

分子氢对小鼠创伤性脑损伤神经转归的作用及机制研究

张 昕, 李庭庭, 刘香楠, 万 强, 杨万超*

哈尔滨医科大学附属第二医院麻醉科, 黑龙江 哈尔滨

收稿日期: 2021年12月28日; 录用日期: 2022年1月18日; 发布日期: 2022年1月29日

摘 要

目的: 探索分子氢对小鼠创伤性脑损伤后脑水肿及神经转归的影响与细胞焦亡机制及全身炎症反应的作用。方法: 雄性C57BL/6小鼠72只, 依照随机数字法分为假手术组(S组)、创伤性脑损伤组(T组)和分子氢治疗组(H组), 每组24只。S组行气管插管后, 暴露颅骨、钻孔, 保留硬脑膜完整, 2 h后拔除气管导管; T组采用液压冲击损伤(FPI)法构建小鼠创伤性脑损伤(TBI)模型; H组建立TBI模型后即日起每日吸入42% H₂-21% O₂-37% N₂混合气2 h, 持续7 d。术后24 h处死小鼠, Western blot法检测细胞焦亡相关蛋白Caspase-1、ASC水平, ELISA法分别检测血清和创伤半暗带处脑组织IL-1 β 、IL-18水平; 术后48 h处死小鼠, 观察脑组织水肿情况并测量脑含水量, HE染色法观察创伤半暗带炎性细胞浸润情况, 尼氏染色法观察创伤侧皮质尼氏小体数量及形态; 同时, 观察并记录小鼠创伤后7天神经功能评分、体重变化情况。结果: 与S组比较, T组脑含水量显著增加, 分子氢治疗后脑水肿显著改善($P < 0.05$); T组脑组织炎细胞浸润明显, 异常尼氏小体数量增加, 神经元排列松散, 分子氢治疗后上述病理改变显著改善($P < 0.05$); T组脑组织Caspase-1、ASC蛋白表达显著升高, 脑皮质及血清内IL-1 β 、IL-18水平明显增加, 术后体重大幅降低, 在96 h降至最低水平, 后呈缓慢恢复趋势, mNSS评分结果显示, TBI后小鼠神经功能损伤明显加重。分子氢治疗后, 上述病理改变均明显减轻($P < 0.05$)。结论: 分子氢显著改善了小鼠TBI后脑水肿及神经转归, 其机制可能与抑制细胞焦亡与全身炎症相关。

关键词

分子氢, 创伤性脑损伤, 细胞焦亡, 炎症

Effects and Mechanism of Molecular Hydrogen on Neurological Outcome after Traumatic Brain Injury in Mice

Xin Zhang, Tingting Li, Xiangnan Liu, Qiang Wan, Wanchao Yang*

*通讯作者。

文章引用: 张昕, 李庭庭, 刘香楠, 万强, 杨万超. 分子氢对小鼠创伤性脑损伤神经转归的作用及机制研究[J]. 临床医学进展, 2022, 12(1): 716-725. DOI: 10.12677/acm.2022.121105

Abstract

Objective: To explore the effects of molecular hydrogen on cerebral edema and neurological outcome after traumatic brain injury in mice and the mechanism of pyroptosis and systemic inflammation. **Methods:** 72 male C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group (group S), traumatic brain injury group (group T) and molecular hydrogen treatment group (group H), with 24 mice in each group. After endotracheal intubation, the skull of mice in group S was exposed, with the dura mater kept intact, and the endotracheal tube was removed 2 h later. Mice in group T were treated with fluid percussion injury (FPI) method to construct traumatic brain injury (TBI) model. The mice in group H inhaled 42% H₂-21% O₂-37% N₂ mixture 2 h daily for 7 days immediately after the establishment of TBI model. The mice were sacrificed 24 h after surgery; western blot was used to detect the levels of Caspase-1 and ASC. The levels of IL-1 β and IL-18 in serum and brain tissue of traumatic penumbra were determined by ELISA. Other mice were sacrificed 48 h after surgery, and the edema of brain tissue was observed and the water content of brain was measured. HE staining was used to observe inflammatory cell infiltration in penumbra of trauma. The number and morphology of Nissl bodies in cortex were observed by Nissl staining. At the same time, neurological function scores and body weight changes of mice 7 days after injury were observed and recorded. **Results:** Compared with group S, brain water content in group T was significantly increased, while the brain edema was significantly improved after molecular hydrogen treatment ($P < 0.05$); in group T, inflammatory cell infiltration was obvious, the number of abnormal Nissl bodies was increased, and the arrangement of neurons was loose. The above pathological changes were significantly improved after molecular hydrogen treatment ($P < 0.05$). The expression of Caspase-1 and ASC protein in brain tissue was significantly increased in group T, and the levels of IL-1 β and IL-18 in cerebral cortex and serum were also significantly increased. After surgery, the body weight was significantly reduced to the lowest level at 96 hours, and then showed a slow recovery trend. mNSS scores showed that the neurological impairment of the mice was significantly aggravated after TBI. After molecular hydrogen treatment, the above pathological changes were significantly alleviated ($P < 0.05$). **Conclusions:** Molecular hydrogen significantly improved brain edema and neurological outcome after TBI in mice, and the mechanism may be related to inhibiting pyroptosis and systemic inflammation.

