

## · 论著 ·

## 单核细胞移动抑制因子对大鼠创伤性颅脑损伤保护作用研究

丁华敏<sup>1</sup>, 秦春霞<sup>1</sup>, 马凯源<sup>2</sup>, 孙莉莉<sup>1</sup>, 章越凡<sup>1</sup>, 李铁军<sup>1,2</sup> (1. 上海市浦东新区浦南医院药剂科, 上海 200125; 2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012)

**[摘要]** **目的** 研究单核细胞移动抑制因子(MLIF)对大鼠颅脑创伤(TBI)的保护作用,并初步探讨其作用机制。**方法** 将大鼠随机分为5组,假手术组、模型组、MLIF低、中、高剂量组(0.33、1、3 mg/kg)。采用液压冲击法制备大鼠颅脑创伤模型,颅脑打击后30 min内完成首次尾静脉注射给药,每天给药1次,连续给药7 d。分别于给药后1、3、7 d取脑,检测大鼠脑含水量变化;采用试剂盒法检测血清超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平;HE染色及尼氏染色观察脑组织病理改变。**结果** 液压打击致大鼠颅脑创伤24 h后,MLIF低、中、高剂量组大鼠脑含水量均显著低于模型组( $P < 0.01$ ),MLIF中剂量组(1 mg/kg)效果最好。与模型组比较,创伤后1、3 d,MLIF(1 mg/kg)组大鼠脑含水量显著降低( $P < 0.01$ ),该组大鼠血清中SOD含量明显升高( $P < 0.05$ )和MDA含量显著降低( $P < 0.05$ )。HE染色和尼氏染色结果显示,模型组大鼠脑组织病理损伤明显,呈现明显水肿、细胞固缩等;MLIF(1 mg/kg)组大鼠脑组织病理损伤得到改善,水肿程度减轻。结论 MLIF可以抑制脑损伤氧化应激及水肿反应,发挥颅脑损伤保护作用。

**[关键词]** 单核细胞移动抑制因子;颅脑损伤;脑水肿;大鼠

**[中图分类号]** R563 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)06-0498-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.005

## Protective effect of MLIF on traumatic brain injury in rats

DING Huamin<sup>1</sup>, QIN Chunxia<sup>1</sup>, MA Kaiyuan<sup>2</sup>, SUN Lili<sup>1</sup>, ZHANG Yuefan<sup>1</sup>, LI Tiejun<sup>1,2</sup> (1. Department of Pharmacy, Punan Hospital of Pudong New Area, Shanghai 200125, China; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the protective effect and explore the mechanism of monocyte locomotion inhibitor factor (MLIF) on traumatic brain injury (TBI) in rats. **Methods** The SD rats were randomly divided into five groups: sham operation group, model group and three MLIF groups (0.33 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg). Rats were made model of brain injury by fluid percussion injury. The tail vein was administered within 30 min after TBI, once every 24 hours, and rats were administered for 7 days. Brain water content, serum levels of SOD and MDA, Hematoxylin-eosin staining and Nissl staining were used to detect the rats brain tissues. **Results** After rats traumatic brain injury for 24h, the brain water content in rats in three MLIF groups (0.33 mg/kg, 1 mg/kg and 3 mg/kg) was significantly lower than that in model group ( $P < 0.01$ ). The effect of MLIF (1 mg/kg) group was the best. Compared to rats traumatic brain injury for 1d and 3d, brain water content in MLIF group (1 mg/kg) was significantly lower than that in model group ( $P < 0.01$ ). SOD content in serum in MLIF (1 mg/kg) group was significantly increased ( $P < 0.01$ ) and MDA content in serum in MLIF (1 mg/kg) group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). HE staining and Nissl staining showed that the pathological changes of brain tissue in model group were obvious, and which in MLIF group were improved in brain tissue. **Conclusion** MLIF could inhibit oxidative stress and edema reaction of brain injury, which had protective effect on traumatic brain injury.

