

凝血酶诱发的脑积水中 TNF- α 与 IL-1 β 对水孔蛋白-1 与水孔蛋白-4 表达水平的影响

王伟 龙春燕 付雪雯 周敬华

【摘要】 目的 探讨蛛网膜下腔出血(Subarachnoid hemorrhage, SAH)中凝血酶(Thrombin, TH)诱导脑积水形成时肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)在脑积水病理发展过程中对水孔蛋白 1(Aquaporin 1, AQP1)和水孔蛋白 4(Aquaporin 4, AQP4)表达水平的调控作用。**方法** 选用健康雄性远交群(Sprague Dawley, SD)大鼠 40 只,随机分成 4 组($n=10$):假手术组、凝血酶(Thrombin, TH)组、TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组;假手术组大鼠枕大池注入 0.3 mL 生理盐水;TH 组大鼠枕大池注入 0.3 mL(10 U/mL)凝血酶;TH/TNF- α 抑制剂组大鼠枕大池注入 0.3 mL(10 U/mL)凝血酶 + (0.25 μ M)TNF- α 抑制剂 Simponi, TH/IL-1 β 抑制剂组大鼠枕大池注入 0.3 mL(10 U/mL)凝血酶 + (0.25 μ M)TH/IL-1 β 抑制剂 GIBH-130;每组大鼠至少 5 只以上,按照缺失补足以保证充足的样本量;建模后的第 1、3 d 对大鼠行神经功能评分;第 3 d 将大鼠处死,计算相对侧脑室面积,免疫组织化学染色评价大鼠 TNF- α , IL-1 β , AQP1 及 AQP4 的阳性表达水平。**结果** (1)第 3 d 假手术组、TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组大鼠侧脑室面积分别为(3.58 \pm 0.40)、(6.09 \pm 0.82)、(5.06 \pm 0.53)、(5.25 \pm 0.68)%;与假手术组比较,TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组相对侧脑室面积增大($P<0.01$);与 TH 组比较, TNF- α 抑制剂组与 IL-1 β 抑制剂组相对侧脑室面积减少($P<0.01$);(2)免疫组织化学染色检测:1)大鼠 TNF- α 与 IL-1 β 的免疫阳性表达主要分布于胞浆内, TNF- α 主要位于侧脑室周围组织的星形胶质细胞及神经元, IL-1 β 主要位于侧脑室周围组织的小胶质细胞及星形细胞;与假手术组比较, TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组 TNF- α 与 IL-1 β 的阳性表达增加($P<0.01$);与 TH 组比较, TH/TNF- α 抑制剂及 TH/IL-1 β 抑制剂组 TNF- α 与 IL-1 β 的阳性表达减少($P<0.01$);2)AQP1 与 AQP4 的免疫阳性表达主要分布于胞膜,其中 AQP1 主要位于脉络丛上皮细胞, AQP4 主要位于侧脑室周围组织的室管膜细胞;与假手术组比较, TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组 AQP1, AQP4 的阳性表达增加($P<0.01$);与 TH 组比较, TH/TNF- α 抑制剂及 TH/IL-1 β 抑制剂组 AQP1, AQP4 的阳性表达减少($P<0.01$)。**结论** (1)在 TH 诱发的 SAH 脑积水病理发展中 TH 可诱导 TNF- α 、IL-1 β 表达水平上调,从而增加 AQP1 的表达,促进脉络丛分泌脑脊液;AQP4 表达水平升高可能为脑积水后的代偿反应;(2)通过抑制 TNF- α 、IL-1 β 表达可以下调 AQP1,并引起继发性的 AQP4 的表达减少,改善大鼠神经功能缺损症状;TNF- α 、IL-1 β 可作为临床治疗脑积水的重要靶点。

【关键词】 脑积水 凝血酶 肿瘤坏死因子- α 白细胞介素-1 β 水孔蛋白 1 水孔蛋白 4

【中图分类号】 R743.35 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2022)01-0019-08

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.01.004

Thrombin-induced hydrocephalus: the effect of TNF- α and IL-1 β on the expression of aquaporin1 and 4

Wang Wei, Long Chunyan, Fu Xuewen, et al. Department of Neurology, the First Clinical Medical College of China Three Gorges University, Yichang Hubei 443000

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) regulateing the expression of aquaporin 1 (AQP1) and aquaporin 4 (AQP4) on the pathological development of hydrocephalus induced by thrombin(TH). **Methods** Forty healthy male SD rats were randomly divided into four groups ($n=10$): sham operation group, TH group, TH/TNF- α inhibitor group, TH/IL-1 β inhibitor group. Rats in the sham operation group were injected with 0.3 mL of

基金项目:宜昌市医疗卫生科项目(A19-301-03)

作者单位:443003 湖北省宜昌市三峡大学第一临床医学院(宜昌市中心人民医院)神经内科[王伟 龙春燕 付雪雯 周敬华 (通信作者)]

normal saline into the cisterna magna, rats in the TH group were injected with 0.3 mL (10 U/mL) of TH into the cisterna magna, and the rats in the TH/TNF- α inhibitor group were injected with 0.3 mL (10 U/mL) of TH + 0.25 μ M TNF- α inhibitor (Simponi) into the cisterna magna, and the rats in the TH/IL-1 β inhibitor group were injected with 0.3 mL (10 U/mL) of TH + 0.25 μ M TH/IL-1 β inhibitor (GIBH-130) into the cisterna magna. There were at least 5 rats in each group, and sufficient sample size was guaranteed according to deficiency supplement. Neurological function scores were performed on the first and third days after odeling. On the third day, the rats were sacrificed and the relative lateral ventricle area was calculated. The positive expressions of TNF- α , IL-1 β , AQP1 and AQP4 proteins were evaluated by immunohistochemical staining.

