

本文引用: 徐伟, 董雨, 申向竹, 等. 依达拉奉右莰醇对液压冲击脑损伤大鼠小胶质细胞极化的影响及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(2): 109-117. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.02.003.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-02-0109-09

· 实验研究 ·

## 依达拉奉右莰醇对液压冲击脑损伤大鼠小胶质细胞极化的影响及机制

徐伟, 董雨, 申向竹, 杨德真, 唐会昌, 武一平

邯郸市中心医院神经外科, 河北省邯郸市 056001

**[摘要]** **[目的]** 研究依达拉奉右莰醇(ED)对液压冲击脑损伤大鼠小胶质细胞极化的影响,并基于 Toll 样受体 4(TLR4)/核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路探讨其机制。**[方法]** 从 205 只健康雄性 SD 大鼠中随机取 32 只设为假手术组,其余 173 只大鼠采用液压冲击法制备脑损伤大鼠模型,取 160 只成模大鼠随机分为模型组、ED(7 mg/kg)组、TAK242(瑞沙托维,TLR4 抑制剂,2 mg/kg)组、ED(7 mg/kg)+TAK242(2 mg/kg)组和 ED(7 mg/kg)+脂多糖(LPS,TLR4 激动剂,0.4 mg/kg)组,每组 32 只。各组分别 1 次/天连续腹腔注射给药 14 天后,通过改良神经功能缺损评分(mNSS)、失重法、伊文思蓝(EB)渗透法考察大鼠神经功能、脑含水量和血-脑屏障(BBB)通透性,通过 HE 染色、Nissl 染色考察脑组织病理学改变,ELISA 检测脑组织  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)1 $\beta$ 、IL-4、IL-10 水平,免疫荧光双染法检测小胶质细胞 M1 极化表型(CD86/Iba-1)和 M2 极化表型(CD206/Iba-1),RT-PCR、Western blot 检测 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、水通道蛋白 4(AQP4) mRNA 和蛋白表达。**[结果]** 与模型组相比,ED 组、TAK242 组和 ED+TAK242 组大鼠 mNSS 评分、脑含水量、BBB 通透性明显降低( $P<0.05$ ),脑组织结构紊乱、神经元排列稀疏无序、空泡样变、炎症细胞浸润、尼氏小体数量减少等病理学改变明显改善,脑组织 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平明显降低,IL-4、IL-10 水平明显升高( $P<0.05$ ),小胶质细胞 M1 极化表型阳性细胞率明显降低,M2 极化表型阳性细胞率明显升高( $P<0.05$ ),TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3、AQP4 的 mRNA 和蛋白表达量均明显降低( $P<0.05$ )。TAK242 可明显增强 ED 对液压冲击脑损伤大鼠神经功能、脑含水量、BBB 通透性、炎症反应、小胶质细胞极化、TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关 mRNA 和蛋白表达的调控作用( $P<0.05$ ),LPS 则明显逆转 ED 对液压冲击脑损伤大鼠的上述调控作用( $P<0.05$ )。**[结论]** ED 可能通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路而促进小胶质细胞由 M1 型向 M2 型极化,抑制炎症反应和 BBB 通透性升高,从而对大鼠液压冲击脑损伤起到保护作用。

**[关键词]** 脑损伤; 依达拉奉右莰醇; 小胶质细胞; TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路; 炎症反应; 血脑屏障

**[中图分类号]** R743.3;R5

**[文献标识码]** A

### Effect and mechanism of edaravone dexborneol on microglial polarization in rats with brain injury caused by hydraulic shock

XU Wei, DONG Yu, SHEN Xiangzhu, YANG Dezhen, TANG Huichang, WU Yiping

The Fourth Department of Neurosurgery, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the effect of edaravone dexborneol (ED) on microglial polarization in rats with brain injury caused by hydraulic shock, and explore its mechanism based on Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. **Methods** 32 rats of 205 healthy male SD rats were randomly selected as sham group, the remaining 173 rats were prepared with brain injury model by hydraulic shock method, and 160 model rats were randomly divided into model group, ED (7 mg/kg) group, TAK242 (ressatovir, TLR4 inhibitor, 2 mg/kg) group, ED (7 mg/kg) +TAK242 (2 mg/kg) group and ED (7 mg/kg)+lipolyaccharide (LPS, TLR4 agonist, 0.4 mg/kg) group, with 32 rats in each group. After 14 days of continuous intraperitoneal injection once a day, the nerve function, brain water content and

**[收稿日期]** 2023-10-13

**[修回日期]** 2023-11-14

**[基金项目]** 河北省医学科学研究课题(20220516)

**[作者简介]** 徐伟,硕士研究生,主治医师,研究方向为颅脑损伤,E-mail:wxdoctor@163.com。通信作者武一平,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为创伤性脑损伤,E-mail:zhyshine@163.com。

blood-brain barrier (BBB) permeability were measured by modified neurological severity score (mNSS), weightlessness method or Evans blue (EB) penetration method, the brain histopathological changes was observed by HE and Nissl staining, the levels of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL) 1 $\beta$ , IL-4 and IL-10 in brain tissue were detected by ELISA, the M1 polarization phenotype (CD86/Iba-1) and M2 polarization phenotype (CD206/Iba-1) of microglia cells were detected by immunofluorescence double staining, the mRNA and protein expressions of TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), aquaporin 4 (AQP4) were detected by RT-PCR or Western blot.

**Results** Compared with the model group, the mNSS score, brain water content, BBB permeability of the rats in ED group, TAK242 group, ED+TAK242 group were significantly were decreased ( $P < 0.05$ ), the pathological changes such as brain structure disorder, sparse and disordered neuronal arrangement, vacuole-like transformation, inflammatory cell infiltration, decrease in the number of Nishi bodies were significantly improved, the levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in brain tissue were significantly decreased, while the levels of IL-4, IL-10 were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the mRNA and protein expressions of TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NLRP3, AQP4 were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). TAK242 could significantly enhance the regulatory effects of ED on nerve function, brain water content, BBB permeability, inflammatory response, microglia polarization, TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway related mRNA and protein expression of the rats with hydraulic shock brain injury ( $P < 0.05$ ), while LPS could significantly reverse the above regulatory effects of ED on the rats with hydraulic shock brain injury ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** ED may promote the polarization of microglia from M1 phenotype to M2 phenotype by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway, inhibit inflammatory response and BBB permeability increasing, and thus play a protective role in brain injury caused by hydraulic shock in rats.

