

## . 实验研究 .

## 亚低温通过抑制 AIF 核转位改善大鼠颅脑损伤

丁华强 廖 帅 汪棋笙 全星运 刘胜杰 廖落星 刘 亮

**【摘要】目的** 探讨亚低温对颅脑损伤(TBI)大鼠脑组织凋亡诱导因子(AIF)核转位的影响。**方法** 将 36 只成年雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、TBI 组、亚低温组,每组 12 只。采用控制性皮质撞击建立 TBI 模型,亚低温组大鼠给予亚低温处理。TBI 后 24 h,HE 染色观察大鼠脑组织病理学变化;免疫组织化学方法检测大鼠脑组织 AIF 的表达部位;免疫印迹法检测损伤脑组织线粒体和细胞核 AIF、caspase-3 的表达情况。**结果** HE 染色结果显示,TBI 后,损伤侧脑组织可见沿灰白质界面的挫伤和出血,亚低温组挫伤和出血灶明显减轻。免疫印迹法检测结果显示,TBI 后,损伤脑组织 caspase-3 表达量明显增加( $P<0.01$ ),细胞核 AIF 表达量明显增加( $P<0.01$ ),而线粒体 AIF 表达量明显降低( $P<0.05$ );亚低温组损伤脑组织 caspase-3 表达量明显下降( $P<0.01$ ),细胞核 AIF 表达量明显下降( $P<0.01$ ),而线粒体 AIF 表达量明显升高( $P<0.05$ )。免疫组织化学染色结果显示,假手术组 AIF 位于大脑皮质和海马神经元细胞核外;TBI 组后,损伤侧皮质及海马区 AIF 从线粒体转移至细胞核内的阳性细胞数量明显增多( $P<0.01$ );亚低温组损伤侧皮质及海马区 AIF 发生核内转移的阳性细胞数量减少( $P<0.01$ )。**结论** 亚低温可能通过抑制 AIF 的核转位减轻颅脑损伤后神经细胞凋亡,从而起到神经保护作用。

**【关键词】** 颅脑损伤;亚低温;细胞凋亡;凋亡诱导因子;神经保护作用

**【文章编号】** 1009-153X(2021)09-0702-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1<sup>5</sup>; R 454

**Effects of mild hypothermia on nucleus translocation of apoptosis inducing factor in injured cerebral tissues of adult rats after traumatic brain injury**

DING Hua-qiang<sup>1</sup>, LIAO Shuai<sup>2</sup>, WANG Qi-sheng<sup>3</sup>, QUAN Xing-yun<sup>4</sup>, LIU Sheng-jie<sup>5</sup>, LIAO Luo-xing<sup>5</sup>, LIU Liang<sup>4</sup>. 1. Department of Neurosurgery, Chongqing Yubei District People's Hospital, Chongqing 401120, China; 2. Department of Neurosurgery, Mianyang No. 3 People's Hospital, Mianyang 621000, China; 3. Department of Neurosurgery, People's Hospital of Hejiang City, Hejiang 646200, China; 4. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 5. Department of Neurosurgery, Chongqing Nan'an District People's Hospital, Chongqing 400000, China

**【Abstract】Objective** To explore the effect of mild hypothermia (MHT) on the nucleus translocation of apoptosis inducing factor (AIF) in injured cerebral tissues of adult rats after traumatic brain injury (TBI). **Methods** Thirty six adult male SD rats were randomly divided into sham group, TBI group and MHT group, with 12 rats in each. TBI was induced by controlled cortical impact. The rats in the MHT group were treated with MHT. Twenty-four hours after TBI, the pathological changes of injured cerebral tissues were analyzed with HE staining; AIF translocation was detected by immunohistochemical staining; expressions of AIF and caspase-3 were analyzed by western blotting. **Results** HE staining showed that contusion and hemorrhage along the gray white matter interface were visible in TBI group, and they were significantly improved in MHT group. Western blotting showed that the caspase-3 expression in the injured cerebral tissues was significantly increased ( $P<0.01$ ), the AIF expression in the nucleus was significantly increased ( $P<0.01$ ), and the AIF expression in mitochondria was significantly reduced ( $P<0.05$ ) in TBI group; the expressions of caspase-3 and AIF in MHT group were significantly reversed compared to TBI group ( $P<0.05$ ). Immunohistochemical staining showed that the number of positive cells transferred from mitochondria to nucleus of AIF in the injured cortex and hippocampus increased significantly in TBI group ( $P<0.01$ ), and it was significantly decreased in MHT group ( $P<0.01$ ). **Conclusions** MHT has a neuroprotective effect on TBI, which may be by inhibiting the nuclear translocation of AIF so as to reduce the apoptosis of nerve cells.

