

本文引用:陆兆丰,陆若玉,吴亚芳,等. 创伤性脑损伤大鼠脑组织中 α -酮戊二酸脱氢酶的活性变化及意义[J].

新乡医学院学报,2020,37(4):306-311. DOI:10.7683/xyxyxb.2020.04.002.

【基础研究】

创伤性脑损伤大鼠脑组织中 α -酮戊二酸脱氢酶的活性变化及意义

陆兆丰¹, 陆若玉², 吴亚芳¹, 朱刚毅¹, 郝建臣¹, 郭新民³, 陈悦华¹, 亢崇仰¹

(1. 河南科技大学第一附属医院急诊科,河南科技大学临床医学院,河南 洛阳 471003;2. 山西医科大学公共卫生学院,山西 太原 030000;3. 河南科技大学第一附属医院义马分院神经外科,河南 义马 472300)

摘要: 目的 探讨创伤性脑损伤(TBI)大鼠脑组织中 α -酮戊二酸脱氢酶(α -KGDHC)活性变化及意义。方法 将80只Sprague Dawley大鼠随机分为假手术组、TBI组、TBI-溶剂对照组、TBI-3-甲基-2-氧基戊酸(KMV)组,每组20只。TBI组、TBI-溶剂对照组和TBI-KMV组大鼠建立中度液压TBI模型,假手术组大鼠给予相同的手术步骤,但不实施液压冲击。TBI前24 h,TBI-KMV组大鼠侧脑室注射10 μ L KMV,TBI-溶剂对照组大鼠侧脑室注射10 μ L生理盐水,注射速度为1 μ L \cdot min⁻¹;假手术组和TBI组大鼠侧脑室不做注射。分别于TBI后24、72 h及7 d时,每组随机选取5只大鼠,采用Shapira和Wahl脑损伤神经功能评分法进行神经功能评分,Morris水迷宫实验检测大鼠学习记忆功能;Morris水迷宫实验后快速断头处死大鼠,完整取出脑组织,迅速分离出损伤侧大脑皮层、海马及丘脑,采用比色法检测脑组织中 α -KGDHC活性。TBI后72 h,每组随机选取5只大鼠,应用40 g \cdot L⁻¹多聚甲醛溶液灌注固定,断头取脑组织,采用Fluoro-Jade染色液对坏死神经元进行染色并计数。**结果** TBI后24、72 h及7 d,TBI组和TBI-溶剂对照组大鼠神经功能评分显著低于假手术组($P<0.05$),TBI-KMV组大鼠神经功能评分显著低于TBI-溶剂对照组和TBI组($P<0.05$),TBI-溶剂对照组与TBI组大鼠神经功能评分比较差异无统计学意义($P>0.05$)。TBI后24、72 h及7 d,TBI组和TBI-溶剂对照组大鼠登台时间及登台累计距离显著长于假手术组($P<0.05$),TBI-KMV组大鼠登台时间及登台累计距离显著长于TBI-溶剂对照组和TBI组($P<0.05$),TBI-溶剂对照组与TBI组登台时间及登台累计距离比较差异无统计学意义($P>0.05$)。TBI后24、72 h及7 d,TBI组和TBI-溶剂对照组大鼠损伤侧大脑皮层、海马及丘脑组织中 α -KGDHC活性显著低于假手术组($P<0.05$),TBI-KMV组大鼠大脑皮层、海马及丘脑组织中 α -KGDHC活性显著低于TBI组和TBI-溶剂对照组($P<0.05$),TBI-溶剂对照组与TBI组大鼠大脑皮层、海马及丘脑组织中 α -KGDHC活性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。TBI后72 h,TBI组和TBI-溶剂对照组大鼠损伤侧大脑皮层、海马和丘脑坏死神经元数显著多于假手术组($P<0.05$),TBI-KMV组大鼠损伤侧大脑皮层、海马和丘脑坏死神经元数显著多于TBI组和TBI-溶剂对照组($P<0.01$),TBI组与TBI-溶剂对照组大鼠损伤侧大脑皮层、海马和丘脑坏死神经元数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** TBI大鼠脑组织中 α -KGDHC活性降低,抑制 α -KGDHC活性可加重脑损伤, α -KGDHC可能参与了TBI和继发性脑损伤的发生与发展。

关键词: 创伤性脑损伤; α -酮戊二酸脱氢酶;神经功能;学习记忆功能

中图分类号: R651.1⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2020)04-0306-06

Changes and significance of α -ketoglutarate dehydrogenase complex activity in brain tissues of rats with traumatic brain injury

LU Zhaofeng¹, LU Ruoyu², WU Yafang¹, ZHU Gangyi¹, JIA Jianchen¹, GUO Xinmin³, CHEN Yuehua¹, KANG Chongyang¹

