

COX5A 通过纠正线粒体稳态失衡缓解脑外伤引发的小鼠神经损伤

刘光彩¹⁾, 黄泓晨²⁾, 陈红兰³⁾, 姜 水¹⁾, 习杨彦彬²⁾, 杨 旭¹⁾

(1)昆明医科大学第二附属医院医学检验科, 云南 昆明 650101; 2)昆明医科大学神经科学
研究院, 云南 昆明 650500; 3)云南省第三人民医院医学检验科, 云南 昆明 650011)

[摘要] **目的** 探讨细胞色素 c 氧化酶亚基 5A(cytochrome c oxidase subunit 5A, COX5A)过表达对创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)小鼠的神经保护作用及其与线粒体功能的关系。**方法** 将 4~6 周龄 C57BL/6J 野生型(wild type, WT)小鼠及同龄 COX5A 过表达(COX5A-UP)转基因小鼠随机分为 WT+假手术组、WT+TBI 组、COX5A-UP+假手术组和 COX5A-UP+TBI 组($n = 12$, 雌雄各半), 采用可控皮质冲击法制备 TBI 模型。术后 14 d 评估神经行为学表现、脑含水量、海马突触体线粒体氧消耗率、ATP、活性氧、丙二醛、线粒体膜电位及线粒体超微结构。**结果** 与 WT+假手术组相比, WT+TBI 组神经功能和行为学表现受损, 脑含水量升高, 突触体线粒体能量代谢下降、氧化应激增强, 并出现线粒体形态破坏($P < 0.05$)。与 WT+TBI 组相比, COX5A-UP+TBI 组上述神经行为学异常、脑水肿及线粒体功能和结构损伤均改善($P < 0.05$)。**结论** COX5A 过表达可减轻 TBI 诱导的神经功能损伤, 其作用可能与改善突触体线粒体功能障碍和维持线粒体结构稳态有关。

[关键词] 细胞色素 c 氧化酶亚基 5A; 创伤性脑损伤; 线粒体稳态失衡; 神经保护; 小鼠模型; 行为学

[中图分类号] R651.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X(2026)07 - 0011 - 09

COX5A Relieves Traumatic Brain Injury-Induced Neurological Damage in Mice by Correcting Mitochondrial Homeostasis Imbalance

LIU Guangcai¹⁾, HUANG Hongchen²⁾, CHEN Honglan³⁾, JIANG Shui¹⁾,
XIYANG Yanbin²⁾, YANG Xu¹⁾

(1) *Department of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101;* 2) *Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500;* 3) *Department of Laboratory Medicine, The Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650011, China)*

[Abstract] **Objective** To investigate the neuroprotective effect of cytochrome c oxidase subunit 5A (COX5A) overexpression in mice with traumatic brain injury (TBI) and its association with mitochondrial function. **Methods** C57BL/6J wild-type (WT) mice aged 4 - 6 weeks and age-matched COX5A-overexpressing (COX5A-UP) transgenic mice were randomly divided into WT+sham operation group, WT+TBI group, COX5A-UP+sham operation group, and COX5A-UP+TBI group ($n = 12$ per group, male : female = 1 : 1). The TBI model was established using the controlled cortical impact method. At 14 days after surgery, neurological and behavioral performance, brain water content, oxygen consumption rate of hippocampal synaptosomal mitochondrial, ATP levels, reactive oxygen species, malondialdehyde, mitochondrial membrane potential and mitochondrial

[收稿日期] 2025 - 11 - 16

[基金项目] 国家自然科学基金(82560226); 昆明医科大学特色学科团队病理学团队(2024XKTDTS11)

[作者简介] 刘光彩(1986~), 女, 云南文山山人, 医学学士, 副主任技师, 主要从事临床基础检验及骨髓细胞形态检验工作。黄泓晨(2001~), 男, 湖北武汉人, 在读硕士研究生, 主要从事神经科学研究工作。黄泓晨与刘光彩对本文具有同等贡献。

[通信作者] 杨旭, E-mail: yx8250696@163.com

ultrastructure were examined. **Results** Compared with the WT+sham group, WT+TBI group showed impaired neurological and behavioral performance, increased brain water content, reduced mitochondrial energy metabolism, enhanced oxidative stress and mitochondrial morphological damage ($P < 0.05$). Compared with the WT+TBI group, the COX5A-UP+TBI group showed improvements in these neurological, behavioral, edema-related and mitochondrial abnormalities ($P < 0.05$). **Conclusion** COX5A overexpression alleviates TBI-induced neurological impairment, and this effect may be associated with amelioration of synaptosomal mitochondrial dysfunction and preservation of mitochondrial structural homeostasis.

[**Key words**] COX5A; Traumatic brain injury; Mitochondrial dyshomeostasis; Neuroprotection; Mouse model; Behavior

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是由外部机械力导致的脑组织损伤, 是青壮年致残和致死的重要原因之一^[1]。TBI 可造成认知障碍、运动功能障碍、语言沟通困难等长期神经功能损害^[2]; 重症患者还可能出现颅内压升高、脑疝及持续意识障碍等严重结局^[3]。此外, 部分患者可伴随情绪波动、焦虑抑郁、攻击性行为或创伤后应激障碍等精神行为异常^[4]。由于 TBI 常需长期康复治疗, 并可能增加慢性创伤性脑病及其他神经退行性疾病风险, 其疾病负担十分突出^[5-6]。目前, 针对 TBI 继发性损伤的有效干预手段仍有限, 亟需寻找新的治疗靶点。

细胞色素 c 氧化酶 (cytochrome c oxidase, COX) 是线粒体电子传递链的终端酶复合体, 也是氧化磷酸化过程中的关键组成部分^[7]。细胞色素 c 氧化酶亚基 5A (cytochrome c oxidase subunit 5A, COX5A) 是 COX 复合体的重要核编码亚基, 参与调节 COX 酶活性及复合体组装^[8-9]。既往研究提示, COX5A 表达或功能异常与线粒体能量代谢紊乱、肿瘤发生发展、心肌损伤及神经退行性病变等过程相关^[8-10], 提示其可能是维持高能耗细胞, 尤其是神经元功能稳态的重要分子。已有研究从细胞生物学和脑老化角度提示 COX5A 可能参与神经功能调节^[8-9], 但其在 TBI 等急性中枢神经系统损伤中的作用仍缺乏系统证据。

