

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 09. 021

高血糖对创伤性脑损伤后皮质 SMAC 和 XIAP 表达的影响

王 亮,董 伟[△]

(重庆市第五人民医院神经外科 400062)

摘 要:**目的** 探讨大鼠创伤性脑损伤(TBI)后高血糖对皮质第二个线粒体衍生的半胱氨酸蛋白酶激动剂(SMAC)和 X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)表达的影响。**方法** 将成年雄性 SD 大鼠随机分成正常对照组、TBI 组、胰岛素治疗组,测定各组各时间点伤前伤后血糖,采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)测定损伤周围 SMAC 和 XIAP 基因表达,免疫组织化学法测定各组伤后损伤皮质 SMAC 及 XIAP 蛋白表达量,末端标记原位细胞凋亡检测法(TUNEL 法)测定各组伤后皮层凋亡细胞数。**结果** TBI 组伤后血糖升高,伤侧皮层 XIAP 表达减少,SMAC 表达及凋亡细胞数明显增加;胰岛素治疗组伤后血糖变化不明显($P>0.05$),XIAP 表达明显高于 TBI 组($P<0.05$),SMAC 表达和细胞凋亡数明显少于 TBI 组($P<0.05$)。**结论** TBI 后高血糖可增加伤后脑细胞凋亡,其机制可能与其抑制 TBI 后 XIAP 的表达,增加 SMAC 的表达有关。

关键词:创伤性脑损伤; 高血糖; 半胱氨酸蛋白酶激动剂; X 连锁凋亡抑制蛋白
中图法分类号:R741.02 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2019)09-1228-04

Effect of hyperglycemia on the expression of SMAC and XIAP in rats following traumatic brain injury
WANG Liang, DONG Wei[△]

(Department of Neurosurgery, the Fifth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400062, China)

Abstract:**Objective** To explore the effect of hyperglycemia on the expression of SMAC and XIAP in rats following traumatic brain injury. **Methods** Adult male SD rats were randomly divided into 3 groups: normal control group, traumatic brain injury group and insulin therapy group, the blood glucose concentration was measured before and after injury. The method of RT-PCR and immunohistochemistry were applied to detect the gene and protein expression of SMAC and XIAP. The apoptosis of the injured cortex were detected by TUNEL staining. **Results** The blood glucose concentration only increased markedly in traumatic brain injury group. The insulin therapy group showed much more expression of XIAP($P<0.05$) but less expression of SMAC($P<0.05$), as well as apoptosis in the injured cortical than that in the traumatic brain injury($P<0.05$). **Conclusion** The hyperglycemia after traumatic brain injury can increase apoptosis in the cortex, the mechanism may be associated with it can degrade the expression of XIAP and upgrade the expression of SMAC.

Key words: traumatic brain injury; hyperglycemia; SMAC; XIAP

创伤性脑损伤(TBI)是神经外科常见病,脑细胞的凋亡是伤后细胞缺失和神经功能障碍的重要原因之一。目前研究表明,TBI 后高血糖对大脑有损害作用,胰岛素强化治疗能显著改善高血糖患者的预后^[1-4]。本课题前期研究发现,控制 TBI 后高血糖能显著减轻 TBI 后脑皮层细胞凋亡,但其具体机制尚不清楚^[5-6]。本文通过检测正常对照组、TBI 组和胰岛素治疗组 TBI 后凋亡相关蛋白半胱氨酸蛋白酶激动剂(SMAC)、X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)的表达,从细胞凋亡角度探讨 TBI 后高血糖对脑损害作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源 选取清洁级雄性 SD 大鼠 75 只,体质量(250.5±12.8)g,随机数字表法分成正常对照组、TBI 组、胰岛素治疗组,每组又分为正常,伤后 12、

24、48、72 h 5 个时间点,每组每个时间点各 5 只,大鼠均取造模前及处死前 10 min 尾静脉血,采用美国 Johnson 公司 One-Touch II 型微型血糖仪测定血糖值。

1.2 仪器与试剂 脑外伤头颅打击装置,One-Touch II 型微型血糖仪,LEICA 光学显微镜,SMAC, XIAP 多克隆抗体(Labovision),SABC 法免疫组织化学试剂盒(武汉博士德),TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天),中效低精蛋白锌胰岛素(NPH)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的制作和标本的收集 造模前动物禁食 8 h。采用刘媛等^[7]的方法制作脑外伤模型,右侧前后囟连线中点旁开 2 mm 处用牙科钻钻开颅骨,以此为中心蚊式血管钳咬开直径 5 mm 的骨窗,保持硬脑膜完整,50 g/cm 打击冲量制作中型 TBI 模型,以撞击区出现明显硬膜下血肿,动物苏醒即刻行走向

