doi:10.11659/jjssx.06E016007

昼夜节律紊乱对大鼠颅脑损伤引起的认知衰退和神经损伤的影响

吴 健,成 刚,陈 旭,刘 平 (绵阳市中心医院神经外科,四川 绵阳 621900)

[摘 要] **目的** 探讨昼夜节律紊乱对大鼠创伤性颅脑损伤引起的认知衰退和神经损伤的影响。**方法** 采用自由落体撞击伤法用SD大鼠建立创伤性颅脑损伤模型,大鼠模型根据其生活环境昼夜的长短分为全昼组和对照组。14 d后利用水迷宫试验和跳台试验评价各组大鼠的记忆能力;采用HE染色和BrdU、Ki-67免疫组化评价各组大鼠脑内神经损伤的程度;采用realtime PCR方法分析各组大鼠脑内凋亡相关蛋白Caspase-3、Caspase-9、Bcl-2和Bax的mRNA表达量。**结果** 全昼组大鼠的记忆能力显著弱于对照组,而海马区细胞损伤程度及皮质病灶体积显著高于对照组;全昼组大鼠脑部细胞的增殖速率以及新生细胞的数量显著低于对照组;全昼组大鼠脑内Bcl-2 mRNA水平显著低于对照组,而Caspase-3、Caspase-9和Bax mRNA水平显著高于对照组。**结论** 昼夜节律紊乱能促进大鼠颅脑损伤引起的认知衰退和神经损伤。

[关键词] 昼夜节律紊乱;颅脑损伤;认知衰退;神经损伤
[中图分类号] R651.1+5 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-10-13

Effect of circadian rhythm disorder on cognitive decline and neurologic impairment after traumatic brain injury in rats

WU Jian, CHENG Gang, CHEN Xu, LIU Ping (Department of Neurosurgery, Mianyang Central Hospital, Mianyang Sichuan, 621900, China)

Abstract: Objective To explore the effect of circadian rhythm disorder on cognitive decline and neurologic impairment after traumatic brain injury (TBI) in rats. **Methods** Rats were subjected to a weight-drop model of TBI, then the rat models were divided into 2 groups according to the environmental length of day and night, namely, the whole day group (12 h light/12 h light) and the control group (12 h light/12 h dark). After 14 days, the Morris water maze test and step-down test were carried out to evaluate the memory of the rats in each group. HE staining and immunohistochemistry (BrdU, Ki-67) were carried out to evaluate the degree of the neurologic impairment of the rats in each group. And the mRNA expressions of Caspase-3, Caspase-9, Bcl-2 and Bax were evaluated with realtime PCR. **Results** The memory function of the rats in whole day group was significant lower than control group; the damage degree of the cells in the hippocampus and the cortical lesion volume in whole day group were significant higher than control group; the cell proliferation rate and newborn cell survival rate in the whole day group decreased significantly compared with the control group; the mRNA expression of Bcl-2 in whole day group was signifiant lower than control group, and the mRNA expression of Caspase-3, Caspase-9 and Bax in whole day group was signifiant higher than control group. **Conclusion** Circadian rhythm disorder can worsen TBI-induced cognitive decline and neurologic impairment.

Keywords: circadian rhythm disorder; traumatic brain injury; cognitive decline; neurologic impairment

