

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001375

基于 ^1H -NMR 技术的 SD 大鼠弥漫性轴索损伤
血浆代谢组学研究熊进成¹, 朱士胜², 赵 鹏³, 马若翔¹, 肖 翔¹, 李红卫⁴, 李剑波¹

(1. 重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医药高等专科学校医学技术学院生物化学教研室, 重庆 401331; 3. 遵义医药高等专科学校基础医学部病理学教研室, 遵义 563006; 4. 重庆市公安局刑警总队技术处, 重庆 400021)

【摘要】目的:采用核磁共振氢谱(^1H -NMR)结合模式识别的方法研究 SD 大鼠弥漫性轴索损伤(diffuse axonal injury, DAI)后血浆代谢的变化,探讨 ^1H -NMR 在 DAI 中应用的可行性,并筛选出 DAI 的早期差异代谢物。**方法:**采用改良的 Marmarou A 法建立 SD 大鼠 DAI 模型,分为打击致伤组($n=6$),假手术组($n=6$,给予打击致伤组相同的打击前准备,但不予以打击),于致伤后 1 d 抽取心血,分离出血浆。应用 ^1H -NMR 结合模式识别技术对大鼠血浆进行代谢组学分析,筛选差异代谢物。**结果:**通过对打击致伤组与假手术组血浆代谢组差异代谢物的相关性分析及独立样本 t 检验,筛选出相关系数 $|r| > 0.6$ 且 $P < 0.05$ 的差异代谢物。结果显示,与假手术组相比,打击致伤组血浆中丙酮酸(Pyruvate) ($r = -0.831, P = 0.019$)、赖氨酸(Lysine) ($r = -0.773, P = 0.030$)、谷氨酸(Glutamate) ($r = -0.772, P = 0.042$)、谷氨酰胺(Glutamine) ($r = -0.772, P = 0.042$)、异丁酸(Isobutyrate) ($r = -0.631, P = 0.045$)、甘油(Glycerol) ($r = -0.844, P = 0.032$) 明显升高,丙二酸二乙酯(Malonate) ($r = 0.699, P = 0.038$)、L2 ($r = 0.786, P = 0.047$)、L3 ($r = 0.666, P = 0.031$)、L4 ($r = 0.715, P = 0.022$)、L10 ($r = 0.663, P = 0.025$)、 β -葡萄糖(β -Glucose) ($r = 0.800, P = 0.030$)、 α -葡萄糖(α -Glucose) ($r = 0.808, P = 0.015$) 明显降低。**结论:**基于 ^1H -NMR 结合模式的方法对 DAI 后血浆的代谢组学分析是可行的,所筛选出的 13 种差异代谢物及其表达变化,不仅为进一步探索 DAI 的病理生理机制提供了新的研究基础;同时,对于临床 DAI 的早期诊断、治疗及法医鉴定提供了重要的方法和依据。

【关键词】弥漫性轴索损伤;代谢组学; ^1H -NMR;SD 大鼠**【中图分类号】**R651.1*5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-10-28Application of ^1H -NMR-based pattern recognition in plasma metabolomics
of rats with diffuse axonal injuryXiong Jincheng¹, Zhu Shisheng², Zhao Peng³, Ma Ruoxiang¹, Xiao Xuan¹, Li Hongwei⁴, Li Jianbo¹

(1. Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University;

2. Department of Biochemistry Faculty of Medical Technology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College;

3. Department of Pathology, Department of Basic Medicine, Zunyi Medical And Pharmaceutical College; 4.

Technical Department of Interpol Corps of the Chongqing Police Bureau)

【Abstract】Objective: To investigate the feasibility of applying ^1H -NMR-based pattern recognition in the studies of plasma metabolomics of Sprague-Dawley (SD) rats with diffuse axonal injury (DAI) and identify potential metabolic markers of DAI at early stage.

