

# 海水浸泡对创伤性脑损伤小鼠转录组学图谱的影响及其机制

谢胜强<sup>1,2</sup>, 阿迪莱·阿卜杜热西提<sup>1,2</sup>, 黑俊如<sup>3</sup>, 宋梦文<sup>4,5</sup>, 王翠<sup>4</sup>, 程岗<sup>1,2,3</sup>, 刘志强<sup>4</sup>, 袁增强<sup>4</sup>, 张剑宁<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>华南理工大学医学院, 广东广州 510006; <sup>2</sup>解放军总医院第六医学中心神经外科, 北京 100048; <sup>3</sup>解放军总医院第一医学中心神经外科医学部, 北京 100853; <sup>4</sup>军事科学院军事医学研究院军事认知与脑科学研究所, 北京 100850; <sup>5</sup>南华大学药学院, 湖南衡阳 421001

[中图分类号] R651.15 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2382.2023.0326

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 谢胜强, 阿迪莱·阿卜杜热西提, 黑俊如, 等. 海水浸泡对创伤性脑损伤小鼠转录组学图谱的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(10): 1153-1161.

[收稿日期] 2022-11-11

[录用日期] 2023-02-03

[上线日期] 2023-03-26

**[摘要]** **目的** 观察海水浸泡后创伤性脑损伤(TBI)小鼠运动功能和脑组织转录组学图谱的变化, 探讨海水浸泡对TBI的影响及其潜在机制。**方法** 将51只雄性C57/BL成年小鼠随机分为假手术组、TBI组和TBI+海水组, 每组17只。在损伤后1 d、3 d和7 d采用行为学测试(转棒和平衡木试验)检测小鼠耐力及运动协调能力的变化; 于损伤后12 h和24 h进行血脑屏障通透性检测[伊文思蓝(EB)染色]、脑组织病理检测(HE染色); 损伤后24 h采用Western blotting检测脑组织凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax的表达水平, 进行脑组织转录组学检测并分析差异表达基因及其相关的信号通路。**结果** 损伤后1、3、7 d的行为学测试显示, 与假手术组和TBI组比较, TBI+海水组小鼠在转棒仪上的停留时间均明显缩短( $P<0.001$ ), 通过平衡木的时间均明显延长( $P<0.001$ )。EB染色结果显示, TBI+海水组EB渗透面积明显大于TBI组( $P<0.05$ ); 两组组内比较, 损伤后24 h EB渗透面积均明显小于损伤后12 h( $P<0.05$ )。HE染色结果显示, 与TBI组比较, TBI+海水组病理损伤加重。Western blotting检测结果显示, 与TBI组比较, 损伤后24 h, TBI+海水组小鼠损伤区域脑组织Bax表达水平明显增高( $P<0.05$ ), 而Bcl-2表达水平明显降低( $P<0.05$ )。转录组学分析显示, 与TBI组比较, TBI+海水组损伤区域脑组织有625个基因存在差异表达( $P<0.05$ ), 且p53相关基因和自然杀伤细胞相关基因的表达量均明显增高( $P<0.05$ ); 自然杀伤细胞免疫调节、淋巴细胞免疫调节和细胞因子-细胞因子受体结合等通路显著富集( $P<0.05$ )。**结论** 海水浸泡可促进TBI小鼠受损神经细胞凋亡, 导致小鼠运动协调能力和耐力受损, 其机制可能与p53介导的内源性凋亡和自然杀伤细胞介导的免疫调节有关。

**[关键词]** 创伤性脑损伤; 海水; 转录组; 自然杀伤细胞; p53蛋白

## Effects and mechanism of seawater immersion on transcriptome profiles in mice with traumatic brain injury

Xie Sheng-Qiang<sup>1,2</sup>, Abduljesit Adile S.<sup>1,2</sup>, Hei Jun-Ru<sup>3</sup>, Song Meng-Wen<sup>4,5</sup>, Wang Cui<sup>4</sup>, Cheng Gang<sup>1,2,3</sup>, Liu Zhi-Qiang<sup>4</sup>, Yuan Zeng-Qiang<sup>4</sup>, Zhang Jian-Ning<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China

<sup>2</sup>Department of Neurosurgery, the Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

<sup>3</sup>Department of Neurosurgery, the First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

<sup>4</sup>Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China

<sup>5</sup>School of Pharmaceutical Sciences, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

\*Corresponding author, E-mail: jnzhang2018@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81971168)

**[Abstract]** **Objective** To observe the changes of motor function and brain tissue transcriptomic profiles in mice with traumatic

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81971168)

**[作者简介]** 谢胜强, 硕士研究生, 主要从事创伤性脑损伤方面的研究

**[通信作者]** 张剑宁, E-mail: jnzhang2018@163.com

brain injury (TBI) by seawater immersion, and to explore its potential mechanism. **Methods** A total of 51 male C57/BL adult mice were randomly divided into sham surgery group, TBI group and TBI+seawater group (17 mice in each group). Behavior tests (rotating bar and balance beam tests) were performed at 1 d, 3 d and 7 d after injury to detect the changes of endurance and motor coordination ability in mice. Blood-brain barrier permeability (Evans blue staining) and brain tissue pathological changes (HE staining) were detected at 12 h and 24 h after injury. The expression levels of apoptosis-related proteins BCL-2 and Bax in brain tissues were detected with Western blotting 24 h after injury, and carry out brain tissue transcriptomics detection and analyze the related differentially expressed genes and signal pathways. **Results** Behavior tests showed that compared with the sham surgery group and TBI group, mice in TBI+seawater group had a significantly shortened time on the rotating bar ( $P<0.001$ ) and spend a significantly prolonged time to pass through the balance beam ( $P<0.001$ ) on 1 d, 3 d, and 7 d after injury. Evans blue staining showed that the EB permeation area of TBI+seawater group was significantly larger than that of the TBI group ( $P<0.05$ ), and the EB permeation area at 24 h after injury was significantly smaller than that at 12 h after injury in both groups ( $P<0.05$ ). HE staining results showed that the pathological damage in TBI+seawater group was worsened compared with TBI group. Western blotting results showed that 24 h after injury, the expression of Bax in TBI+seawater group was significantly increased ( $P<0.05$ ) while the expression of Bcl-2 was significantly decreased ( $P<0.05$ ) in injured brain tissue compared with TBI group. Transcriptomic analysis showed that there were 625 differentially expressed genes in the injured brain tissue of TBI+seawater group compared with TBI group ( $P<0.05$ ), and the expression levels of p53-related genes and natural killer cell-related genes were significantly increased ( $P<0.05$ ). Pathway enrichment analysis showed that natural killer cell immune regulation, lymphocyte immune regulation, and cytokine-cytokine receptor binding pathways were significantly enriched ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Seawater immersion can promote apoptosis of damaged neural cells in TBI mice, leading to impaired motor coordination and endurance in mice. Endogenous apoptosis mediated by p53 and immune regulation mediated by natural killer cells may be associated with this phenomenon.

