

· 实验研究 ·

阿托伐他汀对颅脑损伤大鼠神经元凋亡的抑制作用

唐菁华 孙秀勤 王建军

**【摘要】目的** 探讨阿托伐他汀对颅脑损伤(TBI)大鼠神经元凋亡的抑制作用及机制。**方法** 30 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和阿托伐他汀组,各 10 只。采用液压打击法制作 TBI 模型,阿托伐他汀组连续灌胃阿托伐他汀 2 周(1 mg/kg/d),假手术组、模型组灌胃等体积生理盐水。给药结束后第 2 天,参照 Zea Longa 5 分制标准进行神经功能评分。酶联免疫吸附法检测血清肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白介素(IL)-6 和 IL-1 $\beta$  水平;免疫印迹法检测损伤脑组织 Toll 样受体 4(TLR4)、核转录因子(NF)- $\kappa$ B p65、p-I $\kappa$ B、cleaved Caspase-3 蛋白表达;末端标记法检测神经元凋亡;HE 染色观察脑组织病理变化。**结果** 与模型组相比,阿托伐他汀组大鼠神经功能缺损评分、细胞凋亡率、血清 IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平明显改善( $P<0.05$ ),损伤脑组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、p-I $\kappa$ B、cleaved Caspase-3 水平明显下调( $P<0.05$ );HE 染色显示脑组织损伤程度明显减轻。**结论** 阿托伐他汀可能通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路,抑制 TBI 大鼠的神经元细胞凋亡,促进神经功能恢复。

**【关键词】** 颅脑损伤;阿托伐他汀;大鼠;神经元;细胞凋亡

**【文章编号】** 1009-153X(2020)04-0227-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1<sup>+</sup>5; Q 786

**Inhibitive effect of atorvastatin on neuron apoptosis in rats with traumatic brain injury and its mechanism**

TANG Jing-hua, SUN Xiu-qin, WANG Jian-jun. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

**【Abstract】Objective** To analyze inhibitive effect of atorvastatin on neuron apoptosis in the rats with traumatic brain injury (TBI) and its mechanism. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into 3 groups of 10 animals each, i.e. sham operation group, model group and atorvastatin group. TBI models were made by fluid-percussion technique. The oral administration of atorvastatin (1 mg/kg/d) was performed for 2 weeks in the rats of atorvastatin group after the successful establishment of TBI model. The neurological function defects were determined by Zea Longa method after the treatment. The serum levels of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-6 and IL-1 $\beta$  were detected by enzyme linked immunosorbent assay. The expressions of Toll-like receptor 4 gene (TLR4), nuclear factor (NF)- $\kappa$ B p65, p-I $\kappa$ B and cleaved Caspase-3 protein in the injured brain tissues were determined. The apoptosis of the neurons in the injured brain tissues was determined by TdT-mediated dUTP nick end labeling and the pathological change in the injured brain tissues was observed by HE staining. **Results** The scores of neurological function defects, apoptosis rate of the neurons, the levels of serum IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and the levels of TLR4, NF- $\kappa$ B p65, p-I $\kappa$ B and cleaved Caspase-3 protein expressions in the injured brain tissues were significantly lower in atorvastatin group than those in the model group ( $P<0.05$ ). HE staining showed that the degree of damage to the brain tissues was obviously reduced in atorvastatin group compared to that in the model group. **Conclusion** Atorvastatin may inhibit apoptosis of neurons by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in the rats with TBI.

**【Key words】** Traumatic brain injury; Atorvastatin; Rats; Apoptosis; Mechanism

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是一种常见的外伤,主要表现为意识障碍、头痛、呕吐等。研究显示,TBI 后缺血缺氧、神经细胞凋亡、炎症反应等可引起一系列继发损伤,导致脑缺血、脑梗死甚至死亡<sup>[1]</sup>。阿托伐他汀具有调脂、抗氧化、抗炎等药理学作用,可以通过血脑屏障,临床常用于心脑血管疾病的治疗<sup>[2]</sup>。有研究显示,阿托伐他汀可以改善 TBI 大鼠的神经功能,保护脑组织损伤<sup>[3]</sup>,但作用机制尚