本研究基于 COX5A 过表达转基因小鼠, 观察 TBI 后 COX5A 表达的动态变化, 并从神经功能、行为学、脑水肿、海马突触体线粒体功能及超微结构等层面评价 COX5A 过表达的保护作用, 以期从线粒体稳态角度阐释 TBI 继发性损伤机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

本研究采用遗传背景为 C57BL/6J 的 4~6 周

龄 COX5A 过表达转基因小鼠 (COX5A-UP, 课题组前期自建转基因小鼠品系; 转基因鼠构建方法及应用已获得中国发明专利授权保护, 专利号 ZL201810171251.4)^[9] 作为研究对象, 同窝同月龄野生型 (wild type, WT) 小鼠作为对照。WT 及 COX5A-UP 小鼠分别随机分为假手术组和 TBI 组, 共 4 组: WT+假手术组、WT+TBI 组、COX5A-UP+假手术组、COX5A-UP+TBI 组, 每组 12 只, 雌雄各半。

实验小鼠饲养于标准动物设施, 给予标准饲料和饮水, 光照周期为 12 h/12 h, 环境温度为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。所有动物实验均经昆明医科大学实验动物伦理委员会批准 (kmmu 20230067)。

1.2 小鼠脑外伤模型制备

本研究采用既往报道的可控皮质冲击 (controlled cortical impact, CCI) 法制备 TBI 模型^[12-13]。简要步骤如下: 麻醉后, 将小鼠固定于立体定向装置, 并在右侧顶叶皮层诱导中度 CCI。CCI 参数为冲击速度 6.0 m/s、深度 1.0 mm、接触时间 200 ms、组织变形 2.0 mm。假手术组除不接受 CCI 损伤外, 其余操作与 TBI 组一致。手术结束后, 小鼠置于 26°C 恒温垫上待麻醉苏醒, 随后分笼饲养。

1.3 改良神经功能评分

采用改良神经功能评分 (modified neurological severity score, mNSS) 评估小鼠神经功能, 评分范围为 0~14 分。该评分体系包括运动、感觉、反射和平衡等测试项目^[14-15]。在 TBI 后 14 d 进行 mNSS 评估。由 3 名对动物分组不知情的研究人员根据评分标准独立完成评分, 取平均值用于统计分析。小鼠不能完成相应测试或缺乏相应反射时记 1 分, 分值越高表示神经功能缺损越重。

1.4 小鼠脑含水量检测

为评估 TBI 后脑水肿情况, 本研究采用干湿重法检测造模后 14 d 小鼠脑含水量。各组小鼠于相应时间点取脑, 分离目标脑组织后立即称取湿重, 随后置于 100°C 恒温干燥箱中干燥 24 h 至恒重,

称取干重。脑含水量按公式计算：脑含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.5 旷场实验

按照既往方案进行旷场实验，以评估小鼠术后自发活动和焦虑样行为^[16]。将小鼠置于 40 cm × 40 cm × 40 cm 的开放场地内，记录 10 min 内的总移动距离、直立次数及中心区域停留时间。实验结束后清洁场地，以避免气味影响后续测试。

1.6 新物体识别任务

新物体识别(novel object recognition, NOR)任务按照既定方案进行^[17]，测试场地与旷场实验相同(40 cm × 40 cm × 40 cm)。测试物体高度为 4~5 cm，由形状、纹理、颜色和大小不同的玻璃或塑料材料组成。在 5 min 训练阶段，将小鼠置于场地中央并允许其探索两个相同物体。

训练结束 1 h 后，将小鼠重新放入场地进行 10 min 测试，其中一个熟悉物体被形状和颜色不同但高度相近的新物体替代。物体探索定义为小鼠用鼻部或前爪直接接触物体。

正式测试阶段记录小鼠探索新物体和熟悉物体的时间，并计算识别指数(discrimination index, DI): $DI=(NT-FT)/(NT+FT)$ 。其中，NT 为探索新物体时间，FT 为探索熟悉物体时间。DI 用于反映小鼠识别并区分新、熟悉物体的能力。

1.7 透射电镜检测(transmission electron microscopy, TEM)与线粒体分析

从海马区域随机选择神经元并采集 TEM 图像^[18]。按照文献方法分析各组小鼠海马线粒体形态^[19]。简要而言，使用 FIJI 软件追踪每个细胞内的线粒体，并进行颗粒分析以获得 Feret 直径和最小直径；随后计算二者比值作为线粒体长径比。每只小鼠约分析 300~400 个线粒体，并取平均值用于统计分析，以比较 TBI 后 WT 与 COX5A-UP 小鼠线粒体形态差异。

1.8 海马突触体提取与线粒体功能测试

1.8.1 分离突触体 为探讨 TBI 后认知和行为学损害的线粒体能量代谢基础，本研究分离海马突触体并使用 Seahorse XFe96 分析仪检测 OCR。动物经快速脱颈处死后立即分离海马突触体。海马组织置于含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 Syn-PER 试剂(ThermoFisher 87793)中，并用玻璃 Dounce 匀浆器匀浆。样品于 4℃、3276 r/min(1200×g)离心 10 min，取上清转移至新管；随后于 4℃、3660 r/min(1500×g)离心 20 min。弃上清后，将沉淀重悬于相应培养基中。

1.8.2 线粒体生物能量学检测 进行生物能量学检测时，将分离的突触体重悬于 XF RPMI 培养基(Agilent 103681)中，并加入 1 mmol/L 丙酮酸、2 mmol/L 谷氨酰胺和 10 mmol/L 葡萄糖。随后将样品接种于 XFe96 Flux Pak(Agilent 102601)提供的 96 孔细胞微孔板中，每孔 20 μg。样品于 4℃、4230 r/min(2000×g)离心 20 min 后，使用 Seahorse XFe96 分析仪进行 Cell Mito Stress Test(Agilent 103015)。取每一检测阶段 3 个读数的平均值，备用呼吸容量按最大呼吸与基础呼吸之差计算。

