

网络出版时间: 2021-3-18 16:32 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210317.1520.011.html>

# 槲皮素对蛛网膜下腔出血大鼠脑损伤的影响机制

薛 智, 彭 倩, 李 璞, 缪昌峰

**摘要 目的** 探讨槲皮素(Que)对蛛网膜下腔出血(SAH)大鼠脑损伤的影响及机制。**方法** 采用颈内动脉穿刺法制备蛛网膜下腔出血大鼠模型,随机将大鼠分为假手术(Sham)组、SAH组、SAH+Que 50 mg/kg组和SAH+Que 100 mg/kg组,每组15只。造模成功30 min后,腹腔注射槲皮素,干预23 h后对各组进行Garcia神经功能评分,干湿重法检测脑组织含水量,伊文思蓝染色检测血脑屏障通透性。免疫荧光染色检测TUNEL阳性和微管相关蛋白轻链3(LC3)阳性细胞占比,Western blot检测Cleaved caspase-9、Bax、Bcl-2、Nrf2、HO-1和NQO1蛋白水平。**结果** 与假手术组比较,SAH组Garcia神经功能评分增高,脑组织水含量升高,伊文思蓝含量增加,TUNEL/NeuN双阳性细胞占比增加,LC3/NeuN双阳性细胞占比增加,Cleaved caspase-9和Bax蛋白表达均上调,Bcl-2、Nrf2、HO-1和NQO1蛋白表达均下调;与SAH组比较,SAH+Que 50 mg/kg和100 mg/kg组Garcia神经功能评分均降低,脑组织水含量均减少,伊文思蓝渗出均降低,TUNEL/NeuN双阳性细胞占比均减少,LC3/NeuN双阳性细胞占比均减少,Cleaved caspase-9和Bax蛋白表达均下调,Bcl-2、Nrf2、HO-1和NQO1蛋白表达均上调。**结论** 槲皮素可减轻蛛网膜下腔出血模型大鼠脑神经细胞损伤,改善大鼠神经功能,其机制可能与抑制细胞自噬有关。

2020-09-04 接收

基金项目: 湖南省科技创新计划项目(编号: 2017SK50516)

作者单位: 湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院),长沙 410000

作者简介: 薛 智,男,主治医师,硕士研究生;  
彭 倩,女,助理研究员,硕士研究生,责任作者, E-mail:  
pall16@163.com

**关键词** 槲皮素; 自噬; 蛛网膜下腔出血; 脑损伤

**中图分类号** R 743

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0561-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.011

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是临床常见的一种严重的急性脑血管疾病,多发生于颅内动脉瘤、外伤、药物或其他原因<sup>[1]</sup>。槲皮素是一种天然的黄酮类化合物,具有广泛的药理活性。之前的研究<sup>[2]</sup>报道,槲皮素可以抑制细胞凋亡、保护神经细胞、减少氧化应激造成的脑损伤。但是关于槲皮素在蛛网膜下腔出血早期对脑损伤的作用目前的研究较少,该研究通过颈内动脉穿刺法建立SAH大鼠模型,探讨槲皮素对SAH 24 h后大鼠脑损伤的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** SPF级SD雄性大鼠,体质量270~300 g,6~8周龄,购自上海西普尔必凯实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(沪)2019-0012,室温23~25℃饲养,食物和水分按时摄入,昼夜节律规律。将实验大鼠随机分为Sham组、SAH组和模型+槲皮素50 mg/kg组(SAH+Que 50 mg/kg)和模型+槲皮素100 mg/kg组(SAH+Que 100 mg/kg),槲皮素用0.9%氯化钠溶液溶解,采取灌胃给药,给药体积为1 ml,持续14 d,每组15只,其中5只用于脑水肿检测,5只用于免疫组织化学

Western blot. The proliferation ability of glioma cells was analyzed by techniques of MTT and cell cloning. Transwell was used to analyze the invasion ability of glioma cells, and flow cytometry was used to analyze the apoptosis rate of glioma cells. **Results** Compared with normal brain tissue cells, the expression level of LncRNA MEG3 mRNA decreased in glioma cells. The results of vitro experiments showed that both the mRNA of LncRNA MEG3 and protein expression levels of p53 increased, and the expression levels of MDM2 protein were down-regulated( $P < 0.05$ ) in pCI-MEG3 group when compared with the control group and the pCI group( $P < 0.05$ ). Cell proliferation and cell invasion were inhibited( $P < 0.01$ ). The apoptosis rate increased( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The expression of LncRNA MEG3 in human glioma cells is lower than that in the normal human brain tissue cells. Overexpression of LncRNA MEG3 in human glioma cells can increase the expression of LncRNA MEG3 thereby inhibiting the proliferation and invasion of human glioma cells and increasing the apoptosis rate.