Keywords

Molecular Hydrogen, Traumatic Brain Injury, Pyroptosis, Inflammation

Copyright © 2022 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. 前言

创伤性脑损伤(TBI), 又称颅脑损伤, 是由外伤所致的脑组织损伤, 其不良预后已成为现代社会的重要问题[1], 且目前尚无有效治疗方法。炎症反应及严重的脑水肿是 TBI 后 24 h 急性期病理进展的关键因素[2], 其直接或间接导致的神经元损伤与多器官病理改变, 常贯穿该疾病始终, 最终导致不良预后。

细胞焦亡是近年新发现的一种细胞程序性死亡形式,其主要通过 Caspase-1 介导,引起细胞穿孔,最终导致炎症反应级联放大[3]。细胞焦亡广泛参与多种疾病的发生、发展,其显著特征为 IL-1 β 、IL-18 向胞外大量释放[4],最终引起全身炎症反应。

分子氢常以氢气的形式存在于自然界,而其作为一种新兴的医学气体,有易制得、低成本、起效快、无毒、无残留等特点,目前已被证实可通过抗炎、抗氧化应激、抗凋亡等途径改善多种器官损伤[5] [6],但其具体作用机制尚未明确。目前研究显示,分子氢存在剂量依赖性,较高浓度的氢气可发挥更好的效果[7]。因此,本实验通过液压冲击损伤(FPI)法建立 TBI 模型,探索较高浓度的分子氢对小鼠 TBI 后脑水肿及神经转归的影响,以及细胞焦亡机制与全身炎症反应的作用。

2. 材料和方法

2.1. 试剂及仪器

兔抗小鼠 GAPDH (1:5000, SAB, #21612, 美国),兔抗小鼠 Caspase-1 (1:2000, Origin, #TA323204S, 美国),兔抗小鼠 ASC (1:2000, Origin, #TA326289S, 美国);酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(江莱生物, #IL-1 β ; #IL-18, 中国);AMS-H-03 氢氧气雾化机(上海惠美医疗科技, 中国),液压冲击装置(AmScien Instruments, 美国),尼氏染色液(索莱宝, #G1430, 中国)。

2.2. 动物与分组

本实验经哈尔滨医科大学附属第二医院医学伦理委员会动物实验伦理审批(审批号:SYDWGZR2020-039)。选用雄性健康成年的无特定的病原体(specific pathogen free, SPF)级 C57BL/6 小鼠(10 至 12 周龄),体重 25~30 g [哈尔滨医科大学实验动物学部提供,许可证号:SCXK(黑)2013-001],术前禁食 6 h,不禁饮。所有实验动物使用随机数法分成 3 组:假手术组(S 组)、创伤性脑损伤组(T 组)和分子氢治疗组(H 组),每组 24 只。

2.3. 模型制备

建立改良的小鼠颅脑液压冲击损伤(FPI)模型[8],即 TBI 模型。腹腔注射戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉小鼠,行气管插管,保留自主呼吸。术区常规消毒、备皮,1%利多卡因局部浸润麻醉,固定小鼠头部于脑立体定位仪(Narishige, SR-6N, 日本),沿正中中线切开,暴露颅骨,于矢状缝右侧 1.2 mm、前囟门后 1.2 mm 处钻出直径约 1 mm 圆孔,保持硬脑膜完整无缺损。将液压损伤装置垂直于圆孔与小鼠硬脑膜形成紧密连接,确保完全密闭后,将颅脑液压损伤装置的摆锤调定于 13°,松开摆锤使其自由下落,液压装置中无菌生理盐水产生的压力(约 1.5~2.0 atm)瞬时作用于硬脑膜,导致小鼠发生中度创伤性脑损伤。对于小鼠脑创伤后普遍发生的呼吸暂停现象,使用呼吸气囊通过气管插管辅助呼吸,术后对小鼠保温并监护至完全苏醒。

2.4. 分子氢治疗模式

采用惠美 AMS-H-03 氢氧气雾化机按 1:2 的比例电解去离子水[9],使用氮气进行充盈,形成 42% H₂-21% O₂-37% N₂ 的混合气体。吸入过程在配有气体回路、呼出气吸收装置、气体浓度监测仪的防爆箱中进行。S 组和 T 组全程吸入空气(21% O₂-78% N₂),H 组在术后即日起每日吸入含 42%氢气的混合气体 2 h 进行分子氢治疗。

