

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.23.009
文章编号: 1005-8982 (2022) 23-0045-08

实验研究·论著

L-乳酸对创伤性颅脑损伤后缺氧诱导因子-1 α 和突触可塑性相关蛋白的影响*

赵博¹, 张振¹, 李金英²

(1. 大连市中心医院 麻醉科, 辽宁 大连 116023; 2. 烟台毓璜顶医院 麻醉科, 山东 烟台 264000)

摘要: 目的 探讨L-乳酸对创伤性颅脑损伤后缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和突触可塑性相关蛋白——突触后密度蛋白95(PSD-95)和生长相关蛋白43(GAP-43)表达的影响。**方法** 健康成年雄性SD大鼠27只, 采用随机数字表法将其分为假手术组(Sham组)、创伤性颅脑损伤组(颅脑损伤组)和创伤性颅脑损伤+L-乳酸组(颅脑损伤+Lac组), 每组9只。神经细胞株PC12细胞系分为对照组、细胞模型组(MSC组)和细胞模型+L-乳酸组(MSC+Lac组)。采用改良的Fenney's自由落体打击模型复制中度创伤性脑损伤模型和机械划痕细胞模型。于颅脑损伤后7 d时检测改良神经功能评分(mNSS), 采用Western blotting法检测大鼠损伤侧皮层、海马和PC12细胞HIF-1 α 、PSD-95和GAP-43蛋白的相对表达量, qRT-PCR检测大鼠损伤侧皮层HIF-1 α mRNA相对表达量, 免疫荧光染色法检测大鼠损伤侧皮层和海马PSD-95的表达。**结果** 3组大鼠mNSS评分比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与Sham组比较, 颅脑损伤组mNSS评分升高($P < 0.01$), 与颅脑损伤组比较, 颅脑损伤+Lac组mNSS评分降低($P < 0.01$)。与Sham组比较, 颅脑损伤组的HIF-1 α 蛋白、mRNA相对表达量和PSD-95、GAP-43蛋白相对表达量降低($P < 0.05$); 与颅脑损伤组比较, 颅脑损伤+Lac组HIF-1 α 蛋白、mRNA相对表达量和PSD-95、GAP-43蛋白相对表达量增加($P < 0.05$)。与Sham组比较, 颅脑损伤组大鼠损伤侧皮层和海马PSD-95蛋白免疫荧光强度降低($P < 0.05$), 与颅脑损伤组比较, 颅脑损伤+Lac组大鼠损伤侧皮层和海马PSD-95蛋白免疫荧光强度增强($P < 0.05$)。与对照组比较, MSC组细胞的HIF-1 α 、PSD-95、GAP-43蛋白相对表达量降低($P < 0.05$); 与MSC组比较, MSC+Lac组细胞的HIF-1 α 、PSD-95、GAP-43蛋白相对表达量增加($P < 0.05$)。**结论** L-乳酸可以减轻颅脑损伤大鼠的脑损伤程度, 其机制可能与上调HIF-1 α 表达进而促进PSD-95和GAP-43表达有关。

关键词: 创伤性颅脑损伤; L-乳酸; 缺氧诱导因子-1 α ; 突触可塑性相关蛋白
中图分类号: R651.15 **文献标识码:** A

Effects of L-lactate on HIF-1 α and synaptic plasticity related proteins expression for traumatic brain injury*

Bo Zhao¹, Zhen Zhang¹, Jin-ying Li²

(1. Department of Anesthesiology, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian, Liaoning 116023, China;
2. Department of Anesthesiology, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai, Shandong 264000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of L-lactate on HIF-1 α and synaptic plasticity related proteins, postsynaptic density-95 (PSD-95) and growth-associated protein-43 (GAP-43), in TBI. **Methods** Twenty seven healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups, including sham operation

收稿日期: 2022-07-13

* 基金项目: 辽宁省2021年度科学研究经费项目(No: LJKZ0865)

[通信作者] 李金英, E-mail: jyljying@163.com

group (Sham group), traumatic brain injury (TBI group), and traumatic brain injury + L-lactate group (TBI + Lac group), 9 cases in each group. The cell experiment was divided into control group (Control group), mechanical scratch cell model group (MSC group), and L-lactate treated mechanical scratch cell group (MSC + Lac group). Feeney's free falling method was used to establish moderate traumatic brain injury model, and mechanical scratch model were performed to mimic traumatic cell injury in vitro. The modified neurological score (mNSS) was performed at 7 days after TBI. HIF-1 α , PSD-95, and GAP-43 expressions were detected by western blotting in the ipsilateral cortex, hippocampus, and PC12 cells. The HIF-1 α mRNA expression of the ipsilateral cortex was measured by RT-PCR. The fluorescence intensity of PSD-95 protein was detected by immunofluorescence staining in the ipsilateral cortex and hippocampal CA1 region. **Results** Compared with Sham group, the mNSS scores were increased in TBI group. Meanwhile, the expression of HIF-1 α , PSD-95, and GAP-43 were also decreased in TBI group. Moreover, the fluorescence intensity of PSD-95 immunoreactivity in the ipsilateral cortex and hippocampal CA1 region was decreased in the TBI group. However, the behaviors of TBI rats were improved, the expression of HIF-1 α and synaptic plasticity related proteins were increased, and the fluorescence intensity of PSD-95 immunoreactivity was also increased in the TBI + Lac group. The expression of HIF-1, PSD-95, and GAP-43 protein were decreased significantly in MSC group compared with that of control group, while they were increased in MSC + Lac group. **Conclusion** The mechanism of L-lactate alleviating traumatic brain injury may be related to up-regulated HIF-1 α expression and promoting the expression of PSD-95 and GAP-43.

