DOI:10.16016/j.2097-0927.202501043

反复轻度脑损伤致认知障碍小鼠神经元中CaMKⅡ信号通路及不同BDNF亚型的表达变化

刘殿卿[1,3],黎 芸[1,3],张捷焘[1,3],刘夕霞[2,3] [1]广西中医药大学研究生院,广西南宁;[2]广西医学科学院脑与精神疾病研究所,广西南宁;[3]广西壮族自治区人民医院康复医学科,广西中医药大学联合培养基地,广西南宁

[摘要] **目的** 探索钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ(Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ,CaMKⅡ)信号通路及不同脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)亚型的表达在反复轻度创伤性脑损伤(repetitive mild traumatic brain injury,rmTBI)致认知功能障碍中的变化。**方法** 使用随机数字表法将63只雄性C57BL/6J小鼠(5周龄,体质量16~17 g)分为模型组(n=50)和对照组(n=13),模型组通过自由落体撞击法建立rmTBI模型,对照组仅接受麻醉处理。造模结束后的第30天起通过Morris水迷宫实验评估小鼠空间学习能力和记忆能力,对相关指标进行相关性分析,通过聚类分析将模型组按照认知水平分为高表现组、中表现组和低表现组,将中表现组剔除,对高表现组、低表现组以及对照组的水迷宫指标进行组间对比。行为学实验结束后进行取材,Western blot检测高表现组、低表现组和对照组小鼠前额叶皮质以及海马组织中CaMKⅡ、α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionicacid receptor,AMPAR)亚基(GluR1、p-GluR1、GluR2)、不同亚型的BDNF蛋白(mBDNF、proBDNF)的表达,并进行组间对比分析。**结果** ①水迷宫相关统计指标之间均存在显著相关(P<0.05),通过分层聚类将模型组小鼠分为高表现组(n=31)、中表现组(n=11)、低表现组(n=8),高表现组、低表现组以及对照组3组组间各项认知指标均存在差异。②相较于对照组和低表现组,高表现组小鼠的海马组织中GluR1的磷酸化程度降低(P<0.05);相较于对照组,低表现组的前额叶皮质中GluR1、GluR2的表达均升高(P<0.05),高表现组的前额叶皮质中GluR2及CaMKⅡ的表达均升高(P<0.05);相较于高表现组,低表现组小鼠前额叶皮质中的GluR2/GluR1比值更低(P<0.05)。③相较于对照组,低表现组小鼠前额叶皮质和海马组织中的proBDNF以及mBDNF的表达均升高(P<0.05),且mBDNF/proBDNF也更高(P<0.05);高表现组在前额叶皮质中存在mBDNF的表达升高(P<0.05)。**结论** rmTBI慢性期,良好的认知功能预后伴随着CaMKⅡ信号通路的表达上调,且认知功能差异伴随着突触后膜上不同AMPAR亚基的占比变化,认知障碍组存在着两种BDNF亚型的过表达以及mBDNF转化率的升高。

[关键词] 轻度脑损伤;认知障碍;CaMKⅡ;AMPAR;脑源性神经营养因子

[中图法分类号] R338.1;R363.21;R749.12 [文献标志码] A

[基金项目] 广西自然科学基金面上项目(2023GXNSFAA026175);广西自然科学基金青年科学基金项目(2022GXNSFBA035519);广西壮族自治区研究生教育创新计划项目(YCSW2024410)

[通信作者] 刘夕霞,E-mail:liuxixia2008@126.com

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:刘殿卿,黎芸,张捷焘,等.反复轻度脑损伤致认知障碍小鼠神经元中CaMKⅡ信号通路及不同BDNF亚型的表达变化[J].陆军军医大学学报,2025,47(12):1291-1300.DOI:10.16016/j.2097-0927.202501043.

Citation:LIU D Q,LI Y,ZHANG J T,*et al*. Neuronal expression of CaMKⅡ and BDNF isoforms in mice with cognitive dysfunction induced by repetitive mild traumatic brain injury[J]. J Army Med Univ,2025,47(12):1291-1300. DOI:10.16016/j.2097-0927.202501043.

Neuronal expression of CaMK Ⅱ and BDNF isoforms in mice with cognitive dysfunction induced by repetitive mild traumatic brain injury

LIU Dianqing[1,3], LI Yun[1,3], ZHANG Jietao[1,3], LIU Xixia[2,3] [1]Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi; [2]Institute of Brain and Mental Disorders, Guangxi Academy of Medical Sciences, Nanning, Guangxi; [3]Department of Rehabititation Medicine, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Joint Training Base of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China

[**Abstract**] Objective To investigate the calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ (CaMK Ⅱ) signaling pathway and expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) isoforms in mouse model of cognitive dysfunction secondary to repetitive mild traumatic brain injury (rmTBI). Methods A total of 63 male C57BL/6J mice (5 weeksd old, werghing 16~17 g) were divided into model group (n=50) and control group (n=13). The mice of the model group received modified weight drop and repeated head impacts to establish a model of rmTBI, and the mice from the control group were only given anesthetic treatment. From the 30th day after the end of modeling, Morris water maze test was applied to evaluate the spatial learning and memory abilities, and the relative data was evaluate for correlation analysis. According to the taxonomy of cognitive levels, the model group was further stratified into high-, medium- and low-performance groups. After the mice with medium-performance group were eliminated, and the indicators of water maze test were compared among the high-performance, low-performance, and control groups. After the behavioral experiment, Western blotting was conducted to detect the expression of CaMKII, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionicacid receptor (AMPAR) subunits (GluR1, p-GluR1, GluR2), and different isoforms of BDNF (mBDNF, proBDNF) in the prefrontal cortex and hippocampus. The expression levels were compared among the groups. Results ① There were significant correlations among the water maze-related indicators (P<0.05). The mice in the model group were divided into 3 groups of high- (n=31), medium- (n=11) and low-performance (n=8) levels through hierarchical clustering, and there were differences in cognitive levels in the high-performance, low-performance and control groups. ② The phosphorylation level of GluR1 in the hippocampus was significantly decreased in the high-performance group than the control group and the low-performance group (P<0.05). When compared with the control group, the expression of GluR1 and GluR2 in the prefrontal cortex of the low-performance group was increased (P<0.05), and the expression of GluR2 and CaMK Ⅱ in the prefrontal cortex of the high-performance group was increased (P<0.05). The low-performance group obtained obviously lower GluR1/GluR2 ratio than the high-performance group (P<0.05). ③ When compared with the control group, the low-performance group exhibited notably elevated expression of proBDNF and mBDNF (P<0.05) and mBDNF/proBDNF (P<0.05) in the prefrontal cortex and hippocampus, while the high-performance group had enhanced expression of mBDNF in the prefrontal cortex (P<0.05). Conclusion In the chronic phase of rmTBI, prognosis of good cognitive function is accompanied by up-regulation of CaMK Ⅱ signaling pathway, and the difference in cognitive function is accompanied by the change in proportions of different AMPAR subunits on the postsynaptic membrane. In the cognitive impairment group, there is an overexpression of 2 types of BDNF isoforms and an increase in the conversion rate of mBDNF.