**Key words** glioma; LncRNA MEG3; proliferation; attacks; apoptosis

检测,5只用于蛋白印迹实验。

**1.2 模型制备** 采用颈内动脉穿刺法建立 SAH 大鼠模型<sup>[1]</sup>, 经大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(4.0 ml/kg)后, 分离颈总、颈内、颈外动脉和枕动脉, 结扎颈总动脉近心端, 颈外动脉远心端和距颈动脉分叉处 5 mm 处。用纤芯从颈外动脉进入, 向颈内动脉插入, 入颅内直到有明显抵抗感, 再用力向前推 3 mm 刺破大脑中动脉, 停留 15 s 后拔出纤芯并结扎颈外动脉, 缝合消毒。造模成功的标准: ① 有明显的血管刺破感。② 大鼠出现呼吸急促, 心率加快症状。③ 脑组织剥离后可观察到明显的血液散布在脑底和环池等部位。每组 15 只大鼠, 造模过程中出现动物死亡随机给予补充。

**1.3 试剂与仪器** 榆皮素(≥95%)和伊文思蓝均购自美国 Sigma 公司; TUNEL 染色试剂盒、大鼠抗 LC3 抗体、抗 Cleaved caspase-9 抗体、抗 Bax 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 Nrf2 抗体、抗 HO-1 抗体、抗 NQO1 抗体和 GAPDH 均购自中国赛默飞世尔公司; DYY-7C 型电泳仪购自北京市六一仪器厂; 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; Click-iT® TUNEL Alexa 488 试剂盒购自上海赛默飞公司。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 神经功能评分** 在造模后 23 h, 依据 Garcia 神经功能评分标准<sup>[2]</sup>, 对实验大鼠的自发活动、前爪运动及力量、四肢自发运动、本体感觉、攀爬能力及触须刺激反应等进行评分。

**1.4.2 脑组织含水量检测** 在完成神经功能评分后, 采用干湿重法测定脑组织含水量, 动物麻醉处死后, 去大脑称重为湿质量, 在 100 °C 恒温箱干燥烘烤 3 d 后再次称重为干质量, 计算脑组织含水量百分比。

**1.4.3 EB 含量测定** 通过测定 EB 外渗来分析血脑屏障通透性。在完成神经功能评分后, 取 7 只大鼠用水合氯醛麻醉, 通过尾静脉注入 2% EB(2 ml/kg), 打开胸腔, 心内灌注 0.9% 氯化钠溶液 + 20 U/ml 肝素钠共 300 ml, 断头取脑, 然后将大鼠大脑在 10 倍体积的 50% 三氯乙酸溶液中匀浆沉淀蛋白质并离心。上清液用乙醇(1:3)稀释, 并在 610 nm 处测量荧光, 以测量 EB 的吸光度。

**1.4.4 免疫荧光染色** 在 Garcia 神经功能评分后麻醉大鼠, 并用盐水和 10% 福尔马林磷酸盐缓冲液经心脏灌注。取出脑, 在多聚甲醛中固定 24 h, 随后石蜡包埋并切下 20 μm 厚的切片, 对切片进行 TUNEL 染色。将切片脱石蜡, 再水化并在 PBS 中洗涤两次。4% (W/V) PFA 中固定切片 15 min, PBS

洗涤后, 将切片在室温下用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 15 min, 并用含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 和 5% 牛血清白蛋白在 37 °C 下封闭 30 min。将切片分别与 I 抗 [1:500 稀释的 NeuN(神经元标记)、LC3] 在 4 °C 下孵育过夜, PBS 中洗涤后, 在室温下与山羊抗兔 Alexa Fluor 488 II 抗孵育 1 h。使用 ECLPSE 80i (Nikon, 日本) 显微镜拍摄每个样品的 5 个随机视野的图像。

