

## . 实验研究 .

## 吡咯喹啉醌对颅脑损伤小鼠的神经保护作用

王 凯 王 利 伊西才 王彦刚

**【摘要】目的** 探讨吡咯喹啉醌(PQQ)对颅脑损伤(TBI)小鼠的保护作用及潜在机制。**方法** 将 60 只 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、TBI 组和 PQQ 组,每组 20 只。使用可控皮层冲击方法建立 TBI 模型。PQQ 组伤前 30 min 腹腔注射溶 PQQ (10 mg/kg),假手术组和 TBI 组腹腔注射等量生理盐水。伤后 24 h,采用神经功能评分法评估小鼠神经功能,使用干湿重法检测脑含水量,采用 TUNEL 染色检测神经元凋亡,采用 ELISA 法检测脑组织白介素  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平,采用免疫印迹法检测脑组织 caspase3、Notch 受体胞内段 (NICD)、发状分裂相关增强子 1 (HES-1)、小胶质细胞离子钙结合衔接分子 1 (IBA1) 的蛋白表达水平。**结果** 与假手术组比较,TBI 组小鼠脑含水量及神经功能学评分均明显升高 ( $P<0.05$ ),脑组织 IL- $1\beta$  及 TNF- $\alpha$  含量均明显升高 ( $P<0.05$ ),脑组织 TUNEL 阳性细胞率明显升高 ( $P<0.05$ ),脑组织 NICD、HES-1、IBA-1 和活化 caspase3 达量水平明显增加 ( $P<0.05$ )。与 TBI 组比较,PQQ 组小鼠脑含水量及神经功能学评分均明显减少 ( $P<0.05$ ),脑组织 IL- $1\beta$  水平及 TNF- $\alpha$  水平均明显降低 ( $P<0.05$ ),脑组织 TUNEL 阳性细胞率明显降低 ( $P<0.05$ ),脑组织 NICD、HES-1 达量水平明显增加,但脑组织 IBA-1 和活化 caspase3 表达水平明显降低 ( $P<0.05$ )。**结论** PQQ 可减轻 TBI 小鼠脑水肿、炎症反应和神经元凋亡,改善神经功能,从而发挥脑保护作用,其机制可能与激活 Notch 信号通路有关。

**【关键词】** 颅脑损伤;吡咯喹啉醌;炎症反应;脑水肿;神经元凋亡;小鼠

**【文章编号】** 1009-153X(2024)08-0473-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1\*5

**Protective effect of pyrroloquinoline quinone on mice after traumatic brain injury**

WANG Kai, WANG Li, Yi Xi-cai, WANG Yan-gang. Department of Neurosurgery, Xijing Institute of Clinical Neuroscience, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

**【Abstract】 Objective** To explore the protective effect and potential mechanism of pyrroloquinoline quinone (PQQ) on mice with traumatic brain injury (TBI). **Methods** Sixty C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group, TBI group and PQQ group, with 20 mice in each group. The TBI model was established by controlled cortical impact. The mice in the PQQ group were intraperitoneally injected with PQQ (10 mg/kg) 30 minutes before injury, while the mice in the sham operation and the TBI groups were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline. At 24 hours after injury, the neurological function of mice was evaluated by neurological function score, the brain water content was detected by the dry-wet weight method, neuronal apoptosis was detected by TUNEL staining, the levels of interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in brain tissue were detected by ELISA, and the protein expression levels of caspase 3, Notch receptor intracellular domain (NICD), hairy and enhancer of split 1 (HES-1), and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) of microglia in brain tissue were detected by Western blotting. **Results** Compared with the sham operation group, the brain water content and neurological function score of the TBI group were significantly increased ( $P<0.05$ ), the contents of IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$  in brain tissue were significantly increased ( $P<0.05$ ), the rate of TUNEL positive cells in brain tissue was significantly increased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of NICD, HES-1, IBA-1 and activated caspase3 in brain tissue were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with the TBI group, the brain water content and neurological function score of the PQQ group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), the levels of IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$  in brain tissue were significantly decreased ( $P<0.05$ ), the rate of TUNEL positive cells in brain tissue was significantly decreased ( $P<0.05$ ), the expression levels of NICD and HES-1 in brain tissue were significantly increased, but the expression levels of IBA-1 and activated caspase3 in brain tissue were significantly decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** PQQ can alleviate brain edema, inflammatory response and neuronal apoptosis in TBI mice, improve neurological function, and thus exert a neuroprotective effect. Its mechanism may be related to the activation of the Notch signaling pathway.

