

# 大鼠海马区 A1/A2 型星形胶质细胞在弥漫性脑损伤后的表达变化

史文哲 宋汉君 罗文哲 蔡玉 盛廷良

154000 佳木斯大学基础医学院 黑龙江省微生态-免疫调节网络与相关疾病重点实验室

通信作者: 盛廷良, Email: shengyanliang@jmsu.edu.cn

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2022.12.009

**【摘要】目的** 检测大鼠在弥漫性脑损伤(DBI)后海马区 A1/A2 型星形胶质细胞(A1s、A2s)随时间的表达变化。**方法** 选取 SD 雄性大鼠 48 只,随机分为对照组和 DBI 后 4 h、8 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 组,每组 6 只,通过改良的 Marmarou 脑损伤打击装置建立大鼠脑损伤模型,通过大体观察、苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠脑组织损伤情况,通过免疫组织化学染色、实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测各组大鼠海马区 A1s、A2s 标志物 C3d、S100A10 的蛋白及 mRNA 的表达变化。**结果** 大体观察显示,对照组大鼠未见明显异常;实验组大鼠可见局限性蛛网膜下腔出血,侧脑室和脑组织腹侧面少量出血,脑组织可见轻度水肿,未见局灶性脑挫伤及脑挫裂伤。HE 染色结果显示,实验组大鼠 DBI 后的大脑皮层及深部脑组织形态学改变,大鼠颅脑损伤为弥漫性, DBI 造模成功。免疫组织化学染色结果显示,对照组大鼠海马区 C3d 蛋白的平均光密度值为(0.002 6±0.000 3), DBI 后 4 h 升高至(0.003 4±0.000 1),于 DBI 后 1 d 达高峰,为(0.015 8±0.000 4),染色程度加深,随后逐渐下降,7 d 时为(0.003 6±0.000 2); DBI 后 8 h、12 h、1 d、3 d、5 d 组大鼠的海马组织 C3d 蛋白的平均光密度值高于对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。对照组大鼠海马区 S100A10 蛋白的平均光密度值为(0.078 7±0.006 8), DBI 后 4 h 下降至(0.051 9±0.002 1),1 d 时最少,为(0.005 2±0.000 2),随后上升,7 d 时为(0.034 6±0.001 8); DBI 后 4 h、8 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 组大鼠的海马组织 S100A10 蛋白的平均光密度值低于对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。实时荧光定量 PCR 检测结果显示, C3d 于 DBI 后 4 h 出现升高的趋势,8 h 左右达高峰,表达量为(9.365 2±0.543 8) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,随后逐渐下降; S100A10 在 DBI 4 h 后开始下降,8 h 左右表达量最低,表达量为(0.446 9±0.007 8) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,随后呈上升趋势。DBI 后 4 h、8 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 组大鼠的 C3d mRNA 表达量均高于对照组, DBI 后 4 h、8 h、3 d、5 d、7 d 组大鼠的 S100A10 mRNA 表达量均低于对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。**结论** DBI 后 7 d 内 A1s、A2s 呈单峰表达的时序性变化规律,且趋势相反,为 DBI 时间推断、临床用药及治疗提供一定的理论依据。

**【关键词】** 弥漫性脑损伤; 星形胶质细胞; C3d; S100A10; 损伤时间

**Expression changes of A1/A2 astrocytes in hippocampus after diffuse brain injury in mice** Shi Wenzhe, Song Hanjun, Luo Wenzhe, Cai Yu, Sheng Yanliang

Key Laboratory of Microecology-immune Regulatory Network and Related Diseases, School of Basic Medicine, Jiamusi University, Jiamusi 154000, China

Corresponding author: Sheng Yanliang, Email: shengyanliang@jmsu.edu.cn

**【Abstract】Objective** To investigate the expression changes of A1/A2 astrocytes over time after diffuse brain injury (DBI) in the hippocampus of mice. **Methods** A total of 48 male SD mice were randomly divided into normal control group and 4 h, 8 h, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d group after DBI ( $n=6$ ). The DBI model was established by modified Marmarou brain injury strike device. Brain injury in mice was observed by gross observation and hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of C3d, S100A10 and their mRNA, the markers of A1/A2 astrocytes (A1s/A2s) in the hippocampus of mice were detected by immunohistochemical staining and real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR). **Results** Gross observation showed that there was no obvious abnormality in the normal control group, but there were localized subarachnoid hemorrhage, a small

