实验研究

基于不同时间窗的延迟亚低温对颅脑创伤大鼠Bcl-2、Bax和Caspase-3表达的影响

赵万勇，李晓红，王景景，徐超，王丽娜，陈江龙，张赛，孙洪涛△

摘要：目的 探讨不同时间窗的延迟亚低温（MHT）治疗对颅脑创伤（TBI）大鼠脑组织Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白表达的影响。**方法** 36只清洁级成年雄性SD大鼠随机均分为常温治疗（NT）组、MHT 15 min组、MHT 2 h组及MHT 4 h组。采用电子可控性皮质损伤装置制备大鼠TBI模型，造模完成后NT组给予常温（37 ℃）维持6 h，3个亚低温组分别于TBI后15 min、2 h、4 h给予低温（33.0±1.0）℃维持6 h。3 d后对各组大鼠进行改良神经功能缺损评分（mNSS），HE染色观察海马CA1区组织病理学变化，免疫组化染色和Western blot检测Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白表达情况。**结果** 各组大鼠表现为不同程度的神经行为缺陷，与NT组相比，3个亚低温组mNSS评分均降低（$P<0.01$）。HE染色结果显示3个亚低温组神经细胞结构较规则、排列相对整齐，神经元坏死数量减少，核碎裂、溶解现象减轻。与NT组相比，3个亚低温组均能上调Bcl-2表达，下调Bax和Caspase-3表达（$P<0.05$）。以上实验结果均显示MHT 15 min组疗效优于MHT 2 h组，而MHT 2 h组和MHT4 h组疗效相当。**结论** 恰当地延迟亚低温治疗在一定程度上能够抑制神经细胞凋亡，缓解脑损伤进展。

关键词：颅脑损伤；原癌基因蛋白质c-bcl-2；bcl-2相关X蛋白质；半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3；亚低温；时间窗

中图分类号：R651.15　　**文献标志码：**A　　**DOI:**10.11958/20170055

Effects of delayed mild hypothermia based on different time windows on the expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3 after traumatic brain injury in rats

ZHAO Wan-yong, LI Xiao-hong, WANG Jing-jing, XU Chao, WANG Li-na, CHEN Jiang-long, ZHANG Sai, SUN Hong-tao△

The Affiliated Hospital of Logistics College of PAP, Institute of Traumatic Brain Injury and Neurology, Tianjin Key Laboratory of Neurotrauma Repair, Tianjin 300162, China

△*Corresponding Author　E-mail: chenmo333@163.com*

Abstract: Objective To explore the effects of delayed mild hypothermia (MHT) in different time windows on the expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in brain tissue of model rats with traumatic brain injury (TBI). **Methods** Thirty-six clean adult male SD rats were randomly divided into NT group (normal temperature), MHT 15 min group, MHT 2 h group and MHT 4 h group. TBI rat model was established by electronical controlled cortical injury device. The rats in the NT group were treated with normothermia (37 ℃) and the rats in the three hypothermia groups were implemented with low temperature (33.0±1.0) ℃ at 15 min, 2 h and 4 h for 6 h respectively after establishment of TBI model. The modified neurological senerity scores (mNSS), morphological changes in hippocampal CA1 areas, immunohistochemical staining and Western blot assay for Bcl-2, Bax and Caspase-3 were compared 3 days after TBI between the four groups. **Results** The neurological behavioral deficits were found in each group. Compared with the NT group, the mNSS were decreased in the three hypothermia groups ($P<0.01$). The results of HE staining showed that the structure of neurons was regular and arranged neatly, and the number of neurons decreased with alleviated nuclear fragmentation and dissolution in hypothermia groups. Compared with the NT group, the expression of Bcl-2 was upregulated, and the expressions of Bax and Caspase-3 were downregulated in three hypothermia groups ($P<0.05$). The above experimental results were superior in MHT15 min group to MHT 2 h group, and the therapeutic effect in MHT 2 h group was similar to MHT 4 h group. **Conclusion** The proper delayed mild hypothermia

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81471275，81401067，81671222）；天津市应用基础与前沿技术研究计划（15JCQNJC11100）；天津市自然科学基金项目（16JCYBJC27600）

作者单位：武警后勤学院附属医院，脑创伤与神经疾病研究所，天津市神经创伤修复重点实验室（邮编 300162）

作者简介：赵万勇（1989），男，硕士研究生，主要从事颅脑创伤相关研究

△通讯作者　E-mail: chenmo333@163.com

treatment could inhibit neuronal apoptosis and alleviate brain damage.