**[Key words]** MLIF; traumatic brain injury; brain edema; rats

颅脑损伤(TBI)是创伤中常见的病症之一,统

计数据表明,TBI发病率位于各类创伤之首,有着较高的病残率和病死率,严重影响人们的身体健康与生活质量。而随着社会交通的发展,TBI发病率也在逐年攀升。研究证明,TBI诱发的水肿、炎症和氧化应激等复杂的反应会进一步导致细胞损伤。目前,在临床中缺乏治疗TBI的药物,至今30多个III期前瞻性临床试验均未能获得令人满意的结果,无

**[基金项目]** 上海市卫生和计划生育委员会科研课题(201640404);

上海市浦东新区卫生系统重要薄弱学科建设资助(PWZbr2017-16)

**[作者简介]** 丁华敏,学士,主管药师,研究方向:临床药学,Email: huaminding1987@163.com

**[通讯作者]** 李铁军,博士,副教授,副主任药师,硕士生导师,研究方向:心脑血管药理学、临床药学,Email:18930502906@163.com

一种药物具有确切的临床疗效<sup>[1]</sup>。

单核细胞迁移抑制因子(monocyte locomotion inhibitory factor, MLIF)是由溶组织内阿米巴产生的一种热稳定性化合物<sup>[2]</sup>(相对分子质量 583000)。体内、外研究发现, MLIF 可以发挥抗炎和免疫保护作用,对类风湿关节炎、神经损伤、心肌缺血、脑缺血及痴呆具有良好的保护作用。Zhang 等<sup>[3]</sup>证实 MLIF 通过与核糖体蛋白翻译延长因子 eEF1A1 结合而发挥作用。其中, MLIF 与 eEF1A1 结构域的区域 1(domain1)结合,抑制脑微血管内皮细胞炎症黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达,升高 eNOS 的表达量,改变内皮细胞功能,从而发挥保护作用。MLIF 使体循环中 NO 含量和脂质过氧化物的水平降低, iNOS 基因表达降低,同时 MLIF 提高 IL-10 和 TGF- $\beta$  的表达,进而发挥神经保护作用<sup>[4]</sup>。

本课题组前期研究发现 MLIF 在脑缺血损伤方面能够发挥显著的保护作用, MLIF 可以降低大鼠/小鼠脑缺血模型中脑梗死面积,能够抑制细胞黏附因子发挥保护血管的作用,并且可抑制 MPO、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的过量表达。提示 MLIF 可能具有颅脑损伤保护作用<sup>[5]</sup>。本实验采用液压冲击法建立大鼠颅脑损伤模型,观察 MLIF 对大鼠颅脑创伤的保护作用,探索 MLIF 可能的神经保护作用机制,为其预防与治疗颅脑损伤提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

MLIF(杭州中肽生化有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、丙二醛(MDA)活性检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);水合氯醛、4%多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 实验动物

健康成年 SD 大鼠,雄性,清洁级,体重 250~300 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。实验前,动物房适应饲养 1 周,室温(25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度 40%~70%,自由进食和饮水。所有动物实验过程均符合实验动物伦理学要求。

### 1.3 仪器与设备

ALC-FP6 型动物液压冲击颅脑损伤仪(上海奥尔科特生物科技有限公司);FA1104 型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);脑立体定位仪(瑞沃德生命科技有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 大鼠颅脑创伤模型的制备