[**KEY WORDS**] brain injury; edaravone dexborneol; microglia; TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway; inflammatory response; blood-brain barrier

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是指因交通事故、跌倒、暴力等外力所引起的颅脑结构损伤及神经功能障碍。全球 TBI 年发病率约 5 000 万例,重症 TBI 患者死亡率高达 30%,并且超过 60% 的幸存者中出现不同程度的身体残疾和心理障碍,给家庭和社会带来沉重负担<sup>[1-2]</sup>。TBI 的病理机制复杂,除了脑震荡、脑挫裂伤、颅内血肿等初始损伤外,炎症、脑水肿等在其继发性脑损伤机制中发挥着重要作用,其中炎症是其核心机制<sup>[3]</sup>。小胶质细胞是脑组织固有的免疫细胞,参与调控中枢神经系统炎症反应。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 是炎症反应关键的信号传导通路,并可诱导小胶质细胞由 M2 表型 (抗炎) 向 M1 表型 (促炎) 极化<sup>[4]</sup>。有文献<sup>[5]</sup>报道,通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路促使小胶质细胞向 M2 表型极化,能够减轻 TBI 小鼠的炎症反应。

依达拉奉右莰醇 (edaravone dexbornol, ED) 是目前用于治疗急性缺血性脑卒中及后期神经功能障碍的一种复方制剂。本课题组既往研究证实 ED 可通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻 TBI 大鼠炎症反应<sup>[6]</sup>,但 ED 是否对小胶质细胞极化产生影响尚未见文献报道。液压冲击是制备 TBI 动物模型的常用方法,本研究旨在探讨 ED 对大鼠液压冲击脑损伤及小胶质细胞极化的影响,并基于 TLR4/NF-

$\kappa$ B 信号通路探讨其机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 205 只,7 周龄、体重 220 ~ 250 g,购自河北省实验动物中心,许可证号:SCXK(冀)2022-001。在温度 23 ~ 25  $^{\circ}$ C、湿度 55% ~ 65%、光暗各 12 h 交替的控制环境中饲养,自由进食饮水。本研究获得邯郸市中心医院伦理委员会批准[伦理号:ZYYYLL(K)2021-013]。

### 1.2 主要药物与试剂

ED 注射液购自先声药业有限公司(规格:5 mL,含依达拉奉 10 mg、右莰醇 2.5 mg,批号为 181-220307);TLR4 抑制剂瑞沙托维 (TAK242)、TLR4 激动剂脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和伊文思蓝 (Evans blue, EB)、HE、Nissl 染色试剂盒购自北京索莱宝生物科技公司(货号 IR0580、IL2020、E8010、G1120、G1434); $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4)、白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 试剂盒购自江苏晶美生物科技公司(货号 JM-01605R2、JM-01587R2、JM-01454R1、JM-01598R2、JM-01602R2);RIPA 裂解液、Western 蛋白封闭液、BCA

蛋白浓度测定试剂盒和 CD86 (红色荧光)、CD206 (红色荧光)、Iba-1 (绿色荧光) 抗体、FITC 标记 IgG 二抗购自上海碧云天生物技术公司 (货号 P0013B、P0023B、P0010、AF1447、AG2660、AF7143、A0562); Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、ECL 试剂盒购自南京建成生物工程研究所 (货号 N065、W028-2-1); TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、水通道蛋白 4 (aquaporin 4, AQP4)、GAPDH 抗体和 HRP 标记 IgG 二抗购自北京博奥森生物技术公司 (货号 bs-1021R、bs-3485R、bs-10021R、bs-39018R、bs-41373R、bs-0295G)。

### 1.3 主要仪器

MODEL01-B 型颅脑液压打击仪 (美国 Newsun 公司); iMark680 多功能酶标仪、CFX 96 型 RT-PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); RM2245 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司); JB-P5 型组织包埋机 (武汉俊杰公司); 80i 型荧光显微镜 (日本尼康公司); PP-1150 型电泳仪、MP-3030 型转移槽 (北京凯元信瑞公司); 21R 型高速冷冻离心机 (美国 Thermo 公司)。

### 1.4 分组、造模与给药

从 205 只大鼠中随机取 32 只设为假手术组, 其余 173 只参照文献<sup>[7]</sup> 制备液压冲击脑损伤大鼠模型: 腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠进行麻醉后消毒, 切开头皮和骨膜, 充分暴露颅骨, 取矢状缝右 5 mm、冠状缝后 5 mm 交叉点为中心点开直径 4 mm 骨窗, 通过颅脑液压打击仪制备液压冲击脑损伤大鼠模型 (冲击强度设为 0.2 MPa)。假手术组于相同位置开直径 4 mm 骨窗, 但不给予液压冲击。大鼠出现短暂四肢强直、心率加快、呼吸抑制的现象, 约 1 min 后恢复正常, 即可判定造模成功<sup>[8]</sup>。共造模成功 162 只 (造模过程中死亡 9 只、造模失败 2 只), 取 160 只成模大鼠随机分为模型组、ED (7 mg/kg) 组、TAK242 (2 mg/kg) 组、ED (7 mg/kg) + TAK242 (2 mg/kg) 组<sup>[9]</sup> 和 ED (7 mg/kg) + LPS (0.4 mg/kg) 组<sup>[6]</sup>, 每组 32 只。各组分别 1 次/天连续腹腔注射给药 14 天 (假手术组和模型组给予生理盐水)。