**1.4.5 蛋白印迹实验** 取脑皮质组织 100 mg 放入试管, 剪碎, 裂解液充分研磨, 冰上裂解 1 h, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 测蛋白浓度(Bio-Rad 试剂盒), 分别取 50 μg 蛋白样本经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白后(于 4% ~ 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳) 2 h, 转至硝酸纤维膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 分别与抗 Cleaved caspase-9、Bax、Bcl-2、Nrf2、HO-1 和 NQO1 一抗(兔抗鼠, 1:1 000) 37 °C 摆育 2.5 h, PBST 洗涤 3 次, 与二抗(羊抗兔, 1:2 000) 37 °C 摆育 0.5 h。PBST 洗涤后经 ECL 荧光显色, SMARTVIEW 软件分析蛋白表达量。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。当 *P* < 0.05 时差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 神经功能评分、脑组织水含量测定及伊文思蓝渗出测定结果** 采用 Garcia 神经功能评分对各组进行神经功能评定, 与 Sham 组( $0.20 \pm 0.05$ )比较, SAH 组( $5.27 \pm 0.35$ ) Garcia 神经功能评分增高( $F = 13.31, t = 4.518, P < 0.001$ ), 脑组织水含量升高( $F = 26.21, t = 15.827, P < 0.001$ ), 伊文思蓝渗出增加( $F = 10.84, t = 5.275, P < 0.05$ ); 与 SAH 组比较, SAH + Que 50 mg/kg 组( $3.7 \pm 0.1$ ) Garcia 神经功能评分降低( $F = 13.31, t = 5.520, P < 0.05$ ), 脑组织水含量降低( $F = 26.21, t = 14.963, P < 0.05$ ); 与 SAH 组比较, SAH + Que 100 mg/kg 组( $3.7 \pm 0.1$ ) Garcia 神经功能评分降低( $F = 13.31, 1.8 \pm 0.2$ ) ( $t = 5.028, P < 0.01$ ), 脑组织水含量降低( $F = 26.21, t = 12.430, P < 0.001$ ), 伊文思蓝渗出减少( $F = 10.84, t = 4.963, P < 0.01$ )。见图 1。

**2.2 TUNEL/NeuN 双荧光染色结果** TUNEL/NeuN 双荧光染色结果表明, 与 Sham 组比较, SAH 组 TUNEL/NeuN 双阳性细胞占 NeuN 阳性细胞比例增加( $F = 31.32, t = 21.729, P < 0.001$ ); 与 SAH 组比

