

# 脑震宁对脑震荡后综合征模型大鼠海马线粒体功能的影响

江晓智<sup>1</sup>, 赵乐<sup>1</sup>, 王钱<sup>1,2</sup>, 谭贝西<sup>1</sup>, 王超群<sup>1</sup>, 王永辉<sup>1\*</sup>

(1. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430065)

**[摘要]** 目的: 基于线粒体功能, 探究脑震宁对脑震荡后综合征模型大鼠学习记忆能力及海马CA1区神经元损伤的作用机制。方法: SPF级Wistar大鼠, 采用自由落体撞击法制备三重脑震荡后综合征模型(MCC), 将造模成功的大鼠按随机数字表法分成5组, 模型组、吡拉西坦组、脑震宁低、中、高剂量组, 另设正常组, 每组10只。吡拉西坦组及脑震宁低、中、高剂量组分别以0.43、5.4、10.8、21.6 g·kg<sup>-1</sup>的剂量灌胃给药, 正常组和模型组大鼠分别灌服等体积蒸馏水, 连续给药14 d进行相关指标检测。采用Morris水迷宫实验观察各组大鼠逃避潜伏期、原象限停留时间及穿越平台次数等学习记忆改变情况; 苏木素-伊红(HE)染色、尼氏染色观察海马CA1区病理形态学改变; 透射电子显微镜(TEM)观察线粒体超微结构; 比色法检测线粒体呼吸链复合体I活性; 荧光探针法测定腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)含量; 酶联荧光免疫技术法检测线粒体膜电位(MMP)。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期时间明显延长, 目标象限停留时间及穿越平台次数明显减少, 海马CA1区神经元和尼氏小体数量减少, 神经元形态及线粒体结构遭受破坏, 线粒体膜电位、ATP和呼吸链复合体I含量明显减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 与模型组比较, 脑震宁各剂量组大鼠逃避潜伏期明显缩短, 目标象限停留时间及穿越平台次数明显增加, 海马CA1区神经元及尼氏小体数量显著增加, 神经元形态及线粒体结构损伤有所改善, 线粒体膜电位、ATP和呼吸链复合体I含量明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 脑震宁低剂量组大鼠穿越平台次数及线粒体呼吸链复合体I差异无统计学意义。结论: 脑震宁可以改善MCC大鼠学习记忆能力, 其机制可能与改善线粒体结构与功能, 减轻海马神经元损伤有关。

**[关键词]** 脑震宁; 脑震荡后综合征; 海马; 线粒体功能; 学习记忆

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)11-0086-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220409

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20211221.1323.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-12-22 8:55

## Effect of Naozhenning on Hippocampal Mitochondrial Function in Model Rats with Post-concussion Syndrome

JIANG Xiao-zhi<sup>1</sup>, ZHAO Le<sup>1</sup>, WANG Qian<sup>1,2</sup>, TAN Bei-xi<sup>1</sup>, WANG Chao-qun<sup>1</sup>, WANG Yong-hui<sup>1\*</sup>

(1. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Naozhenning on learning and memory ability and neuron damage in hippocampal CA1 region of post-concussion syndrome model rats based on mitochondrial function. **Method:** Multiple cerebral concussion (MCC) was induced in SPF Wistar rats with the free-fall impact method. Then the model rats were randomly classified into model group (equivalent volume of distilled water), piracetam (0.43 g·kg<sup>-1</sup>, *ig*) group, and low-, medium-, and high-dose NZN (5.4, 10.8, 21.6 g·kg<sup>-1</sup>, respectively, *ig*) groups, with 10 rats in each group, and another 10 normal rats were included in the normal control group (equivalent volume of distilled water). The administration lasted 14 days and then relevant indexes were detected. Morris water maze test was used to observe the changes of learning and memory ability in each

**[收稿日期]** 2021-10-19

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(8210151374); 山西中医药大学科研启动基金项目(2021BKS03)