Keywords: brain injuries, traumatic; L-lactate; hypoxia-inducible factor 1 alpha; synaptic plasticity related proteins

创伤性颅脑损伤可引起脑缺氧缺血^[1-2],脑血流不足和缺氧导致葡萄糖能量代谢异常,使轴突完整性和突触可塑性受损^[3-5]。在脑缺血和缺氧期间,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)的表达上调,可增加脑组织对缺氧的耐受性^[6]。乳酸是糖酵解的产物,作为脑的能量底物参与线粒体呼吸。有研究证明L-乳酸参与神经细胞的能量代谢过程,在脑内L-乳酸可以由星形胶质细胞释放,并且在大脑能量需求增加时作为重要的能源供应给邻近的神经元,使神经元可以利用乳酸产生三磷酸腺苷^[7-9]。另外,除了来源于星形胶质细胞的乳酸参与大脑的代谢,血浆中的乳酸也可能起着重要的作用^[10-11]。颅脑损伤后脑内乳酸浓度显著升高,增加的乳酸既可以作为大脑能量来源,也可以作为信号分子,改善创伤性颅脑损伤大鼠的神经功能^[6,12-14]。有研究^[13,15]表明,中至重度脑损伤患者静脉输注高渗乳酸钠可以改善颅脑损伤后的能量代谢。然而,HIF-1 α 和突触可塑性相关蛋白是否参与L-乳酸对创伤性脑损伤的神经保护作用尚不清楚。本研究旨在探讨L-乳酸对颅脑损伤后HIF-1 α 及突触可塑性相关蛋白——突触后密度蛋白95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95)和生长相关蛋白43 (growth associated protein-43, GAP-43)表达的影响,阐明L-乳酸对颅脑损伤的神经保护作用机

制,为颅脑损伤的治疗提供新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞

健康成年雄性SD大鼠27只,体重250~300g,由大连医科大学实验动物中心提供(动物生产许可证号SCXK:[辽]2004-0017,动物实验许可证号SYXK:[辽]2004-0029)。大鼠在SPF环境中饲养,室温(22 \pm 1) $^{\circ}$ C,24h昼夜循环光照,自由进食水。神经细胞株PC12细胞系(江苏凯基生物技术股份有限公司)来源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤,培养于37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳孵育箱中,使用10% FBS的完全高糖DMEM培养基。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 L-乳酸(批号:30108518,国药集团化学试剂有限公司),TRzol、TransScript Top Green qPCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司),全蛋白提取试剂盒KGP250/KGP2100、BCA蛋白含量检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司),兔抗鼠HIF-1 α (1:500)、兔抗鼠PSD-95(1:1000)、兔抗鼠GAP-43(1:1000)(北京博奥森生物技术有限公司),小鼠抗鼠GAPDH抗体(1:5000)、Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG(1:100)(武汉三鹰生物技术有限公司),DAPI(上海碧

云天生物技术有限公司)。

1.2.2 主要仪器 自由落体打击器(北京众实迪创科技发展有限公司),冷冻切片机 LEICA-CM1850、电子显微镜(美国 Leica 公司),超净工作台(北京哈尔仪器制造有限公司),二氧化碳孵育箱(美国 Thermo 公司),基因扩增仪 ETC811(东胜创新生物科技有限公司),实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型复制及给药 采用随机数字表法将实验大鼠分为 3 组:假手术组(Sham 组)、创伤性颅脑损伤组(颅脑损伤组)和颅脑损伤+L-乳酸组(颅脑损伤+Lac 组),每组 9 只。采用 Fenney's 自由落体打击模型^[14, 16]复制大鼠中度创伤性颅脑损伤模型。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 400 mg/kg 麻醉后,固定于立体定向框架内。在无菌条件下,用牙科钻于左侧顶骨行开颅术(后颅 3.5 mm,侧颅 2.5 mm,直径 5 mm),避免损伤硬脑膜。将一根直径为 4.5 mm、端部扁平的钢棒(20 g)从 25 cm 的高处落在硬脑膜上的活塞上,将脑组织压缩到大约 2 mm 的深度,立即更换骨瓣并封闭,缝合头皮。Sham 组大鼠在相同位置行开颅术,但不撞击。颅脑损伤大鼠模型通过可见的肢体痉挛、短暂性呼吸暂停和无意识来验证是否复制成功^[17]。待模型大鼠清醒后,采用改良大鼠神经功能缺损评分(mNSS)^[18]从运动试验、感觉试验、反射丧失和不正常运动及癫痫、肌阵挛、肌张力障碍 4 个方面进行评分,并确保模型大鼠颅脑损伤程度为中度损伤。参照前期研究^[9],颅脑损伤+Lac 组于颅脑损伤后腹腔注射 L-乳酸 500 mg/kg,1 次/d,连续 7 d; Sham 组和颅脑损伤组腹腔注射等容量生理盐水,1 次/d,连续 7 d。