Results (1) The area of lateral ventricle in the sham operation group, the TH group, the TH/TNF- α inhibitor group, the TH/IL-1 β inhibitor group was (3.58 ± 0.40 %), (6.09 ± 0.82 %), (5.06 ± 0.53 %), (5.25 ± 0.68 %). Compared with the sham operation group, the relative lateral ventricle area of the TH group, the TH/TNF- α inhibitor group and the TH/IL-1 β inhibitor group increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Compared with the TH group, the area of lateral ventricle in the TNF- α inhibitor group and the IL-1 β inhibitor group decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). (2) Immunohistochemical test: 1) The immunopositive expression of TNF- α and IL-1 β was mainly distributed in the cytoplasm of rats. TNF- α was mainly located in the astrocytes and neuronal cells of the peripheral tissues of the lateral ventricles. IL-1 β was mainly located in the microglia and astrocytes of the peripheral tissues of the lateral ventricles. Compared with the sham operation group, the positive expression of TNF- α and IL-1 β protein was increased in the TH group, the TH/TNF- α inhibitor group and the TH/IL-1 β inhibitor group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Compared with TH group, the positive expression of TNF- α and IL-1 β protein in the TH/TNF- α inhibitor group and the TH/IL-1 β inhibitor group decreased, with statistical significance ($P < 0.01$). 2) The immunopositive expressions of AQP1 and AQP4 were mainly distributed in the cell membrane, AQP1 was mainly located in the choroid plexus epithelial cells, and AQP4 was mainly located in the ependymal cells of the periventricular tissues. Compared with the sham operation group, the positive expressions of AQP1 and AQP4 protein in the TH group, the TH/TNF- α inhibitor group and the TH/IL-1 β inhibitor group were increased, with statistical significance ($P < 0.01$). Compared with the TH group, the positive expressions of AQP1 and AQP4 protein in the TH/TNF- α inhibitor group and the TH/IL-1 β inhibitor group were decreased, with statistical significance ($P < 0.01$). **Conclusion** (1) In the pathological development of SAH hydrocephalus induced by TH, TH can induce the up-regulation of TNF- α and IL-1 β , thereby increasing the expression of AQP1 and promoting the secretion of cerebrospinal fluid from the choroid plexus. The elevated expression of AQP4 may be a compensatory response after hydrocephalus. (2) By inhibiting TNF- α and IL-1 β , AQP1 can be down-regulated, and secondary AQP4 expression can be reduced, and the symptoms of neurological impairment in rats can be improved. TNF- α and IL-1 β may be important targets for clinical treatment of hydrocephalus.

【Key words】 Hydrocephalus Thrombin Tumor necrosis factor- α Interleukin-1 β Aquaporin 1
Aquaporin 4

SAH 全球发病率约每年 9/10 万人, 由于年龄、性别及国家等不同而有所差异, 但因其致死率较高, 且病程持久, 已经成为全球瞩目的公共卫生难题^[1]。一旦发生 SAH, 常会导致机体神经功能损伤, 这包含脑水肿、脑积水、血栓形成、脑调节机制紊乱以及内皮细胞及神经细胞凋亡等诸多病理性机制^[2-3]。

Long 等^[4] 研究报道通过 SD 大鼠枕大池 2 次注血法建立 SAH 模型后发现 AQP1 与 AQP4 的表达均出现上调, 两者的变化趋势显示出同脑积水动

态变化趋势之间的高度一致性, 且经枕大池直接注射凝血酶后可诱导大鼠 SAH 脑积水, AQP1 和 AQP4 的表达水平均有所增高, 两种蛋白的表达水平变化显示随着脑积水时间的推移其表达呈现出显著正相关。有研究证据表明, 凝血酶相应的蛋白酶激活受体 (Protease-activated receptors, PARs) 可诱导炎症因子表达过程, 可通过蛋白酶激活受体-1 与蛋白酶激活受体-4 的激活途径来实现, 并且同脑卒中的炎性损伤有一定联系^[5-6]。Cheng 等^[7] 研究结

果表明在对小鼠脑组织注射凝血酶后可检测到其中 IL-1 β 的表达水平差异,而且 PAR-1 基因敲除大鼠呈现为 IL-1 β 表达水平下调及脑卒中损伤减轻。本研究将探讨 TNF- α 和 IL-1 β 在凝血酶诱发的 SAH 后脑积水病理发展过程中对水孔蛋白 AQP1 和 AQP4 表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SD 雄性大鼠 40 只,体重 230~250 g,购于三峡大学实验动物中心;实验动物使用许可证号编号:SYXK(鄂)2017-0061,实验动物生产许可证号编号:SCXK(鄂)2017-0012;将大鼠分笼喂养,室温控制在 20~25 $^{\circ}\text{C}$,避免强光、噪音,自由饮水,自由摄食(标准颗粒饲料)。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 水合氯醛(上海化学试剂公司),4%多聚甲醛(上海图赫实业有限公司),TH 冻干粉(湖南一格制药有限公司),无水乙醇(国药集团),AQP1 抗体(美国 abcam 公司),AQP4 抗体(美国 abcam 公司),Simponi(上海碧云天生物技术有限公司),GIBH-130(上海碧云天生物技术有限公司),山羊血清(北京博奥生物技术有限公司),伊红染料(谷歌生物科技有限公司),苏木素染色液(Sigma 公司),盐酸(国药集团),二甲苯(国药集团),中性树胶封片剂(国药集团),冰醋酸(国药集团),琼脂糖(美国 Amresco 公司),三羟甲基氨基甲烷(美国 Amresco 公司),丙烯酰胺(Acrylamide, Acr)(美国 Amresco 公司),溴酚蓝(美国 Amresco 公司),甲叉丙烯酰胺(美国 Amresco 公司),苯甲基磺酰氟(上海碧云天生物技术有限公司),过硫酸铵(国药集团),十二烷基硫酸钠(国药集团),蛋白 marker(Thermo 公司),兔抗 TNF- α (武汉爱博泰克生物科技有限公司),兔抗 IL-1 β (北京博奥森生物技术有限公司),兔抗 AQP1(武汉博士德生物工程有限公司),兔抗 AQP4(武汉三鹰生物技术有限公司),羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司),显色底物液(武汉赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2.2 主要仪器 脑立体定位仪(Stoelting 公司),微量进样器(杭州贵驰科技有限公司),电子天平(上海越平科学仪器有限公司),脱水机(武汉俊杰 JT-12J 电脑生物组织脱水机),病理切片机(德国 Leica RM 2016 轮转式切片机),切片刀(日本羽毛