**[第一作者]** 江晓智, 在读硕士, 从事中药药理与方剂配伍作用研究, Tel: 0351-3179977, E-mail: 18789087082@163.com

**[通信作者]** \* 王永辉, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药药理与方剂配伍作用研究, Tel: 0351-3179977, E-mail: wyh766188@sina.com

group, such as escape latency, residence time in primary quadrant, and times of crossing platform. The pathological changes of hippocampal CA1 region were observed based on hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining. The ultrastructure of mitochondria was observed under the transmission electron microscope (TME) and the activity of mitochondrial respiratory chain complex I was detected by colorimetry. The content of adenosine triphosphate (ATP) was determined by fluorescence probe and mitochondrial membrane potential (MMP) by fluorescein enzyme-linked fluorescence immunoassay. **Result:** Compared with the normal control group, the model group showed long escape latency, short residence time in target quadrant, few times of crossing the platform, significant decrease in counts of neurons and Nissl bodies in hippocampal CA1 region, damage of neuronal morphology and mitochondrial structure, and significant reduction of MMP and the content of mitochondrial ATP and respiratory chain complex I ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The NZN groups demonstrated short escape latency, long residence time in target quadrant, increased times of crossing the platform, small number of neurons and Nissl bodies in hippocampal CA1 region, alleviated damage of neuronal morphology and mitochondrial structure, and increase in MMP and the content of mitochondrial ATP and respiratory chain complex I ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** NZN can improve the learning and memory ability of MCC rats by improving mitochondrial structure and function and alleviating hippocampal neuron injury.

**[Keywords]** Naozhenning; post-concussion syndrome; hippocampus; mitochondrial function; learning and memory

脑震荡后综合征(PCS)是以头痛、失眠和认知障碍等主观不适为主的一种疾病,其中认知障碍会引起长期功能损害和生活质量下降<sup>[1]</sup>。同时,研究证实,PCS也是血管性痴呆<sup>[2]</sup>、帕金森<sup>[3]</sup>等疾病发生的危险因素之一。目前,休息<sup>[4]</sup>、止痛<sup>[5]</sup>、营养神经<sup>[6]</sup>等对症治疗只能在一定程度上缓解PCS症状,但是,患者常伴有持久性生理、情感、认知障碍等后遗症。因此,寻找PCS后的关键靶标是改善PCS预后的研究重点。海马区是大脑中负责学习和记忆的关键区域,已有研究表明,PCS引起的海马神经元损伤是导致认知障碍的主要因素之一<sup>[7-8]</sup>。线粒体通过氧化磷酸化为细胞提供腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)以维持其正常生理功能和活动。研究显示,线粒体功能障碍是引起PCS后神经元损伤的重要环节,对疾病发展和预后起着关键作用<sup>[9]</sup>。

脑震宁于2017年入选山西省首批“省级名药”名录,全方由丹参、牡丹皮、川芎、炒酸枣仁、柏子仁、茯苓、生地黄、当归、地龙、陈皮及竹茹组成。临床上用于治疗脑外伤后综合征,对眩晕、头痛、失眠等均有较好的缓解作用<sup>[10-11]</sup>。实验研究证实,脑震宁可以减轻氧化应激、改善学习记忆能力<sup>[12]</sup>。此外,课题组前期研究发现,脑震宁能抑制细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路激活,减轻炎症反应,改善神经元脱髓鞘现象,增强神经元内尼氏体染色,对神经元损伤修复和促进再生具有良性调节作用。目前,脑震宁改善神经元损伤与学习记忆能力

是否与调节线粒体结构与功能相关尚未见报道。因此,本研究采用三重脑震荡后综合征模型(MCC),观察使用药物脑震宁后,对大鼠学习记忆能力、海马CA1区神经元形态、线粒体超微结构和线粒体功能的影响,探讨其治疗PCS的可能机制,以期为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级Wistar大鼠66只,雌雄各半,体重(180±20)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于山西省中医药大学动物房,温度(22±2)℃,湿度(50±5)%,自然昼夜节律,自由进水进食,实验由山西中医药大学实验动物伦理审查委员会审查通过(编号2021DW184)。

**1.2 药物** 脑震宁由丹参、茯苓、陈皮、竹茹、酸枣仁、柏子仁、当归、生地黄、牡丹皮、川芎、地龙(安徽省灏融中药饮片有限公司,批号分别为200701、200901、201001、210102、200902、210101、210301、200201、200501、201101、200401)按15:10:10:10:10:10:8:8:6:6:6:6组成,饮片购于山西中医药大学国医堂,经山西中医药大学王永辉教授鉴定符合要求,所有药物以10倍体积纯水浸泡2h,武火煮沸后转文火继续煎煮30min,煎煮2次,滤过,合并2次滤液,浓缩至含生药质量浓度为2.16g·mL<sup>-1</sup>,4℃保存备用。取10mL浓缩药液,常规水浴浓缩、干燥、冷却后称质量,计算水提取物得率为26%。吡拉西坦