Methods: Modified Marmarou A method was used to establish the model of DAI in SD rats. All animals were sacrificed at 1 d post insult. Plasma was prepared with heart blood. ^1H -NMR technique was applied for detection of plasma samples from sham-injured group ($n=6$) and injured group ($n=6$). Pattern recognition of partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal signal correction-partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to analyze and determine the differences of plasma metabolites between the two groups. **Results:** Different metabolites between sham-injured group and injured group were found by correlation analysis and student's t test, metabolites were selected on condition that correlation coefficient $|r| > 0.6$ and $P < 0.05$.

Finally, Pyruvate ($r = -0.831, P = 0.019$), Lysine ($r = -0.773, P = 0.030$), Glutamate ($r = -0.772, P = 0.042$), Glutamine ($r = -0.772, P = 0.042$), Isobutyrate ($r = -0.631, P = 0.045$) and Glycerol ($r = -0.844, P = 0.032$) significantly increased in injured group compared with those of sham-injured group. Malonate ($r = 0.699, P = 0.038$), L2 ($r = 0.786, P = 0.047$), L3 ($r = 0.666, P = 0.031$), L4 ($r = 0.715, P = 0.022$), L10 ($r = 0.663, P = 0.025$), β -Glucose ($r = 0.800, P = 0.030$) and α -Glucose ($r = 0.808, P = 0.015$) significantly decreased in in-

作者介绍: 熊进成, Email: 353661455@qq.com,

研究方向: 法医病理学。

通信作者: 李剑波, Email: ljb2032008@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81273344); 重庆市教委科学技术研究资助项目 (编号: KJ1502703); 贵州省科技合作计划资助项目 (编号: 黔科合 LH 字[2015]7572 号); 重庆市医学科研计划资助项目 (编号: 20142121); 重庆医药高等专科学校科研计划资助项目 (编号: YGZ2014101)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170630.1044.040.html>
(2017-06-30)

jured group compared with those of sham-injured group. **Conclusion:** ^1H -NMR technique is effective in the study of plasma metabolomics of SD rats with DAI. The different metabolites may suggest the possible pathophysiological mechanism of DAI and lay the foundation for the research of early diagnosis, treatment and forensic identification of DAI.

【Key words】diffuse axonal injury; nuclear magnetic resonance; metabolomics; SD rats

弥漫性轴索损伤(diffuse axonal injury, DAI)是头部受到外伤作用后发生的一种以轴索弥漫性损伤为主要改变的原发性脑实质损伤,主要弥漫分布于脑白质。具有致残率、植物生存率和致死率高的特点,是最严重的外伤性脑损伤之一,在法医学及临床医学中十分常见^[1]。DAI 发病机制尚不明确,且缺乏特异性的临床及影像学表现,使得临床诊断、治疗仍面临较多困难。目前,DAI 的诊断金标准为组织病理学,然而,早期的 DAI 往往缺乏典型的病理学改变,使得单纯的组织病理学方法也难以在临床诊疗中推广应用,因此,进一步探索 DAI 的发病机制,寻找其可靠的生物标记物,早期诊断 DAI 是当前临床医学和法医学迫切需要解决的难题^[2]。

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的系统生物学新兴分支学科^[3],可通过比较不同病理生理状态下或刺激前后的代谢图谱,探索疾病发生发展的代谢机制,发现和筛选生物标志物^[4]。磁共振波谱法作为代谢组学中重要的研究方法之一,不仅可以在一张谱图中同时定量地检测几百种化合物,且与其他检测技术相比,具有生物样品预处理简单、可在接近生理状态的缓冲液中采集数据、检测重复性好等优点,在代谢组学中得到了广泛的应用^[5-6]。因此,本研究采用 ^1H 核磁共振波谱(^1H -nuclear magnetic resonance, ^1H -NMR) 结合模式识别的方法对 SD 大鼠 DAI 后血浆进行代谢组学分析,筛选出代表性小分子标志物,以期对 DAI 诊断提供新的方法,并为进一步探索 DAI 的代谢机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠,体重(300 ± 50) g,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要仪器 脑外伤头颅打击器(自制); Varian 600 MHz 核磁共振谱仪(美国)