**【Key words】** Traumatic brain injury; Pyrroloquinoline quinone; Inflammation; Brain edema; Neuronal apoptosis; Mice

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2024.08.007

基金项目:陕西省重点研发计划(2023-YBSF-129)

作者单位:710032 西安,空军军医大学第一附属医院神经外科(王凯、王 利、伊西才、王彦刚)

通信作者:王彦刚,Email: ygwang@163.com

目前认为,颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)可分为原发性损伤和继发性损伤两个阶段,其中继发性损伤阶段的干预措施是临床研究的重点。在此阶段,脑组织炎症可能发挥了重要作用,具体表现为小胶质细胞活化、淋巴细胞募集以及细胞因子的改

变。研究表明炎症可导致脑水肿的形成和神经元死亡并最终造成脑功能缺陷<sup>[1]</sup>。因此,基于抗炎特点的治疗手段可能是一种有效的治疗措施。吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)具有催化氧化还原反应、抗炎、调控免疫和能量代谢、调控细胞信号通路等广泛的生物活性<sup>[2-4]</sup>。本研究探讨 PQQ 对 TBI 小鼠的保护作用及可能的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 60 只成年雄性 C57BL/6 小鼠[12~14 周,体重(30±2)g]购买自空军军医大学动物实验中心。小鼠随机分为假手术组、TBI 组和 PQQ 组,每组 20 只。

**1.2 TBI 模型制作及药物干预** 按照文献[5]报道的方法制作 TBI 模型。小鼠用 4% 含氧异氟醚麻醉,固定头部,沿中线剪开头顶皮肤,暴露颅骨,使用电钻在前囟和后囟之间距中线 1 mm 的右侧顶叶皮层上方开一个直径 3.5 mm 的骨窗,保持硬膜完整。采用气动活塞式冲击装置(美国 Hatteras Instruments)对骨窗皮层进行打击,打击深度 1 mm,速度 4.5 m/s。假手术组接受相同的颅骨开窗手术,但未进行打击。PQQ 纯度为 98% (百灵威科技有限公司),溶于生理盐水,PQQ 组小鼠造模前 30 min 予腹腔注射,参考既往文献选择剂量为 10 mg/kg<sup>[3]</sup>。PQQ 组损伤同 TBI 组,假手术组只行颅骨开窗术,不损伤脑组织。假手术组和 TBI 组小鼠腹腔注射等量生理盐水。

**1.3 神经功能学评分** 伤后 24 h,每组选取 4 只小鼠,按照文献[5]报道的方法评估神经功能缺损。

**1.4 脑水肿的评估** 伤后 24 h,每组选取 4 只小鼠,采用干湿重法评估脑水肿程度<sup>[6]</sup>。伤后 24 h,颈椎脱臼处死小鼠,立即将其大脑取出并称重以确定湿重。随后将脑组织在 110 ℃ 的干燥箱中干燥 24 h,再次称重以确定干重。脑含水量计算公式为:脑含水量(%)=(湿重-干重)×100/湿重。

**1.5 免疫印迹法检测蛋白表达** 伤后 24 h,每组选取 4 只小鼠,颈椎脱臼处死小鼠,取损伤灶周围皮质脑组织提取蛋白,使用 BCA 试剂盒(北京华夏远泽科技有限公司)测定蛋白浓度。取上样量 20 μg,10% SDS-PAGE 分离蛋白,湿法转 PVDF 膜(北京华夏远泽科技有限公司),含 BSA 的 TBST 液室温封闭 1 h,滴加兔抗鼠 NICD、HES-1、IBA-1 一抗(1:500;美国 Abcam 公司),滴加兔抗鼠活化 caspase3、总 caspase3 和 β-actin 一抗(1:1 000;美国 Abcam 公司),4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 10 min×3 次,滴加二抗室温孵育 1

h,TBST 洗膜 10 min×3 次,显影。使用 Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与 β-actin 或总 caspase3 灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

**1.6 ELISA 分析** 伤后 24 h,每组选取 4 只小鼠,颈椎脱臼处死小鼠,取脑组织,对损伤侧大脑半球进行匀浆处理,按照试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司)说明书检测炎症因子白介素 1β(interleukin-1β, IL-1β)和肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)水平。

