

长时程亚低温联合复方脑肽节苷脂注射液对 颅脑创伤大鼠的神经行为学影响

赵万勇¹, 徐书刚¹, 王景景², 李晓红³, 孙洪涛²

摘要 **目的** 探讨长时程亚低温(MHT)联合复方脑肽节苷脂注射液(CPCGI)治疗对颅脑创伤(TBI)大鼠的神经行为学影响及其作用机制。**方法** 36只健康成年雄性SD大鼠随机均分为模型组、MHT组、CPCGI组和MHT+CPCGI组。采用电子可控性皮质损伤装置制备TBI大鼠模型,模型组大鼠腹腔注射等量生理盐水(NS, 2 ml/kg)并给予常温(37℃)治疗48 h, MHT组大鼠腹腔注射等量NS并给予亚低温(33.0±1.0)℃治疗48 h, CPCGI组大鼠腹腔注射等量CPCGI(0.6 ml/kg)并给予常温治疗48 h, MHT+CPCGI组大鼠腹腔注射等量CPCGI并给予亚低温治疗48 h;通过神经功能缺损评分评估大鼠的感觉运动功能, Morris水迷宫实验检测大鼠的运动和空间记忆能力, 横杆跑动实验和斜坡爬壁实验评估大鼠的运动功能;尼氏染色观察海马神经元数量的变化;采用免疫荧光法检测微管相关蛋白(DCX)和神经元特异性核蛋白(NeuN)表达情况;采用免疫印迹法检测B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达情况。**结果** 与MHT组和CPCGI组相比, MHT+CPCGI组小鼠神经功能缺损评分更低, 逃避潜伏期时间更短, 跨越平台次数和目标象限所占时间百分比更高, BWT评分更高, 爬坡角度更大, 神经元数量、DCX和NeuN阳性细胞数量增多, 同时Bcl-2表达量增加, Bax和Caspase-3表达量降低($P < 0.05$)。**结论** 长时程亚低温联合CPCGI治疗通过促进神经再生、抑制细胞凋亡有效改善TBI大鼠的神经行为学缺陷, 为TBI的临床治疗提供潜在的策略和依据。

关键词 亚低温; 复方脑肽节苷脂; 颅脑创伤; 神经行为; 神经元; 凋亡

中图分类号 R 651.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0448-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.013

颅脑创伤(trumatic brain injury, TBI)是导致

人类死亡和致残的主要原因之一, 给社会和家庭带来了沉重的负担^[1-2]。亚低温(mild hypothermia, MHT)通过减轻脑水肿, 保护血脑屏障, 促进内源性神经再生, 减轻炎症反应和抑制神经元细胞凋亡等作用机制, 在临床研究和动物实验中均表现出一定的治疗作用^[3-4]。复方脑肽节苷脂注射液(compound porcine cerebroside and ganglioside injection, CPCGI)是一种神经营养药物, 参与神经元的生长、分化和再生, 促进血液循环和新陈代谢^[5], 已广泛用于脑缺血和阿尔茨海默病的治疗中^[6-7]。

最近发现长时程的MHT疗法在TBI的治疗中具有更积极的神经保护作用^[8], 同时有研究^[9]表明CPCGI通过控制内源性细胞防御氧化应激机制发挥脑损伤后的保护效应, 然而长时程MHT疗法联合CPCGI的治疗研究相对较少。因此, 该文旨在探讨长时程MHT联合复方脑肽节苷脂治疗对TBI大鼠的神经行为学影响并研究其可能的作用机制, 以期作为TBI的临床治疗提供新的策略和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 复方脑肽节苷脂注射液(吉林步长制药有限公司, 货号:210322), 微管相关蛋白(doublecortin, DCX)抗体、神经元特异性核蛋白(neuronal nuclear, NeuN)抗体、B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体、半胱氨酸蛋白酶-3(cysteine proteinase-3, Caspase-3)抗体(美国Proteintech公司, 货号:2088476、20880708、2227948、2061561、2876892), 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(德国Sigma公司, 货号:SAB4701040、D9542), 山羊抗兔二抗IgG(美国Abcam公司, 货号:WK364), 488荧光二抗、568荧光二抗(美国Invitrogen公司, 货号:A-11008、A-21124), BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司, 货号:23225), 水合氯醛、多聚甲醛(天津索罗门生物科技有限公司, 货

2024-01-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:32070791)

作者单位:¹ 山东大学齐鲁医院德州医院神经外科, 德州 253014

² 武警特色医学中心神经创伤修复研究所, 天津 300162

³ 天津大学医学工程与转化医学研究院, 天津 300350

作者简介:赵万勇, 男, 主治医师;

