

·论著·

重症颅脑损伤大鼠中SIRT1的表达情况及其对应激障碍的影响

刘洪涛¹, 冯守宁¹, 解寒冰¹, 杨文涛²

1. 郑州人民医院急诊科, 河南 郑州 450000

2. 开封市中心医院急诊科, 河南 开封 475000

摘要:目的 探讨基于p38分裂原激活蛋白激酶(p38MAPK)通路沉默信息调节因子相关酶1(SIRT1)表达水平在重症颅脑损伤大鼠中的变化及其对创伤后应激障碍(PTSD)的影响。方法 SD大鼠80只,留取15只作对照组,其余复制重症颅脑损伤大鼠模型。分为模型组、SIRT1过表达组、p38激动剂组。对照组仅制作假手术模型,SIRT1过表达组脑内注射过表达SIRT1慢病毒载体,p38激动剂组予以过表达SIRT1慢病毒载体+p38激动剂;模型组、对照组予以等体积生理盐水。评估各组大鼠创伤后第1、3及5天测试神经功能;高架十字迷宫实验评定创伤应激行为学;TTC法观察脑梗死面积;Western blotting检测梗死侧脑皮质中SIRT1、p38、p-p38蛋白的表达情况。结果 从模型组、p38激动剂组、SIRT1过表达组到对照组,大鼠神经功能评分逐渐降低($P<0.05$),进入开臂(和闭臂)次数逐渐增多,在开臂(和闭臂)停留时间逐渐延长($P<0.05$)。模型组、SIRT1过表达组、p38激动剂组大鼠创伤后第1、3及5天脑梗死较明显,且随时间延长而加重;与模型组比较,SIRT1过表达组、p38激动剂组有所改善。从模型组、p38激动剂组、SIRT1过表达组到对照组,大鼠脑皮质SIRT1、p-p38蛋白相对表达量逐渐升高($P<0.05$)。结论 重症颅脑损伤大鼠脑皮质SIRT1表达下调,上调SIRT1可缓解PTSD,其机制可能与抑制p38信号通路有关。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(3): 226-230]

关键词: 重症颅脑损伤; 沉默信息调节因子相关酶1; 应激障碍

中图分类号: R285.5

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.03.003

Expression of silent information regulator related enzyme 1 and its effect on stress disorder in rats with severe traumatic brain injury

LIU Hong-Tao¹, FENG Shou-Ning¹, XIE Han-Bing¹, YANG Wen-Tao²

1. Emergency department of Zhengzhou people's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China

2. Emergency department of Kaifeng Central Hospital, Kaifeng, Henan 475000, China

Abstract: **Objective** To investigate the change in the expression level of silent information regulator related enzyme 1 (SIRT1) based on the p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) signaling pathway in rats with severe traumatic brain injury and its effect on post-traumatic stress disorder (PTSD). **Methods** A total of 80 Sprague-Dawley rats were selected, among which 15 rats were established as control group and the rest of the rats were used to establish a rat model of severe traumatic brain injury and were then divided into model group, SIRT1 overexpression group, and p38 agonist group. The rats in the control group were given sham operation model, those in the SIRT1 overexpression group were given intracerebral injection of SIRT1 overexpression lentiviral vector, and those in the p38 agonist group were given SIRT1 overexpression lentiviral vector+p38 agonist; the rats in the model group and the control group were given an equal volume of normal saline. Neurological function was evaluated on days 1, 3, and 5 after trauma; the elevated plus maze test was used to evaluate post-traumatic stress behavior; the TTC method was used to observe the area of cerebral infarction; Western blotting was used to

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20191175)

收稿日期: 2020-12-16; 修回日期: 2021-03-12

作者简介: 刘洪涛(1970-), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向为外科感染、急腹症、多发创伤, Email: na7985na@163.com。

measure the protein expression of SIRT1, p38, and p-p38 in the cerebral cortex at the ipsilateral side. **Results** Neurological score gradually decreased from the model group to the p38 agonist group, the SIRT1 overexpression group, and the control group ($P < 0.05$), with gradual increases in the number of times of entering open arm (and closed arm) and the time spent in open arm (and closed arm) ($P < 0.05$). The model group, the SIRT1 overexpression group, and the p38 agonist group had marked cerebral infarction on days 1, 3, and 5 after trauma, which aggravated over time, and the SIRT1 overexpression group and the p38 agonist group had certain improvement compared with the model group. The relative protein expression of SIRT1 and p-p38 gradually increased from the model group to the p38 agonist group, the SIRT1 overexpression group, and the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of SIRT1 is downregulated in the cerebral cortex of rats with severe traumatic brain injury, and upregulation of SIRT1 can alleviate PTSD, possibly by inhibiting the p38 signaling pathway. [Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(3): 226-230]

