维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0432-05

肿瘤坏死因子α诱发脑水肿的机制

张新宇,孙晓川

(重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究肿瘤坏死因子α(Tumor necrosis fctor-alpha,TNF-α)对水通道蛋白 4(Aquaporin4,AQP4)和血脑屏障(Blood-brain barrier,BBB)通透性的影响,探讨 TNF-α 诱发脑水肿的机制。方法:90 只成年 SD 大鼠,其中 45 只用于脑含水量和脑组织 AQP4 mRNA 表达的测定,将其随机分为空白对照组(A 组,$n=5$)、生理盐水组(NS 组,$n=20$)、TNF-α 组(TNF-α 组,$n=20$),NS 组和 TNF-α 组按注射后处死的时间再分为 1h 组、6h 组、24h 组、72h 组,每组各为 5 只;其余 45 只用于 BBB 通透性的观察,分组方法同前。采用干湿重法计算脑含水量,采用 RT-PCR 法观察脑组织 AQP4 mRNA 表达的变化,采用伊文思兰法监测 BBB 通透性。结果:大鼠脑内注射 TNF-α 后脑含水量和脑组织 AQP4 mRNA 表达在 1h 均未见明显变化($P>0.05$),均于 6h 达到高峰,之后逐渐降低,72h 脑含水量降到正常水平,但 AQP4 mRNA 表达仍高于正常($P<0.05$);脑组织 EB 含量 1h 开始升高,6h 迅速达到高峰,之后逐渐降低,72h 仍高于正常($P<0.05$);BBB 通透性与 AQP4 mRNA 表达呈显著正相关($R=0.839$,$P<0.01$),与脑水肿变化趋势一致。结论:TNF-α 通过上调 APQ4 表达,增加 BBB 通透性,参与脑水肿形成和发展。

【关键词】肿瘤坏死因子-α;脑水肿;水通道蛋白 4;血脑屏障

【中国图书分类法分类号】R651.15 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-25

The mechanism of brain edema induced by tumor necrosis factor-alpha

ZHANG Xin-yu, et al

(*Department of Neurosurgery, the First Affiliatied Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate aquaporin4(AQP4) expression and blood-brain barrier(BBB) permeability after intracerebral injection of tumor necrosis fctor-alpha(TNF-α) so as to explore the mechanism of brain edema induced by TNF-α in the rats. *Methods*: Forty-five adult SD rats, which were used to detected brain water contents and AQP4 expression were divided randomly into groups: control group(Group A with 5 rats), normal sodium group(NS Group with 20 rats), tumor necrosis fctor-alpha group(TNF-α Group with 20 rats). The NS groups and the TNF-α groups were studied after the microinjection at an interval of1h, 6h, 24h and 72h, respectively ($n=5$ for each group). Other Forty-five adult SD rats were used detected BBB permeability. The grouping approach was the same as the former. The brain edema models were established by microinjection of TNF-α into the cortex. We detected brain water contents by dry-wet weight method, AQP4 mRNA expression by RT-PCR and BBB permeability by EB method. Results: Brain water contents reached peak at 6 hours and gradually recovered normal level at 72h after intracerebral injection of TNF-α. AQP4 mRNA expression wasn't obvious at 1h($P>0.05$), peaked at 6h and it was higher than normal at 72h($P<0.05$). The level of EB contents rose at 1h, peaked at 6h, then descended gradually. There was a significantly positive correlation between AQP4 mRNA expression and BBB permeability($R=0.839$, $P<0.01$). *Conclusions*: TNF-α may have a function in the development and deterioration of the brain edema via up-regulating AQP4 expression and increasing BBB permeability.