[**Key words**] mild traumatic brain injury; cognitive dysfunction; CaMK Ⅱ; AMPAR; brain-derived neurotrophic factor

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Guangxi (2023GXNSFAA026175), the Youth Science Foundation Project of Natural Science Foundation of Guangxi (2022GXNSFBA035519), and the Project of Postgraduate Education Innovation Plan of Guangxi (YCSW2024410).
Corresponding author: LIU Xixia, E-mail: liuxixia2008@126.com

竞技类运动员及军人等职业是反复轻度创伤性脑损伤(repetitive mild traumatic brain injury, rmTBI)的高风险人群,轻度创伤性脑损伤(mild traumatic brain injury,mTBI)是最常见的脑损伤类型,其在临床就诊的创伤性脑损伤总病例中占比超过90%[1-2]。单次的mTBI通常在几周内就能完全康复,但rmTBI会持续累计危害,最终在部分患者身上发展为慢性创伤性脑病(chronic traumatic encephalopathy,CTE),表现为不同程度的学习、记忆障碍及注意力障碍等[3-5]。尽管近年来临床上对rmTBI引起的功能性后遗症的关注日益增加,但目前仍缺乏针对性的治疗措施[6-7]。因此,深入认识创伤性脑损伤致认知障碍的病理反应机制,针对相关通路寻找有效改善认知功能的潜在靶点,是预防以及治疗创伤性脑损伤患者功能性后遗症的关键所在。

钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ(Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ,CaMKⅡ)是一种特异性蛋白激酶,被认为是学习和记忆的重要中介者,参与许多信号传导级联[8]。α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionicacid receptor,AMPAR)是离子型谷氨酸受体的一种,由4个亚基(GluR1、GluR2、GluR3、GluR4)组成,其在突触后膜表面的活性、数量及其动态变化是衡量突触强度的重要指标。在长时程增强(long-term potentiation,LTP)过程中,CaMKⅡ激活后可以通过逆向信号促使突触前膜增强神经递质的释放,磷酸化GluR1亚基并触发AMPAR合成和插入突触后膜表面,极大地增强突触的传递效率[9]。此外,谷氨酸能突触功能异常也是学习记忆功能障碍的重要发病基础[10],在药物成瘾及戒断[11-13]、癫痫[14]、阿尔兹海默病[15-16]、疼痛等疾病的病理状态下都出现了沉默突触的增加,这可能与突触后膜AMPAR的内吞及失活,进而导致功能突触向沉默突触的转化有关[17]。

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)在中枢神经系统内广泛表达,是神经元成熟、突触形成等过程中的重要内源性调节因子,参与突触可塑性以及神经元的再生修复[18-19]。前体脑源性神经营养因子(pro-brain-derived neurotrophic factor,proBDNF)经组织纤维蛋白溶酶原激活物/纤溶酶原级联反应可裂解为成熟型脑源性神经营养因子(mature brain-derived neurotrophic factor,mBDNF)[20]。mBDNF能够与其高亲和力受体原肌球蛋白受体激酶B(neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2,TrKB)结合,进而激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPK)和磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol 3-kinases,PI-3K),促进突触蛋白合成和突触后膜上AMPAR的插入,进而促进LTP的形成,BDNF孵育可以改善中年小鼠脑切片的LTP功能受损[21]。此外,mBDNF-TrKB通过激活磷脂酶(phospholipase C gamma,PLCγ)诱导的Ca^{2+}信号增强也是CaMKⅡ活化的关键触发因素之一[22]。proBDNF激活c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)相关通路会触发神经元凋亡、突触萎缩以及易化海马区长时程抑制(long-term depression,LTD)[23];而激活核因子κB(nuclear factor kappa B,NF-kB)则可以促进大脑发育过程中神经元的存活以及维持其数量充足,协同mBDNF对脑损伤后神经元的修复及保护[24]。有研究发现[25],脑卒中后认知障碍组mBDNF/proBDNF的相对表达水平也会发生显著变化。

CaMKⅡ信号通路和BDNF二者在神经系统发育、学习记忆形成过程中以及某些引发认知功能障碍的疾病进展中,均起着关键作用。然而,这些通路在rmTBI导致认知障碍中的研究仍相对有限。因此,本研究旨在探讨CaMKⅡ信号通路及不同BDNF亚型表达在rmTBI相关认知功能障碍中的动态变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 63只雄性C57BL/6J小鼠(5周龄,体质量16~17 g)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)2024-0001,在室温20~24 ℃、相对湿度40%~60%、12 h光照/12 h黑暗的普通环境中饲养,水食自取,每3天更换一次垫料、食物以及饮用水。使用随机数字表法选取13只小鼠作为对照组,50只作为模型组。所有的动物实验设计符合广西中医药大学实验动物伦理委员会的要求并获得批准(DW20241119-266)。

1.1.2 实验器材 麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);Morris水迷宫视频分析系统(美国Stoelting有限责任公司);三维冷冻研磨仪JXCL-3K(上海净信实业发展有限公司);迷你低速离心机、低温高速离心机、全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);恒温恒湿试验箱(上海精宏实验设备有限公司);台式恒温金属浴(上海一恒科学仪器有限公司TU-10);小型垂直电泳槽、电泳仪电源和凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);水平摇床(北京托摩根生物科技有限公司);万分之一电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)等。

1.1.3　实验试剂　　异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)；高效RIPA裂解液(Solarbio，R0010)；磷酸酶抑制剂(MCE，HY-K0021)；蛋白酶抑制剂(Solarbio，R0010)；即用型BCA蛋白定量试剂盒(雅酶，ZJ102)；SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(碧云天，P0015L)；细胞膜蛋白提取试剂盒(普利莱，P1203-50)；Tris/甘氨酸/SDS电泳缓冲液(雅酶，PS105S)；特超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天，P0018AS)；p-GluR1抗体(HUABIO，HA721865)、GluR1抗体(HUABIO，ET1612-10)、GluR2抗体(HUABIO，ET1706-06)、CaMKⅡ抗体(HUABIO，ET1703-54)、BDNF抗体(HUABIO，ET1606-42)、ATPase抗体(HUABIO，ET1609-76)GAPDH抗体(赛维尔，GB15002)、山羊抗兔二抗(HUABIO，HA1001)等。