左转圈或偏倒,术后 HE 染色撞击区出现明显挫裂伤作为造模成功的标志。伤后动物均采用鼻饲法喂养。胰岛素治疗组于伤后即刻皮下注射精蛋白锌重组人胰岛素(NPH) 1.0 单位,后每 12 h 追加 1.0 单位^[8],同时每天测随机血糖 4 次,如遇血糖降低即刻腹腔注射 10%葡萄糖液予以纠正,同时参照 MOGLIA 等^[9]的方法调整胰岛素用量,以维持血糖在伤前正常范围。正常对照组不做致伤处理,但禁食禁水和鼻饲法喂养同 TBI 组和胰岛素治疗组。选取伤侧损伤周围 2 mm 内部位脑皮质为观察兴趣区^[10]。大鼠深度麻醉,基因测定标本经快速断头取脑,迅速取兴趣区脑组织于液氮中保存备用。石蜡包埋块标本大鼠麻醉后,经心脏灌注 4%冷多聚甲醛固定后断头取脑,以前后囟连线中点为基线冠状位切取 4 mm 厚(基线前后各 2 mm)完整脑片按常规制作成石蜡包埋块。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测兴趣区皮质 SMAC、XIAP 基因表达 按 Trizol 试剂说明提取总 RNA,定量分析 RNA 水平后采用 Takara 逆转录试剂盒逆转录为 cDNA,RT 反应条件:30 ℃ 10 min,50 ℃ 30 min,94 ℃ 5 min。Primer 5 设计 SMAC、XIAP 引物,委托上海生物技术有限公司帮助合成。SMAC 上游引物序列:5'-AGG GCT GTG TCT TTG ATA GCG-3',下游引物序列:5'-TGG ATG TGA TTG GTC CCG GTG A-3',产物长度 354 bp。XIAP 上游引物序列:5'-GCG GCA GTA GAT AGA TAG TA-3',下游引物序列:5'-TGG GGC TGT CTT TGG TAA CGC-3',产物长度 421 bp。B-actin 上游引物序列:5'-TCC TGC TCA TCA ATC GTA A-3',下游引物序列:5'-TCC TGC TCA TCA ATC GTA A-3',产物长度 483 bp。PCR 反应条件:94 ℃ 2 min,94 ℃ 45 s,58 ℃ 35 s,72 ℃ 30 s,循环 30 次。采用 RT-PCR 对定量结果进行计算,得出标本 SMAC 及 XIAP mRNA 的相对表达量。

1.3.3 兴趣区皮质 SMAC、XIAP 免疫组织化学测定 石蜡包埋块冠状位切片,按 SABC 法试剂盒说明书进行 SMAC(抗体 1:200 倍稀释),XIAP(抗体 1:100 倍稀释)免疫组织化学染色,显微镜下观察摄像。采用 Impro-plus6.0 软件分析图像,计算兴趣区皮层脑组织 SMAC 及 XIAP 表达的平均光密度值(OD 值);各组阴性对照均采用抗体稀释液代替 SMAC 及 XIAP 抗体,其余步骤同前。

1.3.4 TUNEL 法检测各组兴趣区皮质细胞凋亡

石蜡包埋块冠状位切取 5 μm 厚完整脑片,按试剂盒说明书步骤操作,Leica 倒置荧光显微镜 400 倍视野观察摄像,应用 Impro-plus6.0 图像分析软件分析凋亡细胞数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组血糖值变化情况 TBI 组血糖于伤后 12 h 开始升高,24 h 达到顶峰(与其他各时间点相比 *P* < 0.05),48 h 开始下降,72 h 仍高于正常水平;胰岛素治疗组伤后各时间点血糖升高不明显;各组伤前血糖差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1。

2.2 TBI 急性期兴趣区皮层 XIAP、SMAC mRNA 表达 正常对照组伤侧兴趣区皮层脑组织 XIAP、SMAC 表达差异无统计学意义(*P* > 0.05)。TBI 组伤侧兴趣区皮层 XIAP mRNA 表达于伤后 12 h 开始降低,48 h 达到最低值,72 h 开始回升但仍低于正常水平,见表 2;SMAC mRNA 表达于伤后 12 h 开始增加,48 h 达到最高值,72 h 开始降低但仍高于正常水平,见表 3。胰岛素治疗组伤后各时间 XIAP mRNA 表达明显高于 TBI 组,SMAC mRNA 表达明显低于 TBI 组(*P* 均 < 0.05)。

