

网络出版时间: 2021-9-7 15:01 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1405.027.html>

控制减压技术影响兔重型颅脑损伤后 NDRG2 表达机制

潘晓飞¹, 曹鑫意¹, 张崇辉¹, 何建青², 陈军辉², 王玉海¹

摘要 选取 30 只健康成年的新西兰大白兔, 随机均分为快速减压组、控制减压组、假手术组。术后 24 h 评价各组动物行为学评分, 检测脑组织含水量、N-myc 下游调节基因 2 (NDRG2)、Caspase-3 表达水平以及脑细胞凋亡情况。与假手术组相比, 控制减压组和快速减压组中动物学评分、脑组织含水量、Caspase-3 的表达水平增加以及脑细胞凋亡程度增加, 但 NDRG2 的表达水平降低; 与快速减压组相比, 控制减压组中动物行为学评分、脑组织含水量、Caspase-3 表达水平以及脑细胞凋亡程度降低, 但 NDRG2 的表达水平增加。

控制减压技术通过增加 NDRG2 的表达减轻了脑水肿程度, 抑制了脑细胞凋亡程度, 从而减轻了脑缺血再灌注的损伤程度, 改善脑损伤预后。

关键词 NDRG2; 颅脑控制减压技术; 创伤性脑损伤; 缺血再灌注损伤

中图分类号 R 651.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)11-1824-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.029

2021-06-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81871589)

作者单位: ¹ 安徽医科大学无锡临床学院神经外科, 无锡 214000

² 中国人民解放军联勤保障部队第 904 医院神经外科, 无锡 214000

作者简介: 潘晓飞, 男, 硕士研究生;

王玉海, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wangyu-hai67@126.com

创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI) 因其较高的致死、致残率已经成为全球公认的健康问题^[1]。Wang et al^[2] 通过多年临床实际操作提出了控制减压技术可以有效降低术中急性脑膨出的发生率, 通过复查患者术后头颅 CT 发现缺血梗死灶面积也有所减少, 可能是因为控制减压技术减轻了脑组织缺血再灌注损伤从而改善患者预后。但是控制减压技术是如何减少脑缺血再灌注损伤的深层机制

物敏感性和耐药基因研究[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(8): 1231-5.

[13] Oviano M, Ramirez C L, Barbeyto L P, et al. Rapid direct detec-

tion of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(5): 1350-4.

Rapid detection of ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* by MALDI-TOF mass spectrometry

Wang Gang, Song Guobin, Huang Ying, et al

(Dept of Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Fifty-four extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) producing strains of *Klebsiella pneumoniae* and 24 cephalosporins-sensitive strains were randomly collected. The mass peaks of hydrolyzed antibiotics were detected by MALDI-TOF MS after co-incubation with a certain concentration of antibiotics. The hydrolysis assay of cefotaxime and ceftriaxone was able to identify ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* after co-incubation for 1 h and 2 h respectively. Compared with genotype detection of ESBLs, the specificity was 100% and the sensitivity was 96.3%. MALDI-TOF MS can quickly and accurately identify pathogens in clinical practice, which has great potential in the detection of bacterial resistance. The antibiotic hydrolysis assay based on MALDI-TOF MS can detect ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* within few hours.

Key words *Klebsiella pneumoniae*; extended-spectrum β -lactamases; matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry

目前尚不清楚。NDRG2 是一种脑保护蛋白,可以抑制核转录因子- κ B 蛋白(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号传导通路的激活,从而阻断 NF- κ B 信号通路活化引起的缺血再灌注损伤,减轻炎症反应、降低细胞凋亡以及减少自由基的产生,保护脑组织的缺血再灌注损伤。该研究首次观察 NDRG2 在控制减压模型中的表达变化,为临床上治疗创伤性脑损伤疾病提供新的思路与方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年新西兰大白兔 30 只,体质量 3~4 kg,购自江苏振林生物有限公司。

1.1.2 试剂 兔抗大白兔 NDRG2 抗体和兔抗大白兔 Caspase-3 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,兔抗大白兔 β -actin 抗体购自美国 Abcam 公司,TRIzol 柱纯化总 RNA 试剂盒及 Fast 1st strand cDNA Synthesis Kit 购自杭州可帮基因科技有限公司,TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 CST 公司,RIPA 裂解缓冲液购自美国 CST 公司,过硫酸铵(ammonium persulfate, APS)和十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)溶液购自上海西格玛奥德里奇公司。