片,每片0.5 g,购自东北制药有限公司,批号6190608。

**1.3 试剂** 组织线粒体分离试剂盒、增强型线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、ATP检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号分别为C3606、C200CS、S0026);线粒体呼吸链复合体I活性检测试剂盒、2.5%戊二醛溶液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为BCO510、P1126);苏木素-伊红(HE)染色液、尼氏染色液(北京雷根生物科技有限公司,批号分别为DH006、DK0021);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号00050807)。

**1.4 仪器** R540IE型呼吸麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);WMT-100型Morris水迷宫视频跟踪系统(成都泰盟科技有限公司);TU-1901型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);SpectraMax i3X型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);TKY-BMB型包埋专用冷台(湖北泰康医疗设备有限公司);HM325型旋转石蜡切片机(美国Thermo公司);KDC-OHR型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科技仪器有限公司);BX53型三目摄像显微镜(日本Olympus公司);HT7700型透射电子显微镜(日本Hitachi公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、造模及给药** 大鼠适应性饲养1周后,通过Morris水迷宫逃避潜伏期筛选动物,剔除6只后,按照随机数字表法分为正常组10只、模型组50只。模型组大鼠按照MYCHASIUK等<sup>[13]</sup>提出的自由落体撞击法造模,1次/d,持续3 d(砝码质量:150 g,高度:1 m,击打部位:双耳前缘与眼后缘的正中连线),正常组予除砝码打击以外其他刺激,造模结束后参照行为学测试<sup>[14]</sup>分析,确定造模成功。将MCC大鼠按随机数字表法分成5组,分别为模型组、吡拉西坦组、脑震宁低、中、高剂量组,每组10只。依据体表面积换算法将标准体质量60 kg成人每日所需药量换算成大鼠每日所需药量,得脑震宁低、中、高剂量组每日生药含量依次是5.4 g·kg<sup>-1</sup>(0.5倍等效剂量)、10.8 g·kg<sup>-1</sup>(1倍等效剂量)、21.6 g·kg<sup>-1</sup>(2倍等效剂量),吡拉西坦组给药浓度为0.43 g·kg<sup>-1</sup>。给药体积10 mL·kg<sup>-1</sup>,正常组和模型组大鼠分别灌服等体积蒸馏水,每日1次,连续给药14 d。

**2.2 Morris水迷宫行为学实验** 大鼠在造模结束后进行连续6 d Morris水迷宫测试,以评估大鼠空间学习记忆功能。1~5 d进行定位航行实验,记录大

鼠找到平台所需要的时间,第6天进行空间探索实验,记录大鼠穿越平台次数及目标平台象限停留时间。

**2.3 脑组织样品处理** Morris水迷宫测试结束后,大鼠禁食12 h,于次日1%戊巴比妥钠(40 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔麻醉,快速取出脑组织,每组取6只大鼠的左脑置于4%多聚甲醛溶液中,右脑置于冰上,分离海马组织后,精密称量,用于相关指标检测。每组取4只大鼠的左脑海马组织置于2.5%戊二醛溶液中,4℃环境存放;右脑海马组织放入离心管中,-80℃环境存放。

**2.4 HE和尼氏染色观察海马病理形态学改变** 脑组织常规固定、脱水、透明及包埋,冠状面切片,切至海马组织层,切片厚2~4 μm,分别行HE染色和甲苯胺蓝染色。通过三目摄像显微镜摄像系统采集切片图像,每张切片选取5个400倍海马CA1区视野图片,采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件,计数整个视野内细胞膜完整、核仁清晰的神经元细胞数,同时,测量神经元细胞内尼氏体面积,用尼氏体的面积代表尼氏体的数量<sup>[15]</sup>。然后取均数,比较各组大鼠海马CA1区神经元损伤程度。

**2.5 透射电镜(TEM)观察海马组织线粒体超微结构** 从2.5%戊二醛溶液中取出海马组织,用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,常规脱水、包埋及切片后,分别行饱和醋酸铀和枸橼酸铅染色,透射电镜观察。

