

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.17.005

P2RX3 基因对创伤性脑损伤大鼠神经功能恢复的影响*

陈勇¹ 李文文¹ 魏宽海² 颜云峰¹ 李思震¹ 钟期富^{1Δ}

(1 新疆喀什地区第一人民医院创伤中心 新疆喀什 844000; 2 南方医科大学南方医院创伤中心 广东广州 510515)

摘要目的:探究嘌呤 2X3(P2RX3)受体(P2RX3)基因对创伤性脑损伤(TBI)大鼠神经功能恢复的影响。**方法:**通过颅脑损伤仪对大鼠进行 TBI 造模,造模后将 54 只 TBI 模型大鼠随机分为 TBI 组(n=10)、TBI+NC-sh 组(n=11)、TBI+P2RX3-sh 组(n=11)、TBI+NC-OE 组(n=11)和 TBI+P2RX3-OE 组(n=11)将仅切开皮肤而未打击造模的大鼠作为 Sham 组(n=10)。TBI+NC-sh 组、TBI+P2RX3-sh 组、TBI+NC-OE 组和 TBI+P2RX3-OE 组大鼠分别脑内注射 NC-sh、P2RX3-sh、NC-OE 组和 P2RX3-OE。Sham 组和 TBI 组大鼠脑内注射等量生理盐水。首次注射 7 d 后再次注射 1 次,14 d 后进行取材。采用改良神经功能缺损评分法评价大鼠神经功能。采用 Morris 水迷宫实验评价认知功能。采用蔗糖偏好实验和旷场实验评价行为学。采用称重法测量脑组织含水量。采用 TUNEL 染色检测细胞凋亡。采用免疫荧光染色检测 BDNF 荧光强度。采用 RT-qPCR 检测 P2RX3 mRNA 水平。采用 Western blot 检测 P2RX3、BDNF、TrkB、p-TrkB、蛋白激酶 B(Akt)、p-Akt、Bcl-2 和 Bax 蛋白水平。**结果:**与 TBI 组和 TBI+NC-sh 组比较,TBI+P2RX3-sh 组大鼠的 P2RX3 mRNA 和蛋白相对水平降低($P<0.05$),神经功能评分、逃避潜伏期和脑含水量均升高($P<0.05$),60 s 内的穿越平台次数、蔗糖偏好率和水平以及垂直活动分数均降低($P<0.05$),TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白相对水平升高($P<0.05$),BDNF 相对荧光强度以及 Bcl-2、BDNF、p-TrkB 和 p-Akt 蛋白相对水平降低($P<0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-OE 组比较,TBI+P2RX3-OE 组大鼠的 P2RX3 mRNA 和蛋白相对水平升高($P<0.05$),神经功能评分、逃避潜伏期和脑含水量均降低($P<0.05$),60 s 内的穿越平台次数、蔗糖偏好率和水平以及垂直活动分数均升高($P<0.05$),TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白相对水平降低($P<0.05$),BDNF 相对荧光强度以及 Bcl-2、BDNF、p-TrkB 和 p-Akt 蛋白相对水平升高($P<0.05$)。**结论:**P2RX3 在大鼠 TBI 后上调,且上调 P2RX3 具有促进神经功能恢复的作用,其机制与激活 BDNF/TrkB/Akt 信号通路有关。

关键词:创伤性脑损伤;嘌呤 2X3(P2RX3)受体(P2RX3);神经功能恢复;BDNF/TrkB/Akt 信号通路

中图分类号:R-33;R651.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)17-3226-07

Effect of P2RX3 Gene on Neurological Function Recovery in Rats with Traumatic Brain Injury*

CHEN Yong¹, LI Wen-wen¹, WEI Kuan-hai², YAN Yun-feng¹, LI Si-zhen¹, ZHONG Qi-fu^{1Δ}

(1 Trauma center, First People's Hospital of Kashi, Kashi, Xinjiang, 844000, China;

2 Trauma center, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515, China)

ABSTRACT Objective: To reveal the effect of purine 2X3 (P2RX3) receptor (P2RX3) gene on neurological function recovery in rats with traumatic brain injury (TBI). **Methods:** The TBI model of rats was made by craniocerebral injury instrument. After the model establishment, 54 TBI model rats were randomly divided into TBI group (n=10), TBI+NC-sh group (n=11), TBI+P2RX3-sh group (n=11), TBI+NC-OE group (n=11) and TBI+P2RX3-OE group (n=11). Rats which only cut the skin without hitting were taken as Sham group (n=10). Rats in TBI+NC-sh group, TBI+P2RX3-sh group, TBI+NC-OE group and TBI+P2RX3-OE group were injected into the brain with NC-sh, P2RX3-sh, NC-OE and P2RX3-OE respectively. Normal saline was injected into the brain of rats in Sham group and TBI group. Rats were injected again 7 days after the first injection, and the samples were taken 14 days later. The modified neurological deficit score was used to evaluate the neurological function. Cognitive function was evaluated by Morris water maze test. Sucrose preference test and open field test were used to evaluate behavior. The water content of brain tissue was measured by weighing method. Apoptosis was detected by TUNEL staining. The fluorescence intensity of BDNF was detected by immunofluorescence staining. The level of P2RX3 mRNA was detected by RT-qPCR. The protein levels of P2RX3, BDNF, TrkB, p-TrkB, protein kinase B (Akt), p-Akt, Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. **Results:** Compared with TBI group and TBI+NC-sh group, the relative levels of mRNA and protein of P2RX3 in TBI+P2RX3-sh group decreased ($P<0.05$), neurological function score, escape latency and brain water content were all increased ($P<0.05$), platform crossing times within 60 s, sucrose preference rate and horizontal and vertical activity scores all decreased ($P<0.05$), TUNEL positive rate and the relative protein level of Bax increased ($P<0.05$), the relative fluorescence intensity of

* 基金项目:新疆维吾尔自治区科技支疆项目计划(指令性)项目(2022E02040);广东省援疆农村科技(特派员)项目(KTPYJ2023010)

作者简介:陈勇(1986-),男,主治医师,主要研究方向:颅脑创伤,E-mail: ChenCYle@126.com

Δ 通讯作者:钟期富(198-),男,主治医师,主要研究方向:重症创伤,E-mail: 278408566@qq.com

(收稿日期:2024-01-31 接受日期:2024-02-26)

BDNF and the relative protein levels of Bcl-2, BDNF, p-TrkB and p-Akt decreased ($P<0.05$). Compared with TBI group and TBI+NC-OE group, the relative levels of mRNA and protein of P2RX3 in TBI+P2RX3-sh group increased ($P<0.05$), neurological function score, escape latency and brain water content were all decreased ($P<0.05$), platform crossing times within 60 s, sucrose preference rate and horizontal and vertical activity scores all increased ($P<0.05$), TUNEL positive rate and the relative protein level of Bax decreased ($P<0.05$), the relative fluorescence intensity of BDNF and the relative protein levels of Bcl-2, BDNF, p-TrkB and p-Akt increased ($P<0.05$). **Conclusion:** P2RX3 is up-regulated after TBI in rats, and up-regulation of P2RX3 can promote the recovery of neurological function, and its mechanism is related to the activation of BDNF/TrkB/Akt signal pathway.