amount of hemorrhage in the lateral ventricle and ventral side of brain tissue, mild edema and no focal brain contusion and laceration in the experimental group. The results of HE staining showed that the morphological changes of cerebral cortex and deep brain tissue in the experimental group after DBI, and the craniocerebral injury of mice was diffuse. DBI model was successfully established. The results of immunohistochemical staining showed that the mean density of C3d protein in the hippocampus of the normal control group mice was  $(0.0026 \pm 0.0003)$ . It increased to  $(0.0034 \pm 0.0001)$  at 4 h after DBI, and reached a peak of  $(0.0158 \pm 0.0004)$  at about 1 d after DBI. The staining was significantly deepened, and then the mean density gradually decreased. It was still higher than that in the normal control group at 7 d after DBI, the mean density was  $(0.0036 \pm 0.0002)$ . The mean density of C3d protein in the hippocampus of 8 h, 12 h, 1 d, 3 d and 5 d after DBI were all higher than that in the normal control group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The mean density of S100A10 protein in the hippocampus of the normal control group mice was  $(0.0787 \pm 0.0068)$ , which decreased to  $(0.0519 \pm 0.0021)$  at 4 h after DBI, and was the lowest at 1d, reaching  $(0.0052 \pm 0.0002)$ , then showing an upward trend,  $(0.0346 \pm 0.0018)$  at 7 d. The mean density of S100A10 protein in hippocampus of mice in groups 4 h, 8 h, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d and 7 d after DBI was lower than that in the normal control group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The results of real-time fluorescent quantitative PCR showed that C3d increased at 4 h after DBI and peaked at 8 h with the relative expression  $(9.3652 \pm 0.5438) 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , then decreased gradually. S100A10 began to decrease at 4 h after DBI, and its expression level was the lowest around 8 h, with the expression level of  $(0.4469 \pm 0.0078) 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , followed by an upward trend. The C3d mRNA expression of mice in the groups 4 h, 8 h, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d and 7 d after DBI was higher than that in the normal control group, and the S100A10 mRNA expression of mice in the groups 4 h, 8 h, 3 d, 5 d and 7 d after DBI was lower than that in the normal control group, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Within 7 days after DBI, A1s and A2s showed unimodal expression, and the trend was opposite, which is expected to become a biological index for estimation of injury time and treatment of DBI, and provide a theoretical basis for clinical medication and treatment.

**【Key words】** Diffuse brain injury; Astrocytes; C3d; S100A10; Injury time

弥漫性脑损伤(diffuse brain injury, DBI)属于闭合性脑外伤的范畴,主要包括4种类型,最常见的类型是弥漫性轴索损伤,此外还有弥漫性脑肿胀、弥漫性脑血管损伤以及缺氧性脑损害<sup>[1]</sup>。在临床实际案例中, DBI较为常见,其病理过程复杂,因此明确 DBI 的损伤时间对临床用药及治疗起到重要的作用。

以往对于脑损伤的研究主要集中于神经细胞,相关证据表明神经胶质细胞在中枢神经系统(central nervous system, CNS)脑外伤发病机制中发挥着不可或缺的作用,尤其是作为神经胶质细胞中数量最多且分布最为广泛的星形胶质细胞(astrocyte),其参与脑损伤后的生理病理机制较为复杂,如炎症反应、血-脑脊液屏障、突触的可逆性及胶质瘢痕形成等<sup>[2]</sup>。有学者通过研究发现,脑损伤后的星形胶质细胞可分为两种不同表型,即神经毒性反应性星形胶质细胞(neurotoxic reactive astrocytes, A1s)和神经保护性反应性星形胶质细胞(neurotrophic reactive astrocytes, A2s)<sup>[3-4]</sup>。两种表型在脑损伤后的病理生理过程中发挥不同作用,甚至有学者提出其在损伤中起着“双刃剑”的作用<sup>[5]</sup>。本实验旨在明确两者在脑损伤后的表达变化及趋势,为脑损伤时间推断及临床治疗提供一定的理论依据。