1.2 实验方法

1.2.1 DAI 模型的建立及分组 采用改良的 Marmarou A^[7-8] 法建立动物 DAI 模型,具体操作如下:15 只大鼠用水合氯醛(10%, 0.35 mL/100 g)腹腔注射,麻醉成功后,充分暴露颅骨,

用牙科磷酸锌水门汀将垫片(直径 10 mm、厚 3 mm)固定于颅顶中央后,将大鼠俯卧位固定于致伤装置的海绵床上,利用悬线和滑轮将重锤(450 g)提升 1.5 m 后自由落下,垂直打击在固定于大鼠颅顶的垫片中央,打击后迅速撤离大鼠并转移至操作台上,防止再次打击。随机抽取打击后存活且无颅骨骨折的 SD 大鼠 6 只作为打击致伤组,取出垫片并消毒缝合手术切口;假手术组($n=6$)除不予打击外,其余操作与打击致伤组相同。

1.2.2 标本的收集 大鼠于打击 1 d 后用 10% 水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射,麻醉良好后,用洁净剪刀暴露胸腔,抽取右心室心血 5 mL 置于 EP 管内(肝素钠处理),离心 10 min (4 °C, 3 000 r/min),取 2 mL 上清液置于无菌无酶冻存管后转移至 -80 °C 冰箱保存。断头处死各组大鼠,取出脑组织,置于中性甲醛溶液中固定 1 周,取材制作组织切片,用于 HE 及嗜银染色观察。

1.2.3 核磁共振检测 将收集的血浆样本解冻,每个样本取 400 μL 置于 1.5 mL 离心管中,先后加入 30 μL 缓冲溶液(0.2 mol/L Na_2HPO_4 , 0.2 mol/L NaH_2PO_4 , pH=7.4) 和 170 μL 重水,涡旋混匀 1 min;离心 10 min (4 °C, 12 000 g)。吸取 500 μL 上清液置于核磁共振管中,振荡混匀。采用 Varian 600 核磁共振谱仪采集 ^1H -NMR 谱,采样频率为 599.91 Hz;采用 CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 序列采集小分子代谢物信息,CPMG 参数如下:谱宽 8 012.8 Hz,累加次数 128 次,采集时间 0.998 4 s,弛豫延迟 2.1 s,总回波时间 100 ms,温度 25 °C。在弛豫延迟期间采用预饱和方式抑制水峰。

1.2.4 数据处理 使用 MestReNova 软件(V3.0, Bruker Biospin, Germany)对谱图进行傅立叶变换,调整相位、基线以及定标等处理。傅立叶转换前乘以增宽因子为 0.5 Hz 的指数窗函数,以提高频域分辨率。以乳酸峰(δ 1.33)定标。以 δ 0.005 为积分段对 δ 0.5~9.0 区间进行分段积分,其中 δ 4.66~5.10 (残余水峰)和 δ 5.60~6.00 (尿素峰)不进行积分,进行数据归一化处理。所得数据结果输出并以 Excel 格式保存,用于模式识别分析。

1.3 统计分析

处理后的数据导入 SIMCA-P⁺(V11.0, Umetrics AB, Umea, Sweden) 软件进行多元统计分析。结果采用偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 进行处理。为强化模型内部组间的差异,对数据进行正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),得到 VIP 值, VIP>1 的变量被看作候选潜在差异代谢物。对 VIP>1 的所有代谢产物在核磁图谱中得到的数据分别进行组间的独立样本 t 检验,得到 2 组间具有统计学差异($P<0.05$)的代谢物,进一步对 2 组之间差异代谢物做相关性分析,将相关系数 $|r|>0.6$ 且 $P<0.05$ 的代谢物筛选出来认为是 2 组间的差异代谢物。

