

促红细胞生成素治疗不同月龄大鼠脑外伤后认知障碍的疗效及其神经可塑性的研究

迟茜茜^{1,2}, 张悦^{1,2}, 张小年^{1,2*}

¹首都医科大学康复医学院, 北京

²中国康复研究中心北京博爱医院, 北京

收稿日期: 2023年8月6日; 录用日期: 2023年9月1日; 发布日期: 2023年9月7日

摘要

目的: 比较促红细胞生成素治疗不同月龄脑外伤模型大鼠认知功能的疗效差异, 探索其对神经可塑性的影响。方法: 分别选取1、2、3个月龄的健康雄性SD大鼠, 利用CCI方法制作重度脑外伤模型, 分为干预组及对照组。干预组分别在造模后1周进行Epo腹腔内注射治疗, 对照组注射等量的生理盐水。造模4周后进行Morris水迷宫测试, 最后处死动物, 进行海马组织免疫组化染色, 检测GAP-43、Syn含量。结果: 1月龄大鼠的空间学习和记忆能力改善最为明显, 和对照组相比均达到了显著性水平; 而3月龄大鼠的认知功能改善均未达到显著性水平。在相同的治疗时间和剂量情况下, 三个月龄组海马的GAP-43和Syn表达水平治疗后均较对照组有显著性差异, 尤其是1月龄组治疗后Syn表达水平最高。结论: 不管成年或未成年脑外伤大鼠, Epo治疗对神经重塑都具有一定的促进作用, 但成年大鼠这种作用对认知功能的改善效果不及未成年大鼠那么明显, 或者是可能需要更长疗程才能体现。

关键词

脑外伤, 控制性皮层撞击, 促红细胞生成素, 认知功能, 康复

Research on Effect of Erythropoietin Therapy on Cognitive Impairment and Neural Plasticity after Traumatic Brain Injury in Rats with Different Month-Age

Qianqian Chi^{1,2}, Yue Zhang^{1,2}, Xiaonian Zhang^{1,2*}

¹School of Rehabilitation Medicine, Capital Medical University, Beijing

²Beijing Bo'ai Hospital, China Rehabilitation Research Center, Beijing

*通讯作者。

文章引用: 迟茜茜, 张悦, 张小年. 促红细胞生成素治疗不同月龄大鼠脑外伤后认知障碍的疗效及其神经可塑性的研究[J]. 临床医学进展, 2023, 13(9): 14075-14081. DOI: 10.12677/acm.2023.1391968

Abstract

Objective: To compare the effect difference of erythropoietin therapy on cognitive function in traumatic brain injury rats with different month-age, and to explore its effect on neural plasticity. **Methods:** 1, 2, 3 month-age healthy male SD rats were selected, and the CCI method was used to make the severe traumatic brain injury model, which was divided into intervention group and control group. The intervention group was treated with Epo intraperitoneal injection after 1 week, and the control group was injected with equal saline. After 4 weeks of modeling, Morris Water Maze test was taken for each rat, then the hippocampal immunohistochemical staining were done for detection of GAP-43 and Syn after final execution of all rats. **Results:** The improvement of spatial learning and memory ability of 1 month-age rats was the most obvious, compared with the control group, it reached a significant level. However, the improvement of cognitive function of 3 month-age rats did not reach a significant level. In the same treatment time and dosage, the level of GAP-43 and Syn expression in hippocampus of 3 month-age group was significantly different from the control group, especially the level of Syn expression in the 1 month-age group after treatment. **Conclusion:** Regardless of adult or underage rats with traumatic brain injury, Epo therapy has a certain promoting effect on neural plasticity, but the effect of adult rats on cognitive function is less obvious than that of underage rats, or it may take longer period of time to manifest.

