基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003617

抑制AMPARs内吞可改善创伤性脑损伤大鼠的运动和认知功能

朱　林，夏　雷，袁　浩，李俊杰，薛梦童，戴春方，石岫屿，易礼琳，董志芳，庞亚燕
（重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所，国家儿童健康与疾病临床医学研究中心，儿童发育疾病研究教育部重点实验室，认知发育与学习记忆障碍转化医学重庆市重点实验室，重庆　400014）

【摘　要】目的：研究抑制含GluA2亚基的α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体（α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors，AMPARs）的内吞对创伤性脑损伤（traumatic brain injury，TBI）大鼠模型运动和认知能力的作用及相关机制。**方法：**构建中度TBI模型大鼠，分为Sham（仅开放颅窗）组，saline（生理盐水处理）组，scr-GluA2$_{3Y}$（对照肽scrambled Tat-GluA2$_{3Y}$处理）组和GluA2$_{3Y}$（实验肽Tat-GluA2$_{3Y}$处理）组，通过改良神经功能评分（Mahmood's method neurological severity score，mNSS）及抓力实验检测大鼠运动及神经功能改善情况，之后用新物体实验和水迷宫实验评估大鼠的探索能力与空间学习记忆能力。后期通过Western blot分别检测海马体的突触蛋白和总蛋白中AMPARs表达情况的变化。**结果：**mNSS及抓力实验显示：随时间推移，GluA2$_{3Y}$组的神经功能状态（P=0.013）及抓力（P<0.001）相较于saline组明显改善。新物体实验显示：GluA2$_{3Y}$组的接触次数（0.60 ± 0.02，P<0.01）及接触时间（0.57 ± 0.03，P=0.011）与scr-GluA2$_{3Y}$组相比明显增加（P<0.01，P=0.010）。水迷宫结果显示：与scr-GluA2$_{3Y}$组相比，GluA2$_{3Y}$组（21.43 ± 1.76）的学习（P<0.001）与记忆（P=0.037）能力提高。Western blot显示：与对照组相比，GluA2$_{3Y}$治疗（0.98 ± 0.03，P=0.981 vs. Sham组，P=0.025 vs. saline组，P=0.025 vs. scr-GluA2$_{3Y}$组）可特异性提高海马中GluA2的含量。**结论：**AMPARs内吞抑制剂，如Tat-GluA2$_{3Y}$可通过提高大鼠海马体中GluA2的含量来修复TBI引起的运动和认知功能受损。

【关键词】创伤性脑损伤；α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体内吞作用；学习和记忆；海马体
【中图分类号】R3　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2024-09-05

Inhibition of GluA2-containing AMPA receptor endocytosis improves motor and cognitive functions in a rat model with traumatic brain injury

Zhu Lin，Xia Lei，Yuan Hao，Li Junjie，Xue Mengtong，Dai Chunfang，Shi Xiuyu，Yi Lilin，Dong Zhifang，Pang Yayan
（*Pediatric Research Institute，Children's Hospital of Chongqing Medical University，Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders，National Clinical Research Center for Child Health and Disorders，Chongqing Key Laboratory of Child Neurodevelopment and Cognitive Disorders*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the effects of inhibition of GluA2-containing α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor（AMPAR）endocytosis on motor and cognitive functions in a rat model with traumatic brain injury（TBI）and related mechanisms. ***Methods*：**The model rats with moderate TBI were established and divided into the Sham group（with open cranial window only），saline group（treated with normal saline），scr-GluA2$_{3Y}$ group（treated with the control peptide scrambled Tat-GluA2$_{3Y}$），and GluA2$_{3Y}$ group（treated with the test peptide Tat-GluA2$_{3Y}$）. The improvement in motor and neurological functions of rats was measured by the Mahmood's method neurological severity score（mNSS）and grip strength test. Then，the exploration ability and spatial learning and memory ability of rats were assessed by the new object experiment and water maze experiment. The change in AMPAR expression of synaptic and total proteins in the hippocampus was measured by Western blot. ***Results*：**The mNSS and grip strength test showed that the neurofunction status（P=0.013）and grip strength（P<0.001）of the GluA2$_{3Y}$ group improved significantly over time compared with the saline group. The new object experiment showed that the number of contacts（0.60 ± 0.02，P<0.01）and contact time（0.57 ±

作者介绍：朱　林，Email：2743013219@qq.com，研究方向：认知障碍相关神经系统疾病。
通信作者：庞亚燕，Email：405033751@qq.com。
基金项目：重庆市教委青年资助项目（编号：KJQN202400423）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.r.20241114.1823.014（2024-11-18）

0.03，P=0.011）of the $GluA2_{3Y}$ group were significantly increased compared with the scr-$GluA2_{3Y}$ group（P<0.01，P=0.010）. The water maze experiment results showed that the learning（P<0.001）and memory ability（P=0.037）were improved in the $GluA2_{3Y}$ group（21.43 ± 1.76）compared with the scr-$GluA2_{3Y}$ group. Western blot revealed that the content of GluA 2 in the hippocampus was specifically increased after treatment with $GluA2_{3Y}$（0.98 ± 0.03，P=0.981 vs. Sham，P=0.025 vs. saline，P=0.025 vs. scr-$GluA2_{3Y}$）. ***Conclusion***：AMPAR endocytosis inhibitors，such as Tat-$GluA2_{3Y}$，repair the impaired motor and cognitive function induced by TBI by increasing the content of GluA2 in the rat hippocampus.