Key words: Traumatic brain injury; Purine 2X3 (P2RX3); Nerve function recovery; BDNF/TrkB/Akt signal pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R651.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)17-3226-07

前言

治疗创伤性脑损伤(Traumatic brain injury, TBI)后的继发性损伤是改善 TBI 患者预后的主要领域。虽然外科手术可降低 TBI 患者的死亡率,但无法避免继发性损伤,因此致残率较高^[1]。更好地了解 TBI 后的继发性损伤发生机制有利于疾病的防治,已有大量学者研究证实许多基因的异常表达参与了 TBI 后继发性损伤的发生^[2]。嘌呤 2X3(P2X3)受体(Purine 2X3, P2RX3)是 P2X 家族的嘌呤受体,也是三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)的嘌呤受体之一,可作为配体门控离子通道激活 ATP 诱发的伤害感受器,研究表明 P2X3 和 P2X3 受体与神经病理性疼痛和炎性疼痛相关^[3]。P2RX 家族已被证明可促进神经生长并在神经损伤后发挥神经保护作用^[4],其中 P2RX3 在轴突生长中发挥重要作用^[5]。据报道,TBI 大鼠脑组织中 P2RX3 表达上调,P2RX3 的过表达促进了 NG108 细胞的神经突生长^[2],然而,尚不清楚 P2RX3 在 TBI 中发挥何种功能。脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及其高亲和力受体原肌球蛋白相关激酶 B (Tropomyosin-related kinase B, TrkB)在促进神经元存活、突出可塑性和记忆功能中发挥着关键作用^[6]。BDNF 可有效增强 P2RX3 功能^[3,6]。还有学者研究显示,其他 P2RX 家族成员 P2RX4 控制神经元 BDNF 的释放^[7]。上述研究背景提示 P2RX3 的异常表达可能参与了 TBI 后的继发性损伤,并且可能与 BDNF 的表达有关。因此,本研究探讨了 P2RX3 对 TBI 大鼠神经功能恢复的影响及可能机制,旨在揭示 P2RX3 在 TBI 后继发性损伤中的作用及其作为治疗靶点的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 阴性对照 shRNA (NC-sh)、P2RX3 shRNA (P2RX3-sh)、阴性对照过表达 (NC-OE) 和 P2RX3 过表达 (P2RX3-OE) 慢病毒委托上海吉玛基因合成。苏木素伊红 (HE)、Nissl 和 TUNEL 染液、RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、ECL 试剂盒购自碧云天生物技术研究所。RNA 提取试剂盒购自美国 Qiagen 公司。PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR Premix ExTaq II 购自日本 Takara 公司。一抗和二抗抗体均购自英国 Abcam 公司。

1.1.2 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 (7~8 周龄, 体质量 240~310 g) 购自新疆医科大学[SCXK(新)2023-0001]。大鼠在 23±

2℃、55±5%湿度、12 h 光暗循环的屏障环境中饲养。

1.2 方法

1.2.1 TBI 大鼠模型的制备 通过美国 PSI TBI-0310 颅脑损伤仪进行 TBI 造模^[8],戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠,仰卧固定于脑立体定向仪上,切开皮肤,左顶骨钻开直径 4 mm 的骨窗,设定颅脑损伤仪参数(速度:5 m/s,深度:4.5 mm,停留时间:400 ms)。骨蜡封孔,缝合皮肤。60 只用于造模的大鼠中有 54 只造模成功,成功率为 90%。

1.2.2 大鼠分组及处理 54 只 TBI 模型大鼠随机分为 TBI 组 (n=10)、TBI+NC-sh 组 (n=11)、TBI+P2RX3-sh 组 (n=11)、TBI+NC-OE 组 (n=11) 和 TBI+P2RX3-OE 组 (n=11),将仅切开皮肤而未打击造模的大鼠作为 Sham 组 (n=10)。TBI+NC-sh 组、TBI+P2RX3-sh 组、TBI+NC-OE 组和 TBI+P2RX3-OE 组大鼠用 10 μL 微量注射剂沿骨窗缘进针至硬膜下 2.5 mm, 分别注入 8 μL 的 NC-sh、P2RX3-sh、NC-OE 组和 P2RX3-OE, 滴度为 1×10^9 TU/mL, 注射速度为 0.5 μL/min。Sham 组和 TBI 组大鼠脑内注射 8 μL 生理盐水。注射完毕后骨蜡封孔,缝合皮肤。首次注射 7 d 后再次注射 1 次,14 d 后进行取材。

1.2.3 大鼠神经功能评价 采用改良神经功能缺损评分法^[9]评价大鼠神经功能,得分范围 0~18 分,分值越高损伤越严重。

1.2.4 大鼠认知功能评价 采用 Morris 水迷宫实验评价认知功能^[10]。美国 CleverSys Gene&I Morris 水迷宫系统主要由视频分析系统、圆形水池(直径 150 cm、高 60 cm)和逃生站台(直径 12 cm)组成,将站台置于第一象限中心水面下 2 cm 处。通过定位航行实验记录逃避潜伏期,通过空间探索实验记录 60 s 内的穿越平台次数。实验过程中保持水温 30℃,水深 35 cm。

1.2.5 大鼠行为学评价 采用蔗糖偏好实验^[11]和旷场实验^[12]评价大鼠行为学。蔗糖偏好实验中,分别准备 1 瓶装满自来水和 1 瓶转满 1%蔗糖溶液的瓶子,将两个瓶子固定在笼中,大鼠禁水禁食 12 h 后放入笼中,6 h 后两个瓶子互换位置。12 h 后测量两瓶溶液的消耗量并计算蔗糖偏好率。旷场实验设备为底部被分成 25 个相等方格的不透明盒子(长:宽:高=100:100:40 cm)。将大鼠从盒子底部中心放入,将 5 min 内的穿越方格的次数作为水平活动分数,5 min 内的两前肢离地次数作为垂直活动分数。

