分类号: 单位代码: 10114

密级: 学 号: Dr2009029

**创伤性脑损伤神经源性机制及其干预实验研究**

**Study on the** neurogenic mechanisms of traumatic **brain injury and intervention experiment**

本课题为国家自然基金资助课题（项目批准号 30600637）

研 究 生 **段虎斌**

指 导 教 师 **范益民**

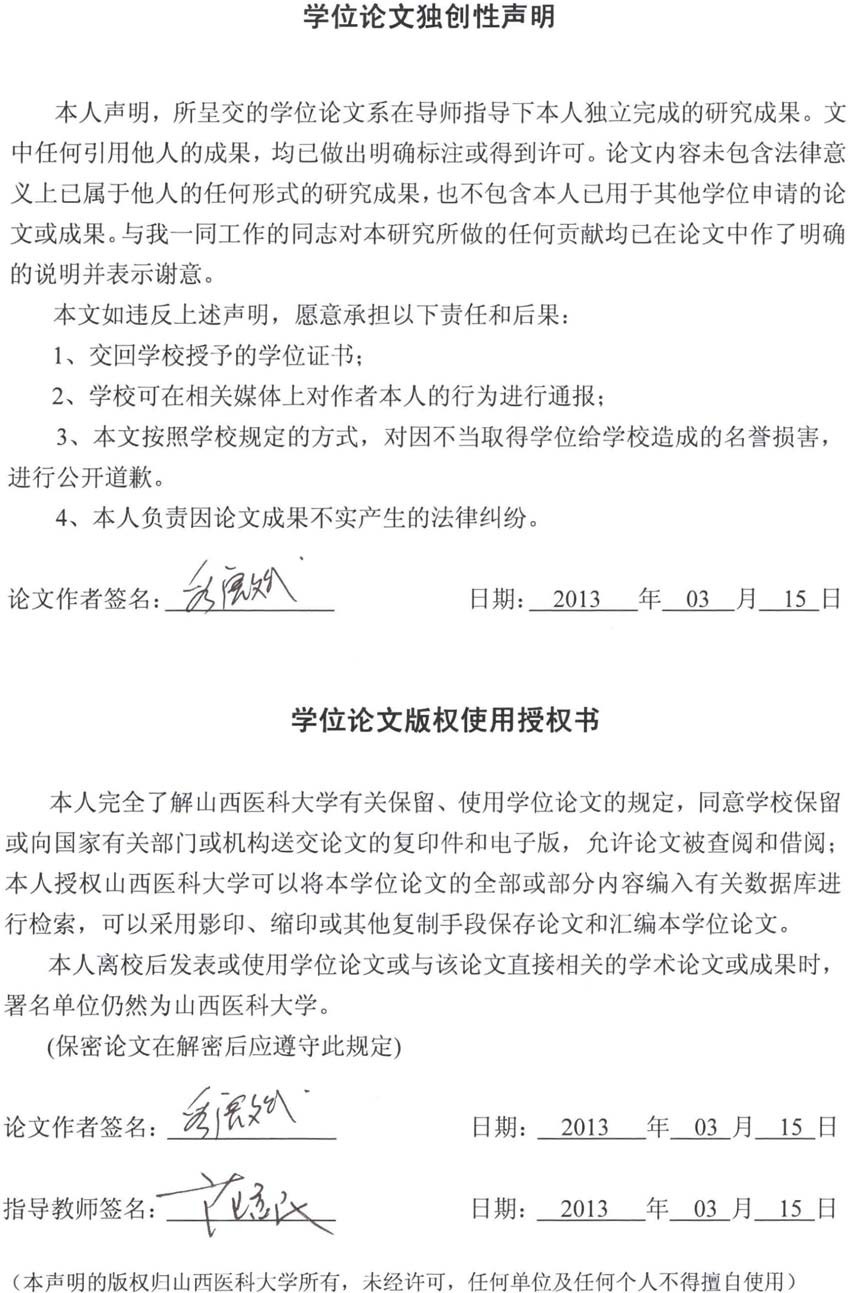
申请学位门类级别 **医学博士**

专 业 名 称 **神经外科学**

研 究 方 向 **颅脑创伤、神经损伤与修复**

所 在 学 院 **ft西医科大学第一临床医学院**

2013 年 3 月 15 日



**目录**

**中文摘要：**……………………………………………………………………………Ⅰ 英文摘要……………………………………………………………………………Ⅴ 中英文缩略词表……………………………………………………………………Ⅺ 正文

[前言… 1](#_TOC_250006)

第一部分 创伤性脑损伤神经源性机制实验研究

[材料与方法… 6](#_TOC_250005)

[结果… 27](#_TOC_250004)

[讨论… 58](#_TOC_250003)

[参考文献… 63](#_TOC_250002)

附图… 72

第二部分 创伤性脑损伤神经源性机制干预实验研究

第一章 L-703, 606 对大鼠创伤性脑损伤保护作用机制的实验研究

材料与方法… 88

结果… 88

讨论… 90

[参考文献… 91](#_TOC_250001)

附图… 93

第二章 **Rho 激酶抑制剂对创伤性脑损伤后脑细胞内亚二倍体比率的影响及其意义**

材料与方法… 99

结果… 100

讨论… 101

参考文献… 102

问题与展望… 103

综述 创伤性脑损伤发病机理研究进展… 104

博士课题期间主持、参加和获奖科研项目及发表论文情况… 115

[致谢… 118](#_TOC_250000)

**中文摘要**

创伤性脑损伤的神经源性机制及其干预试验研究

**研究背景**

创伤性脑损伤（TBI）是致死致残率很高的一种常见病。除原发性脑损伤外，继发性脑损伤对TBI的预后也起着重要影响。目前有关TBI的发生发展机理至今尚未完全明确，国内外有多种学说，如：血脑屏障学说，钙通道学说，自由基学说，脑微循环学说，能量代谢学说等。但上述学说没有一种能完全解释清TBI发病机理，这是因为创伤性脑水肿的发生机理是十分复杂的。上述的各种机制并非孤立存在、单独起作用，而是相互影响、多种机制共同起作用的结果。近年来，神经源性炎症在TBI中的作用机制逐渐引起人们的重视，越来越多的研究发现，神经肽Y（NPY）、降钙素相关基因肽（CGRP）、P物质（SP）、水通道蛋白-4（AQP4）和核转录因子-κB（NF-κB）等在TBI后神经源性炎症中扮演重要角色。本课题提出“创伤性脑损伤的神经源性机制”假说，正是基于神经源性炎症。假说主要内容：TBI后，脑组织内许多神经化学和细胞介质发生改变，并且组织内发生类似神经源性炎症反应或者/和疼痛作为应激性刺激通过复杂的神经源性机制诱发的脑组织内神经递质分泌异常，导致或者加剧脑组织内生物学活性物质产生与代谢失衡，引起脑细胞的损伤，从而加剧损伤区脑组织的损伤，并且引起损伤区周围脑组织的损伤反应，引发创伤性脑水肿，造成继发性颅脑损害，即①神经源性炎症或损伤刺激直接或经传导作用于脑细胞→胞体分泌神经肽增加→神经突触间神经递质释放增多→离子通道活动增加→动作电位活动增加，并由突触部位扩散到胞体→胞体钠、钙通道活动增加→导致水钠储留，钙超载→**细胞性脑水肿**。

②神经源性炎症产生的生物学活性物质（如SP）作用于脑血管及水通道-4（AQP4）

→AQP4活动增强（在朝向血管面及软脑膜面的胶质细胞膜区有选择性的高表达），脑血管通透性增加，胶质细胞水肿→血脑屏障（BBB）通透性增加，血管内容渗出增多，间隙性水肿→**血管源性脑水肿**。①②共同导致创伤性脑水肿，引起颅内高压，此时如不采取措施（脱水、激素、手术）阻止其发展，那将会有更多的脑细胞死亡，炎症加剧，水肿加重，形成恶性循环，直至脑疝死亡。如果上述假设成立，通过干预或阻断上述环节均可能减轻组织损伤，这为我们寻找开发新药治疗创伤性脑损伤提供了新的思路。

**研究目的：** 1、探讨创伤性脑损伤的神经源性机制，即颅脑创伤导致创伤性脑水肿引起脑组织损伤性改变的具体机制。（第一部分实验要解决的问题）

## 2 、探讨使用各种受体拮抗剂，能否减轻和抑制上述损伤性改变。（第二部分实验要解决的问题）

**研究方法：**

1.第一部分实验，采用Wistar雄性大鼠40只，体重280±10g，随机分为4组：对照组（C组），轻度创伤组（M1组），中度创伤(M2组)，重度创伤组（S组），以上4组每组10只。用Feeney按自由落体致伤原理制作TBI大鼠模型，伤后记录丘脑腹后内侧核（VPM）痛敏神经元（PSN）放电频率，1h后断头取血，开颅取脑。通过肉眼大体观测各组大鼠脑皮层损伤处及其周边脑组织损伤程度；光镜苏木精—伊红染色法(HE) 从组织细胞水平观测大鼠脑组织损伤程度；透射电镜超微结构水平观测大鼠脑皮层损伤处及其周边脑组织损伤程度；免疫组化检测大鼠脑皮层损伤处及其周边脑细胞中SP、NPY、CGRP、NF-κB、AQP4阳性表达情况；Western blot检测大脑皮质损伤区AQP4蛋白表达情况；RT-PCR检测SP、NPY、CGRP、NF-κB、NSE和AQP-4基因表达水平；ELISA法测定血清中神经元特异性烯醇化酶（NSE）、缓激肽（BK）、前列腺素E2（PGE2）、组织胺

（HA）、基质金属蛋白酶（MMP-9）、高敏C反应蛋白（hs-CRP）含量；激光共聚焦荧光离子成像实验测定脑细胞内Ca++浓度，检测钙超载情况；流式细胞仪检测大鼠脑皮层细胞亚二倍体比率，了解脑细胞凋亡情况；多通道电生理记录仪记录分析VPM核痛敏神经元放电频率。对上述各项指标进行统计学分析，做相关性研究。从组织形态学、蛋白学、基因学、血清学、神经电生理学、超微结构多角度研究创伤性脑损伤的神经源性机制。

2．第二部分第一章干预实验--NK1受体拮抗剂L-703, 606对大鼠创伤性脑损伤保护作用机制的实验研究，采用45只Wistar雄性大鼠，体重280±10g，随机分为3组：对照组（C组），L-703, 606干预组（L组），TBI创伤未干预组（T组），以上3组每组15只。TBI造模成功后立即尾静脉给予NK1受体拮抗剂L-703, 606(250 nmol/kg Sigma公司)，然后于造模后1 h断头取血，开颅取脑，HE染色观察各组鼠脑损伤情况；免疫组化染色检测SP、CGRP、NF-κB表达情况；RT-PCR检测SP、CGRP、NF-κB、NSE、AQP4mRNA基因表达；ELISA法测定血清中NSE、hs-CRP；统计学分析上述指标，研究P物质受体-NK1受体拮抗剂L-703, 606干预效果。

3. 第二部分第二章干预实验--Rho激酶抑制剂对创伤性脑损伤后脑细胞内亚二倍体比率的影响及其意义，采用健康成年雄性Wistar大鼠45只，体重280±10g，随机分为3组，即假手术组（Sham组），创伤组（TBI组）和Rho激酶抑制剂干预组（FSD组），每组15只。造模后采用流式细胞仪（FCM）检测鼠脑创伤区皮层细胞亚二倍体比率，了解使用Rho激酶抑制剂（Fasudil）后使TBI细胞凋亡

改善情况。**研究结果**

## 1． 第一部分实验结果显示，随打击程度加重，鼠脑水肿越明显、脑细胞、线粒体肿胀越明显，并可见神经突触间释放神经递质及炎症细胞浸润；SP、NPY、CGRP、NF-κB、AQP4、NSE基因表达与蛋白阳性表达成正相关性，且损伤越重，基因表达越强，其对应的阳性蛋白含量表达也越多;致痛物质BK、PGE2、HA与致痛致炎神经递质-SP基因蛋白表达水平成正相关；SP与VPM核痛敏神经元放电频率成正相关性，致痛物质-P物质表达含量越高，VPM核痛敏神经元放电频率越高；

SP与神经肽-NPY、CGRP之间成正相关性，P物质表达及释放越多，神经肽NPY和CGRP表达越多；SP与炎症因子-核转录因子KB(NF-κB)及炎症反应指标-高敏感性C反应蛋白（hs-CRP）之间成正相关性，P物质表达及释放越多，炎症反应指标hs-CRP和NF-κB表达越高，炎症反应越严重，NF-κB与hs-CRP之间也呈正相关性，NF-κB表达越多，血清hs-CRP含量越高，炎症反应越重；SP与基质蛋白水解酶9(MMP-9)、水通道蛋白AQP4表达之间成正相关性，P物质表达及释放越多，MMP-9含量增多，降解和破坏血管内皮基膜的能力越强，引起血管通透性增加，炎性物质渗出增多，导致血管源性脑水肿，P物质表达越多可引起AQP4表达也增多，引起细胞膜通透性增高，导致细胞性脑水肿；SP与损伤皮层脑细胞钙离子含量及细胞凋亡指标-亚二倍体（Hd）比率之间成正相关性，P物质表达及释放越多，损伤皮层脑细胞钙离子含量越高（钙超载现象越严重），脑细胞亚二倍体（Hd）比率也越高（细胞凋亡越严重）；SP与神经元特异性烯醇化酶（NSE）之间成正相关，P物质表达越多，炎症反应越严重，神经细胞坏死越多，NSE表达及含量也越高；NPY、CGRP与NF-κB之间成正相关性，TBI后NPY、CGRP表达越高，NF-κB表达也越高，炎症反应也越重；NF-κB与NSE、AQP4、钙离子浓度、亚二倍体（Hd）比率之间成正相关性，TBI后NF-κB表达越高，炎症反应越重，

NSE(反映神经细胞损伤)、AQP4（反映细胞性脑水肿）、钙离子浓度（反映钙超载）和亚二倍体（反映脑细胞凋亡）比率也越高。（P均﹤0.05）

2. 第二部分L-703, 606对大鼠创伤性脑损伤保护作用机制的实验研究，结果显示L-703, 606干预组（L组）明显较TBI未干预组（T组）损伤减轻，仅有轻度充血，少量炎性细胞浸润；L组和T组大鼠脑皮层损伤区脑组织SP、CGRP和NF-κB阳性表达较对照组阳性表达有明显增强（P﹤0.05），L组较T组表达明显降低；L组和T组大鼠脑皮层损伤区脑组织SP、CGRP、NF-κB、AQP-4和NSE基因表达水平较对照组阳性表达有明显增强（P﹤0.05），且L组较T组表达明显降低（P﹤0.05）；L组和T组大鼠血清中hs-CRP和NSE含量较对照组明显增高（P﹤0.05），且L组较T组hs-CRP和NSE含量明显降低。

3. 第二部分Rho激酶抑制剂对创伤性脑损伤后脑细胞内亚二倍体比率的影响及其意义实验研究结果显示，Sham组、TBI组和FSD组的创伤区皮层细胞亚二倍体比率（%）分别为1.58±0.35，15.90±3.91和5.35±2.10，三组间差异有统计学意义（P<0.01），且FSD组能较TBI组明显降低脑细胞内亚二倍体比率，因而可减轻TBI后脑细胞凋亡，具有脑保护作用。

结**论**

1．神经源性炎症、神经源性机制在创伤性脑损伤中发挥重要作用；

2. NK1受体拮抗剂L-703, 606对大鼠创伤性脑损伤具有保护作用；

3. Rho激酶抑制剂（Fasudil）能降低脑细胞内亚二倍体比率，对TBI后脑组织具有保护作用；

4.其他受体拮抗剂，如CGRP拮抗剂CGRP 8-37、NPY拮抗剂BIBP3226, 芬太尼痛觉干预, PDTC干预NF-κB，小剂量多巴胺抑制APQ4表达，骨髓间充质干细胞

（BMSC）联合血管内皮生长因子（VEGF）或其他神经营养因子移植治疗TBI，均能起到抑制神经源性炎症，保护脑细胞作用（详见本人已发表之相关论文）。期望通过深入研究创伤性脑损伤神经源性机制，找到更多、更高效的治疗TBI的药物和方法，开发新药，为广大TBI患者带来福音。

关键词：创伤性脑损伤；神经源炎症；痛觉；干预；机制

**Study on the** neurogenic mechanisms of traumatic **brain injury and intervention experiment**

Abstract

**BACKGROUND**

Traumatic brain injury (TBI) is a common disease which has a high level of lethal and disability. In addition to the primary brain injury, secondary brain injury also plays an important influence to the prognosis of TBI. the Development Mechanism of TBI has not yet entirely clear. At home and abroad, there are a variety of theories, such as: the doctrine of blood-brain barrier, calcium channel theory, radical theory, brain microcirculation doctrine, energy metabolism theory. But there is no doctrine can fully explain the pathogenesis of TBI, because the occurrence of traumatic brain edema is a very complex mechanism. The various mechanisms described above does not exist in isolation and work alone, but influence each other and a variety of mechanisms to work together. In recent years, the mechanism of neurogenic inflammation in TBI gradually attracted people's attention, a growing number of studies found that neuropeptide Y (NPY), calcitonin gene related peptide (CGRP), substance P (SP), aquaporin -4 (AQP4) and nuclear transcription factor-kappa B (NF-κB) in neurogenic inflammation plays an important role after TBI. This subject put forward the hypothesis of" The neurogenic mechanisms of traumatic brain injury", is just based on neurogenic inflammation. The main content of the hypothesis is follows: When TBI happen, many neurochemical in the brain tissue and cell media is changed within an organization similar to neurogenic inflammatory response, or / and pain as a stress stimulus-induced brain tissue through a complex mechanism of neurogenic abnormal secretion of neurotransmitters, cause or exacerbate the biological active substances in the brain tissue and metabolic imbalance, causing brain cell damage, thus exacerbating the damage to brain tissue damage, and caused the damage zone surrounding brain tissue response to injury caused by traumatic cerebral edema, resulting in secondary brain damage. The neurogenic inflammation or injury stimulate, directly or through conduction in the brain cells, causing the secretion of neuropeptides from the cell body increase. Neurotransmitter in synaptic is released increase, and activity of ion channels increased, then activity of action potential increased. It is proliferated by the

Synapsesspread to the cell body. The sodium, calcium channel activity of cell body increased, and resulting in sodium and water retention, calcium overload, cellular brain edema.

The substances (such as SP) which have biological activityproduced by neurogenic inflammation act on the cerebrovascular and aquaporin -4 (AQP4), The activity of AQP4 is enhanced (selective toward the vascular surface and the pial surface of glial cell membrane area high expression). Increased vascular permeability in the brain, glial cell edema, blood brain barrier (BBB) permeability increase, vascular exudation increased interstitial edema, causing vasogenic cerebral edema. Cellular brain edema and vasogenic cerebral edema common cause the traumatic brain edema, which caused by intracranial hypertension. This time as no measures are taken (for example, dehydration, hormones, surgery) to prevent its development, it will have more brain dead cells, inflammation and edema exacerbated. And a vicious circle until the herniation death. If this assumption is true, tissue damage may be reduced, interfere with or block the above link provides a new approach for us to find and develop new drugs and treatment of traumatic brain injury.

**OBJECTIVE**

1. To explore the neurogenic mechanisms of traumatic brain injury. ie. traumatic brain injury lead to the specific mechanisms of traumatic brain edema caused by changes of brain tissue damage. (First part of the experimental problem to be solved)

2. To explore the use of a variety of receptor antagonists, whether it can obtain the results in mitigation and suppression of these traumatic changes. (Second part of the experimental problem to be solved)

**METHODS**

1. In the first part of the experiment, 40 male Wistar rats weighing 280±10g, were randomly divided into 4 groups: control group (C), mild trauma group (M1 group), moderate trauma (M2 group), severe trauma group(S group), the above four groups with 10 in each group. TBI rat model using Feeney produced according to the principle of free-fall injury, after injury record of the thalamic ventral posterior medial nucleus (VPM) of hyperalgesia neurons (PSN) discharge frequency. Then after TBI 1h, decapitation blood and brain craniotomy were finished. The lesion of rat brain cortex and its surrounding brain tissue damage in general observation by the naked eye; By the light microscopy hematoxylin - eosin staining (HE) and TEM, brain tissue injury of rat were observed from the organization at the cellular level and

Ultrastructure level; the expression of SP, NPY, of CGRP, of NF-κB of AQP4 were detected by immunohistochemical; AQP4 protein expression of the cerebral cortex damage zone was detected by Western blot; gene expression level of SP, NPY, of CGRP, of NF-κB, NSE, and AQP-4 was detected by RT-PCR; ELISA method for the determination of serum neuron-specific enolase (NSE), bradykinin peptide (BK), prostaglandin E2 (PGE2), histamine (HA), matrix metalloproteinase (MMP-9), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) content; Confocal laser fluorescence ion imaging experimental determination of brain cells, the concentration of calcium overload is detected; hypodiploid ratio, was measured by flow cytometry to understand the brain cell apoptosis; multi-channel electrophysiological recorder records the VPM nuclear hyperalgesia neuronal firing frequency. On the above indicators for statistical analysis, correlation studies. To explore neurogenic mechanisms of TBI from the multi-angle, such as tissue morphology, protein, genetics, serology, nerve electrophysiology and ultrastructure.

2. The second part of the first chapter of the intervention experiment, A experimental study about the protective mechanism of NK1 receptor antagonist L-703, 606 to traumatic brain injury, using 45 male Wistar rats, weighing 280±10g, were randomly divided into threegroups: control group (group C), L-703, 606 intervention group (group L), TBI trauma group (group T), 15 rats in each group. The tail vein immediately after TBI model was successful to give the NK1 receptor antagonist L-703, 606 (250 nmol / kg, Sigma), after TBI 1 h, decapitated, blood and brain craniotomy. By HE staining rats brain damage were observed in each group; SP, of CGRP, NF-κB expression were mesured by immunohistochemical staining; SP, CGRP, NF-κB, NSE, AQP4mRNA gene expression were detected by RT-PCR; ELISA method for the determination of serum NSE of hs-CRP; Statistics analysis of these indicators, the intervention effect of receptor-NK1 receptor antagonist L-703, 606.

3. Chapter II of Part Intervention Study - Rho kinase inhibitor on traumatic brain injury brain cells diploid ratio and its significance. The use of healthy adult male Wistar rats 45, weight 280±10g, were randomly divided for the three groups, namely sham operation group (Sham), trauma group (TBI group) and Rho kinase inhibitors in the intervention group (FSD group) (n = 15). After the model, the ratio of hypodiploid in the rats brain trauma cortical cells was mesured by flow cytometry (FCM) to evaluate the situation after using the Rho kinase inhibitors (Fasudil) .

**RESULTS**

1. **The first part of the experimental results show that, with the increase of trauma** degree, the more obvious cerebral edema, brain cells, mitochondrial swelling, the more obvious and visible between the synapses, the release of neurotransmitters and inflammatory cell infiltration; There are positive correlations between the gene

Expression and protein expression of SP, NPY, CGRP, NF-κB, AQP4 and NSE. And

The more severe damage of TBI, the more gene expression, corresponding to the positive expression and content of protein; There are positive correlations between BK, PGE2, HA and SP in protein gene expression level, SP and the firing frequency of VPM nuclear hyperalgesia neuron. the higher the expression level of pain caused by substance-substance P, the higher the VPM nuclear hyperalgesia neuronal firing frequency; There are positive correlations between SP and NPY, CGRP, substance P expression and release more neuropeptides NPY and CGRP expression in the more; There are positive correlations between SP and inflammatory factors, the nuclear transcription factor KB (NF-κB) and the inflammatory response indicators, high sensitivity C reactive protein (hs-CRP), the higher substance P expression, release of hs-CRP and expression of NF-κB, the more serious the inflammatory response. There is a positive correlation between NF-κB and hs-CRP, the more NF-κB expression, the higher content of hs-CRP in serum, and the more severe inflammatory response. There are positive correlations between the expression of SP, matrix proteolytic enzymes (MMP-9) and AQP4. The higher level of the MMP-9 in the serum, the more the ability of degradation and destruction of blood vessels, which causing increased vascular permeability, exudation of inflammatory substances increased, leading to vasogenic cerebral edema. The more expression of substance P, the more AQP4 expression, which causing increased membrane permeability, leading to cellular brain edema; There are positive correlations between SP, calcium content and cell apoptosis of damaged cortex cell. There are positive correlations between the ratio of hypodiploid (Hd), SP expression and calcium content of cortical brain cells, the higher the ratio the more serious of apoptosis. There are positive correlations between SP, neuron-specific enolase (NSE), the more substance P expression, the more serious inflammatory response, the more nerve cell necrosis and the higher NSE expression; There are positive correlations between NPY, CGRP, and NF-κB after TBI. The higher NPY and CGRP expression, the higher the expression of NF-κB, the more severe inflammatory response; There are positive correlations between

NF-κB and NSE, AQP4, the calcium ion concentration, hypodiploid (Hd) ratio after TBI. The higher NF-κB expression, the more severe inflammatory response, NSE (reflecting the nerve cell damage), AQP4 (reflecting the cell brain edema), calcium ion concentration (reflecting the calcium overload) and the higher the ratio of hypodiploid (reflecting brain cell apoptosis). (P <0.05).

2. The study results of experimental study about the protective mechanism of NK1 receptor antagonist L-703, 606 to traumatic brain injury, showed that L-703, 606 intervention group (group L) injury was attenuated significantly compared with TBI intervention group (T group), only mild congestion, a small amount of inflammatory cell infiltration; SP, CGRP, and NF-κB expression of L group and T group in rat cerebral cortical lesions in the brain tissue was increased compared with the control group. L group was significantly reduced compared with T group; SP, CGRP, NF-kappa B, AQP-4 and NSE gene expression levels in the brain tissue of L group and T group in rat cerebral cortical lesions significantly increased than the control group, positive expression of the L group compared with Tgroup was significantly lower; serum hs-CRP and NSE levels of L group and T group was significantly higher than the control group, and the hs-CRP and NSE of L group were significantly lower than that in the T group, (P <0.05)

**3.** The results of Rho kinase inhibitor and its implication of experimental study on traumatic brain injury of brain cells diploid ratio show that hypodiploid ratio of cortical cells in Sham group, TBI group and trauma area of the FSD group are respectively.1.58±0.35, 15.90±3.91 and 5.35±2.10, the differences among the three groups was statistically significant (P <0.01), and the brain cells hypodiploid ratio of FSD group was significantly lower than that of the TBI group. Thus Fasudil can reduce the TBI brain cells apoptosis, and have the cerebral protective effects. **CONCLUSION**

1. Neurogenic inflammation and neurogenic mechanisms play an important role in traumatic brain injury;

2. NK1 receptor antagonist L-703, 606 has a protective effect on the brain injury in rats with traumatic brain injury;

3. Rho kinase inhibitors (Fasudil) can reduce the rate of brain cells hypodiploid, and has a protective effect of TBI in brain tissue;

(4) receptor antagonist, such as CGRP antagonists of CGRP 8-37, NPY antagonist BIBP3226, fentanyl (pain intervention), PDTC intervention of NF-κB, a small dose

Of dopamine inhibition APQ4, the expression of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) with vascular endothelial growth factor (VEGF) or other neurotrophic factor transplantation in the treatment of TBI, can act as a disincentive to neurogenic inflammation, protect brain cells (see I have published papers). Expect in-depth study of neurogenic mechanisms of traumatic brain injury, to find more and more efficient drugs and methods of treatment of TBI, the development of new drugs for the majority of TBI patients to bring the Gospel.