## 一、材料与方法

1. 主要试剂与材料: 苏木素-伊红(HE)染色试剂,兔抗C3d多克隆抗体、兔抗S100A10多克隆抗体购自北京索莱宝科技有限公司,即用型SABC-POD(小鼠IgG)、即用型SABC-POD(兔IgG)、DAB显色试剂盒(黄)购自武汉博士德生物工程有限公司,动物组织总RNA提取试剂盒、All-in-one First Strand cDNA Synthesis Kit、 $2 \times$  SYBR Green qPCR MasterMix、 $10\ 000 \times$  SuperRed 核酸染料(水溶液)、ROX Reference Dye、DEPC 水(DNase RAase free)、TAE( $5 \times$  premixed powder)、ExRed 核酸电泳染料均购自北京赛文创新生物科技有限公司。

2. 实验分组及 DBI 模型的建立: 选取 8 周龄的健康成年清洁级雄性 SD 大鼠 48 只, 体重  $(200 \pm 50)$ g, 由佳木斯大学实验动物中心提供[许可证号: SCXK(黑)2019-001, No.230729211100000123], 大鼠饲养及实验过程均符合国家实验动物护理和使用的道德准则, 遵守《中国实验动物管理条例》, 且实验方案已获得佳木斯大学基础医学院生物与医学伦理委员会审批(伦理审批号: JMSU-237)。大鼠适应性喂养 1 周后随机分为对照组和实验组(DBI 后 4 h、8 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 组), 每组 6 只。采用乙醚吸入法麻

醉大鼠,使用改良的Marmarou方法制造大鼠脑损伤模型<sup>[6]</sup>,对照组不作任何处理。造模成功后分别在预设时间点取材,取材过程中注意观察脑组织的大体变化。戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后立即将脑组织取出,迅速一分为二并做好标记,一半固定于4%多聚甲醛固定液中用于HE染色及免疫组织化学染色,另一半放置冰袋上快速提取海马,首先在大脑半球末端作两个切口,深度约0.7 mm,避免伤及海马,间距约2 mm,用眼科镊将大脑皮层游离,然后继续沿海马表面将大脑皮层与海马分离,剥离后置于-80℃冰箱保存,用于实时荧光定量PCR。

3. HE染色:固定于4%多聚甲醛固定液中的脑组织于24 h后取出,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、连续切片后作成切片(选取丘脑中1/3切面)<sup>[6]</sup>,厚度为3 μm,经冷水初展,在42℃温水中复展,最后贴附于防脱载玻片,在37℃烤箱中过夜,室温保存,然后经二甲苯脱蜡处理、梯度乙醇洗脱二甲苯、苏木素染色、盐酸酒精分化、伊红染色,最后经乙醇脱水、二甲苯透明后采用中性树胶封固。

4. 免疫组织化学染色:切片前步骤同HE染色,切片置于65℃烤箱中过夜后常温保存。经脱蜡水化、灭活、柠檬酸钠溶液微波热修复、BCA封闭液封闭后,滴加一抗,C3d(1:100)或S100A10(1:200),4℃孵育过夜。次日取出湿盒恢复至室温后,按照免疫组织化学染色试剂盒说明书进行操作,以抗体稀释液作为对照。在每张免疫组织化学染色切片中随机选取5个视野(×400),使用Image Pro Plus 6.0软件计算免疫组织化学染色平均光密度值。

5. 实时荧光定量PCR:(1)脑组织总RNA的提取。将脑组织从-80℃冰箱取出,称取10 mg于玻璃研磨器中研磨,将组织匀浆转入DNA-cleaning column中,离心过滤收集组织匀浆上清液,去除体系中基因组DNA后转移至RNA-only column中,特异性吸附RNA,经去蛋白、脱盐处理后,使用RNA-Free ddH<sub>2</sub>O洗脱并收集RNA溶液;随后进行琼脂糖凝胶电泳,并使用紫外分光光度计检测RNA浓度。(2)cDNA的合成。使用All-in-one First Strand cDNA Synthesis Kit,配置20 μl反应体系(Total RNA 2 μl, 5× Master Mix 4 μl, DEPC-ddH<sub>2</sub>O 14 μl),将反应体系放入PCR仪中,反应程序设置为42℃孵育30 min,85℃加热5 min,反应结束后,短暂离心,置于冰上冷却。(3)qPCR的扩增。预先设计引物并合成,cDNA稀释5倍,使用2×SYBR Green qPCR MasterMix配置反应体系(cDNA 2 μl, Forward/

