

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00990

创伤性脑水肿合并海水淹溺大鼠 IL-1 β 和 TNF- α 表达的变化

Changes of interleukin 1 β and tumor necrosis factor α contents in rats with traumatic brain edema and seawater drowning

齐向前, 于明琨*, 卢亦成, 胡国汉, 骆纯, 董艳

第二军医大学长征医院神经外科, 上海 200003

[摘要] 目的: 观察创伤性脑水肿合并海水淹溺后大鼠血清、脑组织、肺组织 IL-1 β 和 TNF- α 含量的变化, 探讨其变化规律及临床意义。方法: 脑侧方液压打击伤加气管内灌注海水建立大鼠创伤性脑水肿合并海水淹溺模型。伤后 1、6、12、24 及 48 h 检测大鼠脑、肺组织含水量及脑、肺组织匀浆和血清中 IL-1 β 、TNF- α 的含量; 观察伤后 24 h 脑、肺组织病理学变化。以颅脑创伤合并淡水淹溺、单纯颅脑创伤、单纯海水淹溺、假手术大鼠作为对照。结果: 脑损伤合并海水淹溺后, 大鼠脑组织含水量较单纯脑损伤、单纯海水淹溺以及脑损伤合并淡水淹溺均显著增高 ($P < 0.05$); 脑组织、肺组织 IL-1 β 和 TNF- α 含量有显著变化。脑、肺组织病理学损伤明显。结论: 海水的损伤性作用是重要致伤因素之一, 炎症反应在创伤性脑水肿合并海水淹溺性肺水肿的病理生理过程中起了重要作用。

[关键词] 创伤性脑水肿; 海水淹溺性肺水肿; 白细胞介素 1 β ; 肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R 649.3 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0990-04

海战或海难可造成大量人员海水淹溺, 常合并颅脑损伤, 致死率极高。海水淹溺性肺水肿 (pulmonary edema after seawater drowning) 和创伤性脑水肿 (traumatic brain edema) 是引起人员早期死亡的主要因素。海水淹溺后肺组织病理改变较淡水淹溺更严重, 海水淹溺可增加血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的通透性, 加重创伤性脑水肿和继发性脑损伤^[1-2], 但其具体机制尚不清楚。纠正低氧血症和酸中毒对治疗重型颅脑伤伴海水淹溺性肺水肿患者有很重要的作用^[3]; 但古妙宁等^[4]研究发现, 排除了低氧血症和酸中毒等因素后海水仍可导致明显的肺损伤, 提示海水淹溺后残留于肺内的海水直接导致肺损伤。单纯海水淹溺后肺损伤及单纯脑损伤均有明确炎症反应存在^[5-7], 提示海水淹溺可能通过炎症介质介导脏器组织的直接损伤。然而, 目前缺乏海水淹溺复合脑损伤后炎症反应的相关研究。为此, 本研究观察海水淹溺性肺水肿合并创伤性脑水肿大鼠炎症因子的变化, 进一步探讨海水淹溺复合损伤后炎症反应变化规律, 为提高此类伤员的救治成功率奠定基础。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 实验用雄性健康 Sprague-Dawley 大鼠购自中国科学院上海实验动物中心, 体质量 (325 \pm 25) g。136 只大鼠随机分为 5 组: 颅脑创伤合并海水淹溺组 ($n=32$), 颅脑创伤合并淡水淹溺组 ($n=32$), 单纯颅脑创伤组 ($n=32$), 单纯海水淹溺组 ($n=32$), 假手术组 ($n=8$)。单纯颅脑创伤组: 采用左侧顶叶硬膜外液压打击建立颅脑外伤模