1.2.6 大鼠脑组织含水量的测定 采用称重法测量脑组织含水量。将损伤侧脑半球取出并用蒸馏水冲洗去除杂物,滤纸吸干水分后测量湿重,95℃烘烤 24 h 后测量干重,含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.2.7 大鼠脑组织病理学检查 将损伤侧脑组织制成 5 μm 厚石蜡切片,采用 HE 染色观察组织形态,采用 Nissl 染色观察尼氏体形态,采用 TUNEL 染色观察细胞凋亡。

1.2.8 免疫荧光染色实验检测 BDNF 表达 将制备好的损伤侧脑组织石蜡切片用二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化后,用 0.01 mol/L 的枸橼酸钠缓冲溶液 (pH6.0) 煮沸 10 min 进行抗原修复,用 0.25% Triton-X 100 室温通透 5 min,用 10% 正常驴血清室温封闭 30 min。将载玻片与 BDNF 一抗(1:500)在 4℃ 孵育过夜。然后与荧光二抗(1:500)室温孵育 2 h,用 DAPI 对细胞核染色 5 min,并使用共焦显微镜拍摄图像,使用 Image J 软件分析荧光强度。

1.2.9 RT-qPCR 实验检测 P2RX3 基因表达水平 使用 RNA 提取试剂盒 (货号:74104, 美国 Qiagen 公司) 提取脑组织总 RNA。使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (货号:RR047A, 日本 Takara 公司) 将提取的 RNA 逆转录为 cDNA, 并使用 SYBR Premix ExTaq II (DRR081A) 和罗氏 LightCycler480 PCR 系统进行 PCR。PCR 条件如下:95℃ 5 min,95℃ 20 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s, 共 40 个循环。引物序列如下: P2RX3: 正向 5'-TGGACAGGATTTTGCCAAGC-3' 和反向 5'-CTGAAGTTGTAGCCAGGGGA-3'。β-actin: 正向 5'-TGCTCTAGGCGGACTGTTA-3' 和反向 5'-CGTCACATGGCATCTCACGA-3'。β-actin 作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因相对水平。

1.2.10 Western blot 实验检测蛋白表达水平 RIPA 提取脑组织总蛋白,BCA 法定量,使用 10% SDS-PAGE 分离蛋白,然后转移到 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后与 P2RX3(1:1000)、BDNF(1:1000)、TrkB(1:1000)、p-TrkB(1:1000)、蛋白激酶 B (Akt)(1:1000)、p-Akt (1:1000)、Bcl-2 (1:2000)、Bax(1:2000)和 β-actin(1:1000)一抗 4℃ 孵育过夜。然后将膜与 IgG H&L(HRP)(1:500)二抗室温孵育 1 h。ECL 显影 5 min,β-actin 作为内参,通过 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行定量。

1.3 统计学分析

SPSS21.0 软件用于分析数据。组间差异分析采用单因素方差分析和 LSD 检验。显著水平为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠脑组织中 P2RX3 的表达

不同处理组的 P2RX3 的 mRNA 和蛋白相对水平差异有统计学意义 ($F=1810.606, 1485.345, P<0.001$)。与 Sham 组比较, TBI 组大鼠的 P2RX3 mRNA 和蛋白相对水平升高 ($P<0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-sh 组比较, TBI+P2RX3-sh 组大鼠的 P2RX3 mRNA 和蛋白相对水平降低 ($P<0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-OE 组比较, TBI+P2RX3-OE 组的 mRNA 和蛋白相对水平升高 ($P<0.05$)。见图 1。

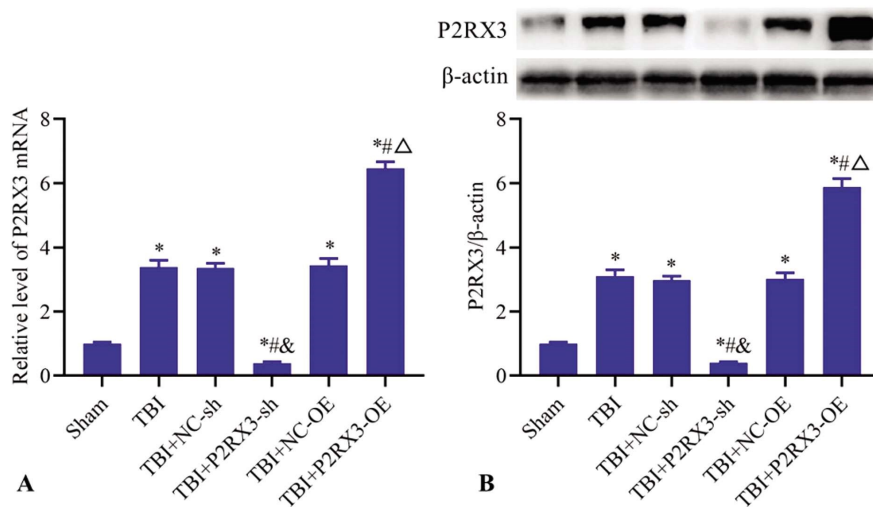


图 1 各组大鼠脑组织中 P2RX3 的 mRNA 和蛋白相对水平

Fig. 1 Relative mRNA and protein levels of P2RX3 in brain tissues of rats in each group

Note: A and B: Relative mRNA and protein levels of P2RX3, respectively; Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with TBI group, # $P<0.05$; Compared with TBI+NC-sh group, & $P<0.05$; Compared with TBI+NC-OE group, Δ $P<0.05$.

2.2 P2RX3 对 TBI 大鼠神经功能的影响

不同处理组的大鼠神经功能评分差异有统计学意义 ($F=174.750, P<0.001$)。与 Sham 组比较, TBI 组大鼠的神经功能评分升高 ($P<0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-sh 组比较, TBI+P2RX3-sh 组的神经功能评分升高 ($P<0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-OE 组比较, TBI+P2RX3-OE 组的神经功能评分降低 ($P<0.05$)。见图 2。

2.3 P2RX3 对 TBI 大鼠认知功能的影响

不同处理组大鼠的逃避潜伏期和 60 s 内的穿越平台次数

差异有统计学意义 ($F=166.383, 278.265, P<0.001$)。与 Sham 组比较, TBI 组大鼠的逃避潜伏期升高, 60 s 内的穿越平台次数降低 ($P<0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-sh 组比较, TBI+P2RX3-sh 组大鼠的逃避潜伏期升高, 60 s 内的穿越平台次数降低 ($P<0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-OE 组比较, TBI+P2RX3-OE 组大鼠的逃避潜伏期降低, 60 s 内的穿越平台次数升高 ($P<0.05$)。见图 3。

2.4 P2RX3 对 TBI 大鼠行为学的影响

不同处理组的蔗糖偏好率、水平和垂直活动分数差异有统

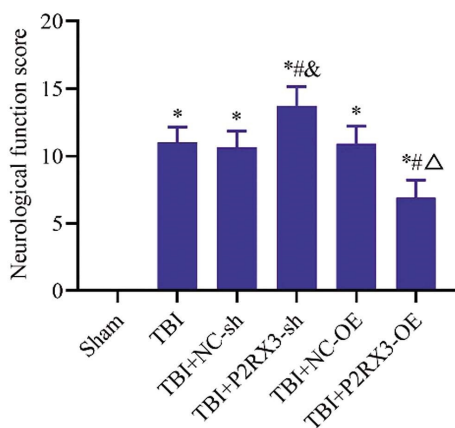


图2 各组大鼠的神经功能评分

Fig. 2 Neural function scores of rats in each group

Note: Compared with Sham group, * $P < 0.05$; Compared with TBI group, # $P < 0.05$; Compared with TBI+NC-sh group, & $P < 0.05$; Compared with TBI+NC-OE group, $\Delta P < 0.05$.