**2.6 荧光酶标技术检测大鼠海马组织线粒体膜电位(MMP)** 利用组织线粒体分离试剂盒得到纯化线粒体,按照试剂盒说明书操作进行检测,以红/绿荧光比值表示MMP水平。依据每5 μL JC-1(200×)加入JC-1染色缓冲液1 mL的比例配置JC-1染色工作液,JC-1染色工作液中加入纯化线粒体。检测JC-1单体,激发波长490 nm,发射波长530 nm,产生绿色荧光;检测JC-1聚合物,激发波长525 nm,发射波长590 nm,产生红色荧光。荧光酶标仪分别检测单体和聚合物的值。

**2.7 比色法测定线粒体呼吸链复合体I(Complex I)活性** 按照试剂盒说明书分离组织线粒体,通过分光光度法在340 nm下测定烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的氧化速率,从而计算出线粒体呼吸链复合体I酶活性。

**2.8 荧光探针法测定ATP含量** 切取相同大小海马组织块,称质量后放入预冷PBS溶液中清洗并剪成碎片,然后进行充分匀浆并离心,取上清,用于后续测定。按1:9的比例稀释ATP检测试剂,配置

ATP检测工作液。加ATP检测工作液100 μL到检测孔内,室温放置4 min,然后在检测孔内分别加入标准品溶液和样品20 μL,混匀间隔2 s后,用多功能酶标仪测定相对光单位(RLU)值。根据标准曲线计算出样品中ATP的浓度。

**2.9 统计学分析** 采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行正态性检验和方差齐性检验,方差齐时采用单因素方差分析,方差不齐采用Tamhane's  $T_2$ 分析,多组间数据比较采

用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对MCC大鼠Morris水迷宫定位航行实验的影响** 与正常组比较,第2、3、4、5天模型组大鼠逃避潜伏期明显延长( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,第4、5天吡拉西坦组及脑震宁各剂量组大鼠逃避潜伏期显著缩短( $P<0.01$ )。见表1。

表1 脑震宁对MCC大鼠逃避潜伏期的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of Naozhenning on escape latency in MCC rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
正常组		55.67±2.74	32.75±6.99	17.75±0.56	17.17±2.54	9.17±0.38
模型组		59.67±0.33	48.50±3.71 <sup>1)</sup>	27.40±23.84 <sup>1)</sup>	40.17±3.76 <sup>2)</sup>	21.08±1.72 <sup>2)</sup>
吡拉西坦组	0.43	57.08±2.92	37.72±3.17	21.92±1.61	24.08±2.67 <sup>3)</sup>	11.75±2.25 <sup>3)</sup>
脑震宁低剂量组	5.4	53.00±3.61	46.42±6.12	26.67±4.04	31.17±1.98 <sup>3)</sup>	12.92±1.74 <sup>3)</sup>
脑震宁中剂量组	10.8	56.75±2.87	37.42±2.27	19.50±2.08	19.50±0.32 <sup>3)</sup>	10.17±0.31 <sup>3)</sup>
脑震宁高剂量组	21.6	54.83±2.90	42.75±3.69	25.00±3.40	28.00±1.32 <sup>3)</sup>	12.17±0.90 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.01$

**3.2 对MCC大鼠Morris水迷宫空间探索实验的影响** 与正常组比较,模型组大鼠目标象限停留时间及穿越平台次数明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,吡拉西坦组及脑震宁中、高剂量组大鼠目标象限停留时间及穿越平台次数明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),脑震宁低剂量组大鼠目标象限停留时间显著延长( $P<0.01$ ),穿越平台次数差异无统计学意义。见表2。

表2 脑震宁对MCC大鼠空间探索的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Naozhenning on space exploration in MCC rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	目标象限停留时间/s	穿越平台次数/次
正常组		34.11±0.34	4.60±0.40
模型组		24.32±0.30 <sup>2)</sup>	2.00±0.63 <sup>1)</sup>
吡拉西坦组	0.43	29.16±0.32 <sup>4)</sup>	3.40±0.25 <sup>3)</sup>
脑震宁低剂量组	5.4	27.81±0.33 <sup>4)</sup>	3.00±0.63
脑震宁中剂量组	10.8	32.43±0.36 <sup>4)</sup>	3.60±0.40 <sup>3)</sup>
脑震宁高剂量组	21.6	30.20±0.37 <sup>4)</sup>	3.40±0.40 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表4同)