【Key words】traumatic brain injury；α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor endocytosis；learning and memory；hippocampus

创伤性脑损伤（traumatic brain injury，TBI）是指由于大脑在颅骨内受到物理冲击导致的疾病，其可被定义为由外力引起的脑功能或病理改变[1-2]。此外，它也是慢性神经退行性疾病（如阿尔茨海默病和帕金森病）的公认危险因素[3-5]。但目前某些临床用药可能导致TBI患者出现耐药性及意识下降等副作用[6]，这严重影响患者的生活质量。因此，迫切需要在临床上探索有效控制TBI患者创伤后症状的潜在替代方案。

有研究报道，儿童和成人在TBI后都经历了明显的神经损伤和认知障碍，即使轻度TBI也可在损伤后3个月内出现认知缺陷[7]。不同的TBI大鼠模型同样显示出明显的神经功能损伤和认知障碍[6,8]。然而，这些变化背后的细胞和分子水平机制仍不清楚。大量证据表明，海马体CA1区谷氨酸能突触的活动依赖性突触可塑性是某些类型的学习和记忆背后的一种细胞机制[9-11]，而含GluA2的α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体（α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors，AMPARs）的内吞作用在认知功能中起着关键作用[12-15]。本研究之前的研究发现，母鼠睡眠剥夺引起的突触后AMPAR内吞作用增强与子代大鼠的突触可塑性和认知功能受损之间存在因果关系[16]。同样，AD模型小鼠的认知功能障碍也是由AMPARs内吞作用引起[17]。

虽然先前的研究已确定AMPARs在认知功能中的潜在作用，但关于TBI中AMPARs内吞的具体机制及其影响尚未充分探讨。因此，本研究旨在探讨抑制AMPARs的内吞作用能否改善TBI诱导的神经损伤和认知障碍。本研究采用了合成肽Tat-$GluA2_{3Y}$干预AMPARs的内吞过程，并评估其对TBI大鼠神经功能及认知能力的影响。通过进一步研究AMPARs内吞在TBI发病机制中的作用，本研究希望为开发新的有效治疗策略提供理论依据及实验支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

为排除激素的影响[18]，本研究所用实验动物均为雄性SD大鼠。它们来自重庆第三军医大学附属大坪医院实验动物中心并饲养于重庆医科大学附属儿童医院SPF级动物实验中心。动物房温度为（23 ± 2）℃，湿度为40%~60%，光照时间为7:00至19:00，自由取食饮水。所有实验动物和动物管理方法均符合《中华人民共和国实验动物管理条例》和《重庆医科大学实验动物管理条例》。所有动物实验均按照重庆科学技术委员会的指导方针进行，并得到了重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会的批准（审批号：NoCHCMU-IACUC20220323015）。

1.2 TBI模型建立

本实验的TBI是通过控制皮层冲击（Rodent controlled cortical impact injury，CCI）模型诱导的[19-20]。具体方法如下：8周龄雄性SD大鼠被随机分为4个组：Sham（仅开放颅窗）组，saline（生理盐水处理）组，scr-$GluA2_{3Y}$（对照肽scrambled Tat-$GluA2_{3Y}$处理）组和$GluA2_{3Y}$（实验肽Tat-$GluA2_{3Y}$处理）组。首先将大鼠称重后按照30 mg/kg的剂量使用3%的戊巴比妥那进行麻醉，麻醉后以俯卧位固定在手术垫上，用剃须刀片剃除大鼠头顶部毛发，暴露头皮，用手术刀作头顶皮肤正中切口，暴露颅骨、表面筋膜和软组织。使用40%双氧水缓慢轻柔地溶解掉颅骨表面软组织。使用直径0.4 cm钻头在颅左侧以中线旁2.5 mm，前囟后1.5 mm为中心磨开一直径为5 mm的骨窗，同时保留硬脑膜。随后，将大鼠固定在TBI建模装置上，设置如下参数：冲击深度3.5 mm，速度5 m/s，接触时间500 ms。撞击后，将大鼠从装置中取出，用棉签短暂压迫止血，清理手术野，间断缝合切口。对于Sham组，仅开放颅窗而不进行TBI操作。整个操作过程中尽量避免出血和对周围组织的刺激。所有大鼠处理完毕后放置于加热垫上待其自然苏醒。

1.3 主要试剂

本实验的大多数试剂采购于西格玛奥德里奇贸易有限公司（Sigma-Aldrich，中国）。AMPAR 内吞作用抑制剂 Tat-$GluA2_{3Y}$多肽（位于 AMPA GluA2 亚基的羧基端区域序列号：$YGRKKRRQRRR_{-869}YKEGYNVYG_{877}$）和 scrambled Tat-$GluA2_{3Y}$干扰肽（位于 AMPA GluA2 亚基的羧基端区域序列号：$YGRKKRRQRRR_{-869}VYKYGGYNE_{877}$）由吉尔生物化学有限公司合成。小鼠抗 psd-95 的单克隆抗体（#MAB1598）来源于密力浦公司（Millipore，美国）。抗 GluA1 多克隆抗体（#AB31232）和抗 GluA2 单克隆抗体（#AB133477）来自艾博抗贸易有限公司（Abcam，美国）。此外，抗 β-actin（#A5441）多克隆抗体购自西格玛奥德里奇贸易有限公司（Sigma-Aldrich）。Anti-Mouse IgG 二抗（HRP）和 Anti-Rabbit IgG 二抗（HRP）标记来自珀金埃尔默股份有限公司（Perkin Elmer）。BCA 蛋白检测试剂盒来自赛默飞世尔科学公司（Thermo Fisher Scientific）。

