

·论著·

高渗冰盐水改善大鼠创伤性脑损伤后半暗带脑水肿

刘梦佳^{1,2}, 陆兆丰², 李海荣², 朱义通², 杨家发²

摘要 目的:应用高渗冰盐水(hypertonic ice saline,HIS)治疗创伤性脑损伤(traumatic brain injury,TBI)大鼠以探讨HIS通过调节水通道蛋白4(aquaporin 4,AQP4)和NLRP3炎症小体的表达抑制大鼠半暗带脑水肿形成和焦亡,并探究HMGB1/NF-κB信号通路调控的分子机制。**方法:**60只SD大鼠被随机分为假手术组、对照组和HIS组,每组20只。通过改进的菲尼自由落体法构建TBI模型,假手术组不造成打击。对照组术后予生理盐水治疗,HIS组术后予HIS治疗。水迷宫试验用于检测大鼠认知能力,脑水肿通过脑组织含水量检测,Western blot用于检测AQP4、NLRP3、焦亡途径相关蛋白(Caspase-1、GSDMD)、HMGB1/NF-κB信号通路相关蛋白(HMGB1、NF-κB、p-IκBα)的表达;采用实时荧光定量PCR检测AQP4以及炎症细胞因子IL-1β和TNF-α的水平。**结果:**水迷宫试验结果显示与对照组相比,HIS组大鼠逃逸潜伏期缩短($P<0.05$)和经过原平台象限次数增加($P<0.05$);Western blot结果显示,与假手术组相比,对照组和HIS组AQP4表达水平均升高($P<0.05$);与对照组相比,HIS组AQP4表达下调($P<0.05$);与对照组相比,HIS组焦亡相关蛋白NLRP3、Caspase-1、GSDMD表达下调;与假手术组相比,对照组和HIS组炎症因子IL-1β和TNF-α的水平显著上调($P<0.05$),与对照组相比,HIS组炎症因子水平下调($P<0.05$);Western blot结果显示HIS能抑制HMGB1/NF-κB信号通路的激活。**结论:**创伤性脑损伤能诱导半暗带炎症水平升高和脑水肿及AQP4表达上调,应用HIS治疗则能改善缓解大鼠创伤性脑损伤后半暗带炎症和脑水肿并降低AQP4表达,其调节机制涉及抑制焦亡相关蛋白表达和抑制HMGB1/NF-κB信号通路激活。

关键词 细胞焦亡;高渗冰盐水;水通道蛋白4;NLRP3

中图分类号 R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgnjcj.20230481

本文引用格式:刘梦佳, 陆兆丰, 李海荣, 朱义通, 杨家发. 高渗冰盐水改善大鼠创伤性脑损伤后半暗带脑水肿[J]. 神经损伤与功能重建, 2024, 19(7): 379-384, 418.

作者单位

1. 河南科技大学临床医学院
河南 洛阳 471000
2. 河南科技大学第一附属医院开元急诊科
河南 洛阳 471000

基金项目

河南省医学科技攻关计划省部共建重点项目(SBGJ202102198)

收稿日期

2023-07-17

通讯作者

陆兆丰
zhaofengl001@163.com

Hypertonic Ice Saline Improve Penumbra Brain Edema after Traumatic Brain Injury in Rats

LIU Mengjia^{1,2}, LU Zhaofeng², LI Hairong², ZHU Yitong², YANG Jiafa². 1. School of Clinical Medicine, Henan University of Science and Technology, Henan 471000, China; 2. Kaiyuan Emergency Department of the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Henan 471000, China

Abstract Objective: To investigate whether hypertonic ice saline (HIS) treatment can inhibit penumbra brain edema formation and pyroptosis in rats with traumatic brain injury (TBI) by regulating the expression of aquaporin 4 (AQP4) and NLRP3 inflammasome, and to explore the molecular mechanism involving the regulation of the HMGB1/NF-κB signaling pathway. **Methods:** Sixty Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: sham, TBI control, and HIS, with 20 rats in each group. The TBI model was constructed using a modified Feeney's free-fall method, while the sham group underwent the same procedure without the impact. Postoperatively, the control group received normal saline treatment, and the HIS group received HIS treatment. The Morris water maze test was used to assess the cognitive ability of the rats. Brain edema was measured by determining the water content of brain tissue. Western blot was used to detect the expression of AQP4, NLRP3, pyroptosis-related proteins (Caspase-1, GSDMD), and HMGB1/NF-κB signaling pathway-related proteins (HMGB1, NF-κB, p-IκBα). Real-time quantitative PCR was used to measure the levels of AQP4 and the inflammatory cytokines IL-1β and TNF-α. **Results:** The water maze test results showed that, compared with the control group, the escape latency of rats in the HIS group was shortened ($P<0.05$) and the number of times they passed through the original platform quadrant increased ($P<0.05$). Western blot results showed that, compared with the sham group, AQP4 expression levels in both the control and HIS groups were increased ($P<0.05$). However, compared with the control group, AQP4 expression in the HIS group was significantly down-regulated ($P<0.05$). Additionally, compared with the control group, the expressions of pyroptosis-related proteins NLRP3, Caspase-1 and GSDMD were down-regulated in the HIS group. Furthermore, compared with the sham group, the levels of inflammatory factors IL-1 β and TNF-α were significantly up-regulated in both the control and HIS groups ($P<0.05$), while the levels of these inflammatory factors were significantly down-regulated in the HIS group compared with the control group ($P<0.05$). Western blot results also showed that HIS inhibited the activation of the HMGB1/NF-κB signaling pathway. **Conclusion:** TBI can induce an increase in penumbra inflammation, brain edema and up-regulation of AQP4

expression. HIS treatment can significantly alleviate the inflammation and brain edema of the penumbra and reduce the expression of AQP4 after TBI in rats. The regulatory mechanism involves inhibiting the expression of pyroptosis-related proteins and blocking the activation of the HMGB1/NF-κB signaling pathway.