1.8.3 突触体线粒体 ATP、ROS、MMP、MDA 检测 ATP 水平采用 ATP 比色/荧光检测试剂盒(Abcam, ab83355, USA)检测，并按说明书操作。根据制造商说明书(MAK085, Sigma-Aldrich)用脂质过氧化测定试剂盒定量 MDA。各组小鼠海马组织在含有丁酸羟甲基苯的裂解缓冲液中均质，离心，收集上清。在样品中加入硫代巴比妥酸，在 95℃ 下孵育 60 min，然后在冰上冷却 10 min。在 532 nm 处读取吸光度，从标准曲线内插浓度，并与样品的蛋白质含量归一化。活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP/ΔΨ_m)参照既往方案检测^[20]，其中 MMP 通过 TMRM 荧光值进行量化，用于评估 TBI 后氧化应激水平和线粒体膜完整性。

1.9 RT-qPCR

总 RNA 使用 TRIzol 法从小鼠脑组织中提取，经微量分光光度计检测合格后(OD 260/280 比值为 1.9~2.1)用于后续实验。在假手术组及 TBI 后 1、3、7、14、21、28 d 检测小鼠海马组织中 COX5A mRNA 表达水平。采用商业逆转录试剂盒将 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green 法进行，反应体系包含 cDNA 模板、特异性引物及预混试剂。反应程序为 95℃ 预变性 30 s；随后进行 40 个循环：95℃ 变性 10 s，60℃ 退火/延伸 30 s。每个样本设置 3 个技术重复，以 GAPDH 为内参基因，采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	序列(5'-3')
COX5A	F: 5'-GGTCAAACCCAACAGAAG-3'
COX5A	R: 5'-TGTCCTGTCGCCATCAATAT-3'
GAPDH	F: 5'-GTCCTTGATCACCCGATTTC-3'
GAPDH	R: 5'-TCCTGTGTGCTTCCATTTC-3'

1.10 Western blot

组织蛋白使用含蛋白酶及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取。在假手术组及 TBI 后 1、3、7、14、21、28 d 检测小鼠海马组织中 COX5A 蛋白水平。经 BCA 法测定蛋白浓度后, 等量蛋白样品与上样缓冲液混合并煮沸变性, 经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转印至 PVDF 膜。膜经快速封闭液封闭后, 于 4 °C 与一抗孵育过夜, 一抗及稀释比例如下: 抗 COX5A (1 : 1 000)、抗 GAPDH (1 : 10 000)。次日, 膜经 TBST 洗涤后, 与辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 2 h。使用 ECL 化学发光底物显影, 并通过成像系统采集信号。条带灰度值采用 ImageJ 软件分析, 以目的蛋白与 GAPDH 灰度比值表示相对表达水平。

1.11 统计学分析

所有统计分析均使用 GraphPad Prism 10.1.2 (GraphPad Software, Inc.) 进行, 所有定量分析均采用盲法完成。数据以均数 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SEM) 表示, 单个数据点代表单个样本或动物。组间比较采用双因素方差分析 (two-way ANOVA) 及 Tukey 事后检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠脑损伤后 14 天神经功能评分及脑含水量测定

2.1.1 改良神经功能评分 假手术组小鼠未出现明显神经功能缺损, 见图 1A。与 WT+假手术组相比, WT+TBI 组 mNSS 评分升高 ($P < 0.0001$),

提示 TBI 导致明显神经功能损伤。与 WT+TBI 组相比, COX5A-UP+TBI 组 mNSS 评分降低 ($P < 0.0001$), 提示 COX5A 过表达可促进 TBI 后神经功能恢复。

2.1.2 脑含水量 与 WT+假手术组相比, WT+TBI 组脑含水量升高 ($P < 0.01$), 见图 1B, 提示 TBI 诱导脑水肿。与 WT+TBI 组相比, COX5A-UP+TBI 组脑含水量降低 ($P < 0.0001$), 但仍高于 WT+假手术组 ($P < 0.0001$), 表明 COX5A 过表达可部分减轻 TBI 后脑水肿。

2.2 小鼠 TBI 后 14 d 行为学评估结果

2.2.1 旷场行为学实验 伤后 14 d 进行旷场实验以评估小鼠自发活动及探索行为。与 WT+假手术组相比, WT+TBI 组 10 min 内总移动距离减少 ($P < 0.001$), 中心区域停留时间降低 ($P < 0.01$), 见图 2A ~ 2C, 提示 TBI 后小鼠活动能力及开放区域探索行为受损。与 WT+TBI 组相比, COX5A-UP+TBI 组总移动距离增加, 中心区域停留时间延长 ($P < 0.05$), 说明 COX5A 过表达可改善 TBI 后行为学异常。

2.2.2 新物体识别实验 为评估 TBI 及 COX5A 过表达对小鼠识别记忆的影响, 本研究采用新物体识别实验, 并以 DI 作为记忆能力评价指标。

与 WT+假手术组相比, WT+TBI 组 DI 降低 ($P < 0.0001$), 见图 2D, 表明 TBI 明显损害小鼠识别记忆。与 WT+TBI 组相比, COX5A-UP+TBI 组 DI 升高 ($P < 0.001$), 提示 COX5A 过表达可改善 TBI 诱导的识别记忆障碍。