(1. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Clinical Medicine College of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China; 2. School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, Shanxi Province, China; 3. Department of Neurosurgery, Yima People's Hospital of the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Yima 472300, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes and significance of α -ketoglutarate dehydrogenase complex (α -KGDHC) activity in brain tissues of rats with traumatic brain injuries (TBI). **Methods** Eighty Sprague Dawley rats were randomly divided into sham operation group, TBI group, TBI-solvent control group and TBI- α -keto- β -methyl-n-valeric acid (KMV) group, with twenty rats in each group. The TBI models of rats in the TBI group, TBI-solvent control group and TBI-KMV group were established by moderate hydraulic impact. The rats in the sham operation group were given the same

DOI:10.7683/xyxyxb.2020.04.002

收稿日期:2019-09-12

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:162102310412)。

作者简介:陆兆丰(1973-),男,河南洛阳人,博士,副主任医师,研究方向:中枢神经损伤修复。

procedure, but no hydraulic shock was applied. At 24 hours before TBI, 10 μL KMV was injected into the lateral ventricles of rats in the TBI-KMV group, and 10 μL normal saline was injected into the lateral ventricles of rats in the TBI-solvent control group, the injection speed was 1 μL · min⁻¹. The rats in the sham operation group and TBI group did not receive lateral ventricle injection. At 24, 72 hours and 7 days after TBI, 5 rats in each group were randomly selected, and the neurological function was scored by Shapira and Wahl brain injury neural function scoring method, and the learning and memory function of rats were examined by Morris water maze test. After Morris water maze test, the rats were decapitated and killed quickly, and the brain tissues were taken out completely, and the damaged cerebral cortex, hippocampus and thalamus were separated rapidly. The activity of α-KGDHC in brain tissues was detected by colorimetry. At 72 hours after TBI, 5 rats in each group were randomly selected, then the rats were perfused and fixed with 40 g · L⁻¹ paraformaldehyde solution, and the brain tissues were taken out after decapitation. The necrotic neurons were stained and counted with Fluoro-Jade staining solution.

Results At 24, 72 hours and 7 days after TBI, the neurological function score of rats in the TBI group and TBI-solvent control group was significantly lower than that in the sham operation group ($P < 0.05$), the neurological function score of rats in the TBI-KMV group was significantly lower than that in the TBI-solvent control group and TBI group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the neurological function score of rats between the TBI-solvent control group and TBI group ($P > 0.05$). At 24, 72 hours and 7 days after TBI, the time and the cumulative distance of arriving platform of rats in the TBI group and TBI-solvent control group were significantly longer than those in the sham operation group ($P < 0.05$), the time and the cumulative distance of arriving platform of rats in the TBI-KMV group were significantly longer than those in the TBI-solvent control group and TBI group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the time and the cumulative distance of arriving platform of rats between the TBI-solvent control group and TBI group ($P > 0.05$). At 24, 72 hours and 7 days after TBI, the activity of α-KGDHC in impaired cerebral cortex, hippocampus and thalamus tissues of rats in the TBI group and TBI-solvent control group was significantly lower than that in the sham operation group ($P < 0.05$), the activity of α-KGDHC in impaired cerebral cortex, hippocampus and thalamus tissues of rats in the TBI-KMV group was significantly lower than that in the TBI group and TBI-solvent control group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the activity of α-KGDHC in impaired cerebral cortex, hippocampus and thalamus tissues of rats between the TBI-solvent control group and TBI group ($P > 0.05$). At 72 hours after TBI, the number of necrotic neurons in cerebral cortex, hippocampus and thalamus of rats in the TBI group and TBI-solvent control group was significantly higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$), the number of necrotic neurons in cerebral cortex, hippocampus and thalamus of rats in the TBI-KMV group was significantly more than that in the TBI group and TBI-solvent control group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the number of necrotic neurons in cerebral cortex, hippocampus and thalamus of rats between the TBI-solvent control group and TBI group ($P > 0.05$).

Conclusion activity of α-KGDHC in brain tissue of TBI rats decreased, inhibiting the activity of α-KGDHC can aggravate brain injury. α-KGDHC may be involved in the occurrence and development of TBI and secondary brain injury.