Keywords pyroptosis; hypertonic ice saline; aquaporin 4; NLRP3

创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)是由外部机械力导致的脑结构损伤和/或脑功能障碍,因高发生率、高死亡率和高致残率的特点而成为神经外科最常见的急危重症之一^[1,2]。TBI原发性损伤主要由机械创伤导致,继而引起兴奋性中毒、氧化应激、线粒体损伤、血脑屏障受损和神经炎症反应等一系列继发性损伤,细胞死亡和随后的炎症是中枢神经系统损伤的主要生物学过程^[3],因此,更深入了解继发性损伤的机制可能有助于发现改善脑外伤结局的疗法。

最近的研究表明,炎症体介导的细胞焦亡是细胞程序性死亡的一种特殊模式,在TBI损伤的发病机制中起着重要作用^[4,5]。针对炎症小体介导的细胞焦亡的治疗可通过抑制神经元细胞死亡、减少小胶质细胞的激活改善TBI继发性脑损伤后的一系列恶性事件。小胶质细胞中失调或持续的神经炎症可能导致神经症状和神经变性,在中枢神经免疫系统中起关键作用^[6]。慢性神经炎的典型特征是核苷酸结合结构域富含亮氨酸的重复序列和含有吡林结构域的受体3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)炎症体在小胶质细胞中激活^[7]。目前已有研究表明多种炎症途径通过靶向调节NLRP3-Gasdermin D(GSDMD)级联反应,对细胞膜进行打孔,激活并诱导炎症因子释放而致细胞死亡,该过程包括但不限于HIF-1α通过募集和激活小胶质细胞诱导NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡^[8]、激活效应分子高迁移率组盒1(high mobility group box 1, HMGB1)通过HMGB1/TLR4/NF-κB信号诱导小胶质细胞焦亡^[9,10]。因此靶向焦亡相关途径中的炎症小体可以减少创伤部位的局灶性坏死和炎症损伤,是TBI治疗的潜在靶点。

TBI中的原发性脑损伤是不可逆的,但继发性脑损伤是由一系列生化反应调节的神经功能改变,因此被认为有恢复的可能性。介于创伤部位和正常部位之间的半暗带由于具备向正常或损伤方向发展的潜力,因此可以作为TBI治疗效果的有效观察部位。高渗生理盐水(hypertonic saline, HS)是脑缺血、脑出血或TBI所致脑水肿的常用治疗方法^[11,12]。在脑水肿大鼠模型中,HS减少脑水肿的效果较等摩尔质量的甘露醇效果更佳^[13],其分子机制被认为与HS通过减少炎症因子释放从而抑制小胶质细胞中水通道蛋白(aquaporin,

AQP)4表达相关^[14]。AQP4是大脑中含量最高的水通道蛋白,在脑水肿的调节中起着关键作用,并且通过与脑部炎症相关途径相互串扰调节脑损伤后的神经功能^[15,16]。

近年来,亚低温(综合运用各种手段使患者目标体温保持在32℃~35℃)在院外心脏骤停中对脑功能的保护作用^[17]已得到证实,但其在TBI治疗中的作用尚不明确。因此,本研究通过改进的菲尼自由落体法(modified Feeney's free-fall method)构建TBI大鼠模型阐明高渗冰盐水(hypertonic ice-cold saline, HIS)对TBI诱导的脑水肿的影响和炎症相关的细胞焦亡的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠60只,体质量230~270 g,6~8周龄,购自上海斯莱克公司(中国上海),许可证号SYXK(沪)2022-0012。所有动物实验程序获得河南科技大学第一附属医院动物保护及使用委员会批准,并且根据美国国立卫生研究院的“实验动物护理和使用指南”进行^[18]。所有大鼠均单独喂养,自由进水、进食,在实验前适应性喂养1周,环境温度20℃~24℃、湿度55%~65%,光照周期12/12 h。

1.1.2 主要试剂与设备 盐酸替来他明盐酸唑拉西泮(商品名舒泰50),购于法国维克有限公司;蛋白酶抑制剂PMSF(ST505)、RIPA裂解液(P0013B);BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009),购于上海碧云天生物公司;PVDF膜(05317),购于美国默克公司;抗AQP4(ab128906)、抗NLRP3(ab4207)、抗p-IκBα(ab133462)、抗GAPDH(ab181602),购于英国Abcam公司;抗GSDMD(sc393581),购于美国Santa Cruz公司;抗HMGB1(6893S)、抗NF-κB(8242T)、抗IκBα(9242s),购于美国CST公司;山羊抗鼠IgG(BA1050)、山羊抗兔IgG(BA1054),购于中国博士德公司;TRIzol(A33250),购于美国Invitrogen公司;cDNA合成试剂盒(6110A)、SYBR Green,购于日本Takara公司;ECL成像仪(CHEMIODOC XRS+成像系统)、CFX96系统,购于美国Bio-RAD公司。