计学意义 ($F=96.863, 124.119, 242.014, P < 0.001$)。与 Sham 组比较, TBI 组大鼠的蔗糖偏好率和水平以及垂直活动分数降低 ($P < 0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-sh 组比较, TBI+P2RX3-sh 组大鼠的蔗糖偏好率和水平以及垂直活动分数降低 ($P < 0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-OE 组比较, TBI+P2RX3-OE 组大鼠的蔗糖偏好率和水平以及垂直活动分数升高 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 P2RX3 对 TBI 大鼠脑组织损伤的影响

不同处理组大鼠的脑组织含水量差异有统计学意义 ($F=29.061, P < 0.001$)。与 Sham 组比较, TBI 组大鼠的脑组织含

水量升高 ($P < 0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-sh 组比较, TBI+P2RX3-sh 组大鼠的脑组织含水量升高 ($P < 0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-OE 组比较, TBI+P2RX3-OE 组大鼠的脑组织含水量降低 ($P < 0.05$)。HE 和 Nissl 染色结果显示, Sham 组大鼠脑组织形态正常; TBI 组大鼠出现明显神经元变形、肿胀、空泡化, 细胞核固缩等病变; 与 TBI 组和 TBI+NC-sh 组比较, TBI+P2RX3-sh 组大鼠脑组织损伤加重; 与 TBI 组和 TBI+NC-OE 组比较, TBI+P2RX3-OE 组大鼠脑组织损伤减轻。见图 5 和图 6。

2.6 P2RX3 对 TBI 大鼠脑组织细胞凋亡的影响

不同处理组大鼠的 TUNEL 阳性率、Bcl-2 和 Bax 蛋白相对水平差异有统计学意义 ($F=238.834, 551.252, 188.435, P < 0.001$)。与 Sham 组比较, TBI 组大鼠的 TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白相对水平升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白相对水平降低 ($P < 0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-sh 组比较, TBI+P2RX3-sh 组大鼠的 TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白相对水平升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白相对水平降低 ($P < 0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-OE 组比较, TBI+P2RX3-OE 组大鼠的 TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白相对水平降低 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白相对水平升高 ($P < 0.05$)。见图 7。

2.7 P2RX3 对 TBI 大鼠脑组织 BDNF/TrkB 信号通路的影响

不同处理组的 BDNF 相对荧光强度以及 BDNF、p-TrkB 和 p-Akt 蛋白相对水平差异有统计学意义 ($F=698.125, 511.148, 428.297, 757.360, P < 0.001$)。与 Sham 组比较, TBI 组大鼠的 BDNF 相对荧光强度以及 BDNF 和 p-TrkB 蛋白相对水平升高 ($P < 0.05$), p-Akt 蛋白相对水平降低 ($P < 0.05$)。与 TBI 组和 TBI+NC-sh 组比较, TBI+P2RX3-sh 组大鼠的 BDNF 相对荧光强度以及 BDNF、p-TrkB 和 p-Akt 蛋白相对水平降低 ($P < 0.05$)。

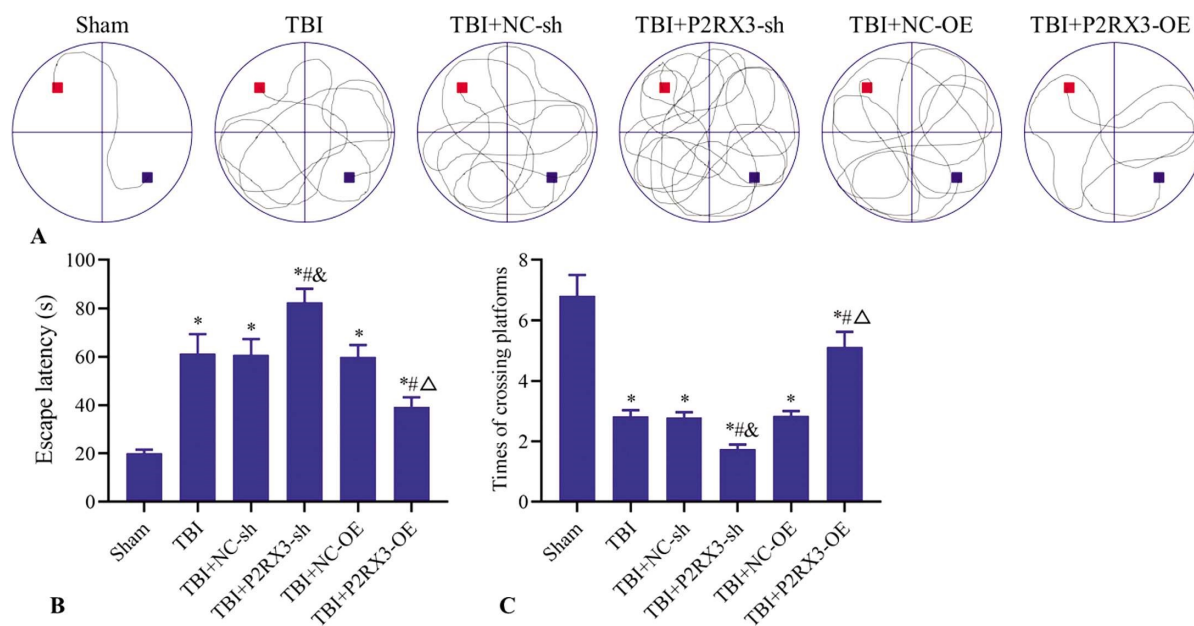


图3 P2RX3 对 TBI 大鼠认知功能的影响

Fig. 3 Effects of P2RX3 on cognitive function in TBI rats

Note: A: The rat swimming path; B and C: The number of times of crossing the platform within 60 s and the incubation period of escape, respectively; Compared with Sham group, * $P < 0.05$; Compared with TBI group, # $P < 0.05$; Compared with TBI+NC-sh group, & $P < 0.05$; Compared with TBI+NC-OE group, $\Delta P < 0.05$.