2 结果

2.1 DAI 动物模型评估

15 只接受打击的 SD 大鼠中,有 3 只死亡,死亡率为 20%,死亡时间为 (2.30 ± 0.48) min,存活的 12 只 SD 大鼠经检查后均无颅骨骨折。

HE 染色、嗜银染色显示:打击致伤组神经纤维出现不同程度的肿胀、弯曲、断裂,并可见轴索收缩球(axonal retraction ball,ARB)形成(图 1C、D 箭头所示);假手术组神经纤维排列紧密,粗细均匀,走行自然、光滑(图 1A、B)。

2.2 打击致伤组和假手术组血浆 ^1H -NMR 图谱的指认与分析

^1H -NMR 是以血浆中各种物质的氢原子作为该物质的标志,不同位置代表不同的物质,信号强弱反映该物质在各个组中的相对含量。结合每个代谢物的化学位移,裂峰情况及

耦合常数,并参照 Chenomx NMR Suite,the Human Metabolome Database (HMDB)、Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB)数据库对血浆中代谢产物进行指认,结果如图 2 所示。

2.3 PLS-DA 和 OPLS-DA 的模式识别及结果分析

图 3 示 PLS-DA 和 OPLS-DA 进行模式识别的得分图,从图中可以看出,PLS-DA 和 OPLS-DA 的模式识别法均可将打击致伤组和假手术组明显区分开。OPLS-DA 法分析 2 组样品未出现超过 95%范围(图中椭圆区域)的离群点。在 SIMCA-P 软件中,采用模型验证参数 R^2 及 Q^2 验证上述模式识别方法所建立的数学模型是否可靠;其中 R^2 代表模型对整体变异的解释能力, Q^2 代表主成分对模型变异的预测能力;通常情况下,若 R^2 、 Q^2 高于 0.5 即认为该模型稳定可靠^[9]。本实验中 PLS-DA 法的 $R^2=0.954$, $Q^2=0.846$,OPLS-DA 法的 $R^2=0.951$, $Q^2=0.808$,说明 OPLS-DA 法与 PLS-DA 法建立的模型均具有较高的稳定性,能很好地对受试样本进行分组预测。