1.2 方法

1.2.1 TBI大鼠模型构建 根据文献^[19]描述采用改进的菲尼自由落体法(modified Feeney's free-fall method)构建大鼠TBI模型,通过腹腔内注射盐酸替来他明盐酸唑拉西泮50 mg/kg置于立体定位装置上。皮肤准备后,用矫形钻头在冠状缝线右侧3 mm和矢状缝线后方3 mm处开一个5 mm的开口,保持硬脑膜完整。然后,将一个40 g的物体从15 cm高的地方掉下,垂直撞击裸露的硬脑膜,形成一个3 mm深、直径4 mm的洞。

1.2.2 实验分组 大鼠随机分为3组:假手术组(n=20)、对照组(n=20)和HIS组(n=20)。假手术组只被钻孔,但没有被坠落物伤害。对照组和HIS组均制备TBI模型。HIS组在诱导TBI后3 h通过股静脉输注3.4% HIS(3.4 g NaCl溶解于100 mL无菌去离子水,4 °C,5 mL/kg)。对照组按同样方法输注常温无菌生理盐水,分别在治疗1 d、2 d、3 d时每组随机处死5只大鼠。在深度麻醉下处死大鼠后立即切除大脑,在距创伤区7 mm处对大脑组织进行冠状切开,沿大脑中线向右2 mm处矢状面切开,然后对右侧余下的大脑组织约60°位置做斜切,快速分离邻近腹外侧皮质即为半暗带。

1.2.3 Morris水迷宫行为学测试 治疗3 d后,参考文献^[20]的描述采用Morris水迷宫测试评价各组大鼠(n=5)认知功能。定位航行试验:放置水温保持在22 °C~25 °C的水池并将其平均分为四个象限,于其中一个象限设置平台,每日于固定时间将大鼠从池壁四个起始点的任一点放入水池,进行4次实验训练大鼠找到平台,记录所需的时间(逃避潜伏期),若120 s内找不到平台(逃避潜伏期120 s)便将大鼠放上平台,休息15 s后再进行下一次试验。空间探索试验:训练5 d后移除平台,记录大鼠经过原平台象限次数和逃逸潜伏期。

1.2.4 蛋白质免疫印迹(Western blot) 将半暗带组织用含有蛋白酶抑制剂PMSF的RIPA裂解液进行总蛋白质提取后,蛋白质浓度用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行检测。等质量(30 μg)蛋白质通过SDS-PAGE凝胶进行电泳分离后转移到PVDF膜上。室温下,用5%脱脂奶粉进行PVDF膜封闭,将特异性一抗覆盖在膜上4 °C孵育过夜,实验中用的一抗包括:抗AQP4、抗NLRP3、抗GSDMD、抗HMGB1、抗NF-κB、抗p-IκBα、抗IκBα、抗GAPDH。次日用TBST对PVDF洗涤3次,每次5 min,然后分别用山羊抗鼠IgG和山羊抗兔IgG二抗在室温下孵育1 h,TBST清洗后用ECL成像仪进行蛋白印迹显影,并用Image J软件对蛋白质印迹进行

灰度值计算。

1.2.5 实时荧光定量(quantitative real-time,qRT)-PCR 使用TRIzol对大鼠半暗带脑组织进行RNA提取。按照cDNA合成试剂盒的说明进行逆转录,之后在CFX96系统上使用引物和SYBR Green(日本Takara公司)进行qRT-PCR,GAPDH作为内参。所用引物包括:IL-1β—F:GCTTCAGGCAGGCAGTATCA,R:TGCAG TTGTCTAATGGGAACG;TNF-α—F:TACTGAACCTT CGGGGTGATCG,R:CCACTTGGTGTTGCTAC G;AQP4—F:TCCCTCTGCTTGACTCAG,R:GCG ATGCTGATCTTCGTGT;GAPDH—F:GTGCCAGC CTCGTCTCATAG,R:CTTTGTCACAAGAGAAGGC AG。

1.2.6 脑组织含水量测定 处死大鼠后取出脑组织并立即置于含有用盐水润湿滤纸的培养皿中,以防止水分蒸发。用滤纸吸干血水后,去除小脑和脑干,对剩余组织进行称量以确定湿重,之后置于100 °C烘箱中干燥48 h后称量干重。含水量计算公式:(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0(购于美国IBM公司)软件进行统计分析,计量数据以(平均值±标准误)表示,Student's t检验,用单因素方差分析评估脑组织含水量和qRT-PCR结果的差异,用重复测量数据的方差分析比较水迷宫数据差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIS对TBI大鼠认知功能的影响