**KEY WORDS: Traumatic brain injury; Neurogenic inflammation; Pain; Intervention; Mechanism**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 中英文对照 |  |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文译名 |
| 5-HT | 5-hydroxytryptamine | 5-羟色胺 |
| Ach | Acetylcholine | 乙酰胆碱 |
| Ang | angiotensin | 血管紧张素 |
| AQP4 | Aquaporin 4 | 水通道蛋白-4 |
| ATP | Adenosine Triphosphate | 三磷酸腺苷 |
| BBB | Blood-brain barrier | 血脑屏障 |
| BK | bradykinin | 缓激肽 |
| BMSC | Marrow mesenchymal stem cells | 骨髓间充质干细胞 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| CDC | Centers for Disease Control | 疾病预防控制中心 |
| cDNA | Complement DNA | 互补 DNA |
| CGRP | Calcitonin gene-related peptide | 降钙素基因相关肽 |
| CNS | Central nervous system | 中枢神经系统 |
| COX-2 | Cyclooxygenase 2 | 环氧化酶 2 |
| CRP | C-reactive protein | C 反应蛋白 |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidine | 3,3'-二氨基联苯胺 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate | 二乙基焦磷酰胺 |
| dH2O | Deionized water | 去离子水 |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| EB | Ethidium bromide | 溴化乙锭 |
| EBA | endothelialbarrierantigen | 内皮屏障抗原 |
| ECM | Extracellular matrix | 细胞外基质 |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| ELAM | Endothelial leukocyte adhesion molecule | 内皮细胞白细胞粘附分子 |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay | 酶联免疫吸附测定 |
| ET-1 | Endothelin 1 | 内皮素 1 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文译名 |
| FCM | Flow Cytometry | 流式细胞计 |
| GAPDH | Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase | 磷酸甘油醛脱氢酶 |
| HA | histamine | 组胺 |
| Hd | hypodiploid | 亚二倍体 |
| HE | Hematoxylin and eosin stain | 苏木精-伊红染色 |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |
| hs-CRP | High sensitive C reacting protein | 高敏 C 反应蛋白 |
| HSP70 | Heat shock protein 70 | 热休克蛋白 70 |
| ICAM-1 | Intercellular adhesion molecule | 细胞间粘附分子 |
| IHC | immunohistochemistry | 免疫组织化学 |
| IL-10 | Interleukin -10 | 白介素-10 |
| IL-2 | interleukin-2 | 白细胞介素-2 |
| I-κB | Inhibitory kappa B | κB 抑制因子 |
| MIWC | Mercurial-insensitive water channel | 汞不敏感性水通道蛋白 |
| MMP-9 | Matrix metalloproteinases | 基质金属蛋白酶 |
| mRNA | Messenger RNA(ribonucleic acid) | 信使核糖核酸 |
| NE | norepinephrine | 去甲肾上腺素 |
| NF-κB | nuclear factor-κB | 核转录因子-κB |
| NK1 | Neurokinin 1 | 神经激肽 1 |
| NLS | Nuclear localization sequence | 核定位信号区 |
| NO | Nitrogen monoxidum | 一氧化氮 |
| NOS | Nitric oxide synthase | 一氧化氮合酶 |
| NPY | Neusopeptide Y | 神经肽 Y |
| NSE | Neurone specific enolase | 神经元特异性烯醇酶 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| PBS | Phosphotate buffer saline | 磷酸盐缓冲液 |
| PDTC | pyrrolidinedithiocarbamate | 吡咯烷二硫代氨基甲酸乙酯 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文译名 |
| PGD2 | Prostaglandin D2 | 前列腺素 D2 |
| PGE2 | Prostaglandin E2 | 前列腺素 E2 |
| PGF2 | Prostaglandin F2 | 前列腺素 F2 |
| PGI2 | prostaglandinI2 | 前列腺素 I2 |
| PIP2 | Phosphatidylinosital biphosphate | 磷酯酰肌醇二磷酸 |
| PLC | Phospholipase C | 磷脂酶 C |
| PPT | preprotacchykinin | 速激肽蛋白前体 |
| PSN | Pain sensitive neuron | 痛敏神经元 |
| PU | Positive Unit | 阳性单位 |
| RNA | Ribonucleic acid | 核糖核酸 |
| rpm | Rotation per minute | 每分钟转速 |
| RT-PCR | Reverse transcription PCR | 逆转录聚合酶链反应 |
| SOM | somatostatin | 生长抑素 |
| SP | Substance P | P 物质 |
| TAE | Tris/acetate/(buffer) | Tris/乙酸电泳缓冲液 |
| TBI | Traumatic brain injury | 创伤性脑损伤 |
| TEM | Transmission electron microscope | 透射电子显微镜, |
| TF | Tissue factor | 组织因子 |
| TNF | Tumor Necrosis Factor | 肿瘤坏死因子 |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethane | 三羟甲基氨基甲烷 |
| VCAM-1 | Vascular cell adhesion molecule | 血管细胞粘附分子 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor | 血管内皮生长因子 |
| VIP | Vasoactive intestinal peptide | 血管活性肠肽 |
| VPM | Ventral posteromedial(nucleus) | 腹后内侧（核） |
| WB | Western blot | 蛋白质印迹 |
| γ-INF | interferon | 干扰素 |

前**言**

据美国疾病控制和预防中心（Centers for Disease Control and Prevention ，

CDC）2011年报告显示创伤性脑损伤（Traumatic brain injury, TBI）依然是美国人致死和致残的主要原因，在美国每年新发颅脑创伤50万，10%属于重型颅脑损

伤，其中约2万人死亡，3万人致残，直接和间接经济损失达560亿美元，而车祸是TBI的主要原因[1]。近年来由于我国交通业、建筑业和采矿业的快速发展，交通事故、工地事故和塌方引起的TBI发生率也在上升，我国每年约有60万人遭受TBI，死亡10万人，其中，因车祸死亡约5万人，这一数字也呈上升趋势，且男性多于女性2~3倍，年龄以15～45岁为最多，尽管在颅脑损伤的诊治及相关基础研究方面取得了许多进展，但其死亡率和致残率依然高居身体各部位损伤之首[2]，这与对TBI的本质特征认识不足有关，尤其是对脑组织损伤的病理变化的本质和规律的认识不足有关。神经源性机制不仅在非中枢神经系统起作用，而且对中枢神经系统本身也有着十分重要的作用，即**神经源性机制在调控非中枢神经系统时，也在影响着中枢神经系统本身**。局部创伤性脑损伤如何引起创伤性脑水肿，进而引起颅内压增高，甚至脑疝危及生命？需要更深入地研究创伤性脑损伤中的神经源性机制，并通过多种干预方法，研究如何控制TBI的进一步发展，寻找新的更有效的治疗TBI的方法。

TBI时，损伤组织（头皮、骨膜、硬膜等）内痛觉神经末稍在生物学活性物质的作用下发生敏感化，即正常状态下不能引起兴奋的刺激，在此状态下可以引起神经末梢兴奋，产生痛觉；正常状态下可引起兴奋的刺激，此状态将产生更强烈的神经兴奋，产生更剧烈的疼痛。同时，受刺激神经末梢通过释放某些神经递质如：神经肽Y (Neuropeptide Y, NPY)、降钙素基因相关肽（calcitonin gene related

peptide，CGRP）、P物质(substance P, SP)等神经多肽。这些生物活性物质作用于组织内肥大细胞、血管内皮细胞等，使之产生其它生物学活性物质或者/和产生生物学效应，引发组织学改变，引起炎症反应甚至组织损伤[3]。NPY对血管有直接收缩作用，是已知最强缩血管效应的多肽之一，它可加强血管对其它收缩血管物质的反应，如去甲肾上腺素（Norepinephrin, NE）及血管紧张素

（Angiotension, Ang）等；可降低血管对舒张血管物质的反应如乙酰胆碱

（acetylcholine, Ach）及β受体阻滞剂等。CGRP主要作用于毛细血管前小动脉，使之扩张充血，脑血管分布着富含CGRP神经纤维，CGRP对脑血管疾病有强烈的舒张作用；SP主要作用于毛细血管后小静脉，使之通透性增加血管内容渗出增加，引起和加重组织的炎症。这种炎症被称为**神经源性炎症**（neurogenic

inflammation）。神经末梢NPY、CGRP、SP与组织内肥大细胞、血管内皮细胞及其分泌的生物学活性物质之间存在着相互作用（兴奋或者抑制），对组织炎症反应进行调制，同时炎症区域内的神经末梢发生敏感化，后者对组织炎症的转归也有重要的影响[4, 5]。

头部外伤的疼痛刺激作用于神经末梢的痛觉感受器，而后产生冲动，经痛觉传导通路向中枢传导，最终传导至大脑皮层，由皮层综合分析而感知疼痛，其顺序如下：致病刺激因素→感受器→传人神经纤维→脊髓灰质后角→丘脑→大脑皮层。头部皮肤、肌肉、血管、硬脑膜等处均有感受器分布，传入神经纤维——传导头部痛觉主要由三叉神经、颈神经l～3和舌咽神经、迷走神经，这称为一级神经元；二级神经元包括上部颈髓灰质后角和脑干内的三叉神经感觉核。经脊髓丘脑束和三叉神经丘系，传导至丘脑后腹核，在此交换神经元（三级神经元），然后投射到大脑皮层感觉区而被感知，并通过传出神经纤维和效应器做出反应。

受痛觉传导通路和神经源性炎症发生机制的启发，我们追询TBI后，脑组织发生组织化学改变，是否产生类似神经源性炎症反应？是否有其它神经源性机制参与？比如，头部伤害性刺激经所支配神经纤维传入中枢神经系统，通过复杂的神经源性活动机制向脑组织内释放生物学活性物质，如NPY、SP、CGRP 和

NE等；或者通过活化脑组织内一些化学物质，继而对损伤部位及其邻近部位脑组织产生损伤，引起创伤性脑水肿，进而引起颅内压增高，甚至脑疝危及生命。神经源性机制包括神经性活动（如交感神经、副交感神经的活动）和神经源性炎症。这种神经源性机制对非损伤区脑组织是否产生影响？产生什么样的影响？如何产生影响？这是我们研究的重点。

我们对TBI后引起的创伤性脑水肿和颅内压增高的过程及其影响因素进行探讨研究。提出如下假设：TBI后，脑组织内许多神经化学和细胞介质发生改变，并且组织内发生类似神经源性炎症反应或者/和疼痛作为应激性刺激通过复杂的神经源性机制诱发的脑组织内神经递质分泌异常，导致或者加剧脑组织内生物学活性物质产生与代谢失衡，引起脑细胞的损伤，从而加剧损伤区脑组织的损伤，并且引起损伤区周围脑组织的损伤反应，引发创伤性脑水肿，造成继发性颅脑损害，即①神经源性炎症或损伤刺激直接或经传导作用于脑细胞→胞体分泌神经肽增加→神经突触间神经递质释放增多→离子通道活动增加→动作电位活动增加，并由突触部位扩散到胞体→胞体钠、钙通道活动增加→导致水钠储留，钙超载→**细胞性脑水肿**。②神经源性炎症产生的生物学活性物质（如SP）作用于脑血管及水通道-4（aquaporin-4, AQP4）→AQP4活动增强（在朝向血管面及软脑膜面的胶质细胞膜区有选择性的高表达）[6]，脑血管通透性增加，胶质细胞水肿

→血脑屏障（BBB）通透性增加，血管内容渗出增多，间隙性水肿→**血管源性脑水肿**。①②共同导致创伤性脑水肿，引起颅内高压，此时如不采取措施（脱水、激素、手术）阻止其发展，那将会有更多的脑细胞死亡，炎症加剧，水肿加重，形成恶性循环，直至脑疝死亡。

如果上述假设成立，通过干预或阻断上述环节均可能减轻组织损伤，包括通过：⑴通过NPY-受体[7-9]、NK1-受体[10]、CGRP-受体阻断[11]；⑵痛觉干预，阻断外伤刺激对周围神经末梢的作用和阻断伤害性刺激传入中枢神经系统，有可能阻遏由外伤刺激诱发的“神经源性炎症”反应和神经源性机制造成脑组织损伤；⑶拮抗损伤组织内炎症反应，治疗和防止炎症反应均可能实现脑保护作用[12, 13]；⑷脱水、利尿，通过提高血管内渗透压，将组织间及细胞内多余的水分排出体外；

⑸清除血肿、切除坏死的脑组织，减少损伤组织内炎症反应；⑹开窗减压术、减容术、脑脊液外引流术，降低创伤性脑水肿引起的颅内压增高；⑺抑制AQP4表达

[14-16],可能改善脑损伤后BBB通透性改变，从而减轻脑水肿，这为脑水肿的治疗提

供了新的思路。探讨神经源性机制在TBI包括损伤区和未损伤区中的作用及其机制，是本课题立题和研究思路的主要基础和研究的目标。

本研究通过透射电镜、激光共聚焦荧光成像技术、ELISA、RT-PCR、Western

blot、HE、IHC、FCM等细胞和分子生物学等方法从血清学、基因学、免疫学、组织细胞学、蛋白学以及超微结构多角度、多层次研究神经源性机制在颅脑损伤中作用。本研究采用颅脑损伤大鼠模型，以脑细胞超微结构和血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)为病理学指标，以脑组织内NPY、SP、CGRP、NE和NF-κB为神经源性活动和组织炎症反应的指标，探讨神经源性机制在颅脑外伤后引起创伤性脑水肿和颅高压中的作用。重新评价颅脑损伤的病理过程，即⑴颅脑外伤可能通过神经源性机制引起①AQP4活动增强，脑血管通透性的改变，血管内容外逸，血管源性脑水肿；②脑细胞离子通道状态改变，水钠潴留，钙超载，细胞性脑水肿；③脑细胞调亡。⑵脑损伤早期阻断神经源性反应（包括NPY受体、CGRP受体和NK1受体阻断、抗炎干预、痛觉干预、抑制AQP4表达等）减轻脑水肿，降低颅内压，减少损伤区及其周围脑组织的损伤，这为脑损伤的治疗提供了新的思路，对提高颅脑损伤机制的认识水平，以及制定更有效的临床治疗方案和脑保护等方面均具有重要意义。

本课题深入研究TBI发生发展病理学过程和机制，为临床治疗TBI提供重要的指导，即明确镇痛和抗炎症性反应治疗在TBI治疗中的作用和重要性；为脑外科手术中脑保护提供重要的依据，即脑保护措施中完善的镇痛和抗炎症性反应是必须的、重要的环节；为研究其他非损伤因素如感染、肿瘤引起的脑水肿病变的治疗提供思路。总之，本课题的意义在于对创伤性脑损伤的病理学机制提出新的理

论体系，即神经源性机制在局部脑损伤引起创伤性脑水肿的发生过程中发挥作用。疼痛（伤害性感受）不仅是传统意义上的伴随脑损伤的临床症状，而且可能是加重脑损伤的重要原因；TBI痛觉干预和抗炎症性反应治疗措施不仅缓解了疼痛症状，更重要的是阻断了机体对伤害感受及其诱发的神经源性反应，减轻脑水肿，即具有脑保护作用。从而为临床治疗TBI、其他脑科疾病以及脑科手术中器官保护方面提出新的观点、思路和原则。

参考文献：

[1]. Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths, 2002-2006. [http: //www. cdc. gov/TraumaticBrain](http://www.cdc.gov/TraumaticBrain) Injury/index. html

[2]. 王忠诚. 神经外科学. 湖北: 湖北科学技术出版社, 2005. 365

[3]. Wall PD, Melzack R. Textbook of Pain. Fourth Edition. Churchill Livingstone, 1999

[4]. Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. Arch Dermatol, 2003, 139: 1479～1487.

[5]. Blaser C, Wittwer M, Grandgirard D, et al. Adjunctive dexamethasone affects the expression of genes related to inflammation, neurogenesis and apoptosis in infant rat pneumococcal meningitis. PLoS One. 2011, 6(3): e17840.

[6]. Bloch Orin, Papadopoulos M C, Manley GT. et al. Aquaporin-4 gene deletion in mice increases focal edema associated with staphylococcal brain abscess. Journal of Neurochemistry. 2005, 95(1): 254～262.

[7]. Yang XP, Chiba S. Dissociation of potentiation of [Leu31-Pro34] neuropeptide Y on adrenergic and purinergic transmission in isolated canine splenic artery. Jpn J Pharmacol. 2000, 83(3): 197～205.

[8]. Petervari E, Balasko M, Uzsoki B, et al. Effects of neuropeptide Y antagonists on food intake in rats: differences with cold-adaptation. Peptides. 2006, 27(1): 150～156.

[9]. Malmstrom R E, Alexandersson A, Balmer K C, et al. In Vivo Characterization of the Novel Neuropeptide Y Y1 Receptor Antagonist H 409/22. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2000, 36(4): 516～525.

[10]. Bang R, Sass G. Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96, 345 AND L-733, 060 from cytokine-mediated liver injury [J] Phamacol Exp Ther, 2003, 305(1): 31～39.

[11]. Hay DL, Poyner D. The preclinical pharmacology of BIBN4096BS, a CGRP antagonist. Cardiovasc Drug Rev. 2005, 23(1): 31～42.

[12]. Yoon SW, Goh SH, Chun JS, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone inhibits lipopolysaccharide- induced tumor necrosis factor-alpha production inleukocytes by modulating protein kinase A, p38 kinase, and nuclear factor kappa B signaling pathways. J Biol Chem. 2003, 278(35): 32914～32920..

[13]. Altinoz MA, Korkmaz R. NF-kappaB, macrophage migration inhibitory factor and cyclooxygenase- inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen- and NSAID-prevention of the ovarian cancer. Neoplasma. 2004; 51(4): 239～47

[14]. Benmessaoud-Mesbah O, Pouzet-Hardin H, Ayad G et al. effects of dehydration on aquaporin-4 distribution in supraoptic nucleus and in neurohypophysis of mice: p. 166. Journal of Neurochemistry. 2005, 94 Suppl. 2: 97.

[15]. Ishida H, Takemori K, Dote K, et al. Expression of glucose transporter-1 and aquaporin-4 in the cerebral cortex of stroke-prone spontaneously hypertensive rats in relation to the blood-brain barrier function. Am J Hypertens.

2006,19(1):33～39.

[16]. Tomura S, Nawashiro H, Otani N, et al. Effect of decompressive craniectomy on aquaporin-4 expression after lateral fluid percussion injury in rats. J Neurotrauma. 2011, 28(2): 237-243.

# 第一部分 创伤性脑损伤的神经源性机制实验研究

据前言中我们提出的神经源性炎症机制假说: ①神经源性炎症或损伤刺激直接或经传导作用于脑细胞→胞体分泌神经肽增加→神经突触间神经递质释放增多→离子通道活动增加→动作电位活动增加, 并由突触部位扩散到胞体→胞体钠、钙通道活动增加→导致水钠储留, 钙超载→**细胞性脑水肿**. ②神经源性炎症产生的生物学活性物质（如SP）作用于脑血管及水通道-4(aquaporin-4, AQP4）

→AQP4活动增强, 脑血管通透性增加, 胶质细胞水肿→血脑屏障（BBB）通透性增加, 血管内容渗出增多, 间隙性水肿→**血管源性脑水肿**. ①②共同导致创伤性脑水肿, 引起颅内高压, 影响脑灌注, 脑缺血, 缺氧, 导致更多的脑细胞死亡, 引起炎症加剧, 水肿加重, 形成恶性循环, 直至脑疝死亡. 我们设计实验如下, 以验证该假说.

材料及方法

[1]. 实验动物及分组

1.1实验动物：实验采用40只Wistar大白鼠，体重280±10g，由ft西医科大学实验动物中心提供。

1.2分组情况：随机分为4组：对照组（Control group, C组），轻度创伤组（Mild

trauma组，M1组），中度创伤(Moderate trauma group, M2组)，重度创伤组（Severe trauma group, S组），以上4组每组10只。

## 2. 实验器材

PCR仪PTC-100型美国 MJ Research Inc德国Hoefer Scientific

电泳仪PS3000 型

Instruments

紫外凝胶图象分析系统GDS7500型美国UVP，

Selectra全自动生化仪荷兰威图公司

JEM-1011透射电镜日本电子株式会社

激光共聚焦显微镜德国Leika公司

包埋机EG1150H+C德国Leica公司

手动轮转切片机RM2235德国Leica公司

中国四川川大智胜软件股份有限

MIAS-2000图像分析系统

公司

流式细胞仪（型号: FACS Calibur.）美国Becton-Dickinson, B-D公司，自由落体撞击装置军事医学科学院生产

Olympus生物显微镜日本Olympus公司

ZH-蓝星B脑立体定位仪

安徽淮北正华生物仪器设备有限公司

RM6240BD 多道生理信号采集处理系统 成都仪器厂 金属记录电极 美国 FHC 公司

冰箱(4℃、-20℃) BCD-599WF 中国 海尔集团

超低温冰箱(-70℃) 日本 SANYO 公司

超低温冰箱（-85℃） 日本 SANYO 公司

低速离心机 KDC-40 中国 科大创新股份有限公司

Milli-Q Biocel 超纯水机 美国 Millipore 公司

电子精密天平(1/10 万) CP324S 德国 Sartorius 公司

电子石英钟计时器 中国 福建迈新生物技术公司

电子天平MP200-I型中国上海第二天平仪器厂

定时微量振荡器 TE-B 中国 姜堰市康健医疗器具厂

多功能电磁炉 MC-SH219 中国 广州美的电器制造公司

封口膜 美国 Millipore 公司

孵育用湿盒 中国 福建迈新生物技术公司

高压锅 中国 广州美的电器制造公司

隔水式电热恒温培养箱 Q/BKYY10-91 型 中国 上海跃进医疗器械厂航空牌液氮罐 中国 国营豫新机械厂

烘片仪 TEC 2602 意大利 Histo-line 公司

计时器 美国 Oregen 公司

空气摇床 SCD-24 型 中国 上海离心机械研究所

蜡块修整器 TEC 2900 意大利 Histo-line 公司

离心机 德国 Eppendorf 公司

立式压力蒸汽灭菌器 中国 上海申安医疗器械厂

漂片仪 TEC 2601 意大利 Histo-line 公司

全自动组织脱水机 ASP300 德国 Leica 公司

实验室振荡器 KS260 德国 IKA 公司

中国军事医学科学院实验仪器厂，

台式冷冻离心机

微量移液器(0-10μl、5-50μl、20-200μl、100-1000μl)

TLL-D 型

美国 Thermo 公司

小型台式离心机 MSE 型 日本 SANYO

循环水浴锅 CB8-30e 型 美国 Heto

移液器吸头 美国 Bio Bassic 公司

载玻片 中国 北京中杉金桥生物技术公司

智能型数显干燥培养两用箱 中国 上海成顺仪器仪表有限公司

紫外可见分光光度计 CE1020 型 美国 CECIL

自动生物组织包埋机和冷冻台 TEC 2800 意大利 Histo-line 公司牙科台式电钻 宁波医疗器械厂生产

二氧化碳孵箱：日本SANYO公司生产；

Petri皿：美国Sigma公司；

倒置显微镜：上海医用仪器厂

无菌操作台：北京市新技术应用研究所

隔水式电热恒温培养箱：上海跃进医疗器械厂**3。实验试剂**

基础饲料ft西医科大学实验动物中心提供PV-6001二步法免疫组化试剂盒中国北京中杉金桥生物技术公司甲醛（分析纯）中国北京博奥生生物技术公司

APES（3-氨丙基-3-乙氧基甲硅烷）（50×

丙酮稀释液）（ZLI-9001）

枸橼酸盐缓冲液（0.01M pH6.0 ）

（ZLI-9064）

中国北京博奥生生物技术公司

中国北京博奥生生物技术公司

碘化丙啶(Propidum lodide, PI)美国Sigma公司

抗体稀释液中国北京中杉金桥生物技术公司

PBS磷酸盐缓冲液（0.01M pH7.2-7.4）

（ZLI-9062）

### 3, 3’-二氨基联苯胺DAB浓缩显色液

（ZLI-9032）

中国北京中杉金桥生物技术公司

中国北京中杉金桥生物技术公司

苏木素粉剂（进口分装）（ZLI-9043） 中国 北京中杉金桥生物技术公司水溶性伊红（进口分装）（ZLI-9046） 中国 北京中杉金桥生物技术公司Tween-20 美国 Amresco 公司

25％－28％氨水（分析纯） 中国 北京化工厂

36％－38％盐酸（分析纯） 中国 北京化工厂

乙醇（分析纯） 中国 天津市申泰化学试剂有限公司

二甲苯（分析纯）中国天津市申泰化学试剂有限公司

丙酮（分析纯） 中国 天津市申泰化学试剂有限公司

中性树胶（ZLI-9055） 中国 北京中杉金桥生物技术公司

流式细胞仪检测试剂美国BDFarmige公司

7.5% EDTA中国北京东雅生物技术研究所

抑肽酶中国北京东雅生物技术研究所

封口膜美国Millipore公司

ELISA 试剂盒灵敏度0.01ng/L 组成如下： 美国 Santa Cruz 公司酶标板（Coated Well）96Well 2-8℃冷藏干燥保存 标准品 6 瓶 1ml/瓶 2-8℃冷藏保存

生物素标记液 6.0 ml 2-8℃冷藏保存

酶标偶合液 6.0 ml 2-8℃冷藏保存

TBM 显色剂 A 6.0 ml 2-8℃避光冷藏保存

TBM 显色剂 B 6.0 ml 2-8℃避光冷藏保存

终止液 6.0 ml 18-25℃保存

浓缩洗涤液 50 ml 2-8℃冷藏保存荧光离子成像试剂

Fluo-3/AM:上海Beyotime公司

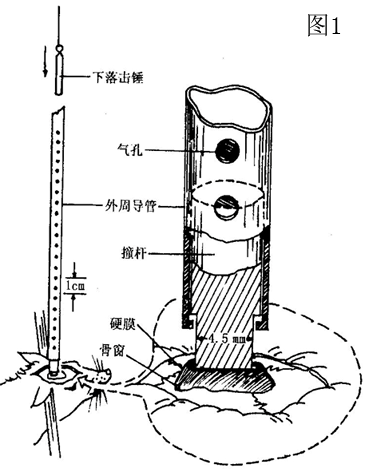
DMSO美国Sigma公司

胰蛋白酶杭州四季青公司

## 4. 实验方法

### **4.1** 创伤性脑损伤（**TBI**）大鼠模型建立及标本采集：

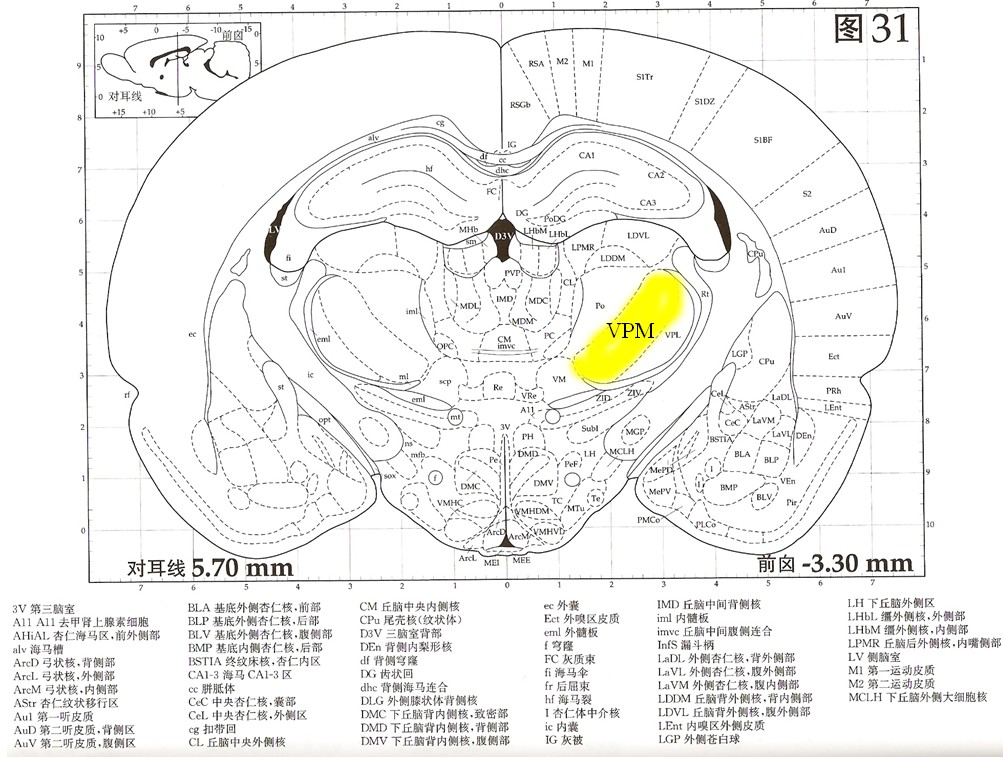
用Feeney法按自由落体致伤原理，制成一撞击装置（由军事医学科学院仪器厂加工）：撞杆头端直径4.5mm,高2.5mm,外周导管高为40cm，保持90°垂直，每隔1㎝有一气孔，以防锤下落时导管内空气压缩阻力的影响。（如图1所示）乌拉坦腹腔注射（1.2mg·kg-1）麻醉满意后，将大鼠固定在脑立体定位仪上。制作TBI模型时沿正中线切开头皮并剥离骨膜，切口长2cm，暴露右顶骨，牙科台式电钻于冠状缝后1.5mm,中线双侧2.5mm处各钻一直径为5mm的圆形骨窗（见图2）,保持硬脑膜完整，左侧置金属电极，对TBI造模前大鼠丘脑VPM核痛觉敏感神经元（PSN）放电频率的进行记录，之后将撞杆头端置右侧骨窗处，击锤（重20g）沿外周导管分别从10cm、30cm高处自由落下冲击撞杆，造成右顶叶轻、中度脑挫伤，另用击锤（重40g）沿外周导管从25cm高处自由落下冲击撞杆，造成右顶叶重度脑挫伤，致伤冲击力分别为200g·cm、600 g·cm和1000 g·cm。假



手术组仅切开头皮，开骨窗，不造成脑损伤，骨蜡封闭右侧骨窗。各组造模后再次记录大鼠丘脑VPM核痛觉敏感神经元（PSN）放电频率。伤后1h断头取血，开颅取脑，进行以下实验。（丘脑VPM定位图见图3）。

图1 自由落体致TBI模型示意图

图2 双侧钻孔（右侧打击，双侧记录）



**图3** **丘脑VPM定位图**

### **4.2** 肉眼大体观测各组大鼠脑皮层损伤处及其周边脑组织损伤程度

### **4.3** 光镜苏木精—伊红染色法**( hematoxylin-eosin staining)**从组织细胞水平观测大鼠脑组织损伤程度

**试剂配置**

A：0.5～1%的伊红酒精溶液：

称取伊红Y 0.5～1 g，加少量蒸馏水溶解后，再滴加冰醋酸直至浆糊状。以滤纸过滤，将滤渣在烘箱中烤干后，以95%酒精100毫升溶解。

B：苏木素染液配方：（配制3000 ml）

苏木精6 g

无水乙醇100 ml

硫酸铝钾150 g

蒸馏水2000 ml

碘酸钠1.2 g

冰醋酸120 ml

甘油900 ml

配制方法：将苏木素溶于无水乙醇，再将硫酸铝钾溶于蒸馏水，溶解后将甘油倾入一起混合，最后加入冰醋酸和碘酸钠。

C: 1%盐酸酒精分化液：将1毫升浓盐酸加入99毫升70%酒精中即可。

**切片制作**：

（1）10%中性甲醛溶液内4℃固定24h～1w。将组织块放入包埋盒中，再放入全自动组织脱水机中脱水，脱水后将石蜡预热30 min后将融蜡倾入模型，然后以钝头热镊夹取备好的组织块在蜡中安放平正，蜡稍凝后，即移到4℃冷台中加速凝固。

（2）切片：切片机上连续切片，厚度为3-4μm，以小镊取完整无划痕、厚薄均匀的切片，将其放入40～45℃温水中，使展平无折，选择较好的切片裱于载玻片上。用铅笔在玻片上标明切片号。

**染色流程**

（1）二甲苯（Ⅰ）15min

（2）二甲苯（Ⅱ）15 min (3) 100%乙醇（Ⅰ）5min (4) 100%乙醇（Ⅱ）5 min (5) 80%乙醇 5min (6)蒸馏水5 min

（7）苏木精液染色5 min

（8）流水稍洗去苏木精液1-3 s

（9）1%盐酸乙醇1-3 s

（10）稍水洗10-30 s (13)蒸馏水过洗1-2 s

(14) 0.5%伊红液染色1-3 min

(15)蒸馏水稍洗1-2 s

（16）80%乙醇稍洗1-2 s (17) 95%乙醇（Ⅰ）2-3 s (18) 95%乙醇（Ⅱ）3-5 s

(19)无水乙醇5-10 min

(20)石炭酸二甲苯5-10 min

(21) 二甲苯（Ⅰ） 2 min

(22) 二甲苯（Ⅱ） 2 min

(23) 二甲苯（Ⅲ） 2 min

(24)

中性树胶封固.注明实验大鼠编号及制作日期

制作切片 保存切片 图像分析图 4 制作切片、保存切片、图像相关分析组图

### **4.4**

透射电镜超微结构水平观测大鼠脑皮层损伤处及其周边脑组织损伤程度



图5 JEM-1011透射电镜、图像采集分析软件

（Olympus analySIS iTEM 5.0）和待检电镜标本组图

电镜样品包埋块制备过程

(1)取材动作要快，部位要准确。组织块要小，在0.5～1mm3，低温下（4℃）操作。

(2)固定取完材立刻投入3%戊二醛固定液中固定2小时或稍长一点时间

(3) 清洗 用 0.1M 磷缓洗 3 次，每次 10 分钟

(4)后固定用1%OsO4（锇酸）后固定2小时

(5) 清洗 用 0.1M 磷缓洗 3 次，每次 10 分钟

(6) 脱水 50%乙醇 15 分钟→ 70%乙醇 15 分钟或保留样品时间稍长一些 → 80%乙醇15 分钟 → 90%乙醇15 分钟 → 100%乙醇110 分钟换无水丙酮两次， 每次 10 分钟

(7) 浸透 丙酮：包埋剂 1: 1 浸透 1 小时 30 分钟 纯树脂浸透过夜

(8)包埋样品包埋于包埋剂中，支持柔软组织，便于超薄切片，

(9)聚合包埋剂在温度作用下由固体变为液体的过程.37℃（12小时）→45℃

（12小时）→60℃（24小时）

（10）切片在进行超薄切片之前常进行半超薄切片，超薄切片切成1mm3

（11）染色一般采用双重染色，先铀染后铅染。常用硝酸铅与醋酸铀。（12）透射电镜下观察.

