DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.019
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
1636 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)18-1636-04

大鼠创伤性脑损伤后NGF mRNA表达变化及外源性IL-1β对其影响

周 政[1],陈惠孙[2],张可成[1],杨 辉[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院神经外科,重庆 400037,[2]附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 观测大鼠脑损伤后NGF mRNA表达变化及IL-1β对其的影响,探讨NGF及IL-1β在脑创伤中的作用机制。方法 在建立流体脑创伤模型的基础上,采用RT-PCR、分子杂交及免疫细胞化学等技术,观测脑创伤后NGF mRNA的表达变化以及外源性IL-1β对其的影响。结果 NGF mRNA在伤后12 h脑伤灶及其周围即出现表达的增加,在脑致伤后24 h及3 d NGF mRNA的表达明显增加,达到峰值,其后逐渐降低但表达仍然高于对照组。IL-1β处理组致伤后3 h即出现NGF mRNA表达的增加,NGF mRNA的含量明显高于单纯致伤组及对照组($P<0.01$),并在伤后24 h达到峰值。结论 脑创伤后NGF mRNA表达的增加可能和创伤早期对神经细胞的保护作用和修复机制有关。IL-1β mRNA的表达增加早于脑创伤后NGF mRNA的表达增高。外源性IL-1β能提高脑创伤后NGF mRNA的表达水平。

关键词:脑创伤;NGF mRNA;IL-1β
中图法分类号:R392.11;R651.1+5 文献标识码:A

Changes of NGF mRNA expression and effect of exogenous IL-1β on it in rat after traumatic brain injury

ZHOU Zheng, CHEN Hui-sun, ZHANG Ke-cheng, YANG Hui (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of NGF mRNA expression and the effect of exogenous interleukin-1β (IL-1β) on it in rats after traumatic brain injury (TBI) and to explore the mechanism of NGF and IL-1β in TBI. Methods A brain trauma model of fluid-percussion in rats was established. Changes of NGF mRNA expression and effect of exogenous IL-1β on it were observed by RT-PCR, molecular hybridization and immunocytochemical techniques. Results NGF mRNA expression in the brain injury site and tissues adjacent to it began to increase at 12 h after trauma and increased markedly at 24 h and reached the peak value on the 3rd. Then it decreased gradually, but still higher than that of the control. NGF mRNA expression increased at 3 h after trauma in IL-1β treatment group and was significantly higher than that in simple trauma and control groups ($P<0.01$) and peaked at 24 h following brain trauma. Conclusion High expression of NGF mRNA after TBI may be related to the mechanisms of neuron protection and repair. Exogenous IL-1β can increase NGF mRNA expression level following brain trauma.

Key words: TBI; NGF mRNA; interleukin-1β

虽然在中枢神经系统(Central nervous system, CNS)创伤后的受损伤神经元并不能发生再生,但随着时间的推移,却常出现相当程度的有意义的功能性恢复。目前对这种恢复的分子基础尚知之甚少,但在受损伤的CNS组织中增高的神经营养因子(Neurotrophic factors, NTFs)的活性及已知的神经营养因子在神经元的生长和维持上的特性提示这些多肽可能与受损伤神经元功能的恢复有关。神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)是神经系统最重要的生物活性物质之一。虽然对损伤所诱导的NGF基因表达的报道很多,但多半集中在缺血、缺氧、自由基、兴奋性神经毒性物质等所引起的NGF表达的研究上[1],本实验在建立流体脑创伤模型的基础上,采用RT-PCR、分子杂交及免疫细胞化学等技术,旨在探讨脑创伤后NGF的表达变化以及IL-1β对其的影响,为进一步了解脑创伤后NGF对神经元功能恢复的意义奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Alzet Model2002型微渗透泵购自美国ALZA公司;流体冲击

作者简介:周 政(1964—),男,湖南省新化县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事颅脑创伤及脑血管病外科方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68755610

收稿日期:2002-11-25;修回日期:2003-04-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