型^[2], 打击力为 2.65 $\times 10^5$ Pa, 伤后动物昏迷时间大约 5 min 左右, 伴呼吸暂停、强直、抽搐及大小便失禁等症状。单纯海水淹溺组: 乙醚吸入麻醉后, 颈部正中气管切开, 10 min 后匀速灌入海水 4 ml/kg, 3 min 内灌完, 大鼠清醒后, 拔除气管内插管。颅脑创伤合并海水淹溺组: 脑侧方液压打击模型建立成功后, 气管切开, 伤后 15 min 匀速灌入海水或淡水 4 ml/kg, 3 min 内灌完^[1-2]。假手术组: 仅行左侧顶叶埋置打击管和气管切开, 不予以打击, 不灌入海水或淡水。前 4 组大鼠按伤后 1、6、12、24、48 h 分组, 24 h 点为 8 只, 其余各时间点 6 只。各组大鼠按预定时间处死, 从 5 组 24 h 点和假手术组各随机取 2 只观察脑、肺组织病理学变化; 其余各组大鼠测脑、肺组织含水量, 检测血清及脑、肺组织 IL-1 β 和 TNF- α 含量。

1.2 标本的获取

1.2.1 血清标本 按设定时间予以 1% 戊巴比妥麻醉, 保持呼吸道通畅, 打开腹腔, 以含 0.04 ml 肝素的 1 ml 注射器自腹主动脉采血 0.5 ml 进行血气分析; 另采血 2 ml 置促凝管内, 室温静置 1 h 后, 800 $\times g$ 离心 15 min, 取上清 0.5 ml, 置 -70 $^{\circ}C$ 冻存待检。

1.2.2 脑、肺组织匀浆标本 大鼠断头处死, 迅速取出大脑和肺, 取伤区及对侧相对部位脑皮层组织约 50 mg, 右肺中叶肺组织约 80 mg, 分别准确称重, 放入 100 $^{\circ}C$ 生理盐水煮沸 5 min, 取出置于无菌匀浆管内, 加入 1 mol/L 乙酸溶液 1 ml, 电动匀浆机充分匀浆, 4 $^{\circ}C$ 静置 100~120 min, 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml, 4 $^{\circ}C$ 下 3 184 $\times g$ 离心 20 min, 取上清液 0.5 ml, 置 -70 $^{\circ}C$ 冻存待检。

[收稿日期] 2007-12-10 **[接受日期]** 2008-05-06

[基金项目] 军队“十一五”课题 (06G54)。Supported by “the 11th- Five-Year-Plan” of PLA (06G54)。

[作者简介] 齐向前, 硕士, 主治医师。E-mail: qixiangqian@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author)。Tel: 021-63610109-73738, E-mail: yumingkun01@163.com

1.2.3 病理标本 麻醉后以生理盐水和 4% 多聚甲醛灌注, 分别取脑和肺组织, 4% 多聚甲醛固定 24~48 h, 取出后常规经脱水、透明处理, 石蜡包埋, 制备 4 μ m 厚切片, 显微镜观察。

1.3 脑、肺组织含水量的测定 两侧大脑半球锐性分离距损伤中心区 5 mm 约 0.4 g 的脑组织, 左肺由肺门处离断, 用滤纸吸尽脑、肺组织表面血渍后, 置于已称重的载玻片上, 用电子分析天平称湿质量后, 置于 110 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱内烤干 48 h 至质量恒定, 称干质量后, 根据 Elliott 等^[8] 公式计算脑、肺含水量: 含水量(%) = (湿质量 - 干质量) / 湿质量 \times 100%。

1.4 血清、脑、肺组织 IL-1 β 、TNF- α 含量的测定 采用放射免疫分析方法, 按说明书操作, 试剂盒购自北京科美东雅生物技术有限公司。

1.5 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SAS V6.12 统计软件, 组内、组间差异比较采用完全随机方差分析, 各损伤因素的作用采用析因分析, 变量之间相关性采用

直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病理检查结果 H-E 染色结果表明: 单纯颅脑创伤组大鼠肺泡结构清晰, 壁薄, 间质内只见少量炎性细胞; 颅脑创伤合并淡水淹溺组大鼠可见部分肺泡萎陷, 间质内炎性细胞浸润(图 1A)。颅脑创伤合并海水淹溺组及单纯海水淹溺组大鼠出现局灶性肺不张, 肺泡萎陷, 肺间质明显增厚伴大量炎性细胞浸润, 以中性粒细胞和淋巴细胞为主, 偶见血管内血栓形成(图 1B、1C)。单纯颅脑创伤组大鼠可见局灶性脑组织疏松水肿, 细胞染色不均; 颅脑创伤合并淡水淹溺组可见皮层结构紊乱, 细胞核固缩, 胞质淡染(图 1D); 颅脑创伤合并海水淹溺组可见伤侧皮质下出血, 脑组织明显疏松水肿, 呈网格样改变(图 1E、1F)。