Keywords: severe traumatic brain injury; silent information regulator related enzyme 1; stress disorder

重型颅脑损伤是一种因坠楼、交通事故等暴力作用引起的重度颅脑组织损伤,创伤后昏迷6 h以上或者再次昏迷者可参考格拉斯哥评分诊断,预后较差,伤后容易发生创伤后应激障碍(posttraumatic stress disorder, PTSD)^[1]。PTSD指的是个体遭受严重创伤或者死亡威胁引起的持续存在或延迟出现的精神障碍,基因疗法为其重要研究方向。研究发现^[2],沉默信息调节因子相关酶1(silent information regulator factor related enzymes 1, SIRT1)是依赖烟酰胺腺苷二核苷酸的一种去乙酰化酶,在脑组织表达高于其他组织器官,可通过使底物蛋白去乙酰化而调节DNA表达、细胞凋亡,参与机体多种病理、生理过程,但关于SIRT1在重型颅脑损伤组织中的表达变化及其对PTSD的影响报道少见。故本研究通过重型颅脑损伤大鼠模型,研究SIRT1表达水平变化对重型颅脑损伤及其PTSD的影响,为PTSD的临床治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 无特定病原体(SPF)级雄性SD大鼠80只。8周龄,体重(300±20)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0002。排除颅脑损伤史,适应性饲养1周。

1.1.2 药物、主要试剂和仪器 SIRT1过表达慢病毒载体GV166-SIRT1(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)、p38MAPK激动剂p79350(上海恪敏生物科技有限公司)、兔抗大鼠SIRT1、p38丝裂原活化蛋白酶(p38)、磷酸化p38丝裂原活化蛋白酶(p-p38)多抗(一抗)(上海士锋生物科技有限公司),山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记的IgG单抗(二抗)(美国Cell Signaling Technology公司),2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium Chloride, TTC)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),总RNA提取试剂盒(德国Qiagene公司)。68505系列脑立体装置(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),ABI7500 fast实时荧光定量PCR仪(美国Ambion公

司),M348496重物击打实验台(深圳市瑞沃德公司),FH-600荧光显微镜(西安华宏光电科技有限公司),XR-XG201高架十字迷宫(上海欣软信息科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型复制与分组 80只大鼠留取15只作对照组,其余65只复制大鼠重物下落致闭合性重型颅脑损伤模型^[3]:腹腔注射2%的戊巴比妥钠麻醉,将大鼠固定在脑定位仪上,标记打击位点。将大鼠置于重物打击实验台上,调节头部位置,保证重物下落位置与打击点重合。重物重300 g,下落高度3 cm,沿垂直金属杆自由下落,撞击脑部左侧颅骨打击点上塑料垫片,颅骨呈凹陷性骨折。模型复制后1 h参考神经功能缺损评分法(neurological severity scores, NSS)^[4],评分标准:自主活动程度、左前肢偏瘫、提尾时左前肢伸不直、抗侧推能力、向左倾斜度、向左环行度、对触须的反应。7个指标无异常为0分,中度异常1分,严重异常2分,总分0~14分,评分越高表示神经功能水平越低。NSS评分≥5分表示模型复制成功。54只模型复制成功大鼠,随机分为模型组、SIRT1过表达组、p38激动剂组,各18只。对照组切开头皮,去除骨窗但不致颅脑损伤,其余操作同前。

1.2.2 干预 SIRT1过表达组大鼠在建模后立即经侧脑室内注射SIRT1过表达慢病毒载体GV166-SIRT1 2 mL/kg+生理盐水1 mL/kg,侧脑室注射坐标是以前囟点为中心,旁开1.5 mm,向后囟方向1.1 mm,深4.5 mm。p38激动剂组大鼠在脑内注射SIRT1过表达慢病毒载体GV166-SIRT1 2 mL/kg+p38MAPK激动剂p79350 1 mL/kg。对照组、模型组则予以注射等体积生理盐水。坚持用药5 d,给药期间对照组死亡3只,其余三组各死亡6只。

1.2.3 神经功能评估 应用NSS评分标准检验大鼠创伤后第1、3及5天的神经功能水平变化。

1.2.4 大鼠模型复制后第5天的PTSD评估 高架十字迷宫实验装置的高度是50 cm,闭合吊臂与开放吊臂的长宽高均为110 cm×50 cm×10 cm,摄像仪安装至正上方。