参照 Mcintosh 等<sup>[6]</sup>的实验方法,采用液压冲击法建立大鼠颅脑创伤模型。大鼠称重,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,俯卧于手术台上,大鼠头部固定于脑立体定位仪上。大鼠头顶部去毛,碘酒消毒头皮。沿正中矢状线剪开长约 1.5 cm 的头皮切口,分离骨膜,暴露颅骨。脑立体定位仪定位选取右侧颅顶冠状缝后 2 mm、矢状缝旁开 2 mm 处,用牙科钻磨开一直径为 5 mm 的圆形骨窗,保持硬脑膜的完整。将自制打击管用牙科水泥粘接固定于圆形骨窗上,待打击管固定牢固后,用 37 $^{\circ}$ C 生理盐水将打击管注满。待大鼠恢复角膜反射或夹尾反射后,将打击管与液压冲击仪端口连接,调整液压冲击仪(强度为 2.026 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa)进行打击。然后取下打击管,消毒、缝合头皮,将大鼠放回笼中饲养。打击后瞬间,大鼠出现四肢抽搐,同时有数秒的呼吸抑制现象,表明打击造模成功。假手术组仅剪开头皮,分离骨膜,磨出骨窗,不进行液压冲击,其余步骤与模型组相同。

### 2.2 脑组织含水量测定

#### 2.2.1 不同给药剂量下大鼠脑组织含水量测定

实验大鼠分为 5 组:假手术组、模型组、MLIF 低、中、高剂量组(0.33、1、3 mg/kg)。假手术组、模型组给予等体积的生理盐水。颅脑创伤后 30 min 内完成第 1 次尾静脉注射给药。创伤后 24 h,水合氯醛麻醉大鼠处死,迅速断头取脑,滤纸吸干表面水分,用天平精密称取湿重,置于 110 $^{\circ}$ C 烘箱中烘烤 24 h 至恒重,称取干重。参考 Elliot 公式计算:脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times$ 100%。

#### 2.2.2 不同给药时间点大鼠脑组织含水量测定

实验大鼠分为 3 组:假手术组、模型组、MLIF(1 mg/kg)组。颅脑创伤后 30 min 内完成第 1 次给药,创伤后每天尾静脉注射给药 1 次,连续 7 d。假手术组、模型组给予等体积的生理盐水。分别于颅脑创伤后 1、3、7 d,取出脑组织,测定脑组织含水量。

### 2.3 血清中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量检测

大鼠分组及给药方法同“2.2.2”项。分别于颅脑创伤后 1、3、7 d,大鼠取血后离心,分离血清。按照 SOD 和 MDA 试剂盒说明书检测两者水平。

### 2.4 脑组织病理学检查

大鼠分组及给药方法同“2.2.2”项。分别于颅脑创伤后 1、3、7 d,大鼠用 10%水合氯醛麻醉,用生理盐水和 4%多聚甲醛心脏灌注后,断头取脑,置于

4%多聚甲醛中固定24 h。石蜡包埋切片,行HE染色和尼氏染色,观察脑组织神经元细胞病理形态学变化。

### 2.5 统计学分析

采用SPSS17.0统计软件进行统计学分析,实验数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析比较组间差异显著性,结果以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 MLIF对颅脑创伤大鼠的保护作用

#### 3.1.1 不同给药剂量对脑创伤大鼠脑组织含水量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑创伤后脑含水量显著增加( $P < 0.01$ ),见图1。MLIF低、中、高剂量组(0.33、1、3 mg/kg)脑含水量与模型组相比明显降低,具有统计学差异( $P < 0.01$ )。MLIF中剂量组(1 mg/kg)脑水肿程度减轻效果最好,故实验选用MLIF 1 mg/kg剂量进行氧化应激水平和病理学研究。

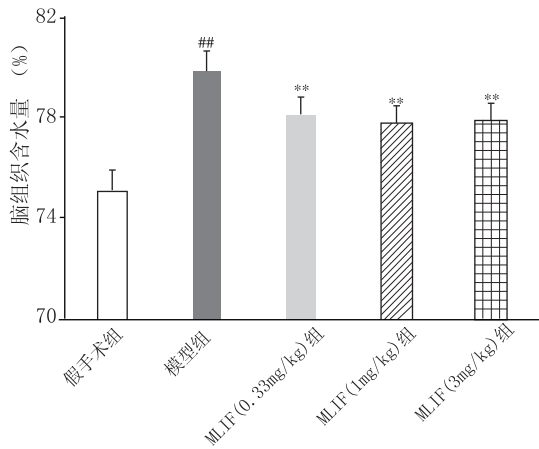


图1 不同剂量MLIF对颅脑创伤大鼠脑组织含水量的影响( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