### **4.5** 免疫组化检测大鼠脑皮层损伤处及其周边脑细胞中**SP**、**NPY**、**CGRP**、**NF-**κB、

**AQP4阳性表达情况**

**本实验采用PV-6001二步法进行免疫组织化学染色步骤**

1、**冻块：**标本蜡块在－20℃冰箱中放置60～120分钟。

2、**切片：**切片机上连续切片，**厚度为3**～**4μm**，用铅笔在玻片上标明切片号，标明指标，抗体滴度，修复方法及时间。

3、**烤片：**石蜡切片放置在60℃摊片机烘烤到无水滴和水泡，再放置在60℃恒温箱中烘烤180分钟。

4、**脱蜡：**二甲苯Ⅰ(10min)→二甲苯Ⅱ(10min)→二甲苯Ⅲ(10min)→无水乙醇Ⅰ(2min)→无水乙醇Ⅱ(2min)→90%乙醇(2min)→75%乙醇(2min) 。

5、**洗涤：**0.1% Tween-20的PBS洗涤，3分钟×3次→PBS洗涤，3分钟×1次。

6、**抗原修复**（高压热修复）：

**CGRP、NPY、NF-κB、SP**热修复均为**1分钟**，**AQP4**热修复为**0.5分钟**

将2000ml的0.01m枸橼酸钠缓冲溶液（PH6.0）注入不锈钢压力锅中加热至沸腾。切片置于塑料架上，甩尽玻片多余的水份，放入锅内，使切片位于液面以下，盖锅，小阀门将会升起来。当压力锅开始慢慢喷气时（约加热5～6分钟后），计

时0.5或1分钟，然后将压力锅端离热源，冷水冲至小阀门沉下去后，打开锅盖，置于冷水中快速冷却，用温度计测量锅中溶液温度均在**25℃左右**。

7、**洗涤：**从不锈钢压力锅中取出玻片，0.1% Tween-20的PBS洗涤，3分钟×

3次→PBS洗涤，3分钟×1次。

8、**过氧化氢孵育**：组织切片加3%H2O2去离子水50微升，孵育30分钟，阻断内源性过氧化物酶。

9、**洗涤：蒸馏水**洗涤切片，3分钟×1次→0.1% Tween-20的PBS洗涤，3分钟

×3次→PBS洗涤，3分钟×1次。

10、**配制一抗**（兔抗大鼠）：**CGRP**为**1: 5000**，**NPY**为**1: 6000**，**NF-кB**为**1：**

**200**，**SP**为**1: 800**，**SPR**为**1: 500**.

11、**加一抗**：组织切片滴加一抗50微升，4℃冰箱过夜或37℃孵育1～2小时。

12、**洗涤：**室温下放置10～30分钟，PBS冲洗→0.1% Tween-20的PBS洗涤，并不断振荡，5分钟×3次→PBS洗涤，3分钟×1次。

13、**加二抗**：组织切片滴加二抗（辣根酶标记ft羊抗兔IgG抗体-HRP多聚体）

50微升，37度孵育20～30分钟。

14、**洗涤：**PBS冲洗→0.1% Tween-20的PBS洗涤，并不断振荡，5分钟×3次

→PBS洗涤，3分钟×1次。

15、**显色**：准备1～1.5毫升双蒸水（pH约7.0），加入一滴（约50微升）试剂A（浓缩缓冲液），混合均匀，然后将试剂B和试剂C各一滴加入其中，再次混匀。此溶液必须现用现配，配好后避光保存，30分钟内使用，剩余的液体应弃去。DAB显色5～20分钟，在显微镜下掌握染色程度。

16、**洗涤：**蒸馏水或自来水充分冲洗。

17、**复染：**甩尽玻片多余的水份，苏木素复染1分钟（新）～10分钟（旧），自来水充分冲洗，甩尽玻片多余的水份→盐酸酒精分化1～2s，自来水充分冲洗，甩尽玻片多余的水份→氨水返蓝1～3s，自来水充分冲洗；显微镜下观察染核情况。

18、**脱水透明：**70%乙醇(5min)→90%乙醇(5min)→无水乙醇(10min)→二甲苯Ⅰ(10min)→二甲苯Ⅱ(10min)→二甲苯Ⅲ(10min)。

19、**封片：**擦去切片周围多余二甲苯，切勿干涸，迅速滴加适量中性树胶，再加盖玻片封固（组织部位切勿残留小气泡），室温条件下晾48～72小时。

20、**贴标签：**在玻片上贴标签标明切片号，指标，抗体滴度，修复方法及时间，实验日期。

21、结果判断：MIAS-2000图像分析系统（四川川大智胜软件股份有限公司）照相，观察，阳性染色为粽黄色。计算各组阳性单位。

阳性单位（positive Unit, PU）测算公式：

*GO*  *Gv*

PU=

(1*AAR*)*G*max

100

GO----目标平均灰度

GV----视场平均灰度

AAR-- -面积密度（Area Ratio目标面积与视场面积的比值）Gmax---最大灰度（255）

阳性单位把显色反应程度分为0---100个等级，每一个等级用0----100的具体数值来表示。

灰度：0---255 0：最黑；255：最亮（白）

### **4.6** **Western blot**检测大脑皮质损伤区**AQP4**蛋白表达情况

Western免疫印迹（Western Blot）是将蛋白质转移到膜上，然后利用抗体进行检测。对已知表达蛋白，可用相应抗体作为一抗进行检测，对新基因的表达产物，可通过融合部分的抗体检测。

原理：与Southern或Northern杂交方法类似，但Western Blot采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳，被检测物是蛋白质，“探针”是抗体，“显色”用标记的二抗。经过PAGE分离的蛋白质样品，转移到固相载体（例如硝酸纤维素薄膜）上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与酶或同位素标记的第二抗体起反应，经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。该技术也广泛应用于检测蛋白水平的表达。

实验步骤： **1。蛋白样品的制备**

在50mg组织中加入0.5ml蛋白裂解液(50mM Tris. Cl pH 6.8、15mM NaCl、5mM EDTA、0.5% NP-40、1mM PMSF, 临用配制)，匀浆，10000g,4℃离心10分钟，收集上清。再加入等体积的2×SDS buffer（tris-Cl 100mM, DTT 200 mM, 甘油20%, 溴酚蓝0.2%, SDS 4%），煮沸5min, 迅速冰浴，10000g,4℃离心10分钟，收集上清，用于后面实验。

**2．SDS-PAGE**

（1）分离胶12%

Tris-HCl PH 8.8 2.5ml

双蒸水3.3ml

10%SDS 0.1ml

30%丙烯酰胺4.0ml

10%过硫酸铵0.1ml

TEMED 0.04ml

（2）浓缩胶5%

Tris-HCl PH 6.8 0.63ml双蒸水3.44ml

10%SDS 0.05ml

30%丙烯酰胺0.83ml

10%过硫酸铵0.05ml

TEMED 0.0005ml

（3）电泳：浓缩胶恒压80V, 时间约45分；分离胶恒压120V，时间约3小时。

3．**转膜**

（1）PVDF膜的活化：甲醇浸泡2分，蒸馏水1分，转入转移缓冲液中。

（2）半干转移仪进行转膜：恒流100mA, 1小时。

**4．封闭：**5%BSA溶液，4℃封闭过夜。

**5.一抗孵育**：

（1）抗体稀释度：兔源AQP4, 1:200稀释；鼠源beta-actin, 1:1000稀释. 稀释液：TBST

（2）时间：4℃过夜。

**6. 二抗孵育：**

（1）抗体稀释度：抗兔二抗或抗鼠二抗，1: 1000稀释。

（2）时间：室温2h。

7. ECL底物化学发光**显色，**扫描。

**8、图像处理与分析**：用photoshop，图像-调色-反色，选取范围，图像直方图，分析各条带灰度值。

### **4.7** **RT-PCR**检测**SP**、**NPY、CGRP、NF-**κ**B、NSE**和**AQP-4**基因表达水平。

#### 4.7.1 设计引物：根据文献报道，检测Genbank获得相应的待测基因的核酸序列，根据下列原则设计引物：①引物长度最好在16-24bps；②GC含量在50%左右，上下游引物GC含量接近，以保证Tm值的协调；③引物自身和引物之间的连续互补碱基不应超过4个，以避免自身二级结构的形成和引物之间二聚体的形

成；④PCR产物大小介于250-800bp之间。确认所设计的引物符合上述原则后，由上海生工生物技术有限服务公司合成引物，PCR引物具体序列及具体参数见表1，表2：

表 1 所设计引物序列表

**Primer Name** Sequence (5'to **3')**

NPYF GTGTGTTTGGGCATTCTGGC

NPYR AAATCAGTGTCTCAGGGCTGG

CGRPF CTTAGAAAGCAGCCCAGGC

CGRPR CAAAGTTGTCCTTCACCACC

NSEF TGGACCACATCAACAGCACC

NSER TTCCGTGTAGCCAGCCTTGT

AQP4F GGGTTGGACCAATCATAGGCGCT

AQP4R GCAGGAAATCTGAGGCCAGTTCTAGG

p65F CCAAAGACCCACCTCACC

p65R CGCATTCAAGTCATAGTCCC

S-P-F TCCGACAGTGACCAAATC

S-P-R TGACCATGCCCATAAAGA

R-GAPDHF TCCCTCAAGATTGTCAGCAA

R-GAPDHR AGATCCACAACGGATACATT

表 2 所设计引物参数表

每OD的引

Primer Name

Primer Length

Tm (1M Na+)

Tm MW(umole) %GC

Ug per OD

Nmoles per OD

物配成100uM的储存液所需的缓冲液量(ul)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| NPYF | 20 | 70.30 | 59.85 | 6,185.95 | 55.00 | 34.00 | 5.50 | 55 |
| NPYR | 21 | 70.83 | 59.97 | 6,486.19 | 52.38 | 31.10 | 4.80 | 48 |
| CGRPF | 19 | 69.71 | 59.72 | 5,806.77 | 57.89 | 30.20 | 5.20 | 52 |
| CGRPR | 20 | 68.25 | 57.80 | 5,996.88 | 50.00 | 33.00 | 5.50 | 55 |
| NSEF | 20 | 70.30 | 59.85 | 6,039.92 | 55.00 | 30.80 | 5.10 | 51 |
| NSER | 20 | 70.30 | 59.85 | 6,074.88 | 55.00 | 34.60 | 5.70 | 57 |
| AQP4F | 23 | 75.33 | 63.73 | 7,104.58 | 56.52 | 31.30 | 4.40 | 44 |
| AQP4R | 26 | 77.62 | 65.15 | 8,060.21 | 53.85 | 30.60 | 3.80 | 38 |
| p65F | 18 | 69.06 | 59.58 | 5,342.46 | 61.11 | 32.10 | 6.00 | 60 |
| p65R | 20 | 68.25 | 57.80 | 6,036.89 | 50.00 | 32.60 | 5.40 | 54 |
| S-P-F | 18 | 64.50 | 55.02 | 5,452.54 | 50.00 | 30.50 | 5.60 | 56 |
| S-P-R | 18 | 62.22 | 52.74 | 5,476.57 | 44.44 | 29.60 | 5.40 | 54 |
| R-GAPDHF | 20 | 66.20 | 55.75 | 6,038.00 | 45.00 | 31.40 | 5.20 | 52 |
| R-GAPDHR | 20 | 64.15 | 53.70 | 6,071.00 | 40.00 | 29.10 | 4.80 | 48 |



Primer name: NPYF

Sequence (5'to 3') GTGTGTTTGGGCATTCTGGC



Primer name: CGRPF

Sequence (5'to 3') CTTAGAAAGCAGCCCAGGC



Primer name: NSEF

Sequence (5'to 3') TGGACCACATCAACAGCACC



Primer name: AQP4F

Sequence (5'to 3') GGGTTGGACCAATCATAGGCGCT

Primer name: NPYR

Sequence (5'to 3') AAATCAGTGTCTCAGGGCTGG



Primer name: CGRPR

Sequence (5'to 3') CAAAGTTGTCCTTCACCACC



Primer name: NSER

Sequence (5'to 3') TTCCGTGTAGCCAGCCTTGT



Primer name: AQP4R

Sequence (5'to 3') GCAGGAAATCTGAGGCCAGTTCTAGG



Primer name: p65F

Sequence (5'to 3') CCAAAGACCCACCTCACC



Primer name: S-P-F

Sequence (5'to 3') TCCGACAGTGACCAAATC



Primer name: R-GAPDHF

Sequence (5'to 3') TCCCTCAAGATTGTCAGCAA

Primer name: p65R

Sequence (5'to 3') CGCATTCAAGTCATAGTCCC



Primer name: S-P-R

Sequence (5'to 3') TGACCATGCCCATAAAGA



Primer name: R-GAPDHR

Sequence (5'to 3') AGATCCACAACGGATACATT

图 6 引物合成报告单组图

#### **4.7.2** 造模取脑后组织抽提：

(1)取组织块50-100㎎用液氮在研钵中研磨成粉末

(2)移入玻璃匀浆器加入1ml Trizol抽打匀浆

(3)移入1.5ml新离心管用5 ml针头抽打

(4)冰上孵育5分钟

(5) 离心12, 000g 4℃ 5分钟 取上清液移入1.5ml新离心管

(6)加0.2 ml氯仿，震荡，冰上孵育5分钟

(7) 离心<12,000g 4℃ 10分钟 取上层液相移入1.5ml新离心管

(8)加0.5 ml异丙醇，震荡，冰上孵育5分钟

(9)离心<12,000g 4℃5分钟弃去上清液

(10)加入1 ml 75%乙醇，震荡

(11)离心<7,500g 4℃5分钟弃去上清液

(12)室温下使之变透明

(13)加入DEPC处理水10μl -35μl溶解RNA（可保存在液氮或低温冰箱）

(14)走RNA变性电泳观察18s，28s条带，分光光度计检测260/280吸光度比值，计算RNA浓度

#### 4.7.3 **反转录** RT反应体系（第一步）：约20分钟

RNA 抽提物 5μl

Radome引物2μl RNA sin 0.5μl 1. 65℃15分钟

2.立即放入冰浴 RT反应体系（第二步）：约2小时RNA sin 0.5μl

10mM dNTP 1μl

5×RT 缓冲液 4μl 25mM MgCl2 4μl

AMV逆转录酶3μl (1) 37℃1.5小时

（2）2.94℃5-10分钟

(3)反应物保存于-20℃或进行PCR

#### 4.7.4 **PCR**扩**增** PCR反应体系：约4.5小时25mM MgCl2 2μl

10×PCR缓冲液5μl 10mM dNTP 1μl

上下游引物10pmol/μl 2.5μl×2 CDNA模板2.5μl

ddH2O 34μl Taq酶0.5μl

轻质石蜡油50μl

（1）94℃2分钟，55℃1分钟，72℃2分钟为第一个步1个循环（2）94℃45秒，55℃40秒，72℃1分钟为第二步30个循环（3）72℃10分钟

(4) 4取出后4℃5分钟后-20℃保存或走电泳

#### **4.7.5** 电泳：约1.25小时

（1）配0.5×TBE电泳缓冲液300 ml

（2）胶浓度1.7%(40ml 0.5×TBE加0.68g胶)

(3)微波炉中火2分钟溶解胶

(4)冷却至60℃加入溴乙锭2μl（10mg/ml的终浓度0.5μg/ml）

(5)放入梳子，浇板，待凝固

(6)加8μl PCR反应产物+2μl溴酚兰

（7）电泳50-80V（每㎝5V）

#### **4.7.6** 凝胶图象分析系统检测DNA信号灰度与内参灰度之比值

将凝胶置于美国UVP凝胶成像系统下，进行图像采集，计算NPY、CGRP、NF-κB、SP、AQP4和GAPDH的光密度值，以GAPDH的光密度值作为内参照，求出以上指标与GAPDH之间的比值。



点样电泳电泳仪



凝胶成像系统采集图象

图7 电泳仪器及主要操作步骤组图

### **4.8** 酶联免疫吸附实验（**ELISA**）法测定血清中神经元特异性烯醇化酶（**NSE**）、缓激肽（**BK**）、前列腺素**E2**（**PGE2**）、组织胺（**HA**）、基质金属蛋白酶（**MMP-9**）、高敏**C**反应蛋白（**hs-CRP**）含量。

**实验原理**

本实验采用大鼠酶联免疫分析（ELISA）试剂盒，本试剂盒应用双抗体夹心酶标免疫分析法测定标本中NSE、BK、PGE2、HA、MMP-9、hs-CRP含量。用纯化的抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入NSE、BK、PGE2、

HA、MMP-9、hs-CRP抗原、生物素化的抗大鼠NSE、BK、PGE2、HA、MMP-9、hs-CRP抗体、HRP标记的亲和素，经过彻底洗涤后用底物TMB显色。TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的NSE、BK、PGE2、HA、MMP-9、hs-CRP呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度（OD值），计算样品浓度。

**操作步骤**

各试剂在使用前平衡至室温。

1.加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。除空白孔外，余孔分别加标准溶液或待测样品100μl，注意不要有气泡，轻轻混匀，酶标板加上盖，37℃反应120分钟。

2.弃去液体，甩干，不用洗涤。

3.每孔加检测溶液A工作液100ul，37℃，60分钟。洗板3次，350μl/每孔，甩干。

4.每孔加检测溶液B工作液100ul，37℃，60分钟，洗板5次，甩干。

5.依序每孔加底物溶液90μl，37℃避光显色30分钟（此时肉眼可见标准品的前3-4孔有明显的梯度兰色，后3-4孔梯度不明显）。

6.依序每孔加终止溶液50μl，终止反应（此时兰色立转黄色）。用酶联仪在450nm波长依序测量各孔的光密度（OD值）。

**计算**

以标准物的浓度为横坐标（对数坐标），OD值为纵坐标（普通坐标），在半对数坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的OD值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与OD值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的OD值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

美国Bio-Rad伯乐酶标仪NSE（大鼠）图8实验仪器及部分实验结果组图

### 4.9 激光共聚焦荧光离子成像实验测定脑细胞内**Ca**++浓度，检测钙超载情况。原理：通过荧光离子成像实验测定脑细胞内Ca2+浓度，观察TBI大鼠模型脑

细胞内钙超载情况，研究Ca2+浓度与颅脑损伤严重程度之间的相关性。溶液的配置：

1、Fluo-3/AM溶于无水二甲基亚砜（DMSO）中配成终浓度为5um的溶液

2、人工脑脊液（ACSF）：NaCl 124mmol/L KCl 3.4mmol/L MgSo4 1.5mmol/L KH2PO4 1.2mmol/L NaHCO3 25mmol/L CaCl2 2.4mmol/L Glucose 10mmol/L HEPES 10

PH 7.4-7.6

3、磷酸缓冲液（PBS）：NaCl 124mmol/L KCl 3.4mmol/L MgSo4 1.5mmol/L KH2PO4 1.2mmol/L NaHCO3 25mmol/L

PH 7.4-7.6

4、胰蛋白酶：用PBS配成终浓度为0.25%的胰蛋白酶溶液

5. D-Hanks液：Nacl 8.0g KC l0.4g KH2PO4 0.06g NaHCO3 0.35g Na2HPO4. H2O 0.06g DH2O (三蒸水) 1000ml PH 7.40左右

6．Locker's液： Nacl 8.932g KCl 0.414g NaHCO3 0.302g CaCl2 0.253g MgCl2 0.133g Glucose 1.109g HEPES 1.333g DH2O (三蒸水) 1000ml

实验步骤：1．造模

2．分离细胞：实验组轻、中、重度损伤的大鼠分别在其伤后1h断头处死，

开颅取脑，取右顶叶水肿区大脑组织块在含有D-Hanks 液的玻璃皿中剪碎至

1×1×1mm3大小，用玻璃吸管将其移至4ml含0.25%胰蛋白酶的PBS溶液中，并通过95％O2和5％CO2混合气体，在37℃恒温水浴箱中消化20分钟（或将胰酶预先预热至37℃），用玻璃吸管依次轻轻吹打，见混浊，用胎牛血清终止胰酶消化。静置5-10分钟，取上清夜，用200M或300M尼龙网过滤，再用D-Hanks液约4-5ml加入混匀，重回收上清夜，再过滤。取过滤液离心，弃掉上清夜，用人工脑脊液12ml加入去掉上清液的试管中混匀。滴于已提前涂有多聚赖氨酸的

Petri皿上，静置20分钟，使细胞贴壁。整个过程通以95％O2和5％CO2混合气体，以保持细胞的活性。取少量混悬液滴于一载玻片上，放于倒置显微镜观察。

3．荧光标记：用人工脑脊液（ACSF）冲洗掉未贴壁的细胞组织，用微量加样器加入98μlACSF至含贴壁细胞的Petri皿中，并加入荧光探针，Fluo-3/AM 2μl（浓度为1000Um），从而荧光探针的终浓度为20uM。在37℃二氧化碳孵育箱中，孵育40分钟，然后用人工脑脊液轻轻冲洗2－3次，通以混合气体准备扫描。

4．激光扫描共聚焦显微镜检测：将载有样品的Petri皿固定在显微镜载物台上，先在10×低倍镜下找到脑细胞，然后在40×高倍镜下选择不同脑细胞进行扫描。激发光选用488nm,发射光为530nm,将该次扫描所用参数（Laser Power 463mW, Speed 10mm/s, Step size 0.3um, Samples/pt 9）存于硬盘，以后每次扫描均调出此参数。将所得荧光图像也存入硬盘，分析时读出。分析时选荧光最强的层面作为计算标准，基础荧光像素值定位1，取10个细胞计算其平均值作为每个样本的钙离子荧光像素值，并计算出不同损伤程度大鼠的脑细胞内钙游离钙平均荧光像素值。



激光扫描共聚焦显微镜LEICA TCS SPE（德国莱卡公司倒置荧光显微镜Leica DMI4000）



采集图象



分析图象

图9 激光扫描共聚焦显微镜及其操作组图

### **4.10** 流式细胞仪检测大鼠脑皮层细胞亚二倍体比率，了解脑细胞凋亡情况

#### 4.10.1 造模后收集细胞

PBS液中剥除硬脑膜、蛛网膜、髓质，留取创伤周边区皮质，剪碎，吸管吹打，滤网过滤，滤液离心2次，每次1500转，5分钟，倒掉上清，留取管底细胞作为待测细胞，调整待测细胞的浓度为0.5×105-1×106个/ml。

#### 4.10.2 固定染色

1000 r/min离心5min，弃去培养液，3ml PBS洗涤1次，离心去PBS, 70%冷乙醇（in PBS）4°C固定过夜。离心弃去固定液，3mlPBS重悬5min, 400目的筛网过滤1次，1000r/min离心5min，弃去PBS，用1ml PI染液染色，4℃避光30min。

#### 4.10.3 流式细胞仪（Flow Cytometry, FCM）检测, CellQuestTM软件获取数据, Modifit软件分析凋亡率、DNA亚二倍体的形成及细胞周期的变化。

#### 4.10.4 结果判断

在分析PI荧光的直方图时，先用门技术排除成双或聚集的细胞以及发微弱荧光的细胞碎片，在PI荧光的直方图上，凋亡细胞在G1/G0期前出现一亚二倍

体峰。



BD FACSCaliburTM样本细胞质量检测

全自动多色分析流式细胞仪系统（图中96.27%为脑皮层神经元细胞）



CellQuestTM软件获取数据ModFit *LT* TM软件分析数据图10流式细胞仪和采集分析软件组图

### **4.11** 多通道电生理记录仪记录分析**VPM**核痛敏神经元放电频率。



屏蔽室屏蔽柜（内有立体定位仪）



屏蔽室内电生理仪器**RM6240**BD多道生理信号采集处理系统



电生理金属记录电极（美国）

RM6240BD多道生理信号采集处理系统操作界面图11 电生理仪器设备组图



### 4.11 统计分析：

所有资料均使用SPSS 13.0统计分析软件包处理。数据变量用均数±标准差（*x*±s）表示；多组间均数比较采用LSD检验（方差齐）和Dunnett'sT检验（方差不齐），相关性分析采用Pearson相关分析。检验水平为双侧α=0.05，以P<0.05为有统计学显著性差异。

**结果**

## 1. 肉眼大体观测各组大鼠脑皮层损伤处及其周边脑组织损伤程度（见图**70-73**）可见对照组脑皮层未见明显损伤，轻度组脑皮层打击侧有轻度损伤，水肿不

明显，中度组脑皮层有较明显脑挫裂伤，水肿较明显，重度组脑皮层可见明显创伤区，出血并伴有明显水肿。

## **2.** 光镜苏木精—伊红染色法**( hematoxylin-eosin staining)**从组织细胞水平观测大鼠脑组织损伤程度（见图**74-81**）

可见对照组光镜下组织结构完整、清晰，细胞间质无水肿，细胞排列整齐，染色均匀，无出血水肿及损伤，未见炎性细胞浸润和血管扩张现象；轻度损伤组，主要表现为蛛网膜下腔出血，打击部位脑实质少量出血，皮层有轻度水肿；中度损伤组可见组织水肿、充血，细胞核间质水肿明显，可见炎性细胞、水肿胶质细

胞；重度损伤组可见组织细胞水肿明显，水肿细胞互相融合，可见巨大空泡，胞核固缩甚至溶解等。

## **3.** 透射电镜超微结构水平观测大鼠脑皮层损伤处及其周边脑组织损伤程度（见图**82-87**）

电镜下可见对照组细胞核呈类圆形，无变形，核膜完整，核周线粒体无肿胀、线粒体嵴排列较整齐。轻度损伤组细胞核轻度变形，核膜皱缩，核周线粒体轻度肿胀，线粒体嵴排列紊乱、断裂；中度损伤组细胞核变形较明显，核膜皱缩，核周线粒体肿胀较明显、线粒体嵴排列亦紊乱、断裂现象较多见；重度损伤组核明显变形、核周空泡变性，核周线粒体肿胀明显、甚至空泡化，线粒体嵴排列严重紊乱、断裂现象常见。另外，在实验中我们观察到神经突触间释放神经递质，可见囊泡位于突触附近。损伤组脑组织内可见血管内变形红细胞，并有单核细胞向血管外游走，变形，血管外有细胞器水肿变形（炎症反应表现）。

## **4.** 免疫组化检测各组大鼠脑皮层损伤区脑细胞中**SP**、**NPY**、**CGRP**、**NF-**κ**B**阳性表达情况（见图**88-103**）

表1 大鼠脑组织SP、NPY、CGRP和NF-κB阳性表达情况（阳性单位，Pu值）（x±s）

| 分组 | SP 阳性表达 | NPY 阳性表达 | CGRP 阳性表达 | NF-κB 阳性表达 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| C 组 | 6.01±1.35 | 8.43±0.66 | 4.13±1.15 | 7.19±0.56 |
| M1 组 | 8.43±1.03\* | 10.85±1.13\* | 6.51±1.04\* | 9.65±1.43\* |
| M2 组 | 10.96±1.51\*# | 13.04±1.05\*# | 9.04±1.31\*# | 12.13±1.09\*# |
| S 组 | 13.78±1.14\*#※ | 15.59±1.34\*#※ | 11.78±1.43\*#※ | 15.14±1.65\*#※ |

20

15

10

5

0

C组

M1组M2组S组

SP NPY CGRP NF-KB

检测指标

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与M1组相比，P﹤0.05；※与M2组相比，P﹤0.05.