Reverse Primer 各 0.5 μl, 2×SYBR Green qPCR MasterMix 10 μl, ddH<sub>2</sub>O 7 μl),qPCR程序设置为预变性95℃ 5 min;变性包括40个循环体系,95℃ 20 s,退火延伸60℃ 30 s,溶解曲线设定为65~95℃。

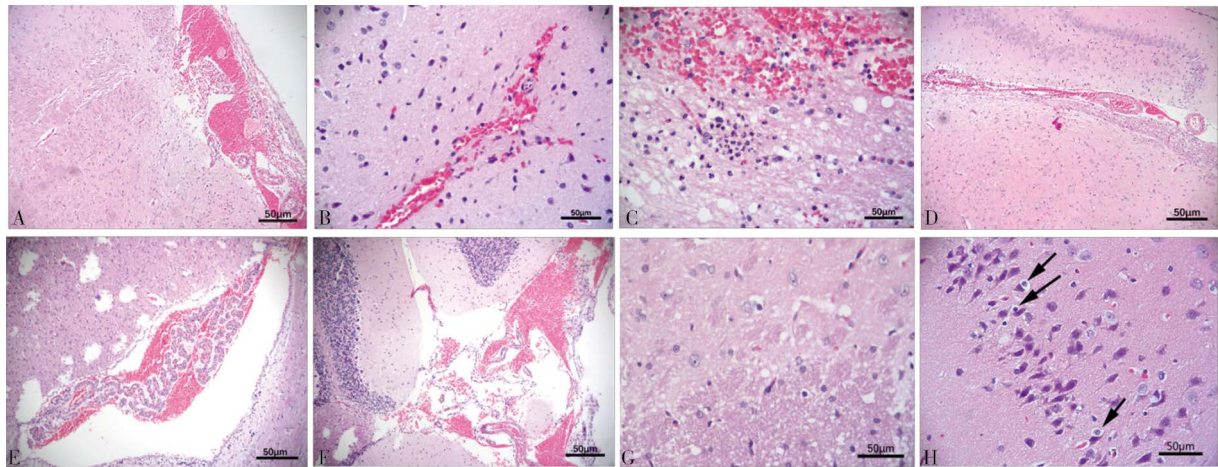
6. 统计学方法:采用SPSS 26.0统计学软件进行数据分析,采用GraphPad Prism 9.0软件作图,数据分析前对计量资料进行正态性检验,若符合正态分布采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,事后多重检验采用最小显著性差异法。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 二、结果

1. 大体观察及HE染色结果:(1)大体观察。对照组大鼠未见明显异常;实验组大鼠可见局限性蛛网膜下腔出血,侧脑室和脑组织腹侧面少量出血,脑组织可见轻度水肿,未见局灶性脑挫伤及脑挫裂伤。(2)HE染色。实验组大鼠DBI后的大脑皮层及深部脑组织形态学改变见图1,大鼠颅脑损伤为弥漫性,本实验成功建造了DBI模型。

2. 免疫组织化学染色结果:(1)C3d蛋白的表达情况。C3d蛋白阳性染色为棕黄色,定位于胞浆与胞核,形状不规则,散在分布于神经元之间,健康大鼠海马回区仅见少量C3d蛋白表达,见图2。DBI 4 h后C3d平均光密度值升高,染色加深,且呈上升趋势,1 d达到峰值后下降。DBI后8 h、12 h、1 d、3 d、5 d组大鼠的海马组织C3d蛋白平均光密度值高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ ),见表1。(2)S100A10蛋白的表达情况。S100A10蛋白阳性染色为棕黄色,定位于胞浆与胞膜,健康大鼠海马组织中S100A10蛋白表达较为丰富,分布于神经元之间,突起不明显,见图3。DBI后4 h组大鼠海马组织中S100A10平均光密度值降低,此后呈下降趋势,DBI后1 d平均光密度值最低,随后升高。DBI后4 h、8 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d组大鼠的海马组织S100A10平均光密度值低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ ),见表1。