### 1.5 改良神经功能缺损评分评估大鼠神经功能

末次给药 24 h 后, 每组随机取 8 只大鼠, 通过改良神经功能缺损评分 (modified neurological severity score, mNSS) 从运动、感觉、平衡、反射四个方面评估大鼠神经功能<sup>[10]</sup>。

### 1.6 失重法测定大鼠脑含水量

取脑组织, 称量脑质量为脑湿重 ( $W_{湿}$ ), 置 95 °C 烘干箱至恒重, 即为脑干重 ( $W_{干}$ ), 脑含水量 =

$[(W_{湿} - W_{干}) / W_{湿}] \times 100\%$ 。

### 1.7 EB 渗透法计算大鼠血-脑屏障通透性

末次给药 24 h 后, 每组随机另取 8 只大鼠, 尾静脉注射 2% EB 溶液 (4 mL/kg), 2 h 后腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠进行麻醉, 心脏灌注 300 mL 生理盐水后取脑组织, 称量脑质量, 以 0.3 mL/100 mg 加入 50% 三氯乙酸后研磨匀浆, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 通过酶标仪检测 620 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值, 对照标准曲线计算脑组织 EB 含量, EB 含量可反映血-脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 通透性。

### 1.8 HE 染色、Nissl 染色观察脑组织病理学改变

取脑组织, 置于 10% 中性甲醛溶液中固定 5 天, 梯度乙醇溶液脱水后浸蜡包埋, 4  $\mu$ m 厚度连续切片, 脱蜡水化后按照试剂盒操作说明行 HE 染色和 Nissl 染色, 中性树脂封片, 显微镜下观察脑组织病理学改变。

### 1.9 ELISA 检测脑组织 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4 和 IL-10 水平

取部分脑组织, 剪碎后加入适量 4 °C 预冷 RIPA 裂解液, 冰上充分裂解, 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清液, 按照各试剂盒说明, 通过酶标仪检测脑组织 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4 和 IL-10 水平。

### 1.10 免疫荧光双染法检测小胶质细胞极化表型

取脑组织石蜡切片, 经脱蜡水化、山羊血清封闭、抗原灭活等处理后, 分别于 4 °C 避光孵育 CD86、Iba-1 抗体和 CD206、Iba-1 抗体 (均按 1 : 200 稀释) 过夜, 冲洗后于 37 °C 避光孵育 FITC 标记 IgG 二抗 (1 : 500 稀释) 1.5 h, 冲洗后于 37 °C DAPI 染核 2 min, 封片后荧光显微镜下观察小胶质细胞极化表型。计数阳性细胞数 (同时着红、绿、蓝色荧光) 和细胞总数, 然后计算阳性细胞率。

### 1.11 RT-PCR 检测 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 mRNA 表达

取脑组织 100 mg, 通过 Trizol 法提取脑组织总 RNA, 反转录成 cDNA 后行 RT-PCR 扩增 (95 °C 预变性 3 min; 95 °C 10 s; 60 °C 10 s; 72 °C 30 s, 共 40 个循环)。以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因相对表达量。PCR 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司设计与合成, 引物序列见表 1。

### 1.12 Western blot 检测 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3、AQP4 蛋白表达

取脑组织 100 mg, RIPA 法提取总蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度后 95 °C 水浴变性, 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转 PVDF 膜, 5% Western 蛋白封闭液

室温封闭 1.5 h, 4 °C 孵育一抗稀释液 TLR4 (1 : 1 000)、NF-κB p65 (1 : 1 000)、NLRP3 (1 : 500)、AQP4 (1 : 500)、GAPDH (1 : 2 000) 过夜, 洗膜后 37 °C 孵育二抗稀释液 IgG (1 : 3 000) 1 h, 洗膜后 ECL 显色, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

表 1. 引物序列  
Table 1. Primer sequences

引物	序列	扩增长度/bp
TLR4	上游 5'-GGTGGTCAGTGTGCTTGTGGTAG-3' 下游 5'-CTCGTTTCTCACCCAGTCTCATTTC-3'	149
NF-κB p65	上游 5'-TGAAGTGTGGGAAGGACT-3' 下游 5'-GGTCTCGCTTCTCACACACT-3'	113
NLRP3	上游 5'-CCTGGATTCTGCTAACGCC-3' 下游 5'-TTCATCAGCACCTCTTGCGA-3'	120
AQP4	下游 5'-AGGCAATGTGTGCACTGCTTAAC-3' 下游 5'-GAAGGTGTCAACGTCACACAACAA-3'	162
GAPDH	上游 5'-ACAGCAACAGGTTGGTGGAC-3' 下游 5'-TTTGAGGTTGCAGCGAACTT-3'	128

### 1.13 统计学分析

运用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析, 计量资料符合正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ED 对液压冲击脑损伤大鼠 mNSS 评分、脑含水量、BBB 通透性的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠 mNSS 评分、脑含水量、EB 渗出量显著升高 (均  $P < 0.05$ )。与模型组相比, ED 组、TAK242 组和 ED+TAK242 组 mNSS 评分、

脑含水量、EB 渗出量显著降低 (均  $P < 0.05$ )。与 ED 组或 TAK242 组相比, ED+TAK242 组 mNSS 评分、脑含水量、EB 渗出量显著降低 (均  $P < 0.05$ )。与 ED 组相比, ED+LPS 组 mNSS 评分、脑含水量、EB 渗出量显著升高 (均  $P < 0.05$ ; 表 2)。

表 2. ED 对液压冲击脑损伤大鼠 mNSS 评分、脑含水量、BBB 通透性的影响 ( $n=8$ )

Table 2. Effects of ED on mNSS score, brain water content and BBB permeability in rats with brain injury by hydraulic shock ( $n=8$ )