**1.7 神经元凋亡的检测** 伤后 24 h,每组选取 4 只小鼠,颈椎脱臼处死小鼠,取脑组织,采用凋亡试剂盒(美国 Roche 公司),按照说明书方法检测,使用 DAPI 共染 5 min 以确定总细胞数,使用 OLYMPUS IX70 倒置显微镜在 400 倍镜下观察,计算每张切片随机 5 个视野的阳性细胞数。凋亡率=阳性细胞数/细胞总数×100%。

**1.8 统计学方法** 应用 SPSS 16.0 软件分析;正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验分析;以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PQQ 对小鼠 TBI 发挥神经保护作用** 与假手术组相比,TBI 组小鼠脑水含水量和神经功能学评分均明显增加(*P*<0.05;图 1)。与 TBI 组相比,PQQ 组小鼠脑含水量和神经功能学评分均明显下降显著下降(*P*<0.05;图 1)。

**2.2 PQQ 对小鼠 TBI 后脑组织神经炎症和小胶质细胞激活的影响** 与假手术组相比,TBI 组小鼠脑组织 TNF-α、IL-1β 含量和 IBA1 表达水平均明显增加(*P*<0.05;图 2)。与 TBI 组相比,PQQ 组脑组织 TNF-α、IL-1β 含量和 IBA1 表达水平均显著下降(*P*<0.05;图 2)。

**2.3 PQQ 对小鼠 TBI 后神经元凋亡的影响** 与假手术组相比,TBI 组小鼠神经元 TUNEL 阳性率和 Caspase3 表达水平均明显增加(*P*<0.05;图 3)。与 TBI 组相比,PQQ 组神经元 TUNEL 阳性率和 Caspase3 表达水平均显著下降(*P*<0.05;图 3)。

**2.4 Notch 信号通路活性改变** 与假手术组相比,TBI 组小鼠脑组织 NICD 和 HES-1 表达水平明显升高(*P*<0.05;图 4)。与 TBI 组相比,PQQ 组脑组织 NICD 和 HES-1 表达水平明显升高(*P*<0.05;图 4)。

## 3 讨论

TBI 是一个复杂的神经退行性变过程<sup>[7]</sup>,涉及许

多细胞和分子水平的改变,其中就包括炎症和凋亡。神经炎症与小胶质细胞的激活和细胞因子的释放有关,而激活的小胶质细胞释放各种神经毒性物质,可能加剧伤后神经元的死亡<sup>[8]</sup>。所以,抑制过度的小胶质细胞激活是减轻损伤进展的一种治疗策略<sup>[9]</sup>。TBI 引起的炎症级联反应由促炎因子和抗炎因子介导,IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 是典型的促炎因子,在伤后数小时内即升高,抑制IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 可减轻TBI后脑水肿及改善神经功能<sup>[10,11]</sup>。研究显示PQQ可以降低

低脂多糖刺激小胶质细胞造成的IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 升高<sup>[3]</sup>。我们发现PQQ能够降低小鼠TBI后小胶质细胞标志性分子IBA-1的表达及IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平,提示PQQ可以抑制TBI造成的神经炎症。

TBI后继发性脑损伤阶段的一重要表现是神经元凋亡,可分为依赖caspase和非依赖caspase两种类型。在caspase依赖型凋亡中,caspase3是一系列凋亡级联反应的最终关键步骤。文献报道caspase3抑制剂可降低大鼠TBI后的脑损伤并改善神经功能