不清楚。本研究探讨阿托伐他汀对 TBI 大鼠神经元凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只,体重 230~260 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号 SCXK(京)2015-0001。按随机数字表法随机分为假手术组、模型组和阿托伐他汀组,各 10 只。模型组和阿托伐他汀组参照液压打击法制作 TBI 模型,假手术组仅打开骨窗,不进行打击损伤。

1.2 动物造模及给药 模型组和阿托伐他汀组大鼠

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.04.012

作者单位:637000 四川南充,川北医学院附属医院儿科(唐菁华、孙秀勤、王建军)

参照液压打击法制作 TBI 模型<sup>[4]</sup>。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液 (2 ml/kg) 麻醉, 常规消毒皮肤, 于大鼠头部正中切开头皮约 3 cm, 剥离颅骨膜, 用磨钻钻取直径约 4 mm 骨窗。调节管口对准骨窗, 采用液压脑创伤仪 (MODEL01-B, 美国 NEW SUN 公司) 建立大鼠液压脑创伤模型, 设置强度为 101.3~152.0 kPa。大鼠出现呼吸暂停数秒、四肢抽搐或小便失禁等, 则为造模成功。造模成功后, 阿托伐他汀组大鼠立即灌胃阿托伐他汀 (1 mg/kg; 辉瑞制药有限公司, 国药准字 H20051408), 每天 1 次; 模型组和假手术组灌胃等量生理盐水; 连续灌胃 2 周。

1.3 大鼠神经功能评估 给药结束后第 2 天, 参照 Zea Longa 5 分制标准<sup>[5]</sup>进行神经功能评分。

1.4 取材 神经功能评估结束后, 立即处死大鼠, 迅速断头取脑, 取大鼠脑皮质损伤组织, 将其分为 2 份, 一份置于 4% 多聚甲醛中固定, 进行常规的脱水、透明、包埋和切片, 用于 HE 和末端标记法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 染色; 另一份置于 -80 ℃ 保存, 用于免疫印迹法检测。

1.5 脑组织病灶的病理变化和神经元凋亡的观察 一份切片进行 HE 染色, 光镜下观察组织的病理变化, 每张切片随机取 5 个视野拍照; 另一份用于 TUNEL 染色, 严格按照试剂盒说明操作染色, 在光镜下观察, 每张切片随机取 5 个视野拍照。计算每个视野下细胞总数及阳性细胞数, 并计算出比值, 则视为细胞凋亡率。

1.6 血清炎症因子水平检测 采集大鼠股动脉血, 3 500 转/min 离心 10 min, 取上清, 采用酶联免疫吸附法测定血清白介素 (interleukin, IL)-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 和 IL-1 $\beta$  水平。严格按试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司) 说明书进行测定。

1.7 免疫印迹法检测神经元凋亡相关蛋白表达 免疫印迹法检测损伤脑组织 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor, TLR4)、核转录因子 (nuclear factor, NF)- $\kappa$ B p65、p-I $\kappa$ B、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cleaved cysteine aspartic protease, cleaved caspase)-3 表达水平。取损伤脑皮层组织约 50 mg, 匀浆, 用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液溶解, 使用细胞裂解液提取总蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白质定量, 取 50  $\mu$ g 总蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后转膜至硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 采用 TBST 洗膜后加入一抗 (美国 Santa Cruz 公司) 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜后加二抗 (美国 DAKO 公司) 37 ℃

孵育 2 h, ECL 显影, 采用凝胶成像系统分析蛋白条带灰度值。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析; 以  $P < 0.05$  表示具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 阿托伐他汀对 TBI 大鼠脑组织损伤和神经功能的影响 HE 染色结果显示, 假手术组大鼠脑组织细胞结构完整, 未见明显病理变化; 模型组大鼠脑组织疏松肿胀, 神经元间隙明显增大, 伴有炎性细胞浸润; 阿托伐他汀组大鼠脑组织损伤程度较模型组明显改善, 见图 1。与假手术组 [(0.24 $\pm$ 0.05) 分] 相比, 模型组 [(2.67 $\pm$ 0.31) 分] 和阿托伐他汀组 [(1.52 $\pm$ 0.23) 分] 神经功能缺损评分明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 阿托伐他汀组神经功能缺损评分明显下降 ( $P < 0.05$ )。