1.1.3 仪器 牙科磨钻、压力输液泵以及儿童型球囊导管购自佛山医港医疗器械有限公司,颅内压监测仪购自美国强生 Codman,颅内压探头购自杭州沃克公司,ABI PRISM[®] 7500 荧光 PCR 仪购自美国 ABI 公司,Western blot 蛋白电泳仪购自美国伯乐公司,离心机购自赛默飞世尔公司。

1.2 实验分组和模型制作 健康成年新西兰大白兔随机分成 3 组,分别是控制减压组、快速减压组、假手术组,每组各 10 只。每组兔子均适应实验中心环境若干天,术前禁食水 12 h。每组兔耳缘静脉注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,达到合适麻醉深度后固定在动物实验手术台上,备皮;沿矢状缝切开 3~5 cm,依次分离头皮、帽状腱膜直到充分暴露颅骨,然后用牙科磨钻在冠状缝后方 0.5 cm,矢状缝左右两侧 0.5 cm 分别钻取直径 0.5 cm 大小的骨孔,注意钻孔时保护硬脑膜的完整性;于左侧骨孔内置入颅内压探头插入脑实质,深度 0.5~1 cm,记录初始颅内压,右侧骨孔硬脑膜外放置球囊导管,注意放置的角度与深度,防止人为造成硬脑膜破裂和脑出血干扰实验,随后左右两个骨孔用牙科水泥封闭。

① 快速减压组:球囊连接压力输液泵,缓慢向球囊内注入生理盐水,待颅内压检测仪颅内压(intracranial pressure, ICP)显示到 36 mmH₂O 后停止注入,保持该压力 30 min 后迅速将输液泵回抽至初始颅内压;② 控制减压组:同理将 ICP 升至 36 mmH₂O 后保持 30 min,保持匀速缓慢回抽输液泵里生理盐水,使 ICP 按照一定的下降梯度恢复至初始颅内压(若出现颅内压波动,可通过控制压力输液泵来调节 ICP);③ 假手术组:球囊连接压力输液泵后,不注入生理盐水,用牙科水泥封闭骨孔后保持 30 min;待球囊液体抽尽后,取出探头和球囊导管并用牙科水泥封闭骨孔,逐渐缝合各层组织及头皮。待麻醉恢复后放入兔笼中,备好饲料和水,观察 24 h。术后 24 h 评价各组动物的意识状态和行为学评分,取皮层脑组织和海马组织放入固定液中用于实验指标的检测。

1.3 动物行为学评分 ① 食欲:1 分,吃完;2 分,吃一部分;3 分,几乎不吃。② 活动:1 分,正常活动;2 分,受到一些刺激后活动;3 分,受到刺激后不活动或轻微肢体收缩。③ 功能障碍:1 分,无功能障碍;2 分,因功能障碍不能走动;3 分,因功能障碍不能站立。

1.4 脑组织含水量测定 动物腹腔注入 10% 水合氯醛直至死亡,迅速提取脑皮层球囊压迫部位组织,用薄层刀片取样后称湿重,再将脑组织放入干燥箱中 70 °C 烘烤 24 h 后,再称干重。按干湿重法测定脑水含量,以脑水含量代表脑水肿的严重程度。计算公式: [(湿重 - 干重) / 湿重] × 100%。

1.5 Western blot 法检测 NDRG2 和 Caspase-3 蛋白的表达 取实验样本,加 RIPA 蛋白裂解液,裂解液中已经加入 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF),广谱蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂进行超声匀浆,直至肉眼看不出样本组织为宜。然后,将样本在 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,再用 BCA 蛋白测定试剂盒进行蛋白定量,并制备具有相同浓度的蛋白质上样缓冲液,上样,电泳,转膜。再用 5% 的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液封闭,将膜完全浸没 5% BSA-TBST 中常温轻摇 1 h,切割靶带并与一抗 NDRG2 (1 : 4 000 稀释)、Caspase-3 (1 : 10 000 稀释)在 4 °C 摇床过夜,待复温后将靶带与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1 : 10 000 稀释)孵育 1 h,后加入配置好的 ECL 发光液进行曝光,获得图像得出结果。