R35 一次性刀片),组织摊烤片机(武汉俊杰 JK-6 生物组织摊烤片机),载玻片及盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司),抗原修复用电陶炉(SKG),包埋机(武汉俊杰 JB-P5),显微镜成像系统(Leica 公司),微量移液器(德国艾本德公司),pH 计(德国 Mettler-Toledo GmbH 公司),酶标仪(Thermo 公司),高温高压灭菌器(上海博迅实业有限公司),超纯水系统(美国 Millipore 公司),电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),超声波清洗器(江苏昆山禾仓超声仪器有限公司),纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.3 实验动物分组及模型建立

选用健康雄性 SD 大鼠 40 只,随机分成 4 组($n=10$):假手术组、TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组。假手术组大鼠的枕大池注入 0.3 mL 生理盐水;TH 组大鼠枕大池注入 0.3 mL (10 U/ml)的凝血酶;TH/TNF- α 抑制剂组大鼠枕大池注入 0.3 mL (10 U/mL) 的凝血酶 + (0.25 μM)TNF- α 抑制剂 Simponi;TH/IL-1 β 抑制剂组大鼠枕大池注入 0.3 mL (10 U/mL)的凝血酶 + (0.25 μM)TH/IL-1 β 抑制剂 GIBH-130。每组大鼠至少 5 只以上,按照缺失补足以保证充足的样本量。

枕大池注入凝血酶脑积水模型:大鼠术前 12 h 禁食,6 h 禁水,参照 Dudhani 等报道过的枕大池 2 次注血法完成^[8]。大鼠称重后用 10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉;大鼠俯卧位固定于操作台上,头部固定于脑立体定向仪上;大鼠颈后中部备皮,碘伏常规消毒,大拇指扣及枕外隆凸处从此处向后纵行切开皮肤约 2 cm,将颈后部肌肉组织钝性分离直到暴露寰枕筋膜;使用 4/5 号针头注射器穿刺大鼠的枕大池,抽取脑脊液 0.05~0.1 mL,用微量进样器取 0.3 mL 的 10 U/mL TH 生理盐水、0.3 mL 的 10 U/mL TH + 0.25 μM Simponi 或 10 U/mL TH + 0.25 μM GIBH-130,使微量进样器与大鼠颈部成角约 30 $^{\circ}$,于寰枕筋膜正中进针,深度 3~5 mm,速度约 0.1 mL/min 缓慢注入,停留 3~5 min 后拔针,立即用无菌棉签按压穿刺点约 40 s,见无液体流出,缝合切口;术后将大鼠取俯卧头低位约 30 $^{\circ}$ 持续约 30 min,让注射液均匀分布于椎基底动脉周围。假手术组按照上述操作进行同样的手术步骤,但枕大池内注入 0.3 mL 的无菌生理盐水。在大鼠麻醉苏醒后重新放回笼中,同一环境下自由饮水,

标准饲料饲养。注射部位标准:使用微量进样器注入 TH 前轻微回抽,若见有脑脊液(Cerebrospinal fluid, CSF)样液体流入,代表注射部位正确,TH 注入枕大池。

1.4 神经功能评分

在建模后的第 1 和 3 d 用改良的 Garcia 神经系统评分法对 4 组大鼠神经功能损伤进行评分。共 6 项神经功能评分内容:①自主活动;②肢体自主活动;③前肢运动;④鼠笼攀爬能力;⑤躯干两侧的触觉反应;⑥触须触摸反应。每项内容 0~3 分,0 分为重度损伤,1 分为中度损伤(感觉评分为重度),2 分为轻度损伤(感觉评分为中度),3 分为正常,共 3~18 分,得分越高,神经功能评价越好。

1.5 苏木素-伊红(Haematoxylin-eosin, HE)染色与脑积水的评估

取假手术组、TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组大鼠各 5 只,于建模后第 3 d 用 10%的水合氯醛腹腔注射深度麻醉大鼠,快速心脏灌注生理盐水 250~300 mL 至肝脏变白后接着灌注 4%的多聚甲醛(100 mL/100 g)250~300 mL,至大鼠全身强直僵硬后停止灌注,断头取出完整的脑组织;再用 4%的多聚甲醛固定 24 h,然后使用梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡(生物组织脱水机器自动程序)、常规包埋;制备视前区、纹状体与海马平面的脑组织切片;之后通过烤片、切片脱蜡、用苏木素-伊红染色液染色,显微镜对视前区、纹状体与海马平面切片完整取图。采用 Hu 等^[9]研究报道过的方法对侧脑室相对面积进行计算,通过 Adobe,Photoshop CS6 等软件对上述 3 个平面的侧脑室面积与整个脑片的面积进行形态学的比较分析,计算出相对侧脑室面积(侧脑室面积/脑片面积 $\times 100\%$),每只大鼠取 3 个平面的相对侧脑室面积的均值。用 Okubo 等实验报道过的方法,以对照组作为参照,当相对侧脑室面积 $>$ 对照组的平均相对侧脑室面积 $+ 3SDs$ 为脑积水^[10]。