2.2 阿托伐他汀对 TBI 大鼠神经元凋亡的影响 与假手术组 [(14.38 $\pm$ 3.62)%] 相比, 模型组 [(48.62 $\pm$ 8.58)%] 和阿托伐他汀组 [(32.76 $\pm$ 7.94)%] 神经元凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 阿托伐他汀组神经元细胞凋亡率明显下降 ( $P < 0.05$ )。

2.3 阿托伐他汀对 TBI 大鼠血清炎症因子水平的影响 与假手术组相比, 模型组和阿托伐他汀组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 阿托伐他汀组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平均明显下降 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.4 阿托伐他汀对 TBI 大鼠损伤脑组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、p-I $\kappa$ B、cleaved Caspase-3 表达的影响 与假手术组相比, 模型组和阿托伐他汀组大鼠损伤脑组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、p-I $\kappa$ B、cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平明显上调 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 阿托伐他汀组大鼠损伤脑组织 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、p-I $\kappa$ B、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显下调 ( $P < 0.05$ )。见图 3、表 2。

## 3 讨论

阿托伐他汀是一种亲脂性的他汀类药物, 可以通过血脑屏障, 具有抗氧化、抗炎、清除自由基等药理作用, 对于 TBI 引起的小鼠脑组织损伤具有保护作用<sup>[6]</sup>。杨会杰等<sup>[7]</sup>研究显示, 阿托伐他汀可以有效减轻局灶性脑缺血大鼠的脑组织损伤, 促进神经功能的恢复。本文结果显示阿托伐他汀可显著改善 TBI 大鼠脑组织损伤, 促进神经功能恢复。研究表

明,TBI引起的神经细胞凋亡和炎症反应是引起TBI后继发性脑组织损伤的主要原因<sup>[8]</sup>。IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 均为活化的单核巨噬细胞合成并分泌的一种致炎因子,可以诱导多种炎性介质的产生,参与脑组织损伤后的细胞水肿、炎症反应、细胞凋亡等病理过程,在TBI后继发性脑组织损伤中具有重要作用<sup>[9]</sup>。

Chu等<sup>[10]</sup>研究表明,TNF- $\alpha$ 可以调控凋亡相关蛋白Caspase-3的表达,激活细胞凋亡级联反应,诱导细胞凋亡。本文结果显示阿托伐他汀明显降低TBI大鼠血清IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平。这提示阿托伐他汀可能通过抑制机体炎症因子的释放,抑制神经元细胞凋亡。

