

褪黑素通过 NF- κ B 通路改善 TBI 小鼠神经炎症反应的作用研究

王文婷 刘昱荣 强智璇 闫玉洁 常翠翠

西安培华学院 中国陕西西安 710125

【摘要】目的：创伤性脑损伤是一种常见的神经功能损伤疾病。TBI 后脑部神经会受到严重创伤，本实验将以 C57BL/6N 小鼠为研究对象，通过 NF- κ B 通路探究褪黑素 (Melatonin, MT) 对小鼠创伤性脑损伤的改善作用。方法：本课题将 30 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、药物干预组。对照组正常饲养；模型组构建 TBI 小鼠模型；药物干预组分为低、中、高剂量；采用 mNSS 评分对小鼠神经功能缺损进行评价；qRT-PCR 法检测 TLR4 及 NF- κ B 基因的表达；Western blot 实验，检测 IL-1 β 和 IL-6 蛋白的变化。结果：对照组 mNSS 评分为 1 分，TBI 组 mNSS 评分 ≥ 10 分，药物干预组 mNSS 评分 ≤ 7 分；qRT-PCR 实验中，TBI 组与对照组比较，脑组织中 TLR4 及 NF- κ B 的 mRNA 含量升高，MT 治疗组与 TBI 组比较，脑组织中 TLR4 及 NF- κ B 的 mRNA 含量降低；Western blot 实验中，TBI 组与对照组比较，脑组织中 IL-1 β 和 IL-6 的蛋白表达含量升高，MT 药物干预组较 TBI 组，IL-1 β 和 IL-6 蛋白表达降低。结论：MT 可以通过 NF- κ B 通路降低炎症因子的表达，进而可改善小鼠神经炎症反应。

【关键词】褪黑素；创伤性脑损伤；神经炎症

【Abstract】Objective: Traumatic brain injury (TBI) is a common neurological injury. Brain nerves will be severely damaged after TBI. This experiment will study C57BL/6N mice, and explore the improvement of Melatonin (MT) on traumatic brain injury in mice through the NF- κ B pathway. Methods: Thirty C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group and drug intervention group. The control group was fed normally. TBI mouse model was constructed in model group. Drug intervention group was divided into low, medium and high dose; mNSS score was used to evaluate the neurological impairment of mice. The expression of TLR4 and NF- κ B gene was detected by qRT-PCR. Western blot assay was used to detect the changes of IL-1 β and IL-6 protein. Results: mNSS score in control group was 1 point, mNSS score in TBI group was ≥ 10 points, mNSS score in drug intervention group was ≤ 7 points. In qRT-PCR assay, mRNA contents of TLR4 and NF- κ B in brain tissue increased in TBI group compared with control group, but decreased in MT group compared with TBI group. In Western blot assay, the protein expressions of IL-1 β and IL-6 in brain tissue of the TBI group were increased compared with the control group, while the expressions of IL-1 β and IL-6 were decreased in the MT drug intervention group compared with the TBI group. Conclusion: MT can reduce the expression of inflammatory factors through NF- κ B pathway and improve the neuroinflammatory response in mice.

【Key words】melatonin; Traumatic brain injury; neuroinflammation

引言

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是一种常见的由于外部机械力对大脑造成损害的神经外科急重症，它是由原发性损伤和继发性损伤共同作用的高度复杂的疾病，但目前尚缺乏有效的治疗方法。近年来，由交通事故引起的 TBI 也在逐年上升，占创伤病例的第二位。TBI 后会引发炎症反应、氧化应激等继发性损伤，因此在 TBI 全病理过程中，神经炎症起着重要作用。研究发现[1]，TBI 后脑组织的炎症反应参与认知功能障碍发生、发展的病理生理过程。因此如何早期干预炎症反应，减轻 TBI 后脑组织损伤，改善认知功能，是目前神经外科相关领域研究的热点和难点。

褪黑素 (Melatonin, MT) 具有调节神经系统、内分泌系统等功能。在临床治疗中，MT 已经作为通用于失眠的短期治疗，且副作用较小。有研究发现，MT 可以抑制内质网应激引起的细胞凋亡[2]。还有研究表明，MT 可以改变水肿相关分子的转录活性，对缺血缺氧后脑组织具有保护作用。但 MT 与炎症反应之间的研究机制还尚不明确。

