论 著

不同海拔高度下颅脑损伤后中性粒细胞弹性蛋白酶浓度变化

马铁军[1],周其全[2△],王 毅[1],王东平[1],高宗科[1](1.解放军第五三七医院,陕西宝鸡 721006;
2.第三军医大学高原军事医学系高原疾病教研室,重庆 400038)

【摘要】 目的 探讨不同海拔高度下,大鼠颅脑损伤后中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)浓度变化以及 NE 与大鼠高原颅脑损伤的相关性。**方法** 取雄性 SD 大鼠 64 只,随机分为平原组和高原组。按 Feeney 自由落体撞击法制作大鼠高原与平原颅脑损伤模型,于 12 h,24 h 和 36 h 后对比观察高原与平原颅脑创伤 NE 浓度变化。另取雄性 SD 大鼠 64 只,模拟 1 000、3000、5000 m 不同海拔高度行颅脑创伤,24 h 后观察各组 NE 浓度变化。**结果** 平原组与高原组大鼠颅脑损伤后 NE 水平明显增高($P<0.05$),并于 24 h 达到峰值。随着海拔高度的增高,大鼠颅脑损伤后 NE 的升高幅度明显增大。**结论** NE 是评价颅脑损伤程度的重要因素,高原颅脑损伤病情程度与 NE 表达呈正相关。

【关键词】 中性粒细胞弹性蛋白酶; 颅脑损伤; 高原
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.23.005
中图分类号:R446.113 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2010)23-2569-02

Change of NE level after brain injury at different elevations

MA Tie-jun[1],*ZHOU Qi-quan*[2△],*WANG Yi*[1],*WANG Dong-ping*[1],*GAO Zong-ke*[1]. 1. 537 *Hospital of PLA*,*Baoji*,721006,*China*;2. *Department of Pathophysiology*,*College of High Altitude Military Medicine*,*Third Military Medical University*,*Chongqing* 400038,*China*

【Abstract】 Objective To investigate the level of neutrophil elastase(NE) in brain injury at different elevations and the relationship between NE and plateau brain injury. **Methods** 64 adult male Wistar rats were divided into 2 groups:champaign group and plateau group. Then we made the model of traumatic brain injury both by Feeney dropping weight. We observed the level of NE at 12 h,24 h,36 h after the traumatic brain,compared it between the two groups. Then we took the other 64 adult male Wistar rats to establish the model of traumatic brain injury at 1 000 m, 3 000 m,5 000 m high. To observe the change of NE levels after 24 h. **Results** The levels of NE in the champaign group and plateau brain injury group were both obviously higher than those in the groups before brain injuring($P<0.05$). NE level got the top at 24 h after brain injuring. NE level became higher as long as elevaion grew up. **Conclusion** NE is an important factor in traumatic brain injury. And the pathogenetic condition of brain injury is positively related with. the level of NE.

【Key words】 neutrophil elastase; brain injury; plateau

颅脑损伤是常见的神经外科急症。研究显示,在高原地区由于受到低温、低氧、低气压等特殊环境影响,颅脑损伤后病情往往发展更加迅速。随着海拔高度的升高,病情也随之加重。中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase,NE)在颅脑损伤后表达水平增高,且与损伤程度成正比。本研究通过对颅脑损伤后不同时相点以及不同海拔高度颅脑损伤,NE 的表达水平的测定,探讨高原颅脑损伤与 NE 的相关性。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 取健康雄性 SD 大鼠 64 只,体质量 200~240 g,由第三军医大学动物实验中心提供。随机分为平原组和高原组(模拟海拔 3 000 m)。平原组和高原组分别行颅脑创伤,于 12、24、36 h 测定 NE 浓度。平原组与高原组分别设对照,不作创伤处理。另取 SD 大鼠 64 只(大鼠要求与上述相同)随机分为对照组与颅脑创伤组,分别于平原、海拔1 000 m、海拔 3 000 m、海拔 5 000 m 测定 NE 浓度。

1.2 平原大鼠颅脑创伤模型制备 采用 Feeney 法制备自由落体颅脑损伤模型。撞杆头端直径 3 mm,击锤质量 20 g,下落高度 20 cm,落体致伤的冲击力为 20 g×20 cm。动物称质量后腹腔注射 10%乌拉坦(15 mL/kg),麻醉后固定大鼠头部,沿正中线切开头皮并剥离骨膜,用颅骨钻于人字缝后 2 mm、中线右旁 2 mm 处钻开直径 4 mm 的圆形骨窗,保持硬脑膜完整。将撞杆头端置于骨窗处,击锤沿外周套管自由落下冲击撞杆,造成右后叶颅脑创伤。