2.5. 脑含水量测定

于损伤后 48 h,戊巴比妥钠深麻醉下断头迅速分离脑组织,将损伤侧的大脑半球置于干燥培养皿中,

使用电子天平称取重量,即为湿重;随后在 80℃恒温烘干箱中干燥 72 h,立即称取重量,即为干重。按照以下公式计算脑含水量:脑含水量 = (湿重 - 干重)/湿重 × 100%。

2.6. 脑组织病理观察

术后 48 h,戊巴比妥钠深麻醉下经心尖穿刺,依次行生理盐水灌注和 4%多聚甲醛固定,后断头取脑,置于 4%多聚甲醛溶液中 4℃固定 24 h,常规石蜡包埋、冠状连续切片(3 μm),分别取脑组织切片进行苏木素-伊红(HE)染色和尼氏(Nissl)染色。低倍镜下(×40)取相同皮质形状切片,视为脑组织同一平面,于高倍镜下(×400)观察神经元细胞损伤和尼氏小体。

2.7. Western blot 检测

术后 24 h,深麻醉下快速断头取脑,取损伤半暗带皮质,RIPA 裂解液裂解,4℃下 14,000 r/min 离心 20 min 吸取上清,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。使用 10%的 SDS-PAGE 胶对蛋白样品进行电泳分离,上样,电泳,转至硝化纤维素膜,6%脱脂奶粉进行封闭。随后分别以兔抗小鼠 GAPDH (1:5000, SAB, #21612, 美国),兔抗小鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 1 (cysteinyl aspartate specific proteinase-1, Caspase-1; 1:2000, Origin, #TA323204S, 美国),兔抗小鼠凋亡相关斑点样蛋白 ASC 型(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC; 1:2000, Origin, #TA326289S, 美国)的一抗 4℃孵育过夜。次日复温后 TBST 洗膜 5 min × 5 次,在室温下孵育山羊抗兔辣根过氧化物酶结合的二级抗体(1:5000; ZSGB biotechnology, 中国) 1 h。TBST 洗膜 5 min × 5 次后,加入化学发光剂(碧云天, 中国)后暗室曝光,使用成像系统(上海勤翔科技, 中国)采集分析 Caspase-1 及 ASC 条带积分光密度值,其与相应 GAPDH 条带之比作为蛋白相对含量。

2.8. ELISA 检测

术后 24 h,小鼠在深麻醉下经心尖穿刺取血,同时快速断头取脑,液氮冻存。将血液于 4℃下以 3000 r/min 的速度离心 15 min 吸取血清;取损伤半暗带皮质匀浆处理后于 4℃下 400 g 离心 5 min,吸取上清液。按说明书描述的方式,用 ELISA 试剂盒分别检测血清和损伤半暗带皮质中 IL-1β 和 IL-18 水平。

2.9. 改良神经功能评分(Modified Neurological Severity Score, mNSS)和体重变化率

在术后第 1~7 天,采用 mNSS [10]评分分别对每组小鼠进行神经功能评估,内容包括提尾试验、置地活动试验、平衡木试验、反射及反常运动试验等,并记录评分总和,用于反映小鼠神经功能损伤情况。同时记录小鼠术前体重为初始体重,术后 1~7 天每日同一时刻记录体重情况为当日体重。按照以下公式计算小鼠体重变化率:体重变化率 = 当日体重/初始体重 × 100%。