**【Key words】** Traumatic brain injury; Mild hypothermia; Cell apoptosis; Apoptosis inducing factor; Neuroprotection

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.09.015

作者单位: 401120, 重庆市渝北区人民医院神经外科(丁华强); 621000 四川, 绵阳市第三人民医院神经外科(廖 帅); 646200 四川, 合江县人民医院神经外科(汪棋笙); 646000 四川泸州, 西南医科大学附属医院神经外科(全星运、刘胜杰、刘 亮); 400000, 重庆市南岸区人民医院神经外科(廖落星)

通讯作者: 刘 亮, E-mail: liulst@163.com

目前, 颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是导致青壮年死亡和残疾的主要原因, 成为日益严重的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。TBI 后神经细胞凋亡是导致神经功能缺损的主要原因。细胞凋亡分子通路主要包括 Caspase 依赖性通路和非 Caspase 依赖性通路<sup>[2]</sup>。凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)在非

Caspase 依赖性通路中发挥重要作用。研究表明, TBI 后神经细胞凋亡与 AIF 核转位有关<sup>[3,4]</sup>。虽然亚低温能通过降低颅内压、减轻神经炎症反应及细胞兴奋性毒性和抑制神经细胞死亡等机制阻止 TBI 继发性损伤,从而起到神经保护作用<sup>[5-10]</sup>,但是临床亚低温治疗 TBI 仍存在一定的争议。以往有关亚低温对 TBI 后神经细胞死亡的作用研究主要集中在对 Caspase 依赖性通路<sup>[8,9,11]</sup>。本研究通过观察亚低温对大鼠 TBI 后非 Caspase 依赖性神经细胞凋亡通路中关键蛋白 AIF 定位表达的影响,为临床亚低温治疗 TBI 提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 取 36 只清洁级成年雄性 SD 大鼠[体重 300~350g,由西南医科大学动物实验中心提供(许可证号:SYXK-2018-065)],采用随机数字表法分为 3 组:假手术(n=12)、TBI 组(n=12)和亚低温组(n=12)。

1.2 TBI 模型的制备 采用控制性皮质撞击法制作大鼠 TBI 模型<sup>[12]</sup>。术前禁食 12 h,腹腔注射 3%水合氯醛(1 ml/100g)麻醉,俯卧位固定于立体定向头架上。沿中线切开头皮,暴露右顶骨,颅骨矢状缝中点旁约 2 mm 处,牙钻钻直径 6 mm 圆形骨窗,暴露硬脑膜。致伤参数:打击速度 4.0 m/s,打击深度 2.8 mm,停留时间 50 ms,打击头直径 5.0 mm。假手术组大鼠只暴露硬脑膜不予以 CCI 打击。

1.3 亚低温的实施 亚低温组参照 Jiang 等<sup>[6]</sup>报道的方法,采用冰浴加间断使用冰袋的方法降温,15 min 内使直肠温度降至(33.0±1.0)℃,并维持 6 h,治疗结束后自然复温至 37℃。假手术组和模型组大鼠置于常温环境,温度维持在(37±0.5)℃。使用体温监测仪持续监测大鼠直肠温度。

1.4 脑组织取材 TBI 后 24 h,4%多聚甲醛灌注固定后取出完整脑组织,用 4%多聚甲醛后固定 24 h。冠状切取脑组织块,常规梯度酒精脱水、透明、浸蜡,然后石蜡包埋用于 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.5 HE 染色 每组取 6 只大鼠脑组织标本,石蜡切片(厚 5 μm),脱蜡,梯度乙醇水化,HE 染色,脱水,封片,在光学显微镜下观察。

1.6 免疫组织化学染色 每组取 6 只大鼠脑组织标本,石蜡切片,二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、柠檬酸盐缓冲液行抗原热修复,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸泡 10 min,PBS 洗 5 min×3 次,10%山羊血清室温封闭 10 min,甩掉血清,滴加一抗 AIF(1:100;美国 Abcam 公司),4℃孵育过

夜;常温复温 1 h,PBS 洗 5 min×3 次,滴加二抗,常温孵育 30 min,PBS 洗 5 min×3 次,滴加 DAB 溶液,显微镜下观察 3~10 min,出现深棕色后,自来水冲洗终止染色,苏木素复染;梯度乙醇脱水,干片后中性树脂封片,显微镜下观察。