孙洪涛, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: chenmo333@163.com

号:110432、163101)。

1.1.2 主要仪器 亚低温治疗仪(中国珠海黑马公司,型号:T1型),电子可控性皮质损伤装置(美国 Custom Design & Fabrication 公司,型号:eCCI),Morris 水迷宫设备(淮北正华生物仪器设备公司,型号:BW-MWM101),冰冻切片机、倒置荧光显微镜(德国 LEICA 公司,型号:HS-1205、MHY-28315),转膜仪(美国 BIO-RAD 公司,型号:DBZY)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组 36 只健康成年雄性 SD 大鼠[许可证号:SCXK(京)2019-0010]由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,体质量为(220 ± 10)g,室温 20 ~ 24 °C,相对湿度 55% ~ 60%,光照时间 7:00—19:00,大鼠在动物房适应性饲养 7 d 后开始实验。随机数字表法将大鼠随机分为 TBI 模型组、仅给予 MHT 治疗(MHT)组、仅给予 CPCGI 治疗(CPCGI)组、同时给予 MHT 和 CPCGI 治疗(MHT + CPCGI)组,每组 9 只。

1.2.2 TBI 模型的制备 根据既往造模方法^[10]进行造模,所有大鼠造模前 12 h 禁食,按 50 mg/100 g 经腹腔注射 5% 水合氯醛进行麻醉,然后将其俯卧位固定于立体定向头架上,头部备皮消毒完毕后于中线切开头皮,剥离骨膜暴露右侧顶骨。以前囟为原点,向后 1.5 ~ 2.0 mm 旁开 1.2 mm 为圆心,颅钻钻孔磨开 5 mm 直径骨窗,暴露硬脑膜并保持其完整。各组分别通过电子可控性皮质损伤(electronic controllable cortical injury, eCCI)装置,按照深度 1.6 mm,撞击速度 4.5 m/s,停留时间 120 ms 给予钻孔部位打击损伤。大鼠造模后连续 5 d 腹腔注射 BrdU 用于标记新生有丝分裂细胞。

1.2.3 CPCGI 腹腔注射和亚低温治疗 将 CPCGI 溶于 0.9% 的生理盐水(normal saline, NS)中,TBI 造模后 TBI 模型组大鼠腹腔注射等量 NS(2 ml/kg)并予以常温(37 °C)治疗 48 h,MHT 组大鼠腹腔注射等量 NS 并予以亚低温(33.0 ± 1.0)°C 治疗 48 h,CPCGI 组大鼠腹腔注射等量 CPCGI^[9]并予以常温治疗 48 h,MHT + CPCGI 组大鼠腹腔注射等量 CPCGI 并予以亚低温治疗 48 h。

1.2.4 行为学实验

1.2.4.1 大鼠改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS) 参照文献^[11]建立的 mNSS 评分量表,TBI 大鼠腹腔注射 BrdU 结束后 3 d 对各组大鼠进行感觉、运动、提尾、平衡木和反射评分。根据评分量表,缺少一项反射或者动物

不能完成一项任务给 1 分。

1.2.4.2 Morris 水迷宫实验 各组大鼠游泳训练达标后 1 周进行水迷宫实验,记录每只大鼠入水寻找隐藏在水面下的平台的平均时间(即逃避潜伏期);各组大鼠由距平台最远的象限入水点头朝池壁放入水中,记录 90 s 内穿越平台的次数,并记录统计其在目标象限(即平台所在象限)的百分率。

1.2.4.3 横杆跑动实验(beam walking test, BWT)和斜坡爬壁实验 TBI 大鼠腹腔注射 BrdU 结束后 3 d 给予声光刺激测试大鼠在有障碍物的杠杆跑道上行进的距离,行走距离的评分标准为:0 分表示无法行走,1 ~ 4 分表示距起点 20、40、60、80 cm 的距离,5 分表示穿过整个跑道进入暗盒中,分别记录各组大鼠的得分情况;同时记录各组大鼠在木板 2 个不同的位置可以维持躯体 5 s 时木板和地面形成的最大角度,每组大鼠进行 3 次评分,最终取平均值。

1.2.5 尼氏染色 大鼠断头取材后,取脑皮质损伤区组织用甲醛固定后进行石蜡包埋。石蜡包埋组织行冠状切片后用二甲苯脱蜡并进行梯度乙醇水化,然后将切片用尼氏染色液染色 5 min,染色后再经脱水和透明后进行封片镜检。取相应海马 CA3 区作为观察区域,在 400 倍视野下随机选取 3 个视野,分别计数显示神经元细胞数,最后算出 3 个视野的平均细胞数。