3. 实时荧光定量PCR检测结果:C3d mRNA的表达量于DBI后4 h表现出升高趋势,8 h左右达高峰,随后逐渐下降。DBI后4 h、8 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d组大鼠的C3d mRNA表达量均高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。S100A10 mRNA的表达量在DBI 4 h后表达下降,8 h左右表达量最低,随后呈上升趋势。DBI后4 h、8 h、3 d、5 d、7 d组大鼠的S100A10 mRNA表达量均低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。见表2。



注: A显示蛛网膜下腔出血( $\times 400$ ); B显示脑皮质条状挫伤出血( $\times 400$ ); C显示脑白质区挫伤出血伴炎性细胞反应( $\times 400$ ); D显示海马钩回区蛛网膜下腔出血( $\times 200$ ); E显示脑室内脉络丛区出血( $\times 200$ ); F显示小脑蛛网膜下腔出血( $\times 400$ ); G显示细胞水肿、变性( $\times 400$ ); H箭头指示区域显示大脑皮质区神经元细胞变化及噬神经细胞现象( $\times 400$ )

图1 实验组大鼠弥漫性脑损伤后大脑皮层及深部脑组织形态学改变(苏木素-伊红染色)

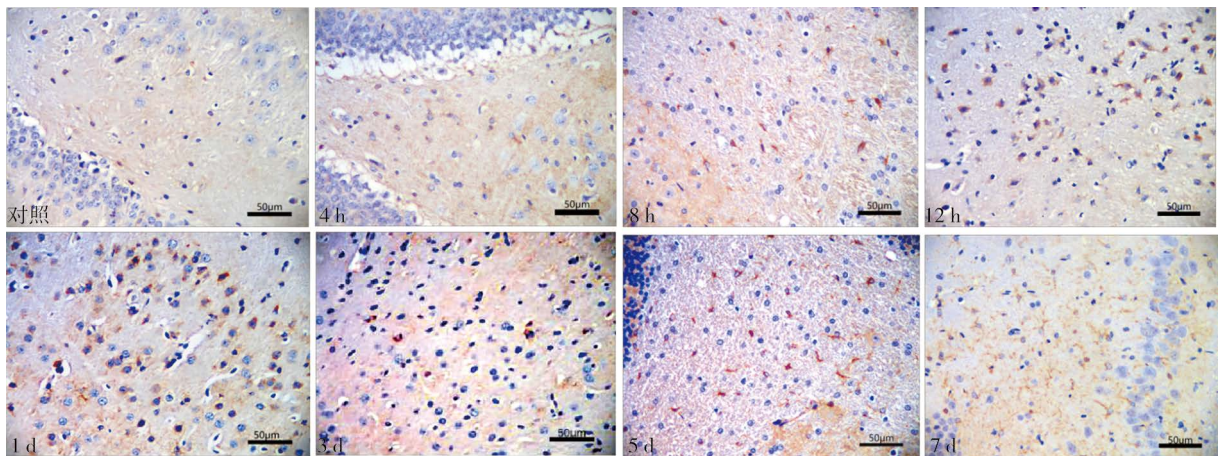


图2 对照组及弥漫性脑损伤后4 h、8 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d组大鼠的海马区C3d蛋白表达( $\times 400$ )