液压伤装置由第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所提供; 试剂: rh-IL-1β 购自 Boehringer Mannheim 公司, 兔抗 NGF 多抗购自中山公司; 兔抗 IL-1β 多抗购自 Boehringer Mannheim 公司 SP 免疫组化试剂盒购自中山生物技术公司。

1.2　实验动物及分组

Wistar 大鼠 118 只, 体质量 250~300 g, 由重庆市第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。将动物分为: A: 对照组 28 只; B: 致伤组, 设立下列各时相点: 伤后 3、12、24 h、3、7 d, 每个时相点动物各 8 只; C: IL-1β 处理组: 设相同时相点及对照组(10 只)。

1.3　方法

1.3.1　流体冲击致大鼠脑创伤模型制备　　参见 Mclntosh 等[2] 的模型制备方法, 中度颅脑流体冲击液压伤的压力峰值为 (1.68±0.32) atm, 波宽(6.8±0.3) ms。

1.3.2　IL-1β 处理组给药方法　　动物致流体冲击脑创伤后立即行右侧侧脑室立体定向穿刺, 将脑灌注泵的灌注导管通过立体定向的方法插入右侧侧脑室, 固定好灌注导管后将导管尾端与微泵连接, 微泵内含有 rhIL-1β 20 ng/ml 的人工脑脊液(Artificial cerebrospinal fluid, ACSF), 微泵的总容量 200 μl, 对照组仅灌注 ACSF, 将微泵埋于鼠颈部皮肤下。

1.4　检测指标

1.4.1　NGF、IL-1β 免疫组化、原位杂交及含量检测　　免疫组化及原位杂交方法参照文献[3], 定量 ELISA 测定 NGF 和 IL-1β 方法参照文献[4], 其中所配置的抗体稀释度为 NGF 多抗为 1∶200, IL-1β 多抗为 1∶1 000, 二抗、三抗的浓度均为 1∶200[3,4]。

1.4.2　NGF 的 RT-PCR　　扩增 NGFcDNA 特异性片段的引物为: 上游引物 5′-TCCAATCCTGTTGAGAGTGG-3′, 下游引物: 5′-CAGGCTGTGTCTATCCGGAT-3′, 这对引物特异扩增 144 bp 的 NGFcDNA 片段。其 RT-PCR 产物的电泳图置于 CS-9000(日本岛津公司)型双波长薄层扫描上, 540 nm 波长处扫描, 计算各样品点所含 mRNA 的总量。

1.5　统计学处理

本实验的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 用 t 检验。记数资料组间比较用 χ^2 检验, 并在 Microsoft Excel 的计算机软件中进行统计学处理。

2　结果

2.1　创伤组织 NGF、IL-1β 的免疫组织化学及原位杂交分析

2.1.1　NGF 免疫组织化学及原位杂交分析　　创伤后 12、24 h, 伤灶周围、皮层下及海马区域仍然可以见到明显的阳性细胞, 且一直持续到伤后 7 d 达到高峰, 其中可见在伤侧海马区域 NGF mRNA 的表达量最高, 见图 1。

2.1.2　IL-1β 的免疫组织化学及原位杂交分析　　IL-1β 阳性细胞主要位于伤灶及其周围脑组织中, 伤侧海马阳性细胞增加明显, 至伤后 3 d 及 7 d 上述脑区的阳性染色逐渐减弱, 脑创伤后对侧相应脑区及海马、脉络丛组织有不同程度的 IL-1β mRNA 表达的增加, 见图 2, 3。

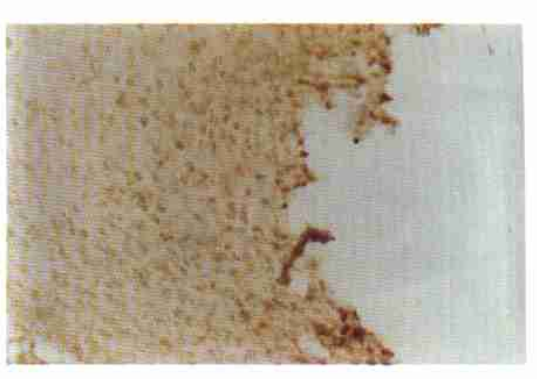


图 1　致伤 24 h 伤灶周围 NGF 阳性细胞明显增多　(S-P× 200)