图 1 大鼠肺组织(A-C)、脑组织(D-F)H-E 染色结果

A: 颅脑创伤合并淡水淹溺组大鼠肺组织; B、C: 颅脑创伤合并海水淹溺组大鼠肺组织; D: 颅脑创伤合并淡水淹溺组大鼠脑组织; E、F: 颅脑创伤合并海水淹溺组大鼠脑组织。Original magnification: $\times 100$ (A, B, D, E); $\times 400$ (C, F)

2.2 血气分析结果 海水淹溺后, 迅速出现明显的低氧血症和酸中毒, 其后迅速改善, 出现明显过度通气; 而淡水淹溺后仅表现为 PO₂ 轻度下降, 无明显酸中毒。

2.3 脑、肺组织含水量的测定结果 脑侧方液压打击后, 各脑损伤组伤侧脑组织的含水量均较对侧升高, 于伤后 24 h 达峰值, 前 3 组较后 2 组显著增高, 且颅脑创伤合并海水淹溺

组脑组织含水量较颅脑创伤合并淡水淹溺组及单纯颅脑创伤组更显著(表 1)。肺组织含水量于灌注海水后 1 h 最高, 虽然下降迅速, 但伤后 24 h 颅脑创伤合并海水淹溺组仍显著高于颅脑创伤合并淡水淹溺组及单纯颅脑创伤组, 而后二者伤后变化不明显(表 2)。

表 1 各组大鼠伤侧脑组织含水量的变化

组别	受伤前	伤后时间 t/h				
		1	6	12	24	48
A	-	79.13 \pm 0.29*	79.72 \pm 0.47*	80.12 \pm 0.51*	80.78 \pm 0.47*	80.32 \pm 0.75*
B	-	79.20 \pm 0.34*	79.51 \pm 0.41*	79.63 \pm 0.51*	79.59 \pm 0.49* Δ	79.50 \pm 0.64* Δ
C	-	78.99 \pm 0.20*	79.45 \pm 0.31*	79.70 \pm 0.33*	79.98 \pm 0.45* Δ	79.55 \pm 0.59* Δ
D	-	78.59 \pm 0.27	78.83 \pm 0.36	78.75 \pm 0.28	78.79 \pm 0.31 Δ	78.77 \pm 0.28 Δ
E	78.62 \pm 0.34	-	-	-	-	-

(n=6, $\bar{x} \pm s$, %)

A: 颅脑创伤合并海水淹溺组; B: 颅脑创伤合并淡水淹溺组; C: 单纯颅脑创伤组; D: 单纯海水淹溺组; E: 假手术组。* $P < 0.05$ 与 D 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 A 组比较

表2 各组大鼠肺组织含水量的变化

($n=6, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	受伤前	伤后时间 t/h				
		1	6	12	24	48
A	-	90.61±0.90* Δ	82.84±0.69* Δ	80.91±0.31* Δ	80.81±0.48* Δ	80.34±0.41* Δ
B	-	80.21±0.65*	79.86±0.54	79.44±0.57	79.69±0.51	79.25±0.45
C	-	80.38±0.88*	79.52±0.67	79.35±0.66	79.22±0.40	79.69±0.52
D	-	89.94±0.94* Δ	81.50±0.59* Δ	80.62±0.59* Δ	80.17±0.57*	79.93±0.42*
E	79.22±0.51	-	-	-	-	-

A: 颅脑创伤合并海水淹溺组; B: 颅脑创伤合并淡水淹溺组; C: 单纯颅脑创伤组; D: 单纯海水淹溺组; E: 假手术组. * $P < 0.05$ 与 E 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 C 组比较