\*\* $P < 0.01$ ,与模型组比较;## $P < 0.01$ ,与假手术组比较

#### 3.1.2 MLIF对大鼠脑创伤不同时间点脑组织含水量的影响

分别于大鼠在脑创伤后1、3、7 d断头取脑,创伤后1 d,模型组大鼠脑含水量显著高于假手术组( $P < 0.01$ );与模型组比较,给予MLIF(1 mg/kg)组大鼠脑含水量显著降低( $P < 0.01$ )。创伤后3 d,模型组脑含水量到达一个高峰,显著高于假手术组( $P < 0.01$ );MLIF(1 mg/kg)组大鼠脑含水量明显低于模型组( $P < 0.01$ )。创伤后7 d,模型组与MLIF(1 mg/kg)组大鼠脑含水量均下降,差异无统计学意义。结果见图2。

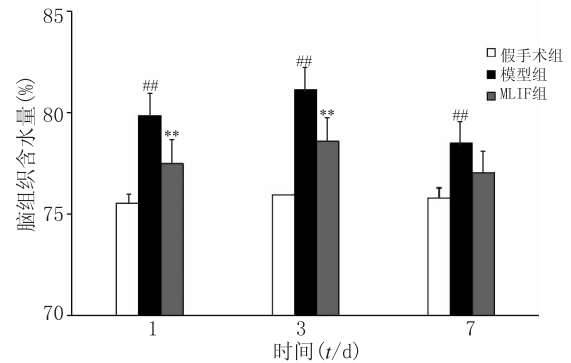


图2 大鼠颅脑创伤后不同时间点脑含水量变化(%)( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

\*\* $P < 0.01$ ,与模型组比较;## $P < 0.01$ ,与假手术组比较

#### 3.2 MLIF对脑创伤大鼠血清中SOD和MDA水平的影响

MLIF对颅脑创伤大鼠血清中SOD和MDA含量的影响结果见图3。

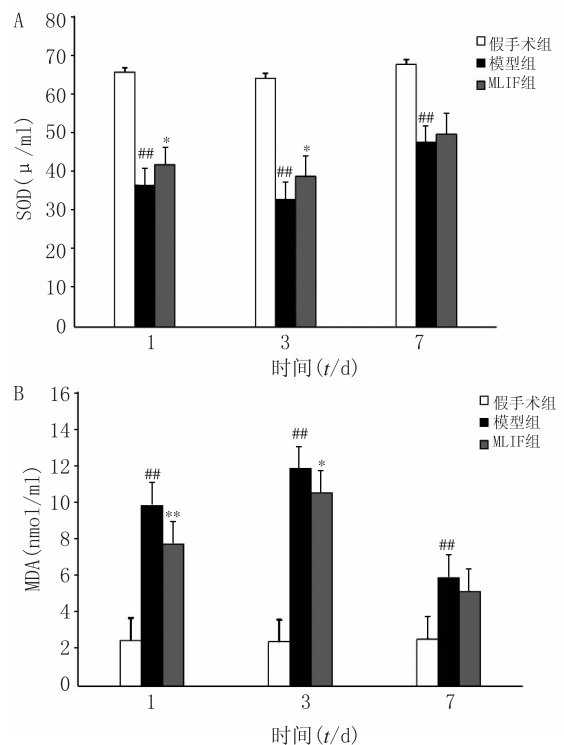


图3 MLIF对颅脑创伤大鼠血清中SOD和MDA含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

A. 大鼠血清SOD水平;B. 大鼠血清MDA水平\* $P < 0.05$ ,

\*\* $P < 0.01$ ,与模型组比较;## $P < 0.01$ ,与假手术组比较