2.3 海马突触体线粒体生物能量学检测

结果表明, TBI 后突触体线粒体呼吸功能受

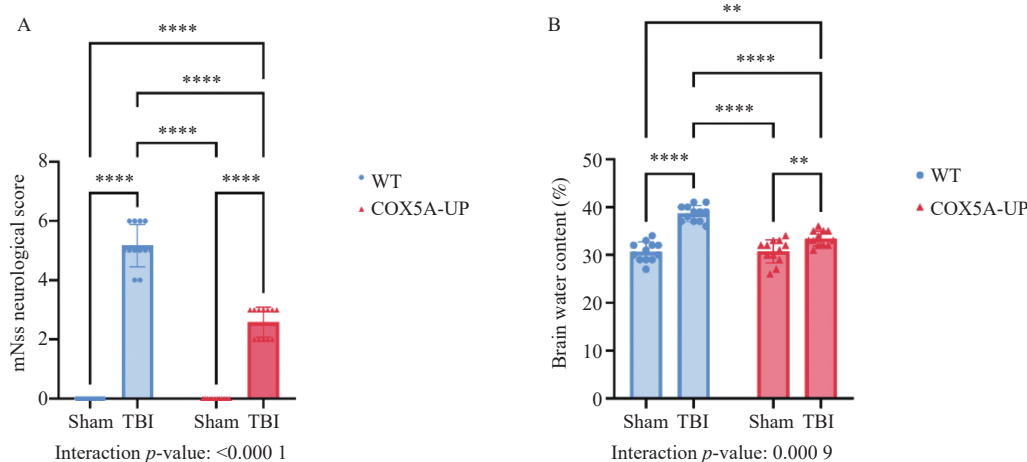


图 1 各组小鼠脑损伤后 14 d 神经功能评分及脑含水量测定 (mean $\pm$ SEM, $n = 12$)

Fig. 1 Neurological function scores and brain water content in each group at 14 days after brain injury (mean $\pm$ SEM, $n = 12$)

A: 伤后 14 d mNSS 评分; B: 脑组织含水量 (%). 采用双因素方差分析及 Tukey 事后检验. ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$.

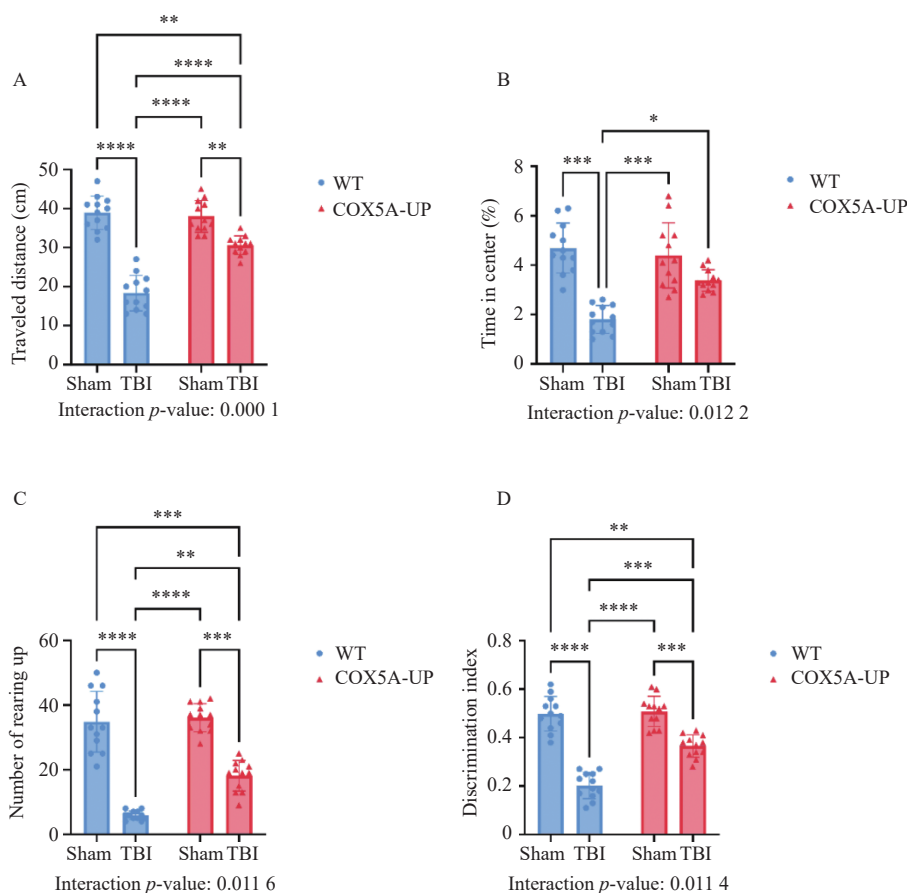


图2 各组小鼠脑损伤后14 d神经行为学评估 [(mean ± SEM), $n = 12$]

Fig. 2 Neurobehavioral evaluation in each group at 14 days after brain injury [(mean ± SEM), $n = 12$]

A: 旷场实验中小鼠总移动距离(cm); B: 旷场实验中小鼠中心区域停留时间占比(%); C: 旷场实验中小鼠直立次数; D: 新物体识别实验中小鼠识别指数。采用双因素方差分析及 Tukey 事后检验。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

损, 而 COX5A 过表达可改善相关指标, 见图 3A。

与 WT+假手术组相比, WT+TBI 组基础呼吸降低($P < 0.0001$), 见图 3B, 提示 TBI 损害突触体线粒体基础能量代谢。与 WT+TBI 组相比, COX5A-UP+TBI 组基础呼吸升高($P < 0.001$), 见图 3B。

最大呼吸能力反映线粒体在高能量需求状态下的呼吸潜力。WT+TBI 组最大呼吸低于 WT+假手术组($P < 0.0001$), 见图 3C; COX5A-UP+TBI 组最大呼吸高于 WT+TBI 组($P < 0.0001$), 见图 3C, 提示 COX5A 过表达可改善 TBI 后突触体线粒体呼吸储备。

备用呼吸容量由最大呼吸与基础呼吸之差计算。WT+TBI 组备用呼吸容量低于 WT+假手术组($P < 0.0001$), 见图 3D; COX5A-UP+TBI 组备用呼吸容量高于 WT+TBI 组($P < 0.0001$), 见图 3D。上述结果表明, COX5A 过表达可改善 TBI 后海马突触体线粒体生物能量学障碍。