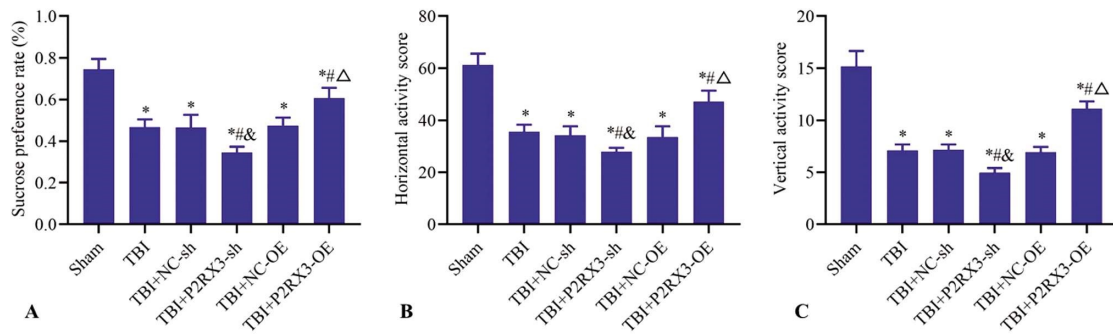


图 4 P2RX3 对 TBI 大鼠行为学的影响

Fig. 4 Effect of P2RX3 on behavior of TBI rats

Note: A-C: Sucrose preference rate, horizontal and vertical activity scores, respectively; Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with TBI group, # $P<0.05$; Compared with TBI+NC-sh group, & $P<0.05$; Compared with TBI+NC-OE group, Δ $P<0.05$.

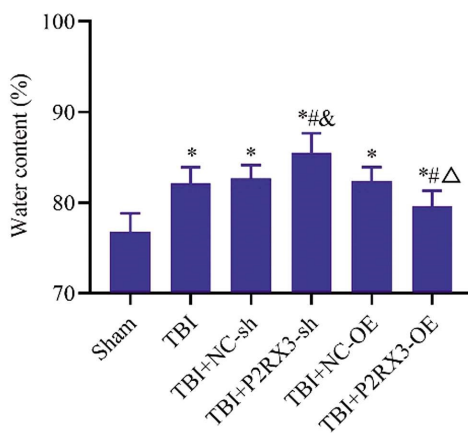


图 5 P2RX3 对 TBI 大鼠脑组织含水量的影响

Fig. 5 Effect of P2RX3 on water content in brain tissue of TBI rats

Note: Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with TBI group, # $P<0.05$; Compared with TBI+NC-sh group, & $P<0.05$; Compared with TBI+NC-OE group, Δ $P<0.05$.

05)。与 TBI 组和 TBI+NC-OE 组比较, TBI+P2RX3-OE 组的 BDNF 相对荧光强度以及 BDNF、p-TrkB 和 p-Akt 蛋白相对水平升高($P<0.05$)。见图 8 和图 9。

3 讨论

目前, TBI 的治疗主要集中在减少继发性损伤和增强神经功能恢复方面。继发性损伤涉及神经功能减退、认知障碍、行为学异常等, 与细胞凋亡、水肿、氧化应激、炎症等一系列反应有关^[3]。TBI 后的继发性损伤机制与多种基因的异常表达有关, 其中包括 P2RX3。P2RX 家族成员具有促进神经生长并的作用^[4], 而 P2RX3 可促进轴突生长^[5]。Huang 等^[2]研究显示, TBI 大鼠脑组织中 P2RX3 在 mRNA 和蛋白水平上表达上调, P2RX3 的过度表达促进分化的 NG108 细胞的神经突生长, 表明上调 P2RX3 可能促进 TBI 后轴突的生长和恢复。本研究也发现 TBI 大鼠脑组织中 P2RX3 表达上调, 进一步研究显示, 下调 P2RX3 加重了 TBI 大鼠脑组织损伤, 表现为神经和认知功能减退、行为学异常、脑组织细胞死亡和凋亡等。然而, 上调 P2RX3 则有效减轻了脑组织损伤, 促进了神经功能恢复。上述结果说明 P2RX3 在 TBI 中发挥神经保护作用。

BDNF 是海马和其他大脑区域长时程增强诱导和维持的主要调节因子^[6]。BDNF 在改善突触可塑性和认知功能方面具有强大作用^[4], 对于神经突和轴突生长很重要^[5]。而 TrkB 的激活可以改善认知, 增加突触密度^[6]。BDNF 和 TrkB 在神经元可塑性发生区域上调, 因此 BDNF/TrkB 是突触可塑性和结

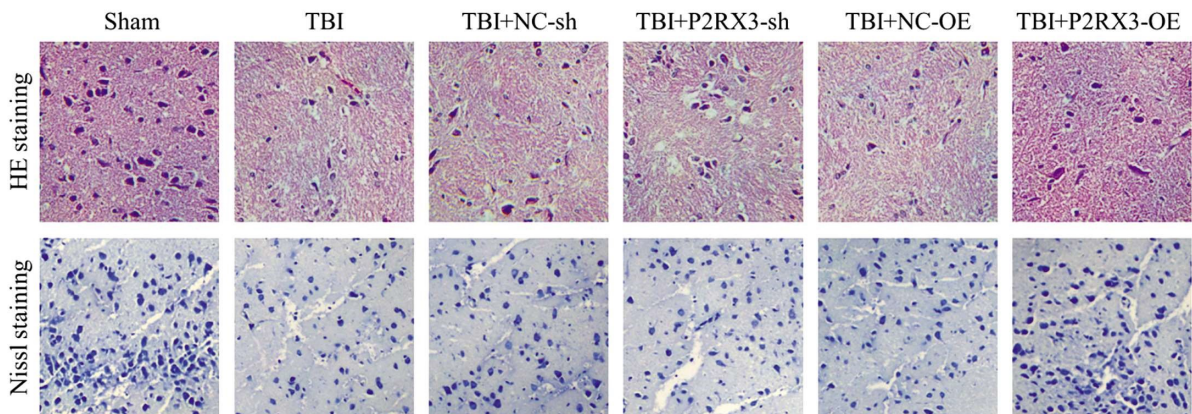


图 6 P2RX3 对 TBI 大鼠脑组织损伤的影响(400×)

Fig. 6 Effect of P2RX3 on brain tissue injury in TBI rats

Note: Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with TBI group, # $P<0.05$; Compared with TBI+NC-sh group, & $P<0.05$; Compared with TBI+NC-OE group, Δ $P<0.05$.