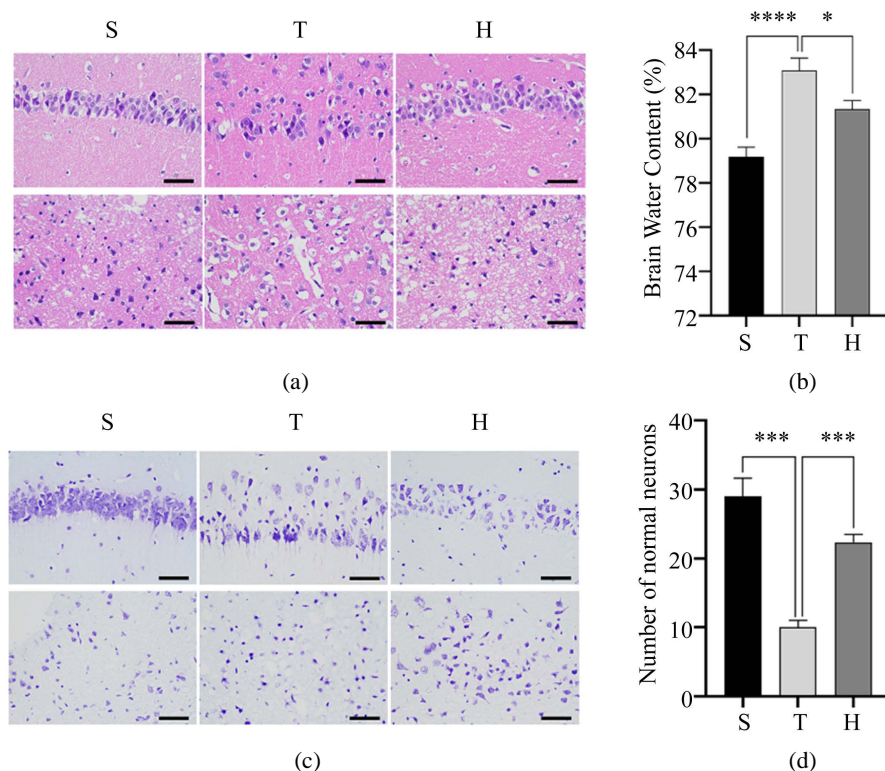
2.10. 统计分析

采用 SPSS22.0 与 GraphPad Prism8.3 软件进行统计学分析。正态分布计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用双尾 t 检验;非正态分布计量资料组间比较采用 U 检验;连续测量数据采用重复测量方差分析,单日组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 脑含水量

如图 1(b)所示,与 S 组比较,T 组脑组织含水量明显增加(**** $P < 0.0001$),与 T 组比较,H 组脑组织含水量明显降低(* $P < 0.05$)。



注：S 组为假手术组，T 组为创伤性脑损伤组，H 组为分子氢治疗组。

Figure 1. Brain water content and pathological changes of mice in three groups 48 h after surgery. (a) HE staining, $\times 400$; (b) Brain water content of mice in three groups, compared with group S, $****P < 0.0001$, compared with group H, $*P < 0.05$; (c) N Nissl staining, $\times 400$; (d) The number of normal Nissl bodies per unit area of injured penumbra cortex in three groups of mice, compared with group S, $***P < 0.001$, compared with group H, $***P < 0.001$

图 1. 3 组小鼠术后 48 h 脑含水量及病理改变情况。(a) HE 染色， $\times 400$ ；(b) 3 组小鼠脑含水量情况，与 S 组比较， $****P < 0.0001$ ，与 H 组比较， $*P < 0.05$ ；(c) 尼氏染色， $\times 400$ ；(d) 3 组小鼠损伤半暗带皮质单位面积下正常尼氏小体数量，与 S 组比较， $***P < 0.001$ ，与 H 组比较， $***P < 0.001$

3.2. 脑组织病理改变

脑组织 HE 染色示，S 组细胞排列致密、整齐，细胞核完整，细胞质均匀丰富；与 S 组相比，T 组细胞肿胀，间隙增宽，部分神经元可见核固缩与炎细胞浸润。相比于 T 组，H 组的病理改变有所减轻(图 1(a))。脑组织尼氏染色可见，S 组包含大量形态正常的尼氏小体；T 组尼氏小体数量减少，排列松散，可见大量异常尼氏小体。相比于 T 组，H 组异常尼氏小体数量减少，神经元损伤减轻(图 1(c)，图 1(d))。

3.3. Western Blot

术后 24 h 脑组织细胞焦亡相关蛋白表达情况如(图 2)所示，与 S 组相比，T 组脑组织中 Caspase-1、ASC 表达水平均明显增加(均 $P < 0.05$)；与 T 组比较，H 组脑组织中 Caspase-1、ASC 表达水平相对显降低(均 $P < 0.05$)。

3.4. ELISA

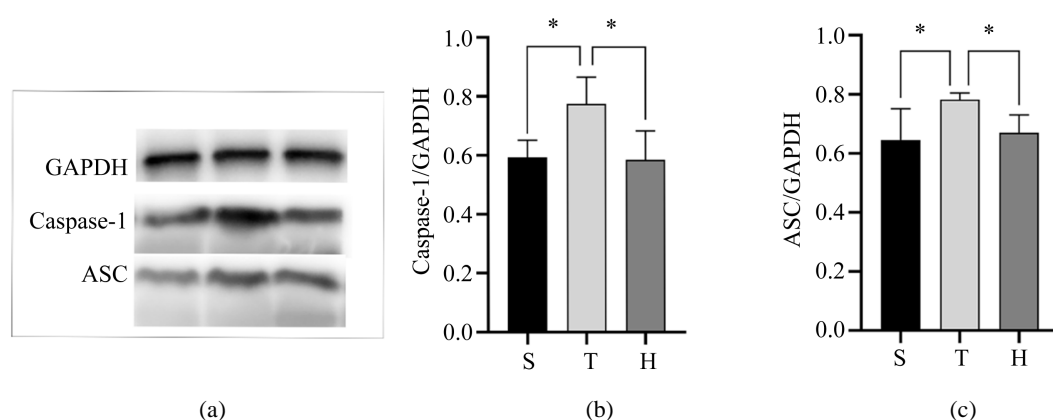
术后 24 h 血清和损伤半暗带皮质中 IL-1 β 和 IL-18 表达水平如(图 3)所示，与 S 组比较，T 组血清中