阳性表达单位（Pu）

图12 大鼠脑皮层损伤区脑组织SP、NPY、CGRP和NF-κB阳性表达情况

**从表1图12可以看出，各损伤组大鼠脑皮层损伤区脑组织SP、NPY、CGRP和NF-κB阳性表达较对照组阳性表达有明显增强（P﹤0.05），且以上指标随损伤程度的加重而有增强趋势（P﹤0.05）。**

## **5.** **Western blot**检测大脑皮质损伤区**AQP4**蛋白表达情况（见图**104**）

**表 2** **各组大鼠脑皮质损伤区AQP4蛋白表达情况**（*x*±s）**分组**AQP4**蛋白表达**

C组0.34±0.11

M1组1.15±0.23\*

M2组1.69±0.30\*#

S组2.31±0.27\*#※

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与M1组相比，P﹤0.05；※与M2组相比，P﹤0.05.

**图13** **各组大鼠脑皮质损伤区AQP4蛋白表达情况**

2.5

2

1.5

1

0.5

0

C组

M1组

M2组

S组

分组

AQP4

AQP4相对表达量

**从表2图13可以看出，各损伤组大鼠脑皮层损伤区脑组织AQP4蛋白表达较对照组阳性表达有明显增强（P﹤0.05），且以上指标随损伤程度的加重而有增 强趋势（P﹤0.05）。**

## **6.** **RT-PCR**检测**SP**、**NPY、CGRP、NF-**κ**B、AQP-4**和**NSE**基因表达水平。（**见图105-111**）

表3 各组大鼠脑组织SP、NPY、CGRP、NF-κB、AQP-4和NSE基因表达水平（*x*±s）

| 分组 SP | NPY | CGRP | NF-κB | AQP4 | NSE |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| C 组 0.43±0.14 | 0.35±0.06 | 0.89±0.11 | 0.52±0.09 | 0.71±0.04 | 0.65±0.12 |
| M1 组 1.06±0.11\* | 0.93±0.04\* | 1.45±0.09\* | 1.16±0.06\* | 1.31±0.15\* | 1.17±0.09\* |
| M2 组 1.28±0.10\*# | 1.15±0.09\*# | 1.71±0.16\*# | 1.39±0.13\*# | 1.59±0.11\*# | 1.43±0.15\*# |
| S 组 1.54±0.15\*#※ | 1.31±0.07\*#※ | 2.04±0.13\*#※ | 1.66±0.10\*#※ | 1.85±0.10\*#※ | 1.77±0.13\*#※ |

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与M1组相比，P﹤0.05；※与M2组相比，P﹤0.05.

基因相对表达量

图14 各组大鼠脑皮层损伤区脑组织SP、NPY、CGRP、NF-κB、AQP-4和NSE基因表达水平

2.5

2

1.5

1

C组

M1组

M2组S组

0.5

0

SP

NPY

CGRP

NF-KB

AQP4

NSE

检测指标

从表3图14可以看出，各损伤组大鼠脑皮层损伤区脑组织SP、NPY、CGRP、NF-κB、AQP-4和NSE基因表达水平较对照组阳性表达有明显增强（P﹤0.05），且以上指标随损伤程度的加重而有增强趋势（P﹤0.05）**。**

## **7**. 酶联免疫吸附实验（**ELISA**）法测定血清中神经元特异性烯醇化酶（**NSE**）、缓激肽（**BK**）、前列腺素**E2**（**PGE2**）、组织胺（**HA**）、基质金属蛋白酶（**MMP-9**）和高敏**C**反应蛋白（**hs-CRP**）含量

表4 各组大鼠血清中NSE、BK、PGE2和HA含量（x±s）

| 分组 | NSE(ng/ml) | BK(pg/ml) | PGE2(pg/ml) | HA(pg/ml) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| C 组 | 9.81±1.53 | 22.45±1.16 | 26.84±1.32 | 9.67±2.55 |
| M1 组 | 40.53±3.60\* | 26.83±1.07\* | 35.97±1.70\* | 16.93±3.01\* |
| M2 组 | 81.31±5.93\*# | 29.15±1.13\*# | 43.55±3.01\*# | 24.57±2.98\*# |
| S 组 | 135.66±9.70\*#※ | 33.69±1.95\*#※ | 49.81±2.18\*#※ | 31.45±2.60\*#※ |

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与M1组相比，P﹤0.05；※与M2组相比，P﹤0.05

血清中含量

图15 各组大鼠血清中NSE、BK、PGE2和HA含量

160

140

120

100

80

60

40

20

0

C组

M1组

M2组S组

NSE（ng/ml） BK（pg/ml） PGE2（pg/ml） HA（pg/ml）

检测指标

从表4图15可以看出，各损伤组大鼠血清中NSE、BK、PGE2和HA含量较对照组明显增高（P﹤0.05），且以上指标随损伤程度的加重而有增强趋势（P﹤0.05）。

表5 各组大鼠血清中hs-CRP和MMP-9含量（x±s）

| 分组 | hs-CRP(mg/ml) | MMP-9（μg/ml） |
| --- | --- | --- |
| C 组 | 0.46±0.17 | 0.35±0.13 |
| M1 组 | 0.85±0.14\* | 0.79±0.19\* |
| M2 组 | 1.15±0.13\*# | 1.17±0.15\*# |
| S 组 | 1.49±0.16\*#※ | 1.58±0.20\*#※ |

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与M1组相比，P﹤0.05；※与M2组相比，P﹤0.05

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1.8  1.6  1.4 | | | |
| 1.2  1  0.8  0.6 | | | C组M1组  M2组S组 |
| 0.4  0.2  0 | hs-CRP(mg/ml) | MMP-9（μg/ml） |  |

**图16** **各组大鼠血清中hs-CRP和MMP-9含量**

从表5图16可以看出，各损伤组大鼠血清中hs-CRP和MMP-9含量较对照组明显增高（P﹤0.05），且以上指标随损伤程度的加重而有增强趋势（P﹤0.05）。

## **8.** 激光共聚焦荧光离子成像实验测定脑细胞内**Ca**++浓度，检测钙超载情况（见图**112-115**）

**表 6** **各组大鼠脑皮质损伤区钙离子浓度平均像素值**（*x*±s）**分组**钙离子浓度

C组60.34±10.55

M1组88.53±9.69\*

M2组113.37±11.06\*#

S组145.91±15.58\*#※

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与M1组相比，P﹤0.05；※与M2组相比，P﹤0.05

| 200 | |
| --- | --- |
| 150  100  50 | C组  M1组  M2组S组 |
| 0  钙离子浓度 | |

**图17** **各组大鼠脑皮质损伤区钙离子浓度**

从表6图17可以看出，各损伤组大鼠脑皮质损伤区钙离子浓度较对照组明显增高（P﹤0.05），且以上指标随损伤程度的加重而有增强趋势（P﹤0.05）。

## **9.** 流式细胞仪检测大鼠脑皮层细胞亚二倍体比率，了解脑细胞凋亡情况（见图**116-118**）

**表7** **各组大鼠创伤区皮层脑细胞亚二倍体比率（***x*±s**）**

**分组亚二倍体比率（%）**C组2.04±1.51

M1组8.98±1.29\*

M2组16.13±1.28\*#

S组20.11±1.40\*#※

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与M1组相比，P﹤0.05；※与M2组相比，P﹤0.05

25

20

15

10

5

0

亚二倍体比率

C组

M1组

M2组S组

图18 各组大鼠创伤区皮层脑细胞亚二倍体比率（%）

从表6图18可以看出，各损伤组大鼠脑皮质损伤区皮层脑细胞亚二倍体比率较对照组明显增高（P﹤0.05），且以上指标随损伤程度的加重而有增强趋势

（P﹤0.05）。

## **10.** 多通道电生理记录仪记录分析**VPM**核痛敏神经元放电频率（见图**119-122**）

**表 8** **各组大鼠VPM核痛敏神经元放电频率（Hz）（***x*±s**）分组放电频率（Hz）**

C组8.51±5.15

M1组28.53±6.34\*

M2组49.19±8.50\*#

S组76.88±9.63\*#※

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与M1组相比，P﹤0.05；※与M2组相比，P﹤0.05

C组

M1组

M2组S组

**图19** **各组大鼠VPM核痛敏神经元放电频率（Hz）**

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

放电频率

从表6图19可以看出，各损伤组大鼠脑VPM核痛敏神经元放电频率较对照组明显增高（P﹤0.05），且以上指标随损伤程度的加重而有增强趋势（P﹤0.05）。

## 11. 相关性分析：

（1）脑组织SP、NPY、CGRP、NF-κB、AQP4、NSE基因表达与蛋白表达相关性分析：

脑组织SP基因与蛋白表达之间成正相关，相关系数为R= 0.8499, t=9.9414, P<0.05；直线回归方程: Y=3.0688+6.2452X (F=98.8317, P<0.05).（见图20）

)

u (P

表达蛋白

SP

织

脑组



脑组织SP基因表达

脑组织SP蛋白表达(Pu )

图20 脑组织SP基因与蛋白表达（Pu）直线回归图

脑组织SP基因表达

脑组织NPY基因与蛋白表达之间成正相关，相关系数为R= 0.9016, t=12.8457, P<0.05；直线回归方程: Y=-0.779+1.5777X (F=165.0116, P<0.05). (见图21)

)

(Pu达表

蛋白



脑组织NPY基因表达

脑组织NPY蛋白表达(Pu )

图21 脑组织NPY基因与蛋白表达（Pu）直线回归图

Y

NP

脑组织

脑组织NPY基因表达

脑组织CGRP基因与蛋白表达之间成正相关，相关系数为R= 0.8802, t=11.4311, P<0.05；直线回归方程: Y=-1.5481+6.1833X (F=130.6707, P<0.05).

)

u (P

表达蛋白



脑组织CGRP基因表达

（见图22）

图22 脑组织CGRP基因与蛋白表达（Pu）直线回归图

P R

CG

织

脑组

脑组织CGRP基因表达

脑组织CGRP蛋白表达(Pu )

脑组织NF-κB基因与蛋白表达之间成正相关，相关系数为R= 0.8598, t=10.3795, P<0.05；直线回归方程: Y=3.4746+6.385X (F=107.7335, P<0.05).

（见图23）

)

u

(P

达表

蛋白



脑组织NF-κB基因表达

脑组织NF-κB蛋白表达(Pu )

图23 脑组织NF-κB基因与蛋白表达（Pu）直线回归图

B

κ

-

NF

织

脑组

脑组织NF-κB基因表达

脑组织AQP4基因与蛋白表达之间成正相关，相关系数为R= 0.9016, t=12.8457, P<0.05；直线回归方程: Y=-0.779+1.5777X (F=165.0116, P<0.05).

（见图24）

达表

蛋白

图24 脑组织AQP4基因与蛋白表达（Pu）直线回归图

P4 AQ

织

脑组

脑组织AQP4基因表达



脑组织AQP4基因表达

脑组织AQP4蛋白表达

脑组织NSE基因与血清NSE含量之间成正相关，相关系数为R= 0.9265, t=15.175, P<0.05；直线回归方程: Y=-63.4117+103.9202X (F=230.2808, P<0.05). (见图25)

）

l

/m ng

（



脑组织NSE基因表达

血清NSE含量（ng/ml）

图25 脑组织NSE基因表达与血清NSE含量（ng/ml）直线回归图

含量

E

NS

血清

脑组织NSE基因表达

脑组织中SP、NPY、CGRP、NF-κB、AQP4、NSE基因表达与蛋白阳性表达相关性分析结果显示，各指标基因表达与其对应的阳性蛋白含量表达成正相关性，且损伤越重，基因表达越强，其对应的阳性蛋白含量表达也越多。

（2）致痛物质缓激肽（BK）、前列腺素E2(PGE2)、组胺（HA）与致痛致炎神经递质-P物质（SP）相关性分析：

血清BK含量与脑组织SP基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.8838，

t=11.6447, P<0.05;直线回归方程: Y=-1.4018+0.0884X (F=135.5983, P<0.05).

（见图26）

表达基因



血清BK含量（pg/ml）

脑组织SP基因表达

图26 血清BK含量（pg/ml）与脑组织SP基因表达直线回归图

SP

织

脑组

血清BK含量（pg/ml）

血清PGE2含量与脑组织SP基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.9171, t=14.1783, P<0.05；直线回归方程: Y=-0.6542+0.0443X (F=201.0251, P<0.05).

（见图27）

达表

基因

SP



血清PGE2含量（pg/ml）

脑组织SP基因表达

图27 血清PGE2含量（pg/ml）与脑组织SP基因表达直线回归图

织

脑组

血清PGE2含量（pg/ml）

血清HA含量与脑组织SP基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.8815, t=11.5062, P<0.05；直线回归方程: Y=0.1717+0.0438X (F=132.3923, P<0.05).

（见图28）

表达基因

图 28 血清HA含量（pg/ml）与脑组织SP基因表达直线回归图

SP

织

脑组

血清HA含量（pg/ml）



血清HA含量（pg/ml）

脑组织SP基因表达

血清BK含量与脑组织SP蛋白表达之间成正相关，相关系数为R=0.8605, t=10.41, P<0.05；直线回归方程: Y=-7.9387+0.6325X (F= 108.3690, P<0.05).

（见图29）

）

Pu

（

表达蛋白



血清BK含量（pg/ml）

脑组织SP蛋白表达（Pu）

图29 血清BK含量（pg/ml）与脑组织SP蛋白表达（Pu）直线回归图

SP

织

脑组

血清BK含量（pg/ml）

血清PGE2含量与脑组织SP蛋白表达之间成正相关，相关系数为R=0.8948, t=12.3526, P<0.05；直线回归方程: Y=-2.6164+0.3178X (F=152.5878, P<0.05).

（见图30）

)

u

(P

达表

蛋白

图30 血清PGE2含量（pg/ml）与脑组织SP蛋白表达（Pu）直线回归图

SP

织

脑组

血清PGE2含量（pg/ml）



血清PGE2含量（pg/ml）

脑组织SP蛋白表达(Pu )

血清HA含量与脑组织SP阳性表达之间成正相关，相关系数为R=0.8909, t=12.091, P<0.05；直线回归方程: Y=3.0719+0.3253X (F= 146.1911, P<0.05).

（见图31）

)

u (P

表达蛋白



血清HA含量（pg/ml）

脑组织SP蛋白表达(Pu )

图 31 血清HA含量（pg/ml）与脑组织SP蛋白表达（Pu）直线回归图

SP

织

脑组

血清HA含量（pg/ml）

致痛物质缓激肽（BK）、前列腺素E2(PGE2)、组胺（HA）与致痛致炎神经递质-P物质（SP）成正相关性，分析结果显示，TBI后，由于组织细胞坏死，引发炎症，局部释放致炎致痛物质（BK、PGE2、HA）含量越多，神经递质SP基因及蛋白表达也增多。损伤程度越重，其表达及含量越多。

（3）脑组织SP表达与脑VPM核痛敏神经元放电频率相关性分析：

脑组织SP基因表达与脑VPM核痛敏神经元放电频率之间成正相关，相关系

数为R=0.8851, t=11.7224, P<0.05；直线回归方程: Y=-18.0739+54.6805X (F= 137.4138, P<0.05). (见图32)

）

Hz

（

率频

放电经元



脑组织SP基因表达

脑VPM核痛敏神经元放电频率（Hz）

图32 脑组织SP基因表达与脑VPM核痛敏神经元放电频率（Hz）直线回归图

神敏痛核

VPM

脑

脑组织SP基因表达

脑组织SP蛋白表达与脑VPM核痛敏神经元放电频率之间成正相关，相关系数为R=0.9204, t=14.5112, P<0.05；直线回归方程: Y=-34.981+7.738X (F= 210.5752, P<0.05). (见图33)

）

Hz

（

率频电放

经元



脑组织SP蛋白表达（Pu）

脑VPM核痛敏神经元放电频率（Hz）

图33 脑组织SP蛋白表达（Pu）与脑VPM核痛敏神经元放电频率（Hz）直线回归图

神敏

核痛

M

VP

脑

脑组织SP蛋白表达（Pu）

脑组织SP表达与VPM核痛敏神经元放电频率相关性分析结果显示，致痛物质-P物质表达含量越高，VPM核痛敏神经元放电频率越高。

（4）脑组织SP与神经肽-NPY、CGRP基因/蛋白表达之间相关性分析：

脑组织SP与NPY基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.933, t=16.0378,

P<0.05；直线回归方程: Y=0.0653+0.8081X (F=257.2117, P<0.05). (见图34)

表达基因

Y

NP



脑组织SP基因表达

脑组织NPY基因表达

图 34 脑组织SP与NPY基因表达直线回归图

织

脑组

脑组织SP基因表达

脑组织SP与NPY蛋白表达之间成正相关，相关系数为R=0.8647, t=10.612, P<0.05；直线回归方程: Y=4.307+0.7831X (F=112.6149, P<0.05). (见图35)

)

(Pu

表达蛋白



脑组织SP蛋白表达（Pu）

脑组织NPY蛋白表达(Pu )

图 35 脑组织SP与NPY蛋白表达（Pu）直线回归图

Y

NP

织

脑组

脑组织SP蛋白表达（Pu）

脑组织SP与CGRP基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.9108, t=13.6005, P<0.05；直线回归方程: Y=0.5126+0.9381X (F=184.9746, P<0.05). (见图36)

达

表

基因P R

CG

图 36 脑组织SP与CGRP基因表达直线回归图

织

脑组

脑组织SP基因表达



脑组织SP基因表达

脑组织CGRP基因表达

脑组织SP与CGRP蛋白表达之间成正相关，相关系数为R=0.8721, t=10.9864, P<0.05；直线回归方程: Y=-0.5424+0.8587X (F=120.7017, P<0.05). (见图37)

)

u

(P

表达蛋白

P

R



脑组织SP蛋白表达 （Pu）

脑组织CGRP蛋白表达(Pu )

图 37 脑组织SP与CGRP蛋白表达（Pu）直线回归图

CG

织

脑组

脑组织SP蛋白表达 （Pu）

NPY与CGRP基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.9368, t=16.5055, P<0.05；直线回归方程: Y=0.4802+1.1145X (F=272.4319, P<0.05). (见图38)

表达基因

P

R

图 38 脑组织NPY与CGRP基因表达直线回归图

CG

脑组织

脑组织NPY基因表达



脑组织NPY基因表达

脑组织CGRP基因表达

NPY与CGRP蛋白表达之间成正相关，相关系数为R=0.8602, t=10.3994,

P<0.05；直线回归方程: Y=-3.3343+0.9353X (F=108.1467, P<0.05). (见图39)

）

Pu

（ 达表

蛋白

P



脑组织NPY蛋白表达（Pu）

脑组织CGRP蛋白表达（Pu）

图 39 脑组织NPY与CGRP蛋白表达（Pu）直线回归图

R

CG

织

脑组

脑组织NPY蛋白表达（Pu）

脑组织SP与神经肽-NPY、CGRP基因和蛋白表达之间相关性分析结果显示，

P物质表达及释放越多，神经肽NPY和CGRP表达越多。这可能与SP是神经递质传导痛觉信息至上级神经元直至大脑高级中枢，引起中枢分泌神经肽类物质增加有关。

（5）脑组织SP与炎症因子-核转录因子-KB(NF-κB)及炎症反应指标-血清高敏感性C反应蛋白（hs-CRP）之间相关性分析：

脑组织SP与NF-κB基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.9392，

t=16.865, P<0.05;直线回归方程: Y=0.1676+0.9433X (F=284.4280, P<0.05).

（见图40）

达表

基因

B

κ



脑组织SP基因表达

脑组织NF-κB基因表达

图 40 脑组织SP与NF-κB基因表达直线回归图

-

NF

织

脑组

脑组织SP基因表达

脑组织SP与NF-κB蛋白表达之间成正相关，相关系数为R=0.8699, t=10.8742, P<0.05；直线回归方程: Y=2.3825+0.8829X (F=118.2476, P<0.05).

（见图41）

)

u

(P

达表

蛋白

B



脑组织SP基因表达 （Pu）

脑组织NF-κB蛋白表达(Pu )

图 41 脑组织SP与NF-κB蛋白表达（Pu）直线回归图

κ

-

NF

脑组织

脑组织SP基因表达 （Pu）

脑组织SP基因表达与血清hs-CRP含量之间成正相关，相关系数为R= 0.8709, t=10.924, P<0.05；直线回归方程: Y=0.0953+0.828X (F=119.3346, P<0.05). (见图42)

）

l

m

/

mg

（

图 42 脑组织SP基因表达与血清hs-CRP含量（mg/ml）直线回归图

含量

-CRP

hs

血清

脑组织SP基因表达



脑组织SP基因表达

血清hs-CRP含量（mg/ml）

脑组织SP蛋白表达与血清hs-CRP含量之间成正相关，相关系数为R= 0.8749, t=11.1358, P<0.05；直线回归方程: Y=-0.1217+0.1132X (F=124.0049, P<0.05). (见图43)

）

l

m

/

mg

含量（



脑组织SP蛋白表达 （Pu）

血清hs-CRP含量（mg/ml）

图 43 脑组织SP蛋白表达（Pu）与血清hs-CRP含量（mg/ml）直线回归图

RP C

-

hs

血清

脑组织SP蛋白表达 （Pu）

脑组织NF-κB基因表达与血清hs-CRP含量之间成正相关，相关系数为R= 0.8862, t=11.7927, P<0.05；直线回归方程: Y=-0.0058+0.839X (F=139.0680, P<0.05). (见图44)

）

l

m

/

mg

（

含量

图 44 脑组织NF-κB基因表达与血清hs-CRP含量（mg/ml）直线回归图

-CRP

hs

血清

脑组织SP基因表达



脑组织SP基因表达

血清hs-CRP含量（mg/ml）

脑组织NF-κB蛋白表达与血清hs-CRP含量之间成正相关，相关系数为R= 0.8789, t=11.3583, P<0.05；直线回归方程: Y=-0.249+0.112X (F=129.0120, P<0.05). (见图45)

）

l

m

/

mg

（

含量



脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

血清hs-CRP含量（mg/ml）

RP C

-

hs

血清

脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

图 45 脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）与血清hs-CRP含量（mg/ml）直线回归图

脑组织SP与NF-κB及血清hs-CRP含量之间相关性分析显示P物质表达及释放越多，炎症反应指标hs-CRP和NF-κB表达越高，炎症反应越严重，这与

SP是神经递质，也是致炎因子有关。TBI后，SP含量增多，一方面可作为神经递质向上级神经元传递痛觉信息，使大脑感知疼痛部位、疼痛性质等信息，促使大脑做出躲避、痛苦情绪等反应，释放相应神经肽类物质，作用于损伤部位，也作用于中枢系统本身；另一方面，SP作为致炎因子，启动NF-κB表达增强，引起炎症的级联放大反应，导致反映机体炎症反应程度的敏感性指标hs-CRP含量增加，加重炎症。

NF-κB与hs-CRP之间也呈正相关，NF-κB表达越多，血清hs-CRP含量越高，炎症反应越重。这是由于核转录因子-KB作为炎症启动因子可引起炎症的级联放大反应，激活之可触发炎症，高敏感性C反应蛋白（hs-CRP）是反映机体炎症反应程度的敏感性指标之一，炎症反应越重，其血清含量越高。

（6）脑组织SP与脑水通道蛋白AQP4、血清基质蛋白水解酶9(MMP-9)之间相关性分析：

脑组织SP基因表达与血清MMP-9之间成正相关，相关系数为R=0.8844, t=11.6831, P<0.05；直线回归方程: Y=-0.1047+0.9997X (F=136.4941, P<0.05).

（见图46）

）

l

m g/ μ

（



脑组织SP基因表达

图 46 脑组织SP基因表达与血清MMP-9含量（μg/ml）直线回归图

含量

P-9 MM

血清

脑组织SP基因表达

血清MMP-9含量（μg/ml）

脑组织SP蛋白表达与血清MMP-9含量之间成正相关，相关系数为R=0.8891, t=11.9766, P<0.05；直线回归方程: Y=-0.3677+0.1368X (F=143.4392, P<0.05).（见图47）

）

l

m g/ μ

（

含量

-9

MMP

血清



脑组织SP蛋白表达（Pu）

血清MMP-9含量（μg/ml）

图 47 脑组织SP蛋白表达（Pu）与血清MMP-9含量（μg/ml）直线回归图

脑组织SP蛋白表达（Pu）

脑组织SP与AQP4基因表达之间成正相关，相关系数为R= 0.9354, t=16.3021, P<0.05；直线回归方程: Y=0.3389+0.9513X (F=265.7594, P<0.05).

（见图48）

表达



脑组织SP基因表达

图 48 脑组织SP与AQP基因表达直线回归图

基因

P4

AQ

织

脑组

脑组织SP基因表达

脑组织AQP4基因表达

血清MMP-9含量与脑组织AQP4基因表达之间成正相关，相关系数为R= 0.8788，t=11.352, P<0.05；直线回归方程: Y=0.5948+0.7907X (F=

128.8680, P<0.05). (见图49)

表达基因



血清MMP-9含量（μg/ml）

脑组织SP基因表达

图 49 血清MMP-9含量（μg/ml）与脑组织SP基因表达直线回归图

SP

织

脑组

血清MMP-9含量（μg/ml）

血清MMP-9含量与脑组织AQP4蛋白表达之间成正相关，相关系数为R= 0.8792, t=11.3778, P<0.05；直线回归方程: Y=0.0264+1.3844X (F=

129.4553, P<0.05). (见图50)

）

Pu

表达（

图 50 血清MMP-9含量（μg/ml）与脑组织SP蛋白表达（Pu）直线回归图

蛋白

SP

织

脑组

血清MMP-9含量（μg/ml）



血清MMP-9含量（μg/ml）

脑组织SP蛋白表达（Pu）

脑组织SP与脑水通道蛋白AQP4、血清基质蛋白水解酶9(MMP-9)之间相关性分析结果显示，P物质表达及释放越多，炎症反应越重，MMP-9含量增多，降解和破坏血管内皮基膜的能力越强，引起血管通透性增加，炎性物质渗出增多，组织细胞间渗透压改变，导致血管源性脑水肿。另外，P物质表达及释放越多可引起AQP4表达也增多，引起细胞膜通透性增高，水钠潴留，导致细胞性脑水肿。血管源性脑水肿和细胞性脑水肿共同作用导致创伤性脑水肿的形成和发展，引起颅内压增高，甚至脑疝。

（7）脑组织SP基因/蛋白表达与损伤皮层脑细胞钙离子含量及细胞凋亡指标-亚二倍体（Hd）比率之间相关性分析：

脑组织SP基因表达与损伤皮层脑细胞钙离子含量之间成正相关，相关系数为R=0.8555, t=10.184, P<0.05；直线回归方程: Y=29.6911+67.2219X (F= 103.7142, P<0.05). (见图51)

量

含子离钙



脑组织SP基因表达

脑脑细胞钙离子含量

图 51 脑组织SP基因表达与脑细胞钙离子含量直线回归图

胞

脑组织SP基因表达

脑组织SP蛋白表达与损伤皮层脑细胞钙离子含量之间成正相关，相关系数为R=0.8423, t=9.6333, P<0.05；直线回归方程: Y=13.8593+9.0069X (F= 92.8000, P<0.05). (见图52)

量含

离子



脑组织SP蛋白表达（Pu）

脑细胞钙离子含量

图 52 脑组织SP蛋白表达（Pu）与脑细胞钙离子含量直线回归图

胞钙脑细

脑组织SP蛋白表达（Pu）

脑组织SP基因表达与损伤皮层脑细胞亚二倍体（Hd）比率之间成正相关，相关系数为R=0.9154, t=14.0146, P<0.05；直线回归方程: Y=-4.4359+15.0988X (F=196.4079, P<0.05). (见图53)

）

%

率（

）比



脑组织SP基因表达

亚二倍体（Hd）比率（%）

图 53 脑组织SP基因表达与亚二倍体（Hd）比率（%）直线回归图

Hd

（

倍体亚二

脑组织SP基因表达

脑组织SP蛋白表达与损伤皮层脑细胞亚二倍体（Hd）比率之间成正相关，相关系数为R=0.9145, t=13.9372, P<0.05；直线回归方程: Y=-8.2836+2.0528X (F=194.2450, P<0.05). (见图54)

）

%

（ 率

）比

图 54 脑组织SP蛋白表达（Pu）与亚二倍体（Hd）比率（%）直线回归图

Hd

（ 体

亚二倍

脑组织SP蛋白表达（Pu）



脑组织SP蛋白表达（Pu）

亚二倍体（Hd）比率（%）

）

%

率（

）比



脑细胞钙离子含量

损伤皮层脑细胞钙离子含量与亚二倍体（Hd）比率之间成正相关，相关系数为R=0.9023, t=12.8992, P<0.05；直线回归方程: Y=-7.5121+0.1894X (F= 166.3893, P<0.05). (见图55)

图55 损伤皮层脑细胞钙离子含量与亚二倍体（Hd）比率（%）直线回归图

Hd

（

倍体

亚二

脑细胞钙离子含量

亚二倍体（Hd）比率（%）

脑组织SP与损伤皮层脑细胞钙离子含量及细胞凋亡指标-亚二倍体（Hd）比率之间相关性分析结果显示，P物质表达及释放越多，损伤皮层脑细胞钙离子含量越高（钙超载现象越严重），脑细胞亚二倍体（Hd）比率也越高（细胞凋亡越严重）。提示SP的痛性炎症作用可导致损伤皮层脑细胞钙超载和脑细胞凋亡，进而影响脑功能，引起神经功能障碍。

（8）脑组织SP与神经元特异性烯醇化酶（NSE）之间相关性分析：

脑组织SP与NSE基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.9112, t=13.6328,

<0.05；直线回归方程: Y=0.2792+0.905X (F= 185.8536, P<0.05). (见图56)

达表

基因

E



脑组织SP基因表达

脑组织NSE基因表达

图 56 脑组织SP与NSE基因表达直线回归图

NS

织

脑组

脑组织SP基因表达

脑组织SP蛋白表达与血清NSE含量之间成正相关，相关系数为R=0.9179, t=14.2592, <0.05；直线回归方程: Y=-69.4132+13.9158X (F=203.3243, P<0.05).