2.3 TBI 急性期兴趣区皮层 XIAP、SMAC 表达 免疫组织化学染色显示,XIAP、SMAC 表达于细胞质,免疫组织化学染色可见细胞质被染成棕黄色,见图 1、2。正常对照组伤侧兴趣区皮层脑组织 XIAP、SMAC 表达差异无统计学意义(*P* > 0.05)。TBI 组伤侧兴趣区皮层 XIAP 蛋白表达于伤后 12 h 开始降低,48 h 达到最低值,72 h 开始回升但仍低于正常水平(图 1);虽然胰岛素治疗组伤后伤侧兴趣区皮层各时间点 XIAP 表达量均明显高于 TBI 组,但其表达量明显少于正常对照组,见表 4。TBI 组伤侧兴趣区皮层脑组织 SMAC 表达于伤后 12 h 开始增加,48 h 达最高值,72 h 开始下降但仍高于正常水平(图 2),虽然胰岛素治疗组伤后 24、48、72 h 伤侧兴趣区皮层 SMAC 表达量明显少于 TBI 组,但其明显多于正常对照组,见表 5。

2.4 TBI 急性期兴趣区皮层凋亡细胞数 正常对照组及各组健侧兴趣区皮层几乎见不到凋亡细胞;虽然 TBI 组和胰岛素治疗组伤侧兴趣区皮层细胞凋亡数均明显多于正常对照组,但 TBI 组伤后各时间点细胞凋亡数明显多于胰岛素治疗组,见表 6。

表 1 大鼠 TBI 后各时间点血糖值($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

组别	<i>n</i>	正常	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	5	4.51±0.47	4.54±0.43	4.47±0.45	4.60±0.33	4.53±0.38
TBI 组	5	4.53±0.31	5.23±0.40*#	5.78±0.44*#	5.40±0.34*#	4.94±0.42*#
胰岛素治疗组	5	4.50±0.44	4.50±0.35	4.40±0.40	4.52±0.27	4.60±0.36

注:与正常对照组比较,**P* < 0.05;与胰岛素治疗组比较,#*P* < 0.05

表 2 TBI 后各时间点兴趣区皮层 XIAP mRNA 表达($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)

组别	<i>n</i>	正常	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	5	0.57±0.03	0.54±0.03	0.55±0.04	0.60±0.05	0.57±0.04
TBI 组	5	0.55±0.02	0.42±0.03* [#]	0.36±0.02* [#]	0.25±0.01* [#]	0.34±0.02* [#]
胰岛素治疗组	5	0.55±0.03	0.50±0.03 [△]	0.42±0.01 [△]	0.32±0.02 [△]	0.41±0.03 [△]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与胰岛素治疗组比较,[#] $P<0.05$;与正常对照组比较,[△] $P<0.05$

表 3 TBI 后各时间点兴趣区皮层 SMAC mRNA 表达($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)

组别	<i>n</i>	正常	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	5	0.53±0.04	0.50±0.03	0.55±0.03	0.60±0.04	0.55±0.03
TBI 组	5	0.51±0.03	0.65±0.04* [#]	0.78±0.04* [#]	0.89±0.04* [#]	0.75±0.04* [#]
胰岛素治疗组	5	0.55±0.03	0.60±0.03 [△]	0.65±0.03 [△]	0.77±0.03 [△]	0.62±0.03 [△]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与胰岛素治疗组比较,[#] $P<0.05$;与正常对照组比较,[△] $P<0.05$

表 4 TBI 后各时间点兴趣区皮层 XIAP 蛋白表达($\bar{x}\pm s, OD$)

组别	<i>n</i>	正常	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	5	0.49±0.02	0.50±0.01	0.49±0.01	0.48±0.01	0.48±0.01
TBI 组	5	0.47±0.01	0.41±0.01* [#]	0.35±0.01* [#]	0.30±0.01* [#]	0.37±0.01* [#]
胰岛素治疗组	5	0.50±0.02	0.45±0.01 [△]	0.40±0.01 [△]	0.34±0.01 [△]	0.42±0.02 [△]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与胰岛素治疗组比较,[#] $P<0.05$;与正常对照组比较,[△] $P<0.05$

表 5 TBI 后各时间点兴趣区皮层 SMAC 蛋白表达($\bar{x}\pm s, OD$)