IL-1 β 和 IL-18 及损伤半暗带皮质中 IL-18 表达水平升高(均 $P < 0.05$), 与 T 组比较, H 组血清中 IL-1 β 和 IL-18 及损伤半暗带皮质中 IL-18 表达水平有所降低(均 $P < 0.05$)。

3.5. mNss 评分和体重变化率

术后 7 日 mNss 评分结果(图 4(a))显示, S 组神经功能评分趋于一致, 未见明显异常; T 组术后即刻显示神经功能明显异常, 同时具有缓慢自愈倾向; 与 T 组比较, H 组快速显示正向神经转归效应, 并显著促进恢复速度, 加快自愈趋势。

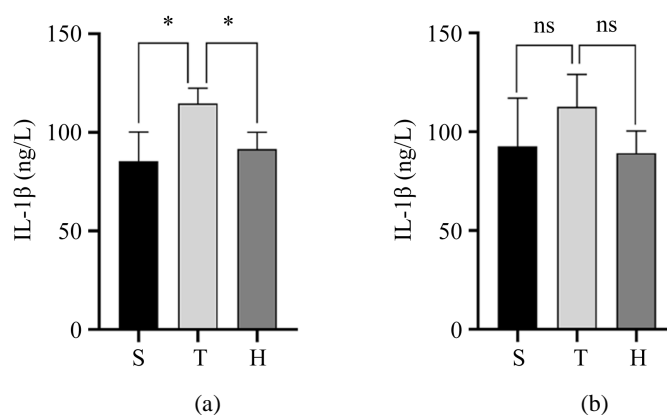
3 组动物术后 7 日体重变化情况(图 4(b))显示, S 组小鼠体重增长趋势较为平稳, T 组小鼠体重在术后出现大幅度降低, 约 96 h 降低至最低水平, 随后缓慢回弹; H 组术后体重减轻幅度较小, 且更早(约 72 h)降低至最低点, 并以较快的速度回升。

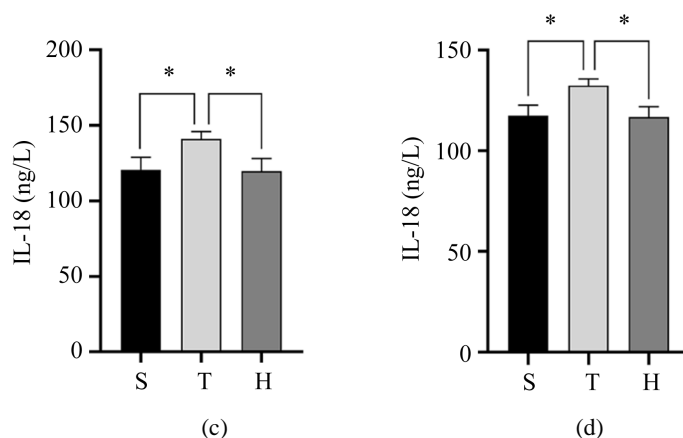


注: S 组为假手术组, T 组为创伤性脑损伤组, H 组为分子氢治疗组。

Figure 2. Comparison of Caspase-1 and ASC protein contents in the injured penumbra cortex of mice in three groups 24 h after surgery. (a) Image of Caspase-1 and ASC protein contents in the injured penumbra cortex of mice in three groups; (b) Comparison of Caspase-1 expression levels in the injured penumbra cortex of the three groups of mice, compared with group S, $*P < 0.05$, compared with group H, $*P < 0.05$; (c) Comparison of ASC expression levels in the injured penumbra cortex of the three groups of mice, compared with group S, $*P < 0.05$, compared with group H, $*P < 0.05$

图 2. 3 组小鼠术后 24 h 损伤半暗带皮质 Caspase-1、ASC 蛋白含量的比较。(a) 3 组小鼠损伤半暗带皮质两种蛋白显影情况;(b) 3 组小鼠损伤半暗带皮质 Caspase-1 表达水平的比较情况,与 S 组比较, $*P < 0.05$,与 H 组比较, $*P < 0.05$;(c) 3 组小鼠损伤半暗带皮质 ASC 表达水平的比较情况,与 S 组比较, $*P < 0.05$,与 H 组比较, $*P < 0.05$

