论著

文章编号:1000-5404(2011)15-1620-03

TNF-α在实验性蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用

陈佳琳[1],姚声涛[2],郭宗铎[3] (563002 贵州 遵义,贵州省遵义医院:儿科[1],神经外科[2];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[3])

[摘要] **目的** 探讨TNF-α抑制剂在大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)后早期脑损伤中的保护作用及其机制。**方法** 健康成年雄性SD大鼠48只,体质量250~300 g,按随机数字表法分为假手术组、SAH组、安慰剂组和TNF-α抑制剂组。采用经视交叉前池注血法建立SAH模型,各组于处理后24 h,对实验动物临床行为进行评估;应用免疫组化方法检测大鼠脑皮层TNF-α表达;应用Western blot方法检测大鼠脑皮层MMP-9蛋白表达。**结果** 免疫组化显示:SAH组大鼠皮层神经元TNF-α表达明显升高,显著高于假手术组;TNF-α抑制剂组TNF-α表达明显下降($P<0.01$)。Western blot检测结果显示:假手术组大鼠MMP-9蛋白表达较低[(2.03±0.21)%];SAH组大鼠皮层MMP-9含量明显升高[(98.92±8.33)%,$P<0.01$];TNF-α抑制剂组MMP-9蛋白表达降低[(52.12±6.25)%],与SAH组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。临床行为评估显示:TNF-α抑制剂组大鼠临床行为得到明显改善($P<0.01$)。**结论** 大鼠SAH后早期脑损伤过程中TNF-α通过调节MMP-9蛋白表达参与SAH后早期脑损伤的病理过程。TNF-α抑制剂能够改善大鼠临床行为,对早期脑损伤发挥保护作用。

[关键词] 肿瘤坏死因子-α;蛛网膜下腔出血;早期脑损伤

[中图法分类号] R651.15; R743.35; R392.11 [文献标志码] A

Role of TNF-α in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats

Chen Jialin[1], Yao Shengtao[2], Guo Zongduo[3] ([1]Department of Pediatrics, [2]Department of Neurosurgery, Zunyi Hospital, Zunyi, Guizhou Province, 563002; [3]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of TNF-α inhibitor during early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. **Methods** Forty-eight adult male SD rats were randomly and equally divided into 4 groups, sham-operation group, subarachnoid hemorrhage group, vehicle group and TNF-α inhibitor group. TNF-α inhibitor (monoclonal antibody) or PBS of 10 μl was injected into lateral cerebral ventricle of corresponding rats in 30 min before subarachnoid hemorrhage model establishment. Then the model was induced by injecting autologous arterial blood into the prechiasmatic cistern. After general condition and nerve function were evaluated in 24 h after model establishment, all rats were killed and their brain was resected. Expressions of TNF-α in the cortex were observed by immunohistochemistry, and the protein expression was examined by Western blotting. The clinical assessment was also examined. Brain Evan's blue contents in rat brains were measured at same time points by formamide extraction method. **Results** Immunohistochemistry showed that the expression of TNF-α was increased dramatically in SAH group, which was higher than that of sham group, but that was decreased significantly in TNF-α inhibitor group. Western blotting showed MMP-9 expression was lower in sham group, and higher in SAH group in the cortex ($P<0.01$). Compared to SAH group, the expression of MMP-9 was decreased significantly in TNF-α inhibitor group ($P<0.01$). The clinical assessment showed that the clinical behavior of rats was improved significantly in TNF-α inhibitor group ($P<0.01$). **Conclusion** TNF-α inhibitor improves the clinical assessment of SAH rats and protects early brain injury, suggesting that TNF-α may be involved in the pathological process of early brain injury after subarachnoid hemorrhage by regulating the expression of MMP-9.