1.6 免疫组织化学染色

将脱蜡水化后的组织切片置于烧杯中加适量的修复液(0.01 M 枸橼酸缓冲液, pH 6.0)于烧杯中,用微波炉加热使液体沸腾,修复时间为 15 min;到时间后将烧杯从微波炉中取出,冷水中降温,降至室温后取出玻片,用磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer salt solution, PBS) (pH 7.4) 冲洗 3 遍,每次 3 min;将配制好的 3%的过氧化氢滴加于切片组织

上以阻断内源性过氧化物酶,室温孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;擦干玻片,免疫组化笔在组织周围画圈,滴加稀释好的正常山羊血清,室温封闭 30 min;加入一抗,除去多余液体后滴加稀释好的一抗(TNF- α 1:100, IL-1 β 1:100, AQP1 1:50, AQP4 1:100),加完后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育过夜(15 h);加酶标二抗, PBS 冲洗切片 3 min $\times 3$ 次,吸水纸擦干切片后滴加辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;加显色剂, PBS 冲洗切片 3 min $\times 4$ 次,吸水纸擦干切片,每张切片滴加新鲜配制的二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色液,显微镜下观察,阳性信号为棕黄色或棕褐色;用苏木素复染 2 min,水洗用 1%的盐酸酒精分化,再用 PBS 浸洗返蓝;脱水后封片置于通风橱中晾干;将晾干的切片放在显微镜下观察,采集图像,使用 IPP 6.0 软件对免疫组化照片进行光密度分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 25.0 及 GraphPad Prism 8.0 软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,多组均数比较采用 One-way ANOVA 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠神经功能评分

大鼠枕大池注入 TH 诱发 SAH 建模病死率为 6.67%。其中 TH 组及 TH/TNF- α 抑制剂组各有 1 只死亡。造模后假手术组大鼠的神经功能评分最高,且第 3 d 变化较小,术后大鼠的食欲、活动基本正常。TH 组、TNF- α 抑制剂组及 IL-1 β 抑制剂组大鼠造模后的神经功能评分出现不同程度下降,主要表现为食欲差、精神萎靡、反应迟钝及活动减少等现象。造模后第 1 d 神经功能评分:假手术组(16.60 ± 0.97)分、TH 组(8.89 ± 0.60)分、TH/TNF- α 抑制剂组(10.11 ± 0.60)分、TH/IL-1 β 抑制剂组(10.50 ± 0.53)分;与假手术组比较,TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组神经功能评分明显降低($P < 0.01$);与 TH 组比较,TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组大鼠神经功能评分均较高($P < 0.01$)。TH/TNF- α 抑制剂组与 TH/IL-1 β 抑制剂组大鼠神经功能评分比较无明显差异($P > 0.05$)。造模后第 3 d 神经功能评分,假手术组(17.00 ± 0.82)分、TH 组(9.67 ± 0.71)分、TH/

TNF- α 抑制剂组(12.78 ± 0.67)分、TH/IL-1 β 抑制剂组(13.20 ± 0.42)分;与假手术组比较,TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组神经功能评分明显降低($P < 0.01$);与 TH 组比较,TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组大鼠神经功能评分均较高($P < 0.01$);TH/TNF- α 抑制剂组与 TH/IL-1 β 抑制剂组大鼠神经功能评分比较无明显差异($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 大鼠不同时间点神经功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)			
组别	鼠数 (只)	神经功能评分	
		造模后第 1 d	造模后第 3 d
假手术组	10	16.60 ± 0.97	17.00 ± 0.82
TH 组	9	$8.89 \pm 0.60^*$	$9.67 \pm 0.71^*$
TH/ TNF- α 抑制剂组	9	$10.11 \pm 0.60^{* \#}$	$12.78 \pm 0.67^{* \#}$
TH/IL-1 β 抑制剂组	10	$10.50 \pm 0.53^{* \# \Delta}$	$13.20 \pm 0.42^{* \# \Delta}$

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与 TH 组比较,# $P < 0.01$;与 TH/ TNF- α 抑制剂组比较, $\Delta P > 0.05$

2.2 大鼠相对侧脑室面积与脑积水评估

造模后各组大鼠第 3 d 相对侧脑室面积有不同程度的增大,其中 17 只大鼠增大达到脑积水的评判标准,脑积水发生率为 60.71%。各组大鼠相对侧脑室面积,假手术组(3.58 ± 0.40)%、TH 组(6.09 ± 0.82)%、TH/TNF- α 抑制剂组(5.06 ± 0.53)%、TH/IL-1 β 抑制剂组(5.25 ± 0.68)%;与假手术组比较,TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑

制剂组大鼠侧脑室面积明显增加($P < 0.01$);与 TH 组比较,TH/TNF- α 抑制剂组、TH/IL-1 β 抑制剂组大鼠侧脑室面积降低($P < 0.01$);TNF- α 抑制剂组与 IL-1 β 抑制剂组大鼠侧脑室面积比较无明显差异($P > 0.05$)(图 1~2)。