Keywords

Traumatic Brain Injury, Controlled Cortical Impact, Erythropoietin, Cognitive Function, Rehabilitation

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

脑外伤的发病率及致残率很高，青年是脑外伤的主要发病群体[1]。而认知障碍是中重度脑外伤患者最为常见的症状之一，严重影响患者的长期预后和生活质量。目前临床上以认知训练治疗为主，现有的改善认知的药物在治疗脑外伤后认知障碍方面缺乏循证医学证据[2]。

研究证实，促红细胞生成素(erythropoietin, Epo)具有一定的神经保护和促进神经修复功能，在脑瘫、缺血性脑血管病、脑外伤、老年性痴呆、癌症放疗后脑损伤等有基础或临床的研究报道[3] [4] [5] [6] [7]。针对 Epo 治疗对脑外伤后认知障碍的影响，有研究通过大鼠模型探索了其用药剂量和疗效的关系，并通过测量病灶体积和神经元丢失的数量探索其可能机制[8]。但尚缺乏对不同月龄大鼠的疗效影响的研究，也缺乏神经递质和可塑性变化的机制研究。

本研究以不同月龄雄性 SD 大鼠为研究对象，采用控制性皮质损伤(controlled cortical impact, CCI)方法制作双侧额叶正中皮质重度脑外伤模型，然后对大鼠模型进行 Epo 干预治疗，通过 Morris 水迷宫实验对比各组大鼠认知功能的改变，观察相关脑组织神经可塑性的变化，综合分析 Epo 治疗对不同月龄大鼠脑外伤后认知功能的影响以及作用机制。

2. 材料和方法

本动物实验严格遵守《医学实验动物管理实施细则》及其它的有关法律、法规，本研究的所有实验程序均是在动物管理伦理委员会批准的协议下进行的。

2.1. 实验动物分组和准备

分别选择 1 个月、2 个月、3 个月的健康雄性 SD 大鼠各 20 只，每个月龄组的大鼠又随机分为两个亚组：治疗组和对照组，每组各 10 只。

所有动物先在温度为 $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光/暗周期为 12 h/12h、光照时间为 7:00~19:00 的条件下饲养适应 7 天，术前、术后均每日给予充足的水分及食物。每周更换垫料一次，保持干燥，造模前禁食 12 h。

2.2. CCI 模型制备

造模前应用 10%水合氯醛以 0.30 mg/kg 腹腔内注射进行麻醉。将大鼠固定在 Kopf 立体定向装置上，固定双侧头皮，在前囟门及人字缝之间距中线 3 mm 进行去骨瓣手术[9]。利用美国 eCCI-6.3 装置进行打击，打击速度：3.5 m/s，打击深度：1.5 mm，停留时间：400 ms [10]。术后将头部切口进行缝合，并于腹腔内注射抗生素，防止感染。假手术组只做开颅去除骨瓣手术，不进行打击[11]。

2.3. 干预方法

治疗组在造模后 1 周进行 Epo 腹腔内注射治疗(5000 U/kg/次,每天 8:00 一次性给药,连续 3 天) [12], 对照组在相同的时间点、选择等量的生理盐水腹腔内注射。

2.4. Morris 水迷宫测试

所有实验大鼠于手术后 4 周进行一次 Morris 水迷宫测试。首先进行定位航行实验，每只大鼠每天测试 4 次，两次测试间隔 15~20 min，计算 4 次测试的平均值作为当日的逃避潜伏期，以此作为空间学习能力的指标。次日进行空间探索实验，将大鼠由原先平台象限的对侧放入水中，记录大鼠在原先平台的象限所花的时间占总时间的百分比，以此作为空间记忆能力的指标。

2.5. 生长相关蛋白(Growth Associated Protein-43, GAP-43)、突触素(Synaptophysin, Syn)测定及分析

所有大鼠进行水迷宫测试后处死大鼠，取脑组织，分离海马组织。采用 Western-blot 定量检测 GAP-43 和 Syn 蛋白表达。应用 Image Pro-Plus 6.0 软件分析免疫组化图片：每组每张切片随机挑选 3 个 200 倍视野进行拍照。应用 Image-Pro Plus6.0 软件选取相同的棕黄色作为判断所有照片阳性的统一标准，对每张照片进行分析，得出每张照片阳性的累积光密度值。

2.6. 统计分析

数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析。数据以平均值 \pm 标准误的形式表示。各时间点水迷宫测试结果进行重复测量方差分析，相同时间点各组间采用单因素方差分析，对水迷宫测试结果采用 Post hoc 中 LSD 检验进行组间比较。各组空间探索实验在目标象限所用时间各组间采用单因素方差分析。将各组水迷宫定位航行实验结果换算为分数，即最高分 60，最低分 1，分别对应所用时间的整数，然后进行 3 日结果平均值的计算，结果作为认知功能测试得分。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