[**Key words**] TNF-α; subarachnoid hemorrhage; early brain injury

Supported by the Program of Department of Science and Technology of Guizhou Province (2009GZ37205). Corresponding author: Yao Shengtao, E-mail: stonegzd@gmail.com

[基金项目] 贵州省科技厅项目(2009GZ37205)

[通信作者] 姚声涛,E-mail:stonegzd@gmail.com

目前,越来越多的学者发现早期脑损伤(early brain injury, EBI)是SAH患者死亡的首要原因,对EBI机制的研究已成为SAH研究的主要方向[1]。我们前期研究已经发现MMP-9通过介导细胞失巢凋亡通路参与EBI病理过程。最近研究证实SAH可以导致炎症标记物包括TNF-α等的释放,它参与SAH后炎症反应,并与SAH预后有关[2]。但目前对于TNF-α在SAH中的作用仍不清楚。由于在多种细胞模型中MMP-9的表达受TNF-α的调节[3-4],我们推测TNF-α可能通过调节MMP-9的表达参与SAH后EBI病理过程。本研究拟通过检测实验性SAH后大鼠海马TNF-α的表达及其与MMP-9表达的关系,探讨TNF-α在EBI中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与材料

重庆医科大学实验动物中心提供健康雄性SD大鼠48只,批号:103016,体质量250~300 g。大鼠按随机数字表法分为假手术组、SAH组、安慰剂组和TNF-α抑制剂组,每组12只(其中6只用于免疫组化检测,6只用于Western blot检测),经临床行为评估后处死并留取皮层组织分别用于检测TNF-α、MMP-9蛋白表达。实验所需MMP-9单克隆抗体购自Lab Vision公司;TNF-α一抗购于武汉博士德公司;抗TNF-α单克隆抗体购自美国Sigma公司。

1.2 SAH模型的制作

据文献[5]采用改良的经额插管注血法建立大鼠SAH模型。Sham组动物按上述方法操作,但蛛网膜下腔置管后不注血。TNF-α抑制剂组于SAH前30 min侧脑室注射抗TNF-α单克隆抗体10 μl,安慰剂组于侧脑室内注入PBS 10 μl。

1.3 实验方法

1.3.1 TNF-α表达的检测 据文献[5]方法制作大鼠脑石蜡切片,采用S-P法进行免疫组化染色,检测TNF-α的表达。以CCD摄像系统采集图像,采用Image-pro plus 5.0软件分析图像,计算平均光密度值。

1.3.2 脑皮层组织蛋白的提取和定量 各组大鼠分别在建模后24 h处死,断头取脑,分离出双侧皮层组织,并置于液氮保存。取出皮层组织,置于匀浆器中,加入蛋白裂解液后冰上匀浆30 min,然后4 ℃下12 000×g离心5 min,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度后,收集上清液-80 ℃冰箱保存备用。

1.3.3 MMP-9蛋白表达检测 据文献[6]采用Western blot法检测MMP-9表达。采用10%聚丙烯酰胺凝胶分离样品蛋白,转移缓冲液在200 mA、100 V条件下电泳后,进行转膜、洗膜、封闭。加入MMP-9一抗,4 ℃过夜,缓冲液漂洗后,再加入二抗,室温孵育,漂洗后加入生色底物。分析光密度值。

