

线粒体 Omi/HtrA2 信号通路参与人脑挫裂伤后神经细胞凋亡的研究

汤蓓 石键 周玲 沈红卫 吴慧平 胡佳元 郑绍俭

【摘要】目的 揭示人脑急性创伤性脑损伤后 Omi/HtrA2 介导的神经细胞凋亡线粒体途径的激活。**方法** 选择 100 例脑外伤开颅手术中获得的脑挫裂伤脑组织作为外伤组,另外选择 100 例脑出血患者手术径路中获得的正常脑组织作为对照组,采用流式细胞仪检测神经细胞凋亡,采用 Western-blot 检测 Omi/HtrA2、X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切聚腺苷二磷酸-核糖多聚酶(PARP)表达,采用四肽荧光底物法检测 caspase 3 和 caspase 9 活性。**结果** 外伤组脑组织凋亡神经细胞比例、Omi/HtrA2、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切 PARP 表达及 caspase 3 和 caspase 9 活性较对照组显著升高(均 $P<0.01$),外伤组脑组织 XIAP 表达较对照组显著下降($P<0.01$)。外伤组脑组织 Omi/HtrA2 表达与凋亡神经细胞比率、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切 PARP 表达及 caspase 3 和 caspase 9 活性呈显著正相关(均 $P<0.01$),与 XIAP 表达呈显著负相关($P<0.01$);外伤组脑组织 XIAP 表达与凋亡神经细胞比率、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切 PARP 表达及 caspase 3 和 caspase 9 活性呈显著负相关(均 $P<0.01$)。**结论** Omi/HtrA2 介导的线粒体途径可能参与人急性创伤性脑损伤后神经细胞凋亡过程。

【关键词】 人类 创伤性脑损伤 神经细胞凋亡 Omi/HtrA2

Mitochondrial Omi / HtrA2 signaling pathway involved in neuronal apoptosis after cerebral contusion and laceration TANG Bei, SHI Jian, ZHOU Ling, et al. Department of Intensive Care Unit, Jiande First People's Hospital, Jiande 311600, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of Omi/HtrA2 mediated mitochondrial signaling pathway in neuronal apoptosis after acute traumatic brain injury. **Methods** Brain tissue samples were collected during craniotomy from 100 patients with cerebral contusion and laceration (trauma group), and normal brain tissue samples were collected from 100 patients with intracerebral hemorrhage(control group). Flow cytometry was applied to determine apoptotic neuronal cells, Western-blotting was performed to test expressions of Omi/HtrA2, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), pro-caspase-3, pro-caspase-9 and cleaved poly ADP-ribose polymerase (PARP), and four peptide fluorescence substrate method was employed to detect activities of caspase 3 and caspase 9 proteins. **Results** Percentage of apoptotic nerve cells, expressions of Omi/HtrA2, pro-caspase 3, pro-caspase 9 and cleaved PARP as well as activities of caspase 3 and caspase 9 proteins were significantly higher and the expression of XIAP was significantly lower in brain tissues of trauma group than those in control group (all $P<0.01$). In trauma group, expression of Omi/HtrA2 was positively correlated with percentage of apoptotic nerve cells, expressions of pro-caspase 3, pro-caspase 9 and cleaved PARP as well as activities of caspase 3 and caspase 9 proteins, and negatively correlation with the expression of XIAP. The expression of XIAP was negatively correlated with percentage of apoptotic nerve cells, expressions of Omi/HtrA2, pro-caspase 3, pro-caspase 9 and cleaved PARP as well as activities of caspase 3 and caspase 9 proteins. **Conclusion** Omi/HtrA2 mediated mitochondrial signaling pathway may be involved in neuronal apoptosis after acute traumatic brain injury.