水迷宫定位航行试验中,与假手术组比较,对照组和HIS组的大鼠逃逸潜伏期延长($P<0.05$),HIS组大鼠逃逸潜伏期较对照组缩短($P<0.05$),见表1。在空间探索试验中,与假手术组相比,对照组和HIS组大鼠经过原平台象限次数减少($P<0.05$),HIS组大鼠经过原平台象限次数较对照组增加($P<0.05$),见表1。这表明HIS可以改善TBI导致的大鼠认知功能障碍。

2.2 HIS治疗可降低TBI大鼠模型中的脑组织含水量

通过测定处理不同时间段的TBI大鼠半暗带脑组织含水量以确定HIS对脑水肿的影响。结果显示对照组和HIS组的脑水肿程度均高于假手术组,与对照组相比,经HIS治疗后1 d、2 d、3 d脑水肿均显著降低,见图1。

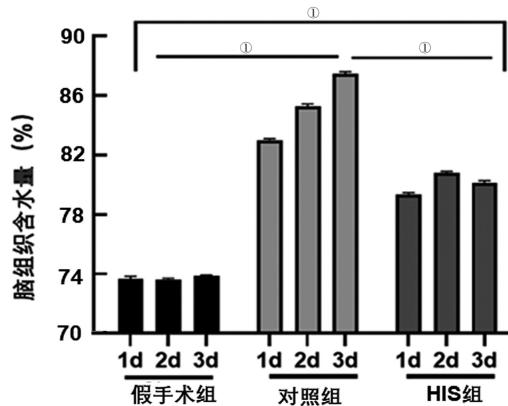
2.3 HIS下调半暗带中TBI诱导的AQP4表达

为了研究HIS缓解TBI大鼠半暗带脑水肿程度的

表1 各组大鼠逃避潜伏期比较($\bar{x}\pm SEM$)

组别	只数	逃避潜伏期/s					经过原平台象限次数/次
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	
假手术组	5	52.21±10.22	40.33±3.87	32.65±5.82	15.46±2.84	5.72±1.93	24.73±3.29
对照组	5	112.66±6.98 ^①	82.75±6.87 ^①	68.95±4.31 ^①	55.97±4.82 ^①	45.63±5.21 ^①	4.68±1.47 ^①
HIS组	5	72.02±6.26 ^{①②}	52.33±7.29 ^{①②}	40.05±4.26 ^{①②}	25.84±3.25 ^{①②}	12.73±2.38 ^{①②}	13.85±1.36 ^{①②}

注:与假手术组比较,^①P<0.05;与对照组比较,^②P<0.05。



注:^①P<0.05。

图1 HIS治疗降低TBI大鼠模型中的脑组织含水量(n=5)

机制,通过Western blot检测了半暗带AQP4蛋白的表达。与假手术组相比,对照组和HIS组在各个时间点的AQP4表达水平均升高($P<0.05$)。与对照组相比,HIS组在相同时间点由于HIS的处理,TBI诱导的AQP4被抑制($P<0.05$),见图2A、表2。实时荧光定量PCR检测的AQP4 mRNA水平也表现出相同的变化趋势($P<0.05$),见图2B。这表明HIS治疗的机制至少部分涉及抑制TBI诱导的AQP4升高。

2.4 HIS治疗减少TBI大鼠半暗带炎症反应

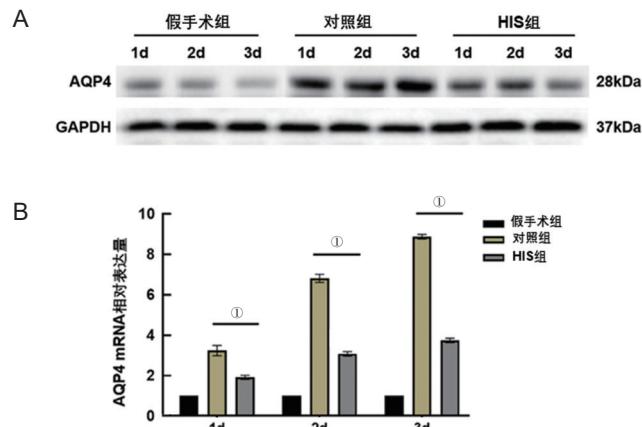
为了研究HIS对TBI大鼠半暗带炎症反应的影响,采用qRT-PCR检测TNF- α 和IL-1 β mRNA水平。与假手术组相比,对照组和HIS组在创伤后1 d、2 d、3 d的TNF- α 和IL-1 β 水平均显著升高,但是与对照组相比,HIS组的炎症水平明显被抑制,见图3。这表明,由TBI诱导的促炎细胞因子水平的升高可被HIS治疗所抑制。

2.5 HIS治疗减少TBI大鼠半暗带NLRP3炎症小体形成

炎症小体的形成表明细胞将逐渐走向焦亡,其中NLRP3是脑组织炎症小体的重要成分之一。Western blot结果显示,与假手术组相比,对照组和HIS组NLRP3表达均升高($P<0.05$),在HIS干预治疗下,TBI诱导的NLRP3被抑制($P<0.05$),见图4、表3。

2.6 HIS抑制TBI大鼠半暗带细胞焦亡过程

为了进一步确定HIS对TBI大鼠脑组织细胞焦亡的影响,通过Western blot分析半暗带焦亡相关蛋白表



注:^①P<0.05。

图2 各组AQP4蛋白(A)及mRNA(B)水平比较(n=5)