（见图57）

）

l

m

/ g

（ 量



脑组织SP蛋白表达（Pu）

血血清N NSE含量（n ng/ml）

图57 脑组织SP蛋白表达（Pu）与血清NSE含量（ng/ml）直线回归图

E含S

清

脑组织SP蛋白表达（Pu）

相关性分析结果显示，脑组织P物质表达及释放越多，炎症反应越严重，神经细胞坏死越多，神经元特异性烯醇化酶表达及含量也越高，这可能与P物质本身也可促使末梢血管舒张，血管通透性增高，炎性物质渗出增多，产生和加重炎症反应，损神经细胞有关。

（9）脑组织神经肽Y(NPY) /降钙素相关基因肽（CGRP）与核转录因子-KB(NF-

κB）基因/蛋白表达之间相关性分析：

脑组织NPY与NF-κB基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.9511, t=18.972, P<0.05；直线回归方程: Y=0.1512+1.1033X (F=359.9385, P<0.05).

（见图58）

达表

基因



脑组织NPY基因表达

图58 脑组织NPY与NF-κB基因表达直线回归图

B

κ

-

NF

织

脑组

脑组织NPY基因表达

脑组织NF-κB基因表达

脑组织NPY与NF-κB蛋白表达之间成正相关，相关系数为R=0.8753, t=11.1559, P<0.05；直线回归方程: Y=-0.7185+0.9809X (F= 124.4542, P<0.05).

（见图59）

）

Pu

（ 达表

蛋白

B



脑组织NPY蛋白表达（Pu）

脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

图59 脑组织NPY与NF-κB蛋白表达（Pu）直线回归图

κ

-

NF

脑组织

脑组织NPY蛋白表达（Pu）

脑组织CGRP与NF-κB基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.9191，

t=14.376, P<0.05;直线回归方程: Y=-0.1814+0.8962X (F= 206.6695, P<0.05).

（见图60）

)

u (P

达

表

蛋白



脑组织CGRP基因表达

图 60脑组织CGRP与NF-κB基因表达直线回归图

B

κ

-

NF

织

脑组

脑组织CGRP基因表达

脑组织NF-κB蛋白表达(Pu )

脑组织CGRP与NF-κB蛋白表达之间成正相关，相关系数为R=0.8502, t=9.9552, P<0.05；直线回归方程: Y=4.1345+0.8763X (F=99.1064, P<0.05).

（见图61）

）

Pu

（ 达表

蛋白



脑组织CGRP蛋白表达（Pu）

脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

B

κ

-

NF

织

脑组

脑组织CGRP蛋白表达（Pu）

图 61脑组织CGRP与NF-κB蛋白表达（Pu）直线回归图

脑组织NPY/CGRP与NF-κB基因蛋白表达之间相关性分析结果提示，TBI后，NPY/CGRP表达越高，NF-κB表达也越高，炎症反应也越重。

（10）脑组织核转录因子-KB(NF-κB)与 NSE、AQP4、钙离子浓度、亚二倍体（Hd）之间相关性分析：

脑组织NF-κB与NSE基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.9233, t=14.817, P<0.05；直线回归方程: Y=0.1733+0.9131X (F=219.5433, P<0.05).

（见图62）

达表

基因

E



脑组织NF-κB基因表达

脑组织NSE基因表达

图 62脑组织NF-κB与NSE基因表达直线回归图

NS

织

脑组

脑组织NF-κB基因表达

脑组织NF-κB蛋白表达与血清NSE含量之间成正相关，相关系数为R=0.9047, t=13.0904, P<0.05；直线回归方程: Y=-82.1888+13.5143X (F=171.3589, P<0.05). (见图63)

）

l

m

/

ng

（

含量



脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

血清NSE含量（ng/ml）

图 63脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）与血清NSE含量（ng/ml）直线回归图

E

NS

血清

脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

脑组织NF-κB与AQP4基因表达之间成正相关，相关系数为R=0.9547, t=19.7736, P<0.05；直线回归方程Y=0.2192+0.9668X (F= 390.9949, P<0.05).

（见图64）

达表

基因

B

图 64脑组织NF-κB与AQP4基因表达直线回归图

κ

-

NF

织

脑组

脑组织AQP4基因表达



脑组织AQP4基因表达

脑组织NF-κB 基因表达

脑组织NF-κB与AQP4蛋白表达之间成正相关，相关系数为R=0.8799, t=11.4136, P<0.05；直线回归方程 Y=-0.9443+0.21X (F= 130.2708, P<0.05).

（见图65）

表达蛋白

P4



脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

脑组织AQP4蛋白表达

图 65脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）与AQP4蛋白表达直线回归图

AQ

织

脑组

脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

脑组织NF-κB基因表达与损伤区皮层脑细胞钙离子浓度之间成正相关，相关系数为R=0.8744, t=11.1064, P<0.05；直线回归方程: Y=21.1256+68.411X (F=123.3511, P<0.05). (见图66)

度浓子离

图 66脑组织NF-κB基因表达与脑细胞钙离子浓度直线回归图

胞钙脑细

脑组织NF-κB基因表



脑组织NF-κB基因表

脑细胞钙离子浓度

脑组织NF-κB蛋白表达与损伤区皮层脑细胞钙离子浓度之间成正相关，相关系数为R= 0.8586, t=10.3257, P<0.05；直线回归方程: 2.2879+9.0465X (F=106.6205, P<0.05). (见图67)

度浓

离子胞钙



脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

脑细胞钙离子浓度

图 67脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）与脑细胞钙离子浓度直线回归图

脑细

脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

脑组织NF-κB基因表达与损伤区皮层脑组织亚二倍体（Hd）比率之间成正相关，相关系数为R=0.9522, t=19.2045, P<0.05；直线回归方程: Y=-6.6823+15.6386X (F=368.8146, P<0.05). (见图68)

）

%

率（

）比

Hd

（

图 68脑组织NF-κB基因表达与亚二倍体（Hd）比率（%）直线回归图

体倍二

织亚

脑组

脑组织NF-κB基因表达



脑组织NF-κB基因表达

脑组织亚二倍体（Hd）比率（%）

脑组织NF-κB蛋白表达与损伤区皮层脑组织亚二倍体（Hd）比率之间成正相关，相关系数为R= 0.8848, t=11.703, P<0.05；直线回归方程: Y= Y=-9.7627+1.9568X (F=136.9604, P<0.05). (见图69)

）

%

率（

）比

Hd

（



脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

脑组织亚二倍体（Hd）比率（%）

体倍二

织亚

脑组

脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）

图 69脑组织NF-κB蛋白表达（Pu）与亚二倍体（Hd）比率（%）直线回归图

脑组织NF-κB与NSE、AQP4、钙离子浓度、亚二倍体（Hd）比率之间相关性分析结果显示：TBI后NF-κB表达越高，炎症反应越重，NSE(反映神经细胞损伤)、AQP4（反映细胞性脑水肿）、钙离子浓度（反映钙超载）和亚二倍体（反映脑细胞凋亡）比率也越高。

**讨论**

创伤性脑损伤（TBI）是致死致残率很高的一种常见病。除原发性脑损伤外，继发性脑损伤对TBI的预后也起着重要影响[1-3]。目前有关TBI的发生发展机理至今尚未完全明确，国内外有多种学说，如：血脑屏障学说，钙通道学说，自由基学说，脑微循环学说，能量代谢学说等[4-6]。

1、血脑屏障学说：血脑屏障结构和功能损害是血管源性脑水肿的病理基础。脑损伤后血脑屏障开放，通透性增加，血中大分子物质及水分从血管内移出进入脑组织内，积聚于细胞外间隙，形成血管源性脑水肿[7, 8]。

2、钙通道学说：钙对神经细胞和死亡起着决定性作用。研究发现脑损伤后脑组织内钙的浓度升高，认为其与脑水肿的发生发展有关。脑损伤早期大量的Ca2+进入细胞内，胞浆中钙浓度异常升高，可达正常的10～15倍，即钙超载，是引起神经细胞损害、血脑屏障破坏和创伤性脑水肿的关键因素[9-11]。

3、自由基学说：氧自由基是一类具有高度化学反应活性的含氧基团，主要有超氧阴离子、羟自由基、和过氧化氢。早在1972年，国外学者就用自由基学说解释脑水肿的发生机理，随后国内外不少学者在实验中观察到，脑损伤后脑内氧自由基产生增加，脂质过氧化反应增强，是引起神经细胞结构损伤和血脑屏障破坏，导致细胞毒性脑水肿和血管源性脑水肿的重要因素[12-14]。

4、脑微循环学说：脑损伤可引起脑微循环功能障碍，导致其静力压增高，产生压力平衡紊乱，导致脑水肿。脑循环障碍包括血管反应性降低、血管自动调节紊乱和血液流变学改变[15-17]。

5、能量代谢学说：细胞能量代谢障碍是细胞毒性脑水肿发生的基础，同时亦引起和加剧血管源性脑水肿[18-20]。

上述学说都不能完全解释清TBI发病机理。这是因为创伤性脑水肿的发生机理是十分复杂的。上述的各种机制并非孤立存在、单独起作用，而是相互影响、多种机制共同起作用的结果。

近年来，神经源性炎症在TBI中的作用机制逐渐引起人们的重视，越来越多的研究发现，P物质（SP）、神经肽Y（NPY）、降钙素相关基因肽（CGRP）、水通道蛋白-4（AQP4）和核转录因子-κB（NF-κB）等在TBI后神经源性炎症中扮演重要角色。本课题提出的“创伤性脑损伤神经源性机制假说”正是基于神经源性炎症[21-33]。

**神经源性炎症是如何触发的呢**？这就涉及到有关痛觉传导通路机制。

头面部的痛觉传导通路：第1级神经元为三叉神经节细胞，其周围突经三叉神经分布于头面部皮肤的有关感受器；中枢突经三叉神经根入脑桥，传导痛觉的纤维再下降为三叉神经脊束，止于三叉神经脊束核，第2级神经元的胞体在三叉

神经脊束核和脑桥核内，它们发出纤维交叉到对侧，组成三叉丘系，止于背侧丘脑的腹后内侧核（VPM核）。第3级神经元的胞体在背侧丘脑的腹后内侧核，发出纤维经内囊后肢，投射到中央后回下部[34-36]。**我们课题正是通过研究TBI后大鼠VPM核放电频率变化来了解打击大鼠头部是否产生痛觉，其疼痛程度与VPM核放电频率是否存在相关性，是否可将VPM核放电频率作为反映疼痛程度的一个客观指标，经研究我们发现，不同程度脑创伤，起放电频率不同，损伤程度越重，放电频率越高。疼痛信息通过放电频率进行信息编码，类似于无线电，通过编码后传递到中枢而被感知，并作出反应，如刺痛躲避反应等。**

TBI时，伤害性刺激引起受损组织释放和生成多种化学和细胞因子，参与激活和调制伤害性传感受器。这些化学和细胞因子包括（a）组织损伤产物：**缓激肽(BK)、前列腺素**、5羟色胺、**组织胺**、乙酰胆碱、腺苷三磷酸、H+和K+等；（b）感觉神经末梢释放：谷氨酸、**P物质（SP）、钙降素基因相关肽（CGRP）**、甘丙肽

（galanin）、胆囊收缩素(CCK)、生长抑素(SOM)、一氧化氮（NO）等；（c）交感神经释放：**神经肽Y（NPY）、**去甲肾上原素、花生四烯酸代谢物等；（d）免疫细胞产物：白细胞介素、阿片肽、激肽类等。（f）神经营养因子；（e），血管因子：一氧化氮、激肽类、胺类等[37-42]。

其中P物质（SP）既是神经递质，可以将疼痛信息上传至高级中枢而被大脑感知，又是致炎因子，刺激周围血管扩张，通透性增高，炎性物质渗出，引发和加重炎症反应。因而它在引发神经源性炎症中起着关键作用[43-45]。

缓激肽（BK）：最强的一种内源性致痛物质，由损伤部位的酶降解血浆蛋白而形成的九肽，有B1和B2两个G蛋白耦联受体亚型。BK可直接作用初级伤害性感受神经元的B2受体，也可激活神经纤维周围的非神经细胞的B2受体，从而引起其他介质的释放，间接地作用感觉神经[46, 47]。

前列腺素（PGs）：在损伤部位酶促合成一类促炎物质，包括PGD2、PGE2、

PGF2、PGI2和thromboxane A2等5种，PGs主要作用是增强伤害性感受器对伤害性刺激的反应，使伤害性感受器敏感。PGE2在这类化合物中致痛作用最强，PGF2刺激末梢释放P物质，加强伤害性感受器的活动，使伤害性感受器敏感，从而产生痛觉过敏。阿司匹林和其它的非甾体抗炎药物的镇痛机制，是抑制了环氧酶，导致前列腺素合成减少[48]。

组织胺（HA）：**由损伤部位的肥大细胞合成和释放可通过初级感觉神经元的轴突分支产生的“轴突反射”，触发神经源性炎症**。轴突反射( axon reflex)亦称假反射（pseudoreflex）[49-52]。在末梢神经的单一轴突的分枝，一枝产生的兴奋通过分枝部位传导到另一枝，有时从那里再移向其它神经元。轴突反射就是指这种由向中神经冲动转换成离中神经冲动所呈现的状似反射样的反应。由于来自皮肤

的向中纤维分枝分布于附近皮肤的血管上，所以刺激皮肤产生的局部发红即是轴突反射。

TBI时，损伤组织（头皮、骨膜、硬膜等）内痛觉神经末稍在生物学活性物质的作用下发生敏感化，即正常状态下不能引起兴奋的刺激，在此状态下可以引起神经末梢兴奋，产生痛觉；正常状态下可引起兴奋的刺激，此状态将产生更强烈的神经兴奋，产生更剧烈的疼痛。同时，受刺激神经末梢通过释放某些神经递质如：NPY、CGRP、SP等神经多肽。这些生物活性物质作用于组织内肥大细胞、血管内皮细胞等，使之产生其它生物学活性物质或者/和产生生物学效应，引发组织学改变，引起炎症反应甚至组织损伤[53]。NPY对血管有直接收缩作用，是已知最强缩血管效应的多肽之一，它可加强血管对其它收缩血管物质的反应，如去甲肾上腺素（Norepinephrin, NE）及血管紧张素（Angiotension, Ang）等[54, 55]；可降低血管对舒张血管物质的反应如乙酰胆碱（acetylcholine, Ach）及β受体阻滞剂等[56,57]。CGRP主要作用于毛细血管前小动脉，使之扩张充血，脑血管分布着富含CGRP神经纤维，CGRP对脑血管疾病有强烈的舒张作用；SP主要作用于毛细血管后小静脉，使之通透性增加血管内容渗出增加，引起和加重组织的炎症。这种炎症被称为**神经源性炎症**。神经末梢NPY、CGRP、SP与组织内肥大细胞、血管内皮细胞及其分泌的生物学活性物质之间存在着相互作用（兴奋或者抑制），对组织炎症反应进行调制[58,59]。**在神经源性炎症引起创伤性脑水肿过程中，SP、NF-**κ**B和AQP4起着重要作用。**

P物质（Substance P, SP）是广泛分布于中枢和周围神经系统细神经纤维内的一种神经肽，其主要生理功能为感受和防御各种伤害性刺激，它由11个氨基酸组成，主要分布在神经组织的突触颗粒中。当神经受刺激后，神经冲动传导时引起离子通道开放，钙离子内流，促使神经末梢囊泡释放P物质。P物质可在中枢端和外周端末梢释放，与**NK1受体**结合发挥生理作用。在中枢端末梢释放的P物质与痛觉传递有关，其C-末端参与痛觉的传递。P物质能直接或间接通过促进谷氨酸等的释放参与痛觉传递。逆向电刺激感觉神经或经细传入纤维传出的轴突反射和背根反射冲动可使外周端末稍释放P物质，通过触发肥大细胞释放**组胺、前列腺素、缓激肽**、5-HT等炎症介质，引起大量炎症介质、细胞因子的连锁式释放，最终导致血管通透性增高，血浆蛋白外渗，产生神经源性炎症反应和水肿

[60]。

**本研究发现，不同程度脑损伤，脑组织中SP表达及含量不同，引发的VPM核放电频率不同，损伤程度越重，放电频率越高，SP表达越强，血清中组胺、前列腺素、缓激肽等致痛物质含量也越高。**

核转录因子-κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)属于Rel蛋白家族，是由两种Rel家族亚基：RelA(p65)、RelB、cRel和NFκB1(p50/p105)、NF-κB

（p52）中任意两种NF-κB／Rel蛋白亚单位构成的二聚体蛋白质，这些蛋白质均具有能与DNA结合的特性，其中发挥主要生理功能的是p50与p65构成的二聚体蛋白质。NF-κB广泛存在于各种细胞内，诸如T淋巴细胞、单核／巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞、表皮细胞、成纤维细胞、神经元细胞及星形胶质细胞等

[61]。

正常情况下，大多数细胞中NF-κB与其抑制蛋白（Inhibitory Kappa B, IκB）结合形成复合体，IκB覆盖于NF-κB的核定位信号区（nuclear localization sequence, NLS），复合体以非活化状态下存在于静止期细胞的胞浆中。当诱导因子刺激时，由信号诱导激活的IκB激酶（IκB Kinase, IκK）引起IκBα蛋白第32和36位丝氨酸的磷酸化，磷酸化的IκBα则由泛素蛋白在多个位点形成泛素化。最后，泛素化的IκBα被26S蛋白酶水解降解，暴露出Rel蛋白上的NlS，这样就使NF-κB快速易位进入细胞核内，与NF-κB的靶基因的同源序列位点结合，使这些靶基因表达增加，从而产生不同的基因产物[62]。

NF-κB诱导表达的靶基因有：⑴细胞因子，包括TNF-a、IL-1等；⑵粘附分子，包括血管细胞粘附分子-1（VCAM-1）、细胞间粘附分子-1（ICAM-1）、内皮细胞白细胞粘附分子-1（EIAM-1）；**⑶急性期蛋白，如C反应蛋白（CRP）**、血管紧张素[63]；⑷受体，包括MHC-1、血小板激活因子受体、组织因子（TF）、免疫球蛋白κ轻链；⑸酶，如COX-2（可诱导环氧化酶2）、线粒体抗氧化酶；⑹趋化因子，如单核细胞趋化因子-1；⑺**参与细胞循环及凋亡的蛋白**，包括cmyc、p53、凋亡抑制蛋白、抗凋亡的Bcl2蛋白家族成员；⑻其他如可诱导一氧化氮合酶（NOS）

[64]。

TBI时，诱导因子高敏C反应蛋白（hs-CRP）刺激NF-κB活化，增强hs-CRP的基因转录，使其产生和释放增多，进而再次激活NF-κB；NF-κB活化后还可使IL-6和IL-8产生和释放增多，导致最初的炎症信号进一步放大，即产生级联放大反应。巨噬细胞在此时分泌基质金属蛋白酶-9（明胶酶B，MMP-9）增加，降解细胞外基质（ECM）和血管内膜能力增强，引起血管通透性增加，导致血管源性脑水肿[65-67]。**本研究显示，TBI后hs-CRP、MMP-9、NF-κB均明显升高，损伤程度越重，脑组织中其含量和表达越高，脑水肿也越明显。**

水通道蛋白-4（Aquaporins, AQP-4, AQP4）**，**是一种对水有特异性通透的蛋白分子**，**AQP4的基因定位在人染色体18q1112与q1211之间的连接处。AQP4单体含有6个α螺旋跨膜区域。其N端和C端都在细胞内。6个α螺旋形成了三个胞外环(A、C、E)和两个胞内环(B、D), 其中B、E两个环伸入双层磷脂膜中折

叠形成一个使水分子单线通过的通道，孔道的大小约为一个水分子左右(3～6A)[68]. E环对外界环境非常敏感，通过其对外界环境改变的感应，可激活AQP4功能，这一结构模型—“砂漏”(hourglass)由于AQP4在已知的汞结位点上缺乏半胱氨酸，对汞的水通透抑制作用不敏感，因而AQP4属于汞不敏感性水通道蛋白(Mercurial - insensitive water channel, MIWC)。按通透性分类, AQP4仅对水可选择性通过，而对尿素、甘油或其他中性小分子溶质不通透。AQP4的组织分布很广，但主要在脑组织[69]。原位杂交示, AQP4mRNA在神经胶质界膜、侧脑室及导水管的室管膜细胞、脉络丛上皮、下丘脑的视上核和室旁核、海马齿状回和小脑等部位均有表达。研究发现，在朝向血管面与软脑膜面的星型胶质细胞和室管膜细胞区有AQP4的高表达[70]。在神经元上未发现有AQP4的表达。血管周围的星形胶质细胞的突起是水分子流动的主要部位, AQP4的存在可能起着调节水代谢的作用。此外, AQP4还可能参与调节血浆的胶体渗透压和控制抗利尿激素的分泌[71-73]。

TBI时，外界伤害性刺激引起组织释放致痛物质，引发神经源性炎症，激活AQP4功能，引起血管面与软脑膜面的星型胶质细胞和室管膜细胞区的AQP4对水分子的通透性增高，引起**细胞毒性脑水肿**。**本课题研究结果显示，不同程度脑损伤，AQP4表达强度不同，损伤越严重，AQP4表达越强，光镜下、电镜下脑组织、 脑细胞、线粒体、细胞核等细胞器水肿明显，线粒体肿胀、线粒体嵴结构紊乱、 断裂。**

神经元特异性烯醇化酶（neuron specific enolase, NSE），是一种烯醇化酶同工酶，参与体内的糖酵解代谢过程，它特异地存在于神经元和神经内分泌细胞中，因而被称为神经元特异性烯醇化酶[74, 75]。在正常情况下，体液中NSE含量很低，在神经细胞受损的情况下，大量NSE可从细胞内漏至细胞间隙，继而进入脑脊液和血循环。体液中NSE含量的增高，即提示神经细胞受损。国外学者也指出血液中NSE浓度测定可取代脑脊液NSE测定[76, 77]。作为脑实质损害的一个十分敏感的指标，现已发现，多数有神经元损伤或坏死的疾病，如脑外伤、脑出血、脑梗死、昏迷等均可出现血清NSE水平的升高。由此测定血液的NSE含量可以敏感反映脑组织的损伤程度，且与脑损伤程度明显相关，反映了脑损伤患者病情的严重程度及预后[78-81]。**本实验研究结果也显示，不同程度脑损伤，血清NSE水平不同，损伤越重，NSE含量越高**。

总之，本实验研究发现，TBI后早期，不同程度脑损伤大鼠脑组织SP、NPY、CGRP、NF-κB、AQP4、NSE表达含量不同，损伤越重，表达越高，这与临床上损伤越重，炎症反应越强烈，脑细胞坏死越多，脑水肿越明显，脑功能障碍越严重表现一致。脑损伤越重，P物质释放量越多，痛觉越明显（VPM核放电频率越高），

引发的神经源性炎症程度越强烈（SP、NF-κB、NPY、CGRP表达增高，），全身炎症反应强度越大（血清hs-CRP含量增多），脑组织水肿越明显（AQP4表达和MMP-9含量增高，光镜和电镜下可见脑组织水肿明显），神经功能障碍越严重（血NSE含量增高，神经细胞坏死，脑组织中钙离子浓度增加，钙超载，亚二倍体比率升高，脑细胞凋亡），严重影响预后。

**因而，总结上述实验结果，我们得出“神经源性机制”在创伤性脑损伤中发挥重要作用。其机制可能为：TBI后，坏死及的损伤神经和组织细胞，释放致痛物质（BK、HA、PGE2等），刺激神经末梢合成及释放SP，一方面SP作为神经递质，通过痛觉传导通路传导痛觉信息（编码的电位活动）于上级神经元，经VPM核投射到大脑皮层，被大脑整合分析后感知（疼痛的性质、部位、强弱），促使机体产生躲避反射、痛苦表情、不良情绪等反应，同时脑内合成神经肽类物质（NPY、CGRP等）增加，引起脑血管痉挛收缩而致脑缺血缺氧，加重脑损害，TBI后缺血区CGRP表达分泌也增多，引起该处血管舒张，通透性增加，导致血管源性脑水肿；另一方面SP又作为痛性致炎物质，引起损伤处神经源性炎症反应，NF-κB表达增加，产生炎症的级联放大反应，加重炎症程度，血清hs-CRP、MMP-9含量增高，引起血管通透性增高，炎性物质渗出增加，同样导致血管源性脑水肿。神经源性炎症刺激AQP4合成表达增加，功能活跃，对水分子通透性增强，引起过多水分聚集在脑细胞内，形成细胞性脑水肿；神经源性炎症还刺激钙离子通道开放，钙离子内流增加，钙超载，导致脑细胞坏死或凋亡，血清中NSE含量和亚二倍体比率增加，引起脑神经功能缺失或障碍，产生相应症状。上述细胞性和血管性脑水肿共同导致创伤性脑水肿，引起颅内压增高，如不及时给予脱水降颅压、去骨瓣减压、营养神经等治疗，水肿将继续加重，形成脑疝，危及生命。**

参考文献

[1]. Doering P, Stoltenberg M, Penkowa M, Rungby J, Larsen A, Danscher G. Chemical blocking of zinc ions in CNS increases neuronal damage following traumatic brain injury (TBI) in mice. PLoS One. 2010; 5(4): e10131.

[2]. MaryAnn Chrzaszcz, Charu Venkatesan, Tina Dragisic, D. Martin Watterson, Mark S. Wainwright. Minozac Treatment Prevents Increased Seizure Susceptibility in a Mouse" Two-Hit" Model of Closed Skull Traumatic Brain. Injury and Electroconvulsive Shock-Induced SeizuresJ Neurotrauma. 2010; 27(7): 1283–1295.

[3]. David A. Sun, Laxmikant S. Deshpande, Sompong Sombati, Anya Baranova,

Margaret S. Wilson, Robert J. Hamm, Robert J. DeLorenzo. Traumatic brain injury causes a long-lasting calcium (Ca2+) -plateau of elevated intracellular Ca levels and altered Ca2+ homeostatic mechanisms in hippocampal neurons surviving brain injury. Eur J Neurosci. 2008; 27(7): 1659–1672.

[4]. Bonnelle V, Ham TE, Leech R, Kinnunen KM, Mehta MA, Greenwood RJ, Sharp DJ. Salience network integrity predicts default mode network function after traumatic brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(12): 4690-4695.

[5]. Gerring JP, Wade S. The essential role of psychosocial risk and protective factors in pediatric traumatic brain injury research. J Neurotrauma. 2012; 29(4): 621-628.

[6]. Rovegno M, Soto PA, Sáez JC, von Bernhardi R. Biological mechanisms involved in the spread of traumatic brain damage. Med Intensiva. 2012; 36(1): 37-44.