【Key words】 Human Traumatic brain injury Neuronal apoptosis Omi/HtrA2

doi:10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.20.2017-377

基金项目:浙江省医药卫生科技计划平台项目(2014ZDA019)

作者单位:311600 建德市第一人民医院重症医学科(汤蓓、周玲、沈红卫、吴慧平、胡佳元),脑外科(郑绍俭);浙江大学医学院附属第二医院脑外科(石键)

通信作者:周玲, E-mail:95225410@qq.com

线粒体凋亡途径是急性创伤性脑损伤后神经细胞凋亡的主要途径之一^[1-3]。Omi/HtrA2 作为一种线粒体丝氨酸蛋白酶,可降解染色体连锁凋亡抑制蛋白(XIAP),解除对 caspase 蛋白的活性抑制,从而激发细胞凋亡^[4-11]。动物实验证实,Omi/HtrA2 介导的线粒体信号通路参与了脓毒症、癫痫和脑缺血/灌注损伤后神经细胞凋亡过程^[12-14]。本研究通过检测人脑挫裂伤脑组织凋亡神经细胞,观察 Omi/HtrA2、XIAP、剪切聚腺苷二磷酸-核糖多聚酶(PARP)、pro-caspase 3 和 pro-caspase 9 等表达情况,揭示人脑急性脑损伤后 Omi/HtrA2 介导的神经细胞凋亡线粒体信号途径的激活,从而为临床急性脑损伤病理生理机制和分子治疗的研究提供新方向。

1 对象和方法

1.1 对象 收集 2013 年 1 月至 2016 年 6 月建德市第一人民医院经开颅手术治疗的脑挫裂伤患者共 100 例(外伤组),男 60 例,女 40 例,年龄 18~78(44.7±14.8)岁。选择同期开颅手术治疗的高血压性基底节区脑出血患者 100 例作为对照组,男 56 例,女 44 例,年龄 41~78(58.0±11.4)岁。外伤组脑标本为开颅手术中脑挫裂伤组织,对照组脑标本为手术径路中正常脑组织。两组患者均未合并其他部位严重外伤、神经系统疾病、恶性肿瘤、严重感染及免疫性疾病。两组患者性别、年龄比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。本研究经建德市第一人民医院伦理委员会同意,所有家属均签署知情同意书。

1.2 神经细胞凋亡检测 粉碎脑组织后,用尼龙网过滤细胞团块,离心后弃去上清液,然后用 700ml/L 乙醇固定,由杭州柯帝生物技术有限公司采用流式细胞仪(美国 BD 公司 FACSCB flow cytometer)检测凋亡神经细胞。应用 Cell Quest 软件获取细胞 10 000 个,进行凋亡细胞计数。以 Mod Fit 软件进行凋亡峰拟合及细胞周期分析并绘制 DNA 分布图,G1 期前的 G1 亚峰(Ap)即为凋亡峰,结果以凋亡百分数表示。

1.3 蛋白表达的检测 制作脑组织匀浆,由杭州柯帝生物技术有限公司采用 Western-blot 检测脑组织 Omi/HtrA2、XIAP、剪切 PARP、pro-caspase 3 和 pro-caspase 9 等表达情况。采用二辛可宁酸法测定蛋白浓度,50μg 蛋白经电泳后,电转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉 Tris 0.9%氯化钠溶液和吐温 20 缓冲液(TBST)室温封闭 1h;加入相应单克隆抗体 4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次;加入 HRP 标记的 IgG 二抗室温摇床孵育 1h,TBST 洗膜 3 次;化学发光试剂作用 5min,X 光胶片曝光。冲洗并扫

描后结果用 Quality one 软件分析杂交条带灰度值,以 β -actin 水平为内对照,计算相对灰度值,即为蛋白表达水平。

1.4 蛋白活性的检测 取脑组织制作匀浆,由杭州柯帝生物技术有限公司采用四肽荧光底物法检测 caspase-3 和 caspase-9 蛋白活性。取脑组织匀浆 100μl 和 caspase-3 底物 AC-DEVD-AMC 或 caspase-9 底物 AC-LEHD-AFC 10μl,加入 HEPES 缓冲液至 1ml,37℃孵育 1 h。使用荧光分光光度计在激发波长 400nm,释放波长 505nm 处测定荧光强度,以未加脑组织时的荧光强度为参照值,计算荧光强度,结果以相对荧光强度表示。