创伤性颅脑损伤(traumatic brain injury,TBI)是一种不同年龄阶段的人群共同面临的一个严峻的公共健康问题,是最常见的脑损伤形式[1]。采用格拉斯哥昏迷评分法通过评估语言反应、肢体运动和睁眼反应3个方面得出的昏迷指数可以将TBI具体分为轻度、中度和重度3型,其中轻度TBI患者一般都意识清醒,但也可能会偶尔失去意识,中度和重度TBI患者表现为反复呕吐、头痛加重、昏迷不醒、瞳孔散大、言语不清、四肢麻木无力、急躁不安、失去平衡、抽搐、恶心等[2]。TBI发生的最常见原因包括暴力、交通事故以及坠物[3]。TBI不仅表现出严重的临床症状如昏迷、脑内血肿、致残致死,还具有长期伴随的并发症,如TBI引发的神经损伤和认知衰退[4-5]。昼夜节律调节着许多生理过程和行为活动,如睡眠周期、血压水平、激素分泌、机体温度、器官活动[6-10]。研究表明,昼夜节律在调节脑部活动如神经递质传递、学习和记忆、情绪调节以及衰老方面也扮演着重要的角色[11-14]。近期越来越多的研究证实,昼夜节律具有调节海马区细胞产生、神经元细胞成熟及存活的功能,海马区细胞夜里的增殖速率显著强于白天[15]。此外有研究显示,昼夜节律可能参与脑部损伤的病理过程[16]。但是昼夜节律与TBI引发的认知衰退和神经损伤之间的关系尚不得知,本研究在大鼠创伤性颅脑损伤模型上研究昼夜节律紊乱对TBI引发的认知衰退和神经损伤的影响。

[通信作者] 吴 健,E-mail:stock_wwww@126.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

30 只雄性清洁级 SD 大鼠购于北京维通利华公司,体质量 250 ~300 g,在清洁级室温 23 ~25 ℃条件下饲养,进食标准饲料。

1.2 试剂和仪器

抗 BrdU 和 Ki-67 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司;SMG-2 水迷宫程序自动控制仪、STT-2 跳台仪由中国医学科学院药物研究所提供;Caspase-3、Caspase-9、Bcl-2 和 Bax realtime PCR 引物于 Invitrogen 公司合成。

1.3 模型制备

术前对大鼠禁食 12 h,自由饮水,然后称每只大鼠的体质量,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠,注射剂量为 50 mg/kg,参考 Feeney's 自由落体撞击伤方法,将大鼠俯卧固定在脑立体定位仪上。矢状中线切开头皮后分离骨膜,暴露前囟、冠状缝和矢状缝及顶骨,以前囟后 3.0 mm,向右旁开矢状缝 3.0 mm 为中心作一直径约为 4 ~5 mm颅骨钻孔,保持硬脑膜不受损伤,将自由落体装置底座置于右顶骨窗部的硬脑膜表面,以 40 g 重物自 25 cm 高沿套管下落打击致伤底座,其直径 3.5 mm,最大下陷距离 3.0 mm。造成右顶局限性损伤,致伤力为 1 000 g/cm。制作模型过程中使用 100 W 头灯照射,将动物肛温控制在(37.5 ±0.5)℃[17]。

1.4 模型分组处理及指标检测

30 只模型大鼠随机分成全昼组和对照组。全昼组 15 只大鼠生活在模拟 24 h 全白昼的环境中,对照组大鼠生活在模拟 12 h 白昼及 12 h 黑夜的生活环境下,2 组大鼠饮食饮水生活环境等完全相同。14 d 后,对 2 组大鼠进行水迷宫试验和跳台试验。在水迷宫试验中,经历学习阶段后,记录大鼠进入盲端的次数(错误次数)和游出平台的时间(潜伏期),如 3 min 内仍未游出,潜伏期则以 180 s 计算。在跳台试验中,经历学习阶段后,记录大鼠在平台上的时间(即潜伏期)和跳下触电次数(错误次数)。取 2 组大鼠脑组织,对其进行 HE 染色及 BrdU、Ki-67 免疫组化实验;提取脑组织 RNA,采用 realtime PCR 分析各组脑组织中 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达量。

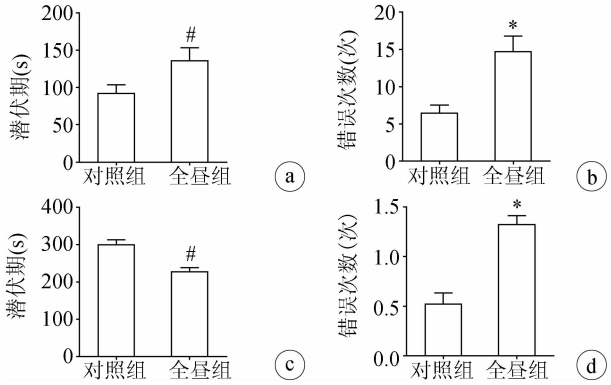
1.5 数据处理

利用 SPSS 17.0 统计学分析软件进行统计分析,采用单因素方差分析和 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 昼夜节律紊乱对创伤性颅脑损伤大鼠模型记忆能力的影响