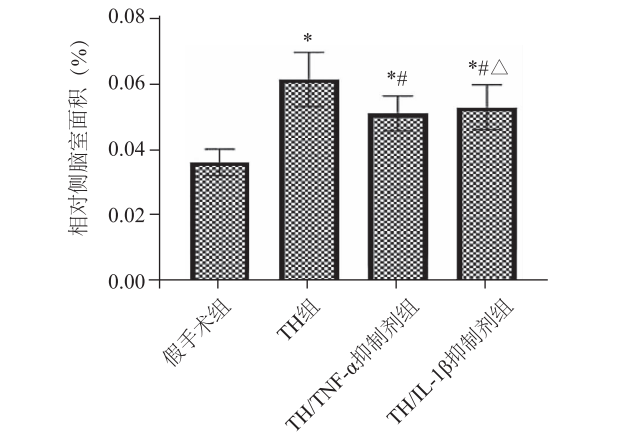


图 1 各组大鼠相对侧脑室面积 与假手术组比较,* $P < 0.01$;与 TH 组比较,# $P < 0.01$;与 TH/TNF- α 抑制剂组比较, $\Delta P > 0.05$

2.3 免疫组化评价大鼠 TNF- α , IL-1 β , AQP1 与 AQP4 的阳性表达水平

2.3.1 TNF- α 与 IL-1 β 的表达水平变化

造模后第 3 d 假手术组仅检测到少量 TNF- α 与 IL-1 β 的阳性表达;TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组

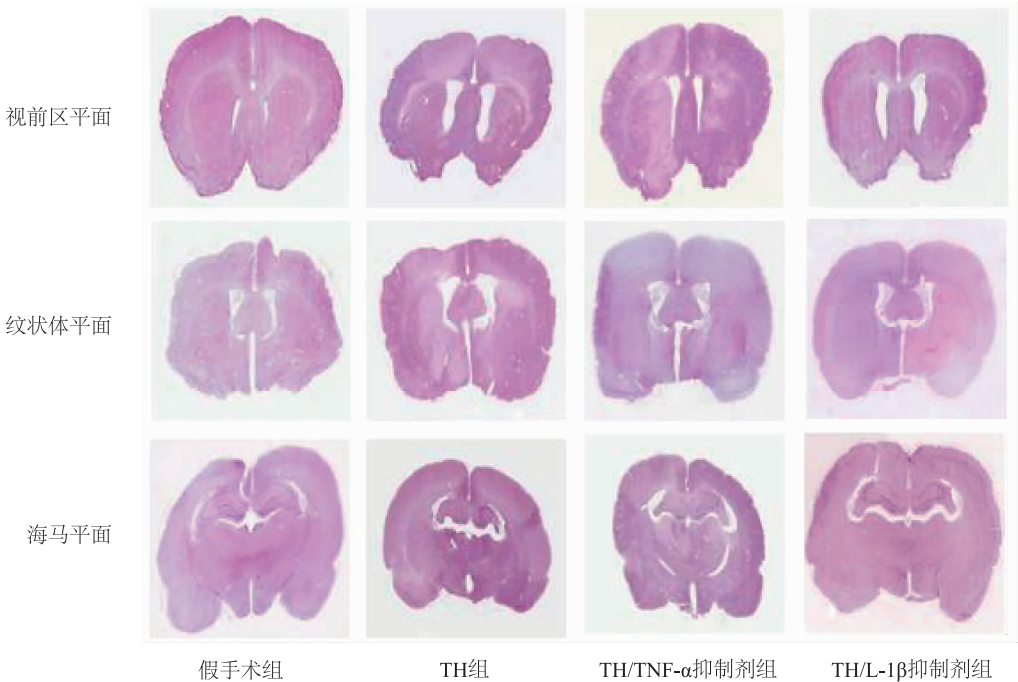


图 2 大鼠视前区、纹状体与海马平面的 HE 染色

及 TH/IL-1 β 抑制剂组检测到较多的 TNF- α 与 IL-1 β 的阳性表达。TNF- α 与 IL-1 β 的免疫反应阳性表达主要分布于胞浆内,呈棕黄色或棕褐色;TNF- α 主要位于侧脑室周围组织的星形胶质细胞及神经元;IL-1 β 主要位于侧脑室周围组织的小胶质细胞及星形细胞。与假手术组比较,TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组的 TNF- α 与 IL-1 β 阳性表达明显增多,平均光密度(Mean optical density,MOD)升高($P<0.01$);与 TH 组比较,TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组的 TNF- α 与 IL-1 β 阳性表达显著减少($P<0.01$);TH/TNF- α 抑制剂组较 TH/IL-1 β 抑制剂组的 TNF- α 阳性表达较少,IL-1 β 阳性表达较多($P<0.01$);TH/IL-1 β 抑制剂组较 TH/TNF- α 抑制剂组 TNF- α 阳性表达较多,IL-1 β 阳性表达较少($P<0.01$)。即 TH 促进 TNF- α 与 IL-1 β 的表达,TNF- α 抑制剂与 IL-1 β 抑制剂可同时抑制 TNF- α ,IL-1 β 的表达,但二者有不同的主要抑制靶点(表 2、图 3~4)。

2.3.2 AQP1 与 AQP4 的表达水平变化

免疫组织化学染色显示,造模后第3 d AQP1 的免疫反应阳性表达主要分布于胞膜,呈棕黄色或棕褐色,主要位于脉络丛上皮细胞;与假手术组比

较,TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组的 AQP1 阳性表达明显增多($P<0.01$);与 TH 组比较,TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组的 AQP1 阳性表达减少($P<0.01$);TH/TNF- α 抑制剂组与 TH/IL-1 β 抑制剂组脑组织内的 AQP1 阳性表达水平无明显差异($P>0.05$)。