Key words: traumatic brain injury; α-ketoglutarate dehydrogenase; neurological function; learning and memory function

创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)是创伤患者病死率和致残率高的首要原因,患者多遗留认知、情感及神经功能障碍,显著增加癫痫、脑卒中、神经退行性疾病发病风险^[1]。TBI后局部及全脑血流-代谢不匹配是导致继发性脑损伤(secondary brain injury, SBI)的重要原因^[2]。目前,线粒体作为TBI后病理反应的中心已成为研究的焦点。α-酮戊二酸脱氢酶(α-ketoglutarate dehydrogenase complex, α-KGDHC)是广泛存在于脑组织中的线粒体酶,参与脑组织能量代谢,对于神经组织三羧酸循环、能量代谢、神经递质代谢等诸多生理及病理过程极为重要,KGDHC活性降低可引起神经组织能量代谢紊乱、氧代谢失调、胆碱能神经功能异常、钙离子稳态变化等,导致患者运动和认知功能受损,与神经退行性病变密切相关,但其具体机制尚不明确^[3-5]。本研究旨在探讨TBI大鼠脑组织中α-KGDHC活性变化及其对TBI大鼠神经功能、学习记忆能力的影响,为进一步临床研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

80只4月龄无特定病原级雄性Sprague Dawley大鼠购自河南科技大学实验动物中心,体质量305~335(320.0±15.0)g;饲养于12 h/12 h明暗交替环境,温度保持在25℃;术前12 h禁食,6 h禁水。将80只大鼠随机分为假手术组、TBI组、TBI-溶剂对照组和TBI-3-甲基-2-氧基戊酸(α-keto-β-methyl-n-valeric acid, KMV)组,每组20只。

1.2 主要试剂与仪器

α-KGDHC纯酶(K1502)、α-酮戊二酸、α-KGDHC活性抑制剂KMV、α-KGDHC活性检测试剂盒购自美国Sigma公司,Fluoro-Jade染色试剂盒购自美国AAT Bioquest公司;大鼠脑立体定位仪购自上海玉研科学仪器有限公司,大鼠液脑压损伤仪购自美国弗吉尼亚大学医学工程部,微量注射立体定向仪、动物用呼吸机购自美国Kent

Scientific 公司, 动物多导生理记录仪购自美国 Biopac 公司, GENios 96 孔板多功能酶标仪购自瑞士 Tecan 公司, Axioplan 荧光显微镜购自德国 Zeiss 公司, Morris 水迷宫及轨迹录像分析系统购自上海吉量科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠中度液压 TBI 模型建立 TBI 组、TBI-溶剂对照组和 TBI-KMV 组大鼠参照文献[6]方法建立中度液压 TBI 模型。20 g · L⁻¹ 戊巴比妥钠 (50 mg · kg⁻¹) 腹腔注射麻醉大鼠, 头部固定于动物立体定位仪, 备皮消毒。头部正中作一 2.5 cm 头皮切口, 剥离骨膜; 于前凶人字缝尖连线中点偏左 4 mm 处颅骨钻孔, 直径约 4.8 mm, 暴露完整硬脑膜; 将 2 枚颅骨固定螺丝置入内径 2.6 mm 打击管, 使用牙科骨水泥固定, 然后缝合、消毒头皮切口; 对侧备皮消毒后定位右侧尾侧至前凶点 0.8 mm、中线旁开 1.5 mm 处置入内径 0.7 mm 不锈钢导管至颅骨下 2.0 mm, 将内径 0.35 mm 注射导管插入颅骨下 5 mm 处右侧脑室, 微量注射泵连接注射导管。然后, 将大鼠置于动物间饲养, 12 h/12 h 明暗交替, 自由进食、饮水。术后 24 h, 给予大鼠乙醚吸入, 气管插管, 股动脉置管, 多导生理记录仪监测大鼠血压、心率变化。待大鼠出现夹足反应时使用液压脑损伤仪 (压力 1.9 ~ 2.0 atm, 1 atm = 101.325 kPa) 制备中度脑损伤; 然后立即给予大鼠呼吸机辅助通气, 至自主呼吸完全恢复。假手术组大鼠手术步骤与 TBI 组、TBI-KMV 组和 TBI-溶剂对照组相同, 但仅放置液压打击管及侧脑室注射导管模拟打击步骤, 而不实施打击, 不制备 TBI 模型。

1.3.2 KMV 侧脑室注射 将 KMV 配置成浓度为 5 mmol · L⁻¹ 溶液, 并调整酸碱度值为 7.4。TBI 前 24 h, TBI-KMV 组大鼠使用微量注射器侧脑室注射 10 μL KMV, TBI-溶剂对照组大鼠侧脑室注射 10 μL 生理盐水, 注射速度为 1 μL · min⁻¹; 假手术组和 TBI 组大鼠侧脑室不做注射。为防止注射物倒流, 注射后导管留置 30 s。

1.3.3 大鼠神经功能评分 分别于 TBI 后 24、72 h 及 7 d 时, 每组随机选取 5 只大鼠, 采用 Shapira 和 Wahl 脑损伤神经功能评分法^[6] 评估各组大鼠神经功能, 评分越高, 表明神经功能越好。