1.2　实验方法

1.2.1　rmTBI造模　　按已有方法进行造模[26]，具体操作流程见图1。rmTBI仪器的主要组成和总体布置如图2所示。使用吸入麻醉机，用4%浓度的异氟烷诱导小鼠麻醉，捏住小鼠尾巴，将麻醉的小鼠立马放于苏醒盒上固定的锡箔纸上，并将其头部置于长度为71 cm的中空PVC导管下，用手拉起用尼龙钓线拴住的54 g金属砝码，使其从导管顶端自由落体击中小鼠颅顶正中，将冲击传递到小鼠颅骨背侧，受到砝码高速撞击后，小鼠身下的锡纸会从中间受力断裂，小鼠会下坠到苏醒盒中的海绵垫上，此过程中躯体会产生向下180°的旋转，导致其头部形成快速的旋转加速，对其造成震荡性脑损伤。模型组小鼠接受7次自由落体击打，1次/d，连续7 d；对照组小鼠每天仅进行吸入麻醉，不接受自由落体撞击。

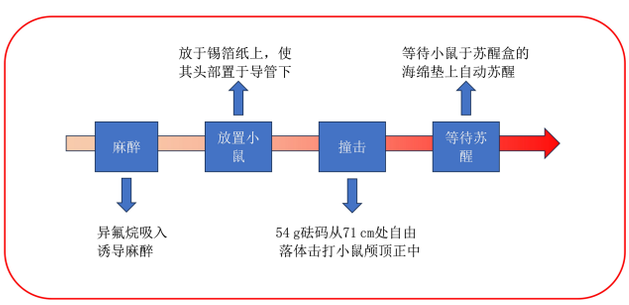


图1　C57BL/6J小鼠rmTBI模型的建立流程

1.2.2　水迷宫行为学检测及分组　　在连续7 d造模结束后的第30天起，使用Morris水迷宫对2组小鼠的空间学习能力和记忆能力进行评估，在完成第一次定位航行实验以及空间探索实验后，将水下平台反转



图2　rmTBI造模设备的总体组成布置图(A)和苏醒盒局部放大图(B)

置于对侧象限中点，再重复一次定位航行实验以及空间探索实验(图3)。①定位航行实验(9 d)：每天挑选固定时间段开始，将水迷宫水池分为4个象限，将平台置于其中1个象限的中央位置，使小鼠分别从不同象限的池壁中点处面向池壁下水，每个象限每天下水1次，记作1次训练，记录小鼠从下水到找到平台的时间为逃避潜伏期，最大逃避潜伏期设置为90 s，如果小鼠90 s内不能找到水下平台，则由实验人员将小鼠置于台上休息15 s，让小鼠记忆平台周围环境以及平台所在空间位置。每天小鼠下水的象限顺序随机变化，小鼠每天4次训练的平均潜伏期作为1个学习记忆指标进行分析。②空间探索实验(2 d)：撤掉水下平台，将小鼠从平台对侧象限池壁中点处面向池壁下水，记录小鼠在180 s内穿过原平台位置的次数。③统计分组：选取6个指标，包括2个学习能力指标(2次定位航行实验找到平台的成功次数、平均潜伏期)和4个长期记忆指标(穿越平台次数、第一次空间探索实验平台所在象限时间占比、第二次空间探索实验平台所在象限时间占比以及对侧象限时间占比)；对上述指标进行相关分析和回归分析，选取其中最具代表性的2个指标，即平均潜伏期和穿越平台次数，通过分层聚类方法对模型组小鼠的认知水平进行区分，将模型组小鼠分为高表现组、中表现组、低表现组；将中表现组剔除，对高表现组、低表现组以及对照组的水迷宫各项指标进行组间对比，明确组间的认知功能差异。

1.2.3　Western blot检测　　完成行为学测试后，对小鼠采取吸入麻醉后颈椎脱臼法实施安乐死，快速剥离并分离相关脑组织，用预冷PBS轻轻洗去血液。在对照组、低表现组以及高表现组中每组随机选择3只小鼠，用细胞膜蛋白提取试剂盒将前额叶皮质以及海

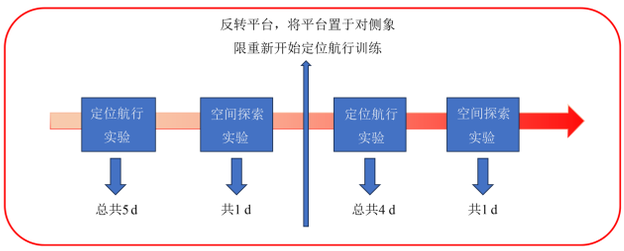


图3 水迷宫行为学检测流程

马组织的膜蛋白以及细胞质蛋白分开提取,BCA试剂盒进行样本蛋白浓度测定,再将样本蛋白浓度稀释到2 μg/μL,加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,细胞质蛋白进行金属浴使蛋白变性,膜蛋白直接进行电泳上样。每孔上样8 μL进行电泳、转膜后用无蛋白快速封闭液封闭10 min。分别配置p-GluR1、GluR1、GluR2、CaMKⅡ、BDNF、内参GAPDH以及ATPase的一抗,用一抗4 ℃孵育转好的PVDF膜过夜,次日用TBST洗膜3次,每次10 min,后用二抗(山羊抗兔)室温孵育1 h,再用TBST洗膜3次,往膜上加入ECL显影液后在凝胶成像系统中进行显影。使用Image J软件测量目的蛋白灰度值。

1.3 统计学分析

应用GraphPad Prism 6.0软件对数据进行统计学分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间对比采用方差分析以及非参数检验等分析方法,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