1.5 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料组间比较采用 χ^2 检验;采用 Pearson 相关分析揭示各变量间的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者脑组织各指标的比较 外伤组脑组织凋亡神经细胞比例、Omi/HtrA2、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切 PARP 表达及 caspase 3 和 caspase 9 活性较对照组均明显升高(均 $P < 0.01$),外伤组脑组织 XIAP 表达较对照组明显下降($P < 0.01$),见图 1、表 1。

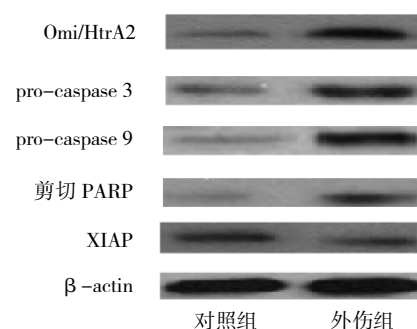


图 1 两组脑组织 Omi/HtrA2、XIAP、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切 PARP 表达的比较

2.2 外伤组各指标的相关性分析 外伤组脑组织 Omi/HtrA2 表达与凋亡神经细胞比例、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切 PARP 表达及 caspase 3 和 caspase 9 活性均呈正相关性($r=0.533、0.529、0.583、0.601、0.621、0.541$, 均 $P < 0.01$),与 XIAP 表达均呈负相关性($r=-0.568, P < 0.01$);外伤组脑组织 XIAP 表达与凋亡神经细胞比例、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切 PARP 表达及 caspase 3 和 caspase 9 活性均呈负相关性($r=-0.610、-0.494、-0.583、-0.611、-0.594、-0.550$, 均 $P < 0.01$)。

表 1 两组患者脑组织各指标的比较

组别	神经细胞 凋亡比例 (%)	Omi/HtrA2 表达 (%)	pro-caspase 3 表达 (%)	pro-caspase 9 表达 (%)	剪切 PARP 表达 (%)	XIAP 表达 (%)	caspase 3 活性 (pmol/min/mg)	caspase 9 活性 (pmol/min/mg)
外伤组	6.4 ± 3.8	42.3 ± 14.9	36.2 ± 11.9	41.3 ± 14.5	30.5 ± 10.8	14.8 ± 5.5	222.3 ± 72.8	83.0 ± 19.3
对照组	1.1 ± 0.7	10.1 ± 3.4	13.4 ± 4.0	11.4 ± 3.6	7.1 ± 2.3	33.8 ± 11.6	48.4 ± 13.8	20.3 ± 7.0
t 值	13.972	22.640	19.830	22.359	22.822	16.613	23.699	32.761
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

神经细胞凋亡是导致颅脑损伤后神经功能障碍的重要原因之一,抑制神经细胞凋亡可以明显改善颅脑损伤动物的神经功能^[15-17]。pro-caspase 3、pro-caspase 9、PARP、caspase 3 和 caspase 9 等在神经细胞凋亡中具有重要作用,这些蛋白表达的升高促进了神经细胞凋亡的发生^[18-20]。正如本研究所发现,凋亡神经细胞比例、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切 PARP 表达及 caspase 3 和 caspase 9 活性在颅脑损伤患者挫伤脑组织中明显升高。这些数据说明,神经细胞凋亡确实在人类颅脑损伤后继发性脑损伤中扮有重要的角色。

