

促红细胞生成素对创伤性颅脑损伤小鼠炎症反应和 T 细胞平衡的影响

周龙¹, 刘美霞², 邓民强¹, 田仁富¹, 潘轲¹, 易伟³

1. 恩施州中心医院神经外科, 湖北 恩施 445000; 2. 恩施州中心医院神经内科, 湖北 恩施 445000;
3. 武汉大学人民医院神经外科, 湖北 武汉 431900

摘要: **目的** 观察促红细胞生成素(EPO)对创伤性颅脑损伤(TBI)炎症反应及 T 细胞亚群分布的影响。**方法** 将 30 只 BALB/C 小鼠随机分为三组,其中假手术组 10 只,TBI 组 10 只及 TBI + EPO 组 10 只,比较三组小鼠的脑组织含水量、坏死体积、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 及 IL-10 水平及淋巴细胞亚群情况。**结果** 小鼠的脑组织含水量、坏死体积、TNF- α 、IL-1 β 水平随 TBI 组→TBI + EPO 组→Sham 组之序递减($P < 0.05$),IL-10 水平及 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 呈 TBI 组→TBI + EPO 组→Sham 组之序递升($P < 0.05$),差异均有统计学意义。**结论** EPO 能够减轻 TBI 小鼠的脑损伤,抑制炎症反应,改善 T 细胞平衡。

关键词: 促红细胞生成素; 创伤性脑损伤; 炎症因子; 淋巴细胞亚群; 脑组织含水量; 坏死体积

中图分类号: R-33 R 651.1⁺5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2018)04-0508-03

Influences of erythropoietin on inflammatory response and T cell balance of traumatic brain injury in mice

ZHOU Long*, LIU Mei-xia, DENG Min-qiang, TIAN Ren-fu, PAN Ke, YI Wei

*Department of Neurosurgery, The Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China

Corresponding author: YI Wei, E-mail: yiweiccc@163.com

Abstract: Objective To observe the effect of erythropoietin (EPO) on the inflammatory response and the distribution of T cell subsets in traumatic brain injury (TBI) mice. **Methods** Thirty BALB/C mice were randomly divided into sham-surgery group (Sham group), TBI model group (TBI group) and TBI model plus EPO group (TBI + EPO group) ($n = 10$, each). The water content in brain tissue, necrotic volume, levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-10 and lymphocyte subsets were compared among three groups. **Results** The water content in brain tissues, necrotic volume, levels of TNF- α , IL-1 β significantly decreased in the order of TBI group, TBI + EPO group and Sham group ($P < 0.05$), meanwhile, levels of IL-10, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ significantly increased in the order of TBI group, TBI + EPO group and Sham group ($P < 0.05$). **Conclusion** EPO can reduce brain damage, inhibit inflammatory response and improve the balance of T cells in TBI mice.

Key words: Erythropoietin; Traumatic brain injury; Inflammatory factor; T cell subsets; Brain tissue water content; Necrotic volume

目前,创伤性颅脑损伤(tramaumatic brain injury, TBI)的发生率呈逐年升高趋势。尽管随着急救体系及医疗技术的发展,外伤患者抢救的成功率逐渐增高,但多种因素的作用能够加重继发性的脑损伤^[1-2]。其中颅脑创伤后以炎症因子分泌及淋巴细胞比例失调为特点的局部炎症反应是继发性脑损伤病理生理过程中的重要机制^[3]。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是肾脏和肝脏分泌的激素样物

质,具有促进红细胞生成的作用,有研究发现 EPO 能够通过调节淋巴细胞比例改善脑脊髓膜炎小鼠的神经功能损伤^[4-5]。本研究旨在观察 EPO 对 TBI 小鼠局部炎症反应及机体 T 淋巴细胞平衡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 清洁健康 BALB/C 雄性小鼠 30 只,10~12 周龄,由武汉大学动物实验中心提供,

批号 SCXK(沪)2003-0003。小鼠饲养条件:室温 20~25℃,空气流通,12 h 光照,昼夜循环,期间自由饮水进食。所有小鼠均进行 7 d 的适应性培养后按照随机数字表法分为三组:假手术组(Sham 组)、TBI 组及 TBI + EPO 组,每组 10 只。