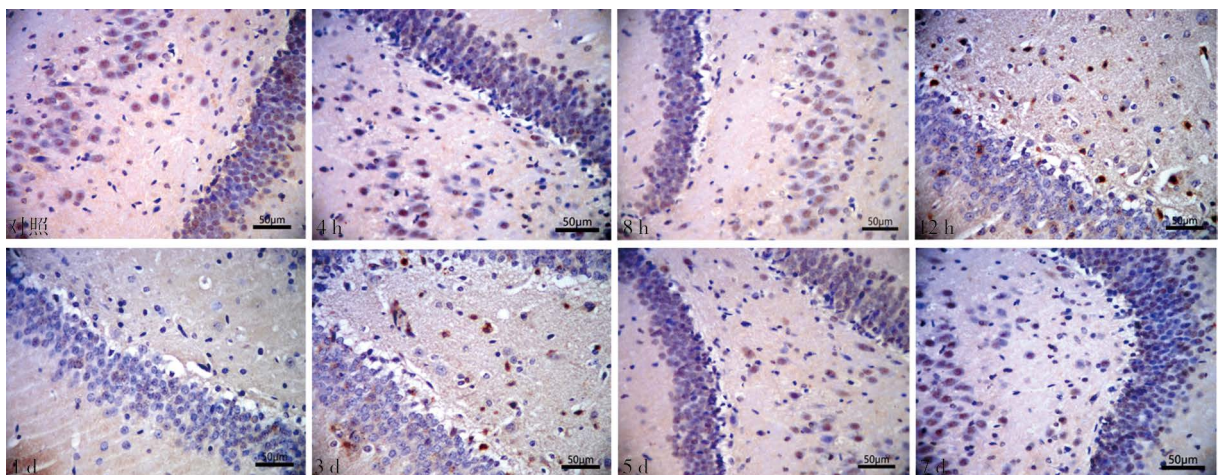


图3 对照组及弥漫性脑损伤后4 h、8 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d组大鼠的海马区S100A10蛋白表达( $\times 400$ )

表1 8组大鼠海马组织C3d、S100A10的平均光密度值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	C3d	S100A10
对照组	6	0.002 6 ± 0.000 3	0.078 7 ± 0.006 8
DBI后4 h	6	0.003 4 ± 0.000 1	0.051 9 ± 0.002 1 <sup>ab</sup>
DBI后8 h	6	0.005 2 ± 0.000 1 <sup>ab</sup>	0.023 5 ± 0.000 9 <sup>ab</sup>
DBI后12 h	6	0.014 6 ± 0.001 1 <sup>a</sup>	0.012 5 ± 0.000 3 <sup>ab</sup>
DBI后1 d	6	0.015 8 ± 0.000 4 <sup>ab</sup>	0.005 2 ± 0.000 2 <sup>ab</sup>
DBI后3 d	6	0.008 7 ± 0.000 3 <sup>ab</sup>	0.007 3 ± 0.000 2 <sup>a</sup>
DBI后5 d	6	0.004 6 ± 0.000 2 <sup>ab</sup>	0.018 3 ± 0.000 6 <sup>ab</sup>
DBI后7 d	6	0.003 6 ± 0.000 2	0.034 6 ± 0.001 8 <sup>ab</sup>
F值		399.59	274.76
P值		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与表格中相邻的上一组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;DBI弥漫性脑损伤

表2 8组大鼠海马C3d、S100A10 mRNA的表达量( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	C3d	S100A10
对照组	6	1.000 0 ± 0.050 8	1.000 0 ± 0.114 6
DBI后4 h	6	3.427 5 ± 0.142 4 <sup>ab</sup>	0.786 0 ± 0.035 2 <sup>ab</sup>
DBI后8 h	6	9.365 2 ± 0.543 8 <sup>ab</sup>	0.446 9 ± 0.007 8 <sup>ab</sup>
DBI后12 h	6	6.918 6 ± 1.096 2 <sup>ab</sup>	1.077 2 ± 0.045 0 <sup>b</sup>
DBI后1 d	6	5.509 4 ± 0.589 6 <sup>ab</sup>	1.149 0 ± 0.051 9
DBI后3 d	6	2.835 6 ± 0.263 6 <sup>ab</sup>	1.279 1 ± 0.128 9 <sup>a</sup>
DBI后5 d	6	2.606 8 ± 0.448 9 <sup>ab</sup>	1.321 7 ± 0.121 6 <sup>a</sup>
DBI后7 d	6	1.911 7 ± 0.210 1 <sup>ab</sup>	3.400 0 ± 0.138 7 <sup>ab</sup>
F值		88.28	273.44
P值		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与表格中相邻的上一组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;DBI弥漫性脑损伤

**讨论** 脑外伤可诱导星形胶质细胞活化,参与神经发生、血-脑脊液屏障修复、突触形成及可塑性调节、胶质瘢痕和细胞外基质的形成等组织重塑过程,起初可能会导致血-脑脊液屏障完整性和神经血管单位遭到破坏,随后可能继发广泛的神经炎症、星形胶质细胞功能障碍和代谢紊乱。星形胶质细胞与神经元形成密切的相互作用,提供结构支持并参与代谢偶联,作为神经元的营养源和储存库<sup>[7]</sup>。神经元的氧化代谢需要乳酸作为能量底物,星形胶质细胞可将丙酮酸转化为乳酸,随后运送到神经元,因此形成了星形胶质细胞-神经元乳酸穿梭<sup>[8-9]</sup>。考虑到星形胶质细胞在CNS中表达丰富,且发挥多重作用,因此星形胶质细胞中任何功能障碍都可能对神经元产生不利影响。