Key words: craniocerebral trauma; proto-oncogene proteins c-bcl-2; bcl-2-associated X protein; caspase 3; low temperature; time window

目前颅脑创伤(traumatic brain injury,TBI)死亡率和长期致残率逐年增高[1-2],已成为世界范围内亟待解决的公共卫生问题。由 Bcl-2 蛋白家族(Bcl-2、Bcl-XL、Bax、Caspase-3 等)介导的内源性线粒体凋亡通路参与了 TBI 的继发性损伤[3]。研究表明亚低温(mild hypothermia, MHT)治疗可以通过降低脑组织耗氧量、保护血脑屏障、减轻脑水肿、抑制细胞凋亡等[4-5]作用机制改善 TBI 大鼠的组织病理学和行为结果,提高其认知和学习能力,从而起到脑保护作用。部分临床研究表明,及早的亚低温干预有可能获得更好的疗效,尤其是在局灶性脑损伤需要清除血肿或者发生缺血/再灌注损伤之前[6];而诸多 TBI 患者受个体化影响未能接受即刻的亚低温治疗,临床疗效也参差不齐。以往的动物实验绝大部分是在 TBI 后立即实施亚低温治疗[7-9],且治疗结果显示出高度一致的肯定疗效。亚低温在临床和基础研究中的疗效并不一致[10],原因之一在于实施亚低温的初始治疗时间不同。因此,在实验研究中应适当延迟亚低温的初始治疗点,进一步贴近临床治疗的实际时机。然而,TBI 后延迟实施亚低温同其治疗效果的关系尚不明确,本实验拟通过选取不同的延迟时间点实施亚低温治疗,观察其对 TBI 大鼠 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达的影响,探讨延迟亚低温的脑保护作用,为临床亚低温治疗 TBI 提供更可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 T1 亚低温治疗仪(珠海黑马,中国);电子可控性皮质损伤装置(eCCI,Custom Design & Fabrication,美国);冰冻切片机(LEICA,德国);倒置荧光显微镜(LEICA CTR4000,德国);苏木素-伊红染液、水合氯醛、多聚甲醛(天津索罗门生物科技有限公司);Bcl-2 抗体、Bax 抗体、Caspase-3 抗体(Proteintech 公司);山羊抗兔 IgG 二抗(Abcam,美国);免疫组化检测试剂盒(上海基因科技有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 36 只清洁级成年雄性 SD 大鼠购自军事医学科学院实验动物中心(许可证号:SCXK-2012-0004),体质量(220±10)g,所有动物均在湿度 55%~60%,室温 20~24 ℃,光照时间 7:00—19:00 的环境中饲养,食物和水充分供给,自由摄取。大鼠在动物房适应性饲养 7 d 后用于实验。采用随机数字表法将大鼠分为常温治疗组(NT 组)、TBI 后 15 min MHT 治疗组(MHT 15 min 组)、TBI 后 2 h MHT 治疗组(MHT 2 h 组)、TBI 后 4 h MHT 治疗组(MHT 4 h 组),每组 9 只。

1.2.2 TBI 模型的制备 所有大鼠术前 12 h 禁食,按 0.7 mL/100 g 经腹腔注射 5%水合氯醛进行麻醉,然后将其俯卧位固定于立体定向头架上,头部备皮消毒完毕后于中线切开头皮,剥离骨膜,暴露右侧顶骨。以冠状缝后 1.5~2.0 mm,中线旁开 1.2 mm 为中心,颅钻磨开直径 5 mm 骨窗,暴露硬脑膜并保持其完整。各组分别通过 eCCI 给予打击损伤,参数设置为深度 1.6 mm,撞击速度 4.5 m/s,停留时间 120 ms。NT 组给予常温(37 ℃)维持 6 h;3 个亚低温组分别于 TBI 后 15 min、2 h、4 h 给予亚低温维持 6 h,使用体温监测仪连续监测大鼠肛温并使其温度保持在(33.0±1.0)℃,所有处理组均未给予其他治疗措施。