1.3.2 细胞模型制备及给药 实验细胞分为对照组、机械划痕细胞模型组(MSC 组)和机械划痕细胞+L-乳酸组(MSC+Lac 组)。参照文献[19]制备中等机械划痕细胞模型。PC12 细胞接种于 6 孔板上,两孔为一组。在超净工作台内, MSC 组和 MSC+Lac 组直视下用 200 μ L 黄色移液管进行纵横切割损伤细胞,使损伤程度和范围基本保持一致;参照文献[19]进行预实验(时间梯度实验和浓度梯度实验),确定 MSC+Lac 组 L-乳酸浓度 20 mmol/L 为最佳治疗浓度,处理时间 20 min 为最佳治疗时间。对

照组细胞不做切割损伤。对照组和 MSC 组给予相同剂量的 0.9% 无菌生理盐水。

1.3.3 大鼠行为学观察及评分 7 d 后,采用 mNSS 评分^[18]评估各组大鼠神经功能缺损恢复程度。

1.3.4 Western blotting 检测大鼠损伤侧皮层、海马中 HIF-1 α 、PSD-95 和 GAP-43 蛋白的相对表达量 行为学观察结束后,每组随机取 3 只大鼠麻醉后断头处死,取其损伤侧皮层及海马组织。将各组脑组织裂解提取总蛋白,用 BCA 标准蛋白定量法测定蛋白浓度,置入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存备用。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜。使用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,洗膜后分别加入兔抗鼠 HIF-1 α (1:500)、兔抗鼠 PSD-95(1:1 000)、GAP-43(1:1 000)及小鼠抗鼠 GAPDH 抗体(1:5 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。然后,加入山羊抗兔或山羊抗鼠 IgG 二抗(1:10 000),室温孵育 2 h。洗膜后进行化学发光显影,使用 Image J 软件分析各条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值反映目的蛋白的相对表达量。

1.3.5 Western blotting 检测 PC12 细胞中 HIF-1 α 、PSD-95 和 GAP-43 蛋白的相对表达量 将各组细胞裂解提取总蛋白,用 BCA 标准蛋白定量法测定蛋白浓度,置入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存备用。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜。使用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,洗膜后分别加入兔抗鼠 HIF-1 α (1:500)、兔抗鼠 PSD-95(1:1 000)、GAP-43(1:1 000)及小鼠抗鼠 GAPDH 抗体(1:5 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。然后,加入山羊抗兔或山羊抗鼠 IgG 二抗(1:10 000),室温孵育 2 h。洗膜后进行化学发光显影,使用 Image J 软件分析各条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值反映目的蛋白的相对表达量。

1.3.6 qRT-PCR 检测损伤侧皮层 HIF-1 α mRNA 相对表达量 行为学观察结束后,每组随机取 3 只大鼠麻醉后断头处死,取损伤侧皮层组织。用 TRIZol 试剂提取总 RNA,测定 RNA 纯度和浓度。总 RNA 用 TranScript Top Green qPCR Kit 逆转录成 cDNA,合成的 cDNA 立即用于定量 PCR。HIF-1 α 正向引物:5'-TCTAGTGAACAGGATGGAATGGAG-3',长度 24 bp;反向引物:5'-TCGTAAGTGGTCAGCTGTGGTAA-3',长度:23 bp。GAPDH 正向引物:5'-ATGCCGCCTGGAGAAACC-3',长度 18 bp;反向引物:

5'-GCATCAAAGGTGGAAGAATGG-3', 长度: 21 bp。扩增条件: 第一步 94℃ 30 s; 第二步 94℃ 5 s、55℃ 15 s、72℃ 10 s, 40 个循环; 第三步添加熔解曲线, 进行 qRT-PCR, 得到 Ct 值。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算大鼠损伤侧皮层 HIF-1 α mRNA 的相对表达量。