2.4 血清、脑组织、肺组织 IL-1 β 和 TNF- α 各组血清 IL-1 β 和 TNF- α 变化不明显。各组打击对侧脑组织 IL-1 β 和 TNF- α 无显著变化; 而伤侧脑组织 IL-1 β 含量于伤后 1 h 有一过性下降, 后迅速升高, 伤后 6 h 达峰值, 前 3 组较单纯海水淹溺组均显著增高 ($P < 0.05$), 颅脑创伤合并海水淹溺组升高较颅脑创伤合并淡水淹溺组及单纯颅脑创伤组更显著 ($P < 0.05$), 后渐下降, 至伤后 48 h 与单纯海水淹溺组无统计学差异; 前 3 组伤侧脑组织 TNF- α 含量于伤后 1 h 均显著增高, 6 h 及以后与单纯海水淹溺组无统计学差异 (图 2)。海水淹溺后肺组织 IL-1 β 和 TNF- α 均于伤后 1 h 显著升高 ($P < 0.05$), 6 h 及以后各组无统计学差异 (图 3)。

图2 伤侧脑组织 IL-1 β (A) 和 TNF- α (B) 表达的变化

2.5 析因和相关分析 脑损伤、淹溺、时间因素对伤侧脑水肿和肺水肿的主效应均有统计学意义; 对于脑含水量, 可以认为时间因素与脑损伤和海水淹溺因素存在交互作用; 对于肺含水量, 尚不能认为时间因素与脑损伤和海水淹溺因素存在交互作用。对于颅脑创伤合并海水淹溺大鼠, 肺组织 IL-1 β 、TNF- α 、伤侧脑组织 TNF- α 与伤侧脑水肿具有相关性, 与肺水肿关系更密切。

图3 肺组织 IL-1 β (A) 和 TNF- α (B) 表达的变化

3 讨论

淡水与海水具有不同的理化性质, 与体液相比, 海水是高渗液体, 而淡水是低渗性液体, 这是两者的最大差别。伤后 1 h, 淡水淹溺组大鼠肺内并未见明显液体, 说明淡水淹溺后吸收迅速。与淡水淹溺比较, 海水淹溺后 48 h 肺含水量仍显著高于淡水淹溺, 结合病理检查, 海水淹溺合并颅脑损伤以间质性肺水肿为主且恢复缓慢, 可见海水淹溺后的肺水肿远较淡水严重而持久。我们发现单纯海水淹溺后没有出现明显脑水肿, 说明产生脑水肿的主要原因是脑损伤。无论含水量测定还是病理检查结果, 均提示海水淹溺比淡水淹溺更明显加重了创伤性脑水肿。

Conn 等^[9] 对实验犬在淡水、海水淹溺后 1、4、7、10 min 作血气分析, 发现海水和淡水淹溺后血气均有显著变化, 表现为明显的呼吸性酸中毒。因此, 除了缺氧和酸中毒的因素外, 海水淹溺比淡水淹溺更明显加重了创伤性脑水肿还可能与海水淹溺后炎症反应更显著有关。本研究没有观察到淡水淹溺后明显血气变化, 可能与本研究缺少 1 h 以内观察点

有关。

本研究发现,颅脑创伤合并海水淹溺后,大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 无显著变化,提示海水淹溺主要在脑、肺组织局部产生 TNF- α 和 IL-1 β ,与以往研究^[10-11]类似。相关分析结果发现,肺组织 IL-1 β 、TNF- α 、伤侧脑组织 TNF- α 含量的升高与颅脑创伤合并海水淹溺大鼠伤侧脑水肿与肺水肿的严重程度密切相关。血清炎症因子变化受诸多因素影响,较局部组织更能反映全身炎症反应情况,但局部组织炎症因子的变化更能反映局部炎症反应特点。本实验发现脑、肺组织内 TNF- α 和 IL-1 β 含量增高的高峰在 6 h 以内,与肺水肿的发展高峰基本同步,而先于脑水肿高峰,提示海水淹溺和脑创伤后脑、肺组织炎症反应发生都很早,炎症反应可能促进了脑水肿和肺水肿的发生。