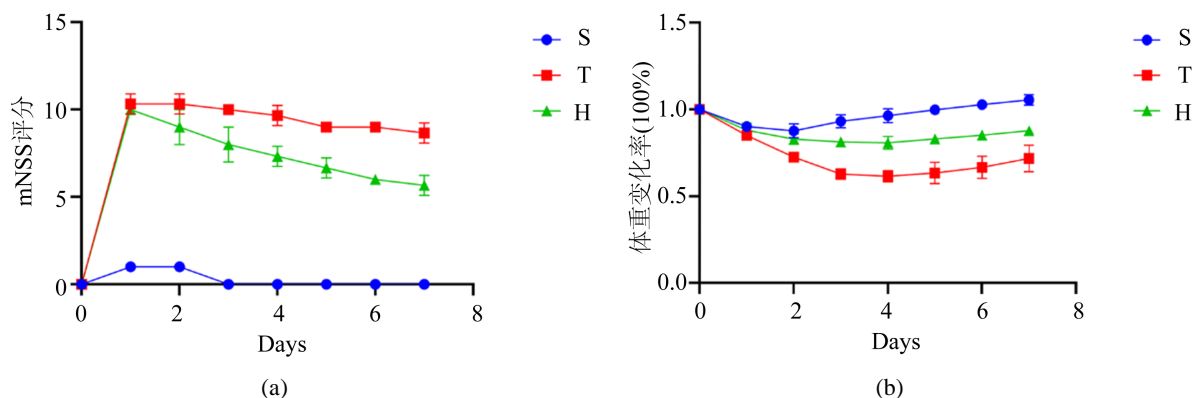




注: S 组为假手术组, T 组为创伤性脑损伤组, H 组为分子氢治疗组。

Figure 3. Expression levels of IL-1 β and IL-18 in serum and injured penumbra cortex of the three groups of mice 24 h after surgery. (a) Comparison of serum IL-1 β expression levels, compared with group S, $*P < 0.05$, compared with group H, $*P < 0.05$; (b) The expression level of IL-1 β in the injured penumbra cortex showed no statistical significance compared with group S and group H; (c) Comparison of serum IL-18 expression levels, compared with group S, $*P < 0.05$, compared with group H, $*P < 0.05$; (d) IL-18 expression in the injured penumbra cortex compared with group S, $*P < 0.05$, compared with group H, $*P < 0.05$

图 3. 三组小鼠术后 24h 血清和损伤半暗带皮质中 IL-1 β 和 IL-18 表达水平。(a) 血清中 IL-1 β 表达水平的比较情况, 与 S 组比较, $*P < 0.05$, 与 H 组比较, $*P < 0.05$; (b) 损伤半暗带皮质中 IL-1 β 表达水平的比较情况, 与 S 组比较, 差异无统计学意义, 与 H 组比较, 差异无统计学意义; (c) 血清中 IL-18 表达水平的比较情况, 与 S 组比较, $*P < 0.05$, 与 H 组比较, $*P < 0.05$; (d) 损伤半暗带皮质中 IL-18 表达水平的比较情况, 与 S 组比较, $*P < 0.05$, 与 H 组比较, $*P < 0.05$



注: S 组为假手术组, T 组为创伤性脑损伤组, H 组为分子氢治疗组。

Figure 4. Long-term survival of mice in three groups. (a) The mNSS score changing trend of mice in three groups till the 7th day after surgery; (b) Body weight changes of mice in three groups till the 7th day after surgery

图 4. 3 组小鼠长期生存情况。(a) 3 组小鼠术后 1~7 d mNss 评分变化趋势; (b) 3 组小鼠术后 1~7 d 体重变化情况

4. 讨论

TBI 是我国致死、致残率较高的疾病之一, 患者常伴有神经转归差, 预后不良等改变[11]。在以往的研究中, 该疾病经典的动物模型建立方法包括自由落体冲击(weight-drop, WD)、皮层冲击损伤(controlled cortical impact, CCI)和液压冲击损伤(fluid percussion injury, FPI)等[12]。相较于前两种方法, FPI 产生的冲击压力及时间具备一定的可控性, 并且能够较好地模拟临床上 TBI 患者的神经功能障碍情况, 独特的优

势促使其成为 TBI 相关动物实验研究的一线建模方法。本次研究选取 FPI 法制备 TBI 模型,能够准确模拟 TBI 损伤特性,保证了研究动物神经转归稳定性。此外,区别于以往大量研究,本次实验选取了小鼠作为实验动物进行探索。虽然大鼠具备体积大、易于操作、存活率高等特性,是以往 TBI 相关研究的常用实验动物,但在基因及分子机制层面而言,小鼠与人类的同源性远高于大鼠,且小鼠的研究具备更好的转化特质,为保证本次研究结果能够具备临床转化优势,我们选取较为少见的 TBI 小鼠作为实验对象,同时应用改良的 FPI 法,进一步保证模型稳定。