大鼠最开始置于迷宫中间平台上,正面为迷宫同一个开放吊臂,观察5 min中四个行为指标,即进入开放(和闭合)吊臂总次数、在开放(和闭合)吊臂停留时间。

1.2.5 创伤后梗死面积测定 在各组大鼠创伤后第1、3及5天,分别取4只大鼠,分离大鼠脑组织,切取额端置入磷酸TTC缓冲液内,再置入37℃恒温箱内,避光孵育20 min。正常脑组织可被TTC染为红色,受损脑组织因缺血性梗死而显示白色,观察各组大鼠脑梗死面积。

1.2.6 Western blotting法检测脑皮质中SIRT1、p38、p-p38蛋白表达水平 取上述脑组织,应用放射免疫沉淀测定裂解液结合超声提取蛋白,10 min后获得总蛋白,以二喹啉甲酸法定量蛋白浓度,各组取50 μg蛋白进行SDS-PAGE电泳,转膜至聚偏氟乙烯膜,5%脱脂奶粉封闭1 h,置入相应一抗(SIRT1浓度1:200,p38浓度1:200,p-p38浓度1:200,GAPDH浓度1:200),4℃过夜,次日用HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(浓度1:1 000)在室温下孵育1 h,显色拍照,获得蛋白条带图,应用Image J软件计算其蛋白灰度值。实验重复5次。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件分析数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,如Levene检验方差齐,采用重复测量数据的方差分析,或单因素方差分析及LSD-*t*比较,不齐则改用Welch检验及Dunnett T3比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组神经功能评分变化

各组大鼠创伤后第1、3及5天的神经功能评分比较,采用重复测量数据的方差分析,结果:①不同时间点的神经功能评分有差别($F=12.262, P=0.000$)。②组间神经功能评分有差别($F=16.487, P=0.000$),模型组、SIRT1过表达组、p38激动剂组大鼠创伤后1、3及5天神经功能评分逐渐升高($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组、SIRT1过表达组、p38激动剂组大鼠神经功能评分较高($P < 0.05$);与模型组比较,SIRT1过表达组、p38激动剂组大鼠神经功能评分较低($P < 0.05$);与SIRT1过表达组比较,p38激动剂组大鼠神经功能评分较高($P < 0.05$)。③SIRT1过表达组、p38激动剂组与模型组的神经功能评分变化趋势有差别($F=10.946, P=0.000$)。见表1。

表1 各组大鼠创伤后各个时间点的神经功能评分 ($n=12$,分)

组别	第1天	第3天	第5天
对照组	1.13±0.13	1.14±0.13	1.13±0.12
模型组	9.98±1.25	11.35±1.19	12.75±1.10
SIRT1过表达组	7.14±1.11	8.81±1.13	9.44±1.28
p38激动剂组	8.59±1.19	10.01±1.31	11.02±1.33

2.2 各组大鼠PTSD行为学变化

从模型组到p38激动剂组、SIRT1过表达组、对照组,大鼠进入开臂(和闭臂)次数逐渐增多,在开臂(和闭臂)停留时间逐渐延长($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠PTSD行为学检验结果 ($n=12$)

组别	进入开臂次数/次	在开臂停留时间/s	进入闭臂次数/次	在闭臂停留时间/s
对照组	4.95±1.23	29.64±4.16	11.26±2.31	149.69±20.36
模型组	2.02±1.05 ^①	18.33±3.29 ^①	8.05±1.48 ^①	121.61±21.45 ^①
SIRT1过表达组	3.47±1.06 ^{①②}	25.28±2.97 ^{①②}	9.66±1.42 ^{①②}	142.45±14.66 ^{①②}
p38激动剂组	2.99±1.05 ^{①②③}	21.47±3.13 ^{①②③}	9.05±1.23 ^{①②③}	137.63±20.27 ^{①②③}
<i>F</i> 值	20.219	34.344	11.097	6.441
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.001

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与模型组比较, $P < 0.05$;③与SIRT1过表达组比较, $P < 0.05$

2.3 各组大鼠创伤后脑梗死面积变化

各组术后第1、3及5天分别处死4只大鼠,对照组脑组织正常,无梗死表现;模型组、SIRT1过表达组、p38激动剂组大鼠创伤后脑梗死面积较大,且随创伤时间延长而增大;与模型组比较,SIRT1过表达组、p38激动剂组脑梗死面积有所改善。见图1。