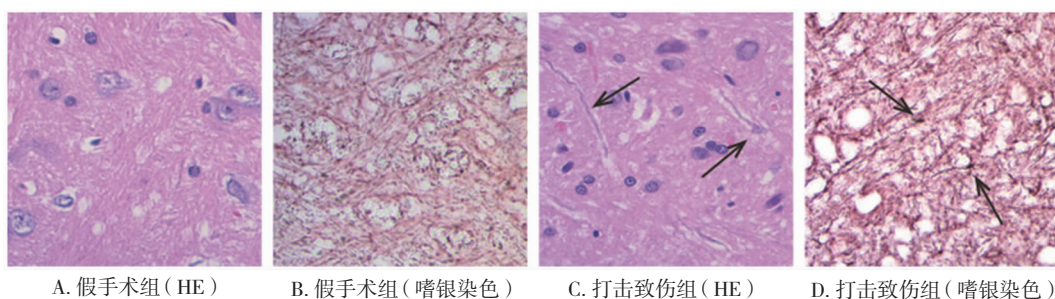
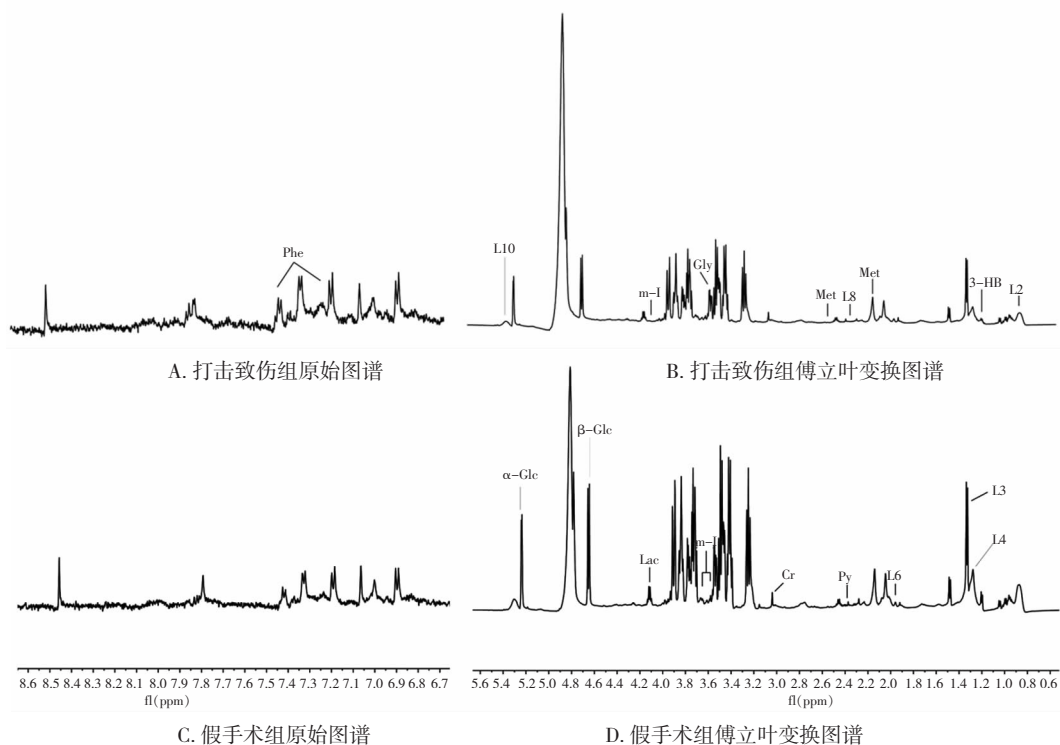


图 1 打击致伤组、假手术组 HE 染色及嗜银染色结果(400×)

Fig.1 HE staining and silver staining in injured group and sham-injured group(400×)



3-HB: 3-羟基丁酸; Cr: 肌酸; Gly: 甘氨酸; L1: 低密度脂蛋白, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$; L2: 极低密度脂蛋白, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$; L3: 低密度脂蛋白, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$; L4: 极低密度脂蛋白, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$; L6: 脂质, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$; L8: 脂质, $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$; L10: 脂质, $-\text{CH}=\text{CH}-$; Lac: 乳酸; m-I: 肌醇; Met: 蛋氨酸; Phe: 苯丙氨酸; Py: 丙酮酸盐; α -Glc: α -葡萄糖; β -Glc: β -葡萄糖

图 2 打击致伤组与假手术组 ^1H -NMR 原始图谱及傅立叶变换图谱

Fig.2 ^1H -NMR spectra original map and Fourier transform map of sham-injured group and injured group

进一步采用随机多次($n=200$)响应排序检验(图 4),通过随机排序计算所得 R^2 和 Q^2 值小于原始值,且 Q^2 回归直线与 Y 轴有负截距,说明模型有效,没有过拟合^[10]。OPLS-DA 载荷图(图 5)给出了引起组间差异贡献较大的代谢物及其变化趋势(表 1),结果显示相对假手术组,打击致伤组 SD 大鼠血浆中丙酮酸(Pyruvate)、赖氨酸(Lysine)、谷氨酸(Glutamate)、谷氨酰胺(Glutamine)、异丁酸(Isobutyrate)、甘油(Glycerol)6 种代谢物含量显著升高($P<0.05$),丙二酸二乙酯(Malonate)、L2、L3、L4、L10、 β -葡萄糖(β -Glucose)、 α -葡萄糖(α -Glucose)7 种代谢物含量明显降低($P<0.05$)。