分组	mNSS 评分/分	脑含水量/%	EB 渗出量/( $\mu\text{g/g}$ )
假手术组	1.00±0.00	73.04±0.98	0.62±0.08
模型组	12.07±1.42 <sup>a</sup>	82.69±1.75 <sup>a</sup>	2.44±0.29 <sup>a</sup>
ED 组	6.43±0.79 <sup>b</sup>	78.59±1.62 <sup>b</sup>	1.40±0.16 <sup>b</sup>
TAK242 组	7.61±0.88 <sup>b</sup>	79.24±1.68 <sup>b</sup>	1.63±0.17 <sup>b</sup>
ED+TAK242 组	4.85±0.60 <sup>bcd</sup>	76.12±1.34 <sup>bcd</sup>	0.97±0.11 <sup>bcd</sup>
ED+LPS 组	9.72±1.04 <sup>c</sup>	81.03±1.70 <sup>c</sup>	1.91±0.21 <sup>c</sup>

注: a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与模型组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 ED 组比较; d 为  $P < 0.05$ , 与 TAK242 组比较。

### 2.2 ED 对液压冲击脑损伤大鼠脑组织病理学改变的影响

HE 染色和 Nissl 染色结果显示, 假手术组大鼠脑组织结构及神经元形态未见异常; 模型组大鼠脑组织呈现结构紊乱、神经元排列稀疏无序、空泡样变、炎症细胞浸润、尼氏小体数量减少等病理学改变; 与模型组相比, ED 组、TAK242 组和 ED+TAK242 组脑组织病理学改变呈不同程度改善, ED+TAK242 组改善效果明显优于 ED 组和 TAK242 组; 与 ED 组比较, ED+LPS 组脑组织病理学改变明显加重 (图 1 和图 2)。

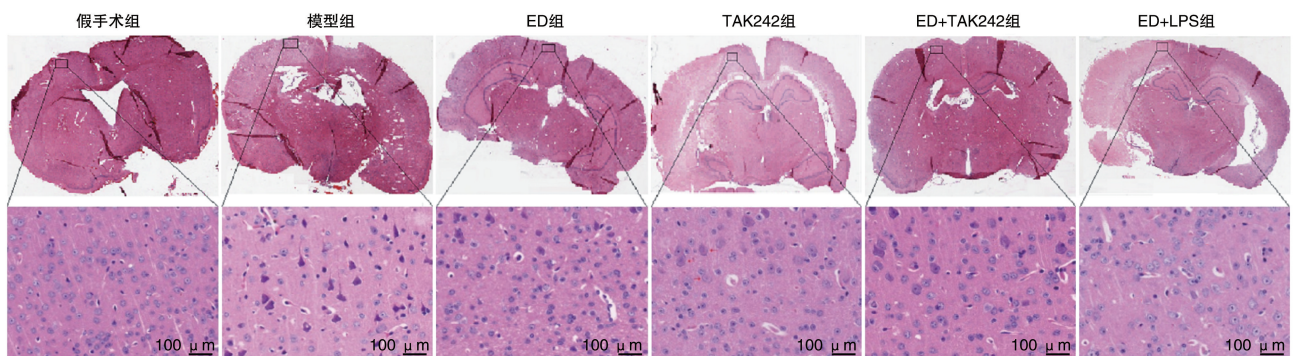


图 1. HE 染色观察大鼠脑组织病理学改变

Figure 1. The histopathological changes of brain tissue were observed by HE staining

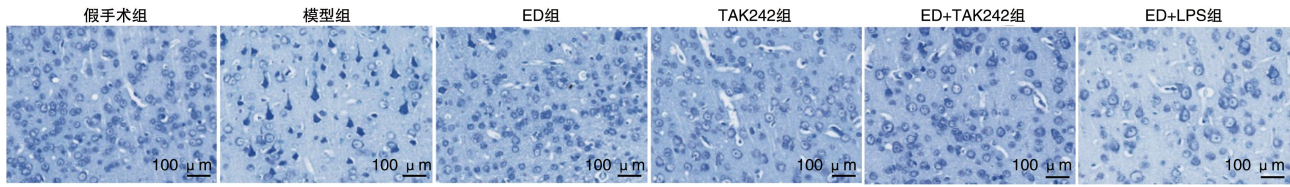


图 2. Nissl 染色观察大鼠脑组织病理学改变

Figure 2. The histopathological changes of brain tissue were observed by Nissl staining

2.3 ED 对液压冲击脑损伤大鼠脑组织 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4 和 IL-10 水平的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著升高,IL-4、IL-10 水平显著降低(均  $P < 0.05$ )。与模型组相比,ED 组、TAK242 组和 ED+TAK242 组 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著降

低,IL-4、IL-10 水平显著升高(均  $P < 0.05$ )。与 ED 组或 TAK242 组相比,ED+TAK242 组 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著降低,IL-4、IL-10 水平显著升高(均  $P < 0.05$ )。与 ED 组相比,ED+LPS 组 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著升高,IL-4、IL-10 水平显著降低(均  $P < 0.05$ ;表 3)。

表 3. ED 对液压冲击脑损伤大鼠脑组织 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4 和 IL-10 水平的影响( $n=8$ )  
Table 3. Effects of ED on levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-10 in brain tissue of rats with brain injury caused by hydraulic shock( $n=8$ )

分组	IFN- $\gamma$ /( $\mu\text{g/L}$ )	TNF- $\alpha$ /( $\mu\text{g/L}$ )	IL-1 $\beta$ /(ng/L)	IL-4/( $\mu\text{g/L}$ )	IL-10/( $\mu\text{g/L}$ )
假手术组	12.54 $\pm$ 1.38	1.39 $\pm$ 0.16	33.50 $\pm$ 3.72	24.19 $\pm$ 3.05	53.62 $\pm$ 7.49
模型组	40.72 $\pm$ 5.95 <sup>a</sup>	2.76 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	71.86 $\pm$ 7.40 <sup>a</sup>	8.25 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	16.44 $\pm$ 2.10 <sup>a</sup>
ED 组	24.91 $\pm$ 3.17 <sup>b</sup>	2.18 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	54.94 $\pm$ 5.85 <sup>b</sup>	14.06 $\pm$ 1.73 <sup>b</sup>	35.86 $\pm$ 5.04 <sup>b</sup>
TAK242 组	28.05 $\pm$ 3.64 <sup>b</sup>	2.24 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	59.28 $\pm$ 6.09 <sup>b</sup>	12.10 $\pm$ 1.58 <sup>b</sup>	31.54 $\pm$ 4.79 <sup>b</sup>
ED+TAK242 组	17.64 $\pm$ 2.07 <sup>bed</sup>	1.80 $\pm$ 0.22 <sup>bed</sup>	40.57 $\pm$ 4.63 <sup>bed</sup>	18.62 $\pm$ 2.25 <sup>bed</sup>	46.39 $\pm$ 6.18 <sup>bed</sup>
ED+LPS 组	32.51 $\pm$ 3.80 <sup>c</sup>	2.56 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>	66.89 $\pm$ 6.24 <sup>c</sup>	10.47 $\pm$ 1.16 <sup>c</sup>	24.70 $\pm$ 2.83 <sup>c</sup>