1.2.6 免疫荧光染色检测大鼠脑组织中 DCX、BrdU 和 NeuN 表达水平 本研究使用 BrdU 标记新生细胞反映神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖,并对成熟神经元进行抗 NeuN 抗体标记。大鼠断头取材,4% 甲醛溶液固定 24 h。使用冰冻切片机按 25 μm 厚度进行切片,滴加一抗 DCX(1:100)、BrdU(1:100)和 NeuN(1:200)室温孵育 1 h,滴加 488 荧光二抗(1:200)和 568 荧光二抗(1:200)室温孵育 30 min 后检测免疫反应。取相应海马区作为观察区域,在 400 倍视野下随机选取 3 个视野,分别计数 DCX 和 NeuN 荧光阳性的细胞数,最后算出 3 个视野的平均 DCX 和 NeuN 阳性细胞数,同理计算 NeuN/BrdU 双标记阳性细胞数。

1.2.7 Western blot 检测大鼠脑组织中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达 大鼠断头取脑,在冰浴中快速将损伤侧脑组织加入细胞裂解液中,组织经匀浆破碎后,用 BCA 法进行蛋白定量,10% SDS-PAGE 凝胶电泳,NC 转膜。杂交步骤如下:5% 脱脂牛奶封闭 NC 膜 1 h,1 × TBST 洗 10 min × 3 次,然后室温下与 Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:2 000)和 Caspase-3

(1 : 600) 杂交反应 1 h, TBST 漂洗同前。再将 NC 膜与山羊抗兔二抗 IgG(1 : 2 000) 在室温下杂交反应 1 h, 最后用 TBST 洗 NC 膜 10 min × 3 次。NC 膜滴加 1 : 1 配制的显影 A 液和 B 液, 利用 BIO-RAD 凝胶成像系统进行显影。使用 ScnImage 软件进行目的蛋白和内参的灰度值测定, 得出目的蛋白相对灰度值。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 23.0 统计软件进行数据处理, 正态分布的计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两组间多重比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能缺损评分结果 为了评估大鼠的感觉运动等功能的恢复情况, 于 TBI 大鼠腹腔注射 BrdU 结束后 3 d 对大鼠进行神经功能缺损评分。TBI 模型组、MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组 mNSS 评分分别为 (9.76 ± 1.63)、(6.33 ± 1.26)、(7.64 ± 1.65) 和 (5.03 ± 1.32)。与 TBI 模型组相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组神经功能缺损评分均降低 ($t_{\text{MHT}} = 4.99$, $t_{\text{CPCGI}} = 2.74$, $t_{\text{MHT+CPCGI}} = 6.77$, 均 $P < 0.05$), 与 MHT 组和 CPCGI 组相比, MHT + CPCGI 组评分均降低 ($t = 2.14$ 、 3.71 , 均 $P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果 与 TBI 模型组相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组逃避潜伏期时间不同程度缩短 ($t = 10.32$ 、 5.66 、 14.00 , 均 $P < 0.05$), 与 MHT 组和 CPCGI 组相比, MHT + CPCGI 组逃避潜伏期时间更短 ($t = 4.23$ 、 6.91 , 均 $P < 0.05$); 与 TBI 模型组相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组跨越平台次数不同程度升高 ($t = 5.99$ 、 3.60 、 7.94 , 均 $P < 0.01$), 与 MHT 组和 CPCGI 组相比, MHT + CPCGI 组跨越平台次数更高 ($t = 2.51$ 、 2.98 , 均 $P < 0.05$); 与 TBI 模型组相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组目标象限所占时间百分比不同程度升高 ($t = 5.32$ 、 6.13 、 8.58 , 均 $P < 0.05$), 与 MHT 组和 CPCGI 组相比, MHT + CPCGI 组目标象限所占时间百分比更高 ($t = 3.73$ 、 5.17 , 均 $P < 0.05$)。见表 1。

2.3 各组大鼠 BWT 和斜坡爬壁实验结果 在 BWT 中, 与 TBI 模型组大鼠相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组大鼠的 BWT 评分均有提高 ($t = 7.38$ 、 4.20 、 8.57 , 均 $P < 0.05$), 与 MHT 组和 CPCGI

组相比, MHT + CPCGI 组的 BWT 评分均有提高 ($t = 2.25$ 、 4.58 , 均 $P < 0.05$)。在斜坡爬壁实验中, 与 TBI 模型组大鼠相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组大鼠的爬坡角度均有所增加 ($t = 5.54$ 、 6.70 、 14.20 , 均 $P < 0.05$), 而 MHT + CPCGI 组的爬坡角度更大 ($t = 9.43$ 、 5.16 , 均 $P < 0.05$)。见表 2。