1.2 主要药品、试剂及仪器 (1)药品:重组人促红细胞生成素注射液(商品名:机买新,华北制药金坦生物技术,国药准字 S20000026);4% 水合氯醛(青岛宇龙海藻,国药准字 H37022673)。(2)试剂:TTC 溶液(上海君瑞生物技术);肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 及 IL-10 抗体(Thermo 公司,美国);淋巴细胞分离液(MP Biomedicals 公司,美国);CD3、CD4 及 CD8 抗体(Biolegend 公司,美国)。(3)仪器:超净无菌工作台(Spetec 公司,德国);倒置荧光显微镜(Olympus 公司,日本);流式细胞仪(Thermo 公司,美国);Multiskan FC 酶标仪(Thermo 公司,美国);Pin Point™ 精密颅脑损伤撞击器(Hatteras Instruments,美国)。

1.3 模型构建与药物处理 所有小鼠均采用 4% 的水合氯醛以 400 mg/kg 腹腔注射,无菌条件下行头皮正中切口,分离骨膜并暴露颅骨,在右侧人字缝及右侧前囟中间开一骨窗,直径 5 mm,注意不要破坏硬膜的完整性。将 TBI 组及 TBI + EPO 组小鼠固定于定位仪上,将撞击锤安置于骨窗,设置撞击深度 1 mm,速度 2 m/s,接触时间 85 s,术后修补骨窗,缝合伤口。Sham 组仅在打开骨窗后修补缝合,不进行撞击。TBI + EPO 组小鼠在伤口缝合后即开始腹腔注射 EPO 溶液(1 000 U/ml),剂量 5 000 U/kg,其余两组小鼠注射等量生理盐水,持续到处死前 1 d。

1.4 观察指标 (1)神经损伤评分:所有小鼠均于造模前(0 d)及造模 7 d 后评价神经功能缺损程度,参照 Tsenter 等应用的评价标准,正常为 0 分,每得 1 分表示无法执行指令或对指令无反应,最高得分 21 分。(2)脑组织含水量及坏死体积测定:于 7 d 处死小鼠,迅速剥离脑组织,称量患侧脑组织湿重后放入恒温干燥箱烘干,称量干重。含水量 = (脑组织湿重 - 脑组织干重) / 脑组织湿重 \times 100%。取大鼠脑组织切片进行 HE 染色,修整图片后使用 Image J 软件自动估算坏死体积(V)。(3)炎症因子检测:于 7 d 取大鼠脑组织保存于 -80℃ 冰箱中,分别取患侧及非患侧脑组织置于分离管中,加入 PBS,用超声粉碎机对脑组织进行粉碎,上述操作均在冰上进行。将组织匀浆置于 4℃ 离心机中,1 500 r/min 离心 20 min,收集上清液。TNF- α 、IL-1 β 及 IL-10 检测采用酶联免疫吸附法,操作严格按照说明书进行。(4)淋巴细胞亚

群检测:于 7 d 取小鼠脾脏,研磨碎后加入 3 ml 无血清 GIBCO 培养基,吸出液体加入 2 ml 淋巴细胞分离液,2 000 r/min 离心 25 min,吸取含有淋巴细胞的白雾状层置于 Hank 液中,洗涤 2 次,弃上清液,加入培养基制备单细胞悬液 1×10^6 个/ml。在 100 μ l 单细胞悬液中加入抗体,孵育 30 min 后加入 1 ml 破红细胞低渗液,静置 5 min 后 PBS 洗涤两次,流式细胞仪检测 CD4⁺(%)、CD8⁺(%) 及 CD4⁺/CD8⁺。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件对所得数据进行处理和分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验;计数资料采用 χ^2 检验。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠神经功能损伤评分 各组小鼠 0 d 的神经功能损伤评分均为 0 分。7 d 后神经功能损伤评分 Sham 组 0 分、TBI 组(11.7 \pm 1.5)分、TBI + EPO 组(4.5 \pm 0.8)分,差异有统计学意义($F = 8.931, P < 0.05$);TBI + EPO 组、TBI 组均高于 Sham 组,但 TBI + EPO 组低于 TBI 组(P 均 < 0.05)。

2.2 各组小鼠脑组织含水量及坏死体积比较 各组小鼠脑组织含水量及坏死体积的差异具有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 1。

2.3 各组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-10 的水平 各组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-10 水平的差异具有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 2。