注:a 为  $P < 0.05$ ,与假手术组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与模型组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 ED 组比较;d 为  $P < 0.05$ ,与 TAK242 组比较。

2.4 ED 对液压冲击脑损伤大鼠脑组织小胶质细胞极化表型的影响

与假手术组相比,模型组大鼠小胶质细胞 M1 表型阳性细胞率升高,M2 表型阳性细胞率降低(均  $P < 0.05$ )。与模型组相比,ED 组、TAK242 组和 ED+TAK242 组小胶质细胞 M1 表型阳性细胞率降低,M2 表型阳性细胞率升高(均  $P < 0.05$ )。与 ED 组或 TAK242 组相比,ED+TAK242 组小胶质细胞 M1 表型阳性细胞率降低,M2 表型阳性细胞率升高(均  $P < 0.05$ )。与 ED 组相比,ED+LPS 组小胶质细胞 M1 表型阳性细胞率升高,M2 表型阳性细胞率降低(均  $P < 0.05$ ;图 3 和表 4)。

2.5 ED 对液压冲击脑损伤大鼠脑组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 mRNA 表达的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 mRNA 的表达量升高(均  $P < 0.05$ )。与模型组相比,ED 组、TAK242 组和 ED+TAK242 组 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 mRNA 的表达量降低(均  $P < 0.05$ )。与 ED 组或 TAK242 组

相比,ED+TAK242 组 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 mRNA 的表达量降低(均  $P < 0.05$ )。与 ED 组相比,ED+LPS 组 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 mRNA 的表达量升高( $P < 0.05$ ;表 5)。

表 4. ED 对液压冲击脑损伤大鼠脑组织小胶质细胞极化表型的影响( $n=8$ )

Table 4. Effects of ED on polarization phenotype of microglia in brain tissue of rats with brain injury caused by hydraulic shock( $n=8$ ) %

分组	M1 表型阳性细胞率	M2 表型阳性细胞率
假手术组	7.02 $\pm$ 1.14	15.29 $\pm$ 2.01
模型组	74.88 $\pm$ 10.65 <sup>a</sup>	10.03 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>
ED 组	36.24 $\pm$ 4.87 <sup>b</sup>	34.31 $\pm$ 4.67 <sup>b</sup>
TAK242 组	45.00 $\pm$ 5.61 <sup>b</sup>	22.58 $\pm$ 3.49 <sup>b</sup>
ED+TAK242 组	21.57 $\pm$ 2.90 <sup>bed</sup>	52.63 $\pm$ 7.17 <sup>bed</sup>
ED+LPS 组	52.38 $\pm$ 5.84 <sup>c</sup>	18.42 $\pm$ 2.18 <sup>c</sup>

注:a 为  $P < 0.05$ ,与假手术组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与模型组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 ED 组比较;d 为  $P < 0.05$ ,与 TAK242 组比较。