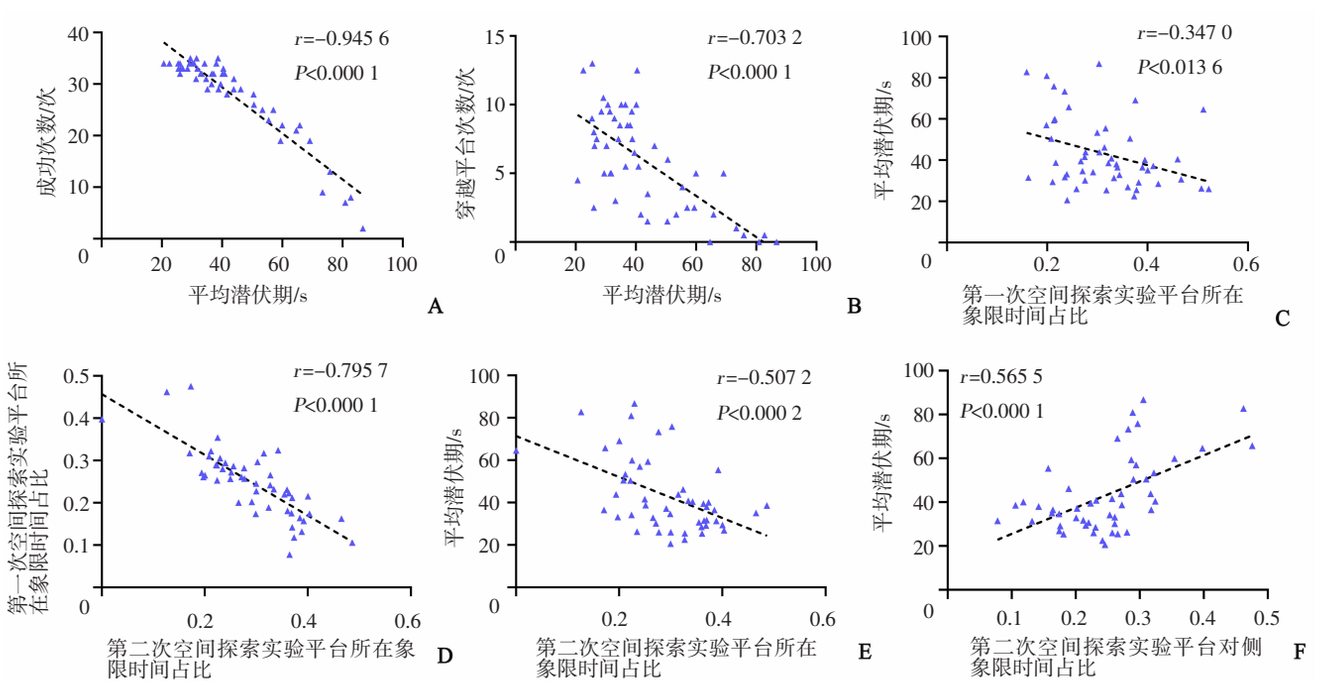
2 结果

2.1 模型组小鼠水迷宫相关统计指标之间存在显著的相关性

学习指标以及长期记忆指标彼此内部显著相关($r=-0.945\ 6$,$P<0.000\ 1$,图4A;$r=-0.795\ 7$,$P<0.000\ 1$,图4D)。在两类指标之间也存在着显著的相关性:平均潜伏期与穿越平台次数($r=-0.703\ 2$,$P<0.000\ 1$,图4B)、第一次空间探索实验平台所在象限时间占比($r=-0.347\ 0$,$P<0.013\ 6$,图4C)、第二次空间探索实验平台所在象限时间占比($r=-0.507\ 2$,$P<0.000\ 2$,图4E)以及第二次空间探索实验平台对侧象限时间占比($r=-0.565\ 6$, $P<0.000\ 1$,图4F)。

2.2 双因素分层聚类分组结果及组间认知差异对比

挑选其中最具代表性的2个指标,平均潜伏期和穿越平台次数,通过分层聚类方法对模型组小鼠的认知功能进行区分,将模型组小鼠分为高表现组($n=31$)、



A:平均潜伏期和成功次数存在显著相关性;B:平均潜伏期和穿越平台次数存在显著相关性;C:平均潜伏期和第一次空间探索实验平台所在象限时间占比存在显著相关性;D:2次空间探索实验平台所在象限时间占比存在显著相关性;E:平均潜伏期和第二次空间探索实验平台所在象限时间占比存在显著相关性;F:平均潜伏期和第二次空间探索实验平台对侧象限时间占比存在显著相关性

图4 水迷宫统计指标之间的相关分析与回归分析($n=50$,$\bar{x}\pm s$)

中表现组(n=11)、低表现组(n=8，图5)。相较于对照组，低表现组在2次定位航行实验中第2~5天、第7~10天的当日平均潜伏期存在显著差异(P<0.05，图6A)，高表现组与低表现组在2次定位航行实验中当日平均潜伏期存在显著差异(P<0.05，图6A)。相较于高表现组和对照组，低表现组小鼠的平均潜伏期更长(P<0.05，图6B)，穿越平台次数更少(P<0.05，图6C)。在第二次空间探索实验中，相较于低表现组，高表现组在平台对侧象限探索时间更短，在平台所在象限探索时间更长(P<0.05，图6D)。在定位航行实验中，相较于另外2组，低表现组小鼠的平均移动距离显著增加(P<0.05，图6E)。相较于低表现组，高表现组小鼠在2次空间探索实验中的移动距离均显著增加(P<0.05，图6F)。

2.3　CaMKⅡ信号通路相关蛋白表达在rmTBI致认知障碍中发生变化

相较于对照组，高表现组小鼠前额叶皮质中的CaMKⅡ和GluR2的表达显著升高(P<0.05，图7C、F)，低表现组小鼠的前额叶皮质中GluR1、GluR2的表达均显著升高(P<0.05，图7E、F)；相较于高表现组，低表现组小鼠前额叶皮质中的GluR2/GluR1比值显著下降(P<0.05，图7G)；相较于其它2组，高表现组小鼠海马组织中GluR1的磷酸化程度显著降低(P<0.05，图7I)。