水迷宫试验结果显示,全昼组大鼠达到终点所需的时间(潜伏期)和碰壁的错误次数显著高于对照组;跳台试验结果显示,全昼组大鼠跳台上的停留时间(潜伏期)显著少于对照组,错误次数明显多于对照组(图 1)。这些结果表明,昼夜节律紊乱加速了创伤性颅脑损伤大鼠记忆能力的衰退。

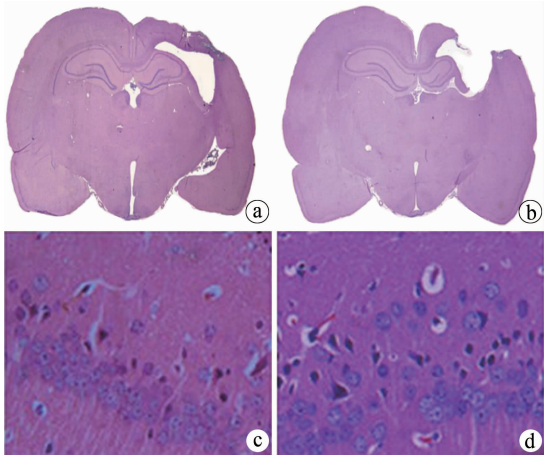


a:水迷宫试验各组潜伏期;b:水迷宫试验各组错误次数;c:跳台试验各组潜伏期;d:跳台试验各组每 5 min 错误次数 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.01$

图 1 2 组水迷宫试验和跳台试验结果

2.2 昼夜节律紊乱对创伤性颅脑损伤大鼠模型脑组织损伤病灶体积以及海马区细胞的影响

切片 HE 染色结果显示,全昼组大鼠脑组织损伤病灶体积显著多于对照组,且海马区细胞损伤程度显著高于对照组(图 2)。这些结果表明,昼夜节律紊乱不利于脑组织损伤部位修复,会促进海马区细胞损伤。

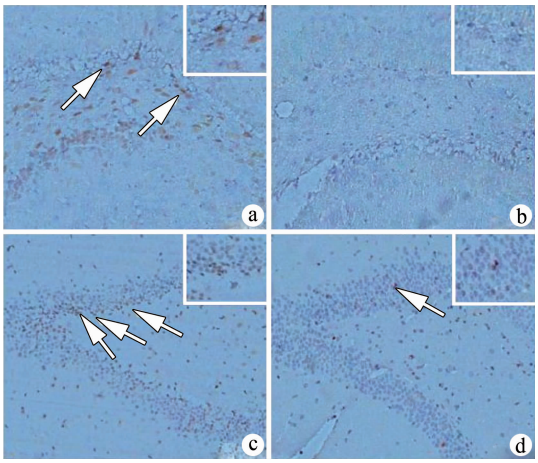


a:对照组全脑组织(HE ×10);b:全昼组全脑组织(HE ×10);c:对照组海马区细胞(HE ×400);d:全昼组海马区细胞(HE ×400)

图 2 2 组大鼠脑组织以及海马区细胞 HE 染色结果

2.3 昼夜节律紊乱对创伤性颅脑损伤大鼠模型脑组织细胞的增殖速率以及新生细胞数量的影响

BrdU、Ki-67 免疫组化结果显示,全昼组大鼠脑部细胞的 Ki-67 和 BrdU 染色的细胞数量显著低于对照组(图 3)。这些结果表明,昼夜节律紊乱抑制创伤性颅脑损伤大鼠模型脑组织细胞的增殖以及新生细胞的产生。