1.3.4 大鼠 Morris 水迷宫实验 各组大鼠分别于 TBI 后 24、72 h 及 7 d 神经功能评分后进行 Morris 水迷宫实验。Morris 水迷宫装置为直径 180 cm、高 45 cm 的圆柱缸, 缸顶部设有与计算机系统相连的摄像跟踪系统。缸内注水至高 30 cm 处, 水温保持在 25 ~ 28 ℃, 缸中放置 1 个直径为 10 cm 的站台,

使水面超过站台 2 cm; 分别于 TBI 后 24、72 h 及 7 d 时将大鼠随机从东南西北 4 个象限放入水中, 大鼠可在缸内自由游泳直至找到水面下的站台进行休息, 如 120 s 内仍无法找到站台, 则将其引导至站台上休息 30 s, 然后将其从缸内捞出, 休息 30 min 后再次进行实验。大鼠在缸内的所有运动轨迹均被与计算机连接的录像跟踪系统记录, 并使用配套程序对大鼠找到站台的时间 (登台时间)、登台前的游泳距离进行计算和分析。

1.3.5 脑组织标本取材 各组大鼠分别于脑损伤 24、72 h 及 7 d 进行 Morris 水迷宫实验后快速断头处死, 完整取出脑组织, 迅速分离出损伤侧大脑皮层、海马及丘脑, 置于 -190 ℃ 液氮中保存。

1.3.6 比色法检测脑组织中 α-KGDHC 活性 取各组大鼠 TBI 后 24、72 h 及 7 d 时损伤侧大脑皮层、海马及丘脑组织并标记。脑组织于裂解缓冲液中制备成 20 g · L⁻¹ 匀浆, 离心收集上清液并标记; 制备反应混合物, 反应混合物反应 5 min 后, α-KGDHC 纯酶及 0.1 mmol · L⁻¹ 酮戊二酸 10 μL 加入反应体系中 (0.8 mL, pH = 8.0), 反应时间 10 min, 制作标准反应曲线; 将待检测样品迅速加入反应混合液, 蛋白上样量约 60 μg; 应用 96 孔板多功能酶标仪检测吸光度, 实验重复 3 次, 取均值。记录吸光度值 (激发光 340 nm, 发射光 460 nm), 计算酶活性。

1.3.7 Fluoro-Jade 染色法计数坏死神经元 大鼠 TBI 后 72 h (每组 5 只), 应用 100 g · L⁻¹ 水合氯醛腹腔注射麻醉, 快速暴露心脏, 剪开右心耳, 灌注针经左心室插入至升主动脉, 恒速泵灌注 200 mL 冰生理盐水后再灌注 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛溶液 400 mL。断头取大鼠脑组织, 自头端前凶点开始做 2 mm 冠状切面并准确标记; 制作损伤侧大脑皮层、海马及丘脑组织的石蜡切片 (厚约 6 μm)。参照文献[6]方法, 应用 Fluoro-Jade 染色液对坏死神经元进行染色并计数, 坏死神经元呈高亮绿色。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行数据统计与分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组内不同时间点间比较采用重复测量资料的方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠神经功能评分比较 结果见表 1。TBI 后 24、72 h 及 7 d, TBI 组和 TBI-溶剂对照组大鼠神经功能评分显著低于假手术组, TBI-KMV 组大鼠神经功能评分显著低于 TBI-溶剂对照组和 TBI 组, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05); TBI-溶剂对照

组与 TBI 组大鼠神经功能评分比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 不同时间点 4 组大鼠神经功能评分比较

Tab.1 Comparison of neurological function scores of rats among the four groups at different time points ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	神经功能评分		
		TBI 后 24 h	TBI 后 72 h	TBI 后 7 d
假手术组	5	8.83 \pm 0.11	8.85 \pm 0.12	8.87 \pm 0.11
TBI 组	5	6.30 \pm 0.11 ^a	6.80 \pm 0.31 ^a	7.25 \pm 0.10 ^a
TBI-溶剂对照组	5	6.25 \pm 0.01 ^a	6.72 \pm 0.11 ^a	7.09 \pm 0.31 ^a
TBI-KMV 组	5	5.01 \pm 0.10 ^b	5.56 \pm 0.11 ^b	5.85 \pm 0.12 ^b

注:与假手术组比较^a $P<0.05$;与 TBI 组和 TBI-溶剂对照组比较^b $P<0.05$ 。

2.2 4 组大鼠学习记忆能力比较 结果见表 2 和表 3。TBI 后 24、72 h 及 7 d,TBI 组和 TBI-溶剂对照组大鼠登台时间及登台累计距离显著长于假手术组,TBI-KMV 组大鼠登台时间及登台累计距离显著长于 TBI-溶剂对照组和 TBI 组,差异均有统计学意义($P<0.05$);TBI-溶剂对照组与 TBI 组登台时间及登台累计距离比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 4 组大鼠 Morris 水迷宫登台时间比较