一般情况下,星形胶质细胞处于静息状态,在疾病或损伤状态下被激活,分化为A1s、A2s。A1s起初被发现于神经退行性疾病中,目前有研究通过

侧向液压冲击实验首次证实了其存在于颅脑损伤模型中<sup>[10]</sup>。A1s被认为具有神经毒性,在CNS损伤后能迅速产生并杀死神经元和少突胶质细胞,能高表达多种经典补体级联反应基因,其中C3补体成分C3d高度上调,可作为A1s最具特征性的基因之一<sup>[10]</sup>。相反,A2s可上调多种神经营养因子,因此A2s又被称为抗炎表型的星形胶质细胞,S100A10可作为其特异性标志物能够促进CNS修复,发挥神经保护作用。

本研究通过免疫组织化学染色对C3d、S100A10蛋白表达进行检测,结果显示,对照组大鼠海马区仅存在少量A1s,染色较浅,散在分布于神经元之间,DBI 4 h后表达开始升高,此后呈上升趋势,1 d左右达高峰,染色加深,随后表达逐渐下降,7 d时仍高于对照组,差异有统计学意义。对于S100A10蛋白而言,其在正常大鼠脑组织中普遍表达,当脑组织损伤后,随时间进展,其表达呈现先降低后升高的趋势,与C3d表达趋势相反。本研究随后对C3d mRNA、S100A10 mRNA的表达进行检测,两者同样表现出相反趋势,随损伤时间进展,C3d mRNA表达下降时,S100A10 mRNA表达升高,DBI后8 h两者达到各自峰值。相对于蛋白表达而言,mRNA到达峰值的时间要早于其相应蛋白。观察到的上述mRNA和蛋白质水平之间存在差异,可能是由于翻译、翻译后修饰、蛋白质半衰期和抗体表位可及性的不同调控所致。虽然mRNA与其相应蛋白到达峰值与谷值的时间存在差异,但趋势大致相似。

既往有学者提出,正常情况下星形胶质细胞主要表达S100A10,并且在疾病或损伤状态时给予适当的治疗干预(通过线粒体转移)可以使星形胶质细胞由A1s转化为A2s,从而有利于损伤的修复<sup>[11]</sup>。还有研究提出,将星形胶质细胞由经典的促炎性A1s转变为保护性A2s可能成为一种潜在的治疗方法<sup>[12]</sup>,例如在脊髓损伤模型中A2s可以促进神经元存活和组织修复<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,在脑组织损伤前期,A1s逐渐增多而A2s表达逐渐减少,DBI后1 d两者各自达到峰值与谷值,此时A1s表达占据优势,可能与炎症、损伤程度有关。在随后的检测中,A2s表达又呈升高趋势,而A1s表达趋势降低,可能与脑损伤的恢复程度有关。A1s由激活的小胶质细胞诱导,可通过分泌神经毒性补体C3诱导神经元死亡。因此,在适当的时机通过使用相关药物并采取必要的治疗手段,如脑损伤前期,在A1s分化达到峰值前(DBI后1 d)可减少星形胶质细胞向A1s方向分化,或增加星形胶质细胞向A2s方向分化,以减轻脑

损伤所致的神经功能缺失、神经炎症、神经元损伤及脑水肿等。

在实验过程中,考虑到 A1s、A2s 的表达与神经退行性疾病相关,因此本实验选取 8 周龄大鼠作为研究对象,避免大鼠自身产生的影响。但本实验仍存在不足之处,即使 C3d、S100A10 是目前公认的最具代表性的标志物<sup>[4, 14]</sup>,但其偶尔也可在神经元中发现。因此,后续实验将采用免疫荧光双重染色的检测方法,进一步确定 C3d、S100A10 在星形胶质细胞中的表达数量及趋势。目前,对于 A1s、A2s 机制的研究尚存在争议。因此,今后还应通过相应的激动剂、抑制剂或基因敲除等干预措施,在探究其机制的同时,观察其对颅脑损伤修复的作用。另外,本研究的实验对象为大鼠,与人类生理结构和功能之间存在差异,研究结果距离实际应用有待进一步探究。此外, C3d、S100A10 均存在于内环境中,可通过血液或其他易获得的体液探究其表达趋势。考虑未来通过以上环节,能够将基础研究应用到临床实践中。同时也需从多方面综合考虑,以更好地探索 A1s、A2s 在脑外伤后随时间的变化趋势,以便于在适当时机给予相关药物治疗或采取必要的治疗手段,从而为脑损伤时间推断及临床治疗提供新的思路 and 理论依据。