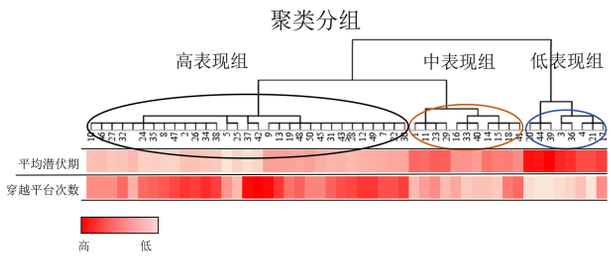
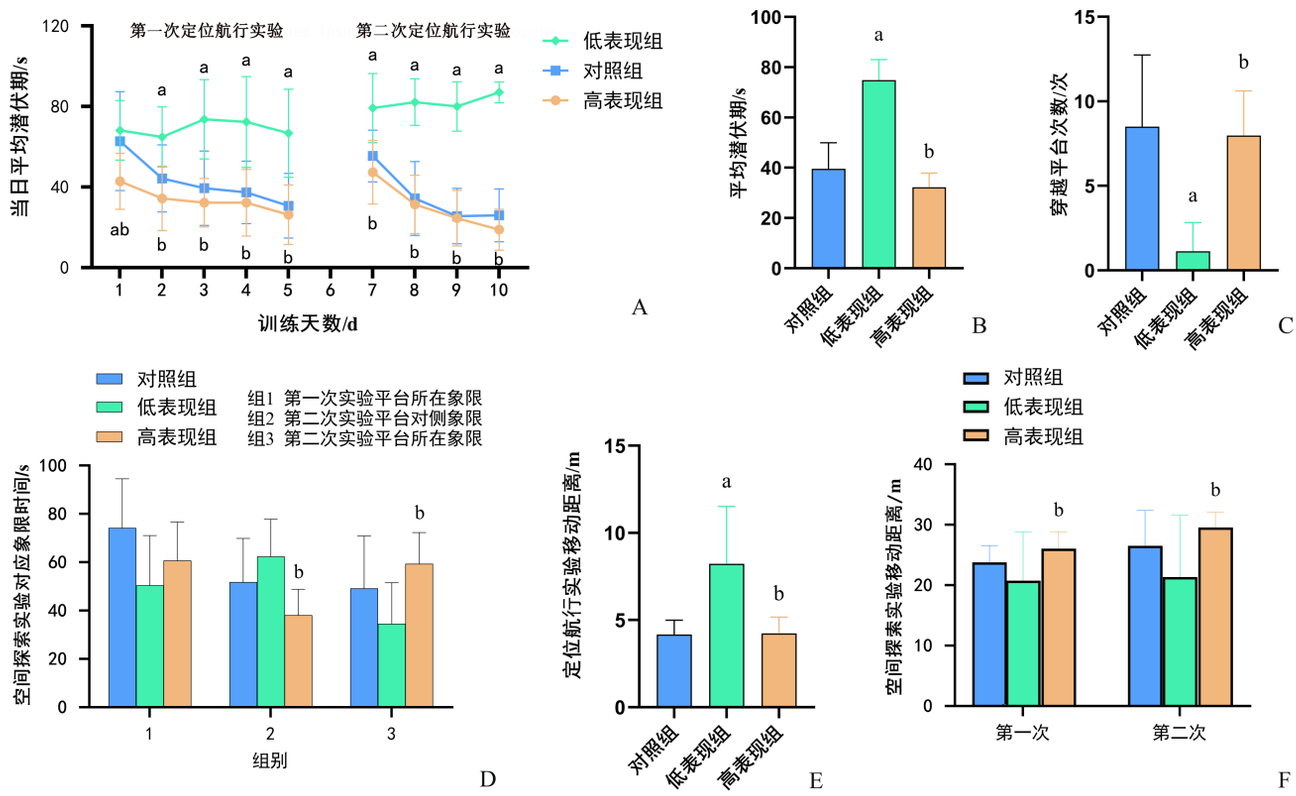


图5　模型组小鼠双因素分层聚类分组结果

2.4　BDNF蛋白表达在rmTBI致认知障碍中发生变化

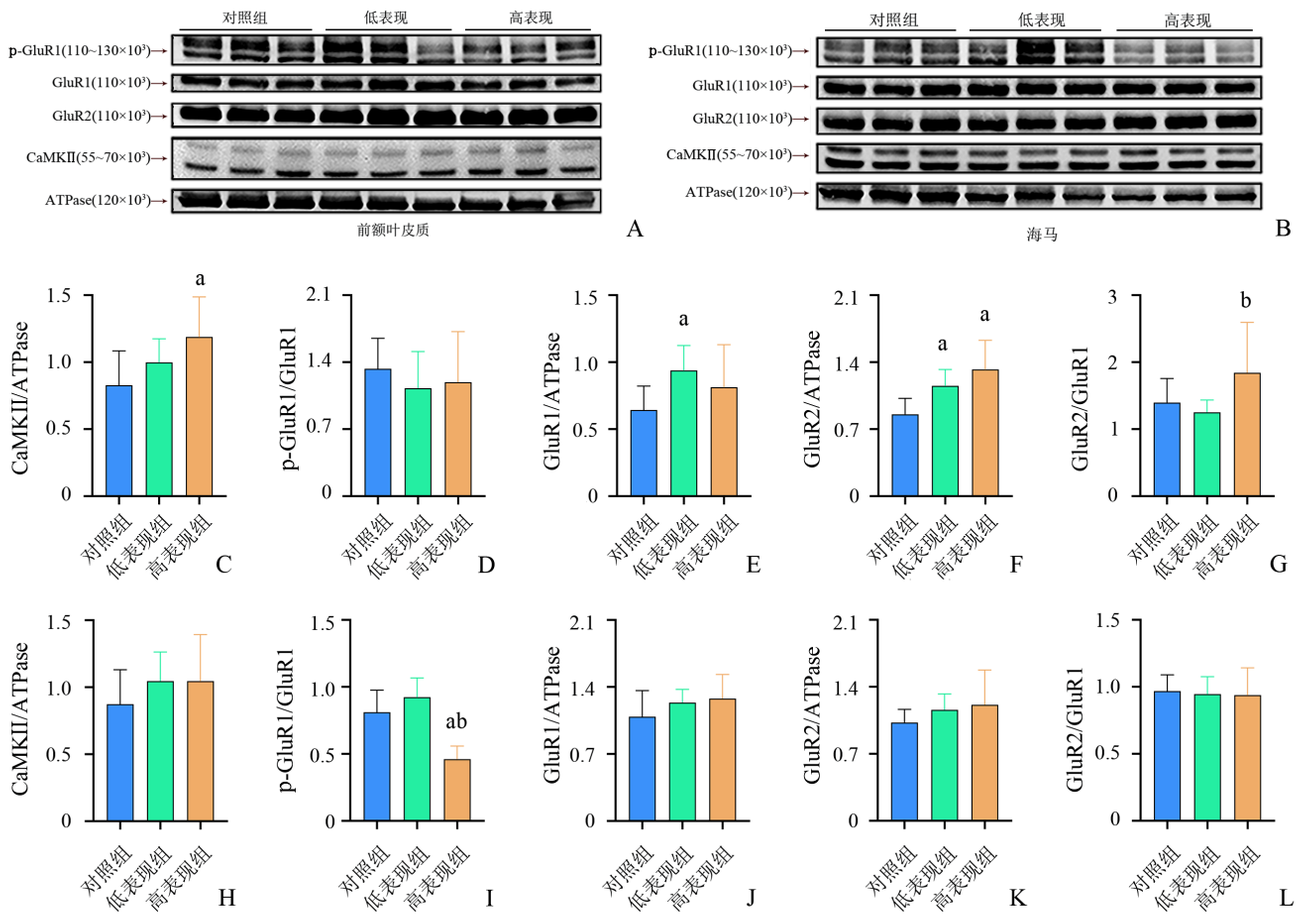
相较于对照组，低表现组小鼠proBDNF(P<0.05，图8C、F)和mBDNF(P<0.05，图8D、G)在前额叶皮质和海马组织中的表达均显著升高，高表现组小鼠仅在前额叶皮质中mBDNF的表达显著升高(P<0.05，图8D)。相较于对照组，低表现组小鼠在前额叶皮质和海马组织中的mBDNF/proBDNF比值均显著升高(P<0.05，图8E、H)，而高表现组小鼠的mBDNF/proBDNF比值差异不具有统计学意义。



a：P<0.05，与对照组比较；b：P<0.05，与低表现组比较

A：各组小鼠2次定位航行实验当日平均潜伏期比较结果；B、C：各组小鼠平均潜伏期和穿越平台次数的比较结果；D：各组小鼠空间探索实验对应象限时间的比较结果；E、F：各组小鼠水迷宫实验移动距离的比较结果