线粒体途径是神经细胞凋亡重要的信号通路之一。Omi/HtrA2 是一种由内质网合成的丝氨酸蛋白酶,由 MTS/MLS 引导转运进入线粒体,通过自身蛋白酶解或者被线粒体加工肽酶降解形成成熟的 Omi 分子^[4-8]。当细胞受到刺激发生应激反应而线粒体膜通透性增加时,Omi/HtrA2 分子从线粒体释放并进入细胞质而发挥作用^[9-11]。XIAP 是内源性 caspases 抑制物,可结合和抑制活化的 caspase 9。当细胞受到刺激后,Omi/HtrA2 分子被释放到细胞质,降解 XIAP,解除了 XIAP 对 caspase 9 的抑制,导致下游 caspase 3 活化,进而 DNA 断裂而发生细胞凋亡^[6,11]。目前动物实验已经证实,脑损伤大鼠皮层 Omi/HtrA2 表达增高,而 XIAP 表达降低^[12-14]。本研究留取颅脑损伤患者脑挫伤皮层进而检测 Omi/HtrA2 和 XIAP 表达,也发现了类似的结果。同时,本研究发现,Omi/HtrA2 表达与凋亡神经细胞比例、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切 PARP 表达及 caspase 3 和 caspase 9 活性呈正相关,与 XIAP 表达均呈负相关;XIAP 表达与凋亡神经细胞比例、pro-caspase 3、pro-caspase 9 和剪切 PARP 表达及 caspase 3 和 caspase 9 活性均呈负相关。这些说明,Omi/HtrA2 介导的线粒体途径可能参与了人类外伤性脑损伤后神经细胞凋亡的发生。

目前已有研究揭示,Omi/HtrA2 的特异性抑制剂(UCF-101)可明显减少脓毒症或脑缺血大鼠的神经细

胞凋亡,一定程度上改善神经功能^[12-14]。这些研究结果也从另外一个方面说明,特异性地抑制 Omi/HtrA2 表达可能抑制颅脑损伤后神经细胞,从而改善颅脑损伤患者,这也为颅脑损伤治疗提供了新思路。

4 参考文献

- [1] Zhai X, Ding Y, Wang Q, et al. Rutin Acid Ameliorates Neural Apoptosis Induced by Traumatic Brain Injury via Mitochondrial Pathways in Mice[J]. Neuroimmunomodulation, 2016, 23(3):179-187.
- [2] Gao Y, Zhuang Z, Gao S, et al. Tetrahydrocurcumin reduces oxidative stress-induced apoptosis via the mitochondrial apoptotic pathway by modulating autophagy in rats after traumatic brain injury[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3):887-899.
- [3] Sun G Z, Gao F F, Zhao Z M, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the penumbra aggravates secondary damage in rats with traumatic brain injury[J]. Neural Regen Res, 2016, 11(8):1260-1266.
- [4] Liu X, Lei J, Wang K, et al. Mitochondrial Omi/HtrA2 Promotes Caspase Activation Through Cleavage of HAX-1 in Aging Heart [J]. Rejuvenation Res, 2017,20(3):183-192.
- [5] Xu Z, Chen Y, Xu G, et al. Omi/HtrA2 pro-apoptotic marker differs in various hepatocellular carcinoma cell lines owing to ped/pea-15 expression level [J]. Oncol Rep, 2015, 33(2):905-912.
- [6] Winkler J, Rand M L, Schmugge M, et al. Omi/HtrA2 and XIAP are components of platelet apoptosis signalling[J]. Thromb Haemost, 2013, 109(3):532-539.
- [7] Sun L L, Zhang L, Meng X L, et al. Effects of fluid shear stress on the expression of Omi/HtrA2 in human umbilical vein endothelial cells[J]. Mol Med Rep, 2013,7(1):110-114.
- [8] Goo H G, Rhim H, Kang S. HtrA2/Omi influences the stability of LON protease 1 and prohibitin, proteins involved in mitochondrial homeostasis[J]. Exp Cell Res, 2014,328(2):456-465.
- [9] Goo H G, Jung M K, Han S S, et al. HtrA2/Omi deficiency causes damage and mutation of mitochondrial DNA [J]. Biochim Biophys Acta, 2013,1833(8):1866-1875.
- [10] Kang S, Fernandes-Alnemri T, Alnemri E S. A novel role for the mitochondrial HTRA2/OMI protease in aging [J]. Autophagy, 2013, 9(3):420-421.
- [11] Dan H C, Sun M, Kaneko S, et al. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)[J]. J