表 1 各组大鼠逃避潜伏期、跨越平台次数和目标象限所占时间百分比的比较 ($n = 9$, $\bar{x} \pm s$)

组别	逃避潜伏期 (s)	跨越平台次数	目标象限所占时间百分比 (%)
TBI 模型	70.69 ± 6.43	2.2 ± 0.92	16.52 ± 3.65
MHT	43.53 ± 4.58 *	5.1 ± 0.99 *	27.34 ± 4.89 *
CPCGI	53.10 ± 6.76 *	4.3 ± 1.49 *	25.60 ± 2.53 *
MHT + CPCGI	34.72 ± 4.25 *# Δ	5.9 ± 1.20 *# Δ	37.20 ± 6.24 *# Δ
F 值	67.76	16.59	31.32
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与 TBI 模型组比较: * $P < 0.01$; 与 MHT 组比较: # $P < 0.05$; 与 CPCGI 组比较: $\Delta P < 0.05$

表 2 各组大鼠 BWT 评分和爬坡角度比较 ($n = 9$, $\bar{x} \pm s$)

组别	BWT 评分	爬坡角度
TBI 模型	1.2 ± 0.79	19.67 ± 3.12
MHT	3.4 ± 0.52 *	33.89 ± 5.53 *
CPCGI	2.6 ± 0.70 *	28.22 ± 3.38 *
MHT + CPCGI	4.0 ± 0.67 *# Δ	46.33 ± 4.67 *# Δ
F 值	32.20	61.03
P 值	<0.001	<0.001

与 TBI 模型组比较: * $P < 0.01$; 与 MHT 组比较: # $P < 0.05$; 与 CPCGI 组比较: $\Delta P < 0.05$

2.4 各组大鼠海马 CA3 区神经元细胞数表达结果

尼氏染色结果显示, 在 TBI 模型组可见大鼠海马 CA3 区神经元明显缺失和损伤, 与 TBI 模型组相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组海马 CA3 区神经元细胞数量增多 ($t = 5.93$ 、 2.44 、 12.87 , 均 $P < 0.05$); 与 MHT 组和 CPCGI 组相比, MHT + CPCGI 组神经元细胞数量增多 ($t = 4.75$ 、 10.21 , 均 $P < 0.05$)。见图 1。

2.5 各组大鼠 DCX 和 NeuN 阳性细胞数表达结果

与 TBI 模型组相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组 DCX 阳性细胞数量增多 ($t = 9.15$ 、 3.61 、 11.15 , 均 $P < 0.05$); 与 MHT 组和 CPCGI 组相比, MHT + CPCGI 组 DCX 阳性细胞数量增加 ($t = 4.27$ 、 6.83 , 均 $P < 0.05$)。见图 2。与 TBI 模型组相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组 NeuN 阳性细胞数量增多 ($t = 2.83$ 、 2.21 、 4.89 , 均 $P < 0.05$); 与

MHT 组和 CPCGI 组相比, MHT + CPCGI 组 NeuN 阳性细胞数量增加 ($t = 2.35, 2.85$, 均 $P < 0.05$), 与

MHT 组相比, MHT + CPCGI 组 NeuN/BrdU 双标记阳性细胞数量增加 ($t = 8.42, P < 0.05$)。见图 3。

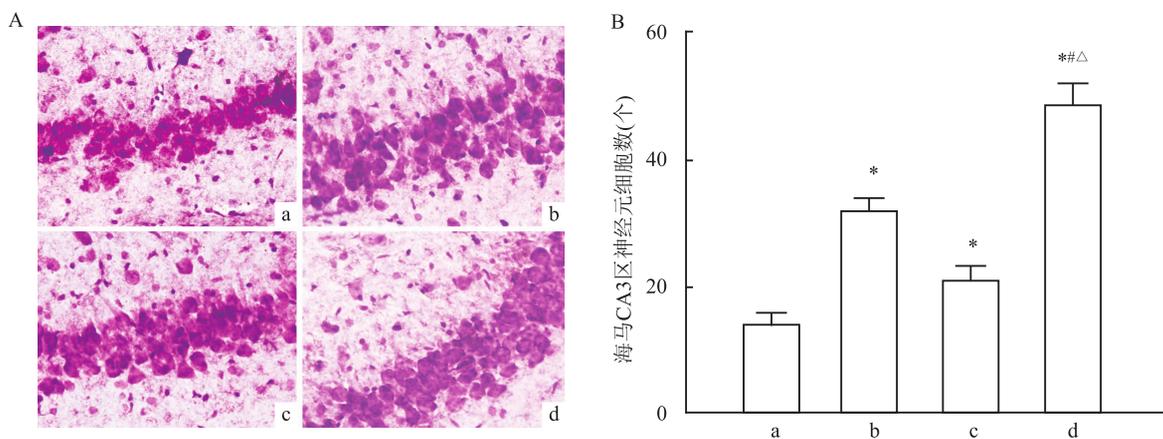


图1 各组大鼠海马 CA3 区尼氏染色结果 ×200

a: 模型组; b: MHT 组; c: CPCGI 组; d: MHT + CPCGI 组; 与 TBI 模型组比较: * $P < 0.05$; 与 MHT 组比较: # $P < 0.01$; 与 CPCGI 组比较: Δ $P < 0.01$