Fig 1　NGF positive cells markedly increase around the lesion site at 24 h following trauma　(S-P× 200)



图 2　致伤后 24 h 伤侧半球 IL-1β 阳性细胞反应性增加　(S-P× 200)

Fig 2　IL-1β positive cells increase in the hemisphere on the injured side at 24 h following trauma　(S-P× 200)



图 3　致伤后 24 h 伤侧海马区域 IL-1β mRNA 的表达　(ISH× 200)

Fig 3　IL-1β mRNA expression in hippocampus on the injured side at 24 h following trauma　(ISH× 200)

2.1.3　IL-1β 处理组的动物致伤后 3 h 即可在伤灶周围见到大量阳性细胞, 呈逐渐增加的趋势, 并在伤后 24 h 其 NGF mRNA 的表达达到峰值, 并且可见整个大脑半球有大量的阳性细胞染色, 在致伤后 3、7 d 表达量仍然比同时相点的致伤组高。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 脑创伤后NGF mRNA的RT-PCR检测

伤后24 h组NGF mRNA的表达急剧增加并达到最高峰，而且随着伤后时间的延长，其mRAN的表达仍然维持在高的表达状态。经IL-1β处理后在伤后12 h组就明显增加，并在伤后12、24 h及3 d其NGF mRNA的表达达到最大值，见表1。

表1 脑创伤后不同时相点NGF mRNA含量变化(ng/mg)

Tab 1 Changes of NGF mRNA content at different time points after TBI(ng/mg)

Group	Control	Time after TBI				
		3 h	12 h	24 h	3 d	7 d
Trauma	7.65	7.93	8.04	36.40 *	26.61 *	13.38 *
IL-1β	3.89	7.49 *	22.87 *#	29.75 *#	28.06 *	7.92 *#

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* trauma group

2.3 IL-1β、NGF的含量变化

2.3.1 IL-1β含量的变化 定量ELISA法测定伤后3、12、24 h等各时相点的脑组织IL-1β的含量均显著高于对照组，尤以伤后12 h组的含量最高，达(2.87±0.18) ng/mg($P<0.01$)。

2.3.2 NGF含量的变化 定量ELISA法测定伤后24 h、3 d及7 d组NGF含量与对照组相比有明显的增加($P<0.01$)，其致伤后3 d组为(7.23±0.87) ng/mg，达到峰值。

2.3.3 IL-1β处理组的NGF含量变化 经IL-1β处理后的NGF含量在伤后24 h达到高峰，其余各时相点的NGF含量较同时相点的单纯致伤组有明显增加($P<0.01$)，见表2。

表2 脑创伤后不同时相点NGF和IL-1β的含量变化($\bar{x}\pm s$, ng/mg)

Tab 2 Changes of NGF mRNA and IL-1β contents at different time points after TBI($\bar{x}\pm s$, ng/mg)

	n	Content		
		IL-1β	NGF(trauma group)	NGF(IL-1β group)
Control group	8	0.72±0.04	1.78±0.16	1.73±0.22
3 h after TBI	8	2.21±0.19 **	1.81±0.18	2.03±0.26 *
12 h after TBI	8	2.87±0.18 **	2.19±0.21 *	7.98±0.75 *##
24 h after TBI	8	1.93±0.16 **	3.66±0.53 **	8.45±1.13 *##
3 d after TBI	8	1.36±0.13 **	7.23±0.87 **	8.42±1.06 *##
7 d after TBI	8	1.12±0.10 **	5.68±0.82 **	7.03±0.97 *##

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ *vs* control;
##: $P<0.01$ *vs* NGF group