Tab.2 Comparison of the time of arriving platform in Morris water maze test among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	登台时间/s		
		TBI 后 24 h	TBI 后 72 h	TBI 后 7 d
假手术组	5	57.78 \pm 11.10	57.10 \pm 12.10	58.23 \pm 11.10
TBI 组	5	105.00 \pm 11.32 ^a	104.00 \pm 10.83 ^a	100.00 \pm 9.20 ^a
TBI-溶剂对照组	5	104.00 \pm 11.26 ^a	102.00 \pm 10.23 ^a	98.30 \pm 10.20 ^a
TBI-KMV 组	5	132.00 \pm 12.23 ^b	134.00 \pm 12.15 ^b	139.00 \pm 12.00 ^b

注:与假手术组比较^a $P<0.05$;与 TBI 组和 TBI-溶剂对照组比较^b $P<0.05$ 。

表 3 4 组大鼠 Morris 水迷宫登台累计距离比较

Tab.3 Comparison of the cumulative distance of arriving platform in Morris water maze test among the four groups

组别	n	登台累计距离/m		
		TBI 后 7 d	TBI 后 14 d	TBI 后 21 d
假手术组	5	6.23 \pm 1.58	6.13 \pm 1.52	6.13 \pm 1.69
TBI 组	5	12.50 \pm 1.10 ^a	12.00 \pm 1.21 ^a	11.80 \pm 1.32 ^a
TBI-溶剂对照组	5	12.20 \pm 1.13 ^a	12.40 \pm 1.02 ^a	11.60 \pm 1.02 ^a
TBI-KMV 组	5	15.40 \pm 1.12 ^b	15.60 \pm 1.21 ^b	15.40 \pm 1.21 ^b

注:与假手术组比较^a $P<0.05$;与 TBI 组和 TBI-溶剂对照组比较^b $P<0.05$ 。

2.3 4 组大鼠脑组织中 α -KGDHC 活性比较 结果见表 4、表 5 和表 6。TBI 后 24、72 h 及 7 d,TBI 组和 TBI-溶剂对照组大鼠损伤侧大脑皮层、海马及丘脑组织中 α -KGDHC 活性显著低于假手术组,TBI-

KMV 组大鼠大脑皮层、海马及丘脑组织中 α -KG-DHC 活性显著低于 TBI 组和 TBI-溶剂对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);TBI-溶剂对照组与 TBI 组大鼠大脑皮层、海马及丘脑组织中 α -KGDHC 活性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 4 4 组大鼠损伤侧大脑皮层组织中 α -KGDHC 活性比较

Tab.4 Comparison of α -KGDHC activity in injured cerebral cortex tissues of rats among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	α -KGDHC/(mU \cdot mg ⁻¹)		
		TBI 后 24 h	TBI 后 72 h	TBI 后 7 d
假手术组	5	2.01 \pm 0.11	2.01 \pm 0.12	2.01 \pm 0.13
TBI 组	5	1.28 \pm 0.10 ^a	1.30 \pm 0.11 ^a	1.38 \pm 0.21 ^a
TBI-溶剂对照组	5	1.30 \pm 0.10 ^a	1.33 \pm 0.13 ^a	1.42 \pm 0.22 ^a
TBI-KMV 组	5	1.02 \pm 0.10 ^b	1.05 \pm 0.10 ^b	1.10 \pm 0.20 ^b

注:与假手术组比较^a $P<0.05$;与 TBI 组和 TBI-溶剂对照组比较^b $P<0.05$ 。

表 5 4 组大鼠损伤侧海马组织中 α -KGDHC 活性比较

Tab.5 Comparison of α -KGDHC activity in injured hippocampus tissues of rats among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	α -KGDHC/(mU \cdot mg ⁻¹)		
		TBI 后 24 h	TBI 后 72 h	TBI 后 7 d
假手术组	5	1.70 \pm 0.11	1.69 \pm 0.10	1.71 \pm 0.23
TBI 组	5	1.32 \pm 0.10 ^a	1.35 \pm 0.13 ^a	1.38 \pm 0.10 ^a
TBI-溶剂对照组	5	1.35 \pm 0.12 ^a	1.37 \pm 0.11 ^a	1.36 \pm 0.14 ^a
TBI-KMV 组	5	1.09 \pm 0.10 ^b	1.12 \pm 0.10 ^b	1.14 \pm 0.10 ^b