[**Key words**] traumatic brain injury; seawater; transcriptome; natural killer cell; tumor protein 53

创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)是一种急性发展并可造成中枢神经系统不可逆性损伤的全球性疾病,发病率约700/10万,并呈逐年上升趋势<sup>[1-3]</sup>。在海上作业及海战条件下,TBI伤员可能面对海水浸泡的环境。由于海水的特殊作用,如低温、高盐(3.1%~3.4%)、高pH(8.0~8.4)及高渗透压(1250~1350 mOsm/L)等,导致TBI的病理生理过程更为复杂,使其防治面临更多难题<sup>[4-7]</sup>。以往针对海水浸泡+TBI的研究显示,细胞凋亡的发生可使神经功能显著下降<sup>[8-10]</sup>。本研究以神经科学领域广泛应用的C57小鼠作为研究对象,观察海水浸泡对TBI小鼠运动协调性、耐力以及脑神经组织病理损伤的影响,并基于基因转录组图谱的变化特征探讨其潜在靶点与作用机制,为海上环境TBI的救治研究提供参考。

## 1 材料与与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 转棒仪(意大利Ugo Basile公司);控制性脑皮质损伤(controlled cortical impact, CCI)仪, KCl、CaCl<sub>2</sub>、NaCl、MgSO<sub>4</sub>、MgCl<sub>2</sub>、NaBr、NaHCO<sub>3</sub>(分析纯)(美国Sigma Aldrich公司);电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

**1.2 实验动物与分组** 51只10周龄SPF级雄性C57BL/6j野生型小鼠,体重20~22g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010]。随机分为假手术组、TBI组和TBI+海水组,每组17只。实验动物饲养于SPF级动物实验室内鼠笼架[苏州猴皇动物实验设备科技有限

公司(规格:PEI),SYXK(军):2019-0004]中。实验动物饲养单位为军事医学研究院军事认知与脑科学研究所,研究方案经军事医学研究院实验动物中心动物实验室实验动物管理与使用委员会审查批准(IACUC-DWZX-2022-566)。动物饲养和实验过程中均按照实验动物使用的3R原则给予人道关怀。

### 1.3 动物模型制备与各组小鼠处置

**1.3.1 人工海水的配制** 按照国家海洋局第三海洋研究所提供的海水配方,配制的水盐浓度为3.00%~3.55%。实验所用海水的主要指标:渗透压(1250.00±11.52) mOsm/L,钾离子浓度(10.88±0.68) mmol/L,钠离子浓度(630.00±5.33) mmol/L,氯离子浓度(658.80±5.25) mmol/L。主要成分(mmol/L):NaCl 443.66, CaCl<sub>2</sub> 12.70, MgSO<sub>4</sub> 27.54, NaBr 0.81, MgCl<sub>2</sub> 25.76, KCl 9.73, NaHCO<sub>3</sub> 2.40。pH值约为8.2。

**1.3.2 假手术组** 小鼠按序号标注,完全麻醉后进行去骨瓣手术,在此过程中持续监测其体温,确保维持在37℃。若需要,将动物置于恒温毯上以保持体温稳定。去骨瓣手术完成后,缝合头皮切口,待生命体征平稳后,将小鼠放回其所在动物房继续饲养。

**1.3.3 TBI组** 小鼠按顺序编号,完全麻醉后实施去骨瓣手术,持续监测体温并使其维持在37℃。使小鼠呈俯卧位,头部固定于小动物立体定向仪上,备皮后乙醇消毒,沿中线剪开1cm头皮,分离骨膜,暴露出人字缝、冠状缝和矢状缝。于冠状缝后方

2 mm、中线旁开左侧 2 mm 处用牙科钻开出直径 5 mm 的骨窗, 注意勿伤及下方组织。然后转移固定至 CCI 仪中进行 TBI 损伤制备, 以深度 1 mm、速度 3.5 m/s、滞留时间 500 ms 进行 TBI 造模。需要时置小鼠于复温毯上以保持体温恒定。缝合头皮切口, 待生命体征平稳后, 放回动物房继续饲养。

**1.3.4 TBI+海水组** TBI+海水组小鼠在 TBI 组处置的基础上, 暴露一侧大脑半球皮质, 将输液器导管末端部分用剪刀剪两个侧孔, 侧孔面向损伤区域脑组织, 缝合皮肤切口中间部分, 于脑表面形成两端开放的皮下隧道, 人工海水流经隧道, 使损伤区域脑组织持续浸泡 30 min。余处置与 TBI 组相同。

**1.4 行为学测试** 每组取 8 只小鼠进行行为学测试。

**1.4.1 转棒实验检测小鼠的耐力** 在实验前 3 d, 先将转棒仪以 10 r/min 恒速运行, 对小鼠进行训练, 3 次/d, 每次间隔 1 h, 每次运行 300 s。训练起始时, 小鼠易掉落, 将小鼠再次放回转棒仪上, 直至训练结束。第 3 天训练时, 将可在转棒仪上停留 150 s 左右的小鼠入组。小鼠在转棒仪上停留的时间越长, 提示其耐力越强。