1.3.7 免疫荧光染色检测大鼠损伤侧皮质和海马 PSD-95 的荧光强度 行为学观察结束后, 每组随机取 3 只大鼠麻醉后, 4% 多聚甲醛经心脏灌注, 断头取脑, 4% 多聚甲醛固定, 蔗糖梯度脱水, 浓度依次是 10%、20%、30%、30%, 使用 OCT 包埋剂将脱水完全的脑组织放入 -80℃ 冰箱保存备用。使用冷冻切片机将包埋好的脑组织切成 10 μ m 厚的切片, 放入 -80℃ 冰箱保存备用。将冷冻组织切片取出, 37℃ 烘箱烘片后, 使用 4% 多聚甲醛固定, 使用 0.2% Triton X-100 通透, 滴加 3% BSA-PBS 封闭。敷一抗, 兔抗 PSD-95 (1: 100), 敷二抗, Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (1: 100)。细胞核使用 DAPI 染色, 荧光显微镜下观察。Image J 软件分析损伤侧皮质和海马 CA1 区 PSD-95 的平均光密度值 (靶蛋白的光密度值/受试大脑区域的总面积), 统计 PSD-95 荧光强度。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠 mNSS 评分的比较

Sham 组 mNSS 评分为 (0.67 \pm 0.71), 颅脑损伤组 mNSS 评分为 (8.00 \pm 1.58), 颅脑损伤+Lac 组 mNSS 评分为 (4.89 \pm 0.78)。3 组大鼠 mNSS 评分比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, 与 Sham 组比较, 颅脑损伤组 mNSS 评分升高 ($P < 0.01$), 与颅脑损伤组比较, 颅脑损伤+Lac 组 mNSS 评分降低 ($P < 0.01$)。

2.2 3 组大鼠损伤侧皮层、海马中 HIF-1 α 蛋白、mRNA 相对表达量比较

3 组大鼠损伤侧皮层、海马中 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计

学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, 与 Sham 组比较, 颅脑损伤组损伤侧皮层、海马中 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$); 与颅脑损伤组比较, 颅脑损伤+Lac 组损伤侧皮层、海马中 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 相对表达量增加 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 1。

2.3 3 组细胞中 HIF-1 α 蛋白相对表达量比较

3 组细胞中 HIF-1 α 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, 与对照组比较, MSC 组 HIF-1 α 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$); 与 MSC 组比较, MSC+Lac 组 HIF-1 α 蛋白相对表达量增加 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 2。

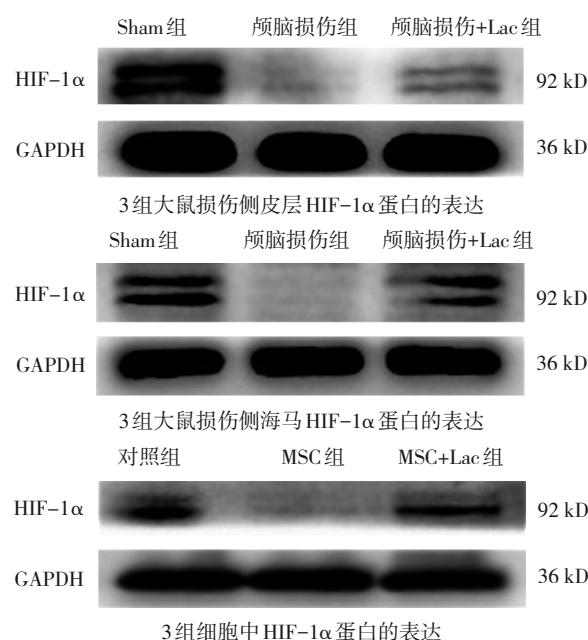


图 1 HIF-1 α 蛋白表达

表 1 3 组大鼠损伤侧皮层、海马中 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 表达比较 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α 蛋白		HIF-1 α mRNA
	皮层	海马	皮层
Sham 组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
颅脑损伤组	0.61 \pm 0.14 ^①	0.45 \pm 0.01 ^①	0.74 \pm 0.15 ^①
颅脑损伤+Lac 组	1.90 \pm 0.23 ^②	1.52 \pm 0.23 ^②	1.06 \pm 0.08 ^②
F 值	57.060	48.380	8.896
P 值	0.000	0.000	0.016

注: ①与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ②与颅脑损伤组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 3 组细胞中 HIF-1 α 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α 蛋白
对照组	1.00 \pm 0.00
MSC 组	0.62 \pm 0.08 ^①
MSC+Lac 组	0.91 \pm 0.17 ^②
F 值	15.493
P 值	0.004

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 MSC 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 3 组大鼠突触可塑性相关蛋白相对表达量和免疫荧光强度比较

3 组大鼠损伤侧皮层、海马中 PSD-95 和 GAP-43 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 与 Sham 组比较, 颅脑损伤组 PSD-95 和 GAP-43 蛋白相对表达量明显降低 ($P < 0.01$); 与颅脑损伤组比较, 颅脑损伤+Lac 组 PSD95 和 GAP43 蛋白相对表达量增加 ($P < 0.05$)。见图 2、3 和表 3。