1.3.4 大鼠临床行为评估 根据文献[7],对实验大鼠的饮食、活动能力及神经功能进行评分。

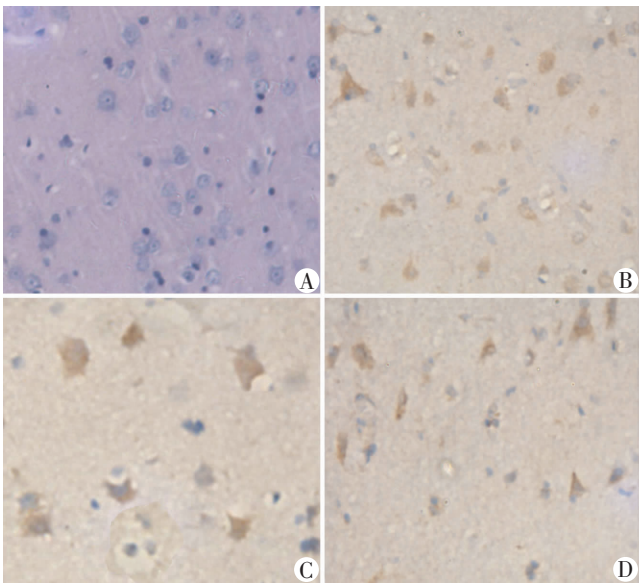
1.4 统计学分析

计量资料运用SPSS 13.0统计软件处理,以$\bar{x} \pm s$表示,采用单向方差分析检验分析组间差异。

2 结果

2.1 大鼠海马组织TNF-α的表达

SAH组大鼠皮层神经元胞质呈棕黄色着染,有较多的TNF-α表达,Sham组皮层神经元未见明显染色[Sham组为(0.12±0.01),SAH组为(0.30±0.01)]。图像分析结果表明,Sham组大鼠脑皮层组织TNF-α蛋白表达水平较低;SAH组大鼠皮层神经元TNF-α表达明显增高,与Sham组相比,差异有统计学意义($P<0.01$),安慰剂组TNF-α表达(0.28±0.03)与SAH组相比无明显变化($P>0.05$);TNF-α抑制剂组皮层TNF-α表达明显下降(0.14±0.01),与SAH组相比,差异有统计学意义($P<0.01$),见图1。

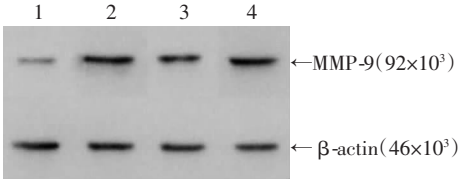


A:Sham组;B:SAH组;C:安慰剂组;D:TNF-α抑制剂组

图1 免疫组化检测大鼠皮层神经元TNF-α蛋白表达 (S-P ×400)

2.2 大鼠海马组织MMP-9表达变化

SAH后24 h大鼠皮层神经元MMP-9表达(98.92±8.33)%与Sham组(2.03±0.21)%相比明显升高($P<0.01$);TNF-α抑制剂组大鼠皮层MMP-9表达明显下降(52.12±6.25)%,与SAH组相比差异有统计学意义($P<0.01$);安慰剂组皮层神经元MMP-9表达(96.89±7.83)%与SAH组相比无明显差异($P>0.05$),见图2。



1:Sham组;2:SAH组;3:TNF-α抑制剂组;4:安慰剂组

图2 Western blot检测大鼠皮层组织MMP-9的表达

2.3 大鼠临床行为评估

大鼠临床行为评分TNF-α抑制剂组(0.33±0.58)明显低于SAH组(1.67±0.58)及安慰剂组(1.33±0.58)($P<0.01$),与假手术组相比无明显差异。

3 讨论

EBI是SAH后72 h以内整个脑组织发生的直接损伤,涉及到迟发性脑血管痉挛出现(3 d至2周)之前脑组织内所发生的病理生理事件[8]。我们前期研究发现MMP-9通过降解细胞外基质导致细胞失巢凋亡通路参与EBI病理过程,但其上游调节因子尚不清楚。深入研究SAH后EBI的病理机制,将为临床治疗SAH后早期损伤和继发性损害提供新的理论依据。

目前研究证实SAH可以导致炎症标记物包括TNF-α等的释放。但目前对于TNF-α在SAH中的作用仍不清楚。有研究发现,TNF-α在动脉瘤的形成和破裂中发挥重要作用[9]。TNF-α在SAH患者蛛网膜下腔释放可以引起基底动脉脑血流加速,提示过度的炎症反应会导致脑血液动力学改变[10]。SAH后不同脑区域内TNF-α产生增加,抑制TNF-α活性,能够降低脑缺血性梗死的体积,增加其活性则加重脑损伤[11]。有研究发现在脑出血模型中抑制TNF-α的表达,明显减轻脑损伤[12]。然而,SAH后TNF-α是否参与EBI的病理改变,目前尚少见相关报道。