较,SAH + Que 50 mg/kg 组和 SAH + Que 100 mg/kg 组 TUNEL/NeuN 双阳性细胞占 NeuN 阳性细胞比例

减少( $F = 31.32, t = 17.528, 19.482$ , 均  $P < 0.05$ ), 且呈现出 Que 剂量依赖性。见图 2。

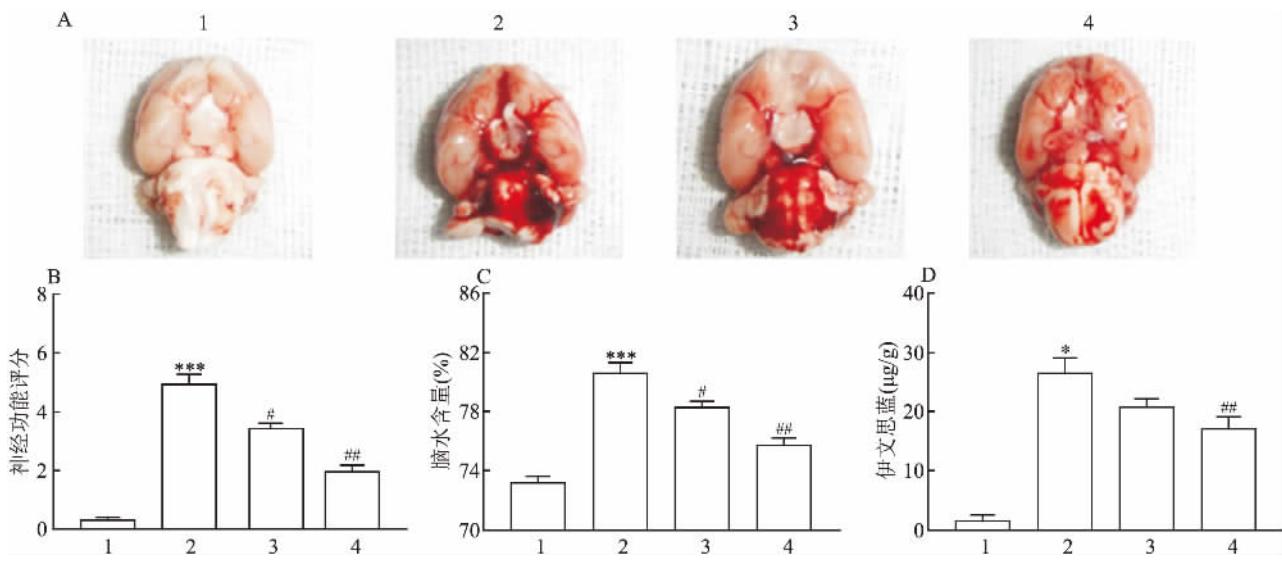


图 1 神经功能评分、脑组织水含量测定及伊文思蓝法检测血-脑屏障通透性( $n=5$ )

A: 各组大鼠大脑组织代表图; B: 各组神经功能评分; C: 各组脑组织水含量测定; D: 各组伊文思蓝渗出量; 1: Sham 组; 2: SAH 组; 3: SAH + Que 50 mg/kg 组; 4: SAH + Que 100 mg/kg 组; 与 Sham 组比较:  $^* P < 0.05$ ,  $^{***} P < 0.001$ ; 与 SAH 组比较:  $^# P < 0.05$ ,  $^{##} P < 0.01$