表 1 各组小鼠脑组织含水量及坏死体积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	含水量(%)	坏死体积(mm ³)
Sham 组	10	65.5 \pm 9.5	0.2 \pm 0.1
TBI 组	10	81.4 \pm 11.2 ^a	3.5 \pm 0.6 ^a
TBI + EPO 组	10	74.2 \pm 7.6 ^{ab}	2.2 \pm 0.4 ^{ab}
<i>F</i> 值		4.931	7.885
<i>P</i> 值		< 0.05	< 0.05

注:与 Sham 组相比,^a $P < 0.05$;与 TBI 组相比,^b $P < 0.05$ 。

表 2 各组小鼠炎症因子水平比较 ($n = 10, \text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-10
Sham 组	78.65 \pm 14.83	31.43 \pm 4.67	14.31 \pm 2.85
TBI 组	295.73 \pm 41.53 ^a	65.93 \pm 10.72 ^a	7.65 \pm 1.82 ^a
TBI + EPO 组	129.65 \pm 22.64 ^{ab}	43.21 \pm 7.63 ^{ab}	11.63 \pm 1.77 ^{ab}
<i>F</i> 值	8.831	6.674	4.068
<i>P</i> 值	< 0.05	< 0.05	< 0.05

注:与 Sham 组相比,^a $P < 0.05$;与 TBI 组相比,^b $P < 0.05$ 。

表 3 各组小鼠 T 细胞亚群比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
Sham 组	44.02 \pm 1.09	23.03 \pm 1.94	1.94 \pm 0.23
TBI 组	21.93 \pm 1.73 ^a	22.93 \pm 1.64	0.95 \pm 0.15 ^a
TBI + EPO 组	35.21 \pm 1.96 ^{ab}	22.89 \pm 1.75	1.42 \pm 0.17 ^{ab}
<i>F</i> 值	8.435	1.094	3.951
<i>P</i> 值	< 0.05	> 0.05	< 0.05

注:与 Sham 组相比,^a $P < 0.05$;与 TBI 组相比,^b $P < 0.05$ 。

2.4 各组小鼠 T 细胞亚群比较 各组小鼠的 $CD4^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 比较差异具有统计学意义 (P 均 < 0.05), $CD8^+$ 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

3 讨论

炎症反应是加重 TBI 患者损伤的重要机制之一, 参与患者继发性损伤的全部过程, 但目前临床上缺乏有效抑制 TBI 患者炎症反应的药物^[6]。宁显忠等^[7]研究发现, EPO 通过抑制大鼠脑部缺血-再灌注损伤后的炎症反应发挥神经保护作用。EPO 既往主要用于贫血的治疗, 研究发现心肌、平滑肌、神经元等非造血细胞上有 EPO 受体的表达^[8]。近些年研究提示外源性 EPO 可以通过血脑屏障, 故其神经保护作用受到广泛的关注^[9]。本研究旨在观察 EPO 对 TBI 小鼠局部炎症反应及机体 T 淋巴细胞平衡的影响。

TNF- α 及 IL-1 β 是促进炎症反应的细胞因子, 其中 TNF- α 是由单核-巨噬细胞产生, 可诱导其他细胞因子和炎症介质的产生, 促进炎症反应级联放大, 造成脑组织局部炎症损伤; 同时, TNF- α 能够直接参与细胞凋亡过程^[10-11]。IL-1 β 可由多种细胞释放, 参与机体的炎症反应, 并在组织损伤及水肿中发挥重要作用^[12]。IL-10 能够抑制单核巨噬细胞的炎症因子释放及抗原呈递作用, 从而拮抗 TNF- α 及 IL-1 β 的作用^[13]。本研究中, EPO + TBI 组小鼠的 TNF- α 及 IL-1 β 水平与 TBI 组比较显著降低, IL-10 显著升高, 说明 EPO 能够抑制小鼠脑组织的炎症反应。

既往研究发现, T 细胞在 TBI 患者继发性脑损害中发挥重要作用。尽管 T 细胞募集至受累脑区的机制尚未明确, 但是 $CD8^+$ 细胞能够通过细胞毒性颗粒的释放加重脑损伤, 而 $CD4^+$ 细胞能够释放多种抑制炎症反应的细胞因子 (如 IL-10) 发挥免疫调节作用。目前, $CD4^+$ 细胞在多种脑血管疾病 (如脑卒中) 中的神经保护作用得到验证, 部分研究证实 $CD4^+$ 还具有促进学习及记忆等功能^[14-15]。本研究中, EPO 能够有效促进 $CD4^+$ 细胞的增殖及活化, 抑制 $CD4^+/CD8^+$ 细胞比例失调, 与陈通恒^[16]的研究一致。