表2 各组大鼠半暗带AQP4蛋白表达灰度值比较($\bar{x}\pm SEM$)

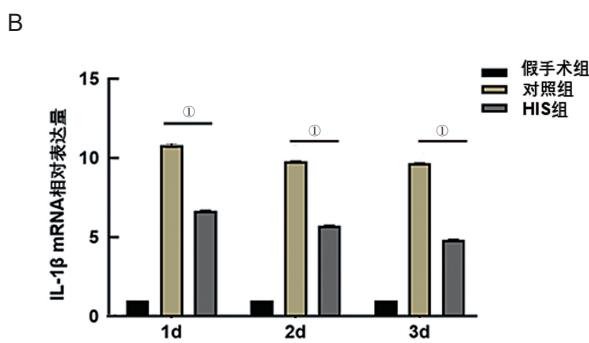
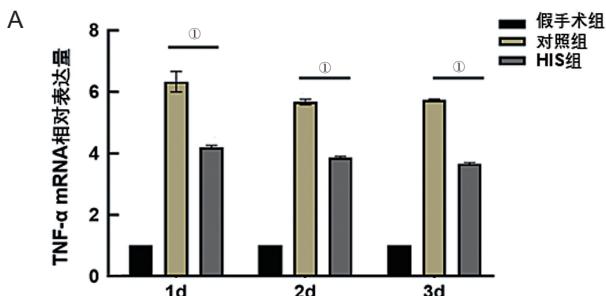
组别	只数	1 d	
		2 d	3 d
假手术组	5	0.45±0.06	
对照组	5	1.12±0.14 ^①	
HIS组	5	0.56±0.02 ^{①②}	
组别	2 d	3 d	
假手术组	0.43±0.08	0.37±0.04	
对照组	1.23±0.13 ^①	1.89±0.08 ^①	
HIS组	0.61±0.11 ^{①②}	0.48±0.10 ^{①②}	

注:与假手术组比较,^①P<0.05;与对照组比较,^②P<0.05。

达水平,结果显示,与假手术组相比,对照组和HIS组Caspase-1、GSDMD表达水平升高($P<0.05$),而HIS组中焦亡相关蛋白的表达降低($P<0.05$),见图5、表4,表明HIS通过抑制TBI诱导的焦亡相关蛋白Caspase-1、GSDMD表达阻止神经细胞走向焦亡结局。

2.7 HIS通过抑制HMGB1/NF- κ B通路缓解TBI后半暗带炎症反应

之前的结果已经表明HIS通过抑制细胞焦亡和下调AQP4减轻TBI后半暗带脑水肿,而且HIS对AQP4的调节呈现出时间依赖性(随着处理时间的延长,对AQP4的抑制作用越明显,见图2)。由于核因子 κ B(nuclear factor kappa beta, NF- κ B)通路已被证明参与炎症和焦亡的调节^[10,21],因此通过Western blot分别检测TBI创伤与HIS治疗后1 d、2 d、3 d的HMGB1、NF- κ B及I κ B α 的磷酸化(phosphorylation of I κ B α , p-I κ B α)水



注: *P<0.05。

图3 各组TNF- α mRNA(A)和IL-1 β mRNA(B)水平比较(n=5)

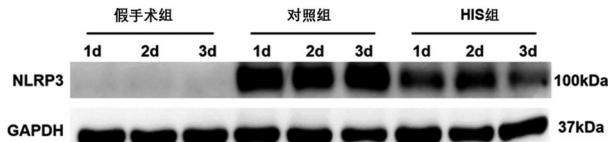


图4 各组大鼠半暗带NLRP3炎症小体表达水平比较(n=5)
平。结果表明,HIS通过下调NF- κ B表达和I κ B α 的磷酸化来抑制TBI后NF- κ B信号传导,而且TBI诱导的HMGB1的上调被HIS治疗所抑制,见图6、表5,因此HIS对炎症信号传导的抑制减弱了细胞焦亡。

3 讨论

本研究的数据表明HIS减轻了TBI大鼠半暗带脑组织炎症诱导的细胞焦亡和脑水肿,主要发现包括:①TBI后大鼠半暗带焦亡相关炎性小体NLRP3显著增多,HIS治疗抑制过度炎症诱导的焦亡;②HIS改善大鼠认知功能障碍和通过下调AQP4表达缓解TBI诱导的脑水肿;③HIS对HMGB1/NF- κ B炎症通路有抑制作用。

AQP4是调节脑组织水稳态的水通道蛋白中最重要的亚型之一,先前已被证明是导致创伤性脑水肿的

表3 各组大鼠半暗带NLRP3蛋白表达灰度值比较($\bar{x}\pm SEM$)

组别	只数			
	1 d	2 d	3 d	
假手术组	5	0.01±0.01		
对照组	5	1.56±0.12 ^①		
HIS组	5	0.46±0.16 ^{①②}		
组别	2 d	3 d		
假手术组	0.01±0.01	0.01±0.01		
对照组	1.62±0.14 ^①	2.26±0.10 ^①		
HIS组	0.58±0.13 ^{①②}	0.28±0.11 ^{①②}		