1.2.3 大鼠改良神经功能缺损评分(mNSS) 参照文献[11]建立 mNSS 评分量表,TBI 后 3 d 采用双盲法对各组大鼠进行感觉、运动、提尾、平衡木和反射评分。根据评分量表,缺少一项反射或者动物不能完成一项任务给 1 分。

1.2.4 HE 染色观察组织病理情况 各组大鼠于术后 3 d 断头取脑,4%多聚甲醛固定过夜,分别使用 20%、30%蔗糖进行脱水,4 ℃放置至组织块沉底,然后用 OCT 胶包埋脑组织置于制冷台的样品支撑器上。待 OCT 胶及组织变硬后进行切片,切片厚度 14 μm,最后将组织切片黏附于防脱载玻片。切片稍水洗后苏木素染液染色 5 min,水洗后盐酸乙醇分化液分化 20 s,稍水洗后 1%氨水溶液返蓝 20 s,伊红染液染色 2 min,水洗后 75%、85%、95%乙醇以及无水乙醇逐级脱水,二甲苯透明,中性树胶固定。

1.2.5 免疫组织化学染色检测 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达 选取脑组织切片置于 3%H_2O_2溶液浸泡 10 min,PBS 洗 5 min×3 次,而后 0.5%TritonX 浸泡 20 min,PBS 洗 5 min×3 次;滴加 5%BSA 100 μL/片封闭,37 ℃孵育 15 min,用滤纸吸去血清,不洗,直接滴加一抗 Bcl-2(1∶50)、Bax(1∶50)、Caspase-3(1∶50),放入湿盒后置于 4 ℃冰箱过夜;隔日将切片复苏 1 h,回收一抗,PBS 洗 5 min×3 次;滴加二抗,37 ℃温箱避光 30 min,PBS 洗 5 min×3 次;滴加 DAB 工作液显色,出现深棕色后,自来水充分冲洗终止显色反应;各浓度乙醇梯度脱水:75%乙醇 2 min,85%乙醇 2 min,95%乙醇 2 min,无水乙醇 5 min×2 次;中性树胶封片置于镜下观察。取损伤侧皮质作为观察区域,在 400 倍视野下随机读取 3 个视野,分别计数棕色颗粒阳性细胞数,最后算出 3 个视野的平均阳性细胞数。

1.2.6 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达 5%水合氯醛麻醉大鼠,4%多聚甲醛心脏灌注后取脑,在冰浴中快速将损伤侧脑组织加入细胞裂解液中,组织经匀浆破碎后,用 BCA 法进行蛋白定量,10% SDS-

PAGE，NC 转膜。杂交步骤如下：5%脱脂牛奶封闭 NC 膜 1 h，1×TBST 洗 10 min×3 次，然后室温下与兔抗鼠一抗 Bcl-2（1∶1 000）、Bax（1∶2 000）、Caspase-3（1∶600）、GAPDH（1∶1 000），杂交反应 1 h，TBST 漂洗同前。再将 NC 膜与山羊抗兔 IgG 二抗（1∶2 000）杂交反应 1 h，最后用 TBST 洗 NC 膜 10 min×3 次。NC 膜滴加等量 A、B 液混合显影液，利用 BIO-RAD 凝胶成像系统进行显影。使用 ScnImage 软件进行目的蛋白和内参的灰度值测定，得出目的蛋白相对灰度值。

1.3 统计学方法　使用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理，正态分布的计量资料用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA），组间多重比较采用 LSD-t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1 大鼠神经功能缺损评分结果　NT 组、MHT15 min 组、MHT2 h 组及 MHT4 h 组的 mNSS 评分分别为 9.75±1.83、5.13±1.13、6.38±1.19、7.63±1.60，差异有统计学意义（F=14.49，$P<0.01$），3 个亚低温组均低于 NT 组（$P<0.05$），MHT 15 min 组低于 MHT 2 h 组和 MHT 4 h 组（$P<0.05$），而 MHT 2 h 组和 MHT 4 h 组比较差异无统计学意义。