3 讨论

3.1 NGF mRNA在脑创伤后脑组织中表达变化的意义

脑内NGF含量在个体发育成熟和衰老过程中有复杂的变化，这种复杂变化可能与神经细胞分化、功能联系的建立和维持及衰老有密切关系。本实验从基因表达及蛋白表达两个方面对脑创伤以后NGF的变化情况作了观察，发现正常脑组织NGF mRNA的表达主要集中在海马及大脑皮层，创伤后3 h未见明显增加，创伤后12 h原位杂交即可在创伤区域及海马见到NGF mRNA表达增加，并在伤后24 h达到高峰，其后仍然维持较高水平的表达，在致伤后7d组仍然较正常对照组有显著的表达增加。脑创伤后3 h原位杂交可以在海马中发现有NGF mRNA表达增加。同样NGF蛋白水平也在脑创伤后的3 d组、7 d组含量最高，与对照组相差非常显著，说明NGF的活性在脑创伤后有明显增高，这种增高的NGF活性可能与脑创伤后的病理生理改变密切相关。通常认为，NGF mRNA表达水平在脑损伤后的增加可能是使神经退化变性局限化的一种内源性抗损伤的天然机制。脑损伤后机体功能部分恢复所需的细胞过程，可能也受到增加的NGF以及其它神经营养因子的影响。这些过程包括防止神经元死亡、增强神经细胞再生能力、促进神经细胞分化及神经递质的摄取和合成以及重建脑创伤后受损的血脑屏障等[5]。依据损伤的性质不同，这种天然的代偿性反应方式也各不相同。如神经轴突被切断后，NGF一方面促进断端再生，保护周边受侵袭而尚未死亡的神经元，使其延长存活时间，另一方面促进周边健康完好的神经细胞轴突芽生，发挥代偿作用。此外，NGF能明显提高中隔培养细胞的ChAT活性及促进脑损伤后神经胶质细胞的分裂增殖。针对创伤性脑损伤后NGF mRNA表达的增高，根据一些作者在离体实验中所得的结果[6]，可以推测出NGF mRNA表达增高可能与脑创伤早期神经细胞的保护作用和损伤修复有关。这可能与神经元损伤的共同机制有关。有关NGF在TBI中表达的增加是否可以作为判断脑创伤程度的一个标志以及和神经功能部分恢复有何关联目前尚不清楚。

3.2 IL-1β对NGF mRNA表达的影响

有研究表明IL-1β在原发性脑损伤后的脑细胞继发性损害中可能起重要作用。它能引起微血管损伤、破坏血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)、星形神经胶质疤痕形成以及加重脑水肿等。在离体实验中发现IL-1β是NGF合成调节的主要效应物质。Bandtlow等[7]报道在正常成年大鼠的某些脑区，IL-1β mRNA和IL-1活性与NGF mRNA部分地共定位，在海马内注射IL-1β可增加NGF mRNA水平。在体外培养下，IL-1β主要是通过IL-1 Ⅰ型受体来诱导星型胶质细胞NGF合成和分泌的[8]。对于脑室内灌注IL-1β是如何影响NGF的分泌和合成，目前尚未见有文献报道。本实验的结果显示大鼠脑创伤后IL-1β及NGF的表达均有明显增加，其中经过IL-1β灌注处理后的NGF在伤后12 h就出现明显增加。经IL-1β灌注处理后的NGF表达与单纯致伤组相比有非常显著的差异，其提高NGF的水平在伤后1 d即达到高峰，这种作用可能和脑创伤

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后机体的修复及抗损伤机制有关[5]。在脑创伤中 IL-1β 既能加重脑创伤的继发性损害，又能增加脑创伤后神经营养因子的活性。目前并不清楚增加了的 IL-1β 是否能完全阻止或增加继发性脑损伤的过程，并且是否和伤后可能的功能恢复有关等。Goss 等[9] 报道亚低温治疗能够有效降低 IL-1β mRNA 水平，减轻脑创伤后的炎性反应，但同时也伴有 NGF mRNA 和蛋白水平的降低。作者认为脑创伤后亚低温治疗方案需要考虑到把神经营养因子的使用结合起来，而且认为这种作用的产生至少部分是通过调节 NGF 来实现的。