现有研究证实,炎症因子TNF-α调节MMP-9的表达[3]。研究人员发现在人乳腺癌细胞中,抑制转录因子AP-1 DNA结合活性可以降低TNF-α诱导的MMP-9表达[13]。在胆管癌细胞中,TNF-α通过TNF-R1诱导COX-2和PGE2活化,及通过PGE2受体通路上调MMP-9[14]。但在SAH后EBI病理过程中,TNF-α与MMP-9表达的关系尚不明确。本研究采用经视交叉前池注血法建立SAH模型,应用蛋白印迹方法和免疫组化技术检测大鼠脑皮层神经元TNF-α及MMP-9蛋白表达,同时应用TNF-α抑制剂观察其对EBI的保护作用,结果发现大鼠SAH后24 h皮层TNF-α的表达明显升高,MMP-9表达也升高。抑制TNF-α的表达能够明显降低MMP-9的表达,改善SAH大鼠临床行为,提示大鼠SAH后早期脑损伤过程中TNF-α通过调节MMP-9蛋白表达参与SAH后早期脑损伤的病理过程。TNF-α抑制剂能够改善大鼠临床行为,对早期脑损伤发挥保护作用。

本研究探讨了TNF-α与MMP-9在SAH后EBI病理过程中的作用,同时观察了TNF-α抑制剂对EBI的治疗作用。研究结果将为临床治疗EBI,改善SAH患者预后提供新的理论依据,具有重要的临床意义。

参考文献:

[1] Broderick J P, Brott T G, Duldner J E, *et al*. Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 1994, 25(7):1342-1347

[2] Simard J M, Geng Z, Woo S K, *et al*. Glibenclamide reduces inflammation, vasogenic edema, and caspase-3 activation after subarachnoid hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(2): 317-330.

[3] Reyes R, Guo M, Swann K, *et al*. Role of tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption after peripheral thermal injury in rats[J]. J Neurosurg, 2009, 110(6): 1218-1226.

[4] Lin C C, Tseng H W, Hsieh H L, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB in A549 cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 229(3): 386-398.

[5] 郭宗铎,孙晓川,何朝晖, 等. 蛛网膜下腔出血后早期海马MMP-9的表达与海马神经元凋亡的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 71-74.

[6] 陈佳琳,姚声涛,陈良勇, 等. 米诺环素对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(17): 1847-1850.

[7] Yamaguchi M, Zhou C, Nanda A, *et al*. Ras protein contributes to cerebral vasospasm in a canine double-hemorrhage model[J]. Stroke, 2004, 35(7):1750-1755.

[8] Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, *et al*. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(8): 916-925.

[9] Fontanella M, Rainero I, Gallone S, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha gene and cerebral aneurysms[J]. Neurosurgery, 2007, 60(4): 668-672.

[10] Fassbender K, Hodapp B, Rossol S, *et al*. Inflammatory cytokines in subarachnoid haemorrhage: association with abnormal blood flow velocities in basal cerebral arteries[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001, 70(4): 534-537.

[11] Prunell G F, Svendgaard N A, Alkass K, *et al*. Inflammation in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. Neurosurgery, 2005, 56(5): 1082-1092.

[12] Wu J, Yang S, Xi G, *et al*. Minocycline reduces intracerebral hemorrhage-induced brain injury[J]. Neurol Res, 2009, 31(2): 183-188.

[13] Kim S, Choi J H, Kim J B, *et al*. Berberine suppresses TNF-alpha-induced MMP-9 and cell invasion through inhibition of AP-1 activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. Molecules, 2008, 13(12): 2975-2985.

[14] Itatsu K, Sasaki M, Yamaguchi J, *et al*. Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor-alpha[J]. Am J Pathol, 2009, 174(3): 829-841.

(**收稿**:2011-03-19;**修回**:2011-04-25)

(编辑 王 红)