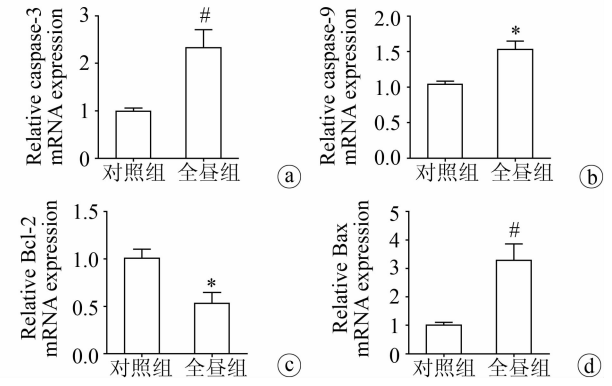


a:对照组脑组织 Ki-67;b:全昼组脑组织 Ki-67;c:对照组脑组织 BrdU;d:全昼组脑组织 BrdU

图 3 2 组大鼠脑组织 Ki-67、BrdU 免疫组化结果(×200)

2.4 昼夜节律紊乱对创伤性颅脑损伤大鼠模型脑组织中凋亡蛋白 mRNA 表达量的影响

Realtime PCR 结果显示,全昼组大鼠脑组织 Caspase-3、Caspase-9 和 Bax 的 mRNA 表达水平显著高于对照组,Bcl-2 的 mRNA 表达水平显著低于对照组(图 4)。这些结果表明,昼夜节律紊乱促进创伤性颅脑损伤大鼠模型脑组织细胞的凋亡。



a:Caspase-3 mRNA;b:Caspase-9 mRNA;c:Bcl-2 mRNA;d:Bax mRNA ＊:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.01$

图 4 2 组大鼠脑组织 caspase-3、caspase-9、Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达水平

3 讨论

创伤性颅脑损伤可造成不同程度的神经功能障碍,主要表现为运动功能下降以及认知的衰退,细胞水平上表现为神经细胞受到破坏[18]。近年的研究表明,创伤性颅脑损伤与昼夜节律紊乱有相关性[7-8]。人类昼夜节律是由视交叉上核调节,睡眠 - 觉醒周期是人类最为明显的昼夜节律。大量的研究表明,昼夜节律对认知功能的影响是普遍存在的,可以对注意力、警觉性、语音和视觉的工作记忆、陈述性记忆、程序记忆、双重任务处理、抑制、认知灵活性以及各种各样的执行功能产生广泛的影响[11-14]。本研究水迷宫试验结果显示,经历特定时间的学习后,全昼组大鼠逃避潜伏期和错误碰撞次数显著多于对照组;跳台试验结果显示,全昼组大鼠在跳台上的停留时间显著少于对照组,而错误次数却显著多于对照组。试验结果说明全昼组大鼠经历游泳训练中学习记忆能力均显著弱于对照组。根据本实验结果,我们发现昼夜节律紊乱能够加剧创伤性颅脑损伤大鼠的记忆力衰退。

大脑海马区对于人类和动物的学习与记忆能力有着至关重要的作用,创伤性颅脑损伤引起记忆功能的衰退主要是通过破坏大脑海马区细胞的结构和功能,产生类似衰老的学习和记忆功能衰退[19]。本实验 HE 染色结果发现,2 组创伤性颅脑损伤大鼠大脑内的海马区神经细胞出现明显细胞内水肿、增生、变性以及坏死,但是全昼组海马区损伤程度重于对照组。此结果表明,昼夜节律紊乱加剧创伤性颅脑损伤大鼠记忆力衰退与促进海马区神经细胞损伤有关。此外,通过脑部 HE 病理切片,我们还发现,全昼组大脑损伤病灶体积显著多于对照组,此结果表明,昼夜节律紊乱不利于损伤部位的修复。