2.4 海马突触体线粒体 ATP、ROS、MMP、MDA 检测结果

为进一步评估 TBI 对突触体线粒体功能的影

响, 本研究检测能量代谢、氧化应激及膜电位相关指标。结果显示, TBI 导致突触体线粒体多重功能异常, 而 COX5A 过表达可改善这些改变。

如图 4A、4D 所示, 与 WT+假手术组相比, WT+TBI 组 ATP 水平降低($P < 0.0001$), MDA 含量升高($P < 0.0001$), 提示 TBI 后线粒体能量生成受损并伴随脂质过氧化增强。与 WT+TBI 组相比, COX5A-UP+TBI 组 ATP 水平升高($P < 0.05$), MDA 含量降低($P < 0.0001$)。

如图 4B、C 所示, 与 WT+假手术组相比, WT+TBI 组 ROS 生成增加($P < 0.0001$), MMP 升高($P < 0.0001$), 提示氧化应激加重及线粒体膜电位异常。与 WT+TBI 组相比, COX5A-UP+TBI 组 ROS 水平降低($P < 0.0001$), MMP 下降($P < 0.0001$)。

上述结果表明, COX5A 过表达可改善 TBI 后突触体线粒体能量代谢障碍, 减轻氧化损伤并维持膜电位稳定。

2.5 小鼠海马神经元线粒体形态差异

WT+假手术组神经元线粒体形态完整, 嵴结构清晰; WT+TBI 组线粒体出现肿胀、嵴结构断

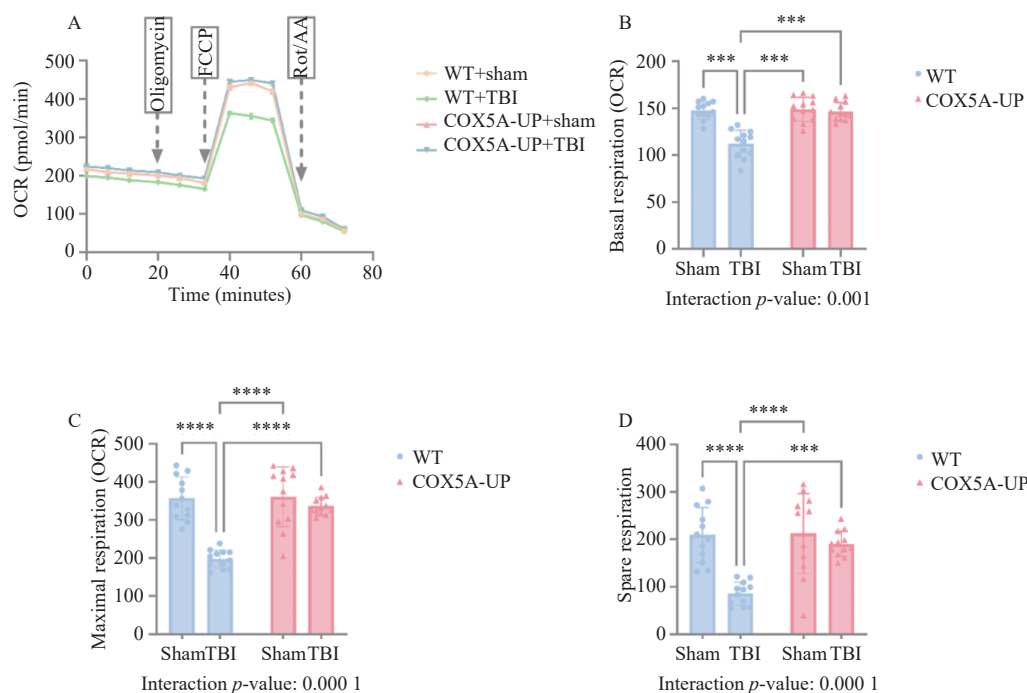


图 3 各组小鼠脑损伤后海马突触体线粒体氧耗量检测 [(mean $\pm$ SEM), $n = 12$]

Fig. 3 Oxygen consumption rate of hippocampal synaptosomal mitochondria in each group after brain injury [(mean $\pm$ SEM), $n = 12$]

A: 海马突触体线粒体氧耗曲线; B: 基础呼吸; C: 最大呼吸; D: 备用呼吸容量。采用双因素方差分析及 Tukey 事后检验。*** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