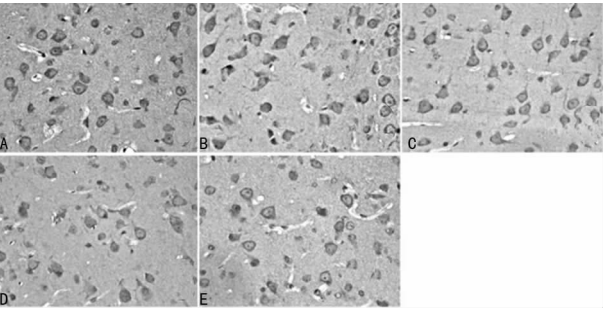
组别	<i>n</i>	正常	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	5	0.10±0.01	0.09±0.01	0.10±0.01	0.11±0.01	0.10±0.01
TBI 组	5	0.09±0.01	0.15±0.01* [#]	0.28±0.02* [#]	0.34±0.02* [#]	0.26±0.01* [#]
胰岛素治疗组	5	0.10±0.01	0.12±0.01 [△]	0.21±0.01 [△]	0.27±0.01 [△]	0.20±0.02 [△]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与胰岛素治疗组比较,[#] $P<0.05$;与正常对照组比较,[△] $P<0.05$

表 6 大鼠 TBI 后各时间点伤侧兴趣区皮层凋亡细胞数($\bar{x}\pm s$)

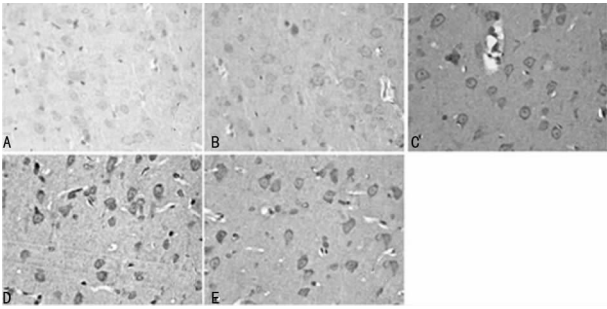
组别	<i>n</i>	正常	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	5	0.05±0.01	0.05±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01
TBI 组	5	0.04±0.01	18.23±4.60* [#]	36.78±9.47* [#]	49.40±14.14* [#]	38.94±9.26* [#]
胰岛素治疗组	5	0.04±0.01	10.50±3.54 [△]	27.45±8.40 [△]	34.52±12.07 [△]	29.60±9.62 [△]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与胰岛素治疗组比较,[#] $P<0.05$;与正常对照组比较,[△] $P<0.05$



注:A 为正常,B~F 依次为伤后 12、24、48、72 h

图 1 TBI 组大鼠 TBI 后损伤侧皮层 XIAP 表达 (SABC,×400)



注:A 为正常,B~F 依次为伤后 12、24、48、72 h

图 2 TBI 组大鼠 TBI 后损伤侧皮层 SMAC 表达 (SABC,×400)

2.5 相关性分析 XIAP 与 SMAC 表达呈负相关($r=-0.901, P<0.05$);XIAP 表达与细胞凋亡呈负相关($r=-0.894, P<0.05$);SMAC 与细胞凋亡呈正相关($r=0.914, P<0.05$)。

3 讨 论

TBI 是神经外科常见病,具有较高的病死率及致残率^[11]。TBI 后致残程度主要与原发性脑损伤的程度相关,近年来研究显示,TBI 后细胞凋亡是脑损伤

后神经功能缺失的重要原因之一^[12]。

细胞凋亡是内外源信号共同作用下激活死亡途径,并在特定基因调控下发生的程序性死亡过程。目前主要发现了 Caspase 介导的死亡受体(外源性)和线粒体依赖性(内源性)两条细胞凋亡途径,内外细胞凋亡途径最终都需激活的 Caspase 参与,各种 Caspase 如同凝血因子一样“瀑布式”层层激活,最终引发细胞凋亡。Caspase-3 是 Caspase 家族中重要一员,是 Caspase 级联反应中的关键效应酶,负责凋亡途径最后执行阶段的全部或部分关键性蛋白的酶切过程,对细胞凋亡常常起到核心的作用,常被称为凋亡的“执行者”^[13]。现已证实,脑细胞的凋亡主要通过线粒体依赖性途径进行^[14]。SMAC 是 Caspase 的第 2 个线粒体激活因子,是 2000 年发现的一种新型线粒体蛋白质,它可通过阻滞凋亡抑制蛋白(IAP),激活 Caspase-9 和 Caspase-3 而发挥促凋亡作用。XIAP 是哺乳动物体内唯一的内源性凋亡抑制蛋白,是凋亡抑制基因中最有效的 Caspase 抑制剂,其表达上调可以明显抑制 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9 的活性^[15]。近年来研究显示,中重性 TBI 后高血糖会明显增加伤侧皮层脑细胞的凋亡,但其具体机制仍不明确^[11]。本文检测了线粒体凋亡途径中主要的凋亡相关蛋白 SMAC 及 XIAP 表达的变化,从细胞凋亡的角度探讨 TBI 后高血糖对脑损伤的可能机制。