表 2 各组大鼠脑组织 TNF- α ,IL-1 β 的 MOD 值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数 (只)	TNF- α	IL-1 β
假手术组	5	0.0051 \pm 0.0004	0.0049 \pm 0.0007
TH 组	5	0.0211 \pm 0.0013 *	0.0167 \pm 0.0008 *
TH/ TNF- α 抑制剂组	5	0.0087 \pm 0.0010 *#	0.0119 \pm 0.0015 *#
TH/IL-1 β 抑制剂组	5	0.0106 \pm 0.0009 *# Δ	0.0088 \pm 0.0012 *# Δ

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与 TH 组比较,# $P<0.01$;与 TH/TNF- α 抑制剂组比较, $\Delta P<0.01$

造模后第3 d AQP4 的免疫反应阳性表达主要分布于胞膜,呈棕黄色或棕褐色,主要位于侧脑室周围组织的室管膜细胞;与假手术组比较,TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组 AQP4 阳性表达明显增多($P<0.01$);与 TH 组比较,TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组的 AQP4

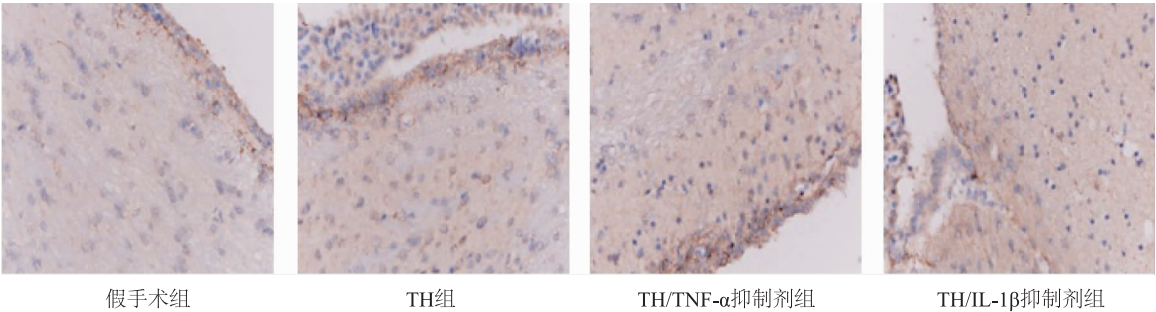


图 3 大鼠脑组织 TNF- α 的表达(免疫组化法 $\times 400$ 倍) 假手术组侧脑室区域 TNF- α 阳性表达水平相对较弱;TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组 TNF- α 主要在星形胶质细胞、神经元上阳性表达较强

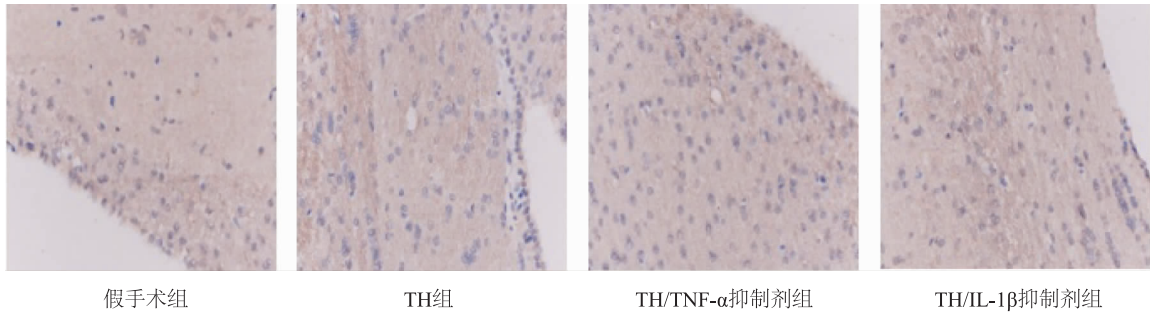


图 4 大鼠脑组织 IL-1 β 的表达(免疫组化法 $\times 400$ 倍) 假手术组侧脑室区域的 IL-1 β 阳性表达水平相对较弱;TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组 IL-1 β 主要在小胶质细胞及星形细胞上阳性表达较强

阳性表达减少($P<0.01$);TH/TNF- α 抑制剂组与 TH/IL-1 β 抑制剂组 AQP4 阳性表达水平无明显差异($P>0.05$)。即在脑积水病理过程中 TNF- α 抑制剂及 IL-1 β 抑制剂的加入可以明显降低 TNF- α 及 IL-1 β 在脑组织中的表达水平,从而下调 AQP1 与 AQP4 的表达,缓解脑积水的病理发展(表 3、图 5~6)。

表 3 各组大鼠脑组织 AQP1,AQP4 的 MOD 值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数 (只)	AQP1	AQP4
假手术组	5	0.0088 \pm 0.0011	0.0145 \pm 0.0017
TH 组	5	0.0251 \pm 0.0011 *	0.0393 \pm 0.0017 *
TH/TNF- α 抑制剂组	5	0.0157 \pm 0.0009 **	0.0304 \pm 0.0011 **
TH/IL-1 β 抑制剂组	5	0.0169 \pm 0.0009 ** Δ	0.0322 \pm 0.0015 ** Δ

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与 TH 组比较,# $P<0.01$;与 TH/TNF- α 抑制剂组比较, $\Delta P>0.05$

3 讨 论

Long 等^[4]研究者通过对枕大池内分别注射凝血酶和血红蛋白来诱发大鼠 SAH 脑积水,进而探究大鼠脑积水的发生机制;该研究发现凝血酶、血红蛋白可促进 SAH 后脑积水发生,同时 AQP1 与