注:与假手术组比较^a $P<0.05$;与 TBI 组及 TBI-溶剂对照组比较^b $P<0.05$ 。

表 6 4 组大鼠损伤侧丘脑组织中 α -KGDHC 活性比较

Tab.6 Comparison of α -KGDHC activity in injured thalamus tissues of rats among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	α -KGDHC/(mU \cdot mg ⁻¹)		
		TBI 后 24 h	TBI 后 72 h	TBI 后 7 d
假手术组	5	1.46 \pm 0.10	1.47 \pm 0.20	1.45 \pm 0.10
TBI 组	5	1.26 \pm 0.10 ^a	1.23 \pm 0.11 ^a	1.22 \pm 0.13 ^a
TBI-溶剂对照组	5	1.21 \pm 0.10 ^a	1.20 \pm 0.13 ^a	1.19 \pm 0.12 ^a
TBI-KMV 组	5	1.01 \pm 0.10 ^b	1.02 \pm 0.10 ^b	1.01 \pm 0.10 ^b

注:与假手术组比较^a $P<0.05$;与 TBI 组及 TBI-溶剂对照组比较^b $P<0.05$ 。

2.4 4 组大鼠坏死神经元数比较 结果见图 1 和表 7。TBI 后 72 h,TBI 组和 TBI-溶剂对照组大鼠损伤侧大脑皮层、海马和丘脑坏死神经元数显著多于假手术组,TBI-KMV 组大鼠损伤侧大脑皮层、海马和丘脑坏死神经元数显著多于 TBI 组和 TBI-溶剂对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);TBI 组与 TBI-溶剂对照组大鼠大鼠损伤侧大脑皮层、海马和丘脑坏死神经元数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

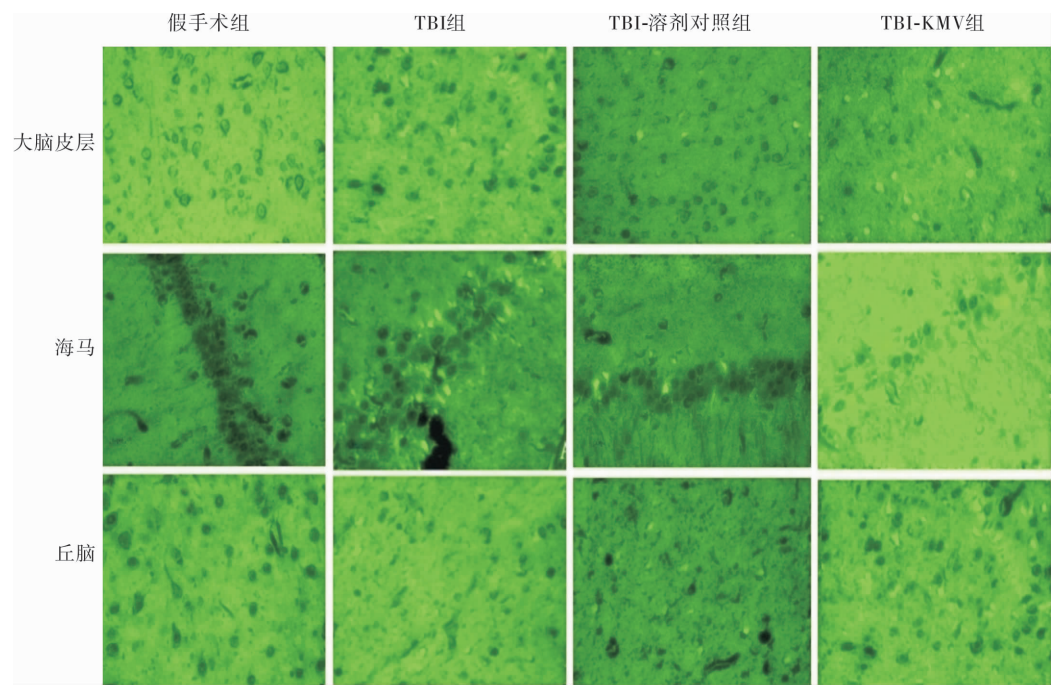


图 1 TBI 后 72 h 4 组大鼠坏死神经元 (Fluoro-Jade 染色, ×400)

Fig. 1 Necrotic neurons of rats in the four groups at 72 hours after TBI (Fluoro-Jade staining, ×400)

表 7 4 组大鼠坏死神经元数比较

Tab. 7 Comparison of the number of necrotic neurons of rats among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	坏死神经元数		
		大脑皮层	海马	丘脑
假手术组	5	4.4 ± 1.0	3.0 ± 1.0	6.0 ± 1.1
TBI 组	5	32.2 ± 4.1 ^a	19.1 ± 3.6 ^a	29.0 ± 3.4 ^a
TBI-溶剂对照组	5	33.0 ± 2.0 ^a	18.4 ± 4.2 ^a	33.3 ± 2.0 ^a
TBI-KMV 组	5	56.5 ± 4.4 ^b	28.0 ± 3.0 ^b	49.0 ± 2.2 ^b