3 组大鼠损伤侧皮层和海马中 CA1 区 PSD-95

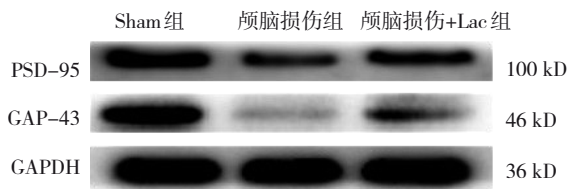


图 2 3 组大鼠损伤侧皮层中 PSD-95 和 GAP-43 蛋白的表达

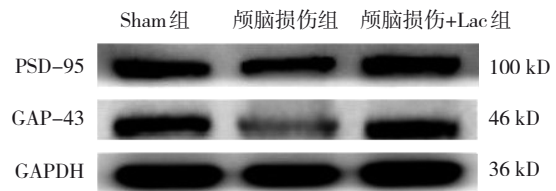


图 3 3 组大鼠损伤侧海马中 PSD-95 和 GAP-43 蛋白的表达

表 3 3 组大鼠损伤侧皮层、海马中 PSD95 和 GAP43 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

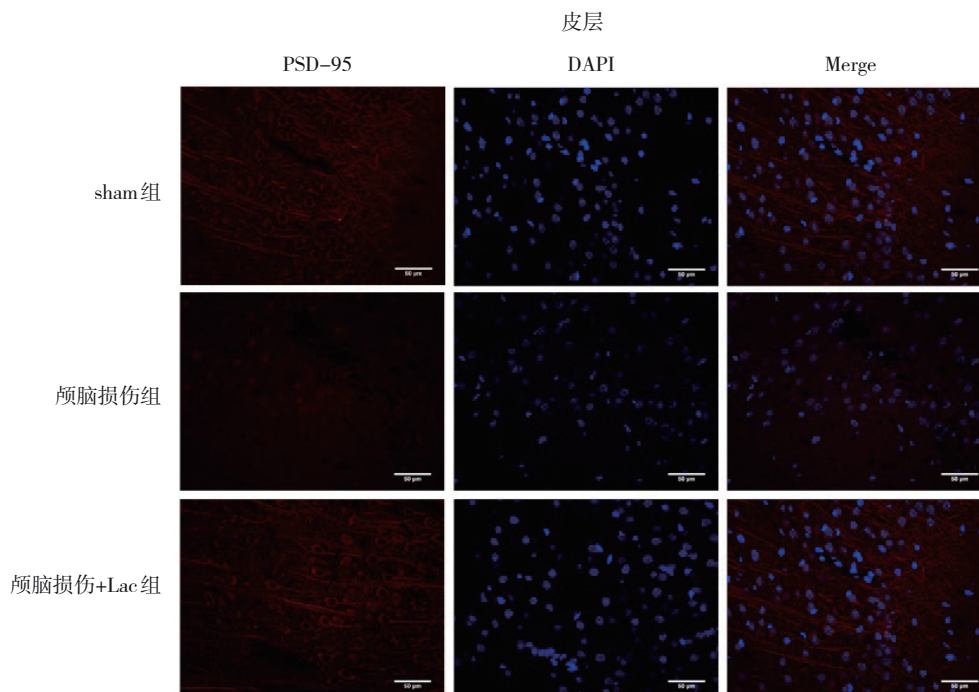
组别	PSD-95 蛋白		GAP-43 蛋白	
	皮层	海马	皮层	海马
Sham 组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
颅脑损伤组	0.69 \pm 0.16 ^①	0.78 \pm 0.04 ^①	0.43 \pm 0.21 ^①	0.81 \pm 0.07 ^①
颅脑损伤+Lac 组	1.58 \pm 0.39 ^②	0.99 \pm 0.12 ^②	1.45 \pm 0.06 ^②	1.67 \pm 0.09 ^②
F 值	5.641	8.759	47.829	130.683
P 值	0.042	0.017	0.000	0.000

注: ①与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ②与颅脑损伤组比较, $P < 0.05$ 。