**1.4.2 平衡木实验检测小鼠的运动协调和平衡能力** 取一根长 1 m、直径 17 mm 的圆柱状平衡木, 将小鼠置于平衡木起始段, 其后放一强光束发射器, 根据小鼠喜阴暗的特点, 诱导其爬行至终点暗箱; 之后让其休息 30 s, 开始下一段训练。每天训练 3 次, 直至小鼠可以 0.2~0.3 m/s 的速度自行无停顿地通过平衡木。TBI 伤后 1 d、3 d 和 7 d 验收结果, 记录小鼠从平衡木起始段到达终端所需的时间。耗时越短, 提示小鼠运动协调能力越好。

**1.5 小鼠脑组织病理学检查**

**1.5.1 伊文思蓝(Evans-blue, EB)染色检测血脑屏障通透性** 每组取 3 只小鼠用于 EB 染色, 检测损伤后 12 h 及 24 h 血脑屏障通透性的变化。于小鼠死亡前 1 h 尾静脉注射 100  $\mu$ l EB 染料, 处死后取脑组织, 采用 ImageJ 软件分析损伤区域 EB 染料浸润面积。

**1.5.2 HE 染色观察小鼠脑组织病理形态** 取损伤后 24 h 小鼠脑组织, 每组 3 只, 通过 4% 组织固定液固定、蔗糖梯度脱水、石蜡包埋等步骤制备石蜡切片, 然后行 HE 染色, 于全景扫描机下进行扫描, 观察小鼠脑组织病理形态学改变。

**1.6 Western blotting 检测小鼠脑组织 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 表达水平** 取损伤后 24 h 小鼠, 每组 3 只, 收集脑损伤区域组织 (1 g 左右), 用裂解液裂解后置于匀浆机上匀浆, 冰上静置 15 min, 待反应充分后离心, 取蛋白上清液以 BCA 法测定各蛋白总浓度, 加 6 $\times$ 上样缓冲液, 金属浴 10 min 变性。每条泳道上样

30  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜 2 h, 封闭 1 h。用兔抗 Bcl-2、Bax 和  $\beta$ -actin 一抗 (1:1000) 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日用 HRP 标记的二抗 (1:5000) 室温孵育 1 h, 采用 ECL 化学发光法显色。显影后, 对原始胶片进行扫描, 通过 ImageJ 定量分析 Bax、Bcl-2 的相对表达量, 取 Bax/Bcl-2 的比值衡量样本间的凋亡情况。

**1.7 转录组学分析小鼠脑组织差异表达基因和信号通路** 损伤后 24 h, 取 4 只 TBI 组小鼠和 5 只 TBI+海水组小鼠的脑组织于液氮中保存, 送至北京青莲百奥生物科技有限公司进行转录组学检测。获取结果后, 通过 R-package DESeq2 以  $P < 0.05$  和  $|\log_2$  变化倍数  $> 1$  为标准对其进行差异性分析。随后使用 ClusterProfiler 对差异基因进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 富集分析, 筛选出差异明显 ( $P < 0.05$ ) 的信号通路。基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) 采用 Broad Institute 开发的 GSEA 软件完成,  $nPerm = 1000$ 。

**1.8 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析并制图。计量资料均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 进一步两两比较采用 Turkey 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 海水浸泡对小鼠运动协调能力和耐力的影响** 平衡木实验与转棒实验结果显示, 与假手术组和 TBI 组比较, 损伤后 1、3、7 d, TBI+海水组小鼠通过平衡木的时间均明显延长 ( $P < 0.001$ , 图 1A), 在转棒仪上停留的时间均明显缩短 ( $P < 0.001$ , 图 1B)。

**2.2 海水浸泡对小鼠神经元凋亡相关蛋白表达的影响** Western blotting 检测结果显示, 与 TBI 组比较, 损伤后 24 h, TBI+海水组小鼠脑组织中促凋亡蛋白 Bax 与抑凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达量的比值明显升高 ( $P < 0.05$ , 图 2)。

**2.3 海水浸泡对小鼠脑组织病理损伤的影响** EB 染色结果显示, TBI+海水组 EB 渗透面积明显大于 TBI 组 ( $P < 0.05$ ); 两组组内比较, 损伤后 24 h EB 渗透区域的面积均明显小于损伤后 12 h ( $P < 0.05$ , 图 3A)。

HE 染色结果显示, 损伤后 24 h, TBI 组和 TBI+海水组小鼠损伤区域脑组织缺损, 蛛网膜和皮质连续性破坏; 与 TBI 组比较, TBI+海水组小鼠脑组织结构损伤明显加重, 坏死面积明显增大, 胞周出现大量空泡, 呈弥漫性分布, 伴有严重的神经元死亡缺失和反应性胶质化, 神经元结构排列紊乱, 血管周围间隙明显扩大 (图 3B)。