图6　小鼠各项认知指标的组间差异性分析($\bar{x}\pm s$)



a:P<0.05,与对照组比较;b:P<0.05,与低表现组比较

A、B:CaMKⅡ信号通路相关蛋白在前额叶皮质以及海马组织中的表达水平　其中p-GluR1与CaMKⅡ都为双条带;C~G:前额叶皮质蛋白表达半定量分析;H~L:海马组织蛋白表达半定量分析

图7　Western blot检测CaMKⅡ信号通路相关蛋白在rmTBI致认知障碍中的表达变化(n=3,$\bar{x}\pm s$)

3　讨论

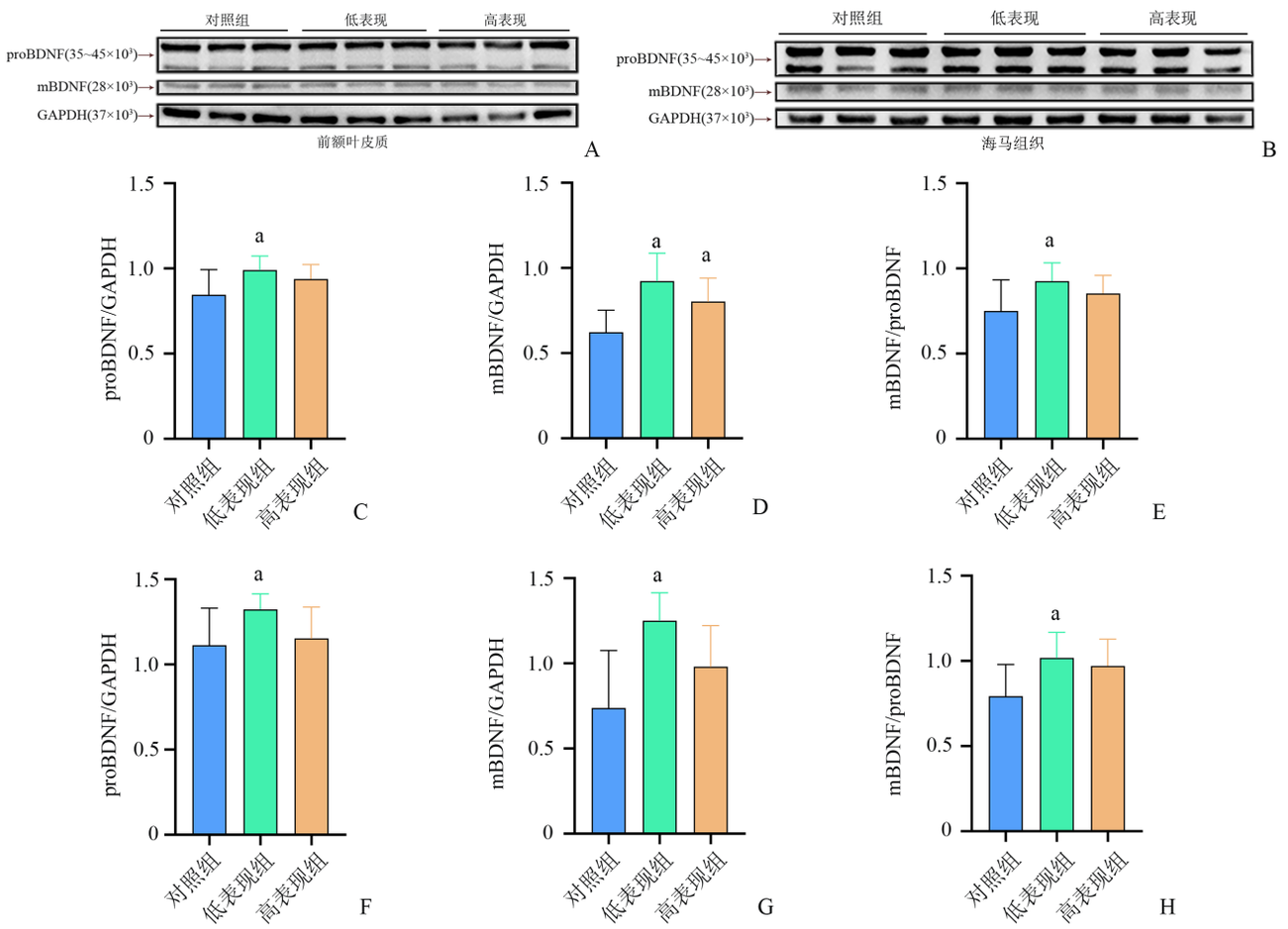
rmTBI在军队训练以及体育运动中难以避免,随着人们对于生活质量要求的日渐提高,对rmTBI引起的功能性后遗症的关注日益增加,在既往研究中发现[27-28],rmTBI所引起的认知障碍与脑代谢紊乱、神经炎症反应、自噬、血脑屏障破坏、脑白质受损、血流动力学等异常相关。

3.1　水迷宫筛选rmTBI后认知功能障碍小鼠

本次实验中,通过水迷宫实验筛选,针对rmTBI造模后存在认知障碍的个体进行相关蛋白表达检测,这种方法之前已经有实验报道过[29-30],与既往实验相比,此次筛选在相关性验证上将学习能力指标与长期记忆指标交互进行分析、在分层聚类上将2类指标都纳入分组条件、在组间差异分析中对比的指标数量更多,上述实验设计可以有效提高筛选结果的可靠性。低表现组小鼠在水迷宫实验中平均潜伏期较长,穿越平台次数较少,提示其认知功能相对较弱,明确存在认知障碍;而高表现组小鼠虽然同样进行了自由落体击打,但在脑损伤慢性期的认知表现与对照组小鼠没有差异,在水迷宫实验中具有较短的平均潜伏期和较高的穿越平台次数,其认知表现与对照组小鼠没有差异,表明其学习能力和长期记忆能力较强,不能认为其存在认知障碍。

3.2　rmTBI慢性期良好的认知功能预后伴随着CaMKⅡ信号通路的表达上调

在神经系统发育及学习记忆形成过程中,CaMKⅡ发挥了重要的作用,其通过介导LTP,可以增加突触后膜表面AMPAR的活性、数量,促使新突触的形成以及沉默突触向功能突触的转化,进而提高神经元的突触效能[9]。相较于对照组,低表现组小鼠前额叶皮质中的GluR1与GluR2亚基的表达升高,但CaMKⅡ的表达



a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与低表现组比较

A、B：不同的BDNF亚型在前额叶皮质以及海马组织中的表达水平　其中proBDNF为双条带；C~E：前额叶皮质蛋白表达半定量分析；F~H：海马组织蛋白表达半定量分析