1.4 实验动物处理

TBI 模型建立后 1 h 开始对各分组给予不同药物。Sham 组无处理，saline 组注射生理盐水 4 mL/kg，scr-$GluA2_{3Y}$组按照 8 mg/kg 的浓度注射对照肽，$GluA2_{3Y}$组按照 8 mg/kg 浓度注射实验肽。此后每天同一时间点对大鼠进行称重和注射，连续 14 d。

1.5 神经系统功能缺损的评估

在建立 TBI 模型后的第 1、3、5、7、14 天采用改良神经功能评分（Mahmood's method neurological severity score，mNSS）[21]及抓力实验评估创伤后大鼠的神经系统状况同时为后续的新物体实验与水迷宫实验提供依据。mNSS 是一种对运动、感觉、反射和平衡的综合测试，用于评估创伤的严重程度，评分越高，损伤越严重[22]。进行抓力实验时将大鼠放置在抓力板上，向后牵拉鼠尾，待动物抓牢后，均匀用力向后拉，使动物松爪。此时记录仪会记录下动物的最大抓力。依次检测左右抓力并记录。每只大鼠测试 5 次以上，待抓力读数稳定在某一数值上下波动时记录 5 个读数。

1.6 认知能力评估

记忆是一种动态的认知过程，目前的研究将其分为工作记忆、情景记忆和语义记忆。工作记忆被定义为暂时性持有、处理和操纵信息的认知能力[23]。关于情景记忆与语义记忆，这两者实际上对时间的依赖性较低，更多的是与个体经验相关的个人经历。情景记忆接收并存储有关事件发生时间及日期的信息，以及这些事件之间的时空关系[24]。

1.6.1 新物体实验 TBI 模型建立后的第 16 天，采用新物体识别实验来评估大鼠的情景记忆能力。该实验根据动物对熟悉物体和新物体的探索时间的长短来评价被测试动物的记忆能力。实验前 24 h 将大鼠放入 40 cm × 40 cm 空箱使其适应 5 min。实验第 1 天往实验装置底板的相邻位置放入 2 个相同的物体 A1 和 A2，物体距箱边距离 10 cm 以上，放入大鼠观察并记录 5 min 内大鼠对每个物体的探索时间（注意消毒去气味）。间隔 24 h 后进行测试，将物体 A2 换成另一个新奇物体（不同的物体 B）。同样观察并记录 5 min 后更换动物，清洁箱体，继续实验。实验人员采用双盲法，记录了大鼠头部和物体接触的情况。然后使用以下公式计算识别指数（recognition index，RI）：RI=（在新物体上花费的次数或时间）/（在 2 个物体上花费的总次数或时间）。

1.6.2 水迷宫试验 TBI 模型建立后第 17 天进行 Morris 水迷宫实验。该测试通常用于评估大鼠的空间学习和工作记忆能力[25]。水迷宫由水池、摄像头及计算机分析系统（Stoelting，美国）组成。池壁周边 3 处放置光源，用遮光帘隔开外界，将水池分为 SE、SW、NS、NW 4 个象限，池壁上贴 3 个形状不同的提示物。适应时不放置平台，将鼠头朝壁轻轻放入水中，60 s 后捞出并擦干放归鼠笼。实验第 1~5 天为训练，每天在同一时间，第 3 象限固定平台，将每只大鼠依次从不同的象限放入，让其在 60 s 内寻找平台，如 60 s 后仍未找到平台，则将其引导至平台，后捞出擦干。每天进行 4 次训练重复，每只大鼠训练间隔 30 min 以上。第 6 天进行测试，移去平台，将大鼠从第 1 象限放入水中，记录其在 60 s 内活动情况。ANY maze 系统（Stoelting，美国）自动记录并计算大鼠逃避潜伏期、学习期轨迹和实验期在第 3 象限呆的时间和穿越平台的次数等实验数据。所有数据均以 Sham 组进行标准化处理。（注：池水用无毒墨水染黑，温度 21~22 ℃，水深为 40 cm，平台置于水下 1 cm，水面不可见）。

1.7 突触蛋白的分离

行为测试后，取大鼠海马体组织样本进行 Western blot 分析。将损伤侧海马体加入含有蛋白酶抑制剂的 Tris-HCl 缓冲液中用匀浆器匀浆，直到 EP 管中无肉眼可见的块状脑组织（整个过程应于碎冰上进行操作）；充分裂解 30 min 后，离心 15 min（12 000 r/min，4 ℃），取上清液。随后，使用先前记录的方法将组织匀浆分离为亚细胞成分[26]。简言之，将海马体匀浆在 4 ℃下进行一系列的离心步骤：首先，将它们在 700 g 转速下离心 2 次，持续 7 min，以消除细胞核和碎片，得到复合上清液；该复合上清液在 100 000 g 转速下进一步离心 60 min。然后用含有 0.5% 聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）的缓冲液处理得到的含酶匀浆，在 4 ℃下孵育 20 min 后，用 1 mol 蔗糖分层，再以 100 000 g 转速离心 60 min。随后，收集蔗糖层下富含突触后致密物的沉淀，在含有 1% 甘氨酸电泳缓冲液（sodium dodecyl sulfate，SDS）中重悬，并在 -80 ℃下保存。总蛋白含量采用 BCA 蛋白检测试剂盒进行定量。

1.8 Western blot

为了确保样本的数量一致，总蛋白使用 30 μg 分析，突触蛋白使用 10 μg 分析。用 5 倍装载缓冲液在 95 ℃下加热 5 min，使蛋白质变性。变性后，样品在 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）上分离，随后转移到聚偏氟