1.6 RT-PCR 法检测 NDRG2 mRNA 表达 通过

基因文库查找 NDRG2 基因序列,设计引物序列, NDRG2 基因上游引物为: 5'-CTCAGTGGAGACGCCG TATGGC-3', 下游引物为: 5'-CTGAAACAGTGGCTG-GAAGCAA-3' 理论上扩增长度至 600 bp 长度。内参照 β -actin 基因上游引物为: 5'-AGAGCAC-CAGAGGAGGACC-3', 下游引物为: 5'-TGGGATG-GAAACTGTGAAGAG-3' 扩增长度至 500 bp, 由无锡金普赛生物科技有限公司合成。用 TRIzol 试剂盒提取 RNA。PCR 反应实验条件如下: 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 33 s, 延伸 95 °C 15 s, 重复 40 个循环; 内参照 β -actin 基因同上。观察并记录反应结果。

1.7 TUNEL 染色法检测细胞凋亡情况 取脑组织切片常规脱蜡入水, 然后将切片迅速加入 90 °C 200 ml 的 0.01 mol/L、pH 6.0 的柠檬酸缓冲液中, 微波照射 1 min 后加入双蒸水 80 ml 冷却, 再移至 PBS 接下来 PBS 洗 5 min \times 3 次, 再加 20% 正常牛血清室温 30 min。然后将 TUNEL 反应混合液加在切片上, 常温培育 90 min, 后 PBS 洗 5 min \times 3 次, 再用 3% H_2O_2 甲醇常温阻断 10 min, 加入 POD 转化剂 30 min, PBS 漂洗 3 次, 加入 DAB/ H_2O_2 显色, 苏木精淡染, 光学显微镜摄像, 保存图片作对比。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组之间差异比较通过单向方差分析 (ANOVA) 和 Turkey 分析进行评估。检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 24 h 后动物行为学评分 严格按照上述评分标准进行评估, 得出控制减压组评分为 4.50 ± 0.60 , 快速减压组为 7.10 ± 0.52 , 假手术组为 3.30 ± 0.34 。与假手术组相比, 快速减压组和控制减压组的行为学评分升高 ($F = 46.728, P < 0.001$)。假手术组在饮食、活动、功能障碍、接受刺激等方面表现优于其他两组; 控制减压组评分低于快速减压组 ($F = 32.247, P < 0.05$)。总体评价控制减压组动物的症状较快速减压组减轻, 饮食、活动、功能障碍等方面有所好转。

2.2 脑组织含水量比较 控制减压组脑组织含水量为 $(80.33 \pm 1.31)\%$, 快速减压组为 $(83.52 \pm 1.5)\%$, 假手术组为 $(75.32 \pm 3.54)\%$ 。假手术组的脑组织含水量明显少于其他两组 ($F = 18.792, P < 0.05$)。说明控制减压组和快速减压组的脑水肿

程度较假手术组严重; 控制减压组脑组织水含量小于快速减压组, 说明控制减压组的脑水肿程度较轻, 而快速减压组的脑水肿程度较重。

2.3 控制减压模型治疗后 NDRG2 和 Caspase-3 的蛋白变化 与控制减压组相比, 快速减压组术后 24 h 的 NDRG2 蛋白表达量降低, 但假手术组 NDRG2 的表达量升高; 与控制减压组相比, 快速减压组术后 24 h 的 Caspase-3 蛋白表达量升高, 但假手术组中 Caspase-3 蛋白表达量降低。见图 1。