图8　Western blot检测不同BDNF亚型在rmTBI致认知障碍中的表达变化（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

不存在显著性差异，而高表现组小鼠不仅GluR2亚基的表达显著升高，CaMKⅡ的表达也显著上升，这意味着在rmTBI慢性期，无认知障碍小鼠的前额叶皮质中存在CaMKⅡ的激活以及突触后膜表面AMPAR插入数量的增多，这使得其神经元突触的传递效率极大增强，可能是其认知功能较好的原因。

3.3　rmTBI慢性期认知功能差异伴随着突触后膜上不同AMPAR亚基的占比变化

AMPAR是由4个亚基（GluR1~4）组成的四异聚体，不同的组合赋予独特的细胞运输行为和生物物理特性，海马中主要以GluR1/GluR2，或GluR2/GluR3双二聚体结合形式存在，以GluR1/GluR2二聚体为主。相较于高表现组，低表现组小鼠GluR2/GluR1的比值显著降低，这可能与一种特殊的谷氨酸受体亚型，钙通透性AMPAR（Calcium-permeable AMPA receptor，CP-AMPAR）的含量变化有关，通常，AMPAR的Ca^{2+}渗透性取决于GluR2亚基是否存在于其四聚体复合体中，缺乏GluR2亚基的CP-AMPAR是可渗透Ca^{2+}的，这意味着低表现组小鼠前额叶皮质神经元突触中CP-AMPAR的占比可能比高表现组更高。CP-AMPAR通过促进Ca^{2+}内流和积累所介导的兴奋性毒性是多种中枢和周围神经系统疾病中细胞损失的主要机制之一[31]，此外，CP-AMPAR还参与脑缺血诱导的游离Zn^{2+}升高和CA1神经元死亡[32]，也有实验验证了体外机械损伤后CP-AMPAR的阻断对神经元死亡有显著的保护作用[33]。而CP-AMPAR介导的兴奋性毒性也会反过来引起神经元膜上谷氨酸受体的增加，其消极作用在多种脑损伤疾病模型中已经被验证[31]，这可能是低表现组小鼠认知障碍的原因。

3.4　rmTBI慢性期认知障碍小鼠存在BDNF的过表达以及mBDNF转化率的升高

在前额叶皮质和海马组织中，相较于对照组，低

表现组小鼠两种BDNF亚型的表达与mBDNF/proBDNF的比值均显著升高,mBDNF与脑损伤后神经元的再生修复及保护有关,mBDNF-TrKB会激活细胞内3条信号通路:分别为MAPK、PI-3K和PLCγ,这3条信号通路在维持神经增长、神经细胞分化和存活发挥重要作用[34-35]。proBDNF存在正反两种作用,一种是proBDNF通过对NF-kB通路的激活来协同mBDNF-TrKB对脑损伤后小鼠神经元的修复及保护;另一种是proBDNF与P75NTR结合通过JNK相关通路来触发神经元凋亡、突触萎缩以及易化LTD。本实验中低表现组小鼠海马组织中GluR1、GluR2以及CaMKⅡ的表达与对照组相比均不存在差异,不能说明存在LTD,所以本实验中proBDNF的升高更可能与协同神经元的修复及保护有关。这意味着在rmTBI慢性期,认知障碍小鼠神经元中可能存在着代偿性的再生修复。

综上,在rmTBI慢性期,低表现组小鼠前额叶皮质神经元突触不同AMPAR亚基的占比与高表现组存在差异,高表现组小鼠的前额叶皮质中存在CaMKⅡ信号通路的激活。此外,在前额叶皮质和海马组织中,相较于对照组,低表现组小鼠proBDNF以及mBDNF的表达均显著升高,并且BDNF成熟体的转化率mBDNF/proBDNF也更高。本次实验存在两点不足:一是对于CaMKⅡ信号通路只进行了蛋白质分子表达水平的检测,后续还需进行电生理、形态学以及免疫组化等不同维度的实验来进行补充验证;二是未对BDNF下游的受体蛋白表达进行检测,因此,对于不同BDNF亚型在rmTBI致认知障碍中具体通过哪些下游通路产生作用,还需要进一步的实验探索。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

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): 1004-1060. DOI:10.1016/S1474-4422(22)00309-X.

[2] RASIAH P K, BEN G E, JHA K A, *et al*. Visual deficits after traumatic brain injury[J]. Histol Histopathol, 2021, 36(7): 711-724. DOI:10.14670/HH-18-315.

[3] RYAN T, NAGLE S, DALY E, *et al*. A potential role exists for nutritional interventions in the chronic phase of mild traumatic brain injury, concussion and sports-related concussion: a systematic review[J]. Nutrients, 2023, 15(17): 3726. DOI:10.3390/nu15173726.

[4] MCKEE A C, STEIN T D, HUBER B R, *et al*. Chronic traumatic encephalopathy (CTE): criteria for neuropathological diagnosis and relationship to repetitive head impacts[J]. Acta Neuropathol, 2023, 145(4): 371-394. DOI:10.1007/s00401-023-02540-w.

[5] SACRAMENTO C B, SONDHI D, ROSENBERG J B, *et al*. Anti-phospho-tau gene therapy for chronic traumatic encephalopathy[J]. Hum Gene Ther, 2020, 31(1/2): 57-69. DOI:10.1089/hum.2019.174.

[6] HWANG P H, NELSON L D, SHARON J D, *et al*. Association between TBI-related hearing impairment and cognition: a TRACK-TBI study[J]. J Head Trauma Rehabil, 2022, 37(5): E327-E335. DOI: 10.1097/HTR.0000000000000735.

[7] 李凯璐, 董宝文, 彭涛, 等. 抑制CCL/CXCL信号介导的中性粒细胞趋化减轻创伤性脑损伤后继发脑损伤[J]. 空军军医大学学报, 2024, 45(12): 1399-1405. DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2024.12.009.
LI K L, DONG B W, PENG T, *et al*. Inhibition of CCL/CXCL signaling pathway-mediated neutrophil chemotaxis alleviates secondary brain injury after traumatic brain injury[J]. J Air Force Med Univ, 2024, 45(12): 1399-1405. DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2024.12.009.

[8] YAMAUCHI T. Neuronal Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II: discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(8): 1342-1354. DOI: 10.1248/bpb.28.1342.