乙烯（polyvinylidene difluoride，PVDF）膜（ISEQ00010，Millipore，美国）上。为了防止非特异性结合，在室温下用5%脱脂牛奶封闭PVDF膜1 h。然后用特异性针对蛋白（如GluA1、GluA2、PSD95和β-actin）的一抗在4 ℃下孵育过夜。取出后将PVDF膜在室温下于辣根过氧化物酶偶联（Horseradish Peroxidase，HRP）的二抗中孵育1 h。使用增强化学发光检测系统（Amersham ECL）检测蛋白条带，并使用Bio-Rad成像仪可视化印迹。使用Bio-Rad Quantity One软件对代表原始数据的印迹条带强度进行量化。为了确定目标蛋白的相对水平，将每个蛋白条带的强度与适当的标记蛋白进行归一化处理（表示为其强度与对应标记蛋白强度的百分比差）。

1.9　统计学方法

本研究的所有实验结果均采用GraphPad Prism 8.0.2软件进行分析和处理。数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。多组数据采用单因素方差分析或重复测量方差分析，然后采用最小显著差（least-significant difference，LSD）检验。采用双因素方差分析比较各组大鼠在Morris水迷宫试验中神经功能、活动力和空间学习能力的差异。检验水准α=0.05。

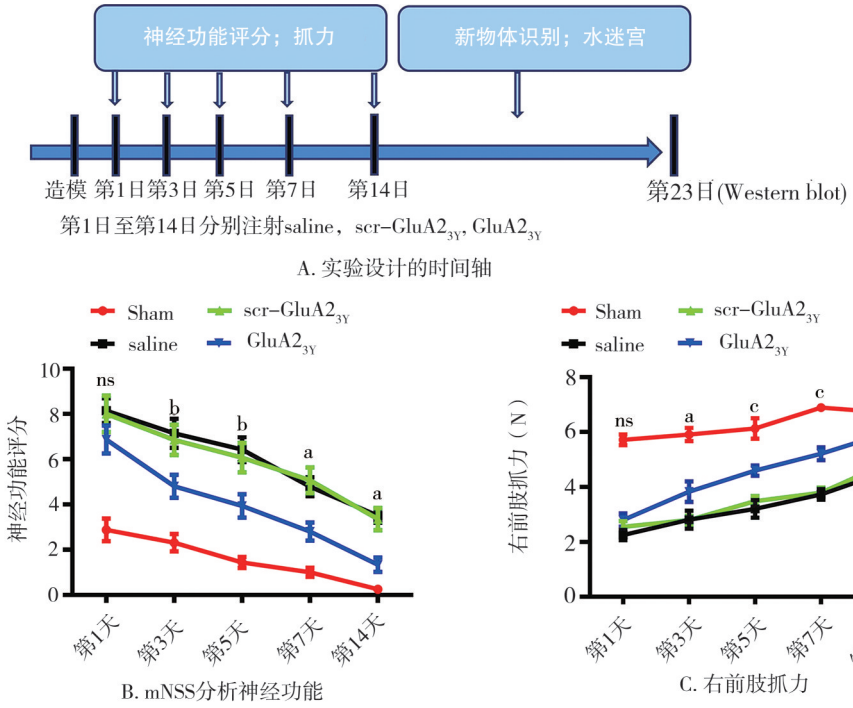
2　结　果

2.1　GluA2$_{3Y}$治疗可减轻TBI引起的神经功能损伤

本实验采用8周龄SD大鼠建立TBI模型，建立TBI模型后2周进行行为测试，建立TBI模型23 d后提取海马体和大脑皮层进行进一步研究（图1A）。为了证实GluA2$_{3Y}$的治疗效果，本研究首先分析了GluA2$_{3Y}$在神经功能损伤中的作用。结果表明，在mNSS试验中（图1B），saline组大鼠评分明显高于Sham组（Sham组：n=16，P<0.001 vs. saline组）。在TBI后24 h，3个TBI组间无显著性差异（scr-GluA2$_{3Y}$组：n=14，P=0.377 vs. GluA2$_{3Y}$组；GluA2$_{3Y}$组：n=15，P=0.272 vs. saline组；saline组：n=14，P=0.997 vs. scr-GluA2$_{3Y}$组）。由于大鼠的自然恢复，所有组的mNSS评分都随着时间的推移而下降。而在TBI3 d、5 d、7 d和14 d，GluA2$_{3Y}$组显著低于saline组（P=0.006、P=0.003、P=0.027、P=0.013 vs. saline组）。在所有时间点scr-GluA2$_{3Y}$组与saline组无明显差异。同时，在抓力实验中（图1C），与其他组相比，sham组（n=16）的右前肢抓力表现最好（P<0.001）。与mNSS检测结果相似，3个TBI组间术后24 h差异无统计学意义（scr-GluA2$_{3Y}$组：n=14，P=0.882 vs. GluA2$_{3Y}$组；GluA2$_{3Y}$组：n=15，P=0.347 vs. saline组；saline组：n=14，P=0.808 vs. scr-GluA2$_{3Y}$组）。然而，在TBI 3 d、5 d、7 d和14 d，GluA2$_{3Y}$组（n=15）的右前肢抓力显著高于saline组（P=0.012、P<0.001、P<0.0001、P<0.001 vs. saline组）。在所有时间点，scr-GluA2$_{3Y}$组（n=14）与saline组（n=15）间没有显著差异。本研究结果表明，靶向AMPARs的抑制剂GluA2$_{3Y}$可改善TBI大鼠的神经功能。