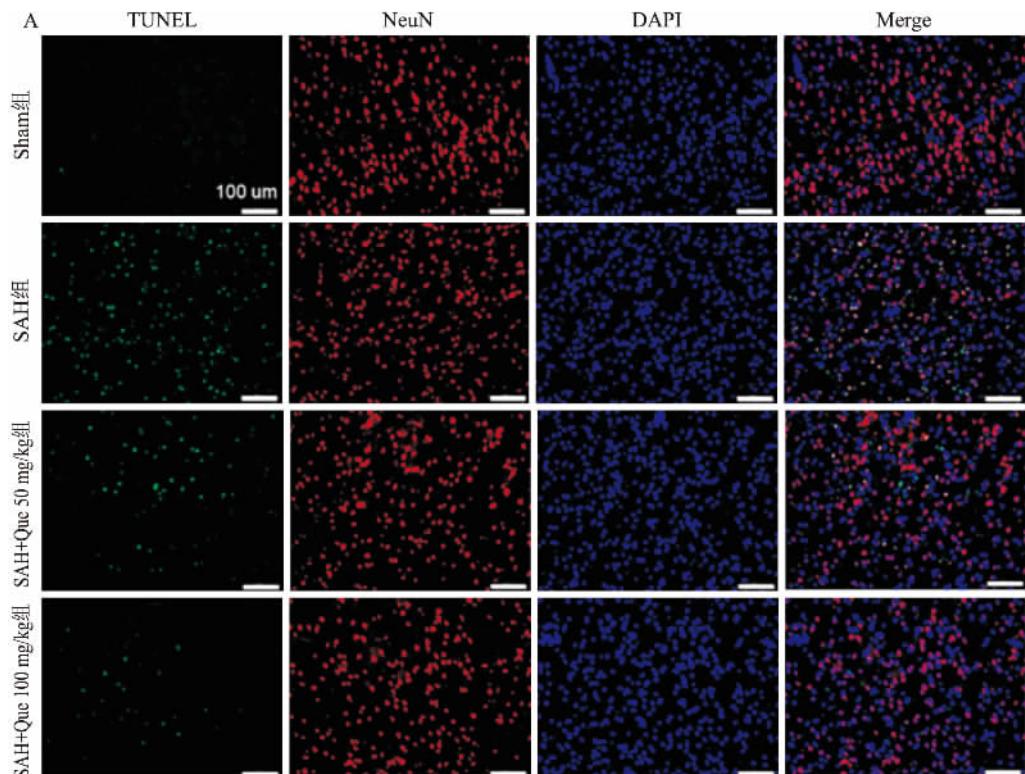
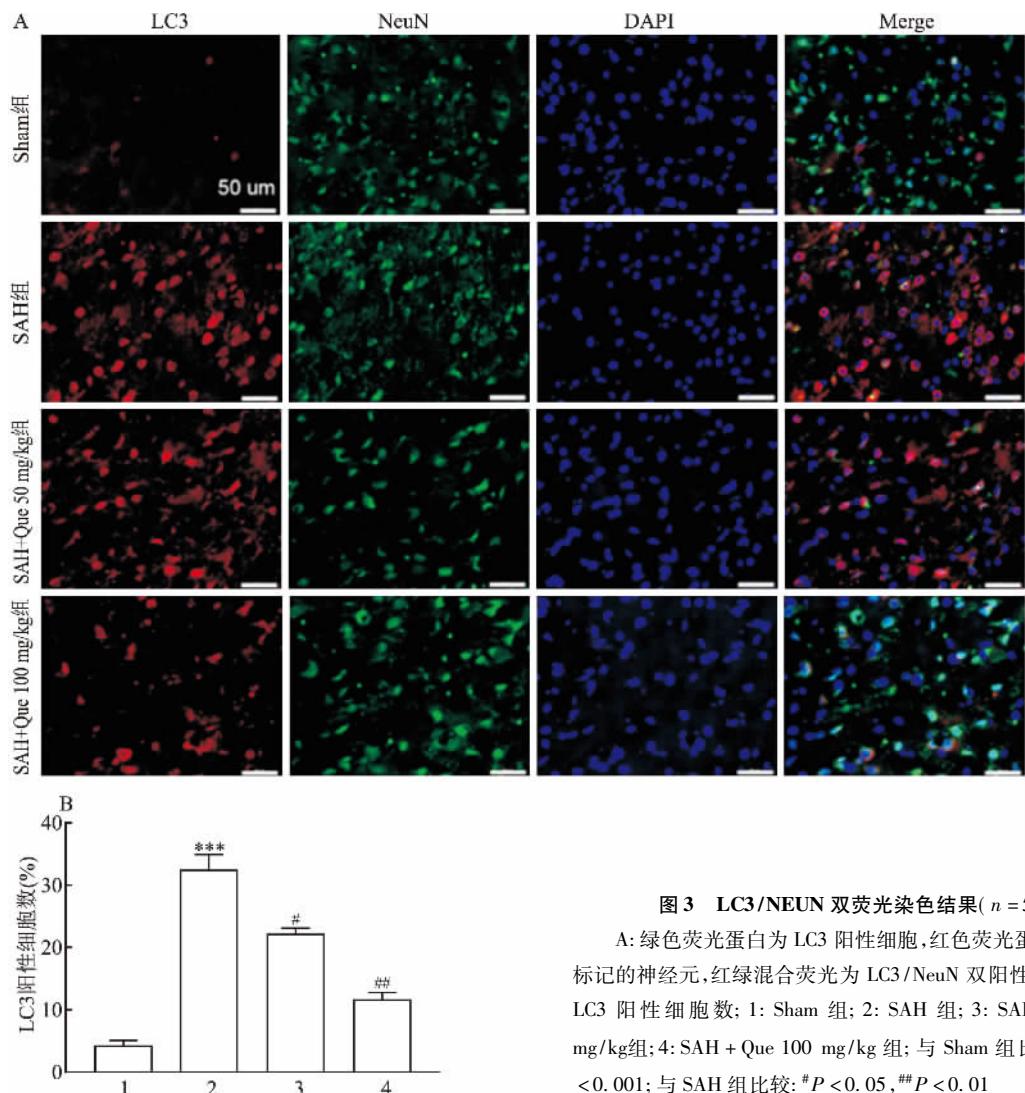


图 2 TUNEL/NeuN 双荧光染色结果( $n=5$ )

A: 绿色荧光蛋白为 TUNEL 标记的凋亡细胞, 红色荧光蛋白为 NeuN 标记的神经元, 红绿混合荧光为 TUNEL/NeuN 双标记的效果; B: TUNEL 阳性细胞数; 1: Sham 组; 2: SAH 组; 3: SAH + Que 50 mg/kg 组; 4: SAH + Que 100 mg/kg 组; 与 Sham 组比较:  $^{***} P < 0.001$ ; 与 SAH 组比较:  $^* P < 0.05$ ,  $^{##} P < 0.01$

图3 LC3/NEUN 双荧光染色结果( $n=5$ )