1) 通过水迷宫测试逃避潜伏期变化反应大鼠的空间学习能力, 各个月龄组及其亚组的测试结果参见表 1。

Table 1. Changes in evasion latency of water maze test in each group

表 1. 各组水迷宫测试逃避潜伏期变化

组别	例数	逃避潜伏期(秒)	
		对照组(n = 10)	治疗组(n = 10)
1 月龄组	20	66.52 ± 3.77	46.78 ± 8.72 [#]
2 月龄组	20	67.73 ± 3.56	48.35 ± 9.33 [#]
3 月龄组	20	66.88 ± 3.63	56.77 ± 10.23

[#]与对照组相比, $P < 0.05$; 各对照组均无显著差异; 1 月龄组和 2 月龄组中治疗组与对照组相比, 均有统计学差异($P < 0.05$); 但 3 月龄组治疗组与对照组相比, 无统计学差异($P > 0.05$)。

2) 通过水迷宫测试目标象限停留时间变化反应大鼠的空间记忆功能, 各个月龄组及其亚组的测试结果参见表 2。

Table 2. Changes in target quadrant residence time of water maze tests in each group

表 2. 各组水迷宫测试目标象限停留时间变化

组别	例数	目标象限停留时间占总时间百分比(%)	
		对照组(n = 10)	治疗组(n = 10)
1 月龄组	20	34.3 ± 3.3	54.4 ± 6.6 [#]
2 月龄组	20	37.5 ± 5.6	42.5 ± 9.0
3 月龄组	20	36.4 ± 5.5	44.9 ± 8.8

[#]与对照组相比, $P < 0.05$; 各对照组均无显著差异; 1 月龄组中治疗组与对照组相比, 有统计学差异($P < 0.05$); 但 2 月龄组和 3 月龄组中, 治疗组与对照组相比, 均无统计学差异($P > 0.05$)。

3) 不同月龄组脑外伤大鼠给予高 Epo 治疗对海马区 GAP-43 和 Syn 阳性细胞 IOD 值的影响, 测试结果参见表 3 和图 1, 图 2。

Table 3. Comparison of IOD values of GAP-43 and Syn positive cells in the hippocampus of rats in each group

表 3. 各组大鼠海马区 GAP-43 和 Syn 阳性细胞 IOD 值对比

组别	n	GAP-43		Syn	
		对照组(n = 10)	治疗组(n = 10)	对照组(n = 10)	治疗组(n = 10)
1 月龄组	20	22,572 ± 2376	38,847 ± 2358 [#]	10,322 ± 523	40,372 ± 6433 [*]
2 月龄组	20	21,342 ± 1378	32,829 ± 203 [#]	8357 ± 379	17,453 ± 3870 [#]
3 月龄组	20	20,765 ± 2216	30,564 ± 5378 [#]	6576 ± 577	17,357 ± 1079 [#]

[#]与对照组相比, $P < 0.05$; ^{*}与对照组相比, $P < 0.01$; 各对照组均无显著差异; 三个组中治疗组与对照组相比, GAP-43 和 Syn 均有统计学差异($P < 0.05$); 1 月龄治疗组与对照组相比, Syn 有显著统计学差异($P < 0.01$)。

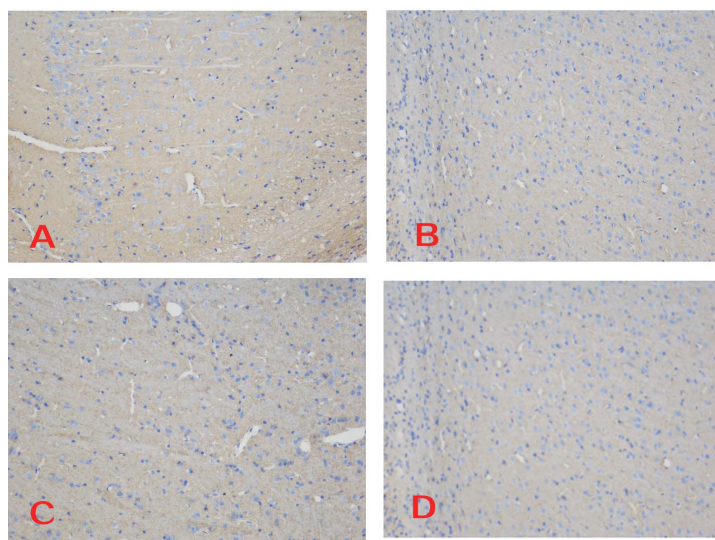


Figure 1. Immunohistochemical staining of the hippocampus of rats in each group showed GAP-43 positive cells (blue, magnified at 200 times). A: the control group, B: 1-month-old group, C: 2-month-old group, D: 3-month-old group