注:与假手术组比较,^①P<0.05;与对照组比较,^②P<0.05。

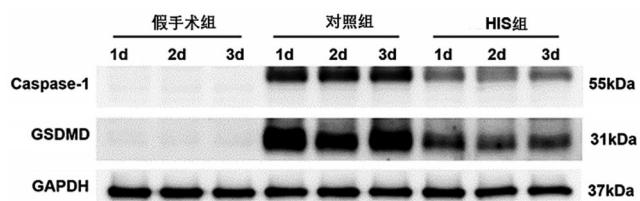


图5 各组大鼠半暗带Caspase-1、GSDMD蛋白表达水平比较
(n=5)

关键调节因子^[22-24]。据报道,用抗体阻断AQP4有利于缓解脑水肿程度^[25];在TBI大鼠模型中发现AQP4蛋白丰度增加,用AQP4-siRNA敲低AQP4后可减少脑水肿^[26];靶向抑制AQP4表达抑制脑水肿形成和神经功能缺损^[27]。本研究结果与其一致,在TBI诱导大鼠半暗带AQP4表达升高,伴随脑水肿进一步形成,通过HIS治疗可以抑制TBI对AQP4的诱导且缓解脑水肿程度。研究表明Na⁺-K⁺-2Cl⁻共转运体1(Na⁺-K⁺-2Cl⁻cotransporter1,NKCC1)和AQP4在星形胶质细胞体积调节中相互作用,在脊髓损伤模型中用AQP4抑制剂(TGN-20)能降低NKCC1的表达,同样的,用NKCC1抑制剂(bumetanide)降低了AQP4的表达^[28],因此NKCC1和AQP4似乎在损伤导致的水肿中存在功能性相互作用,未进一步探究HIS对NKCC1的表达调控是本研究存在的不足之处。

炎症过度激活是脑水肿的特征,因此脑水肿形成和创伤后炎症是继发性脑损伤两个重要的病理过程。焦亡被认为是高度特异性的炎症程序性细胞死亡,焦亡激活的过程主要涉及炎症小体复合物聚集后水解半胱天冬酶原-1为活性亚基,活性Caspase-1诱导GSDMD活化,被转运至细胞内膜,寡聚后形成膜孔并

表4 各组大鼠半暗带Caspase-1和GSDMD蛋白表达灰度值比较($\bar{x}\pm SEM$)

组别	只数	Caspase-1			GSDMD		
		1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d
假手术组	5	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01
对照组	5	1.21±0.16 ^①	1.31±0.12 ^①	1.33±0.14 ^①	1.75±0.14 ^①	1.68±0.10 ^①	1.83±0.15 ^①
HIS组	5	0.23±0.14 ^{①②}	0.22±0.12 ^{①②}	0.20±0.11 ^{①②}	0.95±0.13 ^{①②}	0.82±0.11 ^{①②}	0.74±0.10 ^{①②}

注:与假手术组比较,^①P<0.05;与对照组比较,^②P<0.05。

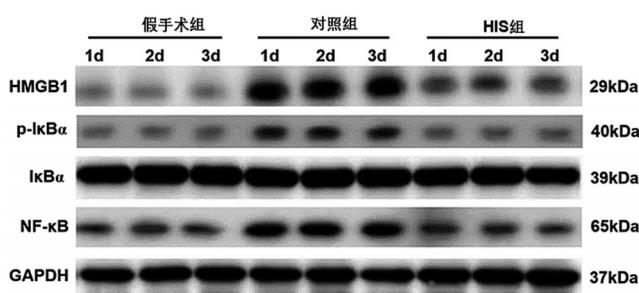


图6 HIS抑制HMGB1/NF-κB通路(n=5)

释放大量炎症因子,最终导致细胞死亡^[29]。与TBI相关的细胞焦亡的炎症小体中被研究最多的便是NLRP3,它们存在于受损脑组织的神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞中,可加速炎症反应和神经元的诱导,最终导致神经系统的恶性结局^[29]。靶向抑制NLRP3炎症小体的治疗已被认为是TBI潜在的有效策略,同时抑制炎症激活及细胞焦亡有助于神经功能恢复和抑制脑水肿形成^[30],本研究的数据也支持这一观点,HIS可有效抑制TBI诱导的炎症反应、NLRP3炎症小体生成和细胞焦亡。

NF-κB参与调解多种炎症信号并在TBI的病理机制中具有重要地位。NF-κB活化后,诱导IκBα磷酸化,通过炎症反应调节下游炎症介质的释放,在细胞焦亡和脑水肿调节中扮演重要角色。HMGB1通过激活急性青光眼中的NF-κB通路,促进NLRP3和半胱天冬酶-8炎症小体的表达水平^[31],VX765可通过减弱小鼠TBI模型中的HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路来抑制炎症反应^[10]。与本研究结果一致,HIS通过抑制TBI大鼠中HMGB1/NF-κB信号通路来抑制炎症反应和细胞焦亡。