创伤后1 d,模型组大鼠血清中SOD含量显著降低,与假手术组比较( $P < 0.01$ );与模型组比较,MLIF(1 mg/kg)组大鼠血清中SOD含量明显升高( $P < 0.05$ )。创伤后3 d,模型组大鼠血清中SOD含量显著低于与假手术组( $P < 0.01$ );MLIF(1 mg/kg)组大鼠血清中SOD含量显著高于模型组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。创伤后7 d,模型组与

MLIF (1 mg/kg)组大鼠血清中 SOD 含量差异无统计学意义。MDA 检测水平方面,创伤后 1 d,模型组大鼠血清中 MDA 含量显著升高,与假手术组比较( $P < 0.01$ ); MLIF (1 mg/kg)组大鼠血清中 MDA 含量较模型组明显降低( $P < 0.01$ )。创伤后 3 d,模型组大鼠血清中 MDA 含量明显高于假手术组( $P < 0.01$ ); MLIF (1 mg/kg)组大鼠血清中 MDA 含量显著降低,与模型组比较( $P < 0.05$ )。创伤后 7 d,模型组与 MLIF (1 mg/kg)组大鼠血清中 MDA 含量差异无统计学意义。

### 3.3 MLIF 对脑创伤大鼠脑组织病理损伤的影响

HE 染色结果如图 4 所示。假手术组:脑组织皮层结构正常,未见出血、水肿及损伤,各细胞层次

清楚,排列整齐有序,神经元核仁清晰,无血管扩张现象。模型组:创伤后 1 d,创伤灶及其周边组织发生明显水肿,神经元和胶质细胞胞体轻微肿胀,可见细胞核固缩或破碎。创伤后 3 d,脑创伤灶及其周边组织水肿加重,神经细胞肿胀进一步加深,胞浆浓染,细胞核固缩及缺失,炎性细胞浸润。创伤后 7 d,神经细胞肿胀明显减轻,正常细胞数量稍有增多。MLIF(1 mg/kg)组:创伤后 1 d,创伤区域组织较模型组水肿程度明显减轻,神经细胞肿胀减少。创伤后 3 d,创伤及周围组织仍有水肿,但较模型组明显减轻。部分空泡中央细胞缺失,核固缩程度稍有好转。创伤后 7 d,水肿显著减轻,神经细胞肿胀好转。

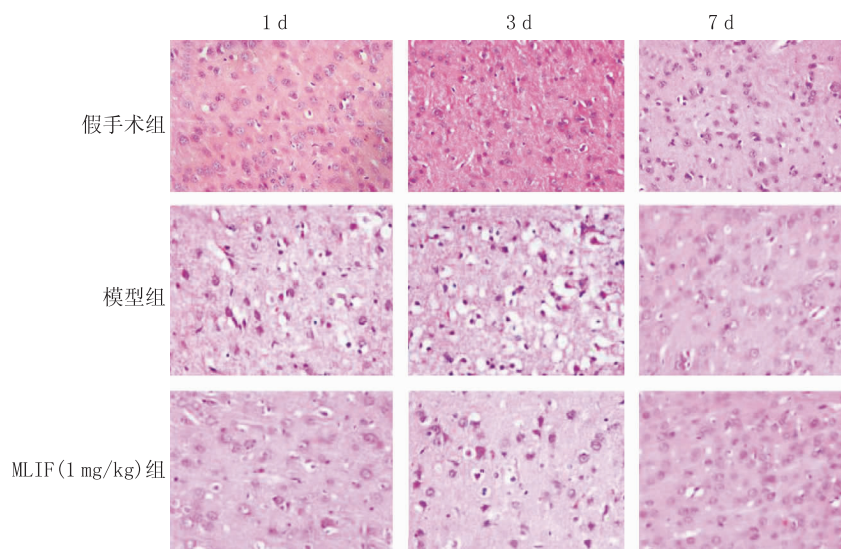


图 4 HE 染色观察各组大鼠脑组织病理学变化(400×)

