伤脑皮层周围的神经细胞凋亡,这可能也是文献[11]报道 PPARγ 激动剂能减少脑挫伤面积的原因之一。

创伤性脑水肿主要包括血管源性脑水肿和细胞毒性脑水肿。血管源性脑水肿主要与血脑屏障受损,血管壁通透性增加有关,发生在脑损伤后早期;而细胞毒性脑水肿主要与不同致病因素,如脑创伤、脑缺血等所致的细胞代谢异常,细胞膜 Na^+-K^+-ATP 酶活性减退,细胞肿胀有关,发生稍晚于血管源性脑水肿[13]。本实验试图通过对大鼠脑组织含水量的测定,来验证吡格列酮是否对创伤性脑水肿有抑制作用。结果证实吡格列酮治疗组与对照组脑组织含水量无统计学差异。原因可能为在创伤性脑损伤后 24 h(TBI 早期)创伤性脑水肿以血管源性脑水肿为主,吡格列酮作用有限;推测在以细胞毒性脑水肿为主的创伤性脑水肿中,吡格列酮可能会对其有抑制作用,下一步拟做进一步的多时间点脑组织含水量测定及相关机制研究。

本研究表明,PPARγ 激动剂吡格列酮对创伤性脑损伤后的继发性脑损害有抑制作用,能保护神经细胞,改善神经功能预后。其主要作用机制可能与抑制创伤性脑损伤后的炎症反应、氧化应激反应等有关,还需作进一步的机制研究。PPARγ 激动剂可能为防治继发性脑损伤开辟新的临床治疗途径。

参考文献:

[1] Craft S, Watson G S. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms[J]. Lancet Neurol, 2004, 3(3): 169-178.

[2] Pedersen W A, McMillan P J, Kulstad J J, *et al*. Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice[J]. Exp Neurol, 2006, 199(2): 265-273.

[3] Collino M, Aragno M, Mastrocola R, *et al*. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion[J]. Eur J Pharamacol, 2006, 530(1/2): 70-80.

[4] 刘科, 唐文渊. 创伤性脑损伤后动态 CT 灌注像的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 1299-1302.

[5] 易陈菊, 徐沙贝, 唐颖馨, 等. 缝隙连接对局灶性脑缺血后海马迟发性神经元死亡及神经行为学的影响[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2008, 37(6): 716-719.

[6] Jennings J S, Gerber A M, Vallano M L. Pharmacological strategies for neuroprotection in traumatic brain injury[J]. Mini Rev Med Chem, 2008, 8(7): 689-701.

[7] Onyszchuk G, He Y Y, Berman N E, *et al*. Detrimental effects of aging on outcome from traumatic brain injury: a behavioral, magnetic resonance imaging, and histological study in mice[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(2): 153-171.

[8] Tureyen K, Kapadia R, Bowen K K, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents[J]. J Neurochem, 2007, 101(1): 41-56.

[9] Hyong A, Jadhav V, Lee S, *et al*. Rosiglitazone, a PPAR gamma agonist, attenuates inflammation after surgical brain injury in rodents[J]. Brain Res, 2008, 1215: 218-224.

[10] Yi J H, Park S W, Brooks N, *et al*. PPARgamma agonist rosiglitazone is neuroprotective after traumatic brain injury *via* anti-inflammatory and anti-oxidative mechanisms[J]. Brain Res, 2008, 1244: 164-172.

[11] Park S W, Yi J H, Miranpuri G, *et al*. Thiazolidinedione class of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists prevents neuronal damage, motor dysfunction, myelin loss, neuropathic pain and inflammation after spinal cord injury in adult rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 320(3): 1002-1012.

[12] Lin T N, Cheung W M, Wu J S, *et al*. 15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(3): 481-487.

[13] 王忠诚. 王忠诚神经外科学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2005: 59-62.

(收稿:2010-03-18 修回:2010-04-28)
(编辑 王小宴)