[7]. Berrout J, Jin M, O'Neil RG. Critical role of TRPP2 and TRPC1 channels in stretch-induced injury of blood-brain barrier endothelial cells. Brain Res. 2012; 1436: 1-12.

[8]. Lopez NE, Krzyzaniak MJ, Blow C, Putnam J, Ortiz-Pomales Y, Hageny AM, Eliceiri B, Coimbra R, Bansal V. Ghrelin prevents disruption of the blood-brain barrier after traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2012; 29(2): 385-393.

[9]. Zhang M, Shan H, Gu Z, Wang D, Wang T, Wang Z, Tao L. Increased expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta after rat traumatic brain injury. J Mol Neurosci. 2012; 46(3): 631-643.

[10]. Balbino M, Capone Neto A, Prist R, Ferreira AT, Poli-de-Figueiredo LF. Fluid resuscitation with isotonic or hypertonic saline solution avoids intraneural calcium influx after traumatic brain injury associated with hemorrhagic shock. J Trauma. 2010; 68(4): 859-864.

[11]. Shahlaie K, Lyeth BG, Gurkoff GG, Muizelaar JP, Berman RF. Neuroprotective effects of selective N-type VGCC blockade on stretch-injury-induced calcium dynamics in cortical neurons. J Neurotrauma. 2010; 27(1): 175-187

[12]. Mustafa AG, Singh IN, Wang J, Carrico KM, Hall ED. Mitochondrial protection after traumatic brain injury by scavenging lipid peroxyl radicals. J Neurochem. 2010; 114(1): 271-280.

[13]. Silva LF, Hoffmann MS, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Furian AF, Oliveira MS, Fighera MR, Royes LF. The involvement of Na+, K+-ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury. J Neurol Sci. 2011; 308(1-2): 35-40.

[14]. Wang GH, Jiang ZL, Li YC, Li X, Shi H, Gao YQ, Vosler PS, Chen J. Free-radical scavenger edaravone treatment confers neuroprotection against traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma. 2011; 28(10): 2123-2134.

[15]. Schwarzmaier SM, Kim SW, Trabold R, Plesnila N. Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. J Neurotrauma. 2010; 27(1): 121-130.

[16]. Pérez-Bárcena J, Ibáñez J, Brell M, Llinás P, Abadal JM, Llompart-Pou JA. [Study of a brain microcirculation in cranioencephalic trauma using the Side Stream Field (SDF) system]. Med Intensiva. 2009; 33(5): 256-259.

[17]. Rafols JA, Kreipke CW, Petrov T. Alterations in cerebral cortex microvessels and the microcirculation in a rat model of traumatic brain injury: a correlative EM and laser Doppler flowmetry study. Neurol Res. 2007; 29(4): 339-347.

[18]. Frisk P, Rössner SM, Norgren S, Arvidson J, Gustafsson J. Glucose metabolism and body composition in young adults treated with TBI during childhood. Bone Marrow Transplant. 2011; 46(10): 1303-1308.

[19]. Clausen F, Hillered L, Gustafsson J. Cerebral glucose metabolism after traumatic brain injury in the rat studied by 13C-glucose and microdialysis. Acta Neurochir (Wien). 2011; 153(3): 653-658.

[20]. Prieto R, Tavazzi B, Taya K, Barrios L, Amorini AM, Di Pietro V, Pascual JM, Marmarou A, Marmarou CR. Brain energy depletion in a rodent model of diffuse traumatic brain injury is not prevented with administration of sodium lactate. Brain Res. 2011; 1404: 39-49.

[21]. Song Y, Bi L, Zhang Z, Huang Z, Hou W, Lu X, Sun P, Han Y. Increased levels of calcitonin gene-related peptide in serum accelerate fracture healing following traumatic brain injury. Mol Med Report. 2012; 5(2): 432-438.

[22]. Armstead WM, Kiessling JW, Riley J, Kofke WA, Vavilala MS. Phenylephrine infusion prevents impairment of ATP- and calcium-sensitive potassium channel-mediated cerebrovasodilation after brain injury in female, but aggravates impairment in male, piglets through modulation of ERK MAPK upregulation. J Neurotrauma. 2011; 28(1): 105-111.

[23]. Hang CH, Shi JX, Li JS, Wu W, Li WQ, Yin HX. Levels of vasoactive intestinal peptide, cholecystokinin and calcitonin gene-related peptide in plasma and jejunum of rats following traumatic brain injury and underlying significance in gastrointestinal dysfunction. World J Gastroenterol. 2004; 10(6): 875-880.

[24]. Amorini AM, Dunbar JG, Marmarou A. Modulation of aquaporin-4 water transport in a model of TBI. Acta Neurochir Suppl. 2003; 86: 261-263.

[25]. Oliva AA Jr, Kang Y, Truettner JS, Sanchez-Molano J, Furones C, Yool AJ, Atkins CM. Fluid-percussion brain injury induces changes in aquaporin channel expression. Neuroscience. 2011; 180: 272-279.

[26]. Rao KV, Reddy PV, Curtis KM, Norenberg MD. Aquaporin-4 expression in cultured astrocytes after fluid percussion injury. J Neurotrauma. 2011; 28(3): 371- 381.

[27]. Tomura S, Nawashiro H, Otani N, Uozumi Y, Toyooka T, Ohsumi A, Shima K. Effect of decompressive craniectomy on aquaporin-4 expression after lateral fluid percussion injury in rats. J Neurotrauma. 2011; 28(2): 237-243.

[28]. Karasu A, Aras Y, SabancıPA, Sağlam G, Izgi N, Biltekin B, Barak T, Hepgül KT, Kaya M, Bilir A. The effects of protein kinase C activator phorbol dibutyrate on traumatic brain edema and aquaporin-4 expression. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2010; 16(5): 390-394.

[29]. Taya K, Gulsen S, Okuno K, Prieto R, Marmarou CR, Marmarou A. Modulation of AQP4 expression by the selective V1a receptor antagonist, SR49059, decreases trauma-induced brain edema. Acta Neurochir Suppl. 2008; 102: 425-429.

[30]. Romeiro RR, Romano-Silva MA, De Marco L, Teixeira AL Jr, Correa H. Can variation in aquaporin 4 gene be associated with different outcomes in traumatic brain edemaNeurosciLett. 2007; 426(2): 133-134.

[31]. Chen CC, Hung TH, Wang YH, Lin CW, Wang PY, Lee CY, Chen SF. Wogonin improves histological and functional outcomes, and reduces activation of TLR4/NF-κB signaling after experimental traumatic brain injury. PLoS One. 2012; 7(1): e30294.

[32]. Su X, Wang H, Zhao J, Pan H, Mao L. Beneficial effects of ethyl pyruvate through inhibiting high-mobility group box 1 expression and TLR4/NF-κB pathway after traumatic brain injury in the rat. Mediators Inflamm. 2011; 2011: 807142.

[33]. Dong XQ, Yu WH, Hu YY, Zhang ZY, Huang M. Oxymatrine reduces neuronal cell apoptosis by inhibiting Toll-like receptor 4/nuclear factor kappa-B-dependent inflammatory responses in traumatic rat brain injury. Inflamm Res. 2011; 60(6): 533-539.

[34]. Walker WC. Pain pathoetiology after TBI: neural and nonneural mechanisms. J

Head Trauma Rehabil. 2004;19(1):72-81.

[35]. Branca B, Lake AE. Psychological and neuropsychological integration in multidisciplinary pain management after TBI. J Head Trauma Rehabil. 2004; 19(1): 40-57.

[36]. Dobscha SK, Clark ME, Morasco BJ, Freeman M, Campbell R, Helfand M. Systematic review of the literature on pain in patients with polytrauma including traumatic brain injury. Pain Med. 2009; 10(7): 1200-1217.

[37]. Marmarou A, Guy M, Murphey L, Roy F, Layani L, Combal JP, Marquer C. A single dose, three-arm, placebo-controlled, phase I study of the bradykinin B2 receptor antagonist Anatibant (LF16-0687Ms) in patients with severe traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2005; 22(12): 1444-1455.

[38]. Koch H, Huh SE, Elsen FP, Carroll MS, Hodge RD, Bedogni F, Turner MS, Hevner RF, Ramirez JM. Prostaglandin E2-induced synaptic plasticity in neocortical networks of organotypic slice cultures. J Neurosci. 2010; 30(35): 11678-11687.

[39]. Kunz T, Marklund N, Hillered L, Oliw EH. Cyclooxygenase-2, prostaglandin synthases, and prostaglandin H2 metabolism in traumatic brain injury in the rat. J Neurotrauma. 2002 Sep; 19(9): 1051-1064.

[40]. Donkin JJ, Cernak I, Blumbergs PC, Vink R. A substance P antagonist reduces axonal injury and improves neurologic outcome when administered up to 12 hours after traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2011; 28(2): 217-224.

[41]. Harford-Wright E, Thornton E, Vink R. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors exacerbate histological damage and motor deficits after experimental traumatic brain injury. Neurosci Lett. 2010; 481(1): 26-29.

[42]. Zacest AC, Vink R, Manavis J, Sarvestani GT, Blumbergs PC. Substance P immunoreactivity increases following human traumatic brain injury. Acta Neurochir Suppl. 2010; 106: 211-216.

[43]. Mota BC, Pereira L, Souza MA, Silva LF, Magni DV, Ferreira AP, Oliveira MS, Furian AF, Mazzardo-Martins L, Silva MD, Santos AR, Ferreira J, Fighera MR, Royes LF. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. Neurotox Res. 2012; 21(2): 175-184.

[44]. Chen G, Shi JX, Hang CH, Xie W, Liu J, Liu X.. Inhibitory effect on cerebral inflammatory agents that accompany traumatic brain injury in a rat model: a

Potential neuroprotective mechanism of recombinant human erythropoietin (rhEPO). Neurosci Lett. 2007;425(3):177-182.

[45]. Potts MB, Koh SE, Whetstone WD, Walker BA, Yoneyama T, Claus CP, Manvelyan HM, Noble-Haeusslein LJ. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. NeuroRx. 2006; 3(2): 143-153.

[46]. Ceruti S, Villa G, Fumagalli M, Colombo L, Magni G, Zanardelli M, Fabbretti E, Verderio C, van den Maagdenberg AM, Nistri A, Abbracchio MP. Calcitonin gene-related peptide-mediated enhancement of purinergic neuron/glia communication by the algogenic factor bradykinin in mouse trigeminal ganglia from wild-type and R192Q Cav2.1 Knock-in mice: implications for basic mechanisms of migraine pain. J Neurosci. 2011; 31(10): 3638-3649.

[47]. Cao XH, Chen SR, Li L, Pan HL. Nerve Injury Increases Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels to Suppress BK Channel Activity in Primary Sensory Neurons. J Neurochem. 2012; 1471-4159.

[48]. Ara T, Fujinami Y, Urano H, Hirai K, Hattori T, Miyazawa H. Protein kinase A enhances lipopolysaccharide-induced IL-6, IL-8, and PGE2 production by human gingival fibroblasts. J Negat Results Biomed. 2012; 11(1): 10.

[49]. Drummond PD, Su D. Endothelial and axon reflex vasodilatation to acetylcholine in rosacea-affected skin. Arch Dermatol Res. 2012; 304(2): 133-137.

[50]. Sommer P, Kluschina O, Schley M, Namer B, Schmelz M, Rukwied R. EElectrically induced quantitative sudomotor axon reflex test in human volunteers. Auton Neurosci. 2011; 159(1-2): 111-116.

[51]. Drummond PD. nflammation contributes to axon reflex vasodilatation evoked by iontophoresis of anα-1 adrenoceptor agonist. Auton Neurosci. 2011; 159(1-2): 90-7

[52]. Kiss R, KeserűGM. Histamine H4 receptor ligands and their potential therapeutic applications: an update. Expert Opin Ther Pat. 2012; 22(3): 205-221.

[53]. Cook NL, Vink R, Donkin JJ, van den Heuvel C. Validation of reference genes for normalization of real-time quantitative RT-PCR data in traumatic brain injury. J Neurosci Res. 2009; 87(1): 34-41.

[54]. Harford-Wright E, Thornton E, Vink R. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors exacerbate histological damage and motor deficits after experimental traumatic brain injury. Neurosci Lett. 2010; 481(1): 26-29.

[55]. Ariza M, Matarin MD, JunquéC, MataróM, Clemente I, Moral P, Antonia Poca

M, Garnacho A, Sahuquillo J. Influence of Angiotensin-converting enzyme polymorphism on neuropsychological subacute performance in moderate and severe traumatic brain injury. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2006;18(1):39-44.

[56]. Donat CK, Walter B, Deuther-Conrad W, Wenzel B, Nieber K, Bauer R, Brust P. Alterations of cholinergic receptors and the vesicular acetylcholine transporter after lateral fluid percussion injury in newborn piglets. Neuropathol Appl Neurobiol. 2010; 36(3): 225-236.

[57]. Shao L, Ciallella JR, Yan HQ, Ma X, Wolfson BM, Marion DW, Dekosky ST, Dixon CE. Differential effects of traumatic brain injury on vesicular acetylcholine transporter and M2 muscarinic receptor mRNA and protein in rat. J Neurotrauma. 1999; 16(7): 555-566.

[58]. Potts MB, Koh SE, Whetstone WD, Walker BA, Yoneyama T, Claus CP, Manvelyan HM, Noble-Haeusslein LJ. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. NeuroRx. 2006; 3(2): 143-153.

[59]. Chen SF, Hung TH, Chen CC, Lin KH, Huang YN, Tsai HC, Wang JY. Lovastatin improves histological and functional outcomes and reduces inflammation after experimental traumatic brain injury. Life Sci. 2007; 81(4): 288-298

[60]. Li WW, Guo TZ, Liang DY, Sun Y, Kingery WS, Clark JD. Substance P Signaling Controls Mast Cell Activation, Degranulation, and Nociceptive Sensitization in a Rat Fracture Model of Complex Regional Pain Syndrome. Anesthesiology. 2012; 116(4): 882-895

[61]. Meng Z, Lou S, Tan J, Xu K, Jia Q, Zheng W. Nuclear factor-kappa B inhibition can enhance apoptosis of differentiated thyroid cancer cells induced by I. PLoS One. 2012; 7(3): e33597

[62]. Groppo R, Richter JD. CPEB control of NF-kappaB nuclear localization and interleukin-6 production mediates cellular senescence. Mol Cell Biol. 2011; 31(13): 2707-2714.

[63]. Satizabal CL, Zhu YC, Mazoyer B, Dufouil C, Tzourio C. Circulating IL-6 and CRP are associated with MRI findings in the elderly: The 3C-Dijon Study. Neurology. 2012; 78(10): 720-724

[64]. Hoh NZ, Wagner AK, Alexander SA, Clark RB, Beers SR, Okonkwo DO, Ren D, Conley YP. BCL2 genotypes: functional and neurobehavioral outcomes after severe traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2010; 27(8): 1413-1427.

[65]. Higashida T, Kreipke CW, Rafols JA, Peng C, Schafer S, Schafer P, Ding JY, Dornbos D 3rd, Li X, Guthikonda M, Rossi NF, Ding Y. The role of hypoxia-inducible factor-1α, aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. J Neurosurg. 2011; 114(1): 92-101

[66]. Berrout J, Jin M, O'Neil RG. Critical role of TRPP2 and TRPC1 channels in stretch-induced injury of blood-brain barrier endothelial cells. Brain Res. 2012; 1436: 1-12. [8] Lopez NE, Krzyzaniak MJ, Blow C, Putnam J, Ortiz-Pomales Y, Hageny AM, Eliceiri B, Coimbra R, Bansal V. Ghrelin prevents disruption of the blood-brain barrier after traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2012; 29(2): 385-393.

[67]. Jia F, Pan YH, Mao Q, Liang YM, Jiang JY. Matrix metalloproteinase-9 expression and protein levels after fluid percussion injury in rats: the effect of injury severity and brain temperature. J Neurotrauma. 2010; 27(6): 1059-1068.

[68]. Ogaki K, Hirayama T, Chijiiwa K, Fukae J, Furuya T, Noda K, Fujishima K, Hattori N, Takahashi T, Okuma Y. Anti-aquaporin-4 Antibody-positive Definite Neuromyelitis Optica in a Patient With Thymectomy for Myasthenia Gravis. Neurologist. 2012; 18(2): 76-79.

[69]. Xie Y, Wen X, Jiang Z, Fu HQ, Han H, Dai L. Aquaporin 1 and aquaporin 4 are involved in invasion of lung cancer cells. Clin Lab. 2012; 58(1-2): 75-80.

[70]. Ampawong S, Combes V, Hunt NH, Radford J, Chan-Ling T, Pongponratn E, Grau GE. Quantitation of brain edema and localisation of aquaporin 4 expression in relation to susceptibility to experimental cerebral malaria. Int J Clin Exp Pathol. 2011; 4(6): 566-574.

[71]. Moeller HB, Fenton RA, Zeuthen T, Macaulay N. Vasopressin-dependent short-term regulation of aquaporin 4 expressed in Xenopus oocytes. Neuroscience. 2009; 164(4): 1674-1684.

[72]. Auguste KI, Jin S, Uchida K, Yan D, Manley GT, Papadopoulos MC, Verkman AS. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. FASEB J. 2007; 21(1): 108-116.

[73]. Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corboy JR, Lennon VA. Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. Arch Neurol. 2006; 63(7): 964-968.

[74]. Böhmer AE, Oses JP, Schmidt AP, Perón CS, Krebs CL, Oppitz PP, D'Avila TT,

Souza DO, Portela LV, Stefani MA. Neuron-specific enolase, S100B, and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. Neurosurgery. 2011;68(6):1624-1630.

[75]. Honda M, Tsuruta R, Kaneko T, Kasaoka S, Yagi T, Todani M, Fujita M, Izumi T, Maekawa T. Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. J Trauma. 2010; 69(1): 104-109.

[76]. Geyer C, Ulrich A, Gräfe G, Stach B, Till H. Diagnostic value of S100B and neuron-specific enolase in mild pediatric traumatic brain injury. J Neurosurg Pediatr. 2009; 4(4): 339-344.

[77]. Kukacka J, Vajtr D, Huska D, Průsa R, Houstava L, Samal F, Diopan V, Kotaska K, Kizek R. Blood metallothionein, neuron specific enolase, and protein S100B in patients with traumatic brain injury. Neuro Endocrinol Lett. 2006; 27 Suppl 2: 116-120.

[78]. Siman R, Giovannone N, Toraskar N, Frangos S, Stein SC, Levine JM, Kumar MA. Evidence that a panel of neurodegeneration biomarkers predicts vasospasm, infarction, and outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. PLoS One. 2011; 6(12): e28938.

[79]. Moritz S, Warnat J, Bele S, Graf BM, Woertgen C. The prognostic value of NSE and S100B from serum and cerebrospinal fluid in patients with spontaneous subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg Anesthesiol. 2010; 22(1): 21-31.

[80]. Brea D, Sobrino T, Blanco M, Cristobo I, Rodríguez-González R, Rodríguez-Yañez M, Moldes O, Agulla J, Leira R, Castillo J. Temporal profile and clinical significance of serum neuron-specific enolase and S100 in ischemic and hemorrhagic stroke. Clin Chem Lab Med. 2009; 47(12): 1513-1518.

[81]. Zhen J, Chen T, Kong M, Li Z, Kou L, Liu H, Zhang L. [Effect of Shuxuetong injection on neuron-specific enolase of serum and recovery of function in patients with acute cerebral infarction]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2011; 36(18): 2584- 2587.

附图 1、鼠脑大体观

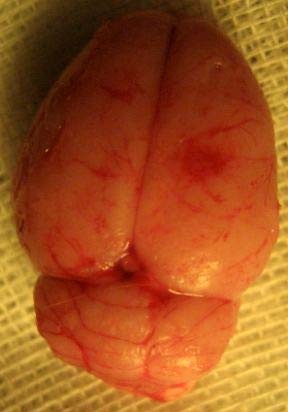


图70 对照组 图71 轻度组



图72 中度组

图73 重度组

2、大脑皮层HE染色结果

图 74 对照组HE×40 图75 对照组HE×400

图76 轻度损伤组HE×40 图77 轻度损伤组HE×400

图 78 中度损伤组HE×40 图79 中度损伤组HE×400

图 80 重度损伤组HE×40 图81 重度损伤组HE×400

3、**透射电镜超微结构**



图82 对照组核呈类圆形，无变形，核膜完整，核周线粒体无肿胀、线粒体嵴排列较整齐。



图83 轻度损伤组核轻度变形，核膜皱缩，核周线粒体轻度肿胀，线粒体嵴排列紊乱、断裂。



图84 中度损伤组核变形，核膜皱缩，核周线粒体肿胀、线粒体嵴排列紊乱、断裂。



图85 重度损伤组核变性、核周空泡变性，核周线粒体肿胀明显、线粒体嵴排列紊乱、断裂。



图86突触间释放神经递质，可见囊泡。



图87损伤组脑组织内可见血管内变形红细胞，并有单核细胞向血管外游走，变形，血管外有细胞器水肿变形（炎症反应表现）。

**4、**免疫组化图



图 88 对照组SP IHC×400 图89 轻度损伤组SP IHC×400



图 90 中度组SP IHC×400 图91 重度组SP IHC×400

图 92 对照组NPY IHC×400 图93 轻度组NPY IHC×400

图 94 中度组NPY IHC×400 图95 重度组NPY IHC×400

图 96 对照组CGRP IHC×400 图97 轻度组CGRP IHC×400

图 98 中度组CGRP IHC×400 图99 重度组CGRP IHC×400



图 100对照组NF-κB IHC×400 图 101轻度组NF-κB IHC×400



图 102 中度组NF-κB IHC×400 图103 重度组NF-κB IHC×400

5、**Western blot检测鼠脑皮层损伤区AQP4表达情况图**



**对照组**轻度组中度组重度组

**图104** **各组AQP4蛋白表达情况**

**6、RT-PCR电泳图**

**M: marker; C: 对照组M1:轻度组M2: 中度组S:重度组图105各组GAPDH mRNA（303bp）表达电泳图**





**M: marker; C: 对照组M1:轻度组M2: 中度组S:重度组图106各组SP mRNA（320bp）表达电泳图**



**M: marker; C: 对照组M1:轻度组M2: 中度组S:重度组图107各组NPY mRNA（165bp）表达电泳图**



**M: marker; C: 对照组M1:轻度组M2: 中度组S:重度组图108各组CGRP mRNA（194bp）表达电泳图**



**M: marker; C: 对照组M1:轻度组M2: 中度组S:重度组图109各组NF-**κ**B mRNA（286bp）表达电泳图**



**M: marker; C: 对照组M1:轻度组M2: 中度组S:重度组图110各组AQP4mRNA（330bp）表达电泳图**



**M: marker; C: 对照组M1:轻度组M2: 中度组S:重度组**

**图 111** **各组NSE mRNA（517bp）表达电泳图**

**7、激光共聚焦荧光离子成像实验结果图**



**图112 对照组**



**图113** **轻度组**



**图114** **中度组**



**图115** **重度组**

**8、流式细胞仪碘化丙啶(PI)单染色法检测鼠脑凋亡细胞DNA亚二倍体含量分析结果图**



图116 轻度损伤组亚二倍体比率(M1) 8.90%



图117 中度损伤组亚二倍体比率(M1) 16.16%



图 118 重度损伤组亚二倍体比率(M1) 20.39%

**9、电生理实验结果图**



图 119 对照组





图 120 轻度组

图121 中度组



图 122 重度组

**第二部分创伤性脑损伤神经源性机制干预实验研究**

第一部分已证实神经源性机制在创伤性脑损伤中发挥重要作用，那么能否通过干预神经源性机制中涉及到的几个关键指标，阻止创伤性脑水肿的发生和发展，达到治疗TBI的目的。

**第一章L-703, 606（NK1受体拮抗剂）对大鼠创伤性脑损伤保护作用机制的实验研究**

**1****材料与方法**

1.1**动物分组**：雄性Wistar大鼠45只（ft西医科大学动物中心提供），体重280±10g，随机均分为对照组(Control组, C组)，创伤未干预组（TBI组，T组）和L-703, 606干预组（L组），每组15只。

1.2**造模：（**参考第一部分4.1）制作模型，不同之处在于TBI组用击锤（重20g）沿外周导管分别从10cm、30cm高处自由落下冲击撞杆，造成右顶叶中度脑挫伤。干预组（L组）大鼠造成右顶叶脑挫伤后立即尾静脉给予NK1受体拮抗剂L-703, 606(250 nmol/kg Sigma公司)，然后于造模后1 h断头取血，开颅取脑；对照组在顶骨相应部位颅骨开窗，暴露硬脑膜，骨蜡封闭骨窗，不进行打击。

1.3 **HE染色（**参考第一部分4.3**） 1.4免疫组化染色检测SP、CGRP、NF-**κ**B**表达情况(参考第一部分4.5)

1.5 **RT-PCR检测**SP、CGRP、NF-κB、NSE、AQP4mRNA基因表达(参考第一部分4.7)

1.6**酶联免疫吸附实验（ELISA）法测定血清中NSE、hs-CRP**(参考第一部分4.8)

1.7**统计学分析**：所有资料均使用SPSS 13.0统计分析软件包处理。数据变量用均数±标准差（*x*±s）表示；多组间均数比较采用LSD检验（方差齐）和Dunnett'sT检验（方差不齐）.

**结果**

1、**HE染色结果（见图4-9）**

**光镜下HE染色显示，**对照组光镜下组织结构完整、清晰，细胞间质无水肿， 细胞排列整齐，染色均匀，无出血水肿及损伤，未见炎性细胞浸润和血管扩张现象；**TBI组**可见组织水肿、充血，细胞核间质水肿明显，可见炎性细胞、水肿胶质细胞；L-703, 606干预组（L组）明显较TBI未干预组（T组）损伤减轻，仅有轻度充血，少量炎性细胞浸润。

**2.免疫组化染色检测大鼠脑组织SP、CGRP和NF-κB阳性表达情况**（见图10-27）

表1 大鼠脑组织SP、CGRP和NF-κB阳性表达情况（阳性单位，Pu值）（x±s）

| 分组 | SP 阳性表达 | CGRP 阳性表达 | NF-κB 阳性表达 |
| --- | --- | --- | --- |
| C 组 | 5.89±1.05 | 3.76±1.03 | 6.73±1.11 |
| L 组 | 8.57±1.10\* | 7.04±1.53\* | 10.13±1.58\* |
| T 组 | 11.55±1.34\*# | 10.31±1.45\*# | 14.59±1.95\*# |

C组L组T组

20

15

10

5

0

SP

CGRP

检测指标

NF-KB

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与L组相比，P﹤0.05.