炎症反应是组织损伤后发生的一系列局部细胞和血管防御反应，是机体通过免疫细胞清除损伤因子的一种保护机制[3]。TLR4 / NF- κ B 信号通路是近年来研究发展与抗炎免疫机制紧密相关的信号传导通路，在炎症发生发展中起重要作用[4]。为探索 MT 与 TBI 神经炎症之间的关系，本

研究将以 C57BL/6N 小鼠为实验对象，探索 MT 对创伤性脑损伤作用的研究，为 TBI 的救治与康复提供理论依据。

1 材料与方

1.1 主要仪器与试剂

C57BL/6 小鼠购买于成都达硕，褪黑素购于 Solarbio, FastKing RT Kit (With gDNA) 购于天根，HE 试剂盒购于索莱宝，SuperReal 荧光定量混试剂增强版购于天根，q-PCR 仪购于罗氏，超纯水系统购于 Veolia，微量台式冷冻离心机购于 Thermo，显影仪购于伯乐。

1.2 动物分组

实验将分为以下五组：空白对照组 (CTL 组)，TBI 组 (T 组)，低剂量 MT 1 mg/kg (低 MT 1 组)，中剂量 MT 5 mg/kg (中 MT 5 组)，高剂量 MT 10 mg/kg (高 MT 10 组)，每组 6 只小鼠。

1.3 模型构建与给药

小鼠经 10% 的水合氯醛 0.1ml/10g 腹腔注射麻醉后，去除头皮部位的毛发，将其固定在适配器上，沿头骨中线靠右侧前凶前钻开，采用 30g 的重锤，以 3.5m/s 的速度由 20cm 高处沿外周导管落下撞击小鼠头部，深至 2mm 处停留 0.2s 构建 TBI 模型，随后用碘伏对其进行消毒处理，缝合皮肤。对照组不予以处理；药物干预组在 TBI 模型后半小时内灌胃低剂量 (1 mg/kg)、中剂量 (5 mg/kg)、高剂量 (10 mg/kg)。

1.4 mNSS 评分

检测小鼠的运动、感觉等行为,根据改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)评价小鼠神经功能缺失程度,评分越高表示神经受损越严重。

1.5 qRT-PCR 法检测 TLR4、NF-κ B 基因的表达

脱颈处死小鼠,取大脑皮层,TRIZOL 法提取 RNA,设计引物,以 GAPDH 作为对照,用 qPCR 法检测 TLR4、NF-κ B 基因的表达。

1.6 免疫印迹法检测 IL-6、IL-1β 蛋白的含量

脱颈处死小鼠,取大脑皮层,提取各组总蛋白,用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转膜,封闭,加一抗过夜,加二抗孵育 1h 后曝光。

1.7 统计学方法

用 Graphpad Prism 9 软件进行数据统计与分析,统计学数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 LSD-T 检验, $P \leq 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 mNSS 评分

与 sham 组相比, TBI 组 mNSS 评分显著升高 ($p < 0.05$),与 TBI 组相比, mNSS 评分显著降低 ($p < 0.05$)。见表 1。

表 1 mNSS 评分比较

组别	n	mNSS 评分
CTL 组	6	1.0 ± 0.00
T 组	6	10.84 ± 1.52 [*]
低 MT 1 组	6	6.72 ± 0.64 [#]
中 MT 5 组	6	4.51 ± 0.48 [#]
高 MT 10 组	6	3.81 ± 0.48 [#]

n=4, *, $p < 0.05$, VS. CTL 组; #, $p < 0.05$, VS. T 组

2.2 q-pcr 法检测小鼠大脑皮层 TLR4、NF-κ B 基因的表达

如图 1,与 CTL 组相比, T 组的 TLR4、NF-κ B 基因的表达量均上升 ($p < 0.05$),而 MT 组与 T 组相比, TLR4、NF-κ B 基因的表达量呈现明显下降趋势 ($p < 0.05$),且高 MT 10 组效果更好。