**3.3 对MCC大鼠海马CA1区神经元的影响** 与正常组比较,模型组大鼠海马CA1区神经元及尼氏小体数量明显减少( $P<0.05$ ),神经元排列紊乱,细胞间

距增大,少量神经元发生变性、坏死;与模型组比较,吡拉西坦组及脑震宁各剂量组大鼠海马CA1区神经元及尼氏小体数量显著增加( $P<0.01$ ),神经元排列整齐,细胞间隙紧密。见表3、图1和图2。

表3 脑震宁对MCC大鼠海马CA1区神经元形态及数量的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

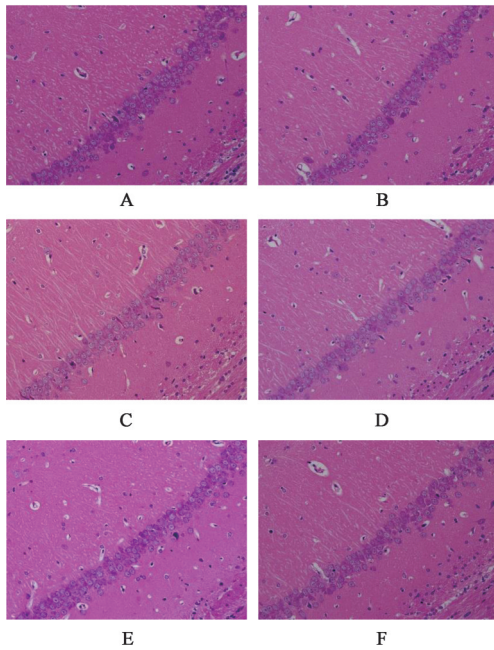
Table 3 Effect of Naozhenning on morphology and number of neurons in CA1 area of hippocampus of MCC rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ ) 个

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	神经元数目	尼氏体数量
正常组		94.00±1.02	84.00±0.77
模型组		59.80±1.36 <sup>1)</sup>	53.60±1.17 <sup>1)</sup>
吡拉西坦组	0.43	83.00±1.27 <sup>2)</sup>	68.60±1.36 <sup>2)</sup>
脑震宁低剂量组	5.4	77.20±0.72 <sup>2)</sup>	67.80±1.07 <sup>2)</sup>
脑震宁中剂量组	10.8	89.60±0.60 <sup>2)</sup>	82.20±0.97 <sup>2)</sup>
脑震宁高剂量组	21.6	84.00±0.77 <sup>2)</sup>	69.00±1.26 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$

### 3.4 对MCC大鼠海马组织线粒体超微结构的影响

正常组大鼠神经元内线粒体超微结构完整,线粒体内外膜和嵴结构清晰,未见水肿和空泡样改变;模型组大鼠神经元内线粒体数量减少,线粒体膜和嵴溶解、消失,出现肿胀,空泡样改变。吡拉西坦组及脑震宁各剂量组大鼠神经元内线粒体结构有不同程度改善,其中脑震宁中剂量组改善最明显。见图3。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 吡拉西坦组;D. 脑震宁低剂量组;E. 脑震宁中剂量组;F. 脑震宁高剂量组(图2和图3同)

图1 脑震宁对MCC大鼠海马CA1区神经元形态的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Naozhenning on neuronal morphology in CA1 area of hippocampus in MCC rats (HE, ×400)

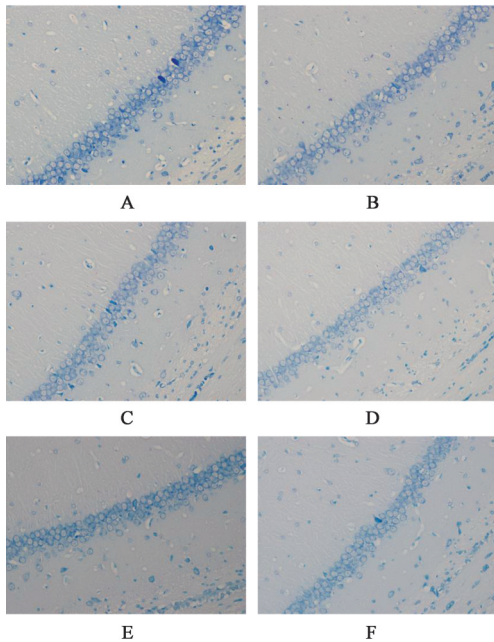


图2 脑震宁对MCC大鼠海马CA1区神经元尼氏小体的影响(Nissl, ×400)