【Key words】 Tumor necrosis factor-alpha; Brain edema; Aquaporin4; Blood-brain barrier

脑水肿是脑外伤、脑卒中、脑肿瘤等脑损害后产生的一种组织病理学反应,可导致脑容积扩大、颅内压增高、脑疝、甚至死亡,危害严重。近年来国内外研究结果表明[1],脑损伤后所激发的炎症反应在病情的发展和预后方面起着重要的作用。TNF-α是一种重要的炎症因子,有多种生物学功能,在脑水肿形成中发挥重要作用。深入研究 TNF-α 的作用机制对临床脑水肿的防治有重要的指导意义,本实验以此为切入点进一步研究脑水肿的发生机制。

作者介绍:张新宇(1980-),男,硕士,研究方向:颅脑损伤。

通讯作者:孙晓川,男,教授,E-mail:sunxchl445@gmail.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康成年 SD 大鼠 90 只，雌雄不分，体重 230～350g，由重庆医科大学动物实验中心提供，以标准饲料喂养和饮用纯净水，恒温 20～25℃。实验一：45 只 SD 大鼠用于测脑的含水量和脑组织 AQP4mRNA 的表达测定，将其随机分为空白对照组（A 组，$n=5$）、生理盐水组（NS 组，$n=20$）、TNF-α 组（TNF-α 组，$n=20$）。NS 组和 TNF-α 组按注射后处死的时间再分为 1h 组、6h 组、24h 组、72h 组，每组各为 5 只。实验二：45 只 SD 大鼠用于测 BBB 通透性，分组方法同前。

1.2 试剂与实验仪器

试剂：重组 TNFα（sigma 公司，美国）、RNAiso Reagent（TaKaRa 公司，日本）、cDNA 第 1 链合成试剂盒（杭州博日科技有限公司）、PCR MasterMix（北京天为时代科技有限公司）、伊文思蓝（sigma 公司，美国）等。仪器：电子天平（Sartorrius GMBH R200D，德国）、电热恒温干燥箱（PH030，国产）、荧光分光光度计（岛津 RF-540，日本）、PCR 仪（Eppendorf AG 22331 Hamburg，德国）、高速离心机（TDZ5-WS，国产）、凝胶图像分析系统（Bio-Rad，美国）、立体定位仪、牙科钻、微量注射器等。

1.3 模型制作

大鼠经 4%水合氯醛腹腔注射麻醉后，固定于立体定位仪上，于头皮作正中切口，于前囟尾部 1.5mm，中线向右旁开 2.0mm 处钻一直径为 1mm 的小孔，进针深度为 0.4mm，实验组缓慢注射预先配好的 TNF-α 2μl（将 5μg 的 TNF-α 加入 1ml 无菌生理盐水中，相当于每只注入 10ng），注入 TNF-α 的剂量是参考 Cai 等[2]的实验方法。对照组注入 2μl 无菌生理盐水；空白组不进针，注射完后留针 10min，退针后缝合头皮。

1.4 观察指标

1.4.1 脑含水量的测量 取每只大鼠右侧大脑半球穿刺点前方的脑组织分别称重（湿重），然后置入 100℃恒温烤箱中，24h 后取出再称重（干重）。以（湿重－干重）/湿重×100%计算脑含水量，以此代表脑水肿的程度。

1.4.2 脑组织 AQP4 mRNA 的表达 取右侧大脑半球穿刺点后方脑组织进行 RT-PCR 分析。使用 RNAiso Reagent 试剂提取脑组织总 RNA；采用逆转录试剂盒将总 RNA 中的 mRNA 逆转录成 cDNA；用 PCR MasterMix 试剂进行扩增，AQP4 引物：上游 5'-GCTGTGATTCCAAACGGACT-3'，下游 5'-CTTTAGGCGACGTTTGAGCT-3'，扩增片段长 260bp；β-actin 引物：上游 5'-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3'，下游 5'-GCCAGGATAGAGCCACCAAT-3'，扩增片段长 684bp。取 PCR 扩增产物进行电泳，电泳结果以 Quantity One 图像分析系统进行电泳条带光密度分析，计算 AQP4 产物与 β-actin 产物的光密度积分的比例，作为 AQP4 mRNA 表达的水平。

1.4.3 血脑屏障通透性 参照 Baskaya[3]的方法，以荧光分光光度计法，测定脑组织中伊文思蓝（Evan'S blue，EB）含量。各组动物在处死前 2h，按 2ml/kg 自股静脉注入 2%的 EB 溶液。取右侧大脑半球脑组织，于电子天平上秤量其湿重，将其放入匀浆器匀浆，匀浆液为 2ml 的 50%三氯乙酸（TCA），充分匀浆后，将组织匀浆液 15 000r/min 离心 20min，取 lml 上清与 3ml 无水乙醇混合，应用荧光分光光度计在 Ex620nm、Em680nm 的条件下测其 OD 值。校零标准品为 50%TCA，按 1/3 加入无水乙醇。使用校零标准品配制不同浓度（100～500mg/L）的 EB，测定其 OD 值，绘制 EB 与荧光值的标准曲线。依据所测得荧光值求得单位体积脑组织中 EB 含量，计算 BBB 对 EB 的通透率，以每克湿重脑组织内所含 EB 的量（μg）表示。