1.7 免疫印迹法检测蛋白表达 每组取 6 只大鼠,TBI 后 24 h 麻醉后立即断头处死,冰上取损伤侧大脑组织,用 RIPA 裂解液提取总蛋白。按线粒体提取试剂盒和细胞核蛋白提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)说明书提取线粒体蛋白和细胞核蛋白。BCA 法(上海碧云天生物技术研究所在)进行定量,SDS-PAGE 胶分离,PVDF 转膜。10%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h,PBST 洗 10 min×3 次,加一抗 AIF(1:1 000;美国 Abcam 公司)、Caspase-3(1:1 000;上海碧云天生物技术研究所在),小鼠抗一抗 β-actin(1:1 000;上海碧云天生物技术研究所在)、Histone H3(1:1 000;上海碧云天生物技术研究所在)、COX IV(1:1 000;美国 Abbkine 公司)4℃孵育过夜。PBST 洗 10 min×3 次,加山羊抗兔 IgG 二抗或山羊抗小鼠 IgG 二抗室温孵育 1 h。PBST 洗 10 min×3 次,ECL 法显影,使用 ImageJ 软件测定灰度值。β-actin、Histone H3 和 COX IV 分别作为总蛋白、细胞核蛋白和线粒体蛋白内参。

1.8 统计学分析 应用 SPSS 22.0 软件分析;正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验;*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 亚低温对 TBI 大鼠脑组织形态结构的影响 HE 染色结果显示,假手术组大鼠脑组织神经细胞形态、结构正常,未见挫伤及出血;TBI 组和亚低温组可见沿灰白质界面的挫伤和出血,但亚低温组挫伤和出血灶明显减轻。见图 1。

2.2 亚低温对 TBI 大鼠 AIF 核转位的影响 免疫印迹法检测结果显示,与假手术组比较,TBI 组和亚低温组损伤脑组织 caspase-3 蛋白表达量明显增加(*P*<0.01),细胞核 AIF 蛋白表达量明显增加(*P*<0.01),而线粒体 AIF 表达量明显降低(*P*<0.05)。与 TBI 组比较,亚低温组损伤脑组织 caspase-3 蛋白表达量明显下降(*P*<0.01),细胞核 AIF 蛋白表达量明显下降(*P*<0.01),而线粒体 AIF 表达量明显升高(*P*<0.05)。见图 2。