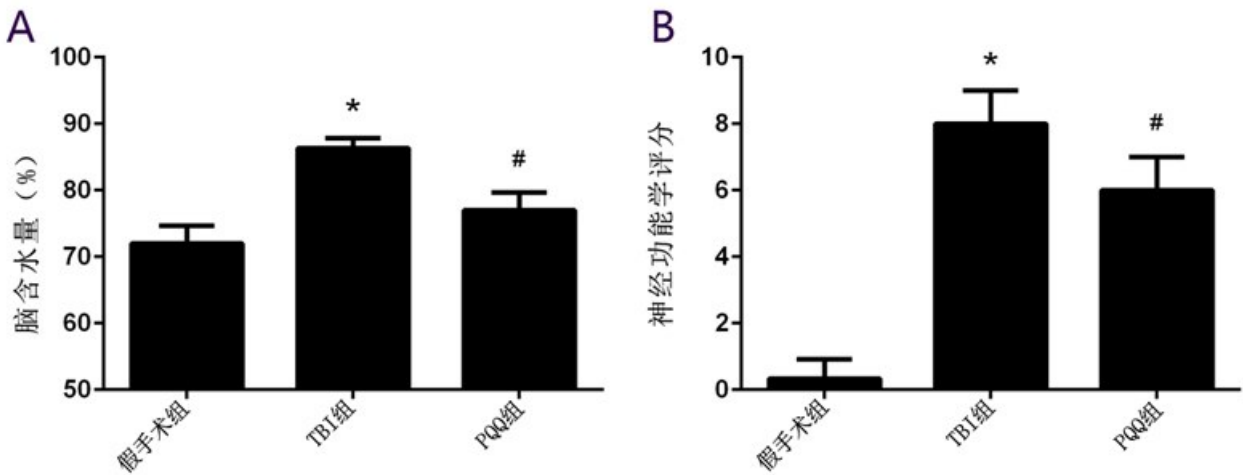


图1 PQQ对TBI小鼠脑含水量和神经功能学评分的影响

A. PQQ对TBI小鼠脑含水量的影响;B. PQQ对TBI小鼠神经功能学评分的影响;PQQ. 吡咯喹啉醌;TBI. 颅脑损伤;与假手术组相比,\* $P<0.05$ ;与TBI组相比,# $P<0.05$

Figure 1 Effect of PQQ on brain water content and neurological function scores in TBI mice

A: Effect of PQQ on brain water content in TBI mice. B: Effect of PQQ on neurological function scores in TBI mice. PQQ: pyrroloquinoline quinone. TBI: traumatic brain injury. \* $P<0.05$  compared with the sham operation group. # $P<0.05$  compared with the TBI group.

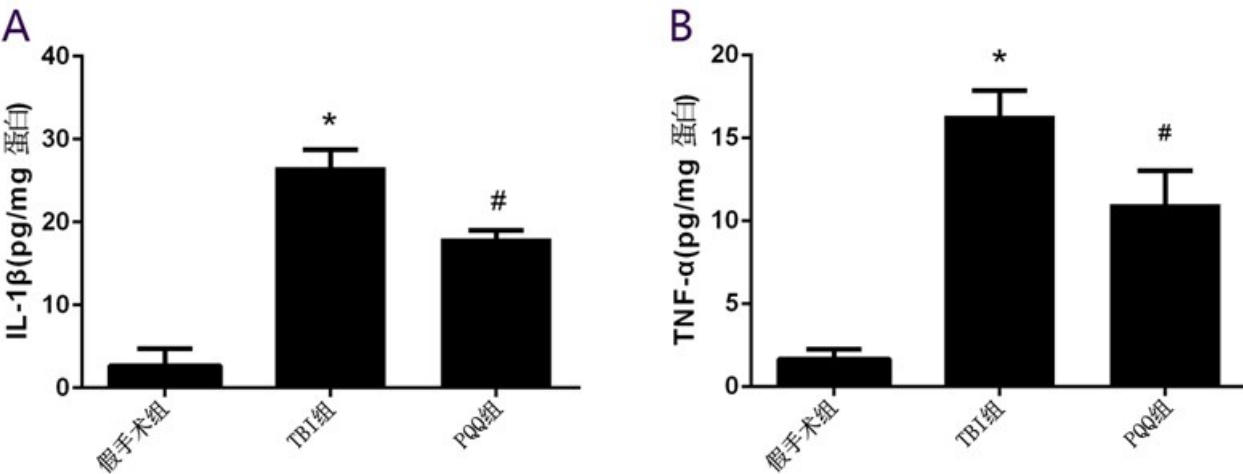


图2 PQQ对TBI小鼠脑组织炎症因子水平的影响

A. PQQ对TBI小鼠脑组织IL-1 $\beta$ 水平的影响;B. PQQ对TBI小鼠脑组织TNF- $\alpha$ 水平的影响;PQQ. 吡咯喹啉醌;TBI. 颅脑损伤;IL-1 $\beta$ . 白细胞介素-1 $\beta$ ;TNF- $\alpha$ . 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;与假手术组相比,\* $P<0.05$ ;与TBI组相比,# $P<0.05$

Figure 2 Influence of PQQ on the levels of inflammatory factors in brain tissue of TBI mice

A: The influence of PQQ on the level of IL-1 $\beta$  in brain tissue of TBI mice. B: The Influence of PQQ on the level of TNF- $\alpha$  in brain tissue of TBI mice. PQQ: pyrroloquinoline quinone. TBI: traumatic brain injury. IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ . TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$ . \* $P<0.05$  compared with the sham operation group. # $P<0.05$  compared with the TBI group.