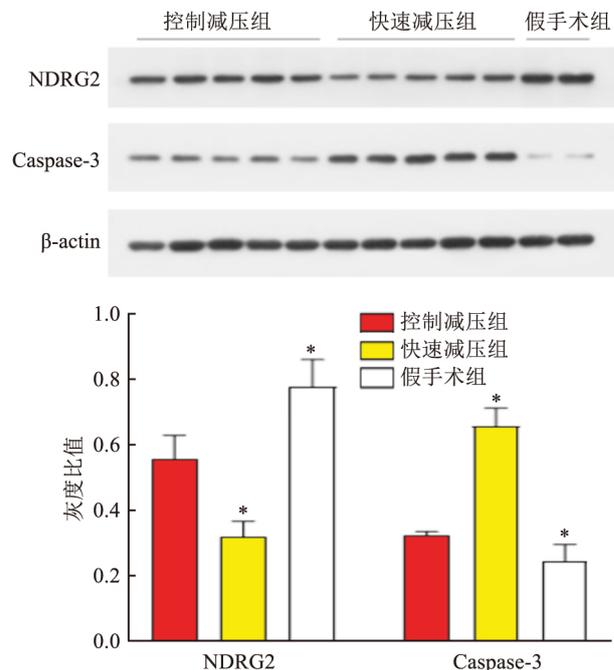


图1 不同组别中 NDRG2 和 Caspase-3 蛋白含量
与控制减压组比较: * $P < 0.05$

2.4 控制减压模型治疗后 NDRG2 mRNA 变化 三组间 mRNA 表达存在差异。与控制减压组相比, 快速减压组术后 24 h 的 NDRG2 mRNA 表达量降低, 但假手术组 NDRG2 mRNA 的表达量升高。见图 2。

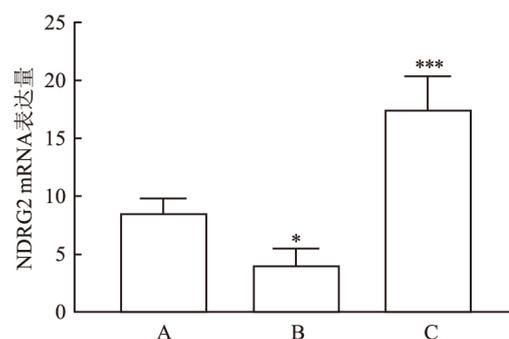


图2 各组中 NDRG2 mRNA 相对表达量
A: 控制减压组; B: 快速减压组; C: 假手术组; 与控制减压组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.5 控制减压模型治疗后脑细胞凋亡程度比较
TUNEL 染色结果显示,假手术组中的绿色凋亡细胞几乎不存在;控制减压组中的绿色凋亡细胞较快速减压组中减少,蓝色正常神经元细胞增多。见图 3。

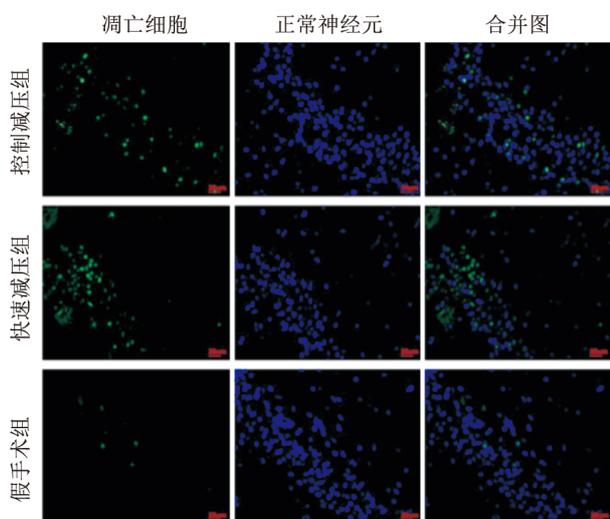


图3 术后 24 h 家兔海马组织 TUNEL 染色结果 $\times 400$
绿色: 凋亡细胞; 蓝色: 正常神经元细胞

3 讨论

创伤性脑损伤是外伤中最严重的一类,一直是神经外科研究的重点。随着对脑外伤机制的深入研究,人们认识到威胁患者生命和健康的不仅是原发性的损伤,继发性脑损伤也是导致预后不良的重要因素。与单纯颅脑外伤相比,合并继发性脑损伤的患者预后更差。其中脑缺血是继发性脑损伤的重要病理生理基础,因此抑制创伤后脑缺血性损害也成为改善疾病预后的关键举措之一。控制减压技术通过人为的控制颅内压的变化来逐渐增加缺血区的血流灌注,使逐步灌注的血流与受损的神经功能相适应,从而减少了再灌注损伤。国外的研究^[3]也说明了低流量灌注缺血后的器官可以明显改善再灌注损伤。传统的大骨瓣减压术使颅内压快速降低,血流大量灌注于缺血区,很大程度上会产生缺血再灌注损伤,这种损伤产生可能是破坏了脑兴奋性和抑制性的平衡导致的,使得兴奋性升高,神经元死亡。如何避免缺血再灌注损伤发生的机制是临床上研究的重点。