参考文献：

[1] Semkova I, Krieglstein J. Neuroprotection mediated *via* neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors[J]. Brain Res Rev, 1999, 30(2): 176－188.
[2] McIntosh T K, Vink R, Noble L, *et al*. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid percussion model[J]. Neuroscience, 1989, 28(1): 233－244.
[3] 蔡文琴，王伯沅. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 103－105.
[4] 徐宜为. 免疫检测技术[M]. 北京：科学出版社，1991. 161－180.
[5] Oyesiku N M, Evans C O, Houston S, *et al*. Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain[J]. Brain Res, 1999, 833(2): 161－172.
[6] Lazar M F, Hegyesi H, Toth S, *et al*. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma[J]. Cytokine, 2000, 12(6): 547－554.
[7] Bandtlow C E, Meyer M, Lindholm D, Spranger M, *et al*. Regional and cellular codistribution of interleukin-1 beta and nerve growth factor mRNA in the adult rat brain: Possible relationship to the regulation of nerve growth factor synthesis[J]. J Cell Biol, 1990, 111(4): 1701－1711.
[8] Juric D M, Carman K M. Interleukin-1 beta, but not IL-1 alpha, mediates nerve growth factor secretion from rat astrocytes *via* type Ⅰ IL-1 receptor[J]. Int J Dev Neurosci, 2001, 19(7): 675－683.
[9] Goss J R, Styren S D, Miller P D, *et al*. Hypothermia attenuates the normal increase in interleukin 1 beta RNA and nerve growth factor follwing traumatic brain injury in the rat[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(2): 159－167.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2003)18-1639-01

个案与短篇

前列腺素 E_1 治疗慢性肾功能不全的疗效观察

Effects of prostagladin E_1 in the treatment of chronic renal failure

谭金春，张 翼，唐永忠 （重庆市涪陵中心医院肾内科，重庆 408000）

1 资料与方法

1.1 资料

本院 1999 年至 2001 年住院的慢性肾功能不全病人 70 例，男性 44 例，女性 26 例，年龄 19～65 岁，平均(42±9)岁，所有病例均符合慢性肾功能不全的诊断标准[1]，并排除感染、体液丢失、低血压存在。肱动脉平均动脉压(MAP)78～160 mmHg，平均(135±25)mmHg；血肌酐(Cr)210.51～671.39 μmol/L，平均(340.60±95.04)μmol/L；血红蛋白(Hb)61.2～124.7 g/L，平均(81.0±18.1) g/L。其中氮质血症期(血 Cr 178～450 μmol/L)46 例，肾功能衰竭期(血 Cr 450～707 μmol/L)24 例。将 70 例患者分为 PGE_1 组 40 例与对照组 30 例。PGE_1 组与对照组治疗前以上指标除男女外，经统计学 t 检验差异不显著。

1.2 治疗方法

对照组以优质低蛋白低磷饮食，控制血压(洛汀新或波依定)、血脂、血糖，控制蛋白尿(黄芪注射液 60 ml/d 静滴，无禁忌证者加洛汀新 10～20 mg/d 口服)，纠正酸中毒，服阿魏酸哌嗪、大黄苏打片综合治疗。贫血病人未使用促红细胞生成素。PGE_1 组在对照组治疗的基础上，以 PGE 1 200 μg/d 静脉滴注，2 周为一疗程，休息 2 周后进行下一疗程，共 3 个疗程。

1.3 血生化值测定

全自动生化分析仪检测。

1.4 血压测定

晨 7 时，测 3 次肱动脉压，取平均值。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，各组间差异用 t 检验及相关分析。

2 结果

2.1 慢性肾功能不全(氮质血症期)

①治疗前后对比：两组病人经治疗后，MAP、BUN、Cr 均显著下降($P<0.01$)，但对照组贫血改善不明显，而 PGE1 组 Hb、HCT、RBC 在治疗后明显上升($P<0.01$)；②治疗后组间对比：PGE_1 组 MAP、BuN、Cr 显著低于对照组($P<0.01$)，Hb 及 RBC 明显高于对照组，有显著差异($P<0.05$)。

（下转 1642 页）

作者简介：谭金春(1964－)，男，重庆市人，主治医师，主要从事肾脏内科临床方面的研究。电话：(023)72221895

收稿日期：2002-07-10；修回日期：2002-10-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net