1.3 高原大鼠颅脑创伤模型制备 制备动物模型前 3 d 将大鼠放入模拟海拔 3 000 m 低压氧舱内连续减压缺氧 3 d,每日减压缺氧 23 h,1 h 用于喂食、清洁氧舱。按平原大鼠颅脑创伤方法于第 3 天开舱时复制高原创伤模型,之后将大鼠继续放入 3 000 m 海拔高度减压 24 h。其他海拔高度创伤大鼠分别模拟对应海拔高度,均按相同方法处理。对照组大鼠采取同样方法于低压仓内饲养 3 d,但不作创伤处理。

1.4 NE 浓度测定 平原对照组经股动脉取血 2 mL,高原对照组大鼠于海拔 3 000 m 低压氧舱减压缺氧 3 d 后取血,平原与高原(3 000 m)创伤各组分别于 12、24、36 h 后取血。不同海拔组大鼠,对照组于对应海拔低压氧舱缺氧 3 d 后取血,创伤组于创伤 24 h 后取血。各组血液 3 000 r/min 离心分离血清,−70 ℃保存待测。采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验法测各组血清中 NE 浓度,标本中的 NE 与试剂盒 NE 单抗结合。加入生物素标记的抗大鼠 NE(二抗),形成免疫复合物辣根过氧

△ 通讯作者。

化物酶标记的 streptavidin 与二抗结合。最后加入 TMB 显色，于波长 450 nm 测定 NE 浓度。

1.5 统计学处理　数据应用软件 SPSS13.0 分析结果，两组间资料统计采用两样本 t 检验，计算 P 值得出结论，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　　果

2.1 平原与高原暴露下大鼠颅脑创伤后不同时相 NE 浓度比较结果所示，平原与高原组大鼠各自进行组内比较：颅脑创伤组大鼠 NE 水平均较对照组大鼠明显升高（$P<0.05$），并且于创伤后 24 h NE 浓度达到峰值。同时，平原与高原两组间进行比较：对照组大鼠高原暴露下 NE 水平比平原暴露下 NE 水平高（$P<0.05$），颅脑创伤不同时相点各组大鼠高原暴露下 NE 水平也比平原暴露下 NE 水平高（$P<0.05$），见表 1。

表 1　平原与高原暴露下大鼠创伤后不同时相 NE 浓度比较

项目	平原组		高原组	
	例数(只)	NE 浓度(ng/mL)	例数(只)	NE 浓度(ng/mL)
对照	8	3.94±0.47	8	9.56±2.85△
创伤后 12 h	8	6.07±1.56*	8	14.42±4.85*△
创伤后 24 h	8	17.07±4.56*	8	21.66±4.96*△
创伤后 36 h	8	18.08±3.25*	8	22.43±3.04*△

注：组内比较，* $P<0.05$ 参比对照；组间比较，△ $P<0.05$ 参比平原组。

2.2 不同海拔高度颅脑损伤后 NE 浓度比较　结果显示，随着海拔高度的升高，对照组大鼠 NE 表达水平随之增高。同样，颅脑创伤组大鼠 随之随着海拔高度的升高，NE 表达水平也随之升高。二者呈现正相关关系（见表 2）。

表 2　不同海拔高度颅脑损伤后 NE 浓度比较

海拔(m)	平原组		高原组	
	例数(只)	NE 浓度(ng/mL)	例数(只)	NE 浓度(ng/mL)
平原	8	3.94±0.47	8	17.07±4.56
1 000	8	4.02±1.56	8	19.38±3.34
3 000	8	9.56±2.85	8	21.66±4.96
5 000	8	15.76±3.00	8	22.42±4.85

3 讨　　论

3.1 平原与高原颅脑损伤与 NE 相关

3.1.1 平原与高原环境下，颅脑损伤后 NE 表达升高　NE 是机体内众多内源性蛋白酶中的一种。在体内众多可能对机体细胞产生损伤的因素中由活化的中性粒细胞合成并释放，分布广泛，能降解许多胞外的基质蛋白，包括胶原、弹性蛋白、纤维蛋白、纤维结合素、层黏蛋白。NE 还能通过产生超氧阴离子和过氧化氢，导致氧化应激。组织、器官损伤或炎性反应过程中，中性粒细胞释放出大量的 NE 进一步加重这些组织的损伤。从实验结果看，平原和高原颅脑损伤后，NE 表达水平均迅速增高。并于 24 h NE 水平达到一定程度，随后见有轻度升高，升高缓慢。