[9] NICOLL R A, SCHULMAN H. Synaptic memory and CaMKII[J]. Physiol Rev, 2023, 103(4): 2877-2925. DOI:10.1152/physrev.00034.2022.

[10] MOKIN M, ZHENG Z Q, KEIFER J. Conversion of silent synapses into the active pool by selective GluR1-3 and GluR4 AMPAR trafficking during *in vitro* classical conditioning[J]. J Neurophysiol, 2007, 98(3): 1278-1286. DOI:10.1152/jn.00212.2007.

[11] KIM S, SOHN S, CHOE E S. Cofilin linked to GluN2B subunits of NMDA receptors is required for behavioral sensitization by changing the dendritic spines of neurons in the caudate and putamen after repeated nicotine exposure[J]. Behav Brain Funct, 2024, 20(1): 27. DOI:10.1186/s12993-024-00253-y.

[12] REVERTE I, MARCHETTI C, PEZZA S, *et al*. Microglia-mediated calcium-permeable AMPAR accumulation in the nucleus accumbens drives hyperlocomotion during cocaine withdrawal[J]. Brain Behav Immun, 2024, 115: 535-542. DOI:10.1016/j.bbi.2023.11.007.

[13] RICH M T, WOROBEY S J, MANKAME S, *et al*. Sex-dependent fear memory impairment in cocaine-sired rat offspring[J]. Sci Adv, 2023, 9(42): eadf6039. DOI: 10.1126/sciadv.adf6039.

[14] XING B, BARBOUR A J, VITHAYATHIL J, *et al*. Reversible synaptic adaptations in a subpopulation of

murine hippocampal neurons following early-life seizures [J]. J Clin Invest, 2024, 134(5): e175167. DOI:10.1172/JCI175167.

[15] DI LUCENTE J, PERSICO G, ZHOU Z Y, *et al*. Ketogenic diet and BHB rescue the fall of long-term potentiation in an Alzheimer's mouse model and stimulates synaptic plasticity pathway enzymes [J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 195. DOI:10.1038/s42003-024-05860-z.

[16] PRIKHODKO O, FREUND R K, SULLIVAN E, *et al*. Amyloid-β causes NMDA receptor dysfunction and dendritic spine loss through mGluR1 and AKAP150-anchored calcineurin signaling [J]. J Neurosci, 2024, 44(37): e0675242024. DOI:10.1523/JNEUROSCI.0675-24.2024.

[17] XIAO M Y, WASLING P, HANSE E, *et al*. Creation of AMPA-silent synapses in the neonatal hippocampus [J]. Nat Neurosci, 2004, 7(3): 236-243. DOI:10.1038/nn1196.

[18] YAN X D, LIU J F, YE Z X, *et al*. CaMKII-mediated CREB phosphorylation is involved in Ca^{2+}-induced BDNF mRNA transcription and neurite outgrowth promoted by electrical stimulation [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162784. DOI:10.1371/journal.pone.0162784.

[19] LU B, NAGAPPAN G, LU Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction [J]. Handb Exp Pharmacol, 2014, 220: 223-250. DOI:10.1007/978-3-642-45106-5_9.

[20] JIANG H, CHEN S, LI C, *et al*. The serum protein levels of the tPA-BDNF pathway are implicated in depression and antidepressant treatment [J]. Transl Psychiatry, 2017, 7(4): e1079. DOI:10.1038/tp.2017.43.

[21] ZHOU S B, XUE M, LIU W Q, *et al*. Age-related attenuation of cortical synaptic tagging in the ACC is rescued by BDNF or a TrkB receptor agonist in both sex of mice [J]. Mol Brain, 2023, 16(1): 4. DOI: 10.1186/s13041-022-00992-x.

[22] LEAL G, COMPRIDO D, DUARTE C B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity [J]. Neuropharmacology, 2014, 76 Pt C: 639-656. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.005.

[23] KOWIAŃSKI P, LIETZAU G, CZUBA E, *et al*. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity [J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(3): 579-593. DOI:10.1007/s10571-017-0510-4.

[24] REICHARDT L F. Neurotrophin-regulated signalling pathways [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006, 361(1473): 1545-1564. DOI:10.1098/rstb.2006.1894.

[25] LI Z X, WANG H Y, XIAO G X, *et al*. Recovery of post-stroke cognitive and motor deficiencies by Shuxuening injection *via* regulating hippocampal BDNF-mediated Neurotrophin/Trk Signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 141: 111828. DOI:10.1016/j.biopha.2021.111828.

[26] KANE M J, ANGOA-PÉREZ M, BRIGGS D I, *et al*. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury [J]. J Neurosci Methods, 2012, 203(1): 41-49. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2011.09.003.

[27] SABIR M, GAUDREAULT P O, FREYBURGER M, *et al*. Impact of traumatic brain injury on sleep structure, electrocorticographic activity and transcriptome in mice [J]. Brain Behav Immun, 2015, 47: 118-30. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.12.023

[28] CELORRIO M, FRIESS S H. Gut-brain axis in traumatic brain injury: impact on neuroinflammation [J]. Neural Regen Res, 2022, 17(5): 1007-1008. DOI:10.4103/1673-5374.324839

[29] JUNG S H, BROWNLOW M L, PELLEGRINI M, *et al*. Divergence in Morris water maze-based cognitive performance under chronic stress is associated with the hippocampal whole transcriptomic modification in mice [J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10: 275. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00275.

[30] RESHETNIKOV V V, KISARETOVA P E, ERSHOV N I, *et al*. Genes associated with cognitive performance in the Morris water maze: an RNA-seq study [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 22078. DOI:10.1038/s41598-020-78997-6.

[31] GUO C Y, MA Y Y. Calcium permeable-AMPA receptors and excitotoxicity in neurological disorders [J]. Front Neural Circuits, 2021, 15: 711564. DOI: 10.3389/fncir.2021.711564.

[32] NOH K M, YOKOTA H, MASHIKO T, *et al*. Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(34): 12230-12235. DOI: 10.1073/pnas.0505408102.

[33] SPAETHLING J M, KLEIN D M, SINGH P, *et al*. Calcium-permeable AMPA receptors appear in cortical neurons after traumatic mechanical injury and contribute to neuronal fate [J]. J Neurotrauma, 2008, 25(10): 1207-1216. DOI: 10.1089/neu.2008.0532.

[34] LIN T W, HARWARD S C, HUANG Y Z, *et al*. Targeting BDNF/TrkB pathways for preventing or suppressing epilepsy [J]. Neuropharmacology, 2020, 167: 107734. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107734.

[35] NUMAKAWA T, ODAKA H, ADACHI N. Actions of brain-derived neurotrophin factor in the neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3650. DOI: 10.3390/ijms19113650.

(收稿:2025-01-15;修回:2025-02-21)

(编辑 严 涵)