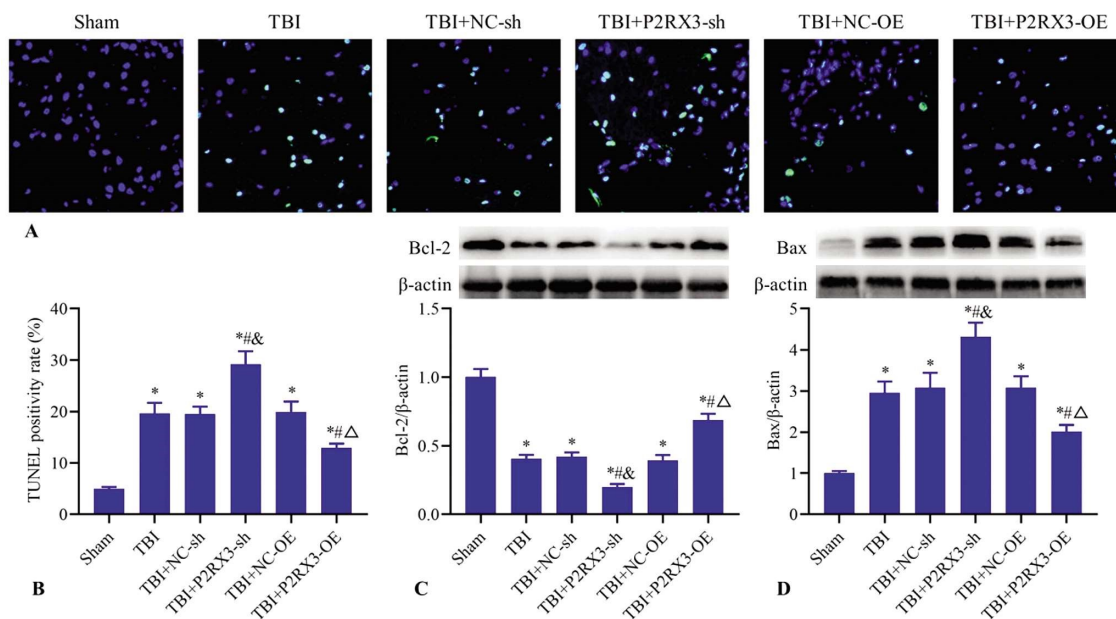


图 7 P2RX3 对 TBI 大鼠脑组织细胞凋亡的影响

Fig. 7 Effect of P2RX3 on apoptosis of TBI rat brain

Note: A: TUNEL staining image (400x); B: TUNEL positive rate; C and D: Relative levels of Bcl-2 and Bax protein, respectively; Compared with Sham group, * $P < 0.05$; Compared with TBI group, # $P < 0.05$; Compared with TBI+NC-sh group, & $P < 0.05$; Compared with TBI+NC-OE group, Δ $P < 0.05$.

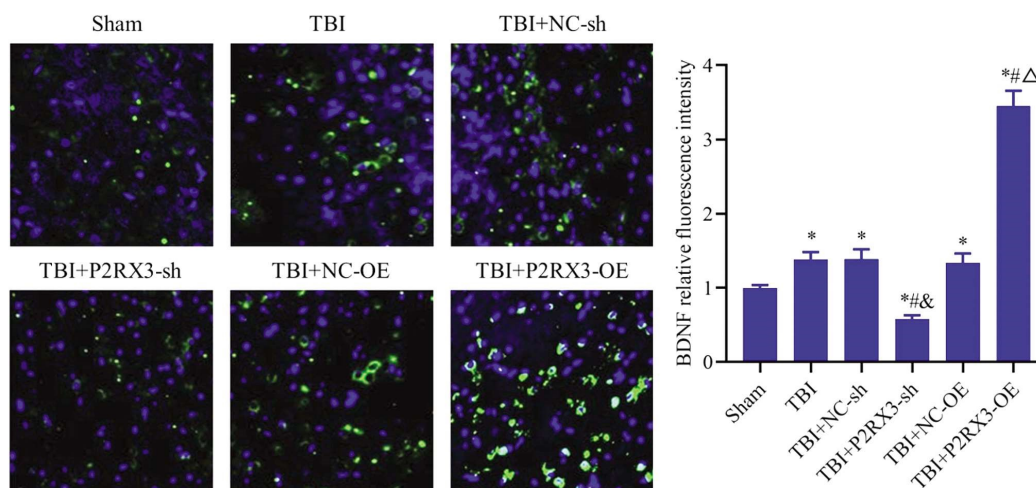


图 8 P2RX3 对 TBI 大鼠脑组织 BDNF 表达的影响

Fig. 8 Effect of P2RX3 on BDNF expression in brain tissue of TBI rats

Note: Compared with Sham group, * $P < 0.05$; Compared with TBI group, # $P < 0.05$; Compared with TBI+NC-sh group, & $P < 0.05$; Compared with TBI+NC-OE group, Δ $P < 0.05$.

构的关键调控因子,影响认知功能^[17]。研究报道,在 TBI 中,受伤后数小时内伤皮质和海马中 BDNF mRNA 水平显著上调^[18],在损伤后 24 小时开始降低,并且在损伤后 36 小时维持较低水平^[19]。损伤后,海马和齿状回中 TrkB mRNA 水平也短暂上调^[20]。Li 等^[21]报道,大鼠 TBI 后 BDNF 和 TrkB 的表达水平升高,并在 12 h 达到峰值,48 h 后逐渐降低到正常水平。TBI 后 BDNF 和 TrkB 的上调表明 BDNF 作为一种内源性神经保护因子试图减轻 TBI 后的继发性损伤^[22]。在其他文献中,依达拉奉通过激活 BDNF/TrkB 信号通路减轻大鼠 TBI 后海马神经元凋亡^[23],针刺通过激活 BDNF/TrkB 信号通路促进 TBI 后神经功能恢复^[24]。本研究显示,大鼠 TBI 后脑组织中 BDNF 和

p-TrkB 蛋白水平上调。据报道,包括 BDNF 在内的多种神经修复因子能够增强 P2RX3 功能^[3,6]。并且已经证实 P2RX 家族成员具有控制神经元合成和释放 BDNF 的作用^[7]。本研究发现下调 P2RX3 抑制了 TBI 大鼠脑组织中 BDNF 和 p-TrkB 蛋白水平,而上调 P2RX3 则升高了 BDNF 和 p-TrkB 蛋白水平,这些结果说明上调 P2RX3 可能通过激活 BDNF/TrkB 信号通路促进大鼠 TBI 后的神经功能恢复。