NDRG2 是 N-myc 下游调节基因家族的一员,在脑组织内表达丰富,参与细胞增殖、分化、凋亡等重要过程^[4]。它被视为体内的一种保护因子,起着抑制肿瘤细胞增殖生长的关键作用,当肿瘤发生时,

NDRG2 的表达量明显降低或几乎检测不到^[5]。当然,NDRG2 在机体缺血再灌注损伤中同样也起到生物保护作用。孙中婵等^[6]在研究大鼠心肌缺血再灌注损伤中发现,缺血再灌注后 NDRG2 的表达降低,并且在灌注后 24 h 达到最低值。此后,Kumar et al^[7]研究心脏缺血再灌注损伤小鼠发现,NDRG2 蛋白在再灌注开始 5 min 时高表达,说明 NDRG2 蛋白与早期心脏缺血再灌注有着十分密切的关联。Sun et al^[8]发现胰岛素可以通过上调心肌 NDRG2 磷酸化和 AKt 水平抑制心肌缺血再灌注损伤,减少细胞凋亡及梗死面积;与此同时,用 shRNA 转导心肌细胞下调 NDRG2 表达,明显加重了心肌缺血再灌注损伤程度。当然,也有学者证实 NDRG2 参与了脑缺血再灌注损伤过程^[9]。Li et al^[10]发现灌注后缺血半暗带中的 NDRG2 表达增加,在再灌注后 4 h 开始增加,24 h 后达到高峰;并且在星形胶质细胞中 NDRG2 信号从细胞质易位到细胞核发生在再灌注发生的 24 h 以后,通过 NDRG2 表达量与 TUNEL 染色结果推测 NDRG2 的表达可能参与脑缺血后产生的细胞凋亡。

此外,很多研究^[11]也表明 NDRG2 与 NF- κ B 信号通路之间存在密切联系,比如在肿瘤细胞中 NDRG2 的过表达会降低 NF- κ B 的活性,通过降低 I κ B α / β 复合体磷酸化来阻断 I κ B α 磷酸化和 p65 从胞质向胞核的移位,进一步降低 NF- κ B 的表达。另外,杨波等^[12]发现在肠缺血再灌注肺损伤中发现 NDRG2 的表达和 NF- κ B 呈负相关,NDRG2 的表达抑制了 NF- κ B 介导的凋亡和炎症反应,减轻了缺血再灌注损伤。此外,microRNA-486 通过靶向 NDRG2 使 NF- κ B 和 JNK/C-Jun 信号通路失活来减轻心肌缺血再灌注损伤^[13]。Li et al^[14]在睾丸间质细胞中发现 NF- κ B 信号传导通路受到 NDRG2 的调控并且共同参与细胞凋亡途径。

本实验建立兔脑急性颅高压模型,探究控制减压基础机制。结果显示与快速减压组相比,NDRG2 在控制减压组中的表达增加,Caspase-3 表达及脑细胞凋亡程度降低,推测在控制减压手术中可能增加 NDRG2 的表达来有效抑制脑细胞凋亡作用,减少缺血再灌注损伤,改善预后。但本实验未能具体阐述 NDRG2 抑制脑细胞凋亡的调控机制。

参考文献

- [1] Toklu H Z, Hahan T, Biber N, et al. The protective effect of alpha lipolic acid against traumatic brain injury in rats [J]. Free Radic