3.1.2 高原环境暴露下机体 NE 水平随海拔升高而升高　高原环境的主要特点是低压缺氧，机体处于这种环境下三磷酸腺苷（ATP）被迅速耗竭，细胞 Na^+/K^+ 泵和 Ca^{2+} 泵功能不能维持，生物膜的完整性和离子梯度遭到破坏，造成细胞严重损伤或死亡。文献报道，在大鼠异体心脏移植动物模型研究中，给予大鼠静脉持续输注 NE 抑制剂西维来司钠 10 mg/kg 可使大鼠心肌的 ATP 含量降低明显低于对照组[1]，这就间接证明 NE 可以增强有氧代谢，产生更多的 ATP。高原环境随着海拔高度的升高，温度和氧含量均随之降低。机体 NE 表达水平与海拔高度的升高而升高，表明高原缺氧初期能代偿性的增高 NE 水平以提高机体抵御缺氧的能力，降低机体损伤。也有研究表明 NE 可作为抗炎性反应的重要指标在高原环境暴露下迅速升高，并且敏感程度较高[2]。

3.1.3 高原颅脑创伤后 NE 水平明显高于平原颅脑创伤　NE 作为中性粒细胞活化后释放的一种弹性蛋白酶。组织、器官损伤后，在白细胞介素（IL-8、IL-1）、肿瘤趋长因子（TNF-α）等作用下 PMN 向损伤部位浸润，释放出大量的 NE 进一步加重这些组织的损伤。高原缺氧环境下，机体免疫调节功能紊乱。IL-8、TNF-α 等作为 NE 最为关键的趋化因子参与了机体低氧应激过程而明显增高，结果导致 NE 水平的升高。因此，高原颅脑损伤后，中性粒细胞释放 NE 量相比平原颅脑损伤后会有所增加。随着海拔的升高，机体低氧应激程度随之升高，这就导致 NE 也将随之升高，本实验结果进一步证实了以上推论。

3.2 NE 加重高原颅脑损伤的原因与机制　高原环境颅脑损伤重于平原，并随海拔升高，病情随之加重。这可能与 NE 随之表达升高相关。中枢神经系统的很多疾病都伴随着损伤局部及其周围组织的炎性反应，包括脑缺血、脑出血、脑组织炎性反应等。炎性反应作为一种对脑损伤的应答反应，会吸引更多的 PMN 向损伤区浸润。NE 作为 PMN 活化后释放一种毒性分子在急性肺损伤中的作用已被肯定[3-4]，但 NE 在脑损伤中的作用较少报道。目前研究表明其参与颅脑损伤的机制主要表现在以下方面，(1)破坏血脑屏障增加血管壁通透性：颅脑损伤后的缺血/缺氧即可使脑微血管内皮细胞受损，血管通透性增加，进而使大量 PMN 黏附于血管内皮细胞，随后穿越血管内皮。在趋化因子的作用下，向损伤区募集，进而释放出大量 NE，NE 除直接破坏受损周围组织的神经细胞外，还可损伤血管内皮细胞、水解脑微血管内皮细胞外基质，从而破坏血脑屏障，增加脑微血管的通透性，加重脑水肿[5]。幺改琦和吴咸中[6]通过 PMN 和血管内皮细胞体外共培养的方法，发现 PMN 释放的 NE 在 PMN 介导的内皮细胞损伤中起重要作用，抑制 NE 可以明显减轻这种损伤，这间接证实了 NE 可破坏血脑屏障。另一方面，NE 通过抑制成纤维细胞生长因子（FGF）以及血管内皮细胞生长因子（VEGF）从而抑制由于炎性反应所致的血脑屏障破坏后血管修复和再生功能[7]。NE 的这种双重作用使血脑屏障破坏加重了颅脑损伤。(2)促进炎性反应细胞因子释放，加重脑缺血炎性反应；研究表明，NE 可上调内皮细胞-白细胞黏附分子-1（VCAM-1）、细胞间黏附分子-1（ICAM-1）及 IL-8 的表达，促进 PMN 与内皮细胞间的黏附，进而向组织浸润，释放炎性反应介质。同时 NE 可以上调 α-肿瘤坏死因子（TNF-α），TNF-α 的增加可促进 IL-6 的合成和分泌，使炎性反应增强，增加血管内皮细胞通透性，导致渗出增加。而 IL-8 与 TNF-α 作为 NE 的关键趋化因子又可促进 PMN 的激活进一步释放 NE，形成恶性循环，加重颅脑损伤后的炎性反应。

由此可见，高原环境下颅脑损伤发病急、病情严重、反应迅速，病死率明显高于平原，与高原环境下 NE 水明显平升高有关。而高原颅脑损伤后，NE 的高阈值本身会迅速作用于损伤部位，并且上调相应炎性反应因子，促使 PMN（下转第 2572 页）