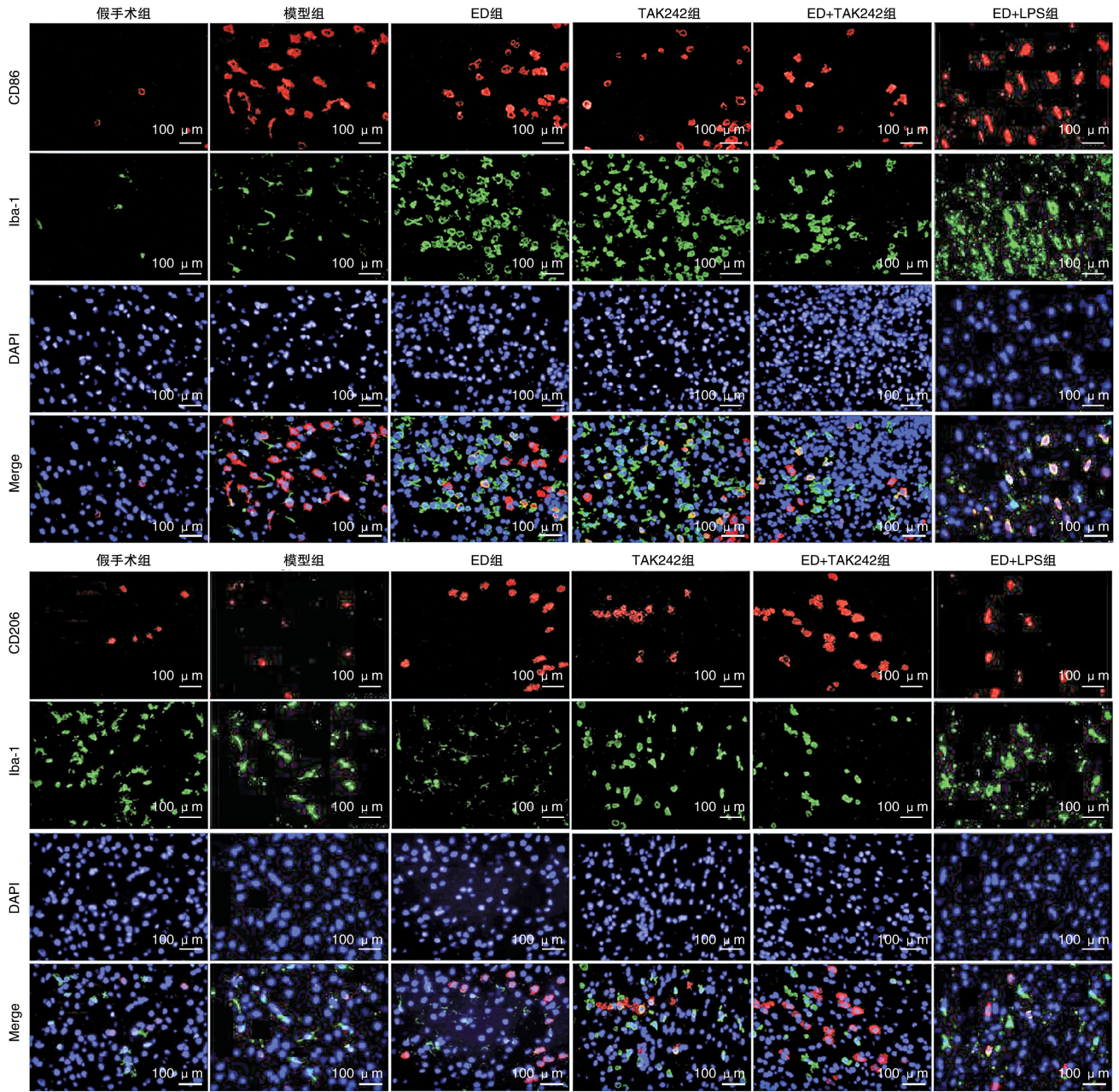


图 3. 免疫荧光双染法观察大鼠脑组织小胶质细胞极化表型

Figure 3. The polarization phenotype of microglia in brain tissue of rats with brain injury caused by hydraulic shock were observed by immunofluorescence double staining

表 5. ED 对液压冲击脑损伤大鼠脑组织 TLR4、NF-κB p65、NLRP3 及 AQP4 mRNA 表达的影响 (n=8)

Table 5. Effects of ED on the mRNA expression of TLR4, NF-κB p65, NLRP3 and AQP4 in brain tissue of rats with brain injury caused by hydraulic shock (n=8)

分组	TLR4	NF-κB p65	NLRP3	AQP4
假手术组	1.16±0.20	1.05±0.17	1.08±0.21	1.34±0.23
模型组	3.47±0.56 <sup>a</sup>	3.26±0.55 <sup>a</sup>	3.19±0.48 <sup>a</sup>	4.07±0.61 <sup>a</sup>
ED 组	2.05±0.31 <sup>b</sup>	2.14±0.29 <sup>b</sup>	2.13±0.30 <sup>b</sup>	2.51±0.37 <sup>b</sup>
TAK242 组	2.13±0.34 <sup>b</sup>	2.30±0.35 <sup>b</sup>	2.42±0.34 <sup>b</sup>	2.63±0.40 <sup>b</sup>
ED+TAK242 组	1.62±0.27 <sup>bed</sup>	1.47±0.21 <sup>bed</sup>	1.50±0.24 <sup>bed</sup>	1.88±0.31 <sup>bed</sup>
ED+LPS 组	2.74±0.38 <sup>c</sup>	2.69±0.37 <sup>c</sup>	2.80±0.36 <sup>c</sup>	3.42±0.43 <sup>c</sup>

注: a 为 P<0.05, 与假手术组比较; b 为 P<0.05, 与模型组比较; c 为 P<0.05, 与 ED 组比较; d 为 P<0.05, 与 TAK242 组比较。

## 2.6 ED 对液压冲击脑损伤大鼠脑组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 蛋白表达的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 蛋白的表达量升高(均  $P < 0.05$ )。与模型组相比,ED 组、TAK242 组和 ED+TAK242 组 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 蛋白

的表达量降低(均  $P < 0.05$ )。与 ED 组或 TAK242 组相比,ED+TAK242 组 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 蛋白的表达量降低(均  $P < 0.05$ )。与 ED 组相比,ED+LPS 组 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 蛋白的表达量升高(均  $P < 0.05$ ;图 4)。

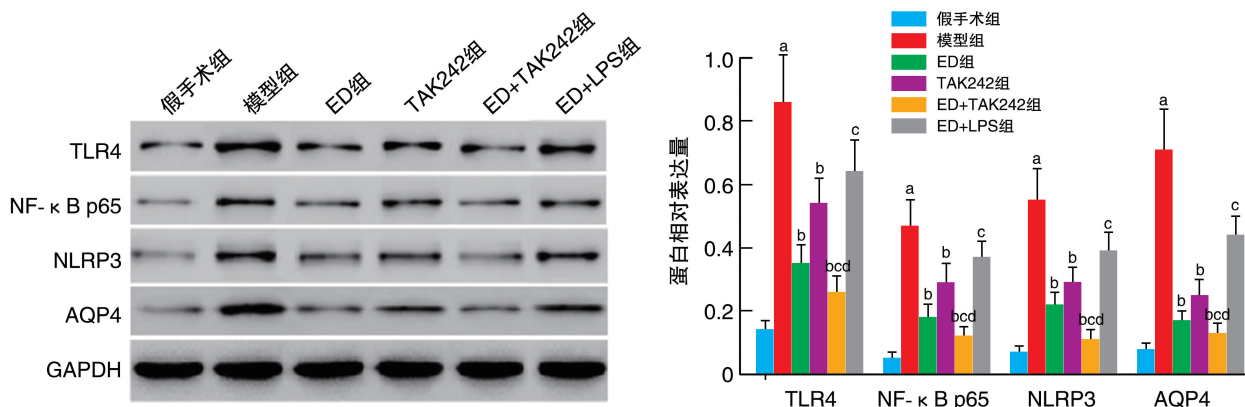


图 4. ED 对液压冲击脑损伤大鼠脑组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 及 AQP4 蛋白表达的影响( $n=8$ )

a 为  $P < 0.05$ ,与假手术组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与模型组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 ED 组比较;d 为  $P < 0.05$ ,与 TAK242 组比较。