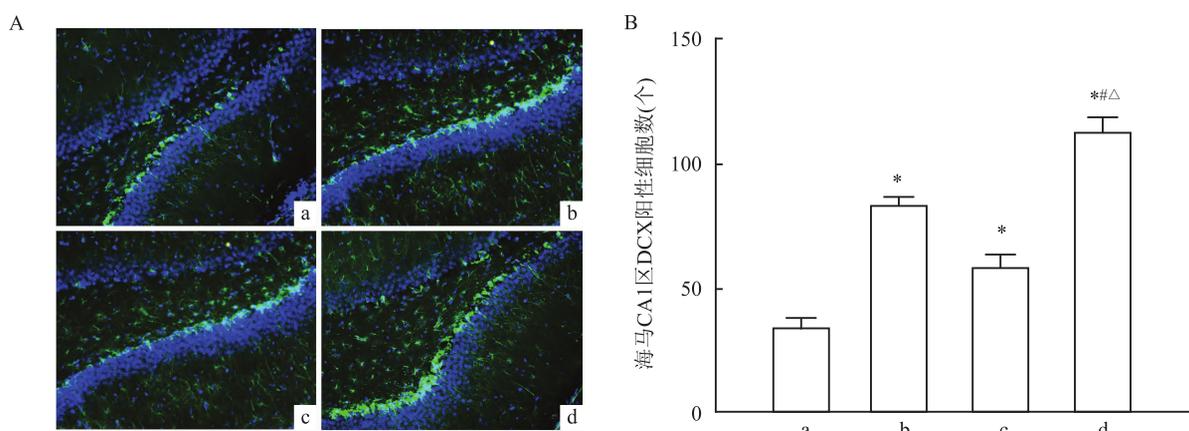


图2 各组大鼠 DCX 免疫荧光染色结果 ×200

a: TBI 模型组; b: MHT 组; c: CPCGI 组; d: MHT + CPCGI 组; 与 TBI 模型组比较: * $P < 0.01$; 与 MHT 组比较: # $P < 0.05$; 与 CPCGI 组比较: Δ $P < 0.05$

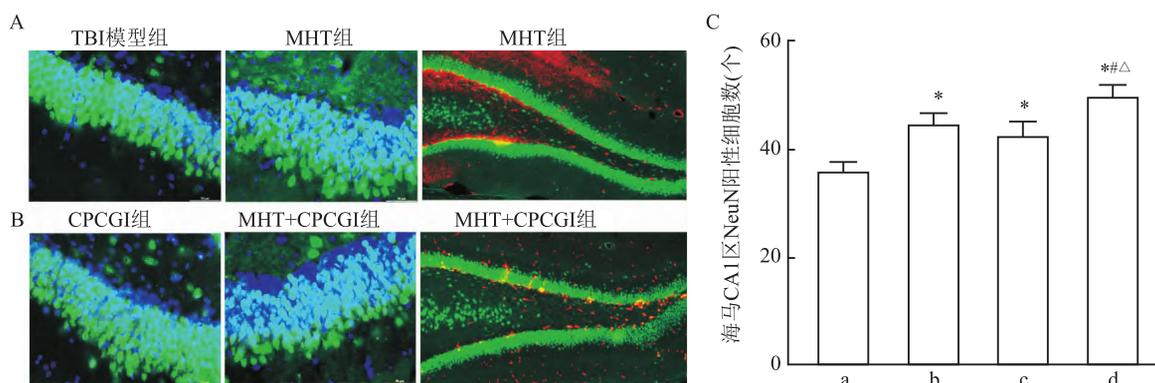


图3 各组大鼠 NeuN 和 NeuN/BrdU 共标免疫荧光染色结果

A: 各组大鼠 NeuN 免疫荧光染色图 ×400; B: 大鼠 NeuN/BrdU 共标免疫荧光染色图 ×200; C: 各组海马 CA1 区 NeuN 阳性细胞数的比较; a: TBI 模型组; b: MHT 组; c: CPCGI 组; d: MHT + CPCGI 组; 与 TBI 模型组比较: * $P < 0.01$; 与 MHT 组比较: # $P < 0.01$; 与 CPCGI 组比较: Δ $P < 0.01$