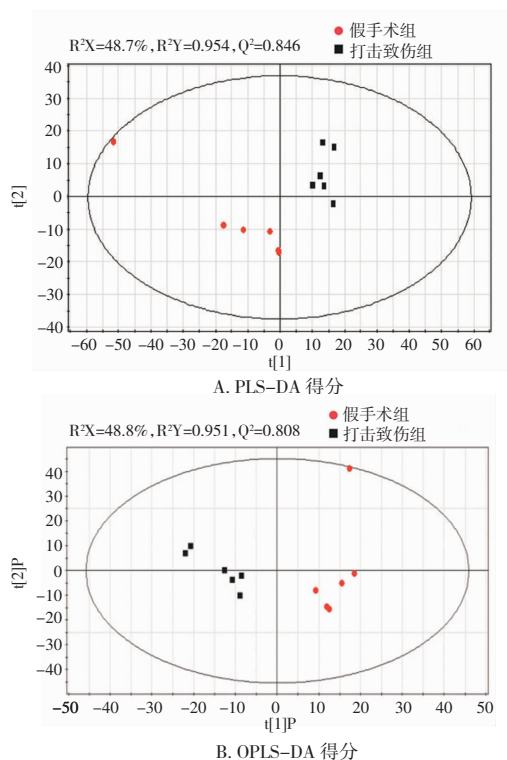


图 3 2 组血浆 ^1H -NMR 谱的模式识别得分

Fig.3 Pattern recognition scores based on the ^1H NMR spectra of plasma obtained from two groups

表 1 OPLS-DA 分析所得的打击致伤组与假手术组间差异的代谢物

Tab.1 OPLS-DA coefficients derived from the NMR data of metabolites in serum obtained from injured group-sham injured group

δH	代谢物	r 值	P 值
2.37(s)	Pyruvate	-0.831	0.019
3.16(s)	Malonate	0.699	0.038
1.72(m), 1.91(m), 3.01(m), 3.76(t)	Lysine	-0.773	0.030
1.30(br)	L4: Lipid, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n$ -(VLDL)	0.715	0.022
1.28(br)	L3: Lipid, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n$ -(LDL)	0.666	0.031
0.90(br)	L2: Lipid, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n$ -(VLDL)	0.786	0.047
5.31(br)	L10: Lipid, $-\text{CH}=\text{CH}-$	0.663	0.025
1.07(d)	Isobutyrate	-0.631	0.045
2.14(m), 2.45(m), 3.78(t)	Glutamine	-0.772	0.042
3.57(m), 3.66(m), 3.78(m)	Glycerol	-0.844	0.032
2.10(m), 2.35(m), 3.78(t)	Glutamate	-0.772	0.042
3.25(ddb), 3.41(t), 3.46(m), 3.49(t), 3.90(dd), 4.65(d)	β -Glucose	0.800	0.031
3.42(t), 3.54(dd), 3.71(t), 3.73(m), 3.84(m), 5.23(d)	α -Glucose	0.808	0.015