A: 绿色荧光蛋白为 LC3 阳性细胞, 红色荧光蛋白为 NeuN 标记的神经元, 红绿混合荧光为 LC3/NeuN 双阳性的细胞; B: LC3 阳性细胞数; 1: Sham 组; 2: SAH 组; 3: SAH + Que 50 mg/kg 组; 4: SAH + Que 100 mg/kg 组; 与 Sham 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 SAH 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.3 LC3/NEUN 双荧光染色结果** LC3/NeuN 双荧光染色结果表明, 与 Sham 组比较, SAH 组 LC3/NeuN 双阳性细胞占比增加( $F = 16.64, t = 6.470, P < 0.001$ ); 与 SAH 组比较, SAH + Que 50 mg/kg 组和 SAH + Que 100 mg/kg 组 LC3/NeuN 双阳性细胞占比减少( $F = 16.64, t = 7.263, 8.108$ , 均  $P < 0.05$ ), 且呈现出 Que 剂量依赖性。见图 3。

**2.4 蛋白印迹实验结果** 蛋白印迹实验表明, 与 Sham 组比较, SAH 组凋亡相关蛋白 Cleaved caspase-9 和 Bax 表达增高, Bcl-2 表达降低( $F = 19.75, t = 4.352, 4.587, 4.269, P < 0.001$ ), Nrf2、HO-1 和 NQO1 表达均降低( $F = 17.32, t = 4.823, 5.285, 4.920, P < 0.001$ ); 与 SAH 组比较, SAH + Que 50 mg/kg 组和 SAH + Que 100 mg/kg 组 Cleaved caspase-9 和 Bax 表达降低, Bcl-2 表达增高( $F = 21.65, t = 4.150 \sim 6.825$ , 均  $P < 0.05$ ), Nrf2、HO-1

和 NQO1 表达均增高( $F = 19.21, t = 4.050 \sim 6.520$ , 均  $P < 0.01$ )。见图 4。

### 3 讨论

SAH 引起的广泛的神经细胞凋亡是 SAH 后早期脑损伤中的关键部分<sup>[3]</sup>。该研究表明, 与 Sham 组比较, SAH 组神经功能评分、脑组织水含量均显著升高, 血脑屏障通透性显著减弱, 表明 SAH 后出现脑水肿、细胞死亡和神经功能减弱。与 SAH 组比较, Que 干预后神经功能评分、脑组织水含量均降低, 血脑屏障通透性改善, 表明 Que 改善了 SAH 后的脑水肿和神经细胞功能。TUNEL 染色中 SAH 组 TUNEL 阳性细胞高于 Sham 组, 但低于 Que 干预组, 也表明 Que 可以显著减少 SAH 后神经细胞凋亡。