### 3.4 MLIF 对脑创伤大鼠脑组织神经元存活的影响

神经组织的基本组成成分主要包括神经细胞和神经胶质细胞。而尼氏体为神经元合成蛋白质的主要场所,因此与神经元的功能发挥关系密切。当各种诱发因素导致神经元受损害变性时,则会通过尼氏体的形状、大小和数量表现出来。课题组分别对颅脑创伤后 1、3、7 d 大鼠大脑皮层神经元进行尼氏染色,观察脑组织神经元细胞形态的改变。从图 5 可以看出,假手术组:皮层区神经元形态规则,排列整齐,尼氏小体数量较多,染色均匀,清楚可见。模型组:神经元细胞大量减少,同时可见坏死、核固缩,神经元排列紊乱、无层次感。MLIF(1 mg/kg)组:神经元细胞数量明显增加,正常形态细胞较模型组稍多,神经元损伤较模型组轻。

## 4 讨论

啮齿动物模型在 TBI 研究中最常见<sup>[7]</sup>。

目前,颅脑创伤主要有 4 个具体的动物模型广泛用于研究:流体冲击伤害(FPI)模型、受控皮质影响(CCD)损伤模型、重物下降冲击加速度损伤模型和爆炸伤模型。FPI 模型复制临床 TBI 而无颅骨骨折。FPI 可以复制颅内出血、脑肿胀和进行性灰质损害,这些都是人类 TBI 的病理生理学标志。

脑水肿是临床常见的病症,水肿的形成主要是由于血管外液体积聚和水代谢紊乱。目前,脑水肿可以分为两大类,即细胞毒性(又称细胞性)水肿或血管源性水肿<sup>[8]</sup>。事实上,一些研究报告指出,大脑水肿引起的死亡率可能占总死亡率的一半,年轻人群中 TBI 的患病率更高<sup>[9-10]</sup>。脑水肿会导致细胞肿胀,改变细胞代谢物浓度,从而改变细胞生理学、生物化学和其他细胞功能。肿胀不仅涉及细胞本身而且涉及薄壁组织,从而引起颅内压迅速增加,导致血

管压缩,组织血流减少,进而损害大脑正常功能<sup>[11]</sup>。本实验结果显示,与模型组相比,MLIF能够明显降

低脑含水量,减轻脑水肿,从而发挥对颅脑创伤的保护作用。

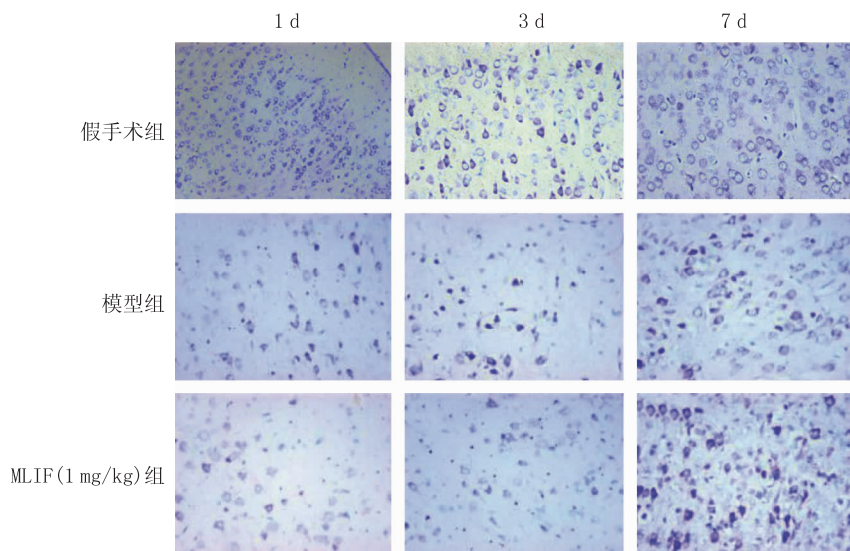


图5 尼氏染色观察各组大鼠脑组织神经元细胞形态(400×)