1.5 统计学处理

应用 SPSS11.0 软件对数据进行统计学处理，各组数据采用单因素方差分析，且各变量间作相关分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，$P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 脑含水量

与 A 组相比 TNF-α 组脑含水量 6h 达到高峰，24h 有所下降，72h 恢复到正常水平；NS 组的脑含水量与 TNF-α 组变化规律基本一致，但 6h 和 24hTNF-α 组脑含水量比 NS 组显著增多，差别有统计学意义（$P<0.05$），1h 和 72h 脑组织含水量两组相比，差别无统计学意义 $P>0.05$）（见表 1）。

2.2 脑组织 AQP4 mRNA 表达

A 组和 NS 组各时间点脑组织 AQP4 mRNA 表达均呈弱阳性（$P>0.05$）；TNF-α 组 1h 脑组织

表 1 各实验组脑组织的含水量（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	1h	6h	24h	72h
A 组	5		80.28 ± 0.62		
NS 组	20	80.58 ± 0.51	85.51 ± 0.48*	83.10 ± 0.26*	80.03 ± 0.38
TNF-α 组	20	80.43 ± 0.25	88.84 ± 0.29*△	85.29 ± 0.34*△	80.82 ± 0.24

与 A 组比较*$P<0.05$；与 NS 组比较△$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 各实验组脑组织 AQP4 mRNA 表达的变化

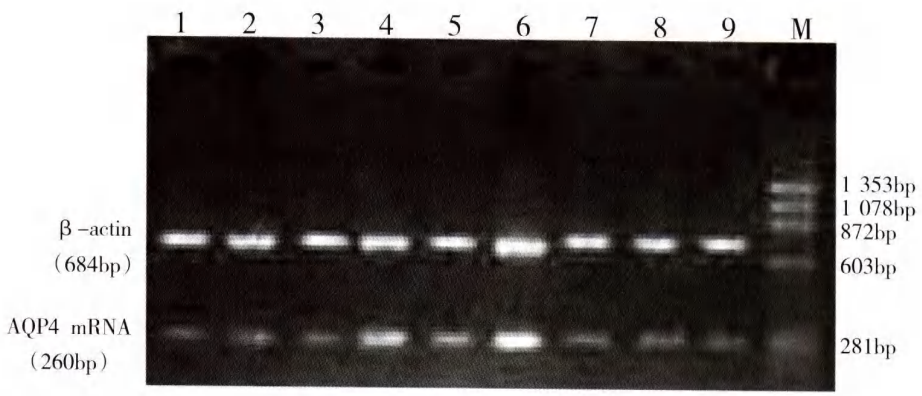
组别	n	1h	6h	24h	72h
A 组	5		0.23 ± 0.02		
NS 组	20	0.22 ± 0.02	0.43 ± 0.05*	0.29 ± 0.03	0.21 ± 0.02
TNF-α 组	20	0.24 ± 0.04	0.86 ± 0.08*△	0.53 ± 0.04*△	0.42 ± 0.06*△