- Res 2009 ,43: 658 – 67.
- [2] Wang Y , Wang C , Yang L , et al. Controlled decompression for the treatment of severe head injury: a preliminary study [J]. *Turk Neurosurg* 2014 ,24: 214 – 20.
- [3] DeCampos K N , Keshavjee S , Liu M , et al. Prevention of rapid reperfusion induced lung injury with prostaglandin E1 during the initial period of reperfusion [J]. *Heart Lung Transplant* ,1998 ,17 (11) : 1121 – 8.
- [4] Melotte V , Qu X , Ongenaert M , et al. The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions , multiple applications [J]. *FASEB* 2010 ,24: 4153 – 66.
- [5] 邓友君 ,赵 勇 ,麻方成 ,等. 抑癌基因 NDRG2 的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学* 2014 ,4(22) : 962 – 5.
- [6] 孙中婵 ,沈 岚 ,孙冬冬 ,等. NDRG2 在大鼠心肌缺血再灌注损伤中的表达 [J]. *心脏杂志* 2010 ,22(4) : 529 – 32.
- [7] Kumar V , Kleffmann T , Hampton M B , et al. Redox proteomics of thiol proteins in mouse heart during ischemia/reperfusion using ICAT reagents and mass spectrometry [J]. *Free Radical Biol Med* , 2013 ,58(2) : 109 – 17.
- [8] Sun Z , Tong G , Ma N , et al. NDRG2: a newly identified mediator of insulin cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Basic Res Cardiol* 2013 ,108(3) : 1 – 15.
- [9] 曹欢 ,史明 ,刘丽娟 ,等. NDRG2 在脑缺血再灌注大鼠室管膜下区的表达研究 [J]. *神经解剖学杂志* 2013 ,29(3) : 291 – 5.
- [10] Li Y , Shen L , Cai L , et al. Spatial-temporal expression of NDRG2 in rat brain after focal cerebral ischemia and reperfusion [J]. *Brain Res* 2011 ,13(82) : 252 – 8.
- [11] Kim A , Kim M , Yang Y , et al. Suppression of NF- κ B activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells [J]. *Carcinogenesis* ,2009 ,30(6) : 927 – 36.
- [12] 杨波 ,张志培 ,姜 鹏 ,等. N-myc 下游调节基因-2 在大鼠肠缺血再灌注肺损伤中的表达及其与 NF- κ Bp65 的相关研究 [J]. *创伤外科杂志* 2012 ,14(6) : 543 – 6.
- [13] Zhang X , Zhang C , Wang N , et al. MicroRNA-486 alleviates hypoxia-induced damage in H9c2 cells by targeting NDRG2 to inactivate JNK/C-Jun and NF- κ B signaling pathways cell [J]. *Physiol Biochem* ,2018 ,8(848) : 2483 – 92.
- [14] Li T , Hu J , He G H , et al. Up-regulation of NDRG2 through nuclear factor-kappa B is required for Leydig cell apoptosis in both human and murine infertile testes [J]. *Biochim Biophys Acta* , 2012 ,1822(2) : 301 – 13.

Controlled decompression techniques influence the expression mechanism of NDRG2 in rabbits after severe craniocerebral injury

Pan Xiaofei , Cao Xinyi , Zhang Chonghui , et al

(*Dept of Neurosurgery , Wuxi Clinical College Anhui Medical University , Wuxi 214000*)

Abstract Thirty healthy adults New Zealand white rabbit were used and randomly divided into fast decompression group , controlled decompression group , and sham group , with 10 rabbits in each group. After the operation within 24 hours , the behavioral scores from each group was evaluated , and brain water content , nuclear factor-kappa (NDRG2) , Caspase-3 expression level and the situation in brain cell apoptosis were also evaluated. Compared with the sham group , zoological score , brain tissue water content , expression of Caspase-3 and apoptosis of brain cells increased in the control decompression group and the fast decompression group , but the expression level of NDRG2 decreased. Compared with the fast decompression group , the animal behavioral score , brain tissue water content , expression of Caspase-3 and degree of brain cell apoptosis decreased in the control decompression group , but the expression level of NDRG2 increased. The controlled decompression technique can reduce the degree of brain edema and inhibit the degree of brain cell apoptosis by increasing the expression of NDRG2 , so as to reduce the degree of cerebral ischemia reperfusion injury and improve the prognosis of brain injury.

Key words NDRG2; controlled decompression; traumatic brain injury; ischemia reperfusion injury