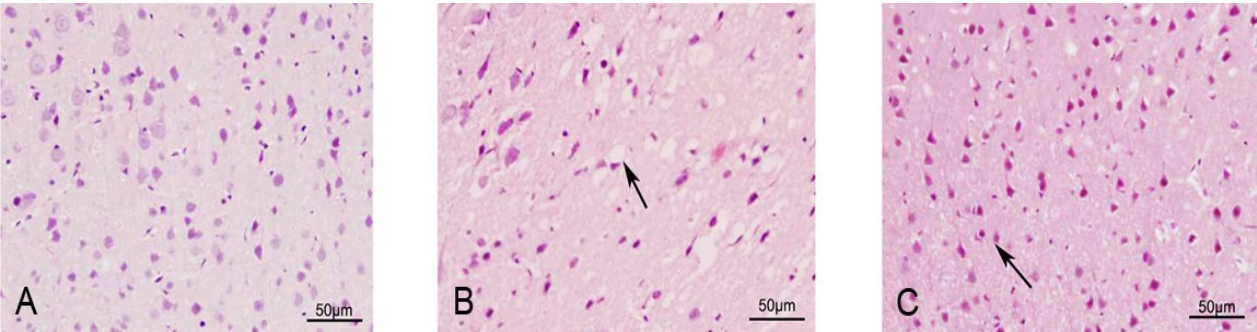


图1 各组大鼠脑组织的病理变化(HE染色)  
A. 假手术组;B. 模型组,↑示损伤神经元;C. 阿托伐他汀组,↑示损伤神经元

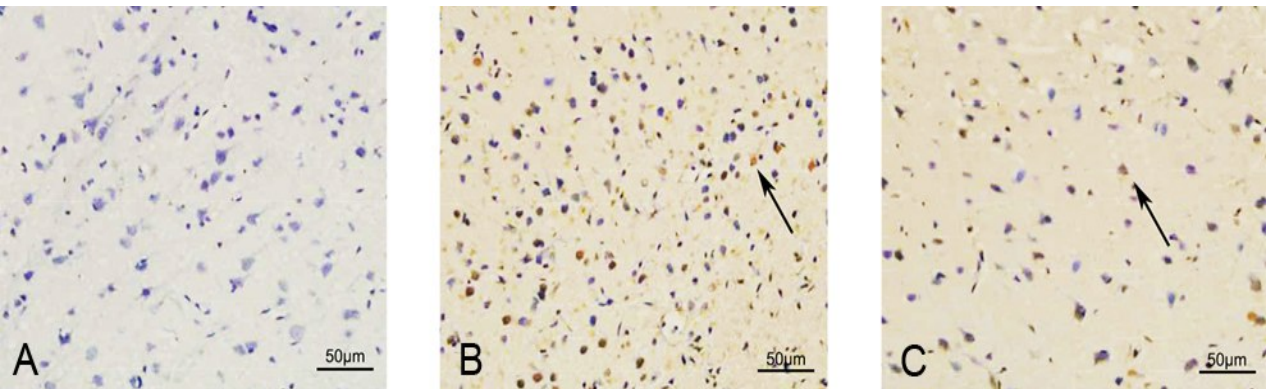


图2 阿托伐他汀对颅脑损伤大鼠神经元凋亡的影响(TUNEL染色)  
A. 假手术组;B. 模型组,↑示凋亡神经元;C. 阿托伐他汀组,↑示凋亡神经元

表1 阿托伐他汀对颅脑损伤大鼠血清炎症因子水平的影响

组别	IL-6(pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-1 $\beta$ (pg/ml)
假手术组(n=10)	72.44 $\pm$ 15.89	43.22 $\pm$ 8.42	28.25 $\pm$ 5.84
模型组(n=10)	187.31 $\pm$ 28.64*	112.23 $\pm$ 18.65*	58.96 $\pm$ 9.76*
阿托伐他汀组(n=10)	124.50 $\pm$ 24.13*#	72.59 $\pm$ 10.12*#	44.65 $\pm$ 7.43*#

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;与模型组相应值比,# $P<0.05$ ;IL. 白介素;TNF- $\alpha$ . 肿瘤坏死因子- $\alpha$

表2 阿托伐他汀对颅脑损伤大鼠损伤脑组织神经元凋亡相关蛋白表达的影响

组别	TLR4	NF- $\kappa$ B p65	p-I $\kappa$ B	cleaved Caspase-3
假手术组(n=10)	0.21 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.03
模型组(n=10)	0.67 $\pm$ 0.08*	0.63 $\pm$ 0.07*	0.54 $\pm$ 0.06*	0.75 $\pm$ 0.09*
阿托伐他汀组(n=10)	0.44 $\pm$ 0.05*#	0.42 $\pm$ 0.05*#	0.39 $\pm$ 0.05*#	0.51 $\pm$ 0.06*#

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;与模型组相应值比,# $P<0.05$ ;TLR4. Toll样受体4;NF- $\kappa$ B. 核转录因子 $\kappa$ B;cleaved caspase-3. 裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3



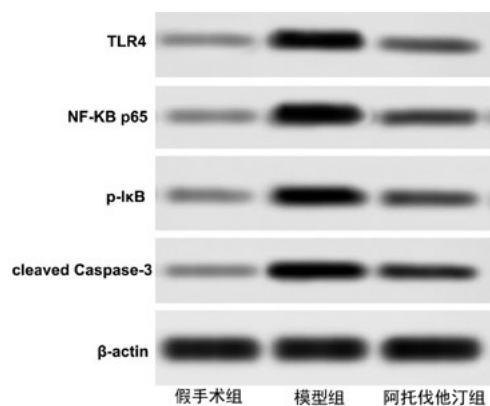


图 3 各组大鼠损伤脑组织 TLR4、NF-κB p65、p-IκB、cleaved Caspase-3 蛋白电泳图  
TLR4. Toll 样受体 4; NF-κB. 核转录因子 κB; cleaved caspase-3. 裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