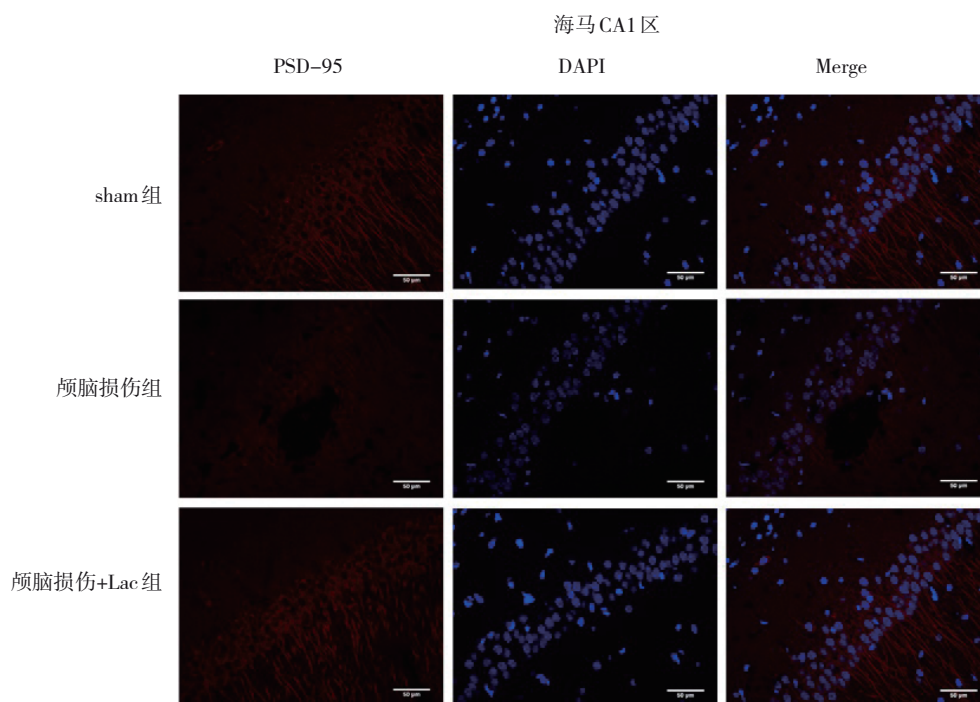
荧光强度比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 与 Sham 组比较, 颅脑损伤组 PSD-95 荧光强度降低 ($P < 0.05$); 与颅脑损伤组比较, 颅脑损伤+ Lac 组 PSD-95 荧光强度增强 ($P < 0.05$)。见图 4 和表 4。

2.5 3 组细胞突触可塑性相关蛋白相对表达量比较

3 组细胞的 PSD95 和 GAP43 蛋白相对表达量比



3 组大鼠损伤侧皮层 PSD-95 免疫荧光染色图



3组大鼠损伤侧海马CA1区PSD-95免疫荧光染色图

图4 PSD-95免疫荧光图 (×200)

表 4 3组大鼠损伤侧皮层、海马中PSD-95荧光强度比较 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	皮层	海马(CA1)
Sham组	20.51 ± 0.46	11.33 ± 2.43
颅脑损伤组	6.55 ± 1.07 ^①	6.84 ± 1.02 ^①
颅脑损伤+Lac组	21.84 ± 0.81 ^②	18.34 ± 1.46 ^②
F值	322.458	33.383
P值	0.000	0.001

注：①与Sham组比较, P<0.05; ②与颅脑损伤组比较, P<0.05。

较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (P<0.05)。进一步两两比较, 与对照组比较, MSC组 PSD95和 GAP43 蛋白相对表达量降低 (P<0.05), 与 MSC组比较, MSC+Lac组 PSD-95 和 GAP-43 蛋白相对表达量增加 (P<0.05)。见图 5 和表 5。

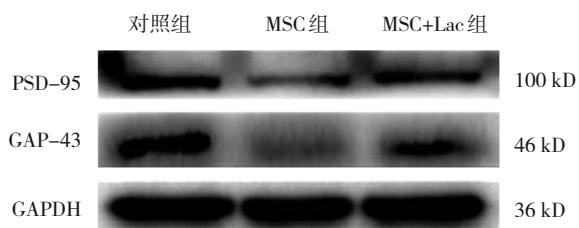


图5 3组细胞中PSD-95和GAP-43蛋白的表达

表 5 3组细胞的PSD95和GAP43蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PSD-95	GAP-43
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
MSC组	0.59 ± 0.16 ^①	0.49 ± 0.31 ^①
MSC+Lac组	0.89 ± 0.06 ^②	1.72 ± 0.45 ^②
F值	13.881	11.307
P值	0.006	0.000

注：①与对照组比较, P<0.05; ②与MSC组比较, P<0.05。

3 讨论

Fenney's 自由落体打击模型是通过去颅骨手术, 将打击力量作用于完整的硬脑膜引起皮质局灶性脑损伤^[16,20]。这些损伤是在几个小时内直接由挫伤皮层处发生的损伤和坏死腔引起的^[16]。本研究采用 mNSS 评分评估大鼠神经功能缺损情况, 确保模型大鼠损伤程度为中度损伤。本研究结果表明, 与 Sham 组比较, 颅脑损伤组大鼠的 mNSS 评分增高, 提示颅脑损伤动物模型复制成功。在前期实验^[14]中给予乳酸预适应后能改善颅脑损伤大鼠的神经功能, 故本研究参照前期实验的大鼠给药剂量和方法, 选用乳酸持续治疗 7 d, 进一步验证在颅脑损伤后持续 L-乳酸治疗的效果及机制。

本研究制备机械划痕细胞模型, 能有效地模仿脑损伤后神经细胞的病理变化^[21]。有研究证明, 大脑皮层神经元损伤后 30 min, 大鼠存活率明显下降, 乳酸脱氢酶明显增加^[22], 使用 15 ~ 30 mmol/L L-乳酸能保护缺血大鼠海马星形胶质细胞^[23]。本研究使用 PC12 细胞系制备中度损伤的机械划痕细胞模型, 通过预实验确定损伤时间为 20 min, L-乳酸浓度为 20 mmol/L, 处理时间 20 min。本研究结果显示, 与对照组比较, 损伤 20 min 后 MSC 组 HIF-1 α 蛋白相对表达量降低; 与 MSC 组比较, 经 20 mmol/L L-乳酸处理 20 min 后, HIF-1 α 蛋白相对表达量增加。