图 1. 各组大鼠海马区免疫组化染色显示 GAP-43 阳性细胞(蓝色, 放大 200 倍)。A 为对照组, B 为 1 月龄组, C 为 2 月龄组, D 为 3 月龄组

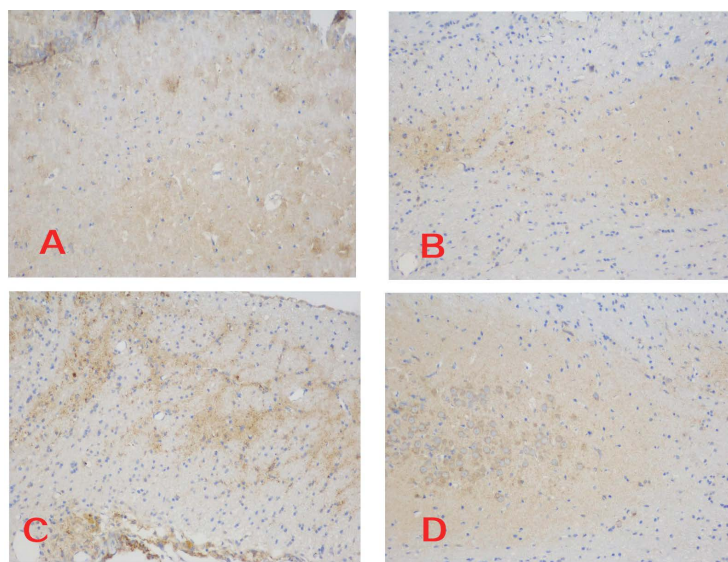


Figure 2. Immunohistochemical staining of the hippocampus of rats in each group shows Syn positive cells (blue, magnified at 200 times). A: the control group, B: 1-month-old group, C: 2-month-old group, D: 3-month-old group

图 2. 各组大鼠海马区免疫组化染色显示 Syn 阳性细胞(蓝色, 放大 200 倍)。A 为对照组, B 为 1 月龄组, C 为 2 月龄组, D 为 3 月龄组

4. 讨论

Epo 具有一定的神经系统的治疗作用, 尤其表现在改善认知功能方面, 也有一定的临床研究报道。通过 Epo 治疗可以改善 1 型糖尿病、抑郁症、精神分裂症、乳腺癌化疗术后、Alzheimer 病等患者的某些认知行为症状[3] [4] [5] [6] [7]。针对新生儿的缺血缺氧损伤, Epo 治疗也有一定的神经保护和修复效果 [13]。但是这些研究仅是小样本的报道, 目前尚缺乏 Epo 在脑外伤患者的临床应用研究。

针对 Epo 的神经保护作用对认知功能的影响及其作用机制, 进行了一定的基础研究, 主要应用啮齿

类动物的各种脑损伤模型[14][15][16][17]。但是这些研究还存在一定的不足：缺乏不同月龄大鼠的疗效对比；针对 Epo 的促神经修复作用，缺少神经递质方面的研究。本研究对比不同月龄脑外伤模型大鼠的 Epo 疗效发现，1 月龄大鼠的空间学习和记忆能力改善最为明显，和对照组相比均达到了显著性水平；而 3 月龄大鼠的认知功能改善均未达到显著性水平。因此可以初步说明，大鼠的月龄对于 Epo 改善脑外伤后认知功能障碍的疗效存在一定的影响，未成年大鼠的疗效可能更好。本研究结果与某些临床研究结果一致，一些临床报道往往多见于新生儿或未成年人[6][13]。