2.4 各组脑皮质SIRT1、p38、p-p38蛋白表达

从模型组到p38激动剂组、SIRT1过表达组、对照组,大鼠脑皮质SIRT1、p-p38蛋白相对表达量逐渐升高($P < 0.05$)。见表3、图2。

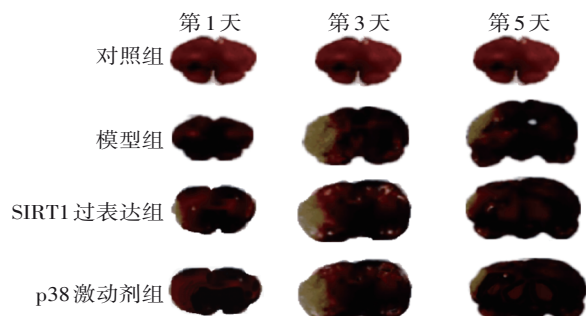


图1 各组大鼠创伤后脑梗死面积(TTC,×200)

表3 各组大鼠脑皮质神经元中SIRT1、p38、p-p38蛋白相对表达量

组别	SIRT1	p38	p-p38
对照组	0.90±0.10	0.97±0.11	0.14±0.03
模型组	0.18±0.09 ^①	0.98±0.13	0.70±0.05 ^①
SIRT1过表达组	0.61±0.10 ^{①②}	1.01±0.14	0.41±0.04 ^{①②}
p38激动剂组	0.43±0.08 ^{①②③}	0.92±0.12	0.55±0.03 ^{①②③}
F值	64.333	0.889	192.316
P值	0.000	0.456	0.000

注:①与对照组比较, $P<0.05$;②与模型组比较, $P<0.05$;③与SIRT1过表达组比较, $P<0.05$

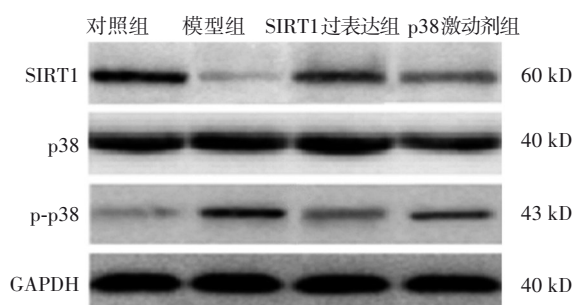


图2 各组大鼠脑皮质神经元中SIRT1、p38、p-p38蛋白Western blotting电泳图

3 讨论

重型颅脑损伤患者由于脑部遭受外力产生脑组织挫伤、颅内血肿,引起脑组织缺氧缺血,并在进展过程中继发PTSD^[5]。炎症反应在颅脑损伤病理发展过程起重要作用,炎症介质受SIRT家族的去乙酰化酶活性调控,因而SIRT家族可能与重型颅脑损伤存在关系^[6-7]。SIRT1作为目前研究最多的SIRT家族成员之一,引起了相关医学研究人员的关注,笔者认为SIRT1表达水平可能对重型颅脑损伤程度以及预后有一定影响,但具体影响机制尚不清楚。

SIRT1是一个与细胞分化、凋亡、能量代谢均密切相关的组蛋白去乙酰化酶,最早在神经元细胞核内被发现,随后被证明在皮质、海马、小脑、下丘脑等神经组织内亦有广泛表达^[8]。SIRT1属于双向调节蛋白,有神经保护作用,用白藜芦醇保护大鼠脑组织缺血性损伤过程中,上调SIRT1表达水平,可发挥神经保护作用,且可能是通过介导功能蛋白去乙酰化而实现的,比如p38蛋白等^[9]。本研究表明,与模型组比较,SIRT1过表达组创伤后第1、3及5天的神经功能评分较低,创伤后第1、3及5天脑梗死面积明显较小,提示SIRT1过表达可减轻重型颅脑损伤大鼠神经功能,减轻脑梗死。PTSD最核心症状是持续性回避行为,可能与脑内核团的某些神经环路相关,动物实验证明^[10],作用在杏仁核上的强烈刺激可影响海马功能,海马功能与脑区存在广泛纤维联系,将各种传入感觉信息整合成有条理信息后返回皮质,改变行为学。与模