BDNF/TrkB 信号通路通过调节多种下游信号来促进神经功能修复。BDNF 对 TrkB 具有高亲和力,与 TrkB 结合后,BDNF 诱导受体二聚化和磷酸化,导致 TrkB 受体内化并启动细胞内信号级联反应,这些信号级联包括磷脂酰肌醇 3 激酶

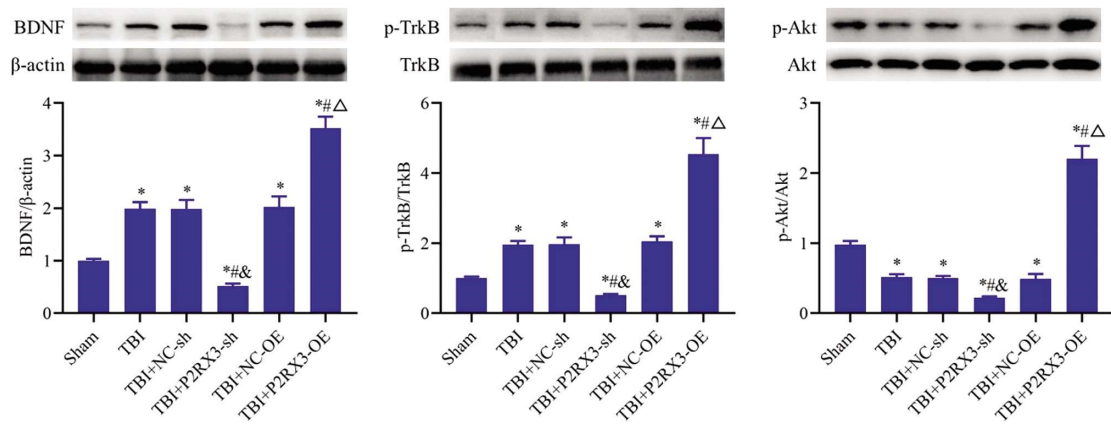


图 9 P2RX3 对 TBI 大鼠脑组织 BDNF/TrkB 信号通路的影响

Fig. 9 Effects of P2RX3 on BDNF/TrkB signaling pathway in TBI rats

Note: A-C: Relative levels of BDNF, p-TrkB and p-Akt protein; Compared with Sham group, * $P < 0.05$; Compared with TBI group, # $P < 0.05$; Compared with TBI+NC-sh group, & $P < 0.05$; Compared with TBI+NC-OE group, Δ $P < 0.05$.

(Phosphatidylinositol-3kinase, PI3K) 途径, PI3K 通路激活蛋白激酶 B (Protein kinase B, Akt) 上调抗凋亡蛋白 (例如 Bcl2) 的表达^[15]和抑制促凋亡蛋白的表达^[24]来促进细胞存活。据报道, P13K/Akt 通路在 TBI 后被抑制, 通过激活 P13K/Akt 通路可发挥神经保护^[25]和抗凋亡作用^[26]。本研究也发现 TBI 大鼠脑组织中 Akt 的磷酸化水平降低, 通过下调 P2RX3 抑制了 Akt 的激活, 而上调 P2RX3 则促进了 Akt 的激活, 这些结果说明上调 P2RX3 可能通过激活 BDNF/TrkB 下游的 Akt 信号通路来抑制脑组织细胞凋亡, 从而促进 TBI 后的神经功能恢复。

目前, 虽然 BDNF 的神经保护作用被广泛揭示, 但 BDNF 的治疗潜力因其半衰期短 (<10 min) 且因其体积大 (27 kDa) 而无法穿过血脑屏障而受到限制^[27]。因此, 直接应用 BDNF 治疗 TBI 效果不理想, 通过间接上调 BDNF 可能有助于改善 TBI 后的神经功能恢复^[28]。本研究表明 P2RX3 对 BDNF 具有正向调控作用, 因此, P2RX3 可能是治疗 TBI 后继发性损伤的新型靶点。

综上所述, 本研究表明 P2RX3 在大鼠 TBI 后上调, 上调 P2RX3 具有促进神经功能恢复的作用, 其机制与激活 BDNF/TrkB/Akt 信号通路有关。P2RX3 可能是治疗 TBI 后继发性损伤的新型靶点。

参考文献 (References)

[1] Mas MF, Mathews A, Gilbert-Baffoe E. Rehabilitation needs of the elder with traumatic brain injury [J]. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 2017, 28(4): 829-842.

[2] Huang GH, Cao XY, Li YY, et al. Gene expression profile of the hippocampus of rats subjected to traumatic brain injury [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15776-15789.

[3] Rubiano AM, Carney N, Chesnut R, et al. Global neurotrauma research challenges and opportunities [J]. *Nature*, 2015, 527(7578): S193-197.

[4] Heine C, Heimrich B, Vogt J, et al. P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro [J]. *Neuroscience*, 2006, 138(1): 303-311.

[5] Leal G, Afonso PM, Salazar IL, et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF [J]. *Brain Res*, 2015, 1621: 82-101.

[6] Ramer MS, Bradbury EJ, McMahon SB. Nerve growth factor induces

P2X(3) expression in sensory neurons [J]. *J Neurochem*, 2001, 77(3): 864-875.

[7] Lalisie S, Hua J, Lenoir M, et al. Sensory neuronal P2RX4 receptors controls BDNF signaling in inflammatory pain [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 964.

[8] 王瑞辉, 郭新荣, 吴涛, 等. 使用电子颅脑损伤仪器制备大鼠颅脑损伤动物模型 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(3): 675-676.

[9] 张辉, 杨林, 陈培莉, 等. 过表达 B 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2 对重度创伤性脑损伤大鼠的治疗作用及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(1): 92-95.

[10] 刘恒, 孙凡, 徐倩倩, 等. 黄芩苷对脑小血管病模型大鼠认知功能及脑内血管内皮生长因子和内皮抑素表达水平的影响 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2019, 45(5): 1080-1085.

[11] Hales CA, Stuart SA, Anderson MH, et al. Modelling cognitive affective biases in major depressive disorder using rodents [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(20): 4524-4538.

[12] Ceretta LB, Réus GZ, Stringari RB, et al. Imipramine treatment reverses depressive-like behavior in alloxan-diabetic rats [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2012, 28(2): 139-144.

[13] Xie BS, Wang YQ, Lin Y, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates tissue damage and improves long-term outcomes after traumatic brain injury in mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(4): 465-475.

[14] 徐霞, 徐琳琳, 王艺. 远端缺血后处理对新生缺氧缺血性脑病小鼠组织型纤溶酶原激活物 / 脑源性神经营养因子通路及海马突触可塑性的影响 [J]. *临床神经病学杂志*, 2022, 35(4): 296-300.