CCI 模型可精确控制打击部位、打击速度及停留时间，重复性更高，受个体差异因素影响较小[18]，可制备不同部位和严重程度的脑外伤模型。GAP-43 是一个轴突膜蛋白，是一种神经特异性的蛋白质，参与神经细胞外生长及突触发育形成和神经细胞再生。在神经元发育和再生过程中以高水平表达，能调解轴突延伸作用，改变细胞形态。作为细胞内信号，可大大增强与 G 蛋白偶联的受体转运作用。Syn 几乎存在于中枢和外周神经系统的所有神经末梢，同时，在神经内分泌细胞等部位也发现有突触素存在[19][20]。参与突触囊泡的导入、转运和神经递质的释放、突触囊泡再循环和突触发生[21][22]。突触素可作为突触前终末的特异性标记物，用来检测突触的密度和分布[23]，已被广泛应用于研究动物模型及人类疾病的突触发生，并作为神经重塑的重要标记之一。

本研究通过测定第 4 周时大鼠海马中与神经重塑相关的指标(GAP-43 和 Syn)，考察不同月龄脑外伤大鼠 Epo 治疗对神经重塑影响的差异性。根据我们实验研究结果显示：在相同的治疗时间和剂量(5000 U/kg)情况下，三个月龄组海马的 GAP-43 和 Syn 表达水平治疗后均较对照组有显著性差异，尤其是 1 月龄组治疗后 Syn 表达水平最高。GAP-43 和 Syn 表达水平和水迷宫测试结果并不完全一致，这可能说明了不管成年或未成年脑外伤大鼠，Epo 治疗对神经重塑都具有一定的促进作用，但成年大鼠这种作用对认知功能的改善效果不及未成年大鼠那么明显，或者是可能需要更长疗程才能体现。

通过与神经重塑相关的重要神经的研究，可以进一步揭示 Epo 神经保护和促进神经修复的作用机制。脑损伤后神经功能的改善是以结构和功能的重组为基础的，因此我们推测在脑外伤恢复期，类似于生长激素，Epo 也可能是通过影响与认知相关部位的神经重塑，达到改善认知的效果[24]，而不同的月龄可能对认知功能的疗效和神经重塑作用均存在一定的影响。

5. 结论

不管成年或未成年脑外伤大鼠，Epo 治疗对神经重塑都具有一定的促进作用，但成年大鼠这种作用对认知功能的改善效果不及未成年大鼠那么明显，或者是可能需要更长疗程才能体现。

参考文献

- [1] Bruns, J.J. and Hauser, W.A. (2003) The Epidemiology of Traumatic Brain Injury: A Review. *Epilepsia*, **44**, 2-10. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.44.s10.3.x>
- [2] 张小年, 张皓. 创伤性颅脑损伤后认知障碍临床治疗进展[J]. 中国康复医学杂志, 2014, 29(1): 86-89.
- [3] Miskowiak, K.W., Vinberg, M., Christensen, E.M., *et al.* (2014) Recombinant Human Erythropoietin for Treating Treatment-Resistant Depression: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Trial. *Neuropsychopharmacology*, **39**, 1399-1408. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.335>
- [4] Jantzie, L.L., Miller, R.H. and Robinson, S. (2013) Erythropoietin Signaling Promotes Oligodendrocyte Development Following Prenatal Systemic Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Pediatric Research*, **74**, 658-667. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.155>
- [5] Mukhopadhyay, P., Sinha, U., Banerjee, J., *et al.* (2012) The Effects in Correction of Anaemia in Chronic Kidney Disease with Erythropoietin Therapy—Preference to Cardiovascular, Neurologic and General Well-Being of Patients from a Tertiary Care Centre. *Journal of Indian Medical Association*, **110**, 885-888.
- [6] Min, K., Song, J., Kang, J.Y., *et al.* (2013) Umbilical Cord Blood Therapy Potentiated with Erythropoietin for Children