2.6 各组大鼠 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达结果

与 TBI 模型组相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组 Bcl-2 蛋白表达量增加 ($t = 5.78、3.91、6.47$, 均 $P < 0.01$); 与 MHT 组和 CPCGI 组相比, MHT + CPCGI 组 Bcl-2 表达量增加 ($t = 2.23、4.78$, 均 $P < 0.05$); 与 TBI 模型组相比, MHT 组、CPCGI 组和 MHT + CPCGI 组 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达量降低 ($t_{Bax} = 3.20、2.39、7.45$, $t_{Caspase-3} = 4.68、4.31、9.66$, 均 $P < 0.05$); 与 MHT 组和 CPCGI 组相比, MHT + CPCGI 组 Bax 和 Caspase-3 表达量降低 ($t_{Bax} = 2.14、5.15$, $t_{Caspase-3} = 3.14、6.63$, 均 $P < 0.05$)。Bcl-2 具有抗细胞凋亡的作用, Bax 具有促细胞凋亡的作用, Caspase-3 是介导细胞凋亡的一类蛋白水解酶, 以上结果提示 MHT + CPCGI 组能进一步上调 Bcl-2 表达, 下调 Bax 和 Caspase-3 表达从而抑制细胞凋亡。见图 4。

3 讨论

MHT 疗法已成为 TBI 的重要治疗手段之一, 因其诱导时机、持续时间以及复温速度等没有统一的执行标准且缺乏个体化的治疗^[12], 目前治疗效果依旧存在争议。研究^[13]表明, 通过延长 MHT 治疗时间至超过 48 h, 并根据颅内压的情况个体化选择复温时间, 能有效改善预后。基于此研究, 本研究选取 48 h 的治疗时间作为长时程的治疗模式来开展研

究, 结果显示, 与 TBI 模型组比较, MHT 组大鼠的神经功能缺损评分降低, 进一步证明了长时程 MHT 对神经的保护作用。

长时程 MHT 治疗能够导致凝血功能障碍、低血容量、电解质异常和感染风险增加^[8], 长期持续低温状态产生的副作用可能掩盖了一部分积极的治疗效果。神经营养药物目前广泛应用于临床, 在一定程度上能够促进脑细胞代谢以及神经修复。CPCGI 主要组份包括多肽、神经节苷脂、次黄嘌呤等, 其作为神经保护剂能够通过血脑屏障刺激核因子-E2 相关因子 2 信号通路, 减轻氧化应激和抑制钙蛋白酶过度激活等, 对 TBI 具有脑保护作用^[9]。本研究通过长时程 MHT 联合 CPCGI 的治疗以期弥补长时程 MHT 产生副作用的缺陷, 结果表明两者联合治疗显示出更积极的治疗作用。

TBI 的神经功能缺损涉及多种病理机制, 有效的治疗应能够抑制继发性损伤并扩大内源性神经可塑性, 抑制细胞凋亡的发生^[14]。海马区是神经发生的重要部位, 与大脑学习记忆等功能密切相关, 因此研究 TBI 诱导的海马区神经发生对神经功能缺损修复的潜在影响十分必要。微管相关蛋白 (doublecortin, DCX) 作为在齿状回由神经干细胞向神经元前体细胞分化的标志物, 在神经再生过程中高度表达。本研究结果显示, 与 MHT 组和 CPCGI 组相比, 在 MHT + CPCGI 组, DCX 和 NeuN 阳性细胞数明显升