注:与假手术组比较^a $P < 0.01$;与 TBI 组及 TBI-溶剂对照组比较^b $P < 0.01$ 。

3 讨论

TBI 后线粒体功能进行性障碍是 SBI 的主要病理机制,线粒体对神经细胞能量代谢及钙离子稳态调节极为重要,是氧自由基产生的重要场所,TBI 后即使给予充足的氧供应,由于线粒体功能严重受损,也会导致腺苷三磷酸产生显著减少^[7]。α-KGDHC 是位于线粒体基质内参与三羧酸循环的限速酶,对维持脑组织氧化还原稳定状态极为关键,在此过程中产生的线粒体膜电位与脑组织神经递质(如谷氨酸等)的释放与代谢密切相关,参与了 TBI 的原发及继发性病理过程。研究显示,α-KGDHC 活性变化可导致三羧酸循环障碍,引起谷氨酸等神经递质代谢改变,使易损区神经组织受损,产生神经系统变性疾病,α-KGDHC 活性改变与诸多神经系统变性疾病有关^[8]。SHI 等^[9]研究发现,大鼠脑组织中的 α-KGDHC 活性自高至低依次为大脑皮层、小脑、中

脑、海马和下丘脑,α-KGDHC 活性分布的差异可能与损伤后神经组织的易损性密切相关。

CHEN 等^[10]研究认为,线粒体氧化应激参与了阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发生与发展过程,与神经组织三羧酸循环能量代谢障碍及谷氨酸代谢异常相关,AD 患者大脑皮层 α-KGDHC 活性显著降低,且 α-KGDHC 活性降低与 AD 病程及严重程度呈正相关。BANERJEE 等^[11]研究发现,帕金森病(Parkinson's disease, PD)患者黑质区黑质细胞酶活性显著降低,也与 PD 的严重程度关系密切。LOONEN 等^[12]研究显示,α-KGDHC 活性降低参与了迟发性运动障碍(tardive dyskinesia, TD)损伤早期的病理级联反应,导致继发性病理损伤,α-KGDHC 活性降低导致线粒体氧化敏感性损伤,诱发神经元坏死。LAI 等^[13]研究显示,在慢性缺氧状态下,新生大鼠海马、大脑皮层组织中 α-KGDHC 活性显著降低,且与新生大鼠的缺氧耐受性有关。PANDYA 等^[14]研究表明,活性氧家族在正常脑组织中主要由 α-KGDHC 参与生成,抑制 α-KGDHC 活性可显著减少 γ-氨基丁胺生成。本研究结果显示,TBI 后 24、72 h 及 7 d,TBI 组和 TBI-溶剂对照组大鼠损伤侧大脑皮层、海马及丘脑组织 α-KGDHC 活性显著低于假手术组,提示 TBI 后大鼠脑组织中 α-KGDHC 酶活性变化在 TBI 发生和发展中起作用。

KMV 能特异性竞争性抑制 α-KGDHC 活性,

HUANG 等^[15] 研究显示,KMV 对 α-KGDHC 活性抑制呈浓度及时间依赖性。α-KGDHC 活性抑制导致细胞色素 C 释放和 caspase-3 激活,诱导细胞凋亡,大鼠海马 CA1 区注射 KMV 后学习能力显著受损。本研究结果显示,TBI 后 24、72 h 及 7 d,TBI-KMV 组大鼠大脑皮层、海马及丘脑组织中 α-KGDHC 活性显著低于 TBI 组和 TBI-溶剂对照组;另外,TBI 组和 TBI-溶剂对照组大鼠神经功能评分显著低于假手术组,TBI-KMV 组大鼠神经功能评分显著低于 TBI-溶剂对照组和 TBI 组;TBI 组和 TBI-溶剂对照组大鼠登台时间及登台累计距离显著长于假手术组,TBI-KMV 组大鼠登台时间及登台累计距离显著长于 TBI-溶剂对照组和 TBI 组;TBI 后 72 h,TBI 组和 TBI-溶剂对照组大鼠损伤侧大脑皮层、海马和丘脑坏死神经元数显著多于假手术组,TBI-KMV 组大鼠损伤侧大脑皮层、海马和丘脑坏死神经元数显著多于 TBI 组和 TBI-溶剂对照组;提示 KMV 可以显著抑制 α-KGDHC 活性,诱导神经元凋亡,损伤大鼠神经功能。CHEN 等^[16] 研究发现,KMV 能够减少 21、60 日龄大鼠大脑皮层谷氨酸的重吸收,对神经元产生兴奋性毒性作用。BUBBER 等^[17] 研究发现,大脑皮层 α-KGDHC 活性导致的情绪、学习及记忆能力受损与精神疾病的发生及发展相关,α-KGDHC 活性降低不仅存在于易损区,在无病理学病变的脑区酶活性也有下降,酶活性改变的播散加重了易损区的损伤,复合体 I 及 α-KGDHC 活性改变影响了电子传递链及腺苷三磷酸合成,这是神经元损伤的重要机制。