IL-1 β 和 TNF- α 是目前研究较多的炎症介质^[12-13],与中枢神经系统损伤和肺损伤关系密切。兔海水淹溺性肺损伤研究^[7]表明抑制肺组织炎症反应具有治疗作用。应用特异性细胞因子拮抗剂可减轻颅脑外伤继发的缺血性脑损害,获得良好预后^[14]。本研究观察海水淹溺合并颅脑损伤模型大鼠 IL-1 β 和 TNF- α 表达的变化,结果发现脑、肺组织 IL-1 β 、TNF- α 主要是局部产生,其含量变化主要受局部损伤影响。至于伤后超早期有无 IL-1 β 和 TNF- α 进入血液,可能需要设定更早的时间点来测定。

炎性因子的效应具有双重性,它既可加重脑继发性损害,同时也可诱导神经修复和组织重建,可能具有时间-空间特异性^[15-16]。这提示通过调控与相关炎性因子的变化可能对颅脑创伤合并海水淹溺有一定治疗作用。

(志谢 本研究得到第二军医大学长征医院病理科杨志慧、王良哲医师的大力支持和无私帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

- [1] 高习文,修清玉,孙波,李兵,石昭泉,陈吉泉. 海水淹溺肺水肿大鼠肺表面活性物质磷脂的变化[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26: 903-906.
- [2] 房文峰,于明琨,董艳,蔡如珏. 海水淹溺性肺水肿对大鼠创伤性脑水肿的影响[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2006, 11: 403-406.
- [3] 谢培增,田辉荣,吴超源,何强华,曾昆仑,梁鹿章,等. 重型颅脑损伤伴海水淹溺性肺水肿疗效观察[J]. 人民军医, 2003, 46: 134-136.
- [4] 古妙宁,肖金仿,黄毅然,周伟,傅卫军,陈黎明,等. 海水直接肺损伤的犬模型研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23: 201-205.
- [5] Kelley B J, Lifshitz J, Povlishock J T. Neuroinflammatory re-

- sponses after experimental diffuse traumatic brain injury[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2007, 66: 989-1001.
- [6] Hutchinson P J, O'Connell M T, Rothwell N J, Hopkins S J, Nortje J, Carpenter K L, et al. Inflammation in human brain injury: intracerebral concentrations of IL-1 α , IL-1 β , and their endogenous inhibitor IL-1 ra [J]. J Neurotrauma, 2007, 24: 1545-1557.
- [7] 丁新民,段蕴铀,彭朝胜,冯华松,薛志强,孟激光,等. 地塞米松对海水淹溺性肺损伤兔肺组织炎症反应的抑制作用[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2006, 13: 199-203.
- [8] Elliott K A, Jasper H. Measurement of experimentally induced brain swelling and shrinkage[J]. Am J Physiol, 1949, 157: 122-129.
- [9] Conn A W, Miyasaka K, Katayama M, Fujita M, Orima H, Barker G, et al. A canine study of cold water drowning in fresh versus salt water[J]. Crit Care Med, 1995, 23: 2029-2037.
- [10] Kamm K, Vanderkolk W, Lawrence C, Jonker M, Davis A T. The effect of traumatic brain injury upon the concentration and expression of interleukin-1 β and interleukin-10 in the rat[J]. J Trauma, 2006, 60: 152-157.
- [11] Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome[J]. J Pathol, 2004, 202: 145-156.
- [12] Campbell S J, Jiang Y, Davis A E, Farrands R, Holbrook J, Lepert D, et al. Immunomodulatory effects of etanercept in a model of brain injury act through attenuation of the acute-phase response[J]. J Neurochem, 2007, 103: 2245-2255.
- [13] Bartfai T, Sanchez-Alavez M, Andell-Jonsson S, Schultzberg M, Vezzani A, Danielsson E, et al. Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever, and neurotrauma[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1113: 173-177.
- [14] Stoll G, Jander S, Schroeter M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system[J]. Adv Exp Med Biol, 2002, 513: 87-113.
- [15] Morganti-Kossmann M C, Rancan M, Stahel P F, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword[J]. Curr Opin Crit Care, 2002, 8: 101-105.
- [16] Marklund N, Keck C, Hoover R, Soltesz K, Millard M, LeBold D, et al. Administration of monoclonal antibodies neutralizing the inflammatory mediators tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 does not attenuate acute behavioral deficits following experimental traumatic brain injury in the rat[J]. Restor Neurol Neurosci, 2005, 23: 31-42.

[本文编辑] 贾泽军