近年来,分子氢已被证明对多种疾病具有改善作用[13],其应用方式同样具备多样性。饮用富氢生理盐水的吸收途径并不能完全发挥分子氢的优势,肌肉注射效果又较为缓慢和局限,而静脉滴注创伤性较大,为此,我们选择吸入的方式探索分子氢的效用。与此同时,鉴于分子氢明显的剂量依赖性,以及越来越多的研究发现低浓度氢气并不理想的治疗效应,故而本次研究选择吸入较高浓度的氢气进行研究[14]。本研究发现,分子氢对小鼠急性期脑水肿、远期生长情况和神经转归均具备明显改善作用,进一步证实了分子氢的神经保护效应。通过与课题组前期研究对比,我们还发现一个有趣的现象。在 TBI 大鼠层面,分子氢对体重变化的改善作用十分可观[15],这可能与其促进胃肠道功能有关;但是在小鼠层面,体重变化则相对平稳,我们分析,这可能与小鼠体重基数较小,以及中枢神经系统差异有关。相应的,TBI 小鼠的体重变化趋势似乎更加贴合临床 TBI 患者,这也进一步增加了本研究的转化优势[16]。

此外,本次研究进一步探索了分子氢的神经保护作用机制。TBI 过程伤常伴随着大量炎症因子释放[17],创伤区的炎症浸润将进一步使炎症反应级联放大,导致神经功能异常。而细胞焦亡过程是 TBI 进展过程中的重要因素,也是导致该疾病预后不良的主要原因。在外界信号的刺激下,接头蛋白 ASC 与 Caspase-1 的前体结合并将其活化,一方面直接诱导细胞破裂,胞膜穿孔,内容物释放,导致炎症反应;同时,其对 IL-1 β 和 IL-18 前体进行切割,将有活性的 IL-1 β 和 IL-18 释放到胞外,导致炎症细胞募集,扩大炎症反应。在细胞焦亡过程中,神经细胞的结构破坏和炎症因子向胞外释放,对于脑组织原发病灶和全身性炎症反应均产生明显影响。而本实验对于损伤侧半暗带皮质和血清内同时进行的经典细胞焦亡相关因子检测进一步证实了分子氢的神经保护作用与抑制细胞焦亡途径有关。

与此同时,在常规检测血清中 IL-1 β 和 IL-18 水平的同时[18],本次研究也检测了脑组织中的炎症因子水平进行对比,结果显示,同一小鼠脑组织中炎症因子的下调水平高于血清。这也是对分子氢治疗作用的靶向性进行了一次探索。相比于全身性的抗炎效应,分子氢在原发病灶的治疗效果或许更佳,这可能与分子氢作为小分子,易于通过血脑屏障有关。对于术后 24h 损伤半暗带皮质中 IL-1 β 水平差异无统计学意义的情况,可能与该取材时间点,炎症反应已由局部病灶级联放大至全身有关。与以往研究[19]不同的是,本次实验的治疗方式为长期、连续的吸入,并且将第一次吸入分子氢的时间设定为术后即刻开始,从结果上来看,神经功能和体重变化率曲线恢复的时间节点出现得更早,治疗效果更佳。这种设计既符合 TBI 临床患者多为重患的特点[20],也反映了分子氢治疗效果的时效性,早期治疗能够更好地逆转急性期改变。而本研究选择了 42% 的吸入浓度,这即对分子氢动物实验的安全性及能否安全地应用于临床提出了挑战。

而同时,本研究应用了气体浓度监测装置,在安全距离为 0.5 m 的金属防爆箱内使用闭合气体回路的条件下进行实验,保证了研究的安全性。同时,2019 年的 COVID 相关研究同样证实了高浓度(66.6% H₂-33.3% O₂)的分子氢对 COVID 及其肺损伤具有治疗作用,并已安全应用于临床[21],这也进一步为本次研究结果向临床转化提供基础。然而,本实验也具有一定的局限性,即在分组中并未设置多个浓度梯度,没有对分子氢的最佳使用浓度进行标准性优化,同时缺少了描述细胞焦亡过程更为直观的扫描电镜检测,这也是本次研究有待改进之处。