大量研究^[24-28]表明, 外源性给予乳酸对脑缺血和创伤性脑损伤有保护作用。持续静脉输注 L-乳酸钠对严重创伤性脑损伤患者有益^[13]; 在动物实验中, L-乳酸预处理可减轻创伤性脑损伤^[14]。本研究结果表明, 与 Sham 组比较, 颅脑损伤组大鼠的 mNSS 评分升高; 与颅脑损伤组比较, 颅脑损伤+Lac 组大鼠的 mNSS 评分降低, 提示 L-乳酸持续治疗 7 d 后可改善颅脑损伤大鼠的神经功能缺损程度。

HIF-1 是一种异二聚体, 由 HIF-1 β 和 HIF-1 α 组成^[29]。研究表明, HIF-1 α 可改善缺氧缺血损伤^[30-31]。HIF-1 α 在颅脑损伤早期表达上调^[6], 本研究结果表明, HIF-1 α 在脑损伤后第 7 天时表达降低, 可能是由于颅脑损伤后 7 d 大鼠处于失代偿状态导致 HIF-1 α 表达降低。本研究的动物实验结果表明, 与 Sham 组比较, 颅脑损伤组 HIF-1 α 表达降低; 与颅脑损伤组比较, 颅脑损伤+Lac 组 HIF-1 α 表达增加。本研究的细胞实验结果表明, 与对照组比较, MSC 组 HIF-1 α 表达降低; 与 MSC 组比较, MSC+Lac 组 HIF-1 α 表达增加。以上结果提示 HIF-1 α 参与创伤性脑损伤的发生, L-乳酸减轻脑损伤的机制与促进 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 表达有关。

突触可塑性在创伤性脑损伤中严重受损^[31], 可塑性相关蛋白 PSD-95 和 GAP-43 减少^[31-33], L-乳酸预处理可促进 PSD-95 和 GAP-43 表达^[14]。有研究表明, 激活 HIF 信号通路, 可促进抑郁大鼠海马神经发生和突触可塑性增加^[34]。本研究结果进一步表明, 在动物实验中, 与 Sham 组比较, 颅脑损伤组 PSD-95 和 GAP-43 表达降低; 与颅脑损伤组比较, 颅脑损伤+Lac 组 PSD-95 和 GAP-43 表达增加。细胞

实验中, 与对照组比较, MSC 组 PSD-95 和 GAP-43 表达降低; 与 MSC 组比较, MSC+Lac 组 PSD-95 和 GAP-43 表达增加。以上结果均提示 L-乳酸通过激活 HIF-1 α 进而促进 PSD-95 和 GAP-43 表达, 对创伤性脑损伤神经具有保护作用。

综上所述, L-乳酸通过上调 HIF-1 α 表达进而增加突触可塑性相关蛋白 (PSD-95、GAP-43) 的表达来减轻大鼠创伤性脑损伤。

参 考 文 献 :

- [1] LEKER R R, SHOHAMI E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2002, 39(1): 55-73.
- [2] WU X G, WANG C L, WANG J B, et al. Hypoxia preconditioning protects neuronal cells against traumatic brain injury through stimulation of glucose transport mediated by HIF-1 α /GLUTs signaling pathway in rat[J]. *Neurosurg Rev*, 2021, 44(1): 411-422.
- [3] BÜKI A, OKONKWO D O, POVLISHOCK J T. Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 1999, 16(6): 511-521.
- [4] MAXWELL W L, DOMLEO A, MCCOLL G, et al. Post-acute alterations in the axonal cytoskeleton after traumatic axonal injury[J]. *J Neurotrauma*, 2003, 20(2): 151-168.
- [5] OKONKWO D O, POVLISHOCK J T. An intrathecal bolus of cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19(4): 443-451.
- [6] NERI M, FRATI A, TURILLAZZI E, et al. Immunohistochemical evaluation of aquaporin-4 and its correlation with CD68, IBA-1, HIF-1 α , GFAP, and CD15 expressions in fatal traumatic brain injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3544.
- [7] DEBERNARDI R, PIERRE K, LENGACHER S, et al. Cell-specific expression pattern of monocarboxylate transporters in astrocytes and neurons observed in different mouse brain cortical cell cultures[J]. *J Neurosci Res*, 2003, 73(2): 141-155.
- [8] BOZZO L, PUYAL J, CHATTON J Y. Lactate modulates the activity of primary cortical neurons through a receptor-mediated pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71721.
- [9] LAURITZEN K H, MORLAND C, PUCHADES M, et al. Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism[J]. *Cereb Cortex*, 2014, 24(10): 2784-2795.
- [10] SCHURR A, PAYNE R S, MILLER J J, et al. Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia[J]. *Brain Res*, 2001, 895(1-2): 268-272.