Fig. 2 Effect of Naozhenning on neuronal nissl bodies in CA1 area of hippocampus in MCC rats (Nissl, ×400)

3.5 对MCC大鼠海马组织线粒体MMP、ATP和呼吸链复合体I含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠MMP显著降低,线粒体ATP和呼吸链复合体

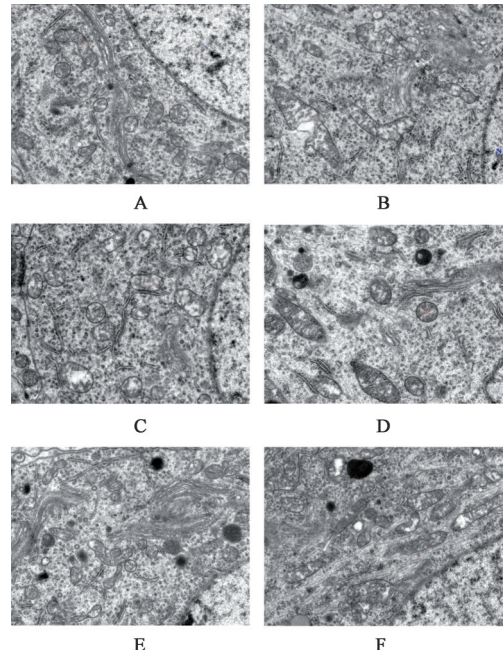


图3 脑震宁对MCC大鼠海马神经元线粒体超微结构的影响(电镜扫描, ×30 000)

Fig. 3 Effect of Naozhenning on mitochondrial ultrastructure in hippocampus neurons in MCC rats (TEM, ×30 000)

I含量明显减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与模型组比较,脑震宁各剂量组大鼠MMP、ATP和呼吸链复合体I含量明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),脑震宁低剂量组线粒体呼吸链复合体I差异无统计学意义。见表4。

#### 4 讨论

PCS因事件发生常不伴有实验室检查异常和特异性体征,易被漏诊失治,且其发病人群广泛,头痛<sup>[16]</sup>、失眠<sup>[17]</sup>、精神抑郁<sup>[18]</sup>、记忆力下降<sup>[19]</sup>等临床症状多迁延数年,反复发作,严重影响患者生活和工作。现代医学认为神经元功能失常是本病发生的最终原因,但具体作用机制尚不清晰。PCS归属于中医“头痛”“健忘”“不寐”等范畴,病机多以气滞血瘀为主,外力撞击后血瘀脉损,清窍瘀滞,日久损耗气血所致,治法为养血活血,行气通窍。本研究组方脑震宁由养血活血、化瘀通络的当归、丹参、牡丹皮、川芎、地龙,益气安神、宁心定智的炒酸枣仁、生地黄、柏子仁、茯苓,理气和胃、降逆止呕的陈皮、竹茹组成,全方共奏养血活血、化瘀通络、安神定智的功效<sup>[20]</sup>。临床研究发现,脑震宁对PCS有显著疗效<sup>[21]</sup>,但对于其分子基础和作用机制尚缺乏系统的研究。

本研究中,通过制备MCC大鼠,给予不同剂量的脑震宁,观察各组大鼠的水迷宫表现和病理形态,结果发现,与正常组比较,模型组大鼠逃避潜伏

表 4 脑震宁对 MCC 大鼠海马组织 MMP、ATP 和呼吸链复合体 I 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Naozhenning on MMP, contents of ATP and respiratory chain complex I in hippocampus of MCC rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MMP(红/绿荧光比率)/%	ATP/mol·g <sup>-1</sup>	Complex I /U·g <sup>-1</sup>
正常组		2.54±0.09	4.37±0.10	439.91±10.37
模型组		0.64±0.01 <sup>2)</sup>	3.05±0.05 <sup>1)</sup>	224.00±6.76 <sup>2)</sup>
吡拉西坦组	0.43	1.22±0.02 <sup>4)</sup>	3.90±0.01 <sup>4)</sup>	324.52±0.25 <sup>4)</sup>
脑震宁低剂量组	5.4	0.90±0.01 <sup>4)</sup>	3.46±0.20 <sup>3)</sup>	247.49±0.45
脑震宁中剂量组	10.8	2.07±0.02 <sup>4)</sup>	4.19±0.05 <sup>4)</sup>	391.93±3.10 <sup>4)</sup>
脑震宁高剂量组	21.6	1.24±0.02 <sup>4)</sup>	3.83±0.01 <sup>3)</sup>	339.90±2.30 <sup>4)</sup>