阳性单位（Pu）

**图1** **大鼠脑组织SP、CGRP和NF-κB阳性表达情况**

从表1图1可以看出，L组和T组大鼠脑皮层损伤区脑组织SP、CGRP和NF-κB阳性表达较对照组阳性表达有明显增强（P﹤0.05），L组较T组表达明显降低（P

﹤0.05）。**提示L-703, 606干预能显著减少SP、CGRP和NF-**κ**B表达和释放，抑制炎症反应，减轻神经源性炎症引起的血管源性脑水肿和对神经元的损伤。**3. **RT-PCR检测SP、CGRP、NF-κB、NSE、AQP4mRNA基因表达。**（见图28-33）

表2 各组大鼠脑组织SP、CGRP、NF-κB、AQP-4和NSE基因表达水平（*x*±s）

**分组**SP CGRP NF-κB AQP4 NSE

C组0.56±0.18 0.97±0.19 0.63±0.23 0.88±0.16 0.71±0.23

L组1.12±0.10\* 1.51±0.13\* 1.19±0.11\* 1.36±0.13\* 1.20±0.15\*

T组1.35±0.11\*# 1.84±0.15\*# 1.50±0.17\*# 1.71±0.14\*# 1.58±0.12\*#

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与L组相比，P﹤0.05

C组L组T组

2

1.5

1

0.5

0

SP

CGRP

NF-KB

检测指标

AQP4

NSE

图2 各组大鼠脑组织SP、CGRP、NF-κB、AQP-4和NSE基因表达水平

PCR值

从表2图2可以看出，L组和T组大鼠脑皮层损伤区脑组织SP、CGRP、NF-

κB、AQP-4和NSE基因表达水平较对照组阳性表达有明显增强（P﹤0.05），且

L组较T组表达明显降低（P﹤0.05）。**提示L-703, 606干预能显著减少SP、CGRP、NF-κB、AQP4和NSE基因表达和释放，抑制炎症反应，减轻神经源性炎症引起的血管源性脑水肿（CGRP表达降低）、细胞性脑水肿（AQP4表达降低）和对神经元的损伤（NSE表达降低）。**

4.**酶联免疫吸附实验（ELISA）法测定血清中NSE、hs-CRP含量**

表3 各组大鼠血清中NSE和hs-CRP含量（x±s）

| 分组 | NSE(ng/ml) | hs-CRP(mg/ml) |
| --- | --- | --- |
| C 组 | 10.76±3.41 | 0.53±0.15 |
| L 组 | 45.34±6.83\* | 0.91±0.16\* |
| T 组 | 97.58±6.10\*# | 1.29±0.13\*# |

注：\*与C相比，P﹤0.05；#与L组相比，P﹤0.05

血清中含量

150

100

50

C组

L组T组

0

NSE（ng/ml） hs-CRP（0.1mg/ml）

检测指标

图3 各组大鼠血清中NSE和hs-CRP含量

从表3图3可以看出，L组和T组大鼠血清中hs-CRP和NSE含量较对照组明显增高（P﹤0.05），且L组较T组hs-CRP和NSE含量明显降低。**提示L-703，**

**606干预能显著减少血清中NSE和hs-CRP含量（P﹤0.05），减少由于P物质含量增多引起的神经源性炎症（hs-CRP含量降低）和神经细胞损伤坏死（NSE含量下降）。**

**讨论**

P物质（substanceP, SP）作为速激肽的一种，与神经源性炎症导致的神经源性脑水肿有密切的关系[1-3]. SP是由11个氨基酸（Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln- Phe-Phe-Gly- Leu-Met-NH）组成的神经肽，广泛分布于神经系统和其他外周组织器官内，具有多种生理功能，它在痛觉传递、胃肠运动、血管扩张、伤口愈合等过程中都有重要作用，在机体的不同系统具有不同的生理学效应[4-6]. SP主要

作用于毛细血管后小静脉，使之通透性增加血管内容渗出增加，引起和加重组织的炎症。这种炎症被称为**神经源性炎症**(neurogenic inflammation)[7]。神经末梢SP、NPY和CGRP与组织内肥大细胞、血管内皮细胞及其分泌的生物学活性物质之间存在着相互作用（兴奋或者抑制），对组织炎症反应进行调制，同时炎症区域内的神经末梢发生敏感化，后者对组织炎症的转归也有重要的影响[ 8]。因而，

SP是致痛物质，也是调节机体反应的重要神经递质。SP是一种速激肽，速激肽受体是由350到500个氨基酸残基组成的蛋白质，分为NK1, NK2和NK3三型。SP对**NK1受体**亲和力较高，对NK2受体和NK3受体亲和力较低。SP通过与NK1受体特异性结合，发挥P物质的各种作用。[9-11] L-703, 606作为**NK1受体的一种非肽类拮抗剂**[12]，对于蛋白水解酶活化受体1(proteinase-activated receptor1, PAR1)激动剂TFLLR-NH（2）引起的血浆外渗和水肿形成有很好的抑制作用。

本实验通过HE染色、免疫组化、PCR和ELISA技术，分析P物质及其拮抗剂在创伤性脑损伤后早期血管通透性增高和水肿形成等病理过程中的作用，结果表明，静脉给予NK1受体拮抗剂L-703, 606后, L-703, 606组较TBI组SP、CGRP、NF-κB、

NSE、AQP4和hs-CRP表达及含量明显降低，HE染色也显示L-703, 606组损伤程度较

TBI组明显减轻。NK1受体拮抗剂L-703, 606这一表现为我们今后在预防和治疗创伤性脑损伤后血管通透性增高、血管内蛋白外渗、痛觉敏感性的提高，提供了新的思路，为P物质拮抗剂将来应用于临床治疗提供相关依据。

参考文献

[1]. Ang SF, Moochhala SM, MacAry PA, Bhatia M. Hydrogen sulfide and neurogenic inflammation in polymicrobial sepsis: involvement of substance P and ERK-NF-κB signaling. PLoS One. 2011; 6(9): e24535.

[2]. Mak IT, Chmielinska JJ, Kramer JH, Spurney CF, Weglicki WB. Loss of neutral endopeptidase activity contributes to neutrophil activation and cardiac dysfunction during chronic hypomagnesemia: Protection by substance P receptor blockade. Exp Clin Cardiol. 2011; 16(4): 121-124.

[3]. Pereira U, Boulais N, Lebonvallet N, Lefeuvre L, Gougerot A, Misery L. Development of an in vitro coculture of primary sensitive pig neurons and keratinocytes for the study of cutaneous neurogenic inflammation. Exp Dermatol. 2010; 19(10): 931-935.

[4]. Pan P, Huang S, Hu C. Nerve growth factor induced expression of iNOS and substance P in dorsal root ganglion sensory neuron and interferon regulatory factor-1. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2011 May; 36(5): 386-391.

[5]. Vergnolle N, Cenac N, Altier C, Cellars L, Chapman K, Zamponi GW, Materazzi S, Nassini R, Liedtke W, Cattaruzza F, Grady EF, Geppetti P, Bunnett NW. A role for transient receptor potential vanilloid 4 in tonicity-induced neurogenic inflammation. Br J Pharmacol. 2010; 159(5): 1161-1173.

[6]. Weglicki WB, Chmielinska JJ, Tejero-Taldo I, Kramer JH, Spurney CF, Viswalingham K, Lu B, Mak IT. Neutral endopeptidase inhibition enhances substance P mediated inflammation due to hypomagnesemia. Magnes Res. 2009; 22(3): 167S-173S.

[7]. Killough SA, Lundy FT, Irwin CR. Substance P expression by human dental pulp fibroblasts: a potential role in neurogenic inflammation. J Endod. 2009; 35(1): 73-77.

[8]. Krämer HH, He L, Lu B, Birklein F, Sommer C. ncreased pain and neurogenic inflammation in mice deficient of neutral endopeptidase. Neurobiol Dis. 2009; 35(2): 177-183.

[9]. Michelson D, Hargreaves R, Alexander R, Ceesay P, Hietala J, Lines C, Reines S. Lack of efficacy of L-759274, a novel neurokinin 1 (substance P) receptor antagonist, for the treatment of generalized anxiety disorder. Int JNeuropsychopharmacol. 2012; 20: 1-11.

[10]. Khan MM, Douglas SD, Benton TD. Substance P-neurokinin-1 receptor interaction upregulates monocyte tissue factor. J Neuroimmunol. 2012; 242(1-2): 1-8.

[11]. Cavazza A, Marini M, Roda LG, Tarantino U, Valenti A. Hydrolysis of substance P in the presence of the osteosarcoma cell line SaOS-2: release of free amino acids. Neurochem Res. 2011; 36(12): 2339-2345 .

[12]. Francis BE, Swain C, Sabin V, Burns HD. Radioiodinated L-703, 606: a potent, selective antagonist to the human NK1 receptor. Appl Radiat Isot. 1994; 45(1): 97-103.

[13]. Cohen I, Maoz M, Turm H, Grisaru-Granovsky S, Maly B, Uziely B, Weiss E, Abramovitch R, Gross E, Barzilay O, Qiu Y, Bar-Shavit R. Etk/Bmx regulates proteinase-activated-receptor1 (PAR1) in breast cancer invasion: signaling partners, hierarchy and physiological significance. PLoS One. 2010; 5(6): e11135.

[14]. Mercer PF, Deng X, Chambers RC. Signaling pathways involved in proteinase-activated receptor1-induced proinflammatory and profibrotic mediator release following lung injury. Ann N Y Acad Sci. 2007; 1096: 86-88.

附图

[1] 、HE染色结果图



图 4 对照组HE×40 图5 对照组HE×400



图6 L-703, 606组HE×40图7 L-703, 606组HE×400



图8 TBI组HE×40 图9 TBI组HE×400

2、免疫组化染色结果图



图 10 对照组SP IHC×40 图11 对照组SP IHC×400



图12 L-703, 606组SP IHC×40图13 L-703, 606组SP IHC×400



图14 TBI组SP IHC×40 图15 TBI组SP IHC×400



图 16 对照组CGRP IHC×40 图17 对照组CGRP IHC×400



图18 L-703, 606组CGRP IHC×40图19 L-703, 606组CGRP IHC×400



图20 TBI组CGRP IHC×40 图21 TBI组CGRP IHC×400



图 22对照组NF-κB IHC×40 图 23对照组NF-κB IHC×400



图24 L-703, 606组NF-κB IHC×40图25 L-703, 606组NF-κB IHC×400



图26 TBI组NF-κB IHC×40 图27 TBI组NF-κB IHC×400

**3、RT-PCR检测结果图**



**M: marker; C: 对照组**L: L-703, **606组T: TBI组图28各组GAPDH mRNA（303bp）表达电泳图**



**M: marker; C: 对照组**L: L-703, **606组T: TBI组图29各组SP mRNA（320bp）表达电泳图**



**M: marker; C: 对照组**L: L-703, **606组T: TBI组图30各组CGRP mRNA（194bp）表达电泳图**



**M: marker; C: 对照组**L: L-703, **606组T: TBI组图31各组NF-κB mRNA（286bp）表达电泳图**



**M: marker; C: 对照组**L: L-703, **606组T: TBI组图32各组AQP4 mRNA（330bp）表达电泳图**



**M: marker; C: 对照组**L: L-703, **606组T: TBI组图33各组NSE mRNA（517bp）表达电泳图**

**第二章Rho激酶抑制剂对创伤性脑损伤后脑细胞内亚二倍体比率的影响及其意义**

TBI后损伤区脑细胞会出现水肿、变性坏死和凋亡现象，出现相应神经功能障碍[1-4]，如何减轻上述现象，改善脑神经功能障碍？临床上常用脱水降颅压、营养神经等治疗，Rho激酶抑制剂-法舒地尔（Fasudil）已被应用于治疗缺血性脑卒中[5]，在脑外伤后早期应用Rho激酶抑制剂，能否起到改善脑神经功能障碍作用，机理如何，我们设计如下实验，以求明确Rho激酶抑制剂在TBI治疗中的作用机制，进一步提高对TBI的认识。

**材料与方法**

1.1主要仪器与试剂

ZH-蓝星B脑立体定位仪（安徽淮北正华生物仪器设备有限公司）, 牙科台式电钻（宁波医疗器械厂），Feeney法自由落体撞击装置（由军事医学科学院仪器厂加工）, BD FACSCaliburTM全自动多色分析流式细胞仪系统，CellQuestTM获取数据软件, ModFit *LT* TM分析数据软件（美国BD公司），碘化丙啶(Propidum lodide, PI)（美国Sigma公司），盐酸法舒地尔注射液（天津红日药业股份有限公司，规格：2ml:30mg）。

1.2实验动物分组

健康成年雄性Wistar大鼠45只，体重280±10g，由ft西医科大学实验动物中心提供，随机分为3组，即假手术组（Sham组），创伤组（TBI组）和Rho激酶抑制剂干预组（FSD组），每组15只。

1.3实验步骤：

1.3.1造模取脑

乌拉坦腹腔注射（1.2mg·kg-1）麻醉大鼠后，固定其于脑立体定位仪上，按

Feeney法制作自由落体创伤性脑损伤（TBI）动物模型[6]，致伤冲击力为0.048 N·s，假手术组只钻孔，不打击，造模后，骨蜡封闭骨窗，缝合头皮，即刻给予FSD组大鼠尾静脉注射Rho激酶抑制剂法舒地尔(1mg／kg) 2ml，Sham组和TBI组给予注射用水2ml做对照，于伤后6小时断头开颅取脑。

1.3.2收集细胞

PBS液中剥除硬脑膜、髓质、蛛网膜，切取创伤周边区皮质，剪碎，吸管吹打，滤网过滤，滤液离心2次，每次1500转，5分钟，倒掉上清，留取管底细胞作为待测细胞，调整待测细胞的浓度为0.5×105-1×106个/ml。

1.3.3固定染色

1000 r/min离心5min，弃去培养液，3ml PBS洗涤1次，离心去PBS, 70%

冷乙醇（in PBS）4°C固定过夜。离心弃去固定液，3mlPBS重悬5min，400目的筛网过滤1次，1000r/min离心5min，弃去PBS，用1ml PI染液染色，4℃避光30min。

1.3.4流式细胞仪（Flow Cytometry, FCM）检测鼠脑创伤区皮层细胞亚二倍体比率：CellQuestTM软件获取数据, Modifit软件分析凋亡率、DNA亚二倍体的形成及细胞周期的变化。

1.3.5结果判断

在分析PI荧光的直方图时，先用门技术排除成双或聚集的细胞以及发微弱荧光的细胞碎片，在PI荧光的直方图上，凋亡细胞在G1/G0期前出现亚二倍体峰。

1.4统计方法

所采集数据均以均数±标准差（ *x* ±s）表示，均数两两比较用 SNK-q 检验， 组间比较用方差分析（ANOVA）进行，采用用 SPSS18.0 统计软件包进行分析，以P<0.05 为差异具有统计学意义。

**结果**

**表1** **大鼠创伤区皮层脑细胞亚二倍体比率（***x*±s**）**

|  | 例数 n | 亚二倍体比率（%） |
| --- | --- | --- |
| Sham 组 | 15 | 1.58±0.35 |
| TBI 组 | 15 | 15.90±3.91\* |
| FSD 组 | 15 | 5.35±2.10\*△ |

18

16

14

12

10

8

6

4

2

0

Sham组

TBI组FSD组

亚二倍体比率（%）

注：与Sham组比较，\**P*﹤0.01，与TBI组比较△*P*﹤0.01

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | |
|  | |  |  | |
|  | |  | |
|  | |  | |
|  | |  | |
|  | |  | |
|  | |  | |
|  |  |
|  | |  |
|  |  |  |

**图1** **大鼠创伤区皮层脑细胞亚二倍体比率**

流式细胞仪碘化丙啶单染色法检测鼠脑创伤区皮层细胞亚二倍体比率，结果显示：Sham组、TBI组和FSD组的创伤区皮层细胞亚二倍体比率（%）分别为1.58

±0.35，15.90±3.91和5.35±2.10，三组间差异有统计学意义（P<0.01）。

**讨论**

Rho激酶（Rho-kinase, ROCK）属于丝氨酸／苏氨酸蛋白激酶家族成员之一，以两种同源性极高的异构体存在：ROCK II(ROCKα)和ROCK I(ROCKβ)。Rho激酶包括一个催化区（位于分子结构的N端），一个螺旋区（位于分子结构的中间部分）及一个pleckstrin同源区(PH区，位于分子结构的C端)。Rho激酶的Rho结合区(Rho—binding, RB)位于螺旋区的C端。Rho—GTP与螺旋区的C端相互作用，并激活Rho激酶的磷酸转移酶活性。Rho激酶的C端（包括RB和PH区）为激酶的负向调节区。在静息状态下，RB和PH区与激酶的催化区相互作用，并抑制激酶的活性。激活状态的Rho与RB相互作用，改变了Rho激酶的构型，从而解除RB和PH对激酶的抑制，Rho激酶被激活。激酶缺失C端区，包括PH区或PH与螺旋区，可使激酶持续激活。球蛋白轻链磷酸化酶(myosin light．chain phosphase, MLCP)是Rho激酶作用的底物之一。Rho激酶激活后MLCP的活性受到抑制，导致MLC磷酸化水平升高和平滑肌细胞收缩，内皮细胞收缩。某些化学制剂，如Y-227632、HAl077(fasudil)或hydroxyfasudil等，能够以与ATP竞争的方式特异性地抑制Rho激酶的活性。它们与ATP竞争Rho激酶催化区的ATP结合位点，从而抑制Rho激酶的活性[7]。

亚二倍体（hypodiploid）为比正常二倍体少一条或几条染色体或染色体片段的细胞，检测亚二倍体比率，可反映细胞的凋亡程度。本实验采用PI染色法检测损伤区脑皮层细胞亚二倍体核形峰的特征。原理主要是依据细胞凋亡时在细胞、亚细胞和分子水平上所发生的特征性改变。已有研究发现凋亡细胞在固定和清洗时，降解的小分子DNA出现外漏现象，导致细胞内DNA含量减少，出现亚二倍体，该亚二倍体细胞群被叫做亚G1期（sub-G1）细胞，可作为细胞凋亡的重要标志[8]。

TBI后，机械能刺激、神经源性炎性物质、氧自由基等激活Rho/Rock信号通路，致球蛋白轻链磷酸化酶（MLCP）活性受抑制，引起脑血管平滑肌收缩，血流下降，内皮及屏障功能受损，导致脑组织缺血，阻碍神经再生，脑血管周围炎性物质渗出增加，引发血管性、细胞性脑水肿和脑细胞调亡。

本研究发现Rho激酶抑制剂对TBI后大鼠创伤区脑组织细胞亚二倍体比率大小存在影响，使用Rho激酶抑制剂（Fasudil）可松弛血管平滑肌，扩张血管，促进脑组织血供，改善神经再生微环境，抑制损伤区脑细胞早期凋亡，从而减轻创伤后的脑神经功能障碍。这为TBI的早期干预和康复治疗提供了新思路。

参考文献

[1]. 王忠诚. 王忠诚神经外科学, 武汉: 湖北科学技术出版社. 2005, 365-366.

[2]. Jennifer E. Slemmer, Changlian Zhu, et al. Causal Role of Apoptosis-Inducing Factor for Neuronal Cell Death Following Traumatic Brain Injury. Am J Pathol. 2008, 173(6): 1795–1805.

[3]. Hubin Duan, Chunyan Hao, Shuzhen Li. The Levels of Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P in the Plasma of Rats with Traumatic Brain Injury and the Role of Neurogenic Inflammation in the Pathogenesis of TBI. FASEB J. 2009, 23: 926.2

[4]. Chunyan Hao, Hubin Duan, Shuzhen Li. Expression of Aquaporin 4 mRNA during Acute Stage of Traumatic Brain Injury in Rats. FASEB J. 2009, 23: 356.7

[5]. Lapchak PA., Han MK. Simvastatin Improves Clinical Scores In A Rabbit Multiple Infarct Ischemic Stroke Model: Synergism With A ROCK Inhibitor, But Not The Thrombolytic Tissue Plasminogen Activator. Brain Res. 2010, 1344: 217–225.

[6]. 段虎斌, 郝春艳, 郝解贺等. 创伤性脑损伤后大鼠脑创伤区皮层细胞早期凋亡的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, (09): 1094-1095.

[7]. Goupil E, Tassy D, Bourguet C. A novel biased allosteric compound inhibitor of parturition selectively impedes the prostaglandin F2alpha-mediated Rho/ROCK signaling pathway. J Biol Chem. 2010, 285(33): 25624-25636.

[8]. Ritu Aneja, Tohru Miyagi, Prasanthi Karna, et al. A novel microtubule-modulating agent induces mitochondrially-driven caspase-dependent apoptosis via mitotic checkpoint activation in human prostate cancer cells. Eur J Cancer. 2010, 46(9): 1668–1678

**问题与展望**

**TBI后引发脑水肿的机理是一个十分复杂的过程和体系，至今尚无定论，还有许多未解之谜等待我们去研究，去探索，去发现。我们将继续探索研究新的**

**TBI致脑水肿机制，发现TBI致脑水肿的各种环节中涉及到的相关因子、神经肽、神经化学介质等一系列因素，通过干预找到治疗TBI的新途径和开发新药，期望为广大TBI患者带来福音。**

**·综述・**

**创伤性脑损伤发病机理研究进展**

据美国疾病控制和预防中心（Centers for Disease Control and Prevention, CDC）2010年报告显示创伤性脑损伤（Traumatic brain injury ，

TBI）依然是美国人致死和致残的主要原因，在美国每年新发颅脑创伤50万，10%

属于重型颅脑损伤，其中约2万人死亡，3万人致残，直接和间接经济损失达560亿美元，而车祸是TBI的主要原因[1]。近年来由于我国交通业、建筑业和采矿业的快速发展，交通事故、工地事故和塌方引起的TBI发生率也在上升，我国每年约有60万人遭受TBI，死亡10万人。尽管在颅脑损伤的诊治及相关基础研究方面取得了许多进展，但其死亡率和致残率依然高居身体各部位损伤之首[2, 3]，这与对TBI的本质特征认识不足有关，尤其是对脑组织损伤的病理变化的本质和规律的认识不足有关。

目前有关创伤性脑损伤的发病机理，国内外有多种学说，如：血脑屏障学说，钙通道学说，自由基学说，脑微循环学说，能量代谢学说等[4]。

1.血脑屏障学说：血脑屏障结构和功能损害是血管源性脑水肿的病理基础。脑损伤后血脑屏障开放，通透性增加，血中大分子物质及水分从血管内移出进入脑组织内，积聚于细胞外间隙，形成血管源性脑水肿。

2.钙通道学说：钙对神经细胞和死亡起着决定性作用。研究发现脑损伤后脑组织内钙的浓度升高，认为其与脑水肿的发生发展有关。脑损伤早期大量的Ca2+进入细胞内，胞浆中钙浓度异常升高，可达正常的10～15倍，即钙超载，是引起神经细胞损害、血脑屏障破坏和创伤性脑水肿的关键因素。

3.自由基学说：氧自由基是一类具有高度化学反应活性的含氧基团，主要有超氧阴离子、羟自由基、和过氧化氢。早在1972年，国外学者就用自由基学说解释脑水肿的发生机理，随后国内外不少学者在实验中观察到，脑损伤后脑内氧自由基产生增加，脂质过氧化反应增强，是引起神经细胞结构损伤和血脑屏障破坏，导致细胞毒性脑水肿和血管源性脑水肿的重要因素。

4.脑微循环学说：脑损伤可引起脑微循环功能障碍，导致其静力压增高，产生压力平衡紊乱，导致脑水肿。脑循环障碍包括血管反应性降低、血管自动调节紊乱和血液流变学改变。

5.能量代谢学说：细胞能量代谢障碍是细胞毒性脑水肿发生的基础，同时亦引起和加剧血管源性脑水肿。

上述学说没有一种能完全解释清TBI发病机理。这是因为创伤性脑水肿的发生机理是十分复杂的。上述的各种机制并非孤立存在、单独起作用，而是相互影

响、多种机制共同起作用的结果。如脑微循环障碍可加重缺血、缺氧，ATP合成减少、血脑屏障被破坏等。另外单胺类神经递质、谷氨酸、一氧化氮、缓激肽、内皮素、花生四烯酸等的增多也参与创伤性脑水肿的发生与发展。

近年来，神经源性炎症在TBI中的作用机制逐渐引起人们的重视，越来越多的研究发现，神经肽Y（NPY）、降钙素相关基因肽（CGRP）、P物质（SP）、水通道蛋白-4（AQP4）和核转录因子-κB（NF-κB）等在TBI后神经源性炎症中扮演重要角色。

**TBI与神经肽 Y**

NPY是1982年瑞典Karolinska学院的Tatemoto从猪脑组织中纯化出的由

36个氨基酸组成的多肽，它属于胰多肽家族，分子量为4, 215,000，其N端和C端各有一个酪氨酸残基和酪氨酰胺残基，C端的酰基化对NPY的生物活性至关重要，N端的酪氨酸残基与稳定NPY的三级结构和结合NPY受体密切相关，从分子结构上看，人、大鼠、豚鼠NPY的氨基酸顺序完全相同。NPY广泛分布于机体组织中，尤以神经系统含量最高，含NPY的神经元以尾状核和豆状核壳部最为密集，其次是下丘脑、边缘系统、杏仁核、海马、隔核、皮质区尤其是深部的Ⅴ和Ⅵ层及白质，含NPY的神经纤维主要见于边缘皮质[5]。

NPY对血管有直接收缩作用，是已知最强缩血管效应的多肽之一，它可加强血管对其它收缩血管物质的反应，如去甲肾上腺素（Norepinephrin, NE）及血管紧张素（Angiotension, Ang）等；可降低血管对舒张血管物质的反应如乙酰胆碱（acetylcholine, Ach）及β受体阻滞剂等，可使脑动脉收缩，脑血管阻力增加，导致脑血流量的下降，引起脑组织灌注不足，进一步加重脑组织的缺血、缺氧。

神经末梢NPY与组织内肥大细胞、血管内皮细胞及其分泌的生物学活性物质之间存在着相互作用（兴奋或者抑制），对组织炎症反应进行调制，同时炎症区域内的神经末梢发生敏感化，后者对组织炎症的转归也有重要的影响。

在脑出血急性期，脑组织及血浆NPY活性同步升高，其动态变化规律与脑出血后脑水肿的发生发展过程一致, NPY在脑出血继发性脑损害和脑水肿中具有重要作用，随病情严重程度的增加, NPY水平逐渐升高。此外，针对大鼠脑出血伴随的缺血性脑损害机制的研究，指出在血肿周边存在着由于血肿直接压迫及外渗血液中缩血管活性物质释放而造成的缺血水肿带，这为NPY在血肿周边活性增强的损伤性作用机制提供了病理形态学依据[6]。

NPY不仅对下丘脑功能产生直接影响，而且具有调节下丘脑激素分泌的作用，可能通过其特异性途径，控制垂体的激素分泌，是促发神经内分泌紊乱的又一重要机制。NPY能够促进下丘脑垂体激素的分泌，最终使血浆皮质醇增加，一方面

造成钠、水潴留及水、电解质紊乱，从而加重脑水肿；另一方面皮质醇本身具有神经毒性作用，它可影响葡萄糖转运及谷氨酸的摄取，对神经功能的恢复不利[7]。

**TBI与CGRP**

CGRP的结构特点：CGRP是1983年Rosenfeld等应用DNA基因重组和分子生物技术研究发现的一种由37个氨基酸组成的生物活性多肽，分子量3786.91。它与降钙素基因同源，由2800个碱基对组成，其中含有5个内含子和6个外显

子。由降钙素基因转录的RNA,最先在神经组织翻录成128个氨基酸组成的CGRP而发挥其生物效应。人和鼠的CGRP均含α和β两种基因，分别表达两种分子异构肽，二者具有相近似的生物活性，但氨基酸组成仅在第3、22、25位有所不同[8]。

CGRP的分布CGRP广泛分布于人和大鼠等动物的神经系统、心血管系统等组织中，在人和大鼠的神经系统中，以脊髓含量最高，在下丘脑、中脑、脑干、脊髓均发现有CGRP的特异性结合位点，在脑膜脑血管平滑肌，内皮细胞膜上均存在CGRP受体，近年来也发现，CGRP阳性神经纤维也大量存在于消化道

中, CGRP-LI纤维与肠道免疫细胞有密切接触，对不同的免疫细胞，其接触程度也不相同[9]。

CGRP与脑血管90年代初有一些研究工作者就提出CGRP是一种很强大的强心舒血管活性神经肽。CGRP作为一种内源性舒血管神经肽，在三叉神经-脑血管系统内浓度较高，对全身血管有不同程度的扩张作用，且在脑、心血管的作用更为显著。Nozaki实验证明CGRP血管舒张反应呈现不同程度的剂—效依赖性，即适当加大CGRP注入剂量时反应增强，浓度低则效应缓慢，但持续时间长，其作用强于SP、VIP等其它血管扩张介质[10]。

CGRP舒张脑血管的作用并不完全依赖血管内皮的完整性，去除内皮细胞其舒张作用依然仍存在, CGRP对粥样硬化的动脉仍有扩张作用，目前认为机制可能是：

（1）CGRP对血管的直接作用；（2）通过激活血管平滑肌细胞上K+-ATP通道来实现；（3）细胞内第二信使cAMP介导作用, cAMP升高程度与血管扩张反应强弱密切相关；（4）可能与CGRP能维持细胞内Ca2 +稳定，降低细胞膜Ca2 +通透性有关。CGRP对脑血管疾病方面的研究，可能会为脑血管病的防治提供一新的肽类药物。另外，CGRP与内皮素相互作用的研究也将成为一个研究热点，已有人研究证明

CGRP具有拮抗内皮素-1 ( ET-1)的血管收缩效应，与ET对血管有强烈、持久的相互拮抗作用研究表明，创伤性脑损伤后原发的脑组织、脑血管损伤、全身应激反应、以及随后的继发性脑水肿缺血缺氧都可直接或间接刺激CGRP的表达和释放，并与脑损伤脑水肿相互作用[11]。

**TBI与SP**

SP是由11个氨基酸组成的神经肽，广泛分布于神经系统、胃肠道系统及脑血

管中，具有扩张血管、保护神经等多种功能。SP在核糖体合成后，转化为有活性的11氨基酸多肽，其结构如下，

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH2. SP是速激肽家族的成员之一。速激肽的特征是有一个糖基化的碳末端，序列为

Phe-X-Gly-Leu-Met-NH2(哺乳动物中，X代表Phe或val)。哺乳动物的速激肽被两种不同的基因所编码：速激肽蛋白前体(preprotacchykinin, PPT)，PPT-A基因和PPT-B. PPT-A基因转录成mRNA前体，经过不同的剪切至少可以产生4种不同的组成，α-和δ-PPT-AmRNAs编码SP，而D-和Y-PPT-AmRNAs则编码SP和神经激肽

A(Neurokinin, NK)两种物质。PPT-B仅编码NKB，在CNS中表达，但在感觉神经元中则不表达[12]。

SP受体，又称为NK-1R，是具有7个A-螺旋跨膜结构的G蛋白偶联受体，其N端是糖基化部位，C端是磷酸化部位。SP与NK-1R特异结合后使受体内在化，通过激活磷脂酶C(PLC)并水解磷酸肌醇(PIP2)生成三磷酸肌醇(IP3)和二酯酰甘油

（DAG）两种第二信使发挥生物学效应。人的NK．1R基因定位于第2个染色体，跨度为45～60kb，含有407个氨基酸残基，相对分子量为46000。[13]