史晓静等<sup>[11]</sup>研究显示,阿托伐他汀可以抑制 NF-κB 炎症信号通路,抑制细胞凋亡。TLR4 属于 Toll 受体家族,与多种疾病的发生、发展密切相关,可以通过调节 NF-κB 信号转导通路,调节机体的炎症反应<sup>[12]</sup>。当机体受到各种生理性或病理性刺激时,TLR4 可与相应的配体结合,发生二聚化,激活 NF-κB 信号通路<sup>[13]</sup>。在生理状况下,NF-κB 与 IκB 结合处于被抑制转态,一旦被 IκB 激活,发生磷酸化,可以释放 NF-κB/p65,进入胞核与靶序列结合,促进 IL-6、IL-1β、TNF-α 等炎症细胞因子的表达<sup>[14]</sup>。王锦鹏等<sup>[15]</sup>研究发现,阿托伐他汀可以下调 TLR4 表达,抑制 MyD88 依赖的 NF-κB 信号通路,抑制炎症因子 TNF-α 的释放。本文结果显示阿托伐他汀明显下调 TBI 大鼠损伤脑组织 TLR4、NF-κB p65、p-IκB 和 cleaved Caspase-3 的表达。这提示阿托伐他汀可能通过调节 TBI 大鼠 TLR4/NF-κB 信号通路,抑制炎症因子的释放,抑制神经元细胞凋亡。

综上所述,阿托伐他汀可能通过抑制 TBI 大鼠的 TLR4/NF-κB 信号通路,抑制炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 等的释放,抑制神经元凋亡,保护脑组织损伤。

# 【参考文献】

- [1] 陈祥荣,李亚松,骆良钦,等. 丙戊酸对大鼠创伤性颅脑损伤后脑水肿和神经功能的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2016,33(11):2538-2542.
- [2] 方永军,韦鹏方,周 锋,等. 阿托伐他汀治疗慢性硬膜下血肿的临床观察[J]. 中国临床神经外科杂志, 2018, 23

- (4):39-40.
- [3] Xu X, Gao W, Cheng S, *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 167-181.
- [4] 李迪彬,涂 悦,程世翔,等. 亚低温联合促红细胞生成素对颅脑创伤大鼠脑保护作用的研究[J]. 中华神经外科杂志, 2015,31(4):381-385.
- [5] 刘 亨,刘香香,陈亭亭,等. 灯盏细辛和赤芍配伍组方对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及对 NF-κB 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018,24(9):111-115.
- [6] 金卫蓬,周 源,王 东,等. 阿托伐他汀对脑外伤小鼠血脑屏障的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(6): 1361-1364.
- [7] 杨会杰,王金兰,乐 婷,等. 阿托伐他汀对局灶性脑缺血大鼠脑水肿的影响及机制探讨[J]. 中华神经医学杂志, 2016,15(2):130-135.
- [8] 马 涛. 颅脑损伤后凝血功能障碍的机制及干预措施[J]. 中国临床神经外科杂志, 2017,22(8):601-603.
- [9] Wang YL, He H, Liu ZJ, *et al.* Effects of TNF-α on cementoblast differentiation, mineralization, and apoptosis [J]. J Dent Res, 2015, 94(9): 1225-1232.
- [10] Chu X, Wang H, Jiang YM, *et al.* Ameliorative effects of tannic acid on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in vivo and in vitro [J]. J Pharmacol Sci, 2016, 130(1): 15-23.
- [11] 史晓静,王高频,陶贵周. 阿托伐他汀通过抑制 NF-κB 对抗大鼠缺血再灌注心肌炎症反应和凋亡的机制[J]. 临床心血管病杂志, 2015,31(7):788-790.
- [12] 王成雅,陈立杰,黄 山,等. Toll 样受体配体与脑缺血损伤机制的研究进展[J]. 中国临床神经科学, 2016,24(4): 446-452..
- [13] 杨雪华,王 锐,陈立杰,等. Toll 样受体 4 信号通路对脑缺血损伤影响的研究进展[J]. 中国临床神经科学, 2016, 24(4):470-474.
- [14] Li G, Wu X, Yang L, *et al.* TLR4-mediated NF-κB signaling pathway mediates HMGB1-induced pancreatic injury in mice with severe acute pancreatitis [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(1): 99-107.
- [15] 王锦鹏,田丰永,徐 涛,等. 丹参酮 II A 磺酸钠联合阿托伐他汀对冠心病患者外周血单个核细胞 TLR4、MyD88、NF-κB 表达的影响[J]. 河北医药, 2016,38(1):16-19.

(2019-07-09 收稿,2019-09-29 修回)