

文章编号: 1674-8085(2019)06-0087-05

头孢曲松通过抑制 Cx43 磷酸化参与治疗创伤性 颅脑损伤的机制

刘伟香¹, 郑平², *陈伟³

(1. 上海健康医学院附属上海浦东新区人民医院药剂科, 上海 201299;

2. 上海健康医学院附属上海浦东新区人民医院神经外科, 上海 201299; 3. 南昌大学第一附属医院, 神经外科, 江西, 南昌 330008)

摘要: **目的** 观察头孢曲松(CFX)通过调控与缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 表达在治疗创伤性颅脑损伤 (TBI) 的相关性机制。**方法** 选取 100 只体重 350~450 g 的 4 月龄的 SD 雄性大鼠, 采用液压打击仪建立脑损伤模型, 具体分组为: ①假手术(sham)组、②治疗 (TBI+CFX) 治疗组、③甘珀酸 (CBX) 阻断 (TBI+CFX+CBX) 组、④溶媒 (TBI+生理盐水) 组及⑤损伤 (TBI) 组, 每组 20 只。实验时间均设