2.2　GluA2$_{3Y}$减轻TBI引起的学习记忆功能损伤

接下来，本研究对各组大鼠进行了行为学测试。首先，本研究利用新物体试验中的RI来评估TBI大鼠的记忆能力（图2A）。本研究发现Sham组的RI次数（Sham组：0.61±0.05，n=11；saline组：0.37±0.03，n=14；P<0.001；图2B）及RI时间（Sham：0.60±0.03，n=11；saline组：0.39±0.03，n=14，P<0.001；图2C）与saline组相比明显降低。而GluA2$_{3Y}$组中RI

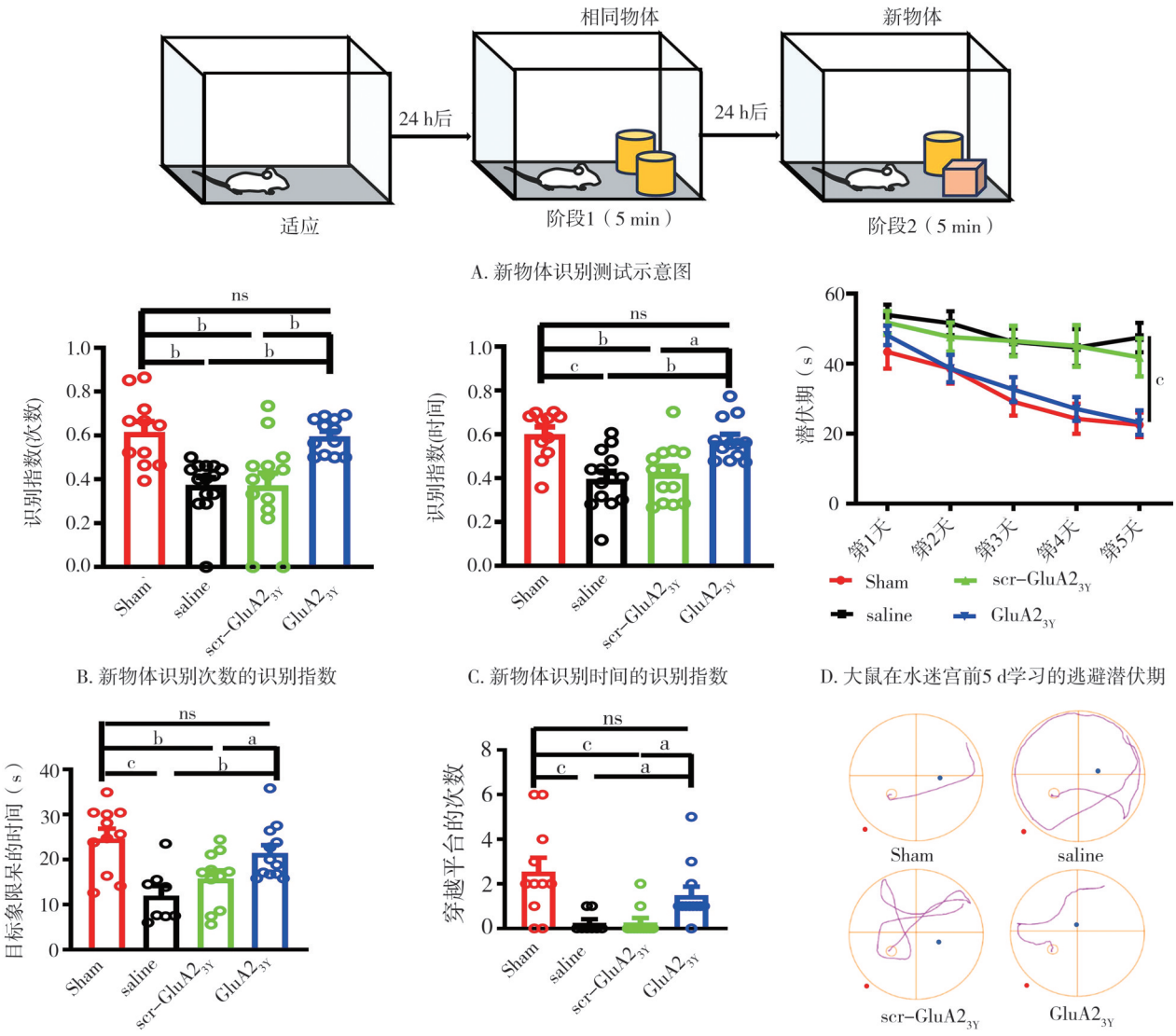


注：a，与saline组比较，P<0.05；b，与saline组比较，P<0.01；c，与saline组比较，P<0.001

图1　GluA2$_{3Y}$影响TBI后神经的神经及运动功能的治疗

次数（scr–GluA2$_{3Y}$组：0.37 ± 0.06，n=14，P<0.01 vs. Sham 组；GluA2$_{3Y}$组：0.60 ± 0.02，n=12，P=0.988 vs. Sham 组，P=0.003 vs. saline 组，P=0.003 vs. scr–GluA2$_{3Y}$组；图 2B）及 RI 时间（scr–GluA2$_{3Y}$组：0.42 ± 0.03，n=14，P<0.01 vs. Sham 组；GluA2$_{3Y}$组：0.57 ± 0.03，n=12，P=0.942 vs Sham 组，P=0.002 vs. saline 组，P=0.011 vs. scr–GluA2$_{3Y}$组；图 2C）与 scr–GluA2$_{3Y}$组相比显著增加。这些结果表明，GluA2$_{3Y}$可减轻 TBI引起的大鼠认知功能障碍。