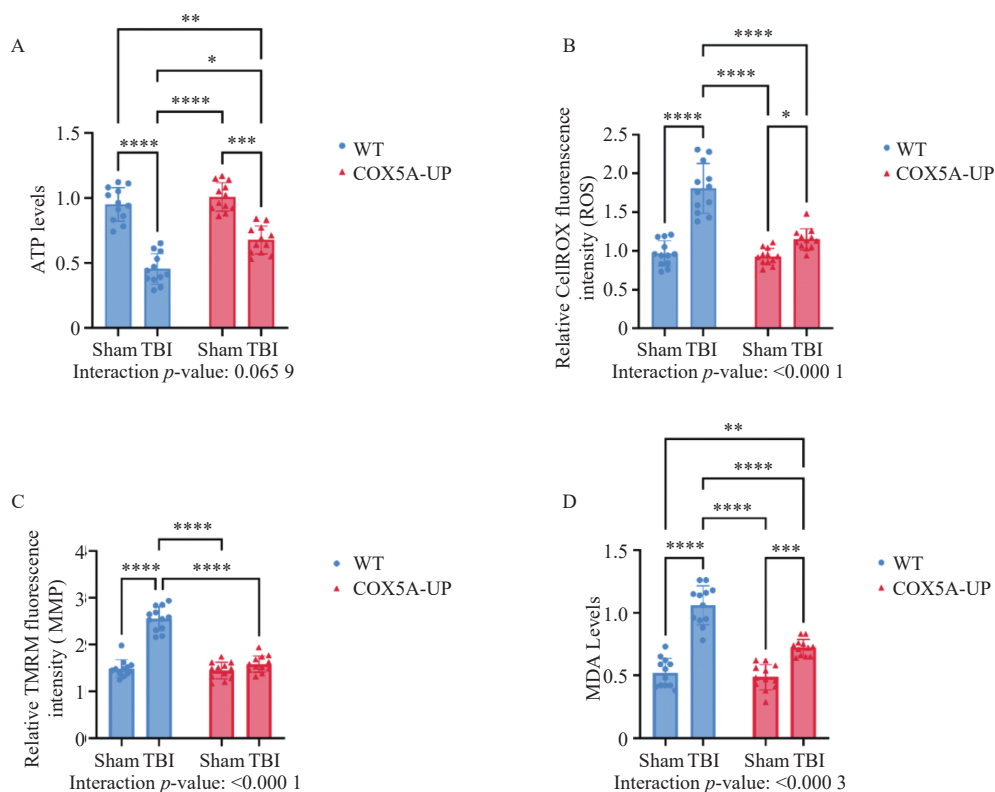


图 4 各组小鼠 TBI 后海马突触体线粒体功能检测 [(mean $\pm$ SEM), $n = 12$]

Fig. 4 Mitochondrial function assessment of hippocampal synaptosomes in each group after TBI [(mean $\pm$ SEM), $n = 12$]

A: 海马突触体线粒体 ATP 水平; B: 海马突触体线粒体 ROS 相对荧光强度; C: 海马突触体线粒体 MMP 相对荧光强度; D: 海马突触体线粒体 MDA 含量。采用双因素方差分析及 Tukey 事后检验。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

裂或消失及空泡化等改变, 见图 5。提示 TBI 导致明显线粒体超微结构损伤。

通过计算线粒体长径比(Feret 直径/最小直径)量化线粒体形态。与 WT+假手术组相比, WT+TBI 组线粒体长径比降低($P < 0.05$), 见图 5B, 提示 TBI 后线粒体趋于圆形化。

与 WT+TBI 组相比, COX5A-UP+TBI 组线粒体长径比升高($P < 0.01$), 见图 5B, 且 TEM 图像显示线粒体嵴结构和膜完整性较 WT+TBI 组改善, 见图 5A。该结果提示 COX5A 过表达可减轻 TBI 诱导的线粒体结构损伤。

2.6 TBI 后不同时间点 COX5A 表达水平的动态变化
为明确 TBI 后 COX5A 表达的时序性特征, 本研究采用 Western blot 和 qPCR 检测假手术组

及 TBI 后 1、3、7、14、21、28 d 小鼠海马组织中 COX5A 蛋白及 mRNA 水平, 见图 6。结果显示, 与假手术组相比, TBI 后 COX5A 蛋白及 mRNA 表达逐渐下降, 于损伤后 14 d 降至最低(蛋白表达下降约 40%, mRNA 下降约 45%, $P < 0.001$), 且低于其他时间点($P < 0.01$)。此后 21 d 和 28 d 表达略有回升, 但仍低于假手术组水平($P < 0.05$)。该结果提示 TBI 后 14 d 为 COX5A 表达抑制较明显的阶段, 可能与该时间点线粒体生物能量学障碍、氧化应激加重及神经功能缺损有关。

3 讨论

本研究围绕 COX5A 在 TBI 后的神经保护作用

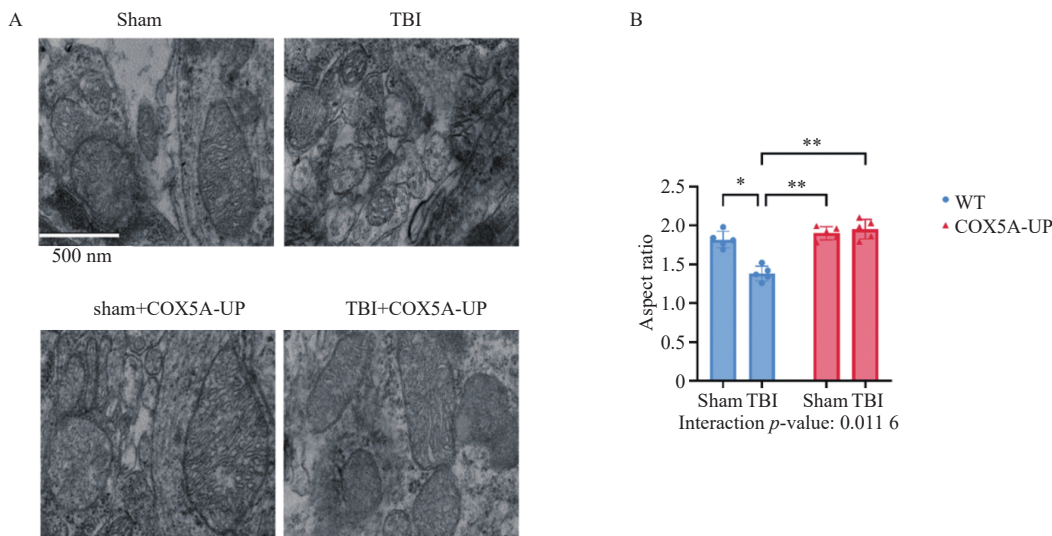


图 5 各组小鼠 TBI 后海马神经元线粒体超微结构及形态学定量 [(mean $\pm$ SEM), $n = 5$]

Fig. 5 Mitochondrial ultrastructure and morphological quantification of hippocampal neurons in each group after TBI [(mean $\pm$ SEM), $n = 5$]

A: 各组小鼠 TEM 代表图 ($\times 20\,000$, scale bar = 500 nm); B: 线粒体长径比定量结果。每只动物量化 300 ~ 400 个线粒体后取平均值; 采用双因素方差分析及 Tukey 事后检验。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