**2.4 海水浸泡后小鼠脑组织转录组学差异表达基因**

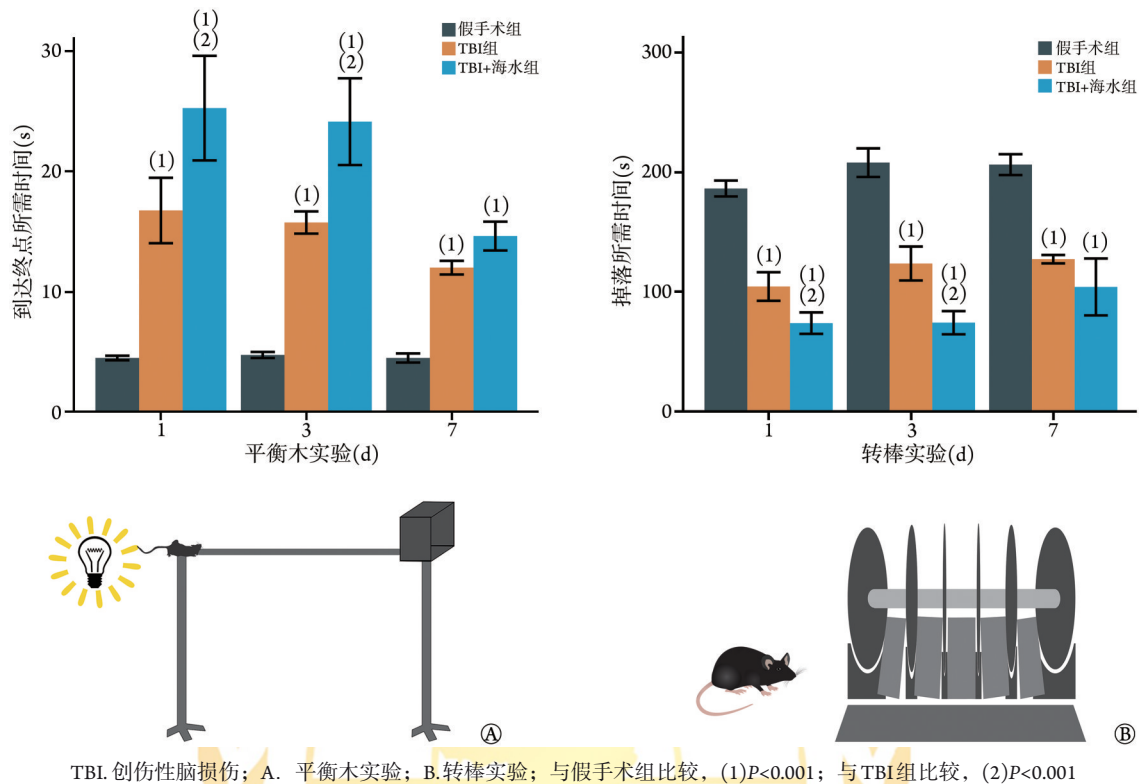


图1 海水浸泡对TBI小鼠运动协调能力和耐力的影响

Fig.1 Effects of seawater immersion on motor coordination and endurance of TBI mice

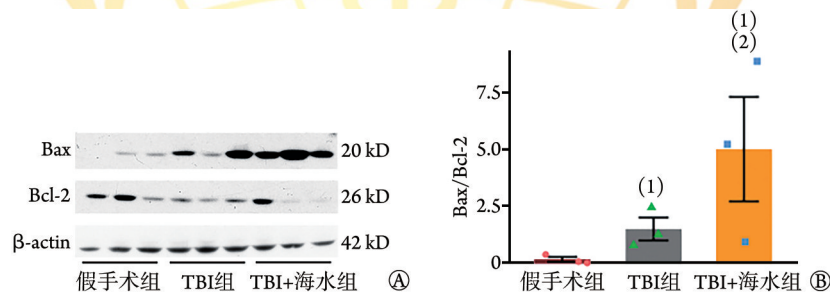


图2 海水浸泡对TBI小鼠神经元凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax表达的影响( $n=3$ )

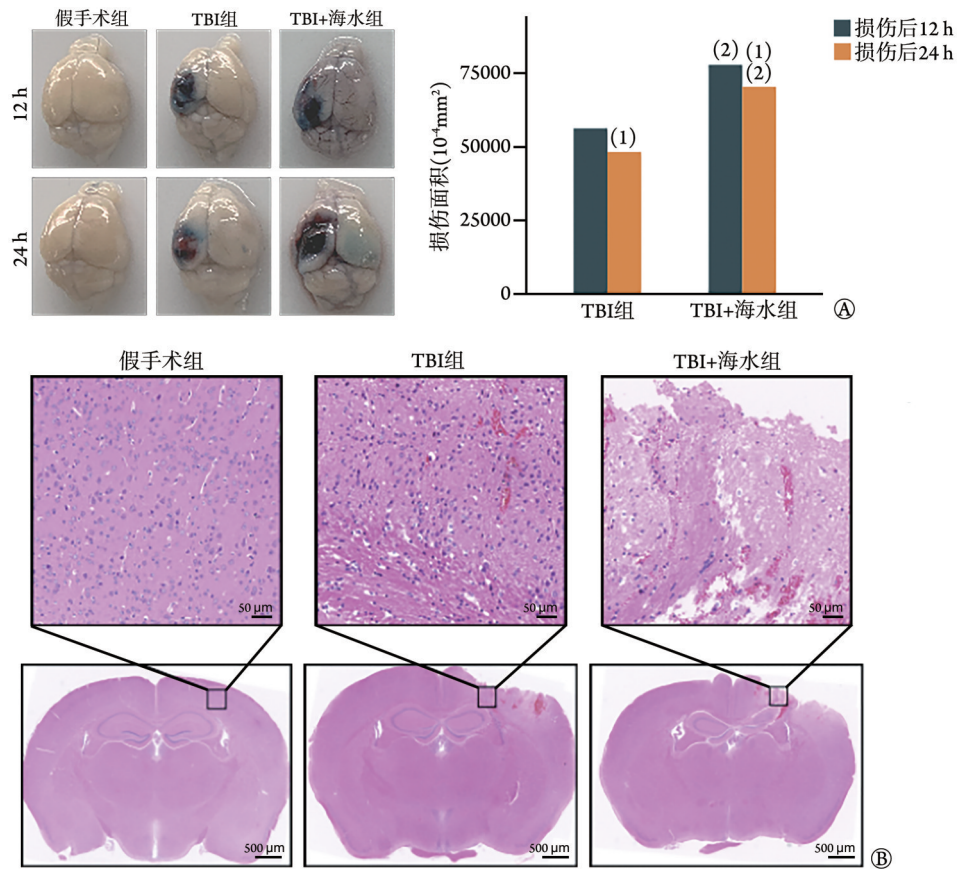
Fig.2 Effects of seawater immersion on the expression of neuronal apoptosis related proteins (Bcl-2 and Bax) in TBI mice ( $n=3$ )

分析 比较TBI组和TBI+海水组小鼠脑组织转录组学图谱的差异,得到625个差异表达基因(312个基因上调,313个基因下调, $P<0.05$ ),其中所标注的基因参与了细胞凋亡或自身免疫调节(图4A)。基因聚类结果有明显差异( $P<0.05$ ,图4B)。GO富集结果显示,自然杀伤(natural killer, NK)细胞免疫调节、细胞死亡及淋巴细胞免疫调节等免疫功能相关的通路显著上调,基因丝组装、微管运动调节及纤毛运动调节等与细胞增殖相关的通路显著下调( $P<0.05$ ,图5A)。KEGG富集结果显示,差异表达基因主要参与了补体与凝血级联反应、细胞因子-细胞因子受体结合和神经激活配体-受体结合等通路,且这些通路之间有着共同的基因差异表达,发生相互作用