在 TBI 后第 16～22 天进行 Morris 水迷宫试验。在训练期间，与 Sham 组相比，saline 组出现了空间学习能力损伤（找到隐藏平台时间：Sham 组：n=11，saline：n=8，P<0.001；图 2D）。然而，GluA2$_{3Y}$治疗明显改善了 TBI引起的大鼠空间学习能力损伤（找到隐藏平台时间：GluA2$_{3Y}$组：n=12，P<0.001 vs. saline 组；图 2D）。在空间探索实验中（图 6G），与 Sham 组相比，saline 组在目标象限的时间（Sham 组：24.64 ± 2.21，n=11，P<0.001，saline 组：11.98 ± 2.12，n=8，P<0.001；图 2E）和穿越平台次数（sham 组：2.55 ± 0.62，n=11，saline 组：0.25 ± 0.16，n=8，P<0.001；图 2F）均显著减少；而 GluA2$_{3Y}$治疗显著增加了 TBI大鼠在目标象限的时间（scr–GluA2$_{3Y}$组：17.75 ± 1.86，n=11，P<0.01 vs. Sham 组；GluA2$_{3Y}$组：21.43 ± 1.76，n=12，P=0.241 vs Sham 组，P<0.01 vs. saline 组，P=0.041 vs scr–GluA2$_{3Y}$组；图 2E）与穿越平台次数（scr–GluA2$_{3Y}$组：0.27± 0.19，n=11，P<0.001 vs. Sham 组；GluA2$_{3Y}$组：1.50±0.38，n=12，P=0.068 vs. Sham 组，P=0.047 vs. saline 组，P=0.033 vs. scr–GluA2$_{3Y}$组；图 2F），这说明了 GluA2$_{3Y}$可改善 TBI引起的空间学习能力和记忆提取能力损伤。