[12]。我们的结果显示PQQ减少小鼠TBI后TUNEL阳性细胞的数量及活化的caspase3的相对表达量,说明PQQ减轻了TBI后的神经元凋亡。

脑水肿是TBI相关的高致死率的一个重要影响因素。TBI后凋亡信号可诱导阳离子蓄积,促使水分进入细胞,引起细胞肿胀并进一步引起细胞毒性水肿。同时,免疫细胞被激活以清除凋亡细胞,这种炎

症反应可能进一步损害微血管内皮,导致血脑屏障破坏和血管源性水肿。我们发现PQQ可明显降低TBI后的脑水肿,这种效果可能和PQQ的抗凋亡和抗炎作用有关。

Notch 信号通路是动物体内一条保守的信号通路,其激活过程包括 Notch 配体-受体结合,使NICD向细胞核的转位和下游基因的转录调控(Hes1

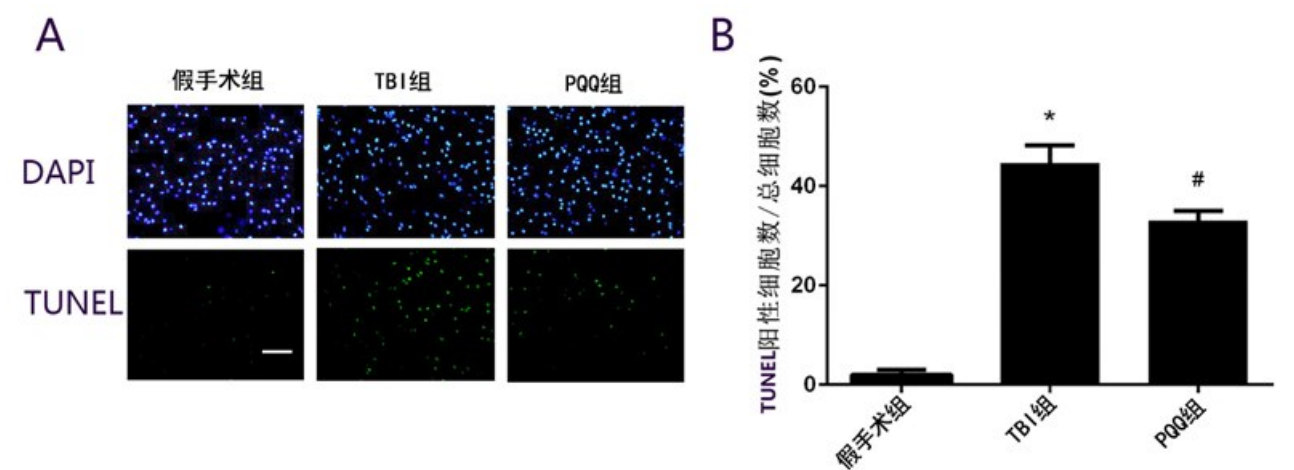


图3 PQQ对TBI小鼠损伤脑组织神经元凋亡的影响

A. 损伤脑组织TUNEL染色,标尺=50μm;B. TUNEL染色阳性细胞百分率;PQQ. 吡咯喹啉醌;TBI. 颅脑损伤;与假手术组相比,\* $P<0.05$ ;与TBI组相比,# $P<0.05$

Figure 3 Impact of PQQ on neuronal apoptosis in the injured brain tissue of TBI mice

A: TUNEL staining of the injured brain tissue, scale bar=50 μm. B: Percentage of TUNEL-positive cells. PQQ: Pyrroloquinoline quinone. TBI: Traumatic brain injury. \*  $P<0.05$  compared with the sham operation group. #  $P<0.05$  compared with the TBI group.