SP在中枢神经系统的不同部位分布已明确：SP在灰质含量高于白质，小脑含量极微，除了扣带回躯体运动、躯体感觉区和嗅区较高外，大脑皮质含量也相当低，皮质下区SP浓度高于皮质，最高浓度见于黑质及下丘脑、苍白球尾壳核及中央灰质，延髓含量中等。SP也见于周围神经系统，但含量较中枢为低，较高浓度见于脊神经节和颈交感干。大量研究表明在大鼠的视前区内侧、弓状核存在有SP样免疫反应神经元，而且，下丘脑内许多核团有SP样免疫反应神经元发出纤维投射到正中隆起。Jens证明正中隆起的内层和外层都存在SP免疫反应纤维，且外层纤维与垂体门脉毛细血管并行。在外周系统，SP主要位于胃肠、呼吸道、泌尿生殖道、皮肤、感觉器官、内分泌系统等几乎全身各个部位。Maghni用逆转录．聚合酶联反应(RT-PCR)法证明在食管平滑肌细胞中也可表达NK-1R。最近发现人真皮微血管内皮细胞也有SP mRNA的表达[14]。

SP是广泛分布于中枢和周围神经系统以及组织器官的神经活性肽，具有多种物学效应，如致痛、降压、血管扩张和毛细血管通透性增加等，而且还可以通过作用于免疫细胞引起神经源性炎症反应。P物质和其它的速激肽因直接作用于血管平滑肌而能引起血管舒张，并能促使血管内皮细胞产生一氧化氮(NO)；SP亦能增加损伤后的血管通透性及蛋白渗出。SP通过与其受体即NK-1R，NK-2R，NK-3R相结合并发挥生物学效应的。因SP与NK-1R的亲和力最大，故NK-1R又被称为P物质受体。NK三类受体均属于G．调节蛋白结合的受体亚家族成员。受体刺激可导致磷酸酯酶的激活，从而产生磷酸肌醇，并引起内部储存的Ca++释放。SP的许多

作用由NKl受体介导，NKl受体可以在许多细胞中表达，这些细胞有神经元、CNS中的许多神经胶质细胞、不同类型的循环免疫细胞以及炎症激活的免疫细胞等。该受体暴露于协同齐U(agonist)后则迅速脱敏，然后逐渐再次致敏，于配体结合后，这种受体将内在化(internalized)，这可能成为炎症反应的一个限制因素[15]。

中枢神经系统(CNS)的神经元和神经胶质细胞是SP的主要来源，SP及其受体的相互作用活化星形胶质细胞和小神经胶质细胞的信号传导通路，在CNS的保护性或破坏性炎症反应中有重要意义。在受到伤害时，SP主要作为痛觉递质可向上传递至中枢神经系统，并且逆向在损伤组织局部释放，启动神经源性炎症反应[16]。左红霞等在研究中发现SP含量的下降将加重脑血管病的发病过程，这可能与以下因素有关：①SP广泛分布于脑血管床及脉络膜丛，在脑微循环的调节、脑脊液的产生及脑脊液．脑间物质转运方面起重要作用。②SP能增加脑缺血后脑循环的稳定性。③SP能扩张脑血管，增加脑血流量，有利于缺血组织的恢复，并能激活单核巨噬系统，加速对坏死组织的吸收。④SP具保护神经的功效，包括神经组织的恢复或修复。

SP在TBI中的作用机制研究相对较少，段虎斌等在研究中发现SP在不同程度脑损伤大鼠TBI模型中表达不同，程度越重，SP表达越高，芬太尼镇痛能抑制SP表达，有效降低TBI损伤程度。

**TBI与AQP4**

近年来研究表明，AQP在体内水代谢中发挥着重要的作用，其中研究较深入的是AQP4在脑水肿发生中的作用，下面简要陈述。

AQP4的分子结构和生化特征，AQPs所有成员之间的基因序列具有一定的同源性。AQP4的基因定位在人染色体18q1112与q1211之间的连接处。由4个外显子(1～4)组成，它们分别编码127、55、27、92位氨基酸序列。其间还有3个内含子，长度分别为018、013和512 Kb. AQP4单体含有6个α螺旋跨膜区域。其N端和C端都在细胞内。6个α螺旋形成了三个胞外环(A、C、E)和两个胞内环(B、D), 其中B、E两个环伸入双层磷脂膜中折叠形成一个使水分子单线通过的通道，孔道的大小约为一个水分子左右(3～6A). E环对外界环境非常敏感，通过其对外界环境改变的感应，可激活AQP4功能，这一结构模型——

—“砂漏”(hourglass)由于AQP4在已知的汞结位点上缺乏半胱氨酸，对汞的水通透抑制作用不敏感，因而AQP4属于汞不敏感性水通道蛋白(Mercurial - insensitive water channel, MIWC)。按通透性分类, AQP4仅对水可选择性通过，而对尿素、甘油或其他中性小分子溶质不通透。AQP4有3个mRNA亚型，由N端外显子的差异所决定[17]。它们分别是AQP41M1、AQP41M23和AQP41M23X。

AQP4的组织分布及功能AQP4的组织分布很广，但主要在脑组织[18]。原

位杂交示, AQP4mRNA在神经胶质界膜、侧脑室及导水管的室管膜细胞、脉络丛上皮、下丘脑的视上核和室旁核、海马齿状回和小脑等部位均有表达。研究发现，在朝向血管面与软脑膜面的星型胶质细胞和室管膜细胞区有AQP4的高表达[19]。在神经元上未发现有AQP4的表达。血管周围的星形胶质细胞的突起是水分子流动的主要部位[20]，AQP4的存在可能起着调节水代谢的作用。此外, AQP4还可能参与调节血浆的胶体渗透压和控制抗利尿激素的分泌[21]。也有研究表明，

AQP4mRNA的表达与血脑屏障的完整性密切相关[22]。Ke C等发现血脑屏障破坏的灶性脑损伤诱导的脑水肿AQP4mRNA表达水平下降，而血脑屏障完整的弥漫性脑损伤诱导细胞毒性脑水肿AQP4mRNA表达并无明显改变，因此提出了AQP4mRNA与脑水肿中血脑屏障的完整性有关[23]。

AQP4与脑水肿1991年Preston等[24]对CHIP28的cDNA分子进行克隆和功能鉴定后，将AQP4的编码序列插入到非洲爪蟾的β2珠蛋白cDNA 5’和3’非翻译的序列中，经体外转录得到cRNA，然后将其注入到非洲爪蟾的卵母细胞中，在低渗溶液中观察其膨胀度，发现其表达AQP4后的水通透性增强了约20倍

[25]，卵母细胞迅速膨胀，并于5分钟内破裂。由于AQP4对水通透性高，在脑组织中广泛分布，并可受药物调控，现在已经成为脑水肿研究的热点。许多研究都表明，在脑水肿的发生发展过程中, AQP4的表达呈现出与脑水肿的病理生理过程相应的变化。

在对创伤性脑损伤的实验中, Vajda、Ke和Kiening等人发现[26, 27], 伤后24 h AQP4在损伤区的表达开始下降，而3 d后损伤区边缘的表达又开始增强。认为这一时间规律是因为血管源性脑水肿较短暂、细胞毒性脑水肿较持久的缘故。早期表达下降可能是对血管源性脑水肿的一种保护性反应，而后期表达增强则是细胞毒性脑水肿的必然结果。而在弥漫性脑外伤时，由于血脑屏障完整，脑组织发生细胞毒性脑水肿, AQP4的表达无变化。Vizuete等[28]研究也发现，脑机械性创伤或向纹状体内注射MNDA受体激动剂喹啉酸后，可诱发损伤区的AQP4

mRNA表达增加。给予62羟基多巴胺或前脑内侧束切割伤可导致远距离的损伤，6 d后，前者可引起AQP4 mRNA在受损的灰质中高表达，而后者只在切割伤处有高表达。经定位研究，认为创伤性脑水肿AQP4 mRNA的表达与血脑屏障的损伤有关。柯昌庶等[26]在此研究结果基础上，进一步研究了大鼠实验性脑挫伤灶内皮屏障抗原( EBA)与AQP4免疫反应性的动态改变，发现在血脑屏障损伤的皮质挫伤灶内，伤后1 d AQP4和EBA免疫反应性明显消失, AQP4阴性反应区面积明显大于EBA阴性反应区。3 d后, EBA的表达重新出现。6 d后, EBA表达延伸至挫伤中心区，而边缘开始有AQP4的表达。伤后11 d, 两者的免疫反应性基本恢复。以上研究结果均表明：创伤后，内皮功能受损导致血管源性脑水肿

的发生，同时，星形细胞足突水通道改变，延缓水分子进入脑组织起到保护性作用。

**TBI与NF-κB**

1986年Sen和Baltimore在成熟的B淋巴细胞中发现一种能与免疫球蛋白kappa轻链基因增强子区域10 bp序列相结合，引起kappa轻链基因转录，因此而得名。随着研究的深入，人们发现NF-κB广泛存在于各种细胞内，诸如T淋巴细胞、单核/巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞、表皮细胞、成纤维细胞、神经元细胞及星形胶质细胞等。NF -κB是由两个蛋白亚基(p50和p65)组成的二聚体，在胞浆中还有一种相对分子质量为36 000～37 000的蛋白，对NF-κB具有抑制作用，称为I-κB(inhibitory kappa B, I-κB)，I-κB与NF-κB结合成三聚体。正常时，一般处于静止状态，当受到某些刺激时，通过特定的蛋白激酶，使I-κB磷酸化后降解，NF-κB得以从胞浆中的三聚体释放出，并迅速进入细胞核内（常可发生在细胞受到刺激后35min内），与NF-κB的靶基因的同源序列位点结合，使这些靶基因的表达增加，从而产生各种不同的基因产物[27]。

创伤性脑损伤后继发性脑水肿被认为是多种因素参与的复杂级联反应的后果，其中炎性介质和细胞因子发挥了重要作用。研究证实，有许多种促炎细胞因子在脑损伤后高度表达，并与脑损伤严重程度密切相关。NF-κB分布于多种细胞类型中，在神经系统中也广泛存在，而NF-κB活化是机体效应细胞大量释放促炎细胞因子，导致组织炎症反应过度和组织损伤的关键环节。NF-κB是一种具有多向性转录激活功能的调节因子，可以被多种刺激物（如应激、炎症、氧自由基、细胞因子等）激活，其主要作用是调控编码多种细胞因子、趋化因子、生长因子、细胞黏附分子、免疫受体、氧化应激相关酶、转录因子、急性时相蛋白等，参与免疫、炎症、细胞凋亡等生理和病理过程中的基因表达调控。在正常生理状态下, NF-κB与其抑制因子I-κB蛋白家族中成员相结合而滞留于细胞质中，不具有转录活性[29]。在创伤性脑损伤发生时，当细胞受到剌激，启动细胞第二信使系统，I-

κB磷酸化及泛素化，发生降解并与NF-κB解离，NF-κB激活，由胞质移位至胞核与DNA上的启动子区域相应靶基因位点结合[30]，从而启动一系列免疫和炎症反应相关基因的转录，诱导众多的生物活性物质的表达：（1）酶类，如诱导型一氧化氮合酶、环氧化物酶、磷脂酶A2等。（2）黏附分子：血管-细胞黏附分子、细胞间黏附分子等。（3）细胞因子：IL-1、IL-6、IL–8、TNF-αγ-INF等。（4）急性期蛋白：HSP70。这些细胞基因产物直接参与创伤性脑损伤时的炎症和免疫反应[31]。NF-κB还可以通过调控多种凋亡相关基因的表达引起神经细胞的损伤或对神经细胞起一定的保护作用[32-35]。

**存在问题与展望**

神经源性炎症在周围组织器官中的作用机制研究较多，而其对中枢系统自身的作用研究尚未见文献报道。神经肽不仅在神经信息的传导中起重要的作用，亦是炎症反应和颅脑损伤的重要介质。对TBI的神经源性机制进行深入研究，将会为临床上脑损伤脑水肿的治疗提供新的思路。

参考文献：

[1]. Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths, 2002-2006. [http: //www. cdc. gov/Traumatic](http://www.cdc.gov/Traumatic) Brain Injury/index. html

[2]. 王忠诚. 神经外科学. 湖北: 湖北科学技术出版社, 2005. 365

[3]. Wall PD, Melzack R. Textbook of Pain. Fourth Edition. Churchill Livingstone, 1999.

[4]. Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. Arch Dermatol, 2003, 139: 1479～1487.

[5]. Blaser C, Wittwer M, Grandgirard D, et al. Adjunctive dexamethasone affects the expression of genes related to inflammation, neurogenesis and apoptosis in infant rat pneumococcal meningitis. PLoS One. 2011, 6(3): e17840.

[6]. Bloch Orin, Papadopoulos M C, Manley GT. et al. Aquaporin-4 gene deletion in mice increases focal edema associated with staphylococcal brain abscess. Journal of Neurochemistry. 2005, 95(1): 254～262.

[7]. Yang XP, Chiba S. Dissociation of potentiation of [Leu31-Pro34] neuropeptide Y on adrenergic and purinergic transmission in isolated canine splenic artery. Jpn J Pharmacol. 2000, 83(3): 197～205.

[8]. Petervari E, Balasko M, Uzsoki B, et al. Effects of neuropeptide Y antagonists on food intake in rats: differences with cold-adaptation. Peptides. 2006, 27(1): 150～156.

[9]. Malmstrom R E, Alexandersson A, Balmer K C, et al. In Vivo Characterization of the Novel Neuropeptide Y Y1 Receptor Antagonist H 409/22. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2000, 36(4): 516～525.

[10]. Bang R, Sass G. Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96, 345 AND L-733, 060

From cytokine-mediated liver injury [J] Phamacol Exp Ther,2003,305(1):31～9.

[11]. Hay DL, Poyner D. The preclinical pharmacology of BIBN4096BS, a CGRP antagonist. Cardiovasc Drug Rev. 2005, 23(1): 31～42.

[12]. Yoon SW, Goh SH, Chun JS, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone inhibits lipopolysaccharide- induced tumor necrosis factor-alpha production in leukocytes by modulating protein kinase A, p38 kinase, and nuclear factor kappaB signaling pathways. J Biol Chem. 2003, 278(35): 32914～32920..

[13]. Altinoz MA, Korkmaz R. NF-kappaB, macrophage migration inhibitory factorand cyclooxygenase- inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen- and NSAID-prevention of the ovarian cancer. Neoplasma. 2004; 51(4): 239～47

[14]. Benmessaoud-Mesbah O, Pouzet-Hardin H, Ayad G et al. effects of dehydration on aquaporin-4 distribution in supraoptic nucleus and in neurohypophysis of mice: p. 166. Journal of Neurochemistry. 2005, 94 Suppl. 2: 97.

[15]. Ishida H, Takemori K, Dote K, et al. Expression of glucose transporter-1 and aquaporin-4 in the cerebral cortex of stroke-prone spontaneously hypertensiveratsinrelationtotheblood-brainbarrierfunction. AmJHypertens. 2006, 19(1): 33～39.

[16]. Tomura S, Nawashiro H, Otani N, et al. Effect of decompressive craniectomy on aquaporin-4 expression after lateral fluid percussion injury in rats. J Neurotrauma. 2011, 28(2): 237-243.

[17]. Badaut J, Lasbennes F, Magist retti PJ, et al1Aquaporins in brain: distributions, Physiology, and pat hophysiology [ C] 1 International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2002, 22 (4): 367～378.

[18]. Nakahama K, Fujioka A, Nagano M, et al. 1A role of t he C-terminus ofaquaporin 4 in it s membrane expression in cultured ast rocytes1 Genes to Cells, 2002, 7 (7) : 731～733.

[19]. Zelenin S, Gunnarson E, Alikina T, et al1 Identification of a new form of AQP4mRNA tat is developmentally expressed in mouse brain [J] 1 International Pediat rics Research, 2000, 48 (3) : 335～337.

[20]. Rash J E, Yasumura T, Hudson CS, et al1Direct immunogold labeling of aquaporin24 in square arrays of ast rocyte and ependymocyteplasma membranes in rat brain and spinal cord [J] 1 Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (20) :

11981～11986.

[21]. Nielsen S, Nagelhus E A, Amiry2Moghaddam M, et al1 Specialized membrane domains for water t ransport in glial cells: high resolution immunogold cytochemist ry of aquaporin 24 in rat brain [J] 1 J Neurosci, 1997, 17 (1) :

171～180.

[22]. Manley G T, Fujimura M, Ma T, et al1Aquaporin 24 deletion in mice reducesbrain edema after acute water intoxication and ischemic stroke [J] 1 Nat Med, 2000, 6 (2) : 159～163.

[23]. Ke C, Poon W S, NG H K, et al1 Heterogeneous response of aquaporin 24 inedema formation in a replicated severe uaumatic brain injury model in rat [J] 1 Neurosci Lett, 2001, 301 (1) : 21～24.

[24]. Preston G M, Agre P1 Isolation of t he cDNA for eryt hrocyte integral membraneprotein of 28 kilodaltons : member of an ancient channel family [J] 1 Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88 (24) : 11110～11114.

[25]. King L S, Nielsen S, Agre P 1 Respiratory aquaporins in lung inflammation: t he night is young [JJ] 1 Am J Respir Cell Mol boil, 2000, 22 (1): 8～10.

[26]. Vajda Z, Pedersen M, Fuchtbauer EM, et al1Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin 24 in dyst rophin 2nullt ransgenic mice1 Proc Natl Acad Sci, 2002, 99 (20): 13131～13135.

[27]. Kiening KL, Landeghem F K, Schreiber S, et al1Decreased hemispheric Aquaporin 24 is linked to evolving brain edema following controlled cortical impact injury in rat s [JJ] 1 Neurosci Lett, 2002, 324 (2): 105～108.

[28]. Vizuete M L, Venero J L, Vargas C, et al1Differential upregulation of aquaporin 24 mRNA expression in reactive ast rocytes after brain injury: potential role in brain edema [J] 1 Neurobiol Dis, 1999, 6 (4): 245～258.

[29]. 柯昌庶, 潘伟生, 吴浩强大鼠实验性脑创伤挫伤灶内皮屏障抗原和Ⅳ型水通道蛋白免疫反应性的动态改变[J] 中国临床神经外科杂志, 2004, 9 (1) : 37～40.

[30]. Weihe E, Krekel J. The neuroimmune connection in human tonsils. Brain Behav Immunity, 1991, 5∶41～54.

[31]. Nozaki K, Okamoto S, Vemura Y, et al. Vascular relaxation properties ofCalcitonin gene2related peptide and vasoactive intestinal polypeptide in subarachnoid haemorrhage. J Neurosurg, 1990, 72∶792～797.

[32]. Bucinskaite V, Brodda G, Stenfors C, et al. Increased concentrations of Calcitonin gene - related peptide immunoreactivity in rat brain and peripheral

Tissue after ischacmia: correlation to flap survival Neuropetides,1998,32∶179～183.

[33]. Sun T, Luo J, Jia M, Li H, Li K, Fu Z. Small interfering RNA-mediated knockdown of NF-κBp65 attenuates neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. Eur J Pharmacol. 2012; 682(1-3): 79-85.

[34]. Lee JK, Chung J, McAlpine FE, Tansey MG. Regulator of G-protein signaling-10 negatively regulates NF-κB in microglia and neuroprotects dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. J Neurosci. 2011; 31(33): 11879-11888.

[35]. Barakat DJ, Dvoriantchikova G, Ivanov D, Shestopalov VI. Astroglial NF-κB mediates oxidative stress by regulation of NADPH oxidase in a model of retinal ischemia reperfusion injury. J Neurochem. 2012; 120(4): 586-597.

博士课题期间主持、参加和获奖的科研项目

**主持的科研项目**： 1、国家自然基金青年基金项目—创伤性脑损伤的神经源性机制及其干预实

验研究（项目批准号 30600637）第一负责人2、ft西省基础研究计划（ft西省自然基金）青年基金项目—神经源性炎症

在缺血性脑卒中的作用机制及其干预实验研究（项目批准号2010021034-4）第一负责人

3、ft西省归国留学基金--缺血性脑卒中神经源性炎症损伤机制及其干预实验研究（项目批准号2011-096）第一负责人

4、ft大一院院基金—PVP对帕金森病预后的影响及其数学模型的建立（项目批准号Y0517）第一负责人

5、ft西医科大学科技创新基金项目—缺血性脑卒中神经源性炎症损伤机制研究第一负责人

**参加的科研项目**：

1、国家“十五”攻关计划——“脑卒中的规范化外科治疗技术推广应用研究”（课题编号：2001BA703B16（B）），负责在ft西医科大学第一医院进行脑卒中的规范化外科治疗技术推广应用研究及其数据库建立。

2、国家高技术研究发展计划（863计划）生物和医药技术领域数字化医疗工程技术开发主题项目之子课题--医疗信息集成与融合技术研发（第四负责人）

4、ft西省卫生厅科技攻关计划课题帕金森病的现代外科治疗及其疗效预后分析第二负责人，项目批准号200502。

**获奖情况**：

**1、PVP对帕金森病预后的影响及其数学模型的建立的研究，国际先进水平，获ft西省科技进步奖二等奖。（第一名）**

2、“SLT接触式激光显微手术治疗脊髓髓内肿瘤的双盲随机对照研究”国际领先水平，获ft西省科技进步奖二等奖。（第六名）

3、2010年获ft西省“第七届青年科技奖”和“青年科研专家”奖称号，并荣记“二等功”一次。

4、2010年在德或德国北威州CDA合作奖一等奖。

5、2012年获ft西省“学术技术带头人”（原“333”人才工程人选）

博士课题期间发表论文情况

**第一作者**

**1. 创伤性脑损伤后大鼠脑创伤区皮层细胞早期凋亡的实验研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011, (09)：1094-1095.**

**2. Rho激酶抑制剂对创伤性脑损伤后脑细胞内亚二倍体比率的影响及其意义[J].中西医结合心脑血管病杂志，2012, (05)：579-580.**

**3. The role of neuropeptide Y and aquaporin 4 in the pathogenesis of intestinal dysfunction caused by traumatic brain injury. journal of surgical research.** [**(http: //dx. doi. org/10.1016/j. jss.2013.03.096,**](http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.03.096) **accepted 28 March 2013. published online 22 April 2013. Available online 18 April 2013. (SCI impact factor 2.247)**

4. Study on the neurogenic mechanisms of traumatic brain injury. The FASEB Journal. 2013;27:980.10. (SCI impact factor 5.712)

5. The role of NK1 receptor antagonist L-703, 606 in the experimental traumatic brain injury FASEB J. 2013 27:779.1. (SCI impact factor 5.712)

6. The Levels of Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P in the Plasma of

Rats with Traumatic Brain Injury and the Role of Neurogenic Inflammation in the Pathogenesis of TBI. FASEB J. 2009 23:926.2 (SCI impact factor 6.401)

7. Effects of low dose dopamine on expression of AQP4 following raumatic brain injury in rat. The Second Sino-French Symposium on Critical Care Medicine and The Shanghai Forum on Critical Care Medicine,, 2009/12/10.

8. The protection of NK1 receptor antagonist L-703,606 following traumatic brain injury in rat. The Second Sino-French Symposium on Critical Care Medicine and The Shanghai Forum on Critical Care Medicine, 2009/12/10

**通讯作者**：

1. HIF-1α在缺血性脑卒中脑组织中表达的实验研究[J].中国医疗前沿，2011，(03)：26-27.

2. 芬太尼对创伤性脑损伤大鼠脑组织中P物质表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志，2011, (11)：1371-1372.

3. 大鼠颅脑损伤后心肌损害和线粒体锰超氧化物歧化酶活性改变及银杏叶提取物的干预作用[J].中国中西医结合杂志，2010，(03)：299-3 02.

4. 芬太尼对创伤性脑损伤后大鼠丘脑腹后内侧核电生理变化的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志，2009, (05)：565-566.

5. 小剂量多巴胺对大鼠颅脑创伤后水通道蛋白4表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志，2009，(11)：1319- 1321.

6. 丹参注射液联合小剂量多巴胺对老年脑外伤大鼠肾功能的影响[J].中国中西医结合肾病杂志，2009, (12)：1076-1078.

7. 银杏叶提取物对大鼠颅脑损伤后心肌病变的保护作用及神经肽Y基因表达的影响[J].中国药物与临床，2009, (12)：1156-1158.

8. CGRP受体拮抗剂CGRP8-37对颅脑创伤后大鼠保护作用的实验研究[J].中西医结合心脑血管病杂志，2010，(01)：85-86.

9. NK1受体拮抗剂L-703 606对大鼠创伤性脑损伤保护作用的实验研究[J].中国药物与临床，2010，(01)：5-7.

**非通讯作者**：

1. 骨髓间充质干细胞联合血管内皮生长因子对大鼠创伤性脑损伤细胞凋亡的抑制作用[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011，(11)：1369-1371. 第二作者

2. 原代骨髓间充质干细胞治疗创伤性脑损伤大鼠模型[J]. 中国医疗前沿，2011，(16)：17-18. 第三作者

3. 脑外伤者血浆NSE含量与损伤程度的相关性[J].中国法医学杂志，2010，(02)：94-96. 第五作者

4. 颅底骨折颅内感染患者血清NF-κB、NSE水平变化及其临床意义[J].内蒙古民族大学学报，2009，(05)：5-7. 第二作者

5. Expression of Aquaporin 4 mRNA during Acute Stage of Traumatic Brain Injury in Rats FASEB J April 22, 2009 23:356.7 (SCI impact factor 6.401)第二作者

致 谢

时光荏苒，日月如梭，在我即将完成博士学业之际，我衷心感谢恩师范益民教授多年来对我在工作和学习上的谆谆教诲和悉心指导，导师严谨的科学态度、一丝不苟的工作作风、渊博的知识、精湛的医术、敏锐的眼光、高尚的人格一直是我学习的楷模。在导师精心指导下我的博士课题才得以顺利完成，导师对我的教育和指导将令我终生受益！

衷心感谢ft西医科大学第一医院神经外科主任郝解贺、刘跃亭、孙之洞、仝海波、王绍樑、赵学明、郑安潮教授，高刘民、闫青云、薛乃照、王宏勤、陈来照、朱权、冉孝龙副教授等多年来对我临床工作和博士学业的支持和帮助！

衷心感谢我的好兄弟蒯东、万大海、连世忠、李涛、王永红副主任医师，刘晓东、黄忻涛主治医师，聂晓东、马宁、郭庚、药天乐住院医师及全体护士在临床工作和课题研究期间的帮助！

衷心感谢我的师弟王学蛟、闫晓鹏、程文刚、赵容、李璞、薛文、李银琦、陈垒、张学波、夏添、皇甫斌、贾志亮、郝强、成睿等在实施我的博士课题各项工作中的帮助！

衷心感谢ft西医科大学中心实验室张华屏老师、窦岩老师，生理教研室祁金顺教授、张策教授、杨晓荣副教授，分子生物学解军教授、郭睿副教授、赵虹副教授，以及电镜中心姜峰老师对我实验的指导和协助！

衷心感谢病理科梁建芳主任、肖虹教授、白陶副主任医师、万惠丽技师、白瑞兵技师、高建忠技师等对我病理实验的指导和帮助！

衷心感谢ft西医科大学实验动物中心陈朝阳副教授、景志杰讲师为本实验提供高质量的实验动物！

衷心感谢统计学教研室刘桂芬教授、流行病学博士李淑珍副教授在我博士学习期间和做课题期间精心传授给我统计学知识和指导我设计实验及分析实验结果，使我受益匪浅！

衷心感谢解放军总医院（301医院）尹岭教授、天津总医院神经外科张建宁教授、江荣才教授、雷平副教授等对我博士课题的支持和帮助！

衷心感谢国家自然基金委员会、ft西省留学基金委、ft西省科技厅、ft西医科大学、ft西医科大学第一医院对我课题的资助！

衷心感谢德国杜塞尔多夫大学神经外科主任、博导-H. J. Steiger教授、

Häggi教授、Vesper教授、Sabel教授、Schu教授、Bostmann教授、Towoskii

博士等在我德国研修及在德做博士课题期间给予我无私的帮助和学习指导！

衷心感谢德国汉诺威国际神经科学中心主任萨米（Samii）教授对我在颅底解剖和神经内窥镜技能培训方面的指导并授予我结业证书！

衷心感谢北京宣武医院神经外科主任凌峰教授及其率领的中国INI代表团在德参加INI成立十周年大会期间对我的关照，使我有机会与世界神经外科学会主席Peter Black教授（美国）、伽马刀创始人之一L. Steiner教授（美国）、美国《SPINE》杂志主编Sontag教授（美籍德国人）、神经解剖名词Kawasa三角的提出人—日本专家T. Kawasa、香港中文大学脑外科主任潘伟生等世界上神经外科学的精英和泰斗接触，交流思想并合影留念，我想这对我是一种激励，也对我一生会产生重要影响！

衷心感谢ft西省发改委、德国北威州政府对我德国研修项目的资助，感谢德国国际教育组织InWEnt、科隆CDC语言培训中心、ft西青年干部管理学院萨克森德语培训中心对我德语的培训和在德研修期间生活学习的安排和帮助，使我有机会到德国接触世界最新的神经外科技术、世界级大师、诺贝尔获奖者、浩如烟海的外文图书等等，使我开阔了眼界，学习到许多新技术、新知识，促进了我博士课题的完善和进一步发展。

感谢德国北威州政府为我颁发CDA一等奖学金，使我延长在德留学时间，学到了更多新知识、新技能！

衷心感谢我的家人对我博士课题实验默默的支持，给予我极大的精神鼓励。衷心感谢所有关心和帮助过我的老师、同学、同事和亲朋好友，是你们给了

我学习前进的动力、积极向上的工作态度和今天快乐幸福的生活。我会在今后的学习、工作和生活中尽我所能，回报你们给予我的帮助。谢谢！