A. 新物体识别测试示意图

B. 新物体识别次数的识别指数

C. 新物体识别时间的识别指数

D. 大鼠在水迷宫前5 d学习的逃避潜伏期

E. 大鼠测试期在目标象限的时间

F. 大鼠在测试期穿越平台次数

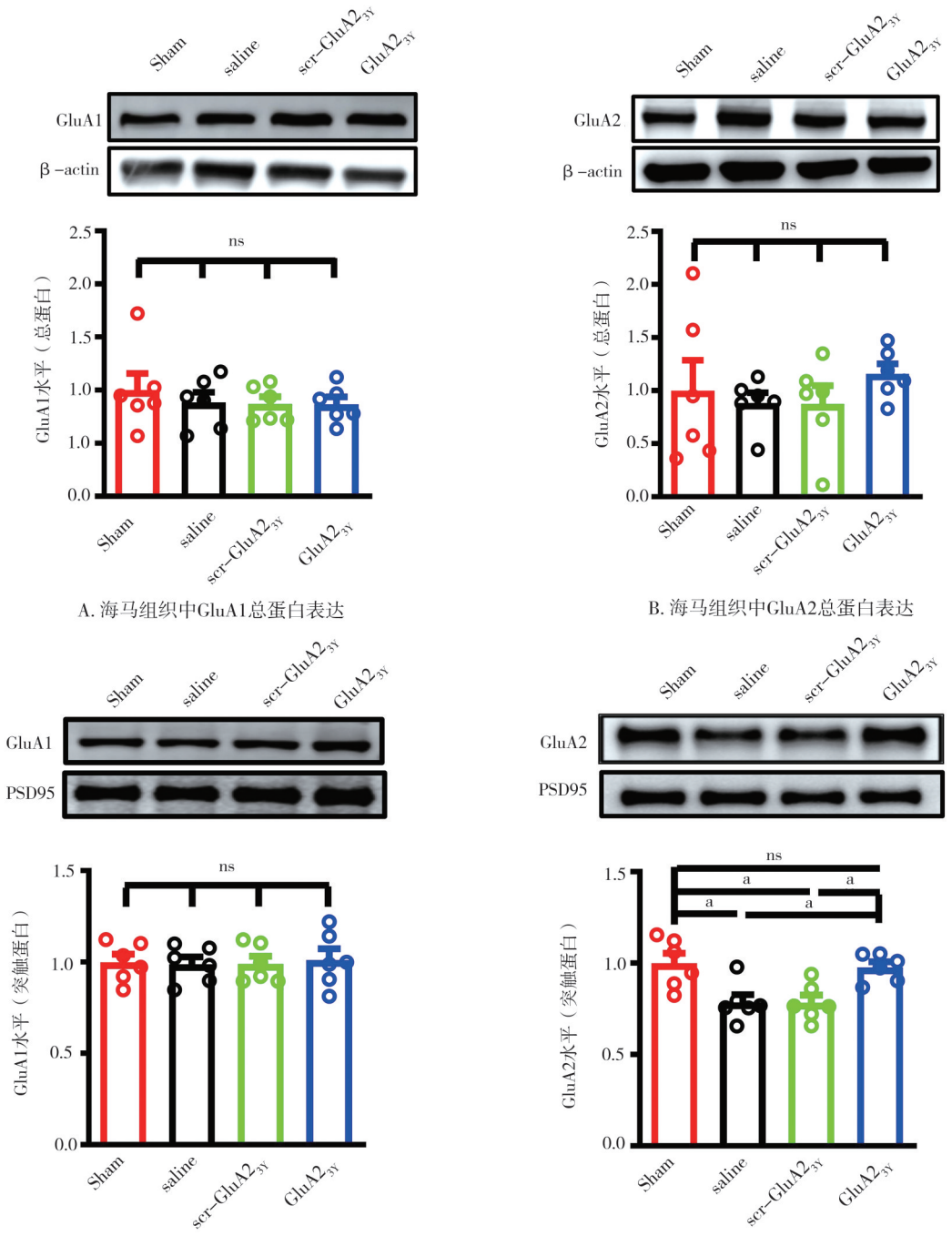
G. 第6天测试中大鼠的轨迹图

注：a，与 Sham 组比较，P<0.05；b，与 Sham 组比较，P<0.01；c，与 Sham 组比较，P<0.001

图 2　GluA2$_{3Y}$治疗可减轻 TBI 引起的学习和记忆缺陷

2.3　$GluA2_{3Y}$逆转了TBI引起的大鼠海马体中AMPAR的异常分布

本研究之前的研究表明，阻断AMPARs的内吞作用可以防止睡眠剥夺母鼠后代的空间学习和记忆缺陷[27]。此外，本研究之前也报道过GluA2依赖的AMPARs内吞作用在学习和记忆中起着关键作用[13,28]。因此，本研究接下来研究了TBI是否确实能促进含有GluA2的AMPARs的内吞作用。本研究检测了AMPARs的GluA1、GluA2亚基在总蛋白（n=6）和突触蛋白（n=6）中的表达水平。本研究发现各组中GluA1和GluA2的总水平没有统计学差异（图3A、B）。重要的是，本研究发现TBI明显选择性地减少了GluA2，但对GluA1含量未产生明显影响（图3C），而使用$GluA2_{3Y}$治疗后（$GluA2_{3Y}$组：0.98 ± 0.03，P=0.981 vs. Sham组，P=0.025 vs. saline组，P=0.025 vs scr–$GluA2_{3Y}$组；图3D）能够阻止这种改变。



A. 海马组织中GluA1总蛋白表达

B. 海马组织中GluA2总蛋白表达

C. 海马组织中GluA1突触蛋白表达

D. 海马组织中GluA2突触蛋白表达

注：a，与Sham组比较，P<0.05；b，与Sham组比较，P<0.01；c，与Sham组比较，P<0.001

图3　$GluA2_{3Y}$逆转了TBI引起的大鼠海马中AMPAR的异常分布

3 讨 论

本研究发现AMPARs内吞在TBI后神经功能障碍中发挥着关键作用，抑制AMPARs的内吞可以明显改善因TBI而导致的大鼠的运动和认知障碍。

尽管近年来在创伤治疗方法上取得了重大进展，但TBI的治疗仍然面临严峻的临床挑战[29]。之前的研究显示，多种AMPARs非竞争性抑制剂（NBQX、Perampanel等）在局部和全脑缺血模型中都显示出强大的神经保护作用[30]。然而，抑制AMPARs对TBI后神经功能的影响尚不明确。事实上，本研究发现全身使用Tat-GluA2$_{3Y}$能改善急性期TBI大鼠的运动功能（图1），可能的机制包括减少促炎细胞因子的产生、增加抗炎细胞因子的产生、调节免疫细胞的活性、减少氧化应激以及改善神经元的存活和功能[31-33]。这些机制共同作用，减轻TBI后的炎症和氧化应激，保护神经元和胶质细胞，从而改善运动功能。并且既往研究显示控制AMPARs内吞在学习和记忆过程中具有重要意义[12-15,34]，使用Tat-GluA2$_{3Y}$抑制AMPARs内吞能增强大鼠的认知功能[13,28]。本实验通过抑制AMPARs内吞，可以维持突触上AMPARs的数量，从而减轻由于含GluA2的AMPARs的内吞作用增强所致的认知障碍（图2、3）。然而，由于在本研究所使用的中度TBI模型破坏了大脑结构，所以本研究未检测到其对突触传递及其可塑性的影响。因此，本研究计划未来采用体外模型来探讨TBI对突触传递的影响，并进一步验证AMPARs内吞在此病理过程中的作用。此外，实验结果显示突触GluA2亚基减少并未伴随着其他AMPARs亚基的明显变化。这可能是因为在AMPARs内化后，部分GluA1同源AMPARs被插入突触，以维持GluA1水平。因此，需在今后的研究中深入探讨AMPARs亚基的动态表达与转运，以阐明它们在TBI病理过程中的作用。

虽然本研究揭示了抑制AMPARs内吞对改善TBI导致的神经损伤和认知障碍的潜力，但迄今为止本研究主要关注Tat-GluA2$_{3Y}$对大鼠急性期损伤的作用。然而，由TBI所造成的运动和认知障碍是一个长期过程，目前尚不清楚Tat-GluA2$_{3Y}$是否能显著促进TBI后期的神经功能改善。因此，需要建立不同类型的TBI模型以检验Tat-GluA2$_{3Y}$在TBI后期的疗效。

参 考 文 献

[1] Maas AIR, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults[J]. Lancet Neurol, 2008, 7(8): 728-741.

[2] Pavlovic D, Pekic S, Stojanovic M, et al. Traumatic brain injury: neuropathological, neurocognitive and neurobehavioral sequelae[J]. Pituitary, 2019, 22(3): 270-282.

[3] Kiraly MA, Kiraly SJ. Traumatic brain injury and delayed sequelae: a review - traumatic brain injury and mild traumatic brain injury (concussion) are precursors to later-onset brain disorders, including early-onset dementia[J]. Sci World J, 2007, 7: 1768-1776.