Figure 4. Effects of ED on the protein expression of TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NLRP3 and AQP4 in brain tissue of rats with brain injury caused by hydraulic shock( $n=8$ )

## 3 讨论

良好可控的动物模型是病理生理学、药理学等研究的基础。TBI 动物模型的制备方法主要有重物坠落损伤法、液压冲击损伤法、控制性皮质损伤法等,其中液压冲击损伤法具有重复性好、损伤程度可控等优点,是啮齿类动物模型最常用的制备方法<sup>[11]</sup>。本研究发现,液压冲击脑损伤大鼠模型 mNSS 评分、脑含水量、BBB 通透性均明显升高,脑组织呈现结构紊乱、神经元排列稀疏无序、空泡样变、炎症细胞浸润、尼氏小体数量减少等病理学改变,与 Zhao 等<sup>[12]</sup>报道一致。经 ED 治疗能够明显降低液压冲击脑损伤大鼠 mNSS 评分、脑含水量和 BBB 通透性,明显改善脑组织病理学改变,提示 ED 对液压冲击脑损伤具有保护作用。这可能与以下因素有关:①TBI 可病理性刺激促炎因子 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等过度表达与释放,抑制抑炎因子 IL-4、IL-10 等表达与释放,且 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  可趋化巨噬细胞等分泌白细胞介素、细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 等,从而加重炎症反应、促进炎症细胞浸润,导致炎症损伤<sup>[13-14]</sup>。ED 具有较好的抗炎作用<sup>[15]</sup>,本研究发现 ED 可明显降低液压冲击脑损伤大鼠脑组织 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水

平,提高 IL-4、IL-10 水平,提示 ED 能够通过抑制炎症反应来减轻大鼠液压冲击脑损伤。②脑水肿在继发性脑损伤的病理机制中扮演着重要角色,是导致 TBI 患者致残、致死的关键因素,而 TBI 后 BBB 通透性异常升高是导致脑水肿的重要原因<sup>[16]</sup>。AQP4 是定位于细胞膜调控水进出的一种蛋白质,其在脑组织中的表达最为丰富,研究表明 AQP4 高表达是 TBI 后脑水肿的重要机制<sup>[17]</sup>。本研究发现,ED 能够明显降低液压冲击脑损伤大鼠脑含水量和 BBB 通透性,降低脑组织 AQP4 mRNA 和蛋白表达量,提示 ED 能够通过下调 AQP4 表达、降低 BBB 通透性和脑水肿,进而减轻大鼠液压冲击脑损伤。与 Huang 等<sup>[18]</sup>报道的 ED 能够降低脑缺血再灌注小鼠 BBB 通透性和脑水肿的结果相似。

小胶质细胞约占胶质细胞总数的 15%,是参与调控脑组织炎症反应的关键免疫细胞,其有 M1 和 M2 两种极化表型,其中 M1 表型可分泌促炎因子 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等而诱发炎症反应,可诱导 AQP4 表达而促进脑水肿<sup>[19]</sup>;M2 表型可分泌抑炎因子 IL-4、IL-10 等而抑制炎症反应<sup>[20]</sup>。本研究发现,液压冲击脑损伤大鼠小胶质细胞 M1 极化表型阳性细胞率明显升高、M2 极化表型阳性细胞率明显降低,与 Liu 等<sup>[21]</sup>报道一致。进一步的研究发

现,经 ED 治疗能够明显降低小胶质细胞 M1 极化表型阳性细胞率、提高 M2 极化表型阳性细胞率,提示 ED 能够促进液压冲击脑损伤大鼠小胶质细胞由 M1 型向 M2 型极化。脑组织 TLR4 主要表达于小胶质细胞,NF- $\kappa$ B 为其下游靶基因。TLR4 可诱导 NF- $\kappa$ B 活化与核转位,入核后 NF- $\kappa$ B p65 亚基可诱导 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等促炎因子表达,从而促进炎症反应<sup>[22]</sup>。NLRP3 炎性小体可大量分泌 IL-1 $\beta$  等促炎因子,而 NLRP3 炎性小体的激活与 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的传导有关<sup>[23-24]</sup>。Hu 等<sup>[5]</sup>报道通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路介导的炎症反应能够减轻 TBI。本研究发现,经 ED 治疗能够明显降低液压冲击脑损伤大鼠脑组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 mRNA 和蛋白的表达量,提示 ED 对液压冲击脑损伤大鼠小胶质细胞极化以及炎症反应的影响可能与其抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

为了验证上述推论,本研究设置了 TAK242 (TLR4 抑制剂)组、ED + TAK242 组和 ED + LPS (TLR4 激动剂)组,结果显示,TAK242 组对液压冲击脑损伤大鼠神经功能、脑含水量、BBB 通透性、炎症反应、小胶质细胞极化、TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关 mRNA 和蛋白表达的调控方向与 ED 组相同,TAK242 可明显增强 ED 对液压冲击脑损伤大鼠上述各指标的调控作用,LPS 则明显逆转 ED 对液压冲击脑损伤大鼠各指标的调控作用。从而进一步证实了 ED 对液压冲击脑损伤大鼠小胶质细胞极化以及炎症反应的影响与其抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

综上所述,ED 可能通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路促进小胶质细胞由 M1 型向 M2 型极化,抑制炎症反应和 BBB 通透性升高,从而对大鼠液压冲击脑损伤起到保护作用。本研究结果为 TBI 的治疗及新药研究提供了新的思路。