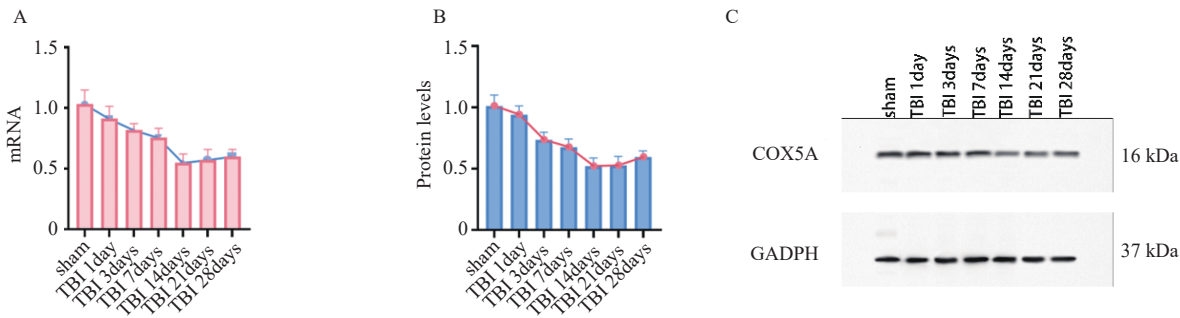


图 6 TBI 后不同时间点 COX5A 表达水平的动态变化 (mean $\pm$ SEM, $n = 12$)

Fig. 6 Dynamic changes in COX5A expression levels at different time points after TBI (mean $\pm$ SEM, $n = 12$)

A: TBI 后海马组织 COX5A mRNA 表达动态变化; B: TBI 后海马组织 COX5A 蛋白表达定量结果; C: TBI 后海马组织 COX5A 蛋白 Western blot 条带图。

进行了系统评价。结果显示, TBI 后小鼠出现明显神经功能缺损、脑含水量升高、活动及识别记忆受损, 同时伴随海马突触体线粒体 OCR 下降、ATP 生成减少、ROS 和 MDA 升高、MMP 异常及线粒体超微结构破坏。COX5A 过表达可不同程度改善上述异常, 提示其保护作用可能与维持突触体线粒体功能和结构稳态密切相关。既往研究认为 COX5A 参与线粒体复合体 IV 功能调控, 并与细胞能量代谢及神经功能变化有关^[7-11]。本研究结果与上述认识基本一致, 并将 COX5A 相关研究从脑老化、肿瘤或心肌损伤等背景进一步扩展至急性 TBI 模型。

TBI 继发性损伤的重要特征之一是线粒体功能障碍, 包括电子传递链效率下降、ATP 生成不足和氧化应激增强^[11, 21]。本研究中, WT+TBI 组基础呼吸、最大呼吸和备用呼吸容量均明显降低, 同时 ATP 下降、ROS 及 MDA 升高, 说明 TBI 后海马突触体线粒体能量代谢和抗氧化能力均受损。COX5A-UP+TBI 组上述指标得到改善, 提示 COX5A 过表达可能通过提高复合体 IV 相关电子传递效率, 减少电子泄漏和 ROS 过量生成, 从而缓解氧化损伤并改善能量供应。该推断与既往关于 COX5A 参与氧化磷酸化调控及 COX5A 过表达改善细胞能量代谢损伤的研究结果相吻合^[8-9]。不过, 本研究尚未直接检测 COX 复合体酶活性、复合体组装状态或电子传递链各复合体功能, 因此 COX5A 改善线粒体功能的直接分子环节仍需进一步验证。

近年来, 国内相关研究也从不同神经损伤或神经退行性疾病模型中支持“线粒体功能障碍-氧化应激-细胞死亡/神经炎症”这一病理链条: 例如, 线粒体功能障碍和 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬被认为与神经退行性疾病进展密切相关^[22-24]; 脑缺血/缺氧及神经退行性细胞模型相关研究显示, 神经干细胞源性外泌体、五味子乙素及槲皮素等干预可通过减轻氧化应激、调节线粒体自噬或改善细胞损伤相关信号发挥神经保护作用^[25-27]; 在创伤性或脊髓损伤相关研究中, 调节炎症反应、自噬及干细胞相关信号可促进神经功能或认知功能改善^[28-30]; 此外, 脑出血后继发性脑损伤中铁死亡和 Nrf2 通路的研究亦提示氧化应激相关细胞死亡可能是中枢神经系统损伤干预的重要环节^[31]。

除功能指标外, 本研究还观察到 TBI 后海马神经元线粒体出现肿胀、嵴结构破坏及长径比降低, 而 COX5A 过表达可改善上述超微结构异常。

线粒体形态改变通常与能量代谢下降、膜电位异常及细胞应激反应密切相关^[18-19]。因此, 本研究中 COX5A 对线粒体形态的保护, 可为其改善 OCR、ATP 和 MMP 等功能指标提供结构学依据。行为学方面, COX5A-UP+TBI 组 mNSS 评分降低、旷场表现和新物体识别能力改善, 说明线粒体保护可能进一步转化为整体神经功能获益。然而, 行为学改善与线粒体功能恢复之间仍属于相关性证据, 未来可通过 COX5A 敲低或条件性敲除模型进一步验证其因果关系。

本研究仍存在一定局限。首先, 研究主要依赖 COX5A 过表达这一增益性功能模型, 尚缺乏敲低或条件性敲除等逆向验证; 其次, 线粒体稳态不仅包括能量代谢和静态形态, 还涉及融合/分裂、线粒体自噬及质量控制等过程, 未来需进一步检测 Drp1、MFN2、PINK1/Parkin 等相关通路; 再次, 本研究线粒体功能检测集中于海马突触体, 虽与认知功能密切相关, 但尚不能全面反映损伤核心皮层或其他脑区的线粒体状态; 最后, 本研究未进一步检测 TUNEL 染色、caspase-3 表达、小胶质细胞活化及炎症因子水平, 因此尚不能直接说明 COX5A 改善线粒体功能后对细胞死亡和神经炎症的终末影响。

综上, COX5A 过表达可改善 TBI 后神经功能缺损、脑水肿及行为学异常, 并缓解海马突触体线粒体能量代谢障碍、氧化应激和超微结构损伤。COX5A 可能是 TBI 继发性线粒体损伤干预的潜在靶点, 但其具体分子机制及转化价值仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Loane D J, Stoica B A, Faden A I. Neuroprotection for traumatic brain injury[J]. *Handb Clin Neurol*, 2015, 127: 343-366.
- [2] Arciniegas D B, Held K, Wagner P. Cognitive impairment following traumatic brain injury[J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2002, 4(1): 43-57.
- [3] Shibahashi K, Nishimura S, Sugiyama K, et al. Initial results of empirical cryoprecipitate transfusion in the treatment of isolated severe traumatic brain injury: use of in-house-produced cryoprecipitate[J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2019, 59(10): 371-378.
- [4] Ahmed S, Venigalla H, Mekala H M, et al. Traumatic brain injury and neuropsychiatric complications[J]. *Indian J Psychol Med*, 2017, 39(2): 114-121.