2.2 HE 染色结果　海马 CA1 区镜下显示，NT 组神经细胞排列明显紊乱，形态破坏严重，神经元坏死明显，可见胞体变形固缩，胞核不清等不同程度损伤。与 NT 组相比，3 个亚低温组神经细胞形态较规则、排列相对整齐，神经元坏死数量减少，核碎裂、溶解现象减轻，见图 1。

2.3 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的免疫组化染色结果　与 NT 组相比，3 个亚低温组 Bcl-2 阳性细胞数量明显增多，而 Bax、Caspase-3 阳性细胞数量明显减少。随着亚低温治疗时间的提前，Bcl-2 阳性细胞数量呈现上升趋势，Bax、Caspase-3 阳性细胞数量呈现下降趋势。MHT 2 h、MHT 4 h 组 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的阳性细胞数量与 MHT 15 min 组差异均有统计学意义（$P<0.05$），而 MHT 2 h 组和 MHT 4 h 组差异无统计学意义，见图 2、表 1。

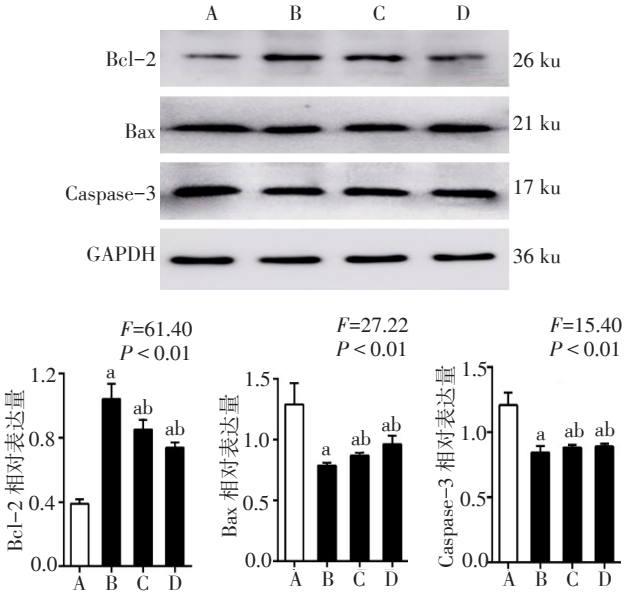
Tab. 1　Comparison of Bcl-2, Bax and Caspase-3 positive cell expressions between four groups

表 1　各组 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 阳性细胞数表达的比较　（n=3，个，$\bar{x}\pm s$）

组别	Bcl-2	Bax	Caspase-3
NT 组	29.00±4.00	86.33±9.07	77.00±8.54
MHT 15 min 组	66.33±10.60[a]	49.00±5.29[a]	41.33±7.64[a]
MHT 2 h 组	47.00±5.57[ab]	67.67±8.50[ab]	60.33±8.08[ab]
MHT 4 h 组	44.67±5.51[ab]	75.00±6.56[ab]	62.00±9.00[ab]
F	14.83**	13.07**	9.24**

**$P<0.01$；[a]与 NT 组比较，[b]与 MHT 15 min 组比较，$P<0.05$

2.4 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的 Western blot 结果　与 NT 组相比，3 个亚低温组 Bcl-2 蛋白表达量明显增高，而 Bax、Caspase-3 蛋白表达量明显降低。随着亚低温治疗时间的提前，Bcl-2 蛋白表达量出现升高，Bax、Caspase-3 蛋白表达量降低。MHT 2 h 组、MHT 4 h 组 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的蛋白表达量与 MHT 15 min 组比较差异均有统计学意义（$P<0.05$），而 MHT 2 h 组和 MHT 4 h 组差异无统计学意义，见图 3。



A：NT 组；B：MHT 15 min 组；C：MHT 2 h 组；D：MHT 4 h 组

[a]与 NT 组比较，[b]与 MHT 15 min 组比较，$P<0.05$

Fig. 3　Comparison of protein expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3 between four groups