[4] Draper K, Ponsford J. Cognitive functioning ten years following traumatic brain injury and rehabilitation[J]. Neuropsychology, 2008, 22(5): 618-625.

[5] Ponsford J, Draper K, Schönberger M. Functional outcome 10 years after traumatic brain injury: its relationship with demographic, injury severity, and cognitive and emotional status[J]. J Inter Neuropsych Soc, 2008, 14(2): 233 - 242.

[6] Li ZZ, Dong XH, Zhang JF, et al. Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism[J]. J Neurol Sci, 2014, 338(1/2): 112-117.

[7] Haarbauer-Krupa J, Pugh MJ, Prager EM, et al. Epidemiology of chronic effects of traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2021, 38(23): 3235-3247.

[8] Ding W, Cai C, Zhu XM, et al. Parthenolide ameliorates neurological deficits and neuroinflammation in mice with traumatic brain injury by suppressing STAT3/NF-κB and inflammasome activation[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 108: 108913.

[9] Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus[J]. Nature, 1993, 361(6407): 31-39.

[10] Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, et al. Long-term depression in the CNS[J]. Nat Rev Neurosci, 2010, 11(7): 459-473.

[11] Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis[J]. Annu Rev Neurosci, 2000, 23: 649-711.

[12] Ahmadian G, Ju W, Liu LD, et al. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD[J]. EMBO J, 2004, 23(5): 1040-1050.

[13] Dong ZF, Han HL, Li HJ, et al. Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis[J]. J Clin Invest,

2015,125(1):234-247.

[14] Man HY, Lin JW, Ju WH, et al. Regulation of AMPA receptor - mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization[J]. Neuron, 2000, 25(3):649-662.

[15] Rumpel S, LeDoux J, Zador A, et al. Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning[J]. Science, 2005, 308(5718):83-88.

[16] Peng Y, Wang W, Tan T, et al. Maternal sleep deprivation at different stages of pregnancy impairs the emotional and cognitive functions, and suppresses hippocampal long-term potentiation in the offspring rats[J]. Mol Brain, 2016, 9(1):17.

[17] Babaei P. NMDA and AMPA receptors dysregulation in Alzheimer's disease[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 908:174310.

[18] Lee DJ, Gurkoff GG, Izadi A, et al. Septohippocampal neuromodulation improves cognition after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2015, 32(22):1822-1832.

[19] Israelsson C, Bengtsson H, Kylberg A, et al. Distinct cellular patterns of upregulated chemokine expression supporting a prominent inflammatory role in traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(8):959-974.

[20] Chen T, Liu WB, Chao XD, et al. Salvianolic acid B attenuates brain damage and inflammation after traumatic brain injury in mice[J]. Brain Res Bull, 2011, 84(2):163-168.

[21] Mahmood A, Lu DY, Wang L, et al. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells[J]. Neurosurgery, 2001, 49(5):1196-1204.

[22] Wang ZY, Wang ZY, Wang AQ, et al. The neuroprotective mechanism of sevoflurane in rats with traumatic brain injury via FGF2[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1):51.

[23] Smith CJ, Xiong GX, Elkind JA, et al. Brain injury impairs working memory and prefrontal circuit function[J]. Front Neurol, 2015, 6:240.

[24] Lyeth BG, Jenkins LW, Hamm RJ, et al. Prolonged memory impairment in the absence of hippocampal cell death following traumatic brain injury in the rat[J]. Brain Res, 1990, 526(2):249-258.

[25] Yu YZ, Huang ZL, Dai CF, et al. Facilitated AMPAR endocytosis causally contributes to the maternal sleep deprivation-induced impairments of synaptic plasticity and cognition in the offspring rats[J]. Neuropharmacology, 2018, 133:155-162.

[26] Gardner RC, Byers AL, Barnes DE, et al. Mild TBI and risk of Parkinson disease: a Chronic Effects of Neurotrauma Consortium Study[J]. Neurology, 2018, 90(20):e1771-e1779.

[27] DeKosky ST, Asken BM. Injury cascades in TBI-related neurodegeneration[J]. Brain Inj, 2017, 31(9):1177-1182.

[28] Chen T, Dai SH, Jiang ZQ, et al. The AMPAR antagonist perampanel attenuates traumatic brain injury through anti-oxidative and anti-inflammatory activity[J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(1):43-52.

[29] Glass TF, Reeves B, Sharp FR. The impact of excitotoxic blockade on the evolution of injury following combined mechanical and hypoxic insults in primary rat neuronal culture[J]. Neurobiol Dis, 2004, 17(3):378-384.

[30] Glass TF, Reeves B, Sharp FR. The impact of excitotoxic blockade on the evolution of injury following combined mechanical and hypoxic insults in primary rat neuronal culture[J]. Neurobiol Dis, 2004, 17(3):378-384.

[31] Bolton C, Paul C. Glutamate receptors in neuroinflammatory demyelinating disease[J]. Mediators Inflamm, 2006, 2006(2):93684.

[32] Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, et al. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept[J]. Shock, 2001, 16(3):165-177.

[33] Nichol A, French C, Little L, et al. Erythropoietin in traumatic brain injury (EPO-TBI): a double-blind randomised controlled trial[J]. Lancet, 2015, 386(10012):2499-2506.

[34] Lüscher C, Xia HH, Beattie EC, et al. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity[J]. Neuron, 1999, 24(3):649-658.

（责任编辑：周一青）