- [5] Bradbury C L, Wodchis W P, Mikulis D J, et al. Traumatic brain injury in patients with traumatic spinal cord injury: clinical and economic consequences[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2008, 89(12): S77-S84.
- [6] Takahata K, Tabuchi H, Mimura M. Late-onset neurodegenerative diseases following traumatic brain injury: chronic traumatic encephalopathy (CTE) and Alzheimer's disease secondary to TBI (AD-TBI) [J]. *Brain Nerve*, 2016, 68(7): 849-857.
- [7] Gowans F A, Thach D Q, Zhu Z, et al. Ophiobolin A covalently targets mitochondrial complex IV leading to metabolic collapse in cancer cells[J]. *ACS Chem Biol*, 2024, 19(6): 1260-1270.
- [8] Zhang P, Chen Z, Lu D, et al. Overexpression of COX5A protects H9c2 cells against doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(1): 43-49.
- [9] Xiyang Y B, Liu R, Wang X Y, et al. COX5A plays a vital role in memory impairment associated with brain aging via the BDNF/ERK1/2 signaling pathway[J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 215.
- [10] Nishigaki R, Osaki M, Hiratsuka M, et al. Proteomic identification of differentially expressed genes in human gastric carcinomas[J]. *Proteomics*, 2005, 5(12): 3205-3213.
- [11] Patergnani S, Morciano G, Carinci M, et al. The mitochondrial stress responses: the Dr. Jekyll and Mr. Hyde of neuronal disorders[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(12): 2563-2575.
- [12] Fox G B, Fan L, Levasseur R A, et al. Sustained sensory/motor and cognitive deficits with neuronal apoptosis following controlled cortical impact brain injury in the mouse[J]. *J Neurotrauma*, 1998, 15(8): 599-614.
- [13] Hu T, Zhou F J, Chang Y F, et al. miR21 is associated with the cognitive improvement following voluntary running wheel exercise in TBI mice[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 57(1): 114-122.
- [14] Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(2): 281-290.
- [15] Li Y, Chen J, Wang L, et al. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells[J]. *Neurology*, 2001, 56(12): 1666-1672.
- [16] Kikutani K, Hosokawa K, Giga H, et al. Genetic deletion of translocator protein exacerbates post-sepsis syndrome with activation of the C1q pathway in septic mouse model[J]. *Shock*, 2023, 59(1): 82-90.
- [17] Figueiredo C P, Clarke J R, Ledo J H, et al. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight A β oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(23): 9626-9634.
- [18] Li S, Yan G J, Tan Y X, et al. Reduced expression of voltage-gated sodium channel beta 2 restores neuronal injury and improves cognitive dysfunction induced by A β 1-42[J]. *Neural Plast*, 2022, 2022: 3995227.
- [19] Manczak M, Calkins M J, Reddy P H. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(13): 2495-2509.
- [20] Wang X, Su B, Lee H G, et al. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(28): 9090-9103.
- [21] van Hameren G, Muradov J, Minarik A, et al. Mitochondrial dysfunction underlies impaired neurovascular coupling following traumatic brain injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 186: 106269.
- [22] 武孔佳, 豆舒乾, 王媛, 等. PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬在神经退行性疾病发展中的影响研究 [J]. *昆明医科大学学报*, 2025, 46(6): 1-8.
- [23] 翟少朋, 王满侠. 线粒体功能障碍在多发硬化发病机制中的研究进展 [J]. *河北医科大学学报*, 2024, 45(9): 1030-1036.
- [24] 刘慧, 严国纪, 吴嘉, 等. 血栓通对阿尔茨海默症模型小鼠认知功能及神经异常兴奋性的作用及其机制研究 [J]. *昆明医科大学学报*, 2024, 45(2): 23-31.
- [25] 陈珊, 赵雪, 刘若静, 等. 神经干细胞源性外泌体对脑缺血再灌注损伤后大鼠氧化应激和细胞凋亡的影响 [J]. *贵州医科大学学报*, 2024, 49(9): 1285-1292.
- [26] 巩俊英, 韩娜娜, 金芳, 等. 五味子乙素对缺氧缺血新生大鼠的脑保护作用及机制 [J]. *贵州医科大学学报*, 2024, 49(9): 1335-1340+1379.
- [27] 郭敏, 彭亚倩, 张婷, 等. 槲皮素对 N2a/APP 细胞的神经保护作用机制 [J]. *贵州医科大学学报*, 2024, 49(9): 1249-1258.
- [28] 王黎一, 习望, 张时远, 等. 奥拉西坦对脑外伤炎症状态和认知功能的影响 [J]. *河北医科大学学报*, 2025, 46(9): 1018-1026.
- [29] 宋希猛, 袁士龙, 卢子昂, 等. 基于巨噬细胞自噬探讨川芎嗪对脊髓损伤修复的分子机制 [J]. *昆明医科大学学报*, 2025, 46(7): 38-45.
- [30] 张明慧, 温江涛, 辛小梅, 等. 骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤后神经病理性疼痛大鼠的影响以及对 LPS 诱导神经元细胞的作用 [J]. *昆明医科大学学报*, 2025, 46(7): 74-83.
- [31] 侯建辉, 李强. 靶向 Nrf2-铁死亡通路抑制脑出血后继发性脑损伤研究进展 [J]. *河北医科大学学报*, 2024, 45(9): 1037-1040.