图 3　各组 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达情况

3　讨论

TBI 促使一系列的病理生理改变，其引起的兴奋性毒性作用、自由基的生成、蛋白水解及炎症反应等均会促使细胞死亡，进而导致脑组织的继发性损伤[12]。本实验利用 eCCI 制作 TBI 模型，所有大鼠经过打击以后表现基本一致，表明 TBI 模型制作成功且符合实验要求。本研究在大鼠 TBI 后延迟 15 min、2 h、4 h 实施亚低温治疗，结果显示随着亚低温治疗时间的提前，大鼠脑组织海马区损伤表现逐渐减轻。细胞凋亡是 TBI 继发性损伤的表现形式之一。Bcl-2 作为抗细胞凋亡蛋白，可以抵抗 Bax 的促凋亡作用，从而抑制 Caspase-3 的活化，阻碍凋亡的发生[13]。本实验表明亚低温能够上调 Bcl-2 表达，下调 Bax 和 Caspase-3 表达，进而阻碍下游的级联反应，发挥抗凋亡作用。MHT 15 min 组表现出最

明显的抗凋亡作用，MHT2 h 组和 MHT4 h 组也表现出较好的治疗结果。不同的延迟时间情况下亚低温治疗的效果表现出一定的差异性，虽然 TBI 后即刻给予亚低温疗效最好，但 2 h 甚至 4 h 后给予亚低温干预同样表现出值得肯定的治疗结果，恰当的延迟亚低温治疗能更大程度地符合 TBI 的临床治疗时机。鉴于动物（大鼠）和人类存在病理生理的差异，动物实验的起始治疗时间并不完全等同于临床的实际治疗时间窗，但目前文献缺乏确切的时间换算关系，延迟更长起始时间的亚低温治疗有待于进一步研究。

一般认为缺血性脑损伤早期，甚至损伤前实施亚低温治疗效果更佳，出血性脑损伤宜在发病 6 h 后给予亚低温治疗[14]。目前亚低温治疗 TBI 的时间窗问题仍存在争议，有学者建议亚低温治疗最佳时机为伤后越早越好[15-16]。值得注意的是多数患者在 TBI 后因各种因素错过了及时的亚低温治疗，而目前相关研究多是在即刻的单一起始时间点探讨亚低温的疗效，并被积极肯定[17]，但临床治疗与实验研究给予的亚低温起始治疗时间存在极大偏差。因此，动物实验应从不同时间点探讨亚低温的保护效应。本实验在 TBI 后延迟起始时间点给予亚低温治疗的结果较为满意，2 h 和 4 h 可作为相对理想的时间窗模型，可用于后续动物研究，尽量缩小同临床实际运用的差异。

综上所述，即刻的亚低温治疗具有更显著的脑保护作用，但恰当地延迟起始治疗时间的亚低温也能在一定程度上抑制神经细胞凋亡，缓解脑损伤进展。

（图1、2见插页）

参考文献

[1] Stocchetti N. Traumatic brain injury: problems and opportunities [J]. Lancet Neurol, 2014, 13(1): 14-16. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70280-1.

[2] Sun HT, Zheng M, Zheng MH, et al. Monitoring intracranial pressure utilizing a novel pattern of brain multiparameters in the treatment of severe traumatic brain injury [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2016, 12: 1517-1523. doi: 10.2147/NDT.S106915.

[3] Hardwick JM, Chen YB, Jonas EA. Multipolar functions of BCL-2 proteins link energeticsto apoptosis [J]. Trends Cell Biol, 2012, 22(6): 318-328. doi: 10.1016/j.tcb.2012.03.005.

[4] Guo C, Geng Y, Song F, et al. Mild hypothermia protects rat neuronal injury after intracerebral hemorrhage via attenuating endoplasmic reticulum response induced neuron apoptosis [J]. Neurosci Lett, 2016, 635: 17-23. doi: 10.1016/j.neulet.2016.10.031.

[5] Chen C, Ma TZ, Wang LN, et al. Mild hypothermia facilitates the long- term survival of newborn cells in the dentate gyrus after traumatic brain injury by diminishing a pro- apoptotic microenvironment [J]. Neuroscience, 2016, 335: 114- 121. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.08.038.