本研究对各组小鼠脑组织及神经功能损伤进行评价: 与 Sham 组相比, 造模小鼠脑组织含水量显著升高, 神经功能损伤评分升高, 小鼠出现脑水肿; EPO 的应用能够有效改善脑水肿、减轻脑组织损伤。既往研究发现, EPO 的神经保护作用与多种机制相关, 除抑制炎症反应及维持 T 细胞平衡, 其能够发挥抗氧化、抗凋亡、促生成及营养神经等多种作用, 促进神经功能恢复, 故其在 TBI 的治疗中具有一定的应用

价值^[17-18]。

综上所述, EPO 能够通过抑制炎症反应及改善 T 细胞平衡, 减轻 TBI 小鼠脑组织损伤。

参考文献

- [1] 陶晓刚, 刘佰运, 陈学涛, 等. PJ34 在创伤性颅脑损伤中保护作用的实验研究[J]. 中华神经外科杂志, 2015, 31(1): 66-70.
- [2] 廖远生, 吴成翰. 核因子- κ B 在脑出血后继发性脑损伤中作用的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(11): 1246-1248.
- [3] 李建香, 过伟峰, 赵杨, 等. 脑出血炎症反应研究进展[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(10): 904-907.
- [4] 肖以磊, 李忠民, 朱建新, 等. rHu-EPO 治疗重型颅脑损伤患者 54 例疗效观察[J]. 中华神经医学杂志, 2015, 14(1): 72-76.
- [5] 李许, 白镇亚, 张飞燕, 等. 促 EPO 生成抗脑缺血中药的研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2265-2271.
- [6] 陈祥荣, 谢宝缘, 邹树凯, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸抑制大鼠创伤性脑损伤后小胶质细胞介导的炎症反应[J]. 中华临床营养杂志, 2016, 24(6): 369-375.
- [7] 宁显忠, 赵德福. EPO 对大鼠脑缺血-再灌注后炎症损伤的保护作用[J]. 重庆医学, 2012, 41(19): 1959-1961.
- [8] 蔺建文, 李淑敏, 王苏平, 等. 首发缺血性脑卒中患者血清 Hcy 和 EPO 水平的变化及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(6): 1104-1106, 1110.
- [9] 张晶, 黄蕊, 郝玲, 等. 促红细胞生成素对缺氧缺血性脑损伤大鼠的脑保护作用及机制[J]. 山东医药, 2015, 55(17): 13-16.
- [10] 樊友道, 尹海斌, 张旺明, 等. TNF- α 、IL-6、NO 在创伤性颅脑损伤病情评估中的作用[J]. 中国现代医药杂志, 2016, 18(3): 37.
- [11] 王宏法, 胡双飞, 周乐平, 等. 百会穴注射腺苷 A1 受体激动剂对创伤性颅脑损伤大鼠脑含水量及炎症介质的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23(3): 261-264.
- [12] 陈澜, 石京山, 龚其海, 等. 淫羊藿苷对大鼠创伤性脑损伤后白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的作用[J]. 中国新药与临床杂志, 2017, 36(4): 210-214.
- [13] 陈华, 梁明华, 袁荣军, 等. 急性颅脑损伤患者血清 hs-CRP、TNF- α 、IL-10 水平变化及意义[J]. 现代诊断与治疗, 2016, 27(13): 2503-2504.
- [14] 苗雨露, 张明霞. 重型颅脑损伤 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 蚌埠医学院学报, 2015, 40(5): 624-626.
- [15] 王献明, 赵军苍, 张莹莹. 标准大骨瓣减压术治疗重型颅脑损伤对患者围术期炎症因子、免疫球蛋白、T 淋巴细胞亚群和脑代谢的影响[J]. 河北医药, 2017, 39(11): 1715-1717, 1720.
- [16] 陈通恒. RhEPO 增加脑创伤小鼠调节性 T 细胞水平减轻 TBI 后神经功能障碍的研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2013.
- [17] 肖以磊, 赵阳, 侯磊, 等. rHu-EPO 对重型颅脑损伤患者的神经保护作用及其机制[J]. 山东医药, 2015, 55(25): 37-39.
- [18] 吉春玲, 周厚荣, 杨秀林, 等. 促红细胞生成素对窒息大鼠心肺复苏后脑组织保护作用的研究[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(12): 984-988.