注: r 为相关系数。 r 为正时表示打击致伤组相对于假手术组,此种代谢物水平降低; r 为负时表示打击致伤组相对于假手术组,此种代谢物水平升高

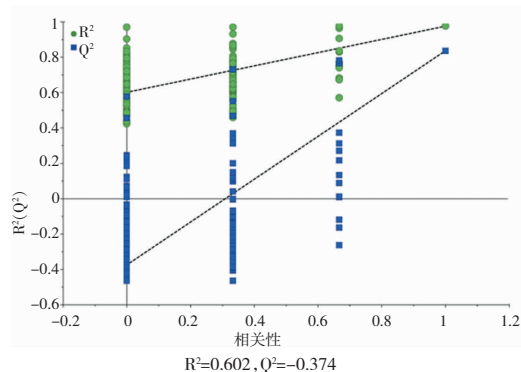


图 4 PLS-DA 模型的 200 次响应排序检验

Fig.4 Two hundred response permutation tests for PLS-DA model

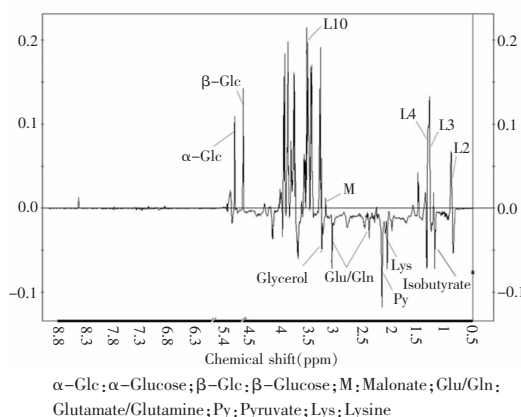


图 5 打击致伤组与假手术组血浆 ^1H -NMR 谱的 OPLS-DA 载荷图

Fig.5 OPLS-DA loading plots based on the ^1H NMR spectra of plasma obtained from injured group and sham-injured group

3 讨论

DAI 是一种最常见、具有特殊病理表现的创伤性脑损伤,是患者伤后出现严重神经功能障碍的重要原因之一^[11]。DAI 多由于脑外伤时,脑深部组织间形

成的剪应力引起脑白质广泛神经轴索损伤所致,组织病理学上主要表现为神经轴索的弯曲、肿胀、断裂和 ARB 的形成^[12],其中 ARB 的形成为其诊断的主要依据。然而,由于目前 DAI 的具体发病机制不详,临床缺乏早期的诊断方法^[13],给其治疗带来巨大困难。现有的生物标志物,如神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase,NSE)^[14]、微管相关蛋白 tau(microtubule-associated protein-tau,MAP-Tau)^[15]、 β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, β -APP)^[16]等也存在特异性不高的缺陷。因此,寻找特异性较高的 DAI 诊断标志物成为目前临床医学及法医学的研究重点。

Zhang 等^[17]采用 iTRAQ-LC/MS/MS 的方法研究了 SD 大鼠 DAI 后脑组织的差异表达蛋白;Lescot 等^[18]采用 ¹H-MRS 结合 MRI 研究了 SD 大鼠创伤性脑损伤后脑损伤部位不同时间点的代谢变化。然而,前期研究方法大多聚焦于 DAI 后脑组织的蛋白质或代谢变化,仍无法应用于临床实践。本研究首次运用基于 ¹H-NMR 的方法对 SD 大鼠假手术组及打击致伤组的血浆进行代谢组学研究,所得数据进行归一化处理后,采用 SIMCA-11.0 对数据进行 PLS-DA、OPLS-DA 的模式识别分析,得到引起组间差异的代谢物;血浆作为临床常用的生物检材,有方便、安全、快捷且可动态观察的优势,更具应用前景。

本研究结果表明,打击致伤组与假手术组血浆代谢组学存在明显的差异;13 种代谢产物有望成为大鼠 DAI 潜在的生物标志物,其中 6 种代谢物显著升高,7 种代谢物显著降低。同时,与假手术组相比,打击致伤组中 SD 大鼠血浆中谷氨酸及谷氨酰胺显著升高,提示 DAI 后兴奋性氨基酸(谷氨酸)释放增加,从而导致其代谢产物谷氨酰胺浓度升高;谷氨酰胺可通过血脑屏障入血,且可参与谷氨酸的合成,从而使血浆中谷氨酸浓度升高。本研究同时发现 DAI 后血浆中丙酮酸的含量升高,这可能与 DAI 后脑组织能量需求增加,机体增加乳酸向丙酮酸的转变,从而增加能量来源相关。

本研究也发现,DAI 后血浆中脂质成分(L4、L3、L2、L10)明显降低,提示损伤一定时间后,脂质过氧化导致脂质成分降解,使其浓度降低,也印证了脂质过氧化在 DAI 发生发展过程发挥了重要作用^[19]。