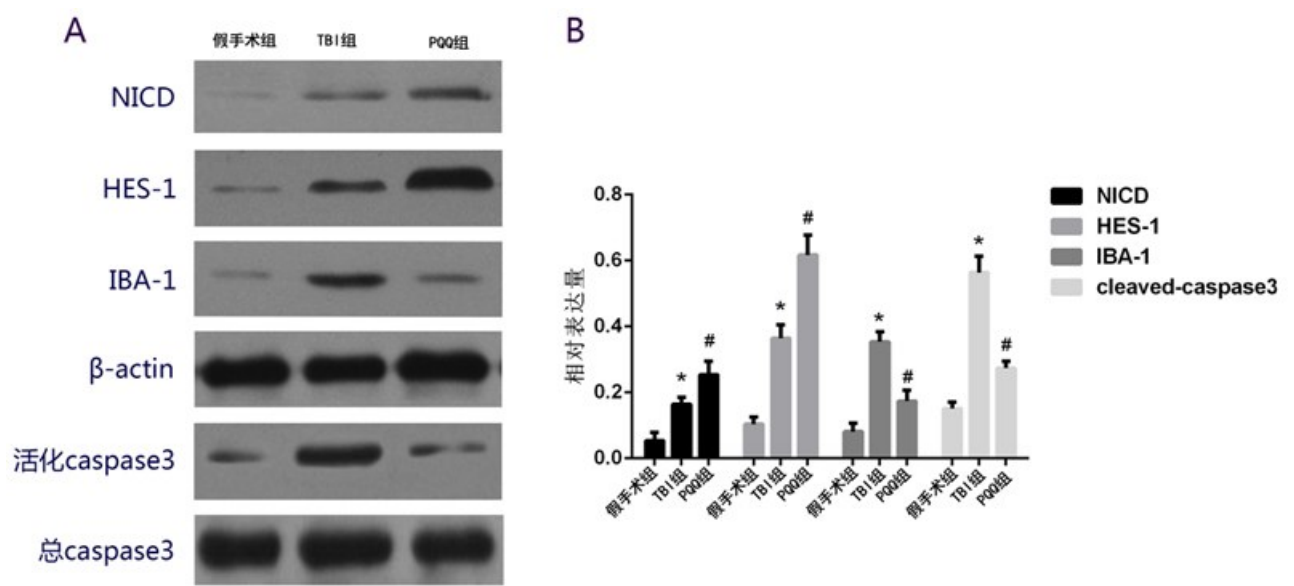


图4 PQQ对TBI小鼠损伤脑组织NICD、HES-1、Caspase3、IBA1表达的影响

A. 损伤脑组织NICD、HES-1、Caspase3、IBA1的电泳图;B. 损伤脑组织NICD、HES-1、Caspase3、IBA1的相对表达水平;PQQ. 吡咯喹啉醌;TBI. 颅脑损伤;与假手术组相比,\* $P<0.05$ ;与TBI组相比,# $P<0.05$

Figure 4 Influence of PQQ on the expressions of NICD, HES-1, Caspase3, and IBA1 in the injured brain tissue of TBI mice

A: Electrophoretogram of NICD, HES-1, Caspase3, and IBA1 in the injured brain tissue. B: Relative expression levels of NICD, HES-1, Caspase3, and IBA1 in the injured brain tissue. PQQ: Pyrroloquinoline quinone. TBI: Traumatic brain injury. \*  $P<0.05$  compared with the sham operation group. #  $P<0.05$  compared with the TBI group.



等)。Notch 信号是神经元发育和发育的基础<sup>[13]</sup>,多种脑损伤均可激活 Notch 信号<sup>[5,14]</sup>,但是对其发挥的作用却报道不一。在脑缺血模型中,阻断 Notch 信号可以改善神经功能<sup>[15]</sup>,但同样在此类模型中也发现激活的 Notch 信号通过减轻凋亡发挥了脑保护的作用<sup>[15]</sup>。类似的,在一些关于药物干预减轻脑损伤的研究中,既有药物抑制 Notch 信号发挥脑保护作用<sup>[16]</sup>,也有药物激活 Notch 信号减轻卒中后脑损伤的报道<sup>[17]</sup>。这些差异可能和实验动物的选择及实验条件的不同有关。我们在先前的小鼠 TBI 研究中发现某些药物可能通过激活 Notch 信号发挥了抗凋亡和抗炎的脑保护作用<sup>[5]</sup>,其实验动物选择及给药方式均与本研究一致。在后续工作中,我们将选择 Notch 抑制剂或基因敲除小鼠进一步验证其治疗机制。