期明显延长,目标象限停留时间及穿越平台次数明显降低,海马 CA1 区神经元及尼氏小体数量显著减少,神经元排列紊乱,细胞间隙增大,少量神经元发生变性、坏死;与模型组比较,脑震宁各剂量组大鼠逃避潜伏期明显缩短,目标象限停留时间及穿越平台次数明显增加,海马 CA1 区神经元及尼氏小体数量显著增加,神经元排列整齐,细胞间隙紧密。该结果提示脑震宁对 MCC 大鼠的海马神经元损伤及学习记忆能力下降有改善作用。

线粒体广泛的分布于神经元内,通过产生 ATP,调节 Ca<sup>2+</sup>浓度及氧化还原稳态,在神经分化、神经突生长、神经递质释放等神经元生理活动过程中发挥着重要作用<sup>[22-24]</sup>。研究证实,线粒体功能紊乱可能在 PCS 引起的神经元受损和神经元变性中发挥作用<sup>[25]</sup>。在大脑中,大部分 ATP 能量用于维持跨膜离子梯度和支持神经递质循环,从而维持大脑中的电生理活动和细胞信号传导。研究证实,呼吸链复合体 I 及线粒体膜电位与线粒体合成 ATP 关系密切。呼吸链复合体 I 又称 NADH-CoQ 氧化还原酶,可以将电子从还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)传递到辅酶 Q(CoQ),同时递送四个质子至膜间隙,形成跨膜质子梯度,这些质子产生化学渗透梯度,从而形成线粒体膜电位,然后可以被 ATP 合酶(Complex V)利用,促进二磷酸腺苷(ADP)磷酸化合成 ATP,为细胞生理活动和功能发挥提供能量<sup>[26]</sup>。本研究中,较正常组而言,模型组大鼠 MMP 显著降低,线粒体呼吸链复合体 I 和 ATP 含量显著减少,同时,通过透射电镜发现,神经元内线粒体数量减少,线粒体膜和嵴溶解、消失,出现肿胀,空泡样改变。给予脑震宁干预后,与模型组比较,脑震宁各剂量组大鼠 MMP 显著升高,线粒体呼吸链复合体 I 和 ATP 含量显著增加,神经元内线粒体结构有不同程度改善,其中脑震宁中剂量组改善最明显。该结果提示,脑震宁可以提高线粒体呼吸链复

合体 I 酶活性,上调 MMP,增加 ATP 含量,改善线粒体结构。

综上所述,本研究探讨了脑震宁对 MCC 大鼠的影响及线粒体功能的作用。结果表明,脑震宁对脑震荡后综合征模型大鼠有较好的神经保护和提高学习记忆能力的作用,其机制可能与改善线粒体结构与功能有关,具体包括维持 MMP 稳态,提高线粒体呼吸链复合体 I 酶活性和 ATP 含量。在后续研究中将进一步探究涉及的相关靶点和具体通路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] DE FREITAS CARDOSO M G, FALEIRO R M, DE PAULA J J, et al. Cognitive impairment following acute mild traumatic brain injury [J]. *Frontiers in neurology*, 2019, 10: 198.
- [2] BECKER R E, KAPOGIANNIS D, GREIG N H. Does traumatic brain injury hold the key to the Alzheimer's disease puzzle? [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 431-443.
- [3] JAFARI S, ETMINAN M, AMINZADEH F, et al. Head injury and risk of Parkinson disease: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Mov Disord*, 2013, 28(9): 1222-1229.
- [4] THOMAS D G, APPS J N, HOFFMANN R G, et al. Benefits of strict rest after acute concussion: A randomized controlled trial [J]. *Pediatrics*, 2015, 135(2): 213-223.
- [5] CONIDI F X. Interventional treatment for post-traumatic headache [J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2016, 20(6): 40.
- [6] ASHBAUGH A, MCGREW C. The role of nutritional supplements in sports concussion treatment [J]. *Curr Sports Med Rep*, 2016, 15(1): 16-19.
- [7] CARLSON S W, SAATMAN K E. Central infusion of insulin-like growth factor-1 increases hippocampal neurogenesis and improves neurobehavioral function