自噬和凋亡信号通路存在广泛的联系, 它们相互作用共同调节细胞死亡。正常水平的自噬是一种

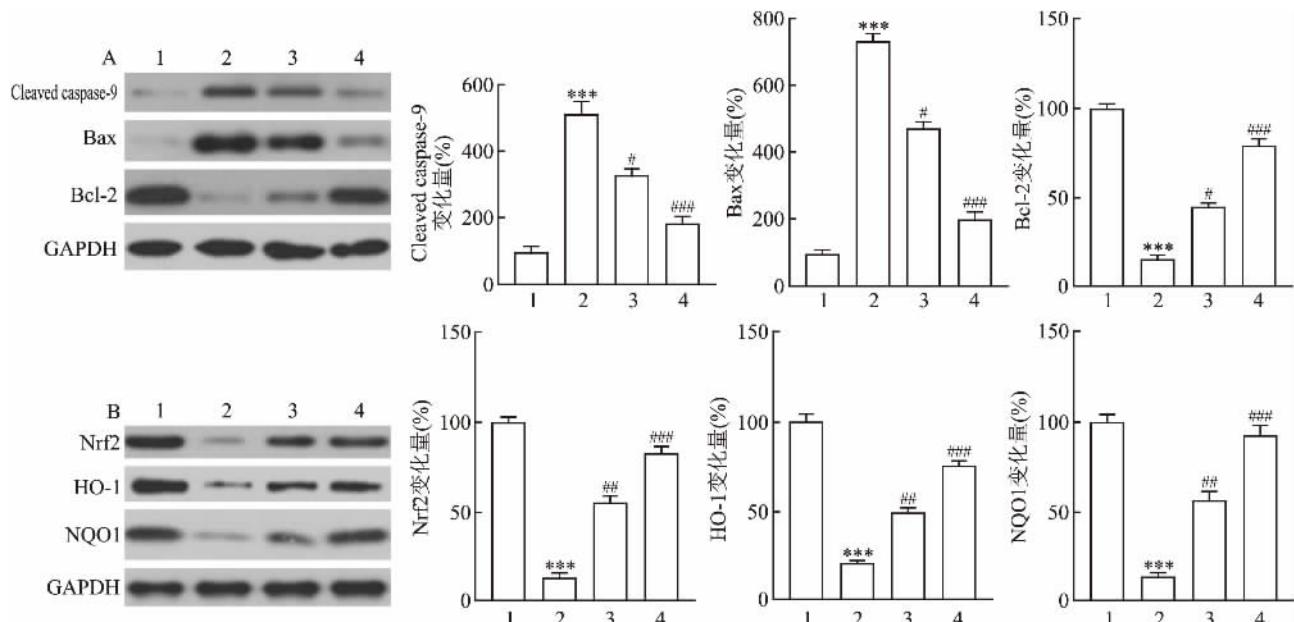


图4 蛋白印迹实验结果(n=5)

A,B:各相关蛋白的表达;1: Sham 组;2: SAH 组;3: SAH + Que 50 mg/kg 组;4: SAH + Que 100 mg/kg 组;与 Sham 组比较: \*\*\*P < 0.001; 与 SAH 组比较: #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001

通过降解细胞内异常组分以维持细胞稳态的过程,然而过度自噬则引起细胞自噬性死亡<sup>[4]</sup>。LC3是细胞膜表面参与自噬小体形成的蛋白,是自噬过程的标志性蛋白,免疫荧光染色结果显示,SAH组LC3/NeuN双阳性细胞在NeuN阳性细胞中占比高于Sham组,但低于Que干预组,表明SAH后神经细胞出现过度自噬导致大量神经细胞死亡,Que干预可以抑制过度自噬导致的神经细胞死亡。

之前的研究<sup>[5]</sup>表明,线粒体通路在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤细胞凋亡中起重要作用,Bcl-2和Bax基因是线粒体凋亡通路的关键调控基因,Bcl-2家族包括抗细胞凋亡的基因(如Bcl-2)和促细胞凋亡的基因(如Bax),Bax在线粒体外膜形成同源二聚体从而形成通道,使细胞色素C释放到胞质中进而激活caspase-9,最终导致细胞凋亡<sup>[6]</sup>。蛋白印迹实验表明,SAH组凋亡相关蛋白Cleaved caspase-9和Bax表达高于Sham组,但低于Que干预组,表明SAH通过Bax/caspase-9通路促进细胞凋亡,Que干预通过Bax/caspase-9通路抑制细胞凋亡。本核因子E2相关因子2(Nrf2)是一种氧化应激过程中的防御性转录因子,受到刺激时被激活向细胞核转移,HO-1和NQO-1是Nrf2的下游分子,激活Nrf2-HO-1/NQO-1通路已被报道<sup>[7-8]</sup>可通过减缓氧化应激对神经细胞起保护作用。该研究表明,SAH组Nrf2、HO-1和NQO-1表达低于Sham组和Que干预组,Que可激活

被SAH抑制的Nrf2/HO-1通路,提示Nrf2/HO-1通路参与Que发挥的神经细胞保护作用。

## 参考文献

- [1] 焦继超,马玉德,李小亮,等.尼莫地平对蛛网膜下腔出血大鼠海马CA1区自噬的影响[J].中国脑血管病杂志,2019,16(2):24-9.
- [2] 徐兰娟,易波,李保林.槲皮素在实验性大鼠脑出血模型中的对抗炎症作用及细胞凋亡作用的研究[J].中华神经创伤外科电子杂志,2017,3(2):93-7.
- [3] Gonçalves B, Turon R, Mendes A, et al. Effect of early brain infarction after subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis[J]. World Neurosurg, 2018, 115: 292-8.
- [4] Kasprowskialskiewicz D. The cell on the edge of life and death: crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2017, 71: 825-41.
- [5] Jing C H, Wang L, Liu P P, et al. Autophagy activation is associated with neuroprotection against apoptosis via a mitochondrial pathway in a rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. Neuroscience, 2012, 213(2): 144-53.
- [6] Che S T, Bie L, Li X, et al. Parthenolide inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human uveal melanoma cells[J]. Int J Ophthalmol, 2019, 12(10): 1531-8.
- [7] Cheng Y, Liu C, Cui Y, et al. Sporidiobolus pararoseus wall-broken powder ameliorates oxidative stress in diabetic nephropathy in type-2 diabetic mice by activating the Nrf2/ARE pathway[J]. RSC Advances, 2019, 9(15): 8394-403.
- [8] Li P, Su L, Li X, et al. Remote limb ischemic postconditioning protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury via upregulating expression of Nrf2, HO-1 and NQO-1 in mice[J]. Int J Neurosci, 2016, 126(6): 552-9.