AQP4 可能参与脑积水的整个进程。正常情况下脑内的凝血酶原主要存在于脑神经元和星形胶质细胞内,在脑损伤的病理状态下凝血酶可通过蛋白酶激活受体途径来诱导 TNF- α ,IL-1 β 表达,损伤血脑屏障及脑组织^[11]。颅内出血早期凝血酶、血红蛋白等血液成分对脑损伤发挥着主要作用,随着时间的延长,凝血瀑布的激活及红细胞裂解产物的释放会进一步加重脑损伤及脑积水的程度^[5]。Long 等^[4]研究者发现 SAH 后大鼠脑积水发生的时间呈动态变化,术后第 1 d 已发生,第 3 d 可达到高峰,其相对侧脑室面积的增加也最明显。Li 等^[12]研究者建立脑缺血大鼠模型发现,抑制脑中 TNF- α ,IL-1 β 的合成可抑制脑损伤后其介导的炎症反应,减少脑缺血后梗死及周围水肿的面积。本实验造模后第 1、3 d 对大鼠进行神经功能损伤评分,并于第 3 d 对大鼠进行组织学观察大鼠相对侧脑室面积大小,TNF- α 抑制剂及 IL-1 β 抑制剂加入后大鼠相对侧脑室面积均有一定程度的减小,但 2 组比较差异无统计学意义,可能与样本量太小有关,此结果有待进一步检验。

AQP1 和 AQP4 参与脑积水的发生发展已得到广泛的证实。脑中的 AQP1 主要分布于脉络丛上皮细胞、脑白质和胶质界膜的星形细胞等,并参与脑

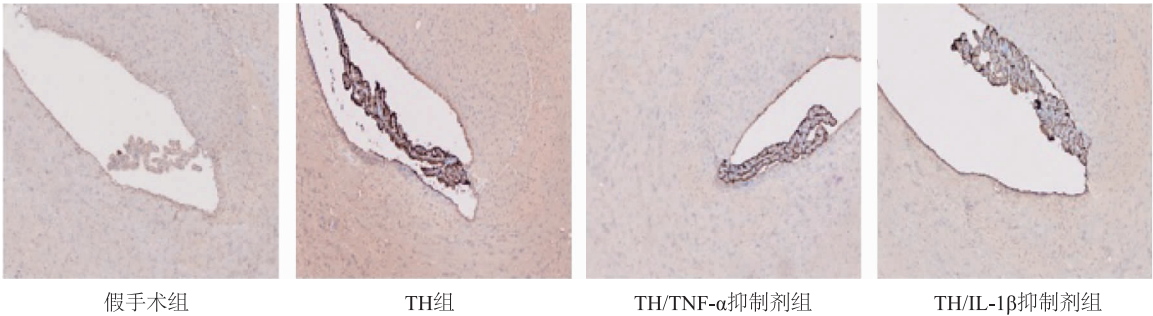


图 5 大鼠脑组织 AQP1 的表达(免疫组化法 $\times 100$ 倍) 假手术组脉络丛上皮细胞及侧脑室区域的 AQP1 阳性表达水平相对较弱;TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组 AQP1 在脉络丛上皮细胞上阳性表达较强

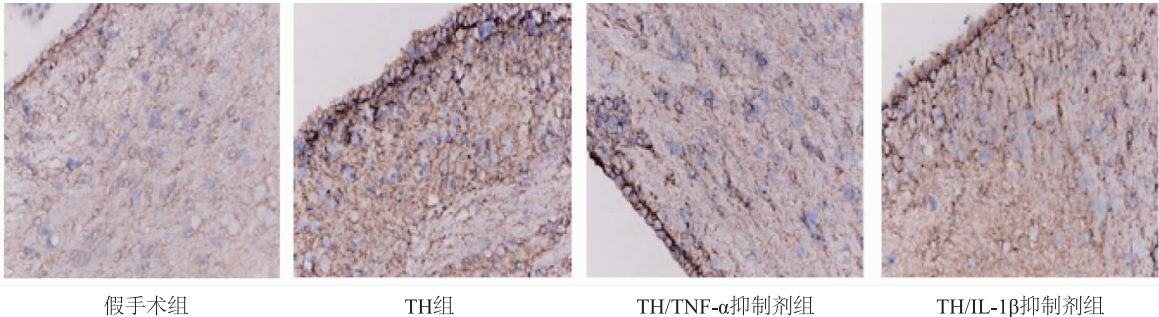


图 6 大鼠脑组织 AQP4 的表达(免疫组化法 $\times 400$ 倍) 假手术组侧脑室区域的 AQP4 阳性表达水平相对较弱;TH 组、TH/TNF- α 抑制剂组及 TH/IL-1 β 抑制剂组 AQP4 在室管膜细胞上阳性表达较强

脊液的产生及颅内压力的调控等过程^[13]。有研究者建立 AQP1 基因敲除的小鼠模型发现,与对照组野生小鼠比较,模型组小鼠脑的脉络膜上皮细胞对水分子的通透性降低,脑脊液生成减少,且脑积水的程度更低^[14]。AQP4 则主要分布于脑室管膜细胞的基底膜、星形胶质细胞的终足、脉络丛等,可能对脑脊液的吸收起着一定的代偿作用^[15]。Feng 等^[16]在建立 AQP4 基因敲除的小鼠模型中发现存在部分小鼠出现脑积水,认为 AQP4 的基因缺陷造成了小鼠脑积水的发生。有研究者通过枕大池注入高岭土建立脑积水模型中发现 AQP4 基因敲除的小鼠清除颅腔内水的能力较低,同时其脑室的扩张度、脑积水的程度明显加重,且神经功能缺损症状及体征更加严重^[17]。炎症因子与水孔蛋白贯穿于脑积水的整个过程,脑损伤早期便可产生炎症因子,并通过某种机制改变 AQPs 的表达,使血脑屏障的进一步损害,加重脑积水,其中 TNF- α 、IL-1 β 等在神经系统疾病中被广泛的报道。Letizia 等^[18]研究者用 TNF- α 抑制剂处理人支气管上皮细胞后发现 AQP1 与 AQP5 的表达水平均有所下降。Ito 等^[19]报道颅内注射 IL-1 β 可促进 AQP4 的表达与脑积水的形成。