- after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2018, 35(13):1467-1480.
- [ 8 ] SANTIAGO-CASTAÑEDA C, SEGOVIA-OROPEZA M, CONCHA L, et al. Propylparaben reduces the long-term consequences in hippocampus induced by traumatic brain injury in rats: Its implications as therapeutic strategy to prevent neurodegenerative diseases [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 82 (s1) : s215-s226.
- [ 9 ] HUBBARD W B, JOSEPH B, SPRY M, et al. Acute mitochondrial impairment underlies prolonged cellular dysfunction after repeated mild traumatic brain injuries [J]. *J Neurotrauma*, 2019, 36(8):1252-1263.
- [10] 王学建,季炜鹏. 脑震宁治疗脑外伤后头痛53例疗效观察[J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2017, 3(5):292-293.
- [11] 梁善勇,王伟伟,张华志. 脑震宁、谷维素、脑益嗪口服及耳针疗法治疗脑外伤综合征观察[J]. *中国医药导报*, 2008, 5(5):35-36.
- [12] CAO J, DUAN Y, LIU Y, et al. Metabolomics coupled with SystemsDock reveal the protective effect and the potential active components of Naozhenning granule against traumatic brain injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 246:112247.
- [13] MYCHASIUK R, FARRAN A, ANGOA-PEREZ M, et al. A novel model of mild traumatic brain injury for juvenile rats [J]. *J Vis Exp*, 2014, (94):e51820.
- [14] MYCHASIUK R, FARRAN A, ESSER M J. Assessment of an experimental rodent model of pediatric mild traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(8):749-757.
- [15] 刘芳,黑常春,孔斌,等. 卵巢移植对去势大鼠海马神经元和雌激素膜受体GPR30表达的影响[J]. *基础医学与临床*, 2015, 35(7):889-893.
- [16] LU L H, BOWLES A O, KENNEDY J E, et al. Single-item versus multiple-item headache ratings in service members seeking treatment for brain injury [J]. *Mil Med*, 2020, 185(1/2):e43-e46.
- [17] LU L H, REID M W, COOPER D B, et al. Sleep problems contribute to post-concussive symptoms in service members with a history of mild traumatic brain injury without posttraumatic stress disorder or major depressive disorder [J]. *NeuroRehabilitation*, 2019, 44(4):511-521.
- [18] HO R A, HALL G B, NOSEWORTHY M D, et al. Post-concussive depression: Evaluating depressive symptoms following concussion in adolescents and its effects on executive function [J]. *Brain Inj*, 2020, 34(4):520-527.
- [19] OLDENBURG C, LUNDIN A, EDMAN G, et al. Cognitive reserve and persistent post-concussion symptoms-A prospective mild traumatic brain injury (mTBI) cohort study [J]. *Brain Inj*, 2016, 30(2):146-155.
- [20] 张华志,刘豪,盛永富. 脑震宁、脑益嗪、谷维素结合治疗脑外伤后综合征568例[J]. *中华创伤杂志*, 1998, 14(1):55.
- [21] 范建新,刘艳之,刘海霞,等. 脑震宁颗粒治疗脑外伤综合征的Meta分析[J]. *山西中医药大学学报*, 2020, 21(3):157-160.
- [22] CHENG A, HOU Y, MATTSON M P. Mitochondria and neuroplasticity [J]. *ASN Neuro*, 2010, 2(5):e00045.
- [23] 王春玲,罗宁,蒋媛静,等. 基于CaMkk $\beta$ /AMPK通路介导线粒体自噬探讨敛肝熄风止颤方的神经保护机制[J]. *世界中医药*, 2021, 16(5):765-768, 774.
- [24] 魏桂林,何青青,金强,等. 线粒体损伤介导的药源性脏器损伤评价模型研究进展[J]. *世界中医药*, 2020, 15(23):3523-3535.
- [25] BARKHOUDARIAN G, HOVDA D A, GIZA C C. The molecular pathophysiology of concussive brain injury [J]. *Clin Sports Med*, 2011, 30(1):33-48.
- [26] YONUTAS H M, VEKARIA H J, SULLIVAN P G. Mitochondrial specific therapeutic targets following brain injury [J]. *Brain Res*, 2016, 1640(Pt A):77-93.

[责任编辑 周冰冰]