总而言之,HIS通过抑制TBI诱导的NLRP3炎症小体持续激活减少焦亡,同时通过下调TBI诱导的AQP4抑制脑水肿形成,两种疗效的分子机制聚焦在抑

表5 各组大鼠半暗带HMGB1、p-IκBα、NF-κB蛋白表达灰度值比较($\bar{x}\pm SEM$)

组别	只数	HMGB1		
		1 d	2 d	3 d
假手术组	5	0.30±0.12	0.31±0.22	0.29±0.14
对照组	5	1.12±0.17 ^①	1.15±0.18 ^①	1.17±0.14 ^①
HIS组	5	0.32±0.11 ^②	0.30±0.18 ^②	0.30±0.19 ^②

组别	p-IκBα			NF-κB		
	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d
假手术组	0.28±0.12	0.29±0.09	0.29±0.19	0.34±0.15	0.36±0.08	0.35±0.13
对照组	0.74±0.15 ^①	0.81±0.13 ^①	0.86±0.12 ^①	0.88±0.12 ^①	0.92±0.11 ^①	0.94±0.14 ^①
HIS组	0.31±0.13 ^②	0.30±0.13 ^②	0.30±0.12 ^②	0.42±0.17 ^②	0.45±0.06 ^②	0.44±0.18 ^②

注:与假手术组比较,^①P<0.05;与对照组比较,^②P<0.05。

制HMGB1/NF-κB信号的激活,为HIS治疗TBI未来临床转化提供了有力证据。目前对于TBI导致的脑水肿分子途径一直是重点研究内容,这有利于开发新的治疗策略和评估治疗效果,本研究通过使用治疗性低温联合高渗疗法改善了大鼠TBI后的脑水肿,评估了神经炎症、细胞焦亡与AQP4之间的串扰,为TBI后脑水肿管理策略提供了新的思路和方法。

参考文献

- Robinson CP. Moderate and Severe Traumatic Brain Injury[J]. Continuum (Minneapolis Minn), 2021, 27: 1278-1300.
- Nie Z, Tan L, Niu J, et al. The role of regulatory necrosis in traumatic brain injury[J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 1005422.
- Li YF, Ren X, Zhang L, et al. Microglial polarization in TBI: Signaling pathways and influencing pharmaceuticals[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 901117.
- Hu X, Chen H, Xu H, et al. Role of Pyroptosis in Traumatic Brain and Spinal Cord Injuries[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16: 2042-2050.
- Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens[J]. Immunol Rev, 2015, 265: 130-142.
- O'Brien WT, Pham L, Symons GF, et al. The NLRP3 inflammasome in traumatic brain injury: potential as a biomarker and therapeutic target[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17: 104.
- Kodali M, Madhu LN, Reger RL, et al. Intranasally administered human MSC-derived extracellular vesicles inhibit NLRP3-p38/MAPK signaling after TBI and prevent chronic brain dysfunction[J]. Brain Behav Immun, 2023, 108: 118-134.
- Yuan D, Guan S, Wang Z, et al. HIF-1 α aggravated traumatic brain injury by NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and activation of microglia [J]. J Chem Neuroanat, 2021, 116: 101994.
- Frank MG, Weber MD, Watkins LR, et al. Stress sounds the alarm: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming[J]. Brain Behav Immun, 2015, 48: 1-7.
- Sun Z, Nyanzu M, Yang S, et al. VX765 Attenuates Pyroptosis and HMGB1/TLR4/NF-κB Pathways to Improve Functional Outcomes in TBI Mice[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 7879629.
- Zhai WC, Toung TJ, Bhardwaj A. Hypertonic saline: First-line therapy for cerebral edema[J]. J Neurol Sci, 2007, 261: 157-166.
- Peterson B, Khanna S, Fisher B. Prolonged hypernatremia controls elevated intracranial pressure in head-injured pediatric patients[J]. Crit Care Med, 2000, 28: 1136-1143.
- Zeng HK, Wang QS, Deng YY. A comparative study on the efficacy of 10% hypertonic saline and equal volume of 20% mannitol in the treatment of experimentally induced cerebral edema in adult rats[J]. BMC Neurosci, 2010, 11: 153.
- Yin J, Zhang H, Chen H, et al. Hypertonic Saline Alleviates Brain Edema After Traumatic Brain Injury via Downregulation of Aquaporin 4 in Rats[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 1863-1870.
- Neri M, Frati A, Turillazzi E, et al. Immunohistochemical Evaluation of Aquaporin-4 and its Correlation with CD68, IBA-1, HIF-1 α , GFAP, and CD15 Expressions in Fatal Traumatic Brain Injury[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 3544.
- Zhang H, Liu J, Liu Y, et al. Hypertonic saline improves brain edema