免疫组织化学染色结果显示,假手术组 AIF 位于大脑皮质和海马神经元细胞核外。与假手术组比较,TBI 组与亚低温组大鼠损伤侧大脑皮质及同侧



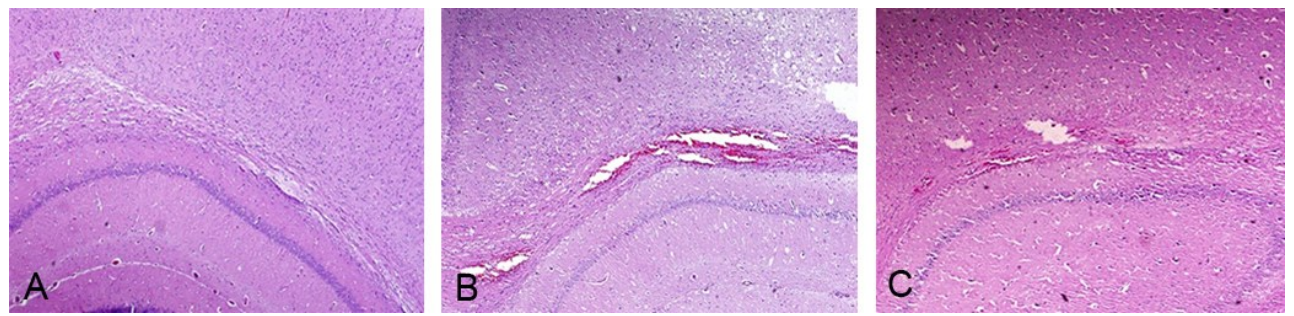


图 1 亚低温对TBI大鼠脑组织形态结构的影响(HE,×40)  
A. 假手术组;B. TBI组;C. 亚低温组;TBI. 颅脑损伤

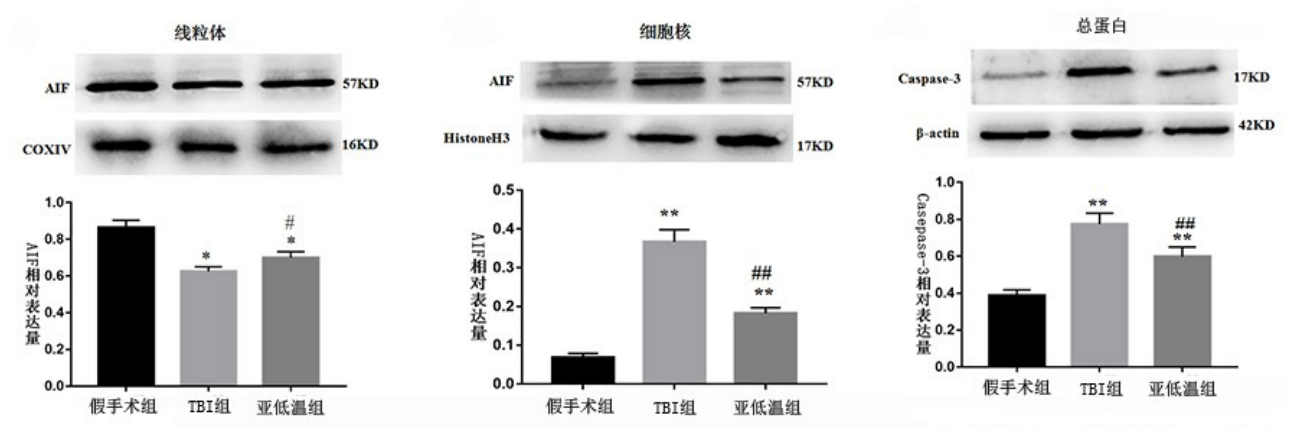


图 2 亚低温对TBI大鼠损伤脑组织 caspase-3 和 AIF 表达的影响  
与假手术组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与TBI组相比,## $P<0.01$

海马区 AIF 从线粒体转移至细胞核内的阳性细胞数量明显增多( $P<0.01$ )。与 TBI 组比较,亚低温组大鼠损伤侧大脑皮质及同侧海马区 AIF 发生核内转移

的阳性细胞数量减少( $P<0.01$ )。见图 3。

### 3 讨论

亚低温能减轻 TBI 后神经细胞凋亡,但其作用机制仍不清楚。本研究发现亚低温能减轻大鼠 TBI 后脑挫伤和出血,其机制可能与亚低温抑制 AIF 核转位、抑制神经细胞凋亡有关。

研究证实 TBI 后神经细胞凋亡与 caspase 依赖性细胞凋亡机制相关<sup>[13-15]</sup>。本实验也发现 TBI 后大鼠伤侧脑组织 caspase-3 表达水平明显升高。尽管如此,AIF 介导的非 caspase 依赖性细胞凋亡通路同样在 TBI 继发性损伤中起着十分重要的作用<sup>[16]</sup>。AIF 是一种存在于线粒体内膜、相对分子量为 57 000 的核黄素蛋白。当线粒体外膜通透性增加后,AIF 释放进入细胞质,随后转移至细胞核与染色质结合,导致染色质凝聚和大规模 DNA 片段化,最终引发非 caspase 依赖性细胞凋亡<sup>[17]</sup>。AIF 核转位是非 caspase-3 依赖性细胞凋亡的标志<sup>[18]</sup>。Zhang 等<sup>[3]</sup>研究发现大鼠 TBI 后伤侧皮质及海马神经元发生 AIF 由线粒体向细胞核内的转移,并伴随有大量 DNA 片段化。Slammer 等<sup>[4]</sup>研究发现敲除 AIF 基因明显减轻

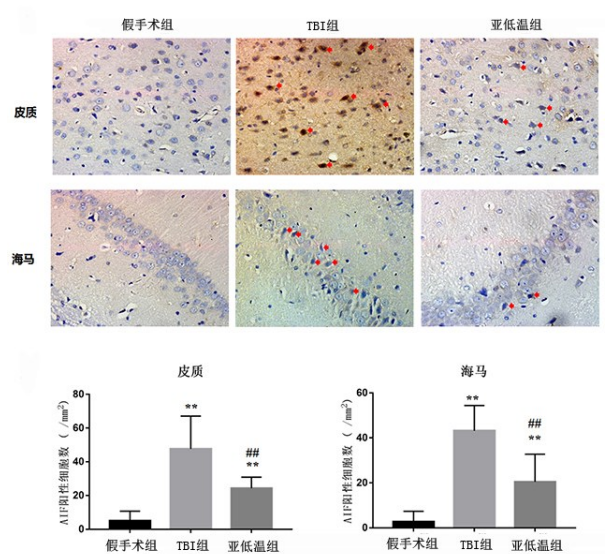


图 3 亚低温对TBI大鼠损伤侧皮质和海马 AIF 表达的影响  
(免疫组化染色,×200;红色↑为 AIF 阳性细胞)  
与假手术组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与TBI组相比,## $P<0.05$ ,  
### $P<0.01$