综上所述,PQQ 可能通过激活 Notch 信号通路,从而抑制 TBI 后神经元凋亡和炎症反应,减轻脑水肿并改善神经功能,发挥脑保护作用。

**【伦理学声明】:**所有动物实验均按照《实验动物-动物福利伦理审查指南》的伦理标准进行。本研究方案于 2023 年 3 月 1 日经空军军医大学实验动物伦理委员会批准,批号为 20240427

**【利益冲突声明】:**本文不存在任何利益冲突。

**【作者贡献声明】:**王凯、王利负责实验操作;伊西才负责数据分析;王彦刚负责课题指导和论文修改。

【参考文献】

[1] SCHMIDT OI, HEYDE CE, ERTEL W, *et al.* Closed head injury--an inflammatory disease [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2005, 48(2): 388-399.

[2] YAMADA Y, NISHII K, KUWATA K, *et al.* Effects of pyrroloquinoline quinone and imidazole pyrroloquinoline on biological activities and neural functions [J]. Heliyon, 2020, 6(1): e3240.

[3] YANG C, YU L, KONG L, *et al.* Pyrroloquinoline quinone (PQQ) inhibits lipopolysaccharide induced inflammation in part via down-regulated NF- $\kappa$ B and p38/JNK activation in microglial and attenuates microglia activation in lipopolysaccharide treatment mice [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109502.

[4] ZHANG Q, DING M, CAO Z, *et al.* Pyrroloquinoline quinone protects rat brain cortex against acute glutamate-induced neurotoxicity [J]. Neurochem Res, 2013, 38(8): 1661-1671.

[5] WANG K, ZHANG L, RAO W, *et al.* Neuroprotective effects of crocin against traumatic brain injury in mice: involvement of notch

signaling pathway [J]. Neurosci Lett, 2015, 591: 53-58.

[6] HATASHITA S, HOFF J T, SALAMAT S M. Ischemic brain edema and the osmotic gradient between blood and brain [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1988, 8(4): 552-559.

[7] MAZZEO A T, BEAT A, SINGH A, *et al.* The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI [J]. Exp Neurol, 2009, 218(2): 363-370.

[8] KREUTZBERG GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS [J]. Trends Neurosci, 1996, 19(8): 312-318.

[9] ROCK RB, GEKKER G, HU S, *et al.* Role of microglia in central nervous system infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 942-964.

[10] JONES NC, PRIOR MJ, BURDEN-TEH E, *et al.* Antagonism of the interleukin-1 receptor following traumatic brain injury in the mouse reduces the number of nitric oxide synthase-2-positive cells and improves anatomical and functional outcomes [J]. Eur J Neurosci, 2005, 22(1): 72-78.

[11] SHOHAMI E, GALLILI R, MECHOULAM R, *et al.* Cytokine production in the brain following closed head injury: dexamethasone (DEX) is a novel TNF- $\alpha$  inhibitor and an effective neuroprotectant [J]. J Neuroimmunol, 1997, 72(2): 169-177.

[12] CLARK RS, KOCHANEK PM, WATKINS SC, *et al.* Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats [J]. J Neurochem, 2000, 74(2): 740-753.

[13] KOPAN R, ILAGAN MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J]. Cell, 2009, 137(2): 216-233.

[14] ARUMUGAM TV, CHAN SL, JO DG, *et al.* Gamma secretase-mediated Notch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemic stroke [J]. Nat Med, 2006, 12(6): 621-623.

[15] YANG Q, YAN W, LI X, *et al.* Activation of canonical notch signaling pathway is involved in the ischemic tolerance induced by sevoflurane preconditioning in mice [J]. Anesthesiology, 2012, 117(5): 996-1005.

[16] WANG JJ, ZHU JD, ZHANG XH, *et al.* Neuroprotective effect of Notch pathway inhibitor DAPT against focal cerebral ischemia/reperfusion 3 hours before model establishment [J]. Neural Regen Res, 2019, 14(3): 452-461.

[17] HUANG S, GONG T, ZHANG T, *et al.* Zhongfenggao protects brain microvascular endothelial cells from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by angiogenesis [J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(2): 222-230.