[6] Yokobori S, Yokota H. Targeted temperature management in traumatic brain injury [J]. J Intensive Care, 2016, 4: 28. doi: 10.1186/s40560-016-0137-4.

[7] Feng JF, Zhang KM, Jiang JY, et al. Effect of therapeutic mild hypothermia on the genomics of the hippocampus after moderate traumatic brain injury in rats [J]. Neurosurgery, 2010, 67(3): 730-742. doi: 10.1227/01.NEU.0000378023.81727.6E.

[8] Jia F, Mao Q, Liang YM, et al. The effect of hypothermia on the expression of TIMP- 3 after traumatic brain injury in rats [J]. J Neurotrauma, 2014, 31(4): 387-394. doi: 10.1089/neu.2008.0814.

[9] Wang G, Zhang JN, Guo JK, et al. Neuroprotective effects of cold-inducible RNA- binding protein during mild hypothermia on traumatic brain injury [J]. Neural Regen Res, 2016, 11(5): 771-778. doi: 10.4103/1673-5374.1827.

[10] Yokobori S, Frantzen J, Bullock R, et al. The use of hypothermia therapy in traumatic ischemic /reperfusional brain injury: review of the literatures [J]. Ther Hypothermia Temp Manag, 2011, 1(4): 185-192.

[11] Wang Z, Yao W, Deng Q, et al. Protective effects of BDNF overexpression bone marrow stromal cell transplantation in rat models of traumatic brain injury [J]. J Mol Neurosci, 2013, 49(2): 409-416. doi: 10.1007/s12031-012-9908-0.

[12] Tian R, Hou Z, Hao S, et al. Hydrogen-rich water attenuates brain damage and inflammation after traumatic brain injury in rats [J]. Brain Res, 2016, 1637: 1-13. doi: 10.1016/j.brainres.2016.01.029.

[13] Lončarević- Vasiljković N, Milanović D, Pešić V, et al. Dietary restriction suppresses apoptotic cell death, promotes Bcl- 2 and Bcl-xl mRNA expression and increases the Bcl-2/Bax protein ratio in the rat cortex after cortical injury [J]. Neurochem Int, 2016, 96: 69-76. doi: 10.1016/j.neuint.2016.02.017.

[14] 张赛. 亚低温对急性神经损伤保护作用的争议与展望[J]. 中华神经外科杂志, 2013, 29(2): 112-115. Zhang S. The controversy and prospect of the protective effect of mild hypothermia on acute nerve injury [J]. Chin J Neurosurg, 2013, 29(2): 112- 115. doi: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2013.02.002.

[15] 江基尧, 朱诚. 亚低温与颅脑创伤临床研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(8): 787- 789. Jiang JY, Zhu C. Clinical research progresson mild hypothermia and traumatic brain injury [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2001, 22(8): 787-789.

[16] 张赛. 正确认识和应用亚低温疗法[J]. 现代神经疾病杂志, 2002, 2(3): 138. Zhang S. Correct understanding and application of hypothermia therapy [J]. Mod J Neurol Neurosurg, 2002, 2(3): 138.