TBI 小鼠继发性损伤。本实验也表明大鼠 TBI 后伤侧皮质和海马区神经细胞发生明显的 AIF 核转位。

TBI 动物模型研究发现,亚低温通过降低 TIMP-3、Bax、caspase-3、caspase-8 及 RIPK1 等 caspase 依赖性细胞凋亡通路相关蛋白表达,抑制神经细胞凋亡<sup>[10,11,19]</sup>。我们的实验不仅证实亚低温能够下调 TBI 后 caspase-3 的表达,还发现亚低温能够抑制线粒体内 AIF 向细胞核内转移。其机制可能为亚低温可以保护线粒体的完整性,降低线粒体通透性,从而减少 AIF 向细胞质的释放和核内的转移<sup>[20]</sup>。

总之,亚低温可通过抑制 AIF 的核转位减轻 TBI 后神经细胞凋亡,从而起到神经保护作用。

【参考文献】

[1] Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, *et al.* Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16: 987-1048.

[2] Faden BASa AI. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury [J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(1): 3-12.

[3] Zhang X, Chen J, Graham SH, *et al.* Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite [J]. *J Neurochem*, 2002, 82(1): 181-191.

[4] Slemmer JE, Zhu C, Landshamer S, *et al.* Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(6): 1795-1805.

[5] Andrews PJ, Sinclair HL, Rodriguez A, *et al.* Hypothermia for intracranial hypertension after traumatic brain injury [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(25): 2403-2412.

[6] Jiang J Y, Liang YM, Luo QZ, *et al.* Effect of mild hypothermia on brain dialysate lactate after fluid percussion brain injury in rodents [J]. *Neurosurgery*, 2004, 54(3): 713-718.

[7] Globus MY, Alonso O, Dietrich WD, *et al.* Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia [J]. *J Neurochem*, 1995, 65(4): 1704-11.

[8] Liu T, Zhao DX, Cui H, *et al.* Therapeutic hypothermia attenuates tissue damage and cytokine expression after traumatic brain injury by inhibiting necroptosis in the rat [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(4): 24547.

[9] Jin Y, Lin Y, Feng JF, *et al.* Moderate hypothermia significantly decreases hippocampal cell death involving autophagy pathway after moderate traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2015, 32(14): 1090-1100.

[10] Zhang HB, Cheng SX, Tu Y, *et al.* Protective effect of mild-induced hypothermia against moderate traumatic brain injury in rats involved in necroptotic and apoptotic pathways [J]. *Brain Inj*, 2017, 31(3): 406-15.

[11] 赵万勇, 李晓红, 王景景, 等. 基于不同时间窗的延迟亚低温对颅脑创伤大鼠 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达的影响 [J]. *天津医药*, 2017, 45(4): 364-367, 449.

[12] Dean DD, Frank JA, Turtzo LC. Controlled cortical impact in the rat [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2017, 81(10): 1-12.

[13] Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, *et al.* Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat [J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(6): 1575-1583.

[14] Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, *et al.* Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury [J]. *J Neurosci*, 1997, 17(19): 7415-7424.

[15] Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, *et al.* Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(15): 5663-5672.

[16] Piao CS, Loane DJ, Stoica BA, *et al.* Combined inhibition of cell death induced by apoptosis inducing factor and caspases provides additive neuroprotection in experimental traumatic brain injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(3): 745-758.

[17] Joza N, Susin SA, Daugas E, *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death [J]. *Nature*, 2001, 410(6828): 549-554.

[18] Cande C, Cecconi F, Dessen P, *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death [J]? *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 24): 4727-4734.

[19] 裴孝忠, 王娟, 刘建, 等. 亚低温对大鼠颅脑外伤后脑组织 AQP-4 和 Caspase-3 表达的影响 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2014, 13(3): 196-199.

[20] Krech J, Tong G, Wowro S, *et al.* Moderate therapeutic hypothermia induces multimodal protective effects in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured cardiomyocytes [J]. *Mitochondrion*, 2017, 35(07): 1-10.

(2020-11-16 收稿, 2021-05-31 修回)