(图5B)。

2.5 p53家族介导的内源性凋亡参与海水加重TBI小鼠神经元损伤的过程 采用GSEA软件(Broad Institute)进行基因组学分析显示,海水浸泡后TBI小鼠的神经细胞凋亡过程受p53家族调控(图6A)。对其相关基因表达量进行聚类分析,结果显示,TBI+海水组的脑神经组织p53相关基因表达明显增高( $P<0.05$ ,图6B)。

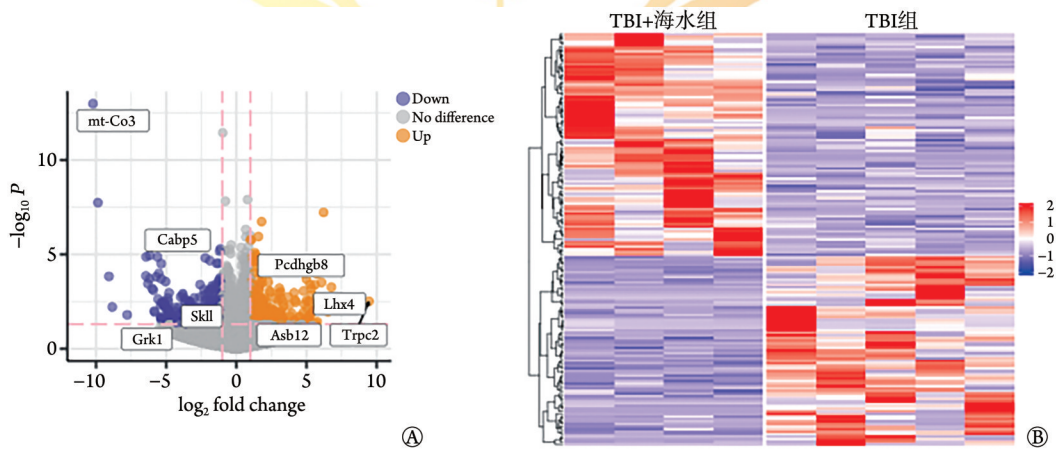
2.6 基因集富集分析结果 通过MsigDB数据库筛选出免疫相关的基因通路进行基因集富集分析,结果显示,NK细胞相关的免疫调节与TBI+海水组关系更密切( $P<0.05$ ,图7A)。对各组小鼠脑组织中NK细胞相关的基因表达量进行聚类分析,结果显示



TBI 创伤性脑损伤; A. 伊文思蓝染色结果( $n=3$ ); B. 损伤后 24 h 脑组织病理损伤情况(HE,  $n=3$ ); 与损伤后 12 h 比较, (1) $P<0.05$ ; 与 TBI 组比较, (2) $P<0.05$

图 3 海水浸泡对 TBI 小鼠脑组织病理损伤的影响

Fig.3 Effects of seawater immersion on the pathological damage of brain tissue in TBI mice



TBI 创伤性脑损伤; A. 差异表达基因的火山图(黄色代表上调的基因, 蓝色代表下调的基因); B. 差异表达基因的聚类分析热图 ( $|\log_2$  fold change $>1$ ,  $P<0.05$ )

图 4 海水浸泡后 TBI 小鼠脑组织差异表达基因

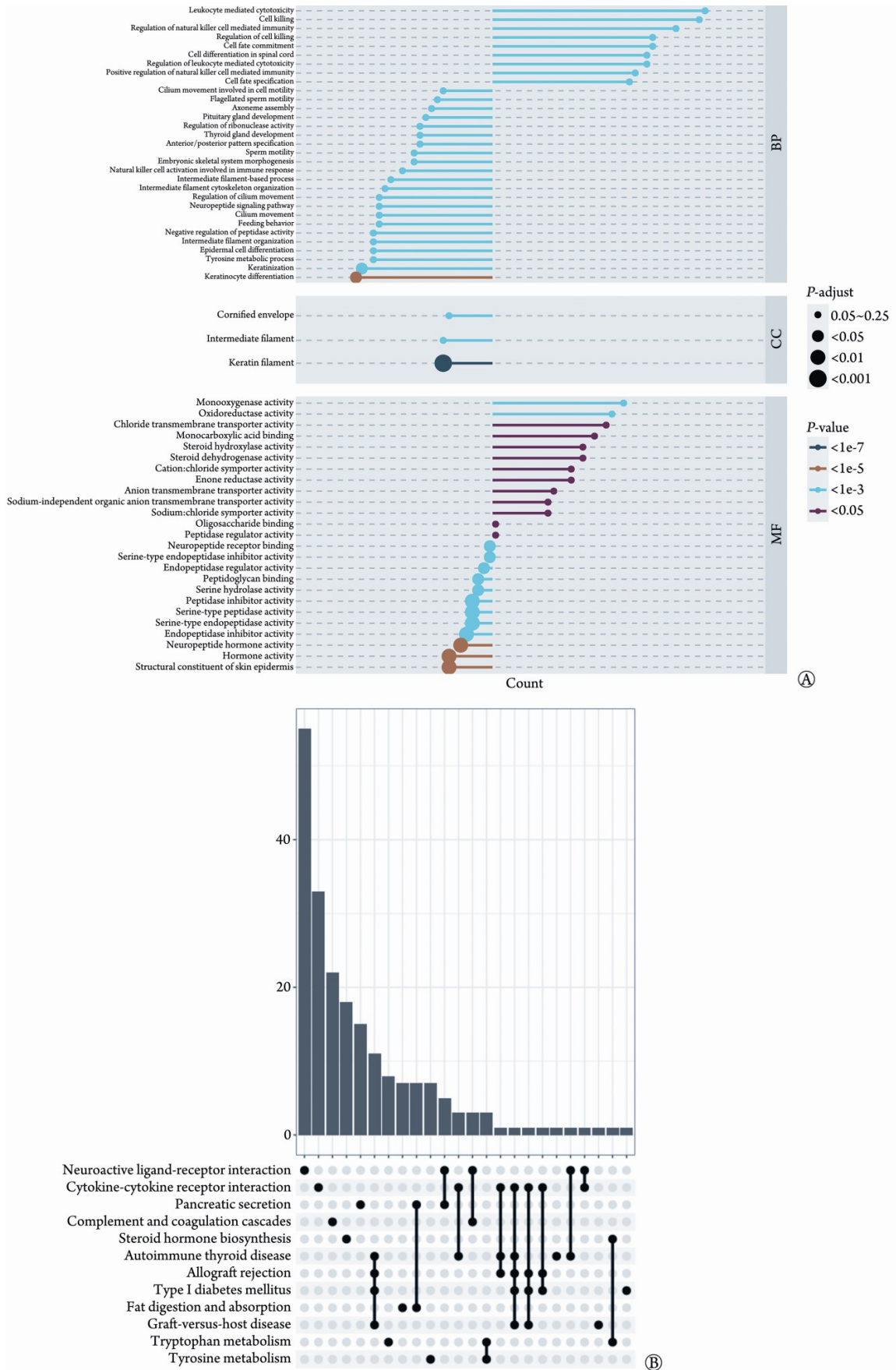
Fig.4 Differential gene expression in brain tissues of TBI mice caused by seawater immersion