- Biol Chem, 2016, 291(43):22846.
- [12] Hu Y, Huang M, Wang P, et al. Ucf-101 protects against cerebral oxidative injury and cognitive impairment in septic rat[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 16(1):108-113.
- [13] Su D, Ma J, Zhang Z, et al. Protective Effects of UCF-101 on Cerebral Ischemia-Reperfusion (CIR) is Depended on the MAPK/p38/ERK Signaling Pathway[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(6):907-914.
- [14] Su D, Su Z, Wang J, et al. UCF-101, a novel Omi/HtrA2 inhibitor, protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Anat Rec (Hoboken), 2009, 292(6):854-861.
- [15] Keskin I, Gunal M Y, Ayturk N, et al. Dose-dependent neuroprotective effect of enoxaparin on cold-induced traumatic brain injury[J]. Neural Regen Res, 2017, 12(5):761-764.
- [16] Huang T Q, Song J N, Zheng F W, et al. Protection of FK506 against neuronal apoptosis and axonal injury following experimental diffuse axonal injury[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(5):3001-3010.
- [17] Zhang G, Zhang F, Zhang T, et al. Tetramethylpyrazine Nitron Improves Neurobehavioral Functions and Confers Neuroprotection on Rats with Traumatic Brain Injury[J]. Neurochem Res, 2016, 41(11):2948-2957.
- [18] Miao Q, Ge M, Huang L. Up-regulation of GBP2 is Associated with Neuronal Apoptosis in Rat Brain Cortex Following Traumatic Brain Injury[J]. Neurochem Res, 2017, 42(5):1515-1523.
- [19] Ma J, Shui S, Han X, et al. microRNA-22 attenuates neuronal cell apoptosis in a cell model of traumatic brain injury[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(4):1895-1902.
- [20] Yao J, Zheng K, Zhang X. Rosiglitazone exerts neuroprotective effects via the suppression of neuronal autophagy and apoptosis in the cortex following traumatic brain injury[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5):6591-6597.
- (收稿日期:2017-02-27)
(本文编辑:严玮雯)

(上接第 1737 页)

总之, 乌司他丁可通过降低 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 等炎症介质的表达来抑制肠道的炎症级联反应, 并能抑制肠黏膜上皮细胞的自噬与凋亡, 对 NEC 新生大鼠肠损伤起保护作用。

4 参考文献

- [1] Kong X, Xu F, Wu R, et al. Neonatal mortality and morbidity among infants between 24 to 31 complete weeks: a multicenter survey in China from 2013 to 2014[J]. BMC Pediatr, 2016, 16(1): 174.
- [2] Cao Y Z, Tu Y Y, Chen X, et al. Protective effect of Ulinastatin against murine models of sepsis: inhibition of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 and augmentation of IL-10 and IL-13 [J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64(6):543-547.
- [3] Wang N, Liu X, Zheng X, et al. Ulinastatin is a novel candidate drug for sepsis and secondary acute lung injury, evidence from an optimized CLP rat model[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 17(3): 799-807.
- [4] Wang S, Wang J, Chen X, et al. Does urinary trypsin inhibitor have a role in acute lung injury induced by pulmonary contusion: a basic research in a model of rats[J]. Am J Ther, 2014, 21(6):447-452.
- [5] Yu L, Luo Q, Fang H. Mechanism of ulinastatin protection against lung injury caused by lower limb ischemia-reperfusion[J]. Panminerva Med, 2014, 56(1):49-55.
- [6] He Q L, Zhong F, Ye F, et al. Does intraoperative ulinastatin improve postoperative clinical outcomes in patients undergoing cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:630835.
- [7] Jiang L, Yang L, Zhang M, et al. Beneficial effects of ulinastatin on gut barrier function in sepsis[J]. Indian J Med Res, 2013, 138(6): 904-11.
- [8] Yu Y, Shiou S R, Guo Y, et al. Erythropoietin protects epithelial cells from excessive autophagy and apoptosis in experimental neonatal necrotizing enterocolitis[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69620.
- [9] Maynard A A, Dvorak K, Khailova L, et al. Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 299(3): G614-622.
- [10] Walczak M, Martens S. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation[J]. Autophagy, 2013, 9(3):424-425.
- [11] Myung Park J, Huang S, Wu T T, et al. Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy[J]. Cancer Biol Ther, 2013, 14(2):100-107.
- (收稿日期:2017-04-07)
(本文编辑:严玮雯)