## 大鼠股动脉血管原代内皮细胞的分离与培养

刘 倩, 韩陈陈, 罗婷婷, 张 雨, 李 浩, 马 眇, 魏 伟

**摘要** 目的 体外分离、培养并鉴定大鼠股动脉血管原代内皮细胞, 为相对较小血管来源的原代内皮细胞功能研究提供细胞模型。方法 无菌取大鼠股动脉血管, 胶原酶消化大鼠股动脉血管内皮细胞使其分离, 流式细胞术检测内皮细胞纯度; 流式分选出 CD31 阳性细胞, 并用激光共聚焦鉴定内皮细胞; 以 CCK-8 法、高内涵细胞成像法检测内皮细胞增殖能力, 以 Transwell 法、Matrigel 胶法检测其迁移和成管功能。结果 胶原酶消化分离所得股动脉血管原代内皮细胞在

14~16 d 细胞覆盖培养瓶面积的 2/3 以上, 细胞呈现典型铺路石状。流式检测其纯度为 38.34%, 分选后利用 CD31 进行荧光染色鉴定, 细胞均为 CD31 阳性; PGE<sub>2</sub> 可显著上调 CD31 阳性内皮细胞增殖、迁移、成管功能。结论 该研究采用简便的方法成功分离得到股动脉血管原代内皮细胞, 为研究相对较小血管来源的原代内皮细胞功能提供体外细胞模型。

**关键词** 大鼠; 股动脉; 原代血管内皮细胞; 分离培养; 鉴定  
**中图分类号** R 394.26; R 322.121

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2021)04-0566-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.012

2020-09-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金( 编号: 81502123、81330081、81673444)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 合肥 230032

作者简介: 刘 倩, 女, 硕士研究生;

魏 伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: [wwei@ahmu.edu.cn](mailto:wwei@ahmu.edu.cn);

马 眇, 女, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: [mayang\\_ahmu@126.com](mailto:mayang_ahmu@126.com)

根据血管的结构、功能和运输方向差异, 分为动脉、静脉和毛细血管。血管壁作为血液与组织的边界, 由内膜、中膜和外膜构成。内皮细胞主要存在于内膜层<sup>[1-2]</sup>, 在生理条件下释放一氧化氮( NO)、前

## The protective function and mechanism of quercetin on brain injury in rats with subarachnoid hemorrhage

Xue Zhi, Peng Qian, Li Jing, et al

(Hunan Provincial People's Hospital, The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410000)

**Abstract** **Objective** To investigate the effect of quercetin( Que) on brain injury in rats with subarachnoid hemorrhage( SAH) and its mechanism. **Methods** Internal carotid artery puncture was used to prepare rat models of subarachnoid hemorrhage, and the rats were randomly divided into sham group, SAH group, SAH + Que 50 mg/kg group and SAH + Que 100 mg/kg group with 15 rats in each group. After 30 minutes of successful modeling, quercetin was injected intraperitoneally, and Garcia nerve function scores were performed in each group after 23 hours of intervention. The water content of brain tissue was measured by wet and dry weight method. The blood-brain barrier permeability was measured by Evans blue staining. The proportion of TUNEL-positive and microtubule-associated protein light chain 3( LC3) -positive cells were detected by immunofluorescence staining, and Cleaved caspase-9, Bax, Bcl-2, Nrf2, HO-1 and NQO1 protein levels were detected by Western blot. **Results** Compared with the sham group, the Garcia neurological score was higher in the SAH group, the brain tissue water content increased. Evans blue content increased, the proportion of TUNEL/NeuN double positive cells increased, the proportion of LC3/NeuN double positive cells increased, cleaved caspase-9 and bax protein expressions were up-regulated, Bcl-2, Nrf2, HO-1 and NQO1 protein expressions were down-regulated. **Conclusion** Quercetin can reduce brain neurons damage in rats with subarachnoid hemorrhage and improve neural function, and the mechanism may be related to the inhibition of autophagy.

**Key words** quercetin; autophagy; subarachnoid hemorrhage; brain injury