与 A 组比较*$P<0.05$;与 NS 组比较△$P<0.05$

表 3 各实验组脑组织伊文斯兰含量($\bar{x} \pm s$)μg/g

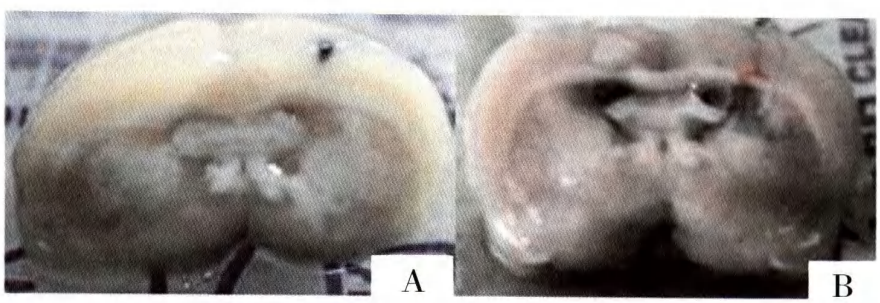
组别	n	1h	6h	24h	72h
A 组	5		6.69 ± 2.06		
NS 组	20	5.97 ± 1.37	24.54 ± 2.43*	14.82 ± 2.23	7.98 ± 1.52
TNF-α 组	20	18.32 ± 2.56*△	66.72 ± 5.78*△	41.64 ± 5.17*△	25.55 ± 3.26*△

与 A 组比较*$P<0.05$;与 NS 组比较△$P<0.05$



M.PCRMarker; 9.空白对照组脑组织 AQP4 mRNA 的表达产物; 2、4、6、8 分别是脑内注射 TNF-α 后 72h、24h、6h、1h 时脑组织 AQP4 mRNA 的表达产物;1、3、5、7 分别是脑内注射 NS 后 72h、24h、6h、1h 时脑组织 AQP4 mRNA 的表达产物。

图 1 各组 AQP4mRNA RT-PCR 产物电泳图



A.6h NS 组; B.6h TNF-α 组;图中明显可见 6h TNF-α 的 BBB 通透性较高

图 2 股静脉注入 EB 后鼠脑穿刺点处冠状位断面图

AQP4 mRNA 表达未见明显增加($P>0.05$),6h 达到高峰,72h 仍高于正常($P<0.05$)。见表 2、图 1。

2.3 脑组织 EB 含量

TNF-α 组 1h 脑组织 EB 含量开始升高,6h 达到高峰,之后逐渐降低,72h 仍高于正常($P<0.05$);NS 组的变化与 TNF-α 组相似,但各时间点 EB 含量均低于 TNF-α 组($P<0.05$)(见表 3、图 2)。

2.4 脑含水量、EB 含量与 AQP4 mRNA 表达的相

维普资讯 http://www.cqvip.com

关分析

大鼠脑内注射 TNF-α 后脑含水量、EB 含量与 AQP4 mRNA 表达的变化规律基本一致，相关性分析显示脑含水量与 AQP4 mRNA 表达呈正相关（R=0.820，P<0.01）；EB 含量与 AQP4 mRNA 表达也呈显著正相关（R=0.839，P<0.01）。

3 讨 论

脑水肿常继发于脑外伤、脑卒中和脑肿瘤等，它在病情演变过程起着重要作用，但目前针对脑水肿的治疗仅限于高渗性脱水和外科手术减压等，缺乏针对脑水肿分子机制的有效措施[4]。目前研究认为，脑水肿的发生、发展是多种因素共同作用的结果，有许多分子机制参与了脑水肿的形成，其中炎症及炎症介质在脑水肿形成中的作用受到广泛重视[5]。传统观点认为中枢神经系统是免疫豁免区，因为中枢神经系统没有淋巴管道，抗原提呈细胞数量有限，且受血脑屏障的限制。近来这种观点受到广泛质疑，大量研究结果表明，脑外伤、脑卒中等疾病时，除原发损害外，缺血缺氧以及脑出血均可引起各种细胞因子、炎性递质分泌，造成或加重继发性脑损害[6]。TNF-α 属于前炎性细胞因子，在中枢神经系统主要由小胶质细胞、星形胶质细胞合成和分泌，有广泛的生物学活性，目前认为 TNF-α 在激发炎症的级联反应中起核心作用。Zhang 和崔洁等[7,8]在实验中证实炎症在脑出血后继发的脑水肿中起重要作用，并测得血肿周围 TNF-α 明显增高，48h 达到高峰。Vitarbo 等[9]在动物实验中检测到脑外伤后 1h 损伤区及其周围 TNF-α 显著增高，一直持续到 3h，随后迅速下降。王纯伦等[10]研究发现 TNF-α 与外伤性脑水肿呈显著正相关。本实验中于大鼠脑内直接注射 TNF-α 后，早期就可出现脑水肿，6h 达到高峰，72h 恢复到正常水平，从而进一步证实 TNF-α 在脑水肿的发生发展中起重要作用。TNF-α 引发的脑水肿 6h 即达到高峰，提示它有可能是脑水肿重要的诱发因素之一，但是目前对它引发脑水肿机制的研究相对较少。