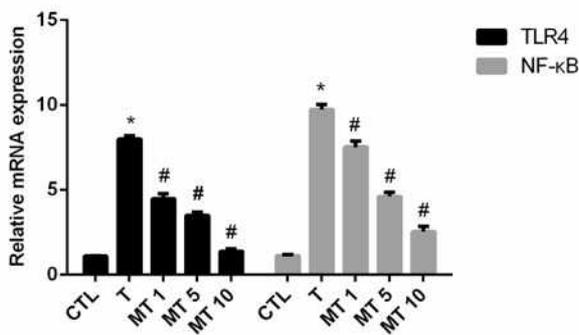


图 1 小鼠大脑皮层 TLR4、NF-κ B 基因表达的比较

n=4, *, $p < 0.05$, VS. CTL 组; #, $p < 0.05$, VS. T 组

2.3 小鼠大脑皮层 IL-6、IL-1β 蛋白表达的影响

如图 2、3, T 组与 CTL 组相比, IL-6、IL-1β 蛋白的表达显著上调,而 MT 处理后, IL-6、IL-1β 蛋白的表达显著下调 ($p < 0.05$),表明 MT 可以通过下调 IL-6、IL-1β 蛋白的表达进而改善神经炎症 ($p < 0.05$)。

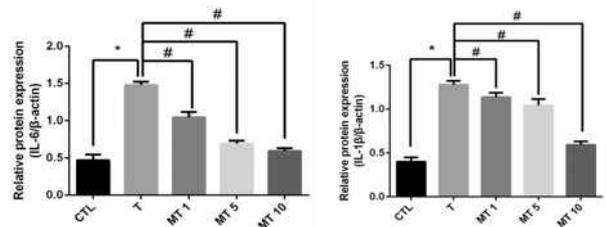


图 2 小鼠大脑皮层 IL-6 蛋白表达的影响 图 3 小鼠大脑皮层 IL-1β 蛋白表达的影响

n=4, *, $p < 0.05$, VS. CTL 组; #, $p < 0.05$, VS. T 组

3 讨论

TBI 是社会面临的重要健康问题,现如今暂且没有较好的医治方式。TBI 后可致使记忆力、运动能力和认知力等下降,严重影响患者的生活。研究表明 PGAM5 敲除可缓解 TBI 后的神经元损伤[5],另有研究表明促红细胞生成素能够降低 TBI 后的病死率、改善患者神经功能,是一种具有保护神经的药物[6]。

本课题基于创伤性脑损伤的模型,研究了不同浓度的 FX 对炎性因子的影响,虽得出 FX 具有改善 TBI 后的运动功能障碍以及具有减轻炎症的作用,但在抗击炎性因子类型以及 TBI 的其它病机方面仍有不足。所以继续探究 TBI 的病理机制,发明新的医治药物以及医治靶点显得尤为重要。

4 结论

本课题以 C57BL/6 为研究对象,构建 TBI 模型,采用 mNSS 评分对小鼠神经功能缺损进行评价; qRT-PCR 法检测 TLR4 及 NF-κ B 基因的表达; Western blot 实验检测 IL-1β 和 IL-6 蛋白的变化。实验结果表明 MT 可以通过 NF-κ B 通路降低炎性因子的表达,进而可改善小鼠神经炎症反应。

参考文献:

[1]顾艳兰,赵思远,陆秋霞,等.小鼠小胶质细胞内 SENP3 介导的神经炎症在创伤性脑损伤中的作用机制研究[J].中国病理生理杂志, 2022, 38(07): 1161-1168.

[2]秦荣,张琰,熊鹏举,等.褪黑素治疗对创伤性脑损伤大鼠海马组织炎症反应的影响[J].生物医学工程与临床, 2021, 25(05): 533-538.

[3]马钦海,陈瑞晗,雷标,等.基于 NF-κ B 通路探讨六神胶囊对脂多糖诱导巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应的影响[J].中医杂志, 2022, 63(04): 362-369.

[4]封艳艳,蔡尚志,何江山,等.针刺对慢性疲劳模型大鼠海马 TLR4/NF-κ B 信号通路及星形胶质细胞的影响[J].针灸临床杂志, 2023, 39(02): 68-74.

[5]Chen Y, Gong K, Xu Q, et al. Phosphoglycerate Mutase 5 Knockdown Alleviates Neuronal Injury After Traumatic Brain Injury Through Drp1-Mediated Mitochondrial Dysfunction. Antioxid Redox Signal. 2021, 34(2): 154-170.

[6]吴晨瑞,何虹兵,程子琦,等.重组人促红细胞生成素改善小鼠创伤性脑损伤神经功能[J].基础医学与临床, 2020, 40(03): 289-293.

作者简介:王文婷(2001.08),女。

基金项目:西安培华学院 2022 年大学生创新创业训练计划项目。项目编号:PHDC2022069