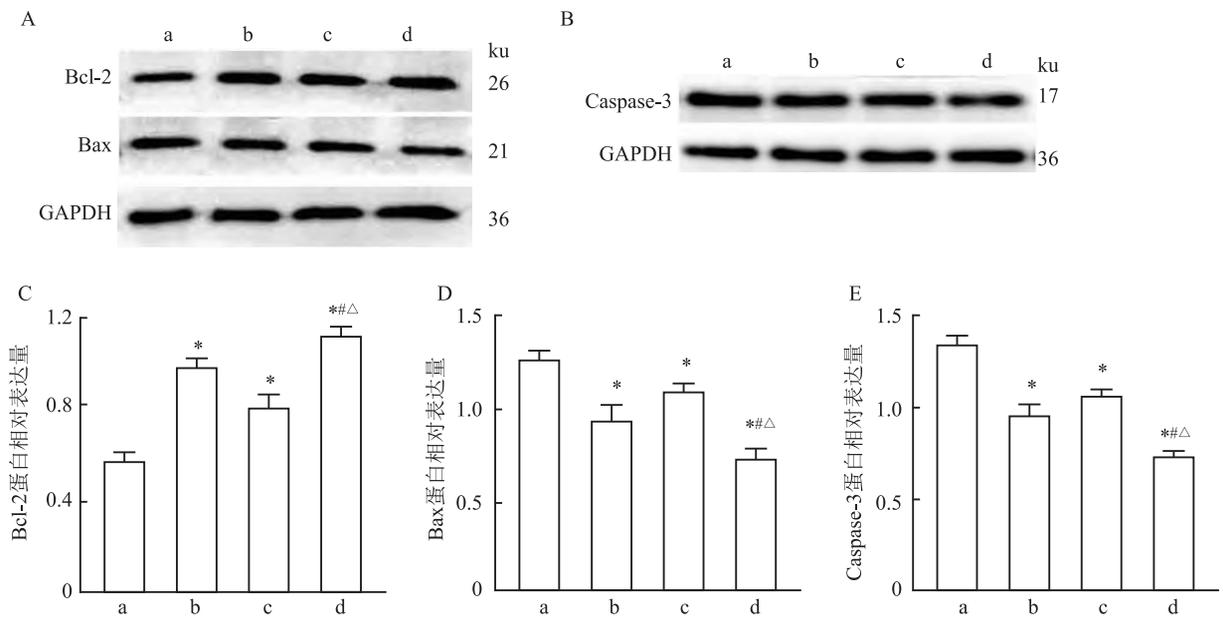


图4 各组大鼠 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的比较

A、B: Western blot 检测结果; C-E: 各组 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达量的比较; a: TBI 模型组; b: MHT 组; c: CPCGI 组; d: MHT + CPCGI 组; 与 TBI 模型组比较: * $P < 0.05$; 与 MHT 组比较: # $P < 0.05$; 与 CPCGI 组比较: Δ $P < 0.05$

高,在尼氏染色中同样发现 MHT + CPCGI 组海马区神经元数量最多,表明长时程 MHT 联合 CPCGI 能够明显促进神经元的生长、增殖和分化进而提高大鼠的行为表现能力。

由 Bcl-2 蛋白家族构成的内源性凋亡通路在 TBI 后细胞凋亡的调控中起到重要作用,研究^[15]表明,细胞凋亡是一个复杂的级联过程,多种凋亡通路在其中起着重要作用,通过调节 Bcl-2/Bax/Caspase-3 凋亡信号通路减少皮质神经元的变性和凋亡,这可能是其神经保护作用的重要机制之一。本研究结果显示,TBI 能够下调 Bcl-2 表达,上调 Bax 表达,进而降低 Bcl-2/Bax 比值,而 MHT 和 CPCGI 能够逆转 Bcl-2/Bax 比值,进一步抑制 Caspase-3 活化阻碍细胞凋亡的发生;MHT + CPCGI 组能够进一步上调 Bcl-2 蛋白表达水平,下调 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平,从而有效地抑制凋亡通路 Caspase 的级联反应,阻碍程序性凋亡的发生。因此推测,联合治疗通过调节受损细胞的凋亡通路发挥神经保护作用,最终改善大鼠的神经功能缺失。

综上所述,长时程 MHT 联合 CPCGI 治疗能够促进神经再生和抑制细胞凋亡,有效改善 TBI 大鼠的神经行为学表现,为 TBI 临床治疗提供潜在的策略和依据。然而人类大脑的进化程度更高,动物缺乏和人类相同的解剖结构,且颅脑损伤机制较为单一,因此长时程的治疗时间也并不完全等同于临床治疗的实际时间。在后续的实验过程中,应根据治疗时间梯度展开研究,明确 MHT 治疗的时间因素对实验结果的影响,从而更好地为临床治疗提供理论依据。鉴于目前研究的局限性,未来还需开展大规模的前瞻性临床队列研究,以期更好地指导临床治疗实践。