型组比较,SIRT1过表达组大鼠脑皮质SIRT1表达上调,同时SIRT1过表达组进入开臂(和闭臂)次数均较多、在开臂(和闭臂)停留时间均较长,提示SIRT1过表达可改善大鼠行为学,减轻PTSD,原因可能为上调大鼠脑皮质上SIRT1表达,减轻了海马功能损伤,从而改善PTSD。

p38MAPK为p38MAPK信号通道的枢纽,受理化生物因素等刺激时会发生络氨酸磷酸化反应,激活下游信号分子,启动相应炎症因子的基因表达^[11-12],可知p38MAPK信号传导通道参与细胞凋亡、炎症发作等应激反应过程,张瑶等^[13]报道p38MAPK可经多种途径控制凋亡,故与创伤后细胞凋亡也存在关系。LI等发现^[14],p38MAPK信号通道与重型颅脑损伤存在密切关系,其在颅脑创伤后炎症反应过程中扮演着重要角色,是应激反应通路之一,可被外部刺激、细胞内刺激激活。活化p38MAPK进入细胞核后,可诱发细胞出现炎症反应或免疫反应,甚至促使细胞凋亡。重型颅脑损伤后激活p38MAPK信号通道,导致氧化应激增强,神经细胞凋亡。大鼠脑皮质上过表达的SIRT1可利用组蛋白脱乙酰基作用,发挥抗氧化应激、抗凋亡作用。从模型组到p38激动剂组、SIRT1过表达组、对照组,大鼠脑皮质SIRT1、p-p38蛋白相对表达量逐渐升高,提示p38MAPK信号通道在重型颅脑损伤中被激活,应用p38抑制剂可抑制SIRT1表达,在减轻重型颅脑损伤后氧化应激、减少神经细胞凋亡过程发挥了反向作用,最终加重了神经功能缺损、增加了脑梗死面积、加剧了PTSD。

重症颅脑损伤大鼠脑皮质SIRT1异常低表达,上调SIRT1可缓解PTSD,其机制可能与p38信号通路激活有关,为临床治疗重型颅脑损伤提供可能潜在靶点。

参 考 文 献

- [1] MENG EP, DUAN Y, WANG XJ. Therapeutic mechanism of intracranial infection in patients with hydrocephalus after craniocerebral injury based on decompressive craniectomy[J]. Saudi J Biol Sci, 2020, 27(3): 873-880.
- [2] SUBBARAMAIAH K, IYENGAR NM, MORROW M, et al. Prostaglandin E₂ down-regulates sirtuin 1 (SIRT1), leading to elevated levels of aromatase, providing insights into the obesity-breast cancer connection[J]. J Biol Chem, 2019, 294(1): 361-371.
- [3] 刘鑫杰, 潘宇政, 黄宗轩, 等. 甘草酸二铵通过Wnt/β-连接蛋白信号通路促进重型颅脑损伤大鼠中枢神经再生修复[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(12): 1451-1456.
- [4] 王景博, 韦春珠, 潘茂华, 等. 活血化痰方剂对重型颅脑损伤大鼠Wnt/β-连环蛋白信号通路表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(9): 1101-1106.
- [5] JUNG JS, KHO AR, LEE SH, et al. Changes in plasma lipoxin A4, resolvins and CD59 levels after ischemic and traumatic brain injuries in rats[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2020, 24(2): 165-171.

- [6] 王文宏, 孔君, 林小祥, 等. bFGF对颅脑损伤大鼠脑水肿、神经功能损伤及自噬相关蛋白表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(2): 320-325.
- [7] NG SY, LEE AYW. Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 528.
- [8] PAUDEL YN, ANGELOPOULOU E, PIPERI C, et al. HMGB1-mediated neuroinflammatory responses in brain injuries: potential mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4609.
- [9] REN MT, GU ML, ZHOU XX, et al. Sirtuin 1 alleviates endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of intestinal epithelial cells in ulcerative colitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(38): 5800-5813.
- [10] 李传文, 张嵘, 侯亮, 等. SIRT1/NF- κ B通路参与白藜芦醇改善大鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(1): 6-9.
- [11] SYDNOR VJ, BOUIX S, PASTERNAK O, et al. Mild traumatic brain injury impacts associations between limbic system microstructure and post-traumatic stress disorder symptomatology[J]. *Neuroimage Clin*, 2020, 26: 102190.
- [12] LIN RC, YANG SF, CHIOU HL, et al. Licochalcone A-induced apoptosis through the activation of p38MAPK pathway mediated mitochondrial pathways of apoptosis in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1441.
- [13] 张瑶, 谢家钊, 胡军, 等. 利拉鲁肽通过p38 MAPK通路改善高同型半胱氨酸血症诱导的大鼠海马氧化应激及炎症损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(11): 2025-2030.
- [14] LI L, LI Y, MIAO C, et al. Coriolus versicolor polysaccharides (CVP) regulates neuronal apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury via the p38MAPK signaling pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(18): 1168.

责任编辑:王荣兵