#### [参考文献]

- [1] HAARBAUER-KRUPA J, PUGH M J, PRAGER E M, et al. Epidemiology of chronic effects of traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2021, 38(23): 3235-3247.
- [2] 齐洪武,曾维俊,张立钊,等. 创伤性脑损伤神经危重症管理的研究进展[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2023, 23(4): 298-304.  
QI H W, ZENG W J, ZHANG L Z, et al. Research progress on neurocritical care management of traumatic brain injury [J]. *J Neurosci Mental Health*, 2023, 23(4): 298-304.
- [3] DONG J Q, GE Q Q, LU S H, et al. Tandem mass tag-based proteomics analysis reveals the vital role of inflammation in traumatic brain injury in a mouse model [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(1): 155-161.
- [4] WANG X L, CHEN F, SHI H, et al. Oxymatrine inhibits neuroinflammation by regulating M1/M2 polarization in N9 microglia through the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100: 108139.
- [5] HU J, WANG X, CHEN X J, et al. Hydroxychloroquine attenuates neuroinflammation following traumatic brain injury by regulating the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 71.
- [6] 张山,徐伟,韩亚非,等. 依达拉奉右莰醇抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路减轻大鼠液压冲击脑损伤[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2023, 31(4): 204-209.  
ZHANG S, XU W, HAN Y F, et al. Edaravone dexbornoil attenuate hydraulic shock brain injury in rats by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J Brain Nerv Dis*, 2023, 31(4): 204-209.
- [7] 孙国柱,王目纲,刘性强,等. 不同分级液压冲击脑损伤模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(5): 963-965.  
SUN G Z, WANG M G, LIU X Q, et al. Establishment of graded fluid percussion model of experimental brain injury in rats [J]. *Chin J Exp Surg*, 2012, 29(5): 963-965.
- [8] 马迎辉,刘绍明,邢国祥. 大鼠液压脑损伤后皮层微血管改变与脑水肿的关系[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2013, 18(8): 485-487.  
MA Y H, LIU S M, XING G X. Association of the changes of cortical capillaries with brain edema after lateral fluid percussion brain injury in adult rat [J]. *Chin J Clin Neurosurg*, 2013, 18(8): 485-487.
- [9] 宫继鹏,贾会玉,李睿,等. 安非博肽调控小胶质细胞 M1/M2 极化抑制脑缺血再灌注损伤后炎症反应研究[J]. *中国药理学杂志*, 2023, 58(5): 426-434.  
GONG J P, JIA H Y, LI R, et al. Inhibition effect of anfibotide on inflammation after cerebral ischemia reperfusion injury through regulating M1/M2 microglia polarization [J]. *Chin Pharm J*, 2023, 58(5): 426-434.
- [10] XING R C, CHENG J, YU J T, et al. Trifluoperazine reduces apoptosis and inflammatory responses in traumatic brain injury by preventing the accumulation of Aquaporin4 on the surface of brain cells [J]. *Int J Med Sci*, 2023, 20(6): 797-809.
- [11] TATUM S, SMITH Z Z, TAYLOR J A, et al. Sensitivity of unilateral-versus bilateral-onset spike-wave discharges to ethosuximide and carbamazepine in the fluid percussion injury rat model of traumatic brain injury [J]. *J Neurophysiol*, 2021, 125(6): 2166-2177.
- [12] ZHAO S S, WANG S Q, CAO L X, et al. Acupuncture

- promotes nerve repair through the benign regulation of mTOR-mediated neuronal autophagy in traumatic brain injury rats[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(1): 458-470.
- [13] ZHANG N N, ZHANG Z B, WANG H X, et al. Plasma cytokine changes and its clinical significance in intracranial infection secondary to traumatic brain injury [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(5): 4573-4580.
- [14] 李潮生, 王振花, 李晓丽, 等. N-乙酰半胱氨酸通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路对高糖诱导的内皮细胞损伤的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(11): 941-948.
- LI C S, WANG Z H, LI X L, et al. N-acetylcysteine protects endothelial cell from high glucose induced injury by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(11): 941-948.
- [15] XU L L, GAO Y R, HU M, et al. Edaravone dextran protects cerebral ischemia reperfusion injury through activating Nrf2/HO-1 signaling pathway in mice[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2022, 36(5): 790-800.
- [16] HU Y, TAO W W. Microenvironmental variations after blood-brain barrier breakdown in traumatic brain injury [J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 14: 750810.
- [17] LU Q, XIONG J, YUAN Y, et al. Minocycline improves the functional recovery after traumatic brain injury via inhibition of aquaporin-4[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(1): 441-458.
- [18] HUANG Y A, ZHANG X J, ZHANG C, et al. Edaravone dextran downregulates neutrophil extracellular trap expression and ameliorates blood-brain barrier permeability in acute ischemic stroke [J]. *Mediators Inflamm*, 2022, 2022: 3855698.
- [19] XIN W Q, PAN Y L, WEI W, et al. Preconditioned extracellular vesicles from hypoxic microglia reduce poststroke AQP4 depolarization, disturbed cerebrospinal fluid flow, astrogliosis, and neuroinflammation [J]. *Theranostics*, 2023, 13(12): 4197-4216.
- [20] YUAN J X, LIN F H, CHEN L C, et al. Lipoxin A4 regulates M1/M2 macrophage polarization via FPR2-IRF pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(2): 487-498.
- [21] LIU N, SUN H Y, LI X Z, et al. Downregulation of lncRNA KCNQ1OT1 relieves traumatic brain injury induced neurological deficits via promoting "M2" microglia polarization [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 171: 91-102.
- [22] XU Y Y, ZHANG J, GAO F, et al. Engeletin alleviates cerebral ischemia reperfusion-induced neuroinflammation via the HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B network [J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(12): 1653-1663.
- [23] 丁立丹, 徐鹏博, 鲍友利, 等. 瓜蒌-薤白对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化过程中 NLRP3 炎症小体活化的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(1): 27-35.
- DING L D, XU P B, BAO Y L, et al. Effects of trichosanthis fructus-allii macrostemonis bulbus on the activation of NLRP3 inflammasomes in ApoE<sup>-/-</sup> mice at different stages of atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(1): 27-35.
- [24] LI J, YAN W L, REN F, et al. Tectorigenin inhibits inflammation in keratinocytes by inhibition of NLRP3 inflammasome regulated by the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2023, 51(2): 82-89.

(此文编辑 文玉珊)