TBI+ 海水组表达水平明显高于 TBI 组 ( $P<0.05$ , 图 7B)。

### 3 讨 论

TBI+海水浸泡常见于海战、海上作业等特殊环

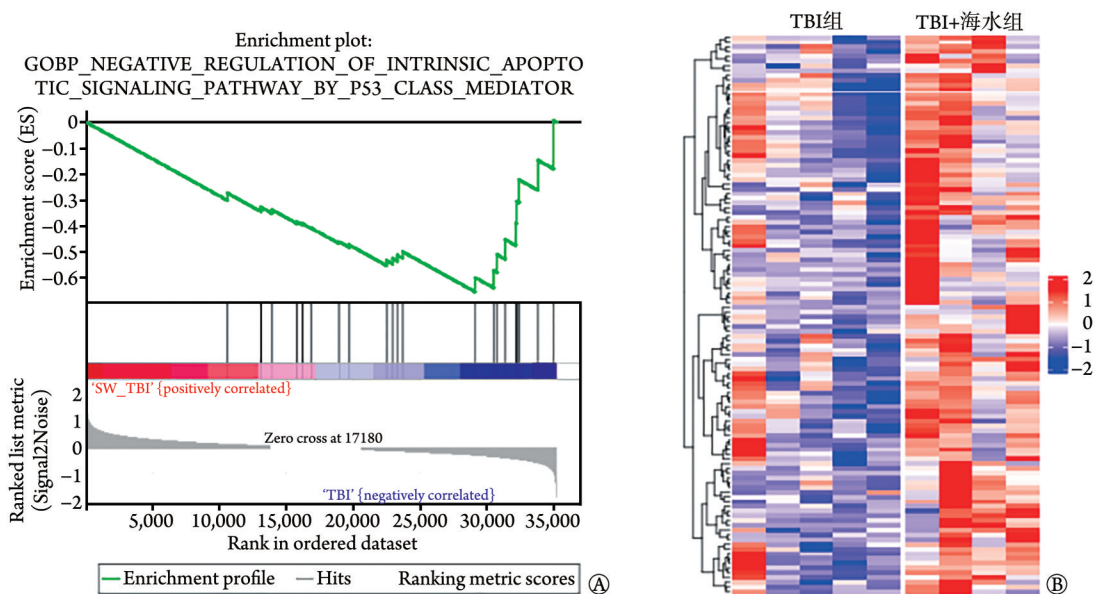
境下, 因海水独特的理化性质, 可使 TBI 的病理生理过程更加复杂。海水高渗、高钾、高钠的特点可使 TBI 损伤区域离子通道异常开放, 进而导致神经细胞水肿, 释放毒性神经递质, 加剧脑组织的损伤程度<sup>[6]</sup>; 高 pH 的特点可加重 TBI 损伤组织血管上皮的损



A. GO 富集分析结果; B. KEGG 富集分析结果(下方连线示存在基因集共表达基因)

图5 海水浸泡 TBI 小鼠脑组织差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig.5 GO and KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in brain tissues of TBI mice caused by seawater immersion



TBI. 创伤性脑损伤; A. 基因集富集分析(FDR<0.05, P<0.05); B. p53家族相关差异基因表达量(|log<sub>2</sub>fold change|>1, P<0.05)

图6 p53家族对海水浸泡致TBI小鼠神经元内源性凋亡通路的调节

Fig.6 Endogenous apoptotic pathways regulated by p53 family in neurons of TBI mice with seawater immersion