- Lancet, 2004, 364: 2106-2112.
- [53] Pilch KS, Spaeth PJ, Yuki N, et al. Therapeutic complement inhibition: a promising approach for treatment of neuroimmunological diseases[J]. Expert Rev Neurother, 2017, 17: 579-591.
- [54] Kwan JS, Ho PW, Ho SL, et al. Aquaporin-4 water channel expression by thymoma of patients with and without myasthenia gravis[J]. J Neuroimmunol, 2010, 227: 178-184.
- [55] Wakayama Y. Aquaporin expression in normal and pathological skeletal muscles: a brief review with focus on AQP4[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 731569.
- [56] Iyer A, Elsone L, Appleton R, et al. A review of the current literature and a guide to the early diagnosis of autoimmune disorders associated with neuromyelitis optica[J]. Autoimmunity, 2014, 47: 154-161.
- [57] 刘静怡, 谭颖, 徐雁, 等. 视神经脊髓炎谱系疾病合并重症肌无力的临床特点及相关机制[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2020, 27: 30-34, 39.
- [58] Wang Z, Yan Y. Immunopathogenesis in Myasthenia Gravis and Neuromyelitis Optica[J]. Front Immunol, 2017, 8: 1785.
- [59] Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses[J]. Nat Rev Immunol, 2016, 16: 626-638.
- [60] 陈嘉欣, 黄鑫, 冯慧宇. 青年女性反复四肢肌无力并吞咽困难——视神经脊髓炎谱系疾病伴发重症肌无力[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2020, 46: 125-128.
- [61] Howard JF Jr, Utsugisawa K, Benatar M, et al. Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study[J]. Lancet Neurol, 2017, 16: 976-986.
- [62] Pittock SJ, Lennon VA, McKeon A, et al. Eculizumab in AQP4-IgG-positive relapsing neuromyelitis optica spectrum disorders: an open-label pilot study[J]. Lancet Neurol, 2013, 12: 554-562.
- [63] Zhao J, Wang C, Xu X, et al. Coexistence of Autoimmune Encephalitis and Other Systemic Autoimmune Diseases[J]. Front Neurol, 2019, 10: 1142.
- [64] Uchio N, Taira K, Ikenaga C, et al. Inflammatory myopathy with myasthenia gravis: Thymoma association and polymyositis pathology[J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2018, 6: e535.
- [65] Tamer S, Gokce Gunes HN, Gokcal E, et al. Coexistence of autoimmune diseases and autoantibodies in patients with myasthenia gravis [J]. Neurol India, 2016, 64: 45-49.

(本文编辑:王晶)

(上接第384页)

- resulting from traumatic brain injury by suppressing the NF- κ B/IL-1 β signaling pathway and AQP4[J]. Exp Ther Med, 2020, 20: 71.
- [17] Belur AD, Sedhai YR, Truesdell AG, et al. Targeted Temperature Management in Cardiac Arrest: An Updated Narrative Review[J]. Cardiol Ther, 2023, 12: 65-84.
- [18] National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.
- [19] Meng XE, Zhang Y, Li N, et al. Hyperbaric Oxygen Alleviates Secondary Brain Injury After Trauma Through Inhibition of TLR4/NF- κ B Signaling Pathway [J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 284-288.
- [20] 薛志远, 岳宇娇, 黄琴, 等. TGF- β 1/Smad3信号通路在阻塞性睡眠呼吸暂停综合征大鼠认知障碍中的作用[J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18: 63-67.
- [21] 张瑞波, 申开文, 王强, 等. 丁苯酞通过下调NF- κ B信号通路抑制细胞焦亡减轻大鼠肾缺血-再灌注损伤[J]. 器官移植, 2023, 14: 539-545.
- [22] Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system[J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14: 265-277.
- [23] MacAulay N. Molecular mechanisms of brain water transport[J]. Nat Rev Neurosci, 2021, 22: 326-344.
- [24] Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological roles of aquaporin-4 in brain [J]. Physiol Rev, 2013, 93: 1543-1562.
- [25] Shenaq M, Kassem H, Peng C, et al. Neuronal damage and functional deficits are ameliorated by inhibition of aquaporin and HIF1 α after traumatic brain injury (TBI)[J]. J Neurol Sci, 2012, 323: 134-140.
- [26] Lu H, Zhan Y, Ai L, et al. AQP4-siRNA alleviates traumatic brain edema by altering post-traumatic AQP4 polarity reversal in TBI rats[J]. J Clin Neurosci, 2020, 81: 113-119.
- [27] Xiong A, Li J, Xiong R, et al. Inhibition of HIF-1 α -AQP4 axis ameliorates brain edema and neurological functional deficits in a rat controlled cortical injury (CCI) model [J]. Sci Rep, 2022, 12: 2701.
- [28] Yan X, Liu J, Wang X, et al. Pretreatment with AQP4 and NKCC1 Inhibitors Concurrently Attenuated Spinal Cord Edema and Tissue Damage after Spinal Cord Injury in Rats[J]. Front Physiol, 2018, 9: 6.
- [29] Zhang LM, Xin Y, Wu ZY, et al. STING mediates neuroinflammatory response by activating NLRP3-related pyroptosis in severe traumatic brain injury[J]. J Neurochem, 2022, 162: 444-462.
- [30] Zhang A, Lu Y, Yuan L, et al. miR-29a-5p Alleviates Traumatic Brain Injury- (TBI-) Induced Permeability Disruption via Regulating NLRP3 Pathway[J]. Dis Markers, 2021, 2021: 9556513.
- [31] Chi W, Chen H, Li F, et al. HMGB1 promotes the activation of NLRP3 and caspase-8 inflammasomes via NF- κ B pathway in acute glaucoma[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 137.

(本文编辑:王晶)