- [11] DIENEL G A. Brain lactate metabolism: the discoveries and the controversies[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(7): 1107-1138.
- [12] MILLET A, CUISINIER A, BOUZAT P, et al. Hypertonic sodium lactate reverses brain oxygenation and metabolism dysfunction after traumatic brain injury[J]. *Br J Anaesth*, 2018, 120(6): 1295-1303.
- [13] WOLAHAN S M, MAO H C, REAL C, et al. Lactate supplementation in severe traumatic brain injured adults by primed constant infusion of sodium L-lactate[J]. *J Neurosci Res*, 2018, 96(4): 688-695.
- [14] ZHAI X L, LI J Y, LI L Y, et al. L-lactate preconditioning promotes plasticity-related proteins expression and reduces neurological deficits by potentiating GPR81 signaling in rat traumatic brain injury model[J]. *Brain Res*, 2020, 1746: 146945.
- [15] ICHAI C, PAYEN J F, ORBAN J C, et al. Half-molar sodium lactate infusion to prevent intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain injured patients: a randomized controlled trial[J]. *Intensive Care Med*, 2013, 39(8): 1413-1422.
- [16] FEENEY D M, BOYESON M G, LINN R T, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. *Brain Res*, 1981, 211(1): 67-77.
- [17] LI Z Z, DONG X H, ZHANG J F, et al. Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism[J]. *J Neurol Sci*, 2014, 338(1-2): 112-117.
- [18] GE X T, LEI P, WANG H C, et al. *miR-21* improves the neurological outcome after traumatic brain injury in rats[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6718.
- [19] LIU W, CHEN Y H, MENG J, et al. Ablation of caspase-1 protects against TBI-induced pyroptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 48.
- [20] XIONG Y, MAHMOOD A, CHOPP M. Animal models of traumatic brain injury[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(2): 128-142.
- [21] 胡玲, 陈锐, 陈晓刚, 等. 体外培养大鼠大脑皮质星形胶质细胞损伤后 TGF- β 1 表达研究[J]. *中国法医学杂志*, 2010, 25(6): 392-394.
- [22] 黄卫东, 费舟, 章翔, 等. 体外培养大鼠脑皮层神经元机械性损伤模型的建立[J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(4): 307-309.
- [23] BANERJEE A, GHATAK S, SIKDAR S K. L-Lactate mediates neuroprotection against ischaemia by increasing TREK1 channel expression in rat hippocampal astrocytes *in vitro*[J]. *J Neurochem*, 2016, 138(2): 265-281.
- [24] BERTHET C, CASTILLO X, MAGISTRETTI P J, et al. New evidence of neuroprotection by lactate after transient focal cerebral ischaemia: extended benefit after intracerebroventricular injection and efficacy of intravenous administration[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2012, 34(5-6): 329-335.
- [25] BERTHET C, LEI H X, THEVENET J, et al. Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(11): 1780-1789.
- [26] BOUZAT P, SALA N, SUYS T, et al. Cerebral metabolic effects of exogenous lactate supplementation on the injured human brain[J]. *Intensive Care Med*, 2014, 40(3): 412-421.
- [27] HORN T, KLEIN J. Neuroprotective effects of lactate in brain ischemia: dependence on anesthetic drugs[J]. *Neurochem Int*, 2013, 62(3): 251-257.
- [28] ICHAI C, ARMANDO G, ORBAN J C, et al. Sodium lactate versus mannitol in the treatment of intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain-injured patients[J]. *Intensive Care Med*, 2009, 35(3): 471-479.
- [29] BARANOVA O, MIRANDA L F, PICHIULE P, et al. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(23): 6320-6332.
- [30] BERGERON M, YU A Y, SOLWAY K E, et al. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain[J]. *Eur J Neurosci*, 1999, 11(12): 4159-4170.
- [31] MERLO L, CIMINO F, ANGILERI F F, et al. Alteration in synaptic junction proteins following traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(16): 1375-1385.
- [32] JOO H, BAE J, LEE J S, et al. Icariin improves functional behavior in a mouse model of traumatic brain injury and promotes synaptic plasticity markers[J]. *Planta Med*, 2019, 85(3): 231-238.
- [33] KRISHNA G, YING Z, GOMEZ-PINILLA F. Blueberry supplementation mitigates altered brain plasticity and behavior after traumatic brain injury in rats[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(15): e1801055.
- [34] LI G F, ZHAO M, CHENG X, et al. FG-4592 improves depressive-like behaviors through HIF-1-mediated neurogenesis and synapse plasticity in rats[J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(2): 664-675.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 赵博, 张振, 李金英. L-乳酸对创伤性颅脑损伤后缺氧诱导因子-1 α 和突触可塑性相关蛋白的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(23): 45-52.

Cite this article as: ZHAO B, ZHANG Z, LI Y J. Effects of L-lactate on HIF-1 α and synaptic plasticity related proteins expression for traumatic brain injury[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(23): 45-52.