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**作者贡献声明** 构思与设计为宋汉君、史文哲,研究实施、资料收集为史文哲、蔡玉,数据分析和整理、绘制图表、文章撰写与修改为史文哲,提供分析工具、论文修订为罗文哲,盛延良审校

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Graham DI, McIntosh TK, Maxwell WL, et al. Recent advances in neurotrauma[ J ]. J Neuropathol Exp Neurol, 2000, 59(8): 641-651. DOI: 10.1093/jnen/59.8.641.
- [ 2 ] 刘源,王蓉.反应性星形胶质细胞在颅脑创伤后作用的研究进展[ J ].神经疾病与精神卫生, 2017, 17(10): 747-750. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.10.016.  
Liu Y, Wang R. Role of reactive astrocytes after traumatic brain injury[ J ]. Journal of Neuroscience and Mental Health, 2017, 17(10): 747-750.
- [ 3 ] Zamanian JL, Xu L, Foo LC, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis[ J ]. J Neurosci, 2012, 32(18): 6391-6410. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
- [ 4 ] Liddelow SA, Barres BA. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential[ J ]. Immunity, 2017, 46(6): 957-967. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.06.006.
- [ 5 ] Michinaga S, Koyama Y. Pathophysiological responses and roles of astrocytes in traumatic brain injury[ J ]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6418. DOI: 10.3390/ijms22126418.
- [ 6 ] Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, et al. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: pathophysiology and biomechanics[ J ]. J Neurosurg, 1994, 80(2): 291-300. DOI: 10.3171/jns.1994.80.2.0291.
- [ 7 ] Linnerbauer M, Rothhammer V. Protective functions of reactive astrocytes following central nervous system insult[ J ]. Front Immunol, 2020, 11: 573256. DOI: 10.3389/fimmu.2020.573256.
- [ 8 ] Bordone MP, Salman MM, Titus HE, et al. The energetic brain - a review from students to students[ J ]. J Neurochem, 2019, 151(2): 139-165. DOI: 10.1111/jnc.14829.
- [ 9 ] Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation[ J ]. Cell Metab, 2011, 14(6): 724-738. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.08.016.
- [ 10 ] Clark DPQ, Perreau VM, Shultz SR, et al. Inflammation in traumatic brain injury: roles for toxic A1 astrocytes and microglial-astrocytic crosstalk[ J ]. Neurochem Res, 2019, 44(6): 1410-1424. DOI: 10.1007/s11064-019-02721-8.
- [ 11 ] Miyamoto N, Magami S, Inaba T, et al. The effects of A1/A2 astrocytes on oligodendrocyte lineage cells against white matter injury under prolonged cerebral hypoperfusion[ J ]. Glia, 2020, 68(9): 1910-1924. DOI: 10.1002/glia.23814.
- [ 12 ] Neal M, Luo J, Harischandra DS, et al. Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes[ J ]. Glia, 2018, 66(10): 2137-2157. DOI: 10.1002/glia.23467.
- [ 13 ] King A, Szekely B, Calapkulu E, et al. The increased densities, but different distributions, of both C3 and S100A10 immunopositive astrocyte-like cells in Alzheimer's disease brains suggest possible roles for both A1 and A2 astrocytes in the disease pathogenesis[ J ]. Brain Sci. 2020, 10(8): 503. DOI: 10.3390/brainsci10080503.
- [ 14 ] Zhang Y, Meng T, Chen J, et al. miR-21a-5p promotes inflammation following traumatic spinal cord injury through upregulation of neurotoxic reactive astrocyte (A1) polarization by inhibiting the CNTF/STAT3/Nkrf pathway[ J ]. Int J Biol Sci, 2021, 17(11): 2795-2810. DOI: 10.7150/ijbs.60509.

(收稿日期: 2022-05-22)

(本文编辑: 赵金鑫)