本实验在大鼠枕大池注射 TH 诱发脑积水,免疫组化法检测显示在脑室与脑室周围区域上 TNF- α 、IL-1 β 、AQP1 与 AQP4 的表达增加,并且可能与相对侧脑室面积有关。炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 表达水平的降低对 AQP1、AQP4 的表达具有调控性,从而在一定程度上缓解脑积水的病理发展,改善大鼠神经功能缺损症状。AQP1 表达水平升高可能促进侧脑室脉络膜分泌脑脊液,参与脑积水的形成,而 AQP4 表达水平的升高可能为脑积水后的代偿机制,可能与脑积水后脑脊液的清除有关。综上所述,在 TH 诱发的 SAH 脑积水病理发展中 TH 可诱导炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达,TNF- α 、IL-1 β 表达水平上调可增加 AQP1 的表达,促进脉络丛分泌脑脊液,导致脑积水的形成和进展。AQP4 表达水平升高可能为脑积水后的代偿反应。通过抑制 TNF- α 、IL-1 β 表达可以下调 AQP1 表达,减少脑脊液的分泌,减轻脑积水程度,并引起继发性的 AQP4 表达减少,改善大鼠神经功能缺损症状。TNF- α 、IL-1 β 可作为临床治疗脑积水的重要靶点。

参 考 文 献

[1] Suarez J. Diagnosis and management of subarachnoid hemor-

rhage[J]. Continuum (Minneapolis, Minn), 2015, 21(5 Neurocritical Care): 1263-1287.

- [2] Guo Z, Sun X, He Z, et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in apoptosis of hippocampal neurons in rats during early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Neurol Sci, 2010, 31(2): 143-149.
- [3] Leonardo DO MA, Loch MR. Neuroinflammation as a target for intervention in subarachnoid hemorrhage[J]. Front Neurol, 2018, 9(5): 292.
- [4] Long CY, Huang GQ, Du Q, et al. The dynamic expression of aquaporins 1 and 4 in rats with hydrocephalus induced by subarachnoid haemorrhage[J]. Folia Neuropathologica, 2019, 57(2): 182-195.
- [5] Krenzlin H, Lorenz V, Danckwardt S, et al. The importance of thrombin in cerebral injury and disease[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(1): 84.
- [6] Fu Q, Cheng J, Gao Y, et al. Protease-activated receptor 4: a critical participator in inflammatory response[J]. Inflammation, 2015, 38(2): 886-895.
- [7] Cheng Y, Xi G, Jin H, et al. Thrombin-induced cerebral hemorrhage: role of protease-activated receptor-1[J]. Transl Stroke Res, 2014, 5(4): 472-475.
- [8] Dudhani RV, Kyle M, Dedeo C, et al. A low mortality rat model to assess delayed cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. J Vis Exp, 2013 (71): e4157.
- [9] Hu Q, Vakhmjanin A, Li B, et al. Hyperbaric Oxygen therapy fails to reduce hydrocephalus formation following subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Med Gas Res, 2014, 4:12.
- [10] Okubo S, Strahle J, Keep RF, et al. Subarachnoid hemorrhage-induced hydrocephalus in rats[J]. Stroke, 2013, 44(2): 547-550.
- [11] Ye F, Garton H, Hua Y, et al. The Role of Thrombin in Brain Injury After Hemorrhagic and Ischemic Stroke [J]. Transl Stroke Res, 2021, 12(3):496-511.
- [12] Li HL, Kostulas N, Huang YM, et al. IL-17 and IFN-gamma mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. J Neuroimmunol, 2001, 116(1): 5-14.
- [13] Arciénega JJ, Brunet JF, Bloch J, et al. Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human Primate brain[J]. Neuroscience, 2010, 167(4): 1103-1114.
- [14] Wang D, Nykanen M, Yang N, et al. Altered cellular localization of aquaporin-1 in experimental hydrocephalus in mice and reduced ventriculomegaly in aquaporin-1 deficiency [J]. Mol Cell Neurosci, 2011, 46(1): 318-324.
- [15] Hubbard JA, Hsu MS, Seldin MM, et al. Expression of the astrocyte water Channel aquaporin-4 in the mouse brain[J]. ASN Neuro, 2015, 7(5): 1759091415605486.
- [16] Feng X, Papadopoulos MC, Liu J, et al. Sporadic obstructive hydrocephalus in Aqp4 null mice[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(5): 1150-1155.
- [17] Bloch O, Auguste KI, Manley GT, et al. Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(12): 1527-1537.
- [18] Letizia Mezzasoma, Lucio Cagini, Cinzia Antognelli, et al. TNF- α regulates Na-triuretic peptides and aquaporins in human bronchial epithelial cells BEAS-2B [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013(10): 159349.
- [19] Ito H, Yamamoto N, Arima H, et al. Interleukin-1 β induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor- κ B pathway in rat astrocytes[J]. J Neurochem, 2006, 99(1): 107-118.

(2021-06-18 收稿)