AQPs 是近年来发现的一组与水通透有关的细胞膜转运蛋白，它们广泛分布于动物、植物及微生物的细胞膜上，是影响水跨膜转运和调节细胞内外环境平衡的主要膜蛋白，在脑组织中以 AQP4 含量最高。AQP4 在正常脑组织中主要分布于邻近毛细血管壁的星形胶质细胞足突上和脑室周围的室管膜细胞，是水在细胞、血管和脑室移动的关键部位[11]。Manley 等[12]对急性水中毒脑水肿动物模型的观察发现，AQP4 在水肿模型的脑组织内表达明显增强；应用基因敲除技术后显示，缺乏 AQP4 表达的大鼠比野生型鼠更易存活，且脑内水的容量及毛细血管周围星形胶质细胞水肿也明显减轻。Nicchia 等[13]在脑中动脉闭塞所致缺血性脑水肿模型中发现，敲除 AQP4 基因的大鼠神经缺失的表现明显比野生型大鼠轻，且 24h 内测定大脑半球膨胀百分数比野生型低 35%。多种脑水肿实验模型均显示 AQP4 在脑水肿的发生发展中发挥重要作用。

关于脑水肿的发生过程中 TNF-α 与 AQP4 是否有密切联系，国内外未见相关报道。本实验通过大鼠脑内直接注射 TNF-α 后诱发脑水肿，于 1h、6h、24h、72h 采用 RT-PCR 检测 AQP4 mRNA 表达，结果显示：1h 脑组织 AQP4 mRNA 表达未见明显增加（P>0.05），6h 达到高峰，72h 仍高于正常（P<0.05）。因此，TNF-α 诱发脑水肿的机制与 AQP4 上调密切相关，但 TNF-α 诱发 AQP4 上调的机制尚不清楚，需进一步深入研究。

BBB 主要由毛细血管内皮细胞、基膜和毛细血管周围的星形胶质细胞足突组成，是中枢神经系统和血液的分界面，限制血液中某些物质进入中枢神经系统，从而维持中枢神经系统内环境稳定。但在脑外伤、脑卒中、炎症、肿瘤等时，BBB 受损，功能障碍，血浆大分子物质从血管腔内移出进入脑组织内积聚于细胞外间隙，使细胞外渗透压升高，水分由血管壁渗出增多，形成血管源性脑水肿。有研究表明 TNF-α 参与 BBB 的破坏和脑水肿的形成[14]。本研究发现在大鼠脑内直接注射 TNF-α 后脑组织 EB 含量 1h 开始升高，6h 达到高峰，之后逐渐降低，但72h 仍高于正常（P<0.05），进一步证明 TNF-α 诱发的脑水肿与 BBB 通透性增加有密切联系。文献报道，TNF-α 可以直接作用于脑损伤区及其周围的血管内皮细胞，破坏它们之间的紧密联接[7]，并且可导致白细胞聚集和脑血管功能紊乱，影响 BBB 的通透性而致血管源性脑水肿。此外，大量释放的 TNF-α 可直接或间接作用于神经细胞和胶质细胞，诱导一些细胞因子如：IL-1、IL-6、IL-8、GM-CSF 等以及炎性介质的上调，并引起脑细胞特别是星型胶质细胞的肿胀和变性，继而释放各种兴奋性氨基酸和神经毒性因子（如氧自由基，NO 等），加重血脑

维普资讯 http://www.cqvip.com

屏障破坏和细胞膜损伤[15]。因此笔者认为 TNF-α 可通过破坏 BBB 诱发脑水肿。

AQP4 主要分布在脑毛细血管周围星形胶质细胞足突上,与 BBB 的关系极为密切。Nicchia 等[16]分别采用鸡视顶盖建立 BBB 发育的动物模型和脑微血管内皮细胞、星形胶质细胞共同培养的方法在体外建立血脑屏障模型,证明 AQP4 在 BBB 的发育和完整性方面有重要作用。Tomas-Camardiel 等[17]通过在大鼠脑内注射 LPS 的方法建立 BBB 开放的实验模型,证实 BBB 开放可以明显诱导 AQP4 表达上调。本研究对脑组织中 EB 含量与 AQP4 mRNA 表达进行相关性分析,结果显示二者呈显著正相关,且 BBB 开放的时间明显较 AQP4 上调的时间早,从而推测本实验中 AQP 4mRNA 表达上调的原因可能与 BBB 开放有关。