综上所述,本研究发现基于 ¹H-NMR 结合模式识别的方法对 DAI 后血浆的代谢组学分析是可行的;所筛选出的 13 种差异代谢物及其表达变化,不仅为进一步探索 DAI 的病理生理机制提供了新的研究基础;同时,为 DAI 的早期临床诊疗及法医学鉴定提供了新的方法和依据。本实验是基于动物实验的基础研究,人 DAI 后血浆的代谢组学分析及其代谢差异物表达变化规律如何还需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Adams JH, Doyle D, Ford I, et al. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading[J]. *Histopathology*, 1989, 15(1): 49-59.
- [2] Hayashi T, Ago K, Nakamae T, et al. Two different immunostaining patterns of beta-amyloid precursor protein (APP) may distinguish traumatic from nontraumatic axonal injury[J]. *Int J Legal Med*, 2015, 129(5): 1085-1090.
- [3] Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease[J]. *Cell*, 2008, 134(5): 714-717.
- [4] Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 469-479.
- [5] Wishart DS, Lewis MJ, Morrissey JA, et al. The human cerebrospinal fluid metabolome[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 871(2): 164-173.
- [6] Xu W, Wang H, Chen G, et al. (1)H NMR-based metabonomics study on the toxicity alleviation effect of other traditional Chinese medicines in Niu Huang Jie Du tablet to realgar (As₂S₂) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(1): 88-98.
- [7] 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.
- [8] Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: morphological characterization[J]. *J Neurosurg*, 1994, 80(2): 301-313.
- [9] 杜智勇, 沈安娜, 苏亮, 等. 基于 ¹H-NMR 的模式识别方法在慢性心力衰竭患者血清代谢组学中的应用[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(3): 415-419.
- [10] 侯玉洁, 祝文君, 陈长功, 等. 基于气相色谱-质谱联用技术的乙型肝炎血清代谢标志物的探究[J]. *色谱*, 2015, 33(4): 383-388.
- [11] Li XY, Feng DF. Diffuse axonal injury: novel insights into detection and treatment[J]. *J Clin Neurosci*, 2009, 16(5): 614-619.
- [12] Li J, Li XY, Feng DF, et al. Biomarkers associated with diffuse traumatic axonal injury: exploring pathogenesis, early diagnosis, and prognosis[J]. *J Trauma*, 2010, 69(6): 1610-1618.
- [13] Berger RP, Ta'asan S, Rand A, et al. Multiplex assessment of serum biomarker concentrations in well-appearing children with inflicted traumatic brain injury[J]. *Pediatr Res*, 2009, 65(1): 97-102.
- [14] Kleine TO, Benes L, Zöfel P. Studies of the brain specificity of S100B and neuron-specific enolase (NSE) in blood serum of acute care patients[J]. *Brain Res Bull*, 2003, 61(3): 265-279.
- [15] Ma M, Lindsell CJ, Rosenberry CM, et al. Serum cleaved tau does not predict postconcussion syndrome after mild traumatic brain injury[J]. *Am J Emerg Med*, 2008, 26(7): 763-768.
- [16] Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein[J]. *Acta Neuropathol*, 1994, 87(1): 55-62.
- [17] Zhang P, Zhu S, Li Y, et al. Quantitative proteomics analysis to identify diffuse axonal injury biomarkers in rats using iTRAQ coupled LC-MS/MS[J]. *J Proteomics*, 2016, 133(5): 93-99.
- [18] Lescot T, Fulla-Oller L, Po C, et al. Temporal and regional changes after focal traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27(1): 85-94.
- [19] 马旭东, 宋锦宁, 张斌飞, 等. 氢气通过抗氧化应激减轻大鼠弥漫性轴索损伤[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2014, 35(6): 760-766.

(责任编辑:冉明会)