[15] Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease [J]. *Dev Neurobiol*, 2010, 70(5): 304-322.

[16] Castello NA, Nguyen MH, Tran JD, et al. 7,8-Dihydroxyflavone, a small molecule TrkB agonist, improves spatial memory and increases thin spine density in a mouse model of Alzheimer disease-like neuronal loss [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91453.

[17] Zeng Y, Liu Y, Wu M, et al. Activation of TrkB by 7,8-dihydroxyflavone prevents fear memory defects and facilitates amygdalar synaptic plasticity in aging [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 31(4): 765-778.

- Med, 2015, 15(3): 261-267.
- [9] 王璵, 尹葳, 蔡雪阳, 等. 基于 SOCS1/STAT3 信号通路探究红禾麻乙酸乙酯部位对 II 型胶原诱导关节炎大鼠的影响 [J]. 中成药, 2023, 45(7): 2364-2367.
- [10] 常红, 林毅, 雷珂, 等. SOCS 低甲基化在儿童过敏性紫癜 Th17/Treg 细胞失衡中的作用研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(1): 38-44.
- [11] 中华医学会内分泌学分会《中国甲状腺疾病诊治指南》编写组. 中国甲状腺疾病诊治指南: 甲状腺炎 [J]. 中华内科杂志, 2008, 47(9): 867-868.
- [12] 刘亚雷, 薛冰花, 冯雨, 等. 亚临床甲状腺功能减退及甲状腺功能正常的桥本甲状腺炎患者肠道菌群特点 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2023, 39(12): 1037-1044.
- [13] Li Q, Wang B, Mu K, et al. The pathogenesis of thyroid autoimmune diseases: New T lymphocytes - Cytokines circuits beyond the Th1-Th2 paradigm [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2204-2216.
- [14] 汪溪, 康志强, 张小芳, 等. 自身免疫性甲状腺炎患者血浆中 Th1/Th2 细胞及甲状腺自身抗体水平变化及临床意义 [J]. 实用医院临床杂志, 2020, 17(1): 154-157.
- [15] 莫伟平, 钟玉钗, 陈占铃, 等. 自身免疫性甲状腺炎患者甲状腺内 Th1/Th2 细胞失衡的临床价值分析 [J]. 临床检验杂志: 电子版, 2019, 8(2): 12-13.
- [16] Siddiquee A, Patel M, Rajalingam S, et al. Effect of omega-3 fatty acid supplementation on resolvin (RvE1)-mediated suppression of inflammation in a mouse model of asthma [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2019, 41(2): 250-257.
- [17] Song J, Sun R, Zhang Y, et al. Serum resolvin E1 levels and its relationship with thyroid autoimmunity in Hashimoto's thyroiditis: a preliminary study [J]. BMC Endocr Disord, 2021, 21(1): 66.
- [18] Sawada Y, Honda T, Nakamizo S, et al. Resolvin E1 attenuates murine psoriatic dermatitis [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 11873.
- [19] Oner F, Alvarez C, Yaghmoor W, et al. Resolvin E1 Regulates Th17 Function and T Cell Activation [J]. Front Immunol, 2021, 12(17): 637983.
- [20] Sutherland APR, Graham KL, Papadimitriou M, et al. IL-21 regulates SOCS1 expression in autoreactive CD8⁺ T cells but is not required for acquisition of CTL activity in the islets of non-obese diabetic mice [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 15302.
- [21] 周希, 郑应麟, 俞燕露, 等. SOCS1/3 对 TLR3 表达和 T 细胞分化的调控及其在桥本甲状腺炎中的作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(7): 845-848.
- [22] Inoue N, Watanabe M, Nakaguchi A, et al. Functional polymorphisms affecting Th1 differentiation are associated with the severity of autoimmune thyroid diseases [J]. Endocr J, 2017, 64(7): 695-703.
- [23] Kopalli SR, Annamneedi VP, Koppula S. Potential Natural Biomolecules Targeting JAK/STAT/SOCS Signaling in the Management of Atopic Dermatitis [J]. Molecules, 2022, 27(14): 4660.
- [24] 陈玉婷. miR-155 介导 SOCS1/JAK2/STAT3 信号通路对 SAT 炎症反应的作用及亚甲方作用机制的研究 [D]. 上海中医药大学, 2020.
- [25] 罗敬华, 李胜彦. 原发性甲状腺功能异常患者血清甲状腺激素与肌酐、胱抑素 CysC 的关系研究 [J]. 贵州医药, 2021, 45(10): 1572-1573.
- [26] Xin C, Xie J, Fan H, et al. Association Between Serum Cystatin C and Thyroid Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12(9): 766516.

(上接第 3232 页)

- [18] Yang K, Perez-Polo JR, Mu XS, et al. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 mRNA in rat brain after cortical impact injury [J]. J Neurosci Res, 1996, 44(2): 157-164.
- [19] Oyesiku NM, Evans CO, Houston S, et al. Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain [J]. Brain Res, 1999, 833(2): 161-172.
- [20] Merlio JP, Ernfors P, Kokaia Z, et al. Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults [J]. Neuron, 1993, 10(2): 151-164.
- [21] Li X, Chen C, Yang X, et al. Acupuncture improved neurological recovery after traumatic brain injury by activating BDNF/TrkB pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 8460145.
- [22] Mattson MP, Scheff SW. Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanisms of action and implications for therapy [J]. J Neurotrauma, 1994, 11(1): 3-33.
- [23] Ding Y, Zhu W, Kong W, et al. Edaravone attenuates neuronal apoptosis in hippocampus of rat traumatic brain injury model via activation of BDNF/TrkB signaling pathway [J]. Arch Med Sci, 2021, 17(2): 514-522.
- [24] Kaplan DR, Miller FD. Developing with BDNF: a moving experience [J]. Neuron, 2007, 55(1): 1-2.
- [25] Amirkhosravi L, Khaksari M, Amiresmaili S, et al. Evaluating the neuroprotective effects of progesterone receptors on experimental traumatic brain injury: The PI3K/Akt pathway [J]. Brain Behav, 2023, 13(11): e3244.
- [26] 张阳, 李光照, 赵金兵, 等. PI3K/Akt 通路在创伤性脑损伤中的表达及抗凋亡作用 [J]. 临床神经外科杂志, 2011, 8(2): 57-61.
- [27] Price RD, Milne SA, Sharkey J, et al. Advances in small molecules promoting neurotrophic function [J]. Pharmacol Ther, 2007, 115(2): 292-306.
- [28] Wurzelmann M, Romeika J, Sun D. Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury [J]. Neural Regen Res, 2017, 12(1): 7-12.