5. 总结

综上所述, 分子氢可以改善 TBI 小鼠脑水肿及神经转归, 其机制可能与抑制细胞焦亡与全身炎症相关。

参考文献

- [1] Miles, S.R., Silva, M.A., Neumann, D., *et al.* (2021) Demographic and Mental Health Predictors of Arrests Up to 10 Years Post-Traumatic Brain Injury: A Veterans Affairs TBI Model Systems Study. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation*, **36**, E240-E248. <https://doi.org/10.1097/HTR.0000000000000640>
- [2] Mathieu, F., Zeiler, F.A., Ercole, A., *et al.* (2020) Relationship between Measures of Cerebrovascular Reactivity and Intracranial Lesion Progression in Acute TBI Patients: A CENTER-TBI Study. *Journal of Neurotrauma*, **37**, 1556-1565. <https://doi.org/10.1089/neu.2019.6814>
- [3] Kesavardhana, S., Malireddi, R. and Kanneganti, T.D. (2020) Caspases in Cell Death, Inflammation, and Gasdermin-Induced Pyroptosis. *Annual Review of Immunology*, **38**, 567-595. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-073119-095439>
- [4] Zhao, W., Yang, H., Lyu, L., *et al.* (2020) GSDMD, an Executor of Pyroptosis, Is Involved in IL-1 β Secretion in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *Experimental Eye Research*, **202**, Article ID: 108375. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108375>
- [5] Kimura, A., Suehiro, P.K., Mukai, P.A., *et al.* (2021) Protective Effects of Hydrogen Gas against Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2021.04.077>
- [6] Hca, B., Bda, B., Yuan, S., *et al.* (2021) Hydrogen Alleviated Neuronal Injury and Neuroinflammation Induced by Microglial Activation via the Nrf2 Pathway in Sepsis-Associated Encephalopathy. *Neuroscience*, **466**, 87-100. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.05.003>
- [7] Li, T.T., Yang, W.C., Wang, Y.Z., *et al.* (2020) Effects of a High Concentration of Hydrogen on Neurological Function after Traumatic Brain Injury in Diabetic Rats. *Brain Research*, **1730**, Article ID: 146651. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146651>
- [8] Muthuraju, S., Islam, M.R., Pati, S., *et al.* (2015) Normobaric Hyperoxia Treatment Prevents Early Alteration in Dopamine Level in Mice Striatum after Fluid Percussion Injury: A Biochemical Approach. *International Journal of Neuroscience*, **125**, 686-692. <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.961065>
- [9] Chen, X., Cui, J., Zhai, X., *et al.* (2018) Inhalation of Hydrogen of Different Concentrations Ameliorates Spinal Cord Injury in Mice by Protecting Spinal Cord Neurons from Apoptosis, Oxidative Injury and Mitochondrial Structure Damages. *Cellular Physiology & Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology*, **47**, 176-190. <https://doi.org/10.1159/000489764>
- [10] Turner, R.C., Dipasquale, K., Logsdon, A.F., *et al.* (2016) The Role for Infarct Volume as a Surrogate Measure of Functional Outcome Following Ischemic Stroke. *Journal of Systems & Integrative Neuroscience*, **2**, 203-209. <https://doi.org/10.15761/JSIN.1000136>
- [11] Jiang, J.Y., Gao, G.Y., Feng, J.F., *et al.* (2019) Traumatic Brain Injury in China. *The Lancet Neurology*, **18**, 286-295. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30469-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30469-1)
- [12] 赵清辉, 琚芳迪, 苏泽华, 等. 创伤性脑损伤模型研究进展[J]. 生物技术进展, 2019, 9(1): 6-12.
- [13] Liu, L., Yang, C., Qiu, T., *et al.* (2021) Hydrogen Alleviates Acute Lung Injury Induced by Limb Ischemia/Reperfusion in Mice. *Life Sciences*, **279**, Article ID: 119659. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119659>
- [14] 王跃振, 李庭庭, 曹红玲, 等. 吸入高浓度氢气对大鼠创伤性脑损伤的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2019, 35(10): 1011-1015.
- [15] Nca, B., Rh, B., Ag, B., *et al.* (2020) TBI Weight-Drop Model with Variable Impact Heights Differentially Perturbs Hippocampus-Cerebellum Specific Transcriptomic Profile. *Experimental Neurology*, **335**, Article ID: 113516. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113516>
- [16] Xiong, Y., Mahmood, A. and Chopp, M. (2010) Emerging Treatments for Traumatic Brain Injury. *Discovery Medicine*, **10**, 434-442.
- [17] Cheng, S., Zhang, Y., Chen, S., *et al.* (2020) LncRNA HOTAIR Participates in Microglia Activation and Inflammatory Factor Release by Regulating the Ubiquitination of MYD88 in Traumatic Brain Injury. *Journal of Molecular Neuroscience*, **71**, 169-177. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01623-7>
- [18] 万强, 李庭庭, 肖媛, 等. 吸入高浓度氢气对大鼠脑缺血-再灌注损伤的影响[J]. 中国脑血管病杂志, 2021, 18(5):

303-310.

- [19] Wang, Y.Z., Li, T.T., Cao, H.L., *et al.* (2019) Recent Advances in the Neuroprotective Effects of Medical Gases. *Medical Gas Research*, **9**, 80-87. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.260649>
- [20] Díaz, C.R., Mayoral, P.C., Huerta, M., *et al.* (2021) The Influence of Hydrogen Ions on Coagulation in Traumatic Brain Injury, Explored by Molecular Dynamics. *Brain Injury*, **35**, 842-849. <https://doi.org/10.1080/02699052.2021.1895312>
- [21] Guan, W.J., Wei, C.H., Chen, A.L., *et al.* (2020) Hydrogen/Oxygen Mixed Gas Inhalation Improves Disease Severity and Dyspnea in Patients with Coronavirus Disease 2019 in a Recent Multicenter, Open-Label Clinical Trial. *Journal of Thoracic Disease*, **12**, 3448-3452. <https://doi.org/10.21037/jtd-2020-057>