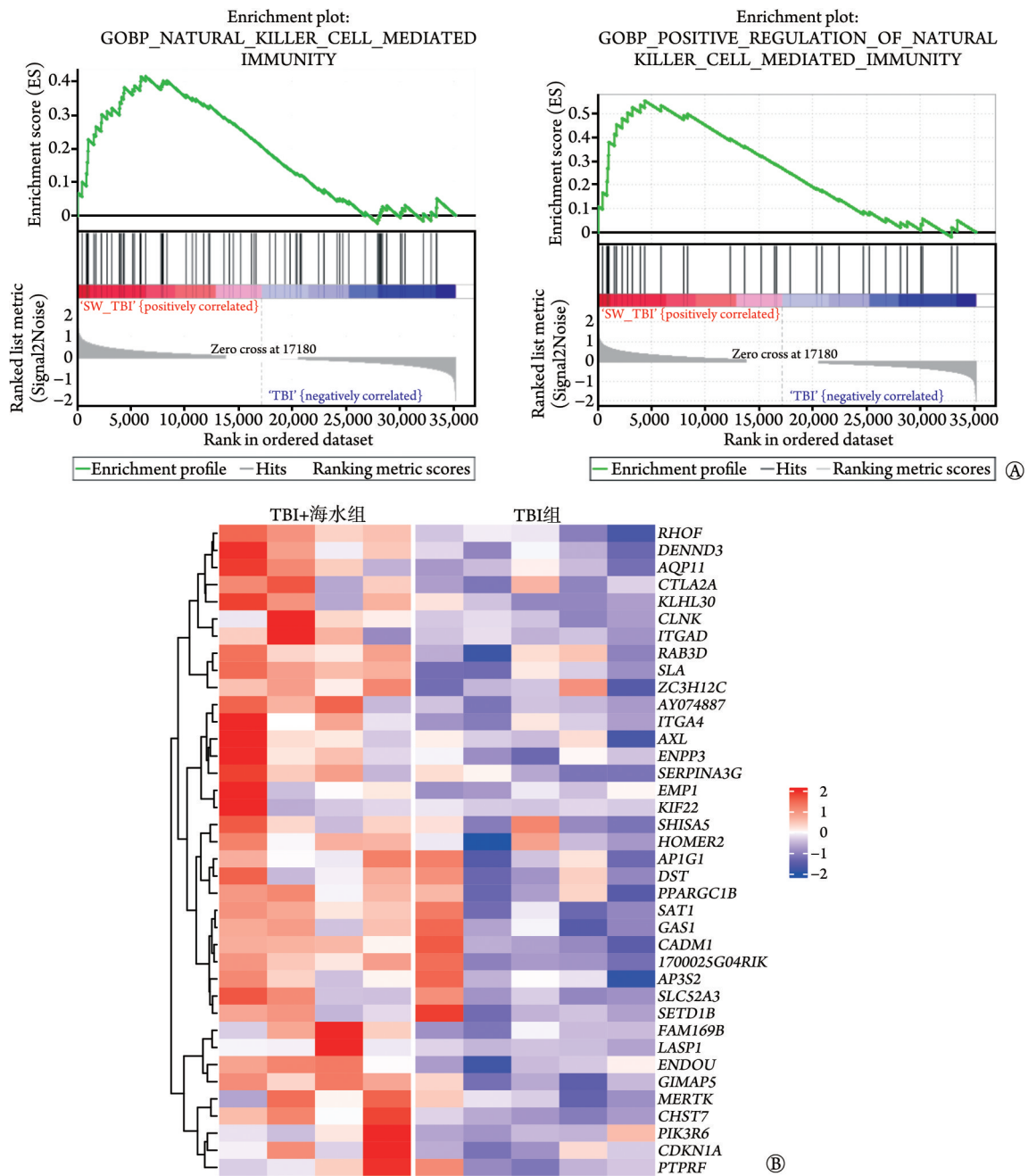
伤, 引发内皮细胞胞质晶体渗透压增高, 进而诱发钙超载, 激发神经系统的炎性反应, 加速神经细胞的死亡进程, 导致神经功能缺损。本研究结果显示, 海水浸泡可明显降低TBI小鼠的运动协调能力和耐力, 破坏血脑屏障的完整性和通透性, 加重浸泡区域脑组织的病理损伤, 而p53蛋白相关的凋亡通路与NK细胞介导的免疫调节可能参与了海水浸泡诱发的损伤过程。

海水浸泡可导致TBI的伤死率和致残率增高。既往研究显示, TBI后神经功能缺失是神经元凋亡的结果, 而海水浸泡加重神经功能缺失是否由凋亡介导尚不清楚。Bax是细胞质中的凋亡相关蛋白, 可诱导线粒体膜通透性增高, 释放c-fos等凋亡相关因子, 促进细胞凋亡的发生; Bax可与抑凋亡蛋白Bcl-2结合形成异二聚体, 影响其发挥清除氧自由基、恢复线粒体膜电势等功效。Bax和Bcl-2是p53家族介导凋亡的常见标志物。本研究的平衡木试验和转棒试验结果显示, 海水浸泡可明显降低TBI小鼠的运动协调能力和耐力, Western blotting检测结果也显示海水浸泡可显著增加凋亡相关蛋白Bax/Bcl-2的比值, 提示海水浸泡后神经功能缺损可能是由于细胞凋亡加重所致。p53基因是一种抑癌基因, 与神经元凋亡有重要关联<sup>[11]</sup>。Xu等<sup>[12]</sup>在TBI中发现, p53的表达呈时间依赖性增高, 且p53的激活可诱发线粒体代谢异常, 释放细胞色素C等, 促进胱天蛋白酶(Caspase)的级联反应, 诱导神经元发生凋亡。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 等炎性因子与p53关系密切, Shao等<sup>[13]</sup>发现, p53家族是TNF- $\alpha$ 作用于TBI的关键

枢纽。本研究转录组学结果显示, p53介导的内源性凋亡参与了海水浸泡后的TBI, 提示p53可能是海水浸泡促进TBI神经细胞凋亡的关键分子, 可激活凋亡相关通路, 促进受损神经元发生凋亡, 进而导致机体神经功能受损。

血脑屏障是由脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cell, BMEC)之间的紧密连接等构成的天然免疫屏障, 可阻挡外周免疫细胞的流入, 维持中枢神经系统的免疫稳态<sup>[14]</sup>。NK细胞是一种天然免疫细胞, 既往研究显示其主要在抗感染方面发挥作用, 近年来随着对TBI研究的深入, 发现其与TBI也有重要联系<sup>[15-16]</sup>。Kong等<sup>[17]</sup>报道, 人体外周循环的NK细胞数量与TBI的严重程度呈负相关; Al Nimer等<sup>[18]</sup>报道, 相比于正常对照组, TBI组损伤区域脑组织NK细胞数量显著增高, 提示TBI早期NK细胞可释放促炎因子, 趋化同类免疫细胞穿过血脑屏障到达损伤区域, 发挥炎症效应, 对中枢神经系统造成损害。在本研究中, 经海水浸泡后TBI小鼠血脑屏障通透性在损伤早期明显增高, 导致外周免疫细胞进入中枢神经系统发挥免疫效应, 破坏中枢神经系统的免疫稳态, 进一步加重了损伤区域脑组织的病理损伤; 脑组织的转录组中NK细胞免疫调节通路显著富集, 提示海水浸泡后外周NK细胞可透过血脑屏障促进炎症效应。此外, 本研究还显示, 凋亡和免疫相关富集通路的基因表达产物水通道蛋白11(aquaporin 11, AQP11)上调, 提示其可能是海水浸泡TBI早期脑水肿发生的关键调节因子之一。