神经细胞死亡是创伤性颅脑损伤引发的神经衰退以及死亡的主要原因。研究表明,创伤性颅脑损伤通过 Caspase 家族、Bcl-2 家族、JNK 以及自噬等机制来调控神经细胞死亡[20]。其中,Bcl-2 基因家族和 Caspase 基因家族是调控细胞凋亡的 2 个非常重要的家族,Bcl-2 和 Bax 基因是 Bcl-2 基因家族中的 2 个最重要成员[21]。Bcl-2 基因具有促进细胞增殖和细胞周期的能力,高表达 Bcl-2 可以特异性抑制细胞凋亡,Bax 是一种促凋亡基因,其高表达可以特异性地促进细胞凋亡,细胞内的 Bcl-2/Bax 表达水平与细胞的损伤程度呈正相关[22]。研究表明,Bcl-2 和 Bax 基因参与调控了颅脑损伤引发的神经细胞的凋亡过程[20]。Caspase 家族介导的级联反应是细胞发生凋亡的中心环节,细胞内的线粒体依赖的信号和死亡受体介导的信号,激活后

的下游 Caspase,然后通过切割其特异性底物,引发细胞凋亡[23]。通常情况下,Caspase 在细胞内以无活性的蛋白酶原形式存在,此时的 Caspase 不能介导细胞凋亡。但是当细胞发出凋亡信号时,Caspase 会被激活,介导 DNA 酶的合成以及细胞修复酶的降解,引发细胞凋亡。研究表明,颅脑损伤引发神经细胞死亡与 Caspase 基因的活化有关[24-25]。本研究 Ki-67、BrdU 免疫组化结果发现,全昼组脑组织中细胞增殖速率以及新生细胞数量显著低于对照组;realtime PCR 结果显示,全昼组 Bcl-2 的表达量显著低于对照组,且 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 表达水平显著高于对照组。这些结果表明,昼夜节律紊乱能够通过抑制神经细胞的增殖以及促进神经细胞的凋亡来加剧神经损伤程度。

综上所述,本研究发现昼夜节律紊乱加剧创伤性颅脑损伤引发的认知衰退和神经损伤,其发生机制与抑制神经细胞的增殖以及促进神经细胞的凋亡有关。

[参考文献]

[1] Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Axonal pathology in traumatic brain injury[J]. Experimental neurology, 2013(246): 35 - 43. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.01.013.

[2] 曾 静,刘星辰,杨小燕. 大脑中动脉粥样硬化性狭窄患者脑血管自动调节能力解析[J]. 当代医学, 2014, 20(24): 65 - 66. doi: 10.3969/j.issn.1009 - 4393.2014.24.044.

[3] Kearns WD, Scott S, Fozard JL, et al. Decreased movement path tortuosity is associated with improved functional status in patients with traumatic brain injury[J]. J Head Trauma Rehabil, 2016, 31(1): E13 - E19. doi: 10.1097/HTR.0000000000000125.

[4] Pitkänen A, Immonen RJ, Gröhn OHJ, et al. From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options[J]. Epilepsia, 2009, 50(s2): 21 - 29. doi: 10.1111/j.1528 - 1167.2008.02007.x.

[5] Irimia A, Wang B, Aylward SR, et al. Neuroimaging of structural pathology and connectomics in traumatic brain injury: Toward personalized outcome prediction[J]. NeuroImage: Clinical, 2012, 1(1): 1 - 17. doi: 10.1016/j.nicl.2012.08.002.

[6] Miyamoto H, Nakamaru-Ogiso E, Hamada K, et al. Serotonergic integration of circadian clock and ultradian sleepwake cycles[J]. J Neurosci, 2012, 32(42): 14794 - 14803. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0793 - 12.2012.

[7] Alibhai FJ, Tsimakouridze EV, Reitz CJ, et al. Consequences of circadian and sleep disturbances for the cardiovascular system[J]. Can J Cardiol, 2015, 31(7): 860 - 872. doi: 10.1016/j.cjca.2015.01.015.

[8] Chakir I, Dumont S, Pevet P, et al. Pineal melatonin is a circadian timegiver for leptin rhythm in Syrian hamsters[J]. Front Neurosci, 2015(9): 190. doi: 10.3389/fnins.2015.00190.