本研究资料表明,正常对照组各时间点血糖变化不明显,TBI 组伤后血糖明显升高,说明 TBI 是导致血糖升高的直接原因。TBI 组伤后会出现 XIAP 表达下调和 SMAC 表达的上调,且 XIAP 与 SMAC 表达呈负相关;XIAP 表达与细胞凋亡呈负相关;SMAC 与细胞凋亡呈正相关;胰岛素降低 TBI 后高血糖后,皮层脑组织 XIAP 表达明显增加,SMAC 表达明显减少,细胞凋亡数亦明显减少。以上结果说明 XIAP、SMAC 表达变化在 TBI 后细胞凋亡发生、发展过程中具有重要作用,同时也提示 TBI 后 SMAC 表达可能对 XIAP 的表达具有负反馈调节作用,SMAC 表达增加导致 XIAP 表达减少。胰岛素控制 TBI 后高血糖能增加脑组织 XIAP 的表达,减少 SMAC 表达,减少伤后细胞凋亡数,说明 TBI 后高血糖增加脑损伤(细胞凋亡)与其降低伤后 XIAP 的表达,增加 SMAC 表达有关。与此同时,与正常对照组相比,胰岛素治疗组 XIAP 表达仍明显减少,SMAC 表达仍明显增加,说明 TBI 后 XIAP、SMAC 的表达受多种因素的影响,对这些因素的进一步探索,将是笔者下一步研究重点。

参考文献

[1] KAFAKI S B, ALAEDINI K, QORBANI A, et al. Hyperglycemia: a predictor of death in severe head injury patients[J]. Clin Med Insights Endocrinol Diabetes, 2016, 9

(9): 43-46.

[2] SHIJO K, GHAVIM S, HARRIS N G, et al. Glucose administration after traumatic brain injury exerts some benefits and no adverse effects on behavioral and histological outcomes[J]. Brain Res, 2015(1614): 94-104.

[3] ZHU C R, CHEN J J, PAN J C, et al. Therapeutic effect of intensive glycemic control therapy in patients with traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(30): e11671.

[4] XUE B, RUAN S Y, XIE P, et al. Prospective analysis of glycemic variability in patients with severe traumatic brain injury: modified Leuven's adjustment process versus conventional adjustment process[J]. J Int Med Res, 2018, 46(4): 1505-1516.

[5] 王亮, 唐文渊, 孙晓川, 等. 创伤性脑损伤急性期高血糖对葡萄糖转运蛋白 1 表达的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2010, 36(1): 30-33.

[6] 王亮, 陈亮, 杨刚, 等. 创伤性脑损伤后高血糖对脑神经元损害作用的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(9): 1327-1331.

[7] 刘媛, 王莉, 曾琳, 等. 一种改良的创伤性脑损伤模型的建立[J]. 中国临床神经外科杂志, 2008, 13(7): 416-419.

[8] UEHARA Y, NIPPER V, MCCALL A L. Chronic insulin hypoglycemia induces GLUT-3 protein in rat brain neurons[J]. Am J Physiol, 1997, 272(4 Pt 1): E716-E719.

[9] MOGLIA B B, PHELPS D S. Changes in surfactant protein A mRNA levels in a rat model of insulin-treated diabetic pregnancy[J]. Pediatr Res, 1996, 39(2): 241-247.

[10] 刘科 唐文渊. 创伤性脑损伤后动态 CT 灌注像的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 1299-1302.

[11] LAZAREV V F, DUTYSHEVA E A, KOMAROVA E Y, et al. GAPDH-targeted therapy - A new approach for secondary damage after traumatic brain injury on rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(4): 1003-1008.

[12] WANG X H, LIU Q, SHAO Z T. Deletion of JDP2 improves neurological outcomes of traumatic brain injury (TBI) in mice: Inactivation of Caspase-3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 504(4): 805-811.

[13] MEGGIATO T, CALABRESE F, DE CESARE C M, et al. C-JUN and CPP32 (caspase 3) in human pancreatic cancer: Relation to cell proliferation and death[J]. Pancreas, 2003, 26(1): 65-70.

[14] BREDESEN D. Programmed cell death mechanisms in neurological disease[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(3): 173-186.

[15] DEVERAUX Q L, LEO E, STENNICKE H R, et al. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases[J]. EMBO J, 1999, 18(19): 5242-5251.