综上所述,TBI 大鼠脑组织中 α-KGDHC 活性降低,抑制 α-KGDHC 活性可损害大鼠神经功能、学习及记忆能力,加重脑损伤,α-KGDHC 可能参与了 TBI 和 SBI 的发生与发展,α-KGDHC 有望成为 TBI 的潜在治疗靶点。

参考文献:

[1] LU Z F,LI B,QIAO P,*et al.* Surgical treatment of traumatic bifrontal contusions:when and how[J]. *World Neurosurg*,2016,93(3):261-269.

[2] ABRAHAMSON E E,IKONOMOVIC M D. Brain injury-induced dysfunction of the blood brain barrier as a risk for dementia[J]. *Exp Neurol*,2020,328(2):113257-113263.

[3] ZHU B,EOM J,HUNT R F. Transplanted interneurons improve memory precision after traumatic brain injury[J]. *Nat Commun*,2019,10(1):5156-5162.

[4] RAMOS-CEJUDO J,WISNIEWSKI T,MARMAR C,*et al.* Traumatic brain injury and Alzheimer's disease:the cerebrovascular link[J]. *EBio Med*,2018,28(5):21-30.

[5] MENDEZ M F. What is the relationship of traumatic brain injury to dementia[J]. *J Alzheimers Dis*,2017,57(3):667-681.

[6] 陆兆丰,贾锋,邱永明,等. 亚低温对创伤性脑损伤后线粒体 α-酮戊二酸脱氢酶活性的影响[J]. *中华神经外科杂志*,2006,22(11):659-662.

[7] 夏天光,孔宪斌,王明丽,等. 光遗传技术调控新生神经元电活动对颅脑损伤小鼠认知功能的影响[J]. *新乡医学院学报*,2018,35(10):858-864.

[8] LAZZARIO G,AMORINI A M,SIGNORETTI S,*et al.* Pyruvate dehydrogenase and tricarboxylic acid cycle enzymes are sensitive targets of traumatic brain injury induced metabolic derangement[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(22):E5774-E5786.

[9] SHI Q,XU H,YU H,*et al.* Inactivation and reactivation of the mitochondrial α-ketoglutarate dehydrogenase complex[J]. *J Biol Chem*,2011,286(20):17640-17648.

[10] CHEN H,DENTON T T,XU H,*et al.* Reductions in the mitochondrial enzyme αketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegenerative disease-beneficial or detrimental[J]. *J Neurochem*,2016,139(5):823-838.

[11] BANERJEE K,MUNSHI S,XU H,*et al.* Mild mitochondrial metabolic deficits by α-ketoglutarate dehydrogenase inhibition cause prominent changes in intracellular autophagic signaling:Potential role in the pathobiology of Alzheimer's disease[J]. *Neurochem Int*,2016,96(2):32-45.

[12] LOONEN A J,WILFFERT B,IVANOVA S A. Putative role of pharmacogenetics to elucidate the mechanism of tardive dyskinesia in schizophrenia[J]. *Pharmacogenomics*,2019,20(17):1199-1223.

[13] LAI J C,WHITE B K,BUERSTATTE C R,*et al.* Chronic hypoxia in development selectively alters the activities of key enzymes of glucose oxidative metabolism in brain regions[J]. *Neurochem Res*,2003,28(6):933-940.

[14] PANDYA J D,LEUNG L Y,YANG X,*et al.* Comprehensive profile of acute mitochondrial dysfunction in a preclinical model of severe penetrating TBI[J]. *Front Neurol*,2019,32(10):605-615.

[15] HUANG H M,OU H C,CHEN H L,*et al.* Protective effect of α-keto-β-methyl-n-valeric acid on BV-2 microglia under hypoxia or oxidative stress[J]. *Ann NY Acad Sci*,2005,1042(3):272-278.

[16] CHEN Z,ZHONG C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism:implications for diagnostic and therapeutic strategies[J]. *Prog Neurobiol*,2013,108(5):21-43.

[17] BUBBER P,HARTOUNIAN V,GIBSON G E,*et al.* Abnormalities in the tricarboxylic acid (TCA) cycle in the brains of schizophrenia patients[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*,2011,21(3):254-260.

(本文编辑:徐自超)