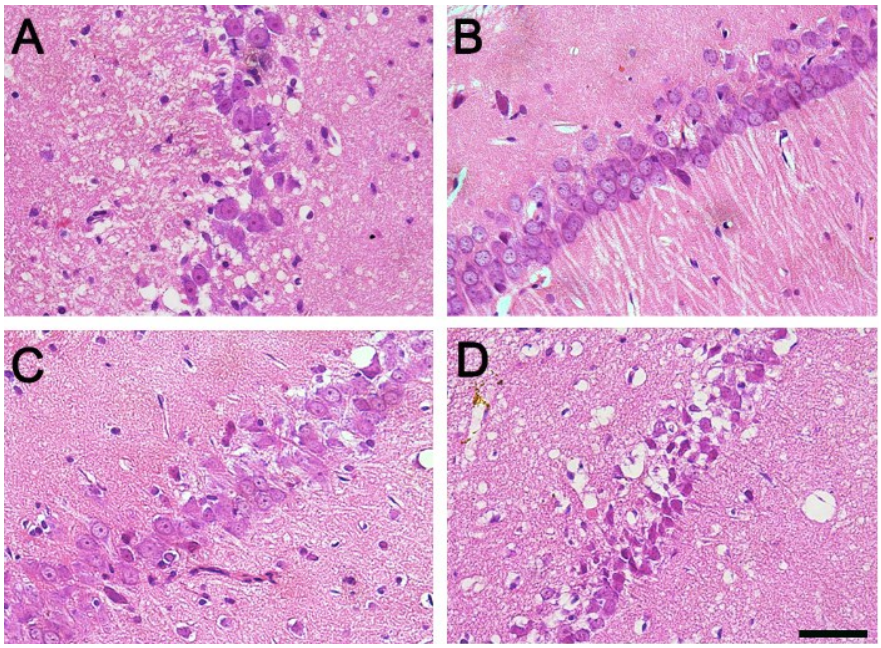
[17] Zhao CC, Wang CF, Li WP, et al. Mild hypothermia promotes pericontusion neuronal sprouting via suppressing suppressor of cytokine signaling 3 expression after moderate traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2017 Jan 13. doi: 10.1089/neu.2016.4759. [Epub ahead of print].

（2017-01-11 收稿　2017-01-24 修回）

（本文编辑　李国琪）

基于不同时间窗的延迟亚低温对颅脑创伤大鼠 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达的影响

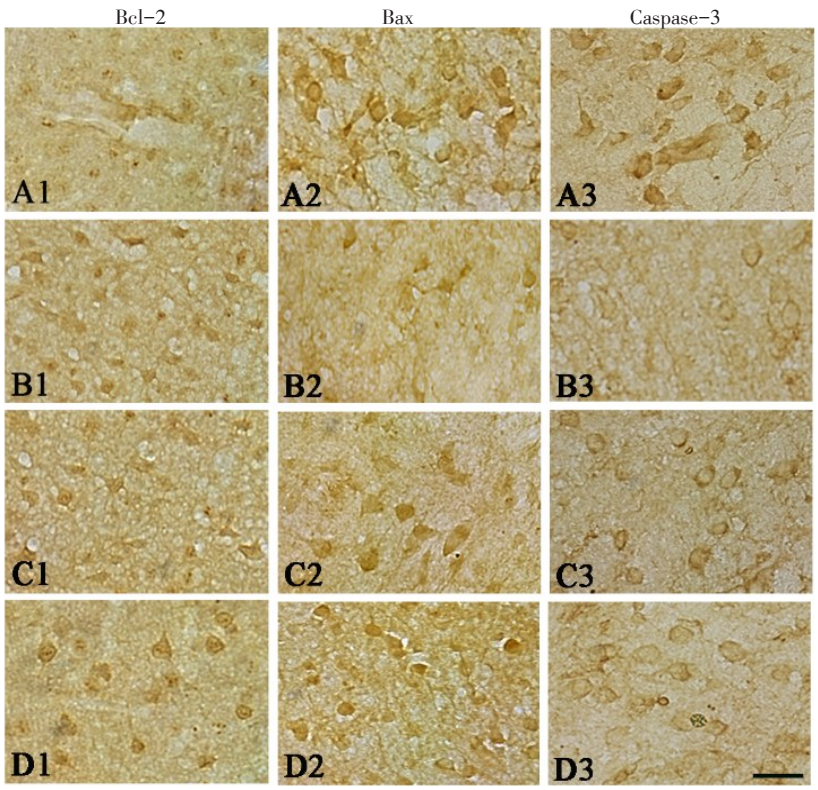
（正文见364页）



A：NT 组；B：MHT 15 min 组；C：MHT 2 h 组；D：MHT 4 h 组

Fig. 1　Pathological changes of brain tissues in four groups (HE staining, ×400)

图 1　各组大鼠脑组织病理切片（HE 染色，×400）



A1 ~ A3：NT 组；B1~B3：MHT 15 min 组；C1 ~ C3：MHT 2 h 组；D1 ~ D3：MHT 4 h 组

Fig. 2　Immunohistochemistry staining of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in injured cortex of four groups（×400）

图 2　各组大鼠损伤皮质 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 免疫组化染色结果（×400）