[9] Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals[J]. Annu Rev Neurosci, 2012(35): 445 - 462. doi: 10.1146/annurev - neuro - 060909 - 153128.

[10] Bailey SM, Udoh US, Young ME. Circadian regulation of metabolism[J]. J Endocrinol, 2014, 222(2): R75 - R96. doi: 10.1530/JOE - 14 - 0200.

[11] Colwell CS. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN[J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(10): 553 - 569. doi: 10.1038/nrn3086.

[12] Castro JP, Frussa-Filho R, Fukushiro DF, et al. Effects of long-term continuous exposure to light on memory and anxiety in mice[J]. Physiol Behav, 2005, 86(1 - 2): 218 - 223. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.07.009.

[13] Bedrosian TA, Fonken LK, Walton JC, et al. Dim light at night provokes depression-like behaviors and reduces CA1 dendritic spine density in female hamsters[J]. Psychoneuroendocrinology, 2011, 36(7): 1062 - 1069. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.01.004.

[14] Fonseca Costa SS, Ripperger JA. Impact of the circadian clock on the aging process[J]. Front Neurol, 2015(6): 43. doi: org/10.3389/fneur.2015.00043.

[15] Bouchard-Cannon P, Mendoza-Viveros L, Yuen A, et al. The circadian molecular clock regulates adult hippocampal neurogenesis by controlling the timing of cell-cycle entry and exit[J]. Cell Rep, 2013, 5(4): 961 - 973. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.037.

[16] Boone DR, Sell SL, Micci MA, et al. Traumatic brain injury-induced dysregulation of the circadian clock[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46204. doi: 10.1371/journal.pone.0046204.

[17] 马班友. 褪黑素对大鼠创伤性脑损伤保护作用的实验研究[J]. 辽宁医学院学报, 2005, 26(2): 5 - 8. doi: 10.3969/j.issn.1674 - 0424.2005.02.002.

[18] 陈世文,马 霞,陈建文,等. 大鼠中度脑损伤后行为和认知功能障碍的测定[J]. 中国临床康复, 2004, 8(1): 48 - 49. doi: 10.3321/j.issn:1673 - 8225.2004.01.024.

[19] Sun D, Daniels TE, Rolfe A, et al. Inhibition of injury-induced cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus impairs spontaneous cognitive recovery after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2015, 32(7): 495 - 505. doi: 10.1089/neu.2014.3545.

[20] Stoica BA, Faden AI. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury[J]. Neurotherapeutics, 2010, 7(1): 3 - 12. doi: 10.1016/j.nurt.2009.10.023.

[21] 张淑玲,常全忠,李银生,等. 缺氧缺血性脑损伤脑内 bd-2 基因表达与细胞凋亡的关系[J]. 实用儿科临床杂志, 2004, 19(5): 387 - 388. doi: 10.3321/j.issn:1007 - 9807.2004.03.013.

[22] 杨小锋,朱永坚,刘伟国,等. 创伤性颅脑损伤后细胞凋亡状态及相关基因表达的实验研究[J]. 浙江医学, 2003, 25(6): 321 - 323. doi: 10.3969/j.issn.1006 - 2785.2003.06.001.

[23] 赵瑞杰,李引乾,王 会,等. Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(17): 73 - 78. doi: 10.3969/j.issn.1001 - 1528.2010.06.016.

[24] Marciano PG, Brettschneider J, Manduchi E, et al. Neuronspecific mRNA complexity responses during hippocampal apoptosis after traumatic brain injury[J]. Neurosci, 2004(24): 2866 - 2876. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5051 - 03.2004.

[25] Knoblach SM, Alroy DA. Caspase inhibitor z-DEVD-fmk attenuates Calpainand Necrotic cell death in vitro and after traumatic brain injury[J]. Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(10): 1119 - 1132. doi: 10.1097/01.WCB.0000138664.1768.

(编辑:左艳芳)