参考文献

- [1] Maas A I R, Menon D K, Manley G T, et al. Traumatic brain injury: progress and challenges in prevention, clinical care, and research[J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(11):1004-60.
- [2] Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic brain injury: an overview of epidemiology, pathophysiology, and medical management[J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2):213-38.
- [3] Baker T S, Durbin J, Troiani Z, et al. Therapeutic hypothermia for intracerebral hemorrhage: systematic review and meta-analysis of the experimental and clinical literature[J]. *Int J Stroke*, 2022, 17(5):506-16.
- [4] Cui H, Yang Z, Xiao P, et al. Effects of different target temperatures on angiogenesis and neurogenesis following resuscitation in a porcine model after cardiac arrest[J]. *Shock*, 2021, 55(1):67-73.
- [5] Song H, Xun S, He H, et al. Compound porcine cerebroside and ganglioside injection (CPCGI) attenuates sevoflurane-induced nerve cell injury by regulating the phosphorylation of p38 map kinase (p38MAPK)/nuclear factor kappa B (NF-κB) pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26:e919600.
- [6] Wang M, Zhang Y, Feng L, et al. Compound porcine cerebroside and injection attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by targeting multiple cellular processes[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2017, 13:927-35.
- [7] Wang X, Zhao J. Neuroprotective effect of CPCGI on Alzheimer's disease and its mechanism[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1):115-22.
- [8] Trieu C, Rajagopalan S, Kofke W A, et al. Overview of hypothermia, its role in neuroprotection, and the application of prophylactic hypothermia in traumatic brain injury[J]. *Anesth Analg*, 2023, 137(5):953-62.
- [9] Niu F, Qian K, Qi H, et al. Antiapoptotic and anti-inflammatory effects of CPCGI in rats with traumatic brain injury[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16:2975-87.
- [10] Zhao W Y, Chen S B, Wang J J, et al. Establishment of an ideal time window model in hypothermic-targeted temperature management after traumatic brain injury in rats[J]. *Brain Res*, 2017, 1669:141-9.
- [11] Wang Z, Yao W, Deng Q, et al. Protective effects of BDNF overexpression bone marrow stromal cell transplantation in rat models of traumatic brain injury[J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 49(2):409-16.
- [12] Wassink G, Davidson J O, Dhillon S K, et al. Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(2):2.
- [13] Maas A, Stocchetti N, et al. Hypothermia and the complexity of trials in patients with traumatic brain injury[J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10(2):111-3.
- [14] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging potential of exosomes for treatment of traumatic brain injury[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(1):19-22.
- [15] Zhang Y, Yang X, Ge X, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:726-33.

Neurobehavioral effects of long-term mild hypothermia combined with compound porcine cerebroside and ganglioside injection after traumatic brain injury in rats

Zhao Wanyong¹, Xu Shugang¹, Wang Jingjing², Li Xiaohong³, Sun Hongtao²

(¹Dept of Neurosurgery, Qilu Hospital of Shandong University Dezhou Hospital, Dezhou 253014; ²Neurotrauma Repair Research Institute, Characteristic Medical Center of People's Armed Police Forces, Tianjin 300162;

³Institute of Medical Engineering and Translational Medicine, Tianjin University, Tianjin 300350)

Abstract Objective To investigate the neurobehavioral effects of long-term mild hypothermia (MHT) combined with compound porcine cerebroside and ganglioside injection (CPCGI) after traumatic brain injury (TBI) in rats and its mechanism. **Methods** 36 healthy adult male SD rats were randomly divided into model group, MHT group, CPCGI group and MHT + CPCGI group. The TBI model was prepared using an electronically controlled cortical injury device. The rats in model group received an intraperitoneal injection of an equal amount of normal saline (NS, 2 ml/kg) and were treated at room temperature (37 °C) for 48 hours. The rats in MHT group received an intraperitoneal injection of an equal amount of NS and were treated at a slightly low temperature (33.0 ± 1.0) °C for 48 hours. The rats in CPCGI group received an intraperitoneal injection of an equal amount of CPCGI (0.6 ml/kg) and were treated at room temperature for 48 hours. The rats in MHT + CPCGI group received an intraperitoneal injection of an equal amount of CPCGI and were treated at a slightly low temperature for 48 hours. The sensorimotor function of rats was evaluated by modified Neurological Severity Score (mNSS). The motor and spatial memory abilities of rats were detected by Morris water maze test, and the motor function of rats was evaluated by beam walking test (BWT) and inclined-grid climbing test. The number of neurons in hippocampus was observed by Nissl staining and immunofluorescence was used to detect the expression of doublecortin (DCX) and neuronal nuclear antigen antibody (NeuN). Western blot was used to observe the protein expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and cysteine proteinase-3 (Caspase-3). **Results** Compared with MHT group and CPCGI group, MHT + CPCGI group had a lower mNSS score, shorter escape latency, higher times across the platform and the percentage of time in the target quadrant, higher BWT score and larger climbing angle, increased numbers of neurons, DCX and NeuN positive cells, increased Bcl-2 expression and decreased expression of Bax and Caspase-3. ($P < 0.05$). **Conclusion** Long-term mild hypothermia combined with CPCGI can effectively improve the neurological deficits of TBI rats by promoting nerve regeneration and inhibiting cell apoptosis, and provide potential strategies and basis for the clinical treatment of TBI.

Key words mild hypothermia; compound porcine cerebroside and ganglioside injection; traumatic brain injury; neurobehavior; neurons; apoptosis