氧化应激增加是影响创伤后损伤的另一个关键因素,因为大脑对游离的自由基高度敏感<sup>[12]</sup>。在TBI之后,自由基过量产生的几个潜在来源包括:线粒体呼吸链、儿茶酚胺氧化、膜磷脂分解、氧化酶活化、浸润嗜中性粒细胞、在细胞内和细胞外抗氧化防御系统受到攻击。目前认为氧化应激是引起TBI后继发性损伤级联反应的主要原因。而氧化应激指标SOD和MDA的含量则能反映机体氧化应激的水平<sup>[13]</sup>。

课题组采用大鼠液压冲击法制备大鼠颅脑创伤模型,给予MLIF干预,结果显示,MLIF能够降低脑创伤大鼠脑组织含水量,减轻脑水肿;MLIF可以提高SOD活性,减少MDA含量,抑制脑损伤氧化应激反应;并且保护脑组织神经元受损,对脑组织病理损伤有明显的改善作用;实验表明,MLIF对颅脑创伤具有保护作用。对于MLIF保护颅脑创伤的具体作用环节和主要作用靶点尚不清楚,还有待深入研究。

#### 【参考文献】

[1] LOANE D J, FADEN A I. Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies[J]. Trends Pharmacol Sci, 2010, 31(12): 596-604.  
 [2] RICO G, LEANDRO E, ROJAS S, et al. The effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon nitric oxide production by human leukocytes[J]. Arch Med Res, 2000, 31(4 Suppl): S90-S91.  
 [3] ZHANG Y F, CHEN J, LI F, et al. A pentapeptide monocyte locomotion inhibitory factor protects brain ischemia injury by targeting the eEF1A1/endothelial nitric oxide synthase path-

way[J]. Stroke, 2012, 43(10): 2764-2773.

[4] 程浩, 芮耀诚, 章超凡, 等. 生物活性肽-单核细胞迁移抑制因子研究进展[J]. 药理学实践杂志, 2015, 33(1): 17-19, 27.  
 [5] ZHU Q Z, ZHANG Y F, LIU Y L, et al. MLIF alleviates SH-SY5Y neuroblastoma injury induced by oxygen-glucose deprivation by targeting eukaryotic translation elongation factor 1A2[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149965.  
 [6] MCINTOSH T K, VINK R, NOBLE L, et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model[J]. Neuroscience, 1989, 28(1): 233-244.  
 [7] MARKLUND N, HILLERED L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? [J]. Br J Pharmacol, 2011, 164(4): 1207-1229.  
 [8] FUKUDA A M, BADAUT J. Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 279.  
 [9] MARMAROU A. Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts[J]. Acta Neurochir Suppl, 2003, 86: 7-10.  
 [10] FEICKERT H J, DROMMER S, HEYER R. Severe head injury in children: impact of risk factors on outcome[J]. J Trauma, 1999, 47(1): 33-38.  
 [11] DONKIN J J, VINK R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments [J]. Curr Opin Neurol, 2010, 23(3): 293-299.  
 [12] HALL E D, VAISHNAV R A, MUSTAFA A G. Antioxidant therapies for traumatic brain injury[J]. Neurotherapeutics, 2010, 7(1): 51-61.  
 [13] JI X T, LIU W B, XIE K L, et al. Beneficial effects of hydrogen gas in a rat model of traumatic brain injury via reducing oxidative stress[J]. Brain Res, 2010, 1354: 196-205.

【收稿日期】 2019-07-23 【修回日期】 2019-10-08

【本文编辑】 李睿旻