- with Cerebral Palsy: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Stem Cells*, **31**, 581-591. <https://doi.org/10.1002/stem.1304>
- [7] Kristensen, P.L., Pedersen-Bjergaard, U., Kjaer, T.W., *et al.* (2013) Influence of Erythropoietin on Cognitive Performance during Experimental Hypoglycemia in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus: A Randomized Cross-Over Trial. *PLOS ONE*, **8**, e59672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059672>
- [8] Hellewell, S.C., Yan, E.B., Alwis, D.S., *et al.* (2013) Erythropoietin Improves Motor and Cognitive Deficit, Axonal Pathology, and Neuroinflammation in a Combined Model of Diffuse Traumatic Brain Injury and Hypoxia, in Association with Upregulation of the Erythropoietin Receptor. *Journal of Neuroinflammation*, **10**, 156. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-156>
- [9] Dixon, C.E., Clifton, G.L., Lighthall, J.W., *et al.* (1991) A controlled Cortical Impact Model of Traumatic Brain Injury in the Rat. *The Journal of Neuroscience Methods*, **39**, 253-262. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90104-8](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90104-8)
- [10] Guseva, M.V., Hopkins, D.M., Scheff, S.W., *et al.* (2008) Dietary Choline Supplementation Improves Behavioral, Histological, and Neurochemical Outcomes in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, **25**, 975-983. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0516>
- [11] Cole, J.T., Yarnell, A., Kean, W.S., *et al.* (2010) Craniotomy: True Sham for Traumatic Brain Injury, or a Sham of a Sham? *Journal of Neurotrauma*, **28**, 359-369. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1427>
- [12] 贾强, 只达石, 黄慧玲, 等. 促红细胞生成素对创伤性脑损伤大鼠认知功能影响的实验研究[J]. 中华神经医学杂志, 2010, 9(7): 686-689, 696.
- [13] Avasiloaiei, A., Dimitriu, C., Moscalu, M., *et al.* (2013) High-Dose Phenobarbital or Erythropoietin for the Treatment of Perinatal Asphyxia in Term Newborns. *Pediatrics International*, **55**, 589-593. <https://doi.org/10.1111/ped.12121>
- [14] Barichello, T., Simoes, L.R., Generoso, J.S., *et al.* (2014) Erythropoietin Prevents Cognitive Impairment and Oxidative Parameters in Wistar Rats Subjected to Pneumococcal Meningitis. *Translational Research*, **163**, 503-513. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.12.008>
- [15] Blixt, J., Gunnarson, E. and Wanecek, M. (2018) Erythropoietin Attenuates the Brain Edema Response after Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, **35**, 671-680. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5015>
- [16] Hralova, M., Plananska, E., Angerova, Y.E., *et al.* (2014) Effects of a Single Dose of Erythropoietin on Motor Function and Cognition after Focal Brain Ischemia in Adult Rats. *Prague Medical Report*, **115**, 5-15. <https://doi.org/10.14712/23362936.2014.1>
- [17] Alexander, M.L., Hill, C.A., Rosenkrantz, T.S., *et al.* (2012) Evaluation of the Therapeutic Benefit of Delayed Administration of Erythropoietin Following Early Hypoxic-Ischemic Injury in Rodents. *Developmental Neuroscience*, **34**, 515-524. <https://doi.org/10.1159/000345645>
- [18] Ommaya, A.K. (1995) Head Injury Mechanisms and the Concept of Preventive Management: A Review and Critical Synthesis. *Journal of Neurotrauma*, **12**, 527-546. <https://doi.org/10.1089/neu.1995.12.527>
- [19] De Camilli, P. and Greengard, P. (1986) Synapsin I: A Synaptic Vesicle-Associated Neuronal Phosphoprotein. *Biochemical Pharmacology*, **35**, 4349-4357. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90747-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90747-1)
- [20] Cesca, F., Baldelli, P., Valtorta, F. and Benfenati, F. (2010) The Synapsins: Key Actors of Synapse Function and Plasticity. *Progress in Neurobiology*, **91**, 313-348. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.006>
- [21] Levitan, E.S. (2008) Signaling for Vesicle Mobilization and Synaptic Plasticity. *Molecular Neurobiology*, **37**, 39-43. <https://doi.org/10.1007/s12035-008-8014-3>
- [22] Fornasiero, E.F., Bonanomi, D., Benfenati, F. and Valtorta, F. (2010) The Role of Synapsins in Neuronal Development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 1383-1396. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0227-8>
- [23] Thiel, G. (1993) Synapsin I, Synapsin II, and Synaptophysin: Marker Proteins of Synaptic Vesicles. *Brain Pathology*, **3**, 87-95. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1993.tb00729.x>
- [24] Zhang, H., Han, M., Zhang, X., *et al.* (2014) The Effect and Mechanism of Growth Hormone Replacement on Cognitive Function in Rats with Traumatic Brain Injury. *PLOS ONE*, **9**, e108518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108518>