综上所述,本实验通过在大鼠脑内微量注射 TNF-α 后,发现早期就可出现脑水肿,并测得 AQP4 明显上调、BBB 通透性显著增加,且二者成显著正相关。因此,我们推测 TNF-α 诱发脑水肿的机制可能是:TNF-α 通过多种途径破坏 BBB,继而诱导 AQP4 表达上调,进一步加重脑水肿,形成恶性循环,在脑水肿的发生发展中起重要作用。

参 考 文 献

[1] Hua Y,Wu J,Keep RF,et al. Tumor necrosis factor-alpha increases in the brain after intracerebral hemorrhage and thrombin stimulation[J]. Neurosurgery,2006;58(3):542-550.

[2] Cai Z,Pang Y,Lin S,et al. Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat[J]. Brain Res,2003;975(1-2):37-47.

[3] Baskaya MK,Dogan A,Rao AM,et al. Neuroprotective effects of citicoline on brain edema and blood-brain barrier breakdown after traumatic brain injury[J]. J Neurosurg,2000;92(3):448-452.

[4] Papadopoulos MC,Krishna S,Verkman AS. Aquaporin water channels and brain edema[J]. Mt Sinai J Med,2002;69(4):242-248.

[5] Stamatovic SM,Dimitrijevic OB,Keep RF,et al. Inflammation and brain edema:new insights into the role of chemokines and their receptors[J]. Acta Neurochir Suppl,2006;96(1):444-450.

[6] David G,Serge R. Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system[J]. Brain Behav Immun,2007;21(3):281-289.

[7] Zhang X,Li H,Hu S,et al. Brain edema after intracerebral hemorrhage in rats:the role of inflammation[J]. Neurol India,2006;54(4):402-407.

[8] 崔 洁,曹参祥,郑 静,等.脑出血大鼠脑组织 MDA、TNF-α 含量变化及其依达拉奉干预效应的研究[J]. 第三军医大学学报,2007;29(11):1032-1035.

[9] Vitarbo EA,Chatzipanteli K,Kinoshita K,et al. Tumor necrosis factor alpha expression and protein levels after fluid percussion injury in rats:the effect of injury severity and brain temperature[J]. Neurosurgery,2004;55(2):416-424.

[10] 王纯伦,胡凤婵,鲁厚红.IL-6 和 TNF-α 在大鼠脑水肿发生中的动态变化及意义[J]. 陕西医学杂志,2006;35(9):1093-1096.

[11] Sobue K,Asai K,Katsuya H. Aquaporin water channels in the brain and molecular mechanisms of brain edema[J]. Nippon Rinsho,2006;64(6):1181-1189.

[12] Manley GT,Fujimura M,Ma T,et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke[J]. Nat Med,2000;6(2):159-163.

[13] Nicchia GP,Frigeri A,Liuzzi GM,et al. Inhibition of aquaporin-4 expression in astrocytes by RNAi determines alteration in cell morphology,growth,and water transport and induces changes in ischemia-related genes[J]. FASEB J,2003;17(11):1508-1510.

[14] Candelario-Jalil E,Taheri S,Yang Y,et al. Cyclooxygenase inhibition limits blood-brain barrier disruption following intracerebral injection of tumor necrosis factor-alpha in the rat[J]. J Pharmacol Exp Ther,2007;323(2):488-498.

[15] 崔 洁,王景周,宋 钦,等.脑出血大鼠脑水肿与血浆肿瘤坏死因子关系的研究[J]. 重庆医学,2007;36(13):1244-1245.

[16] Nicchia GP,Nico B,Camassa LM,et al. The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity:studies in animal and cell culture models[J]. Neuroscience,2004;129(4):935-945

[17] Tomas-Camardiel M,Venero JL,Herrera AJ,et al. Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes:protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals[J]. J Neurosci Res,2005;80(2):235-246.

(责任编辑:关蕴良)