综上所述, 本研究结果显示, 海水浸泡可增加



TBI. 创伤性脑损伤; A. 基因集富集分析(FDR<0.05, P<0.05); B. 自然杀伤细胞相关差异基因表达量(|log<sub>2</sub>fold change|>1, P<0.05)

图7 自然杀伤细胞在海水浸泡TBI小鼠脑组织中参与免疫调节

Fig.7 Natural killer cells participates in immune regulation in brain tissues of TBI mice with seawater immersion

TBI小鼠血脑屏障的通透性,加重损伤区域脑组织的病理损伤,导致机体神经功能下降;p53介导的内源性凋亡和NK细胞介导的神经系统免疫调节可能与之相关。海水浸泡加重TBI小鼠神经细胞损伤的关键点和相关机制及免疫微环境的组成尚待进一步研究。

#### 【参考文献】

- [1] Feigin VL, Nichols E, Alam T, *et al.* Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(5): 459-480.
- [2] Jiang JY, Gao GY, Feng JF, *et al.* Traumatic brain injury in China[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(3): 286-295.
- [3] Hong XJ, Han KW, Chen RB, *et al.* Treating traumatic brain injury at sea: how to improve the skills and capabilities of the naval medical personnel[J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1): 3.
- [4] Yang B, Li M, Liu XL, *et al.* An animal model of open craniocerebral injury with seawater immersion[J]. *Acad J Second Mil Med Univ*, 2016, 37(12): 1538-1542. [杨冰,李明,刘信龙,等.一种开放性颅脑外伤海水浸泡的动物模型[J].第二军医大学学报,2016,37(12): 1538-1542.]
- [5] Zhang JN, Cheng G. Current status of China's maritime cranial combat trauma research[J]. *Chin J Neurosurg*, 2012, 28(2): 211-

213. [张剑宁, 程岗. 我国海上颅脑战创伤研究现状[J]. 中华神经外科杂志, 2012, 28(2): 211-213.]
- [6] Zhong WW, Tian J, Wei LF, *et al.* The effects of seawater immersion on brain edema after traumatic brain injury[J/CD]. *Chin J Neurotrauma Surg (Electr Ed)*, 2015, 1(6): 34-37. [钟旺旺, 田君, 魏梁锋, 等. 海水浸泡对创伤性颅脑损伤后脑水肿的影响[J/CD]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2015, 1(6): 34-37.]
- [7] Wang J, Qian LJ, Xie F, *et al.* Mitochondria of damaged brain tissues following traumatic brain injury and immersion in rat models[J]. *Chin J Neurosurg Dis Res*, 2015(3): 213-217. [王娟, 钱令嘉, 谢方, 等. 颅脑损伤合并海水浸泡对大鼠脑线粒体的研究及意义[J], 中华神经外科疾病研究杂志, 2015(3): 213-217.]
- [8] Yi L, Juan W, Gang C, *et al.* Seawater immersion aggravates early mitochondrial dysfunction and increases neuronal apoptosis after traumatic brain injury[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(3): 447-457.
- [9] Wennersten A, Holmin S, Mathiesen T. Characterization of Bax and Bcl-2 in apoptosis after experimental traumatic brain injury in the rat [J]. *Acta Neuropathol*, 2003, 105(3): 281-288.
- [10] Lu Q, Xiong J, Yuan Y, *et al.* Minocycline improves the functional recovery after traumatic brain injury *via* inhibition of aquaporin-4 [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(1): 441-458.
- [11] Sun J, Li X, Gu X, *et al.* Neuroprotective effect of hydrogen sulfide against glutamate-induced oxidative stress is mediated *via* the p53/glutaminase 2 pathway after traumatic brain injury[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(5): 7180-7189.
- [12] Xu X, Jiang R, Gong P, *et al.* Up-regulation of FOS-like antigen 1 contributes to neuronal apoptosis in the cortex of rat following traumatic brain injury[J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(1): 115-125.
- [13] Shao X, Yang X, Shen J, *et al.* TNF- $\alpha$ -induced p53 activation induces apoptosis in neurological injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(12): 6796-6803.
- [14] Wang YQ, Xu P, Fan HJ, *et al.* Research progress in the relationship of autophagy and blood brain barrier[J]. *Med J Chin PLA*, 2022, 47(5): 518-523. [王保棋, 徐鹏, 范红结, 等. 细胞自噬与血脑屏障的关系研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(5): 518-523.]
- [15] Laginha I, Kopp MA, Druschel C, *et al.* Natural killer (NK) cell functionality after human spinal cord injury (SCI): protocol of a prospective, longitudinal study[J]. *BMC Neurol*, 2016, 16(1): 170.
- [16] Jin HZ, Xu TC, Yang J, *et al.* Study on the activity and expression of activated receptor of natural killer cells in peripheral blood of patients with major de-pression disorder[J]. *Clin J Med Offic*, 2022, 50(12): 1245-1248. [金洪洲, 徐天朝, 杨冀, 等. 抑郁症患者外周血自然杀伤细胞活性及活化性受体表达研究[J]. 临床军医杂志, 2022, 50(12): 1245-1248.]
- [17] Kong XD, Bai S, Chen X, *et al.* Alterations of natural killer cells in traumatic brain injury[J]. *Neurosci Bull*, 2014, 30(6): 903-912.
- [18] Al Nimer F, Lindblom R, Ström M, *et al.* Strain influences on inflammatory pathway activation, cell infiltration and complement cascade after traumatic brain injury in the rat[J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 27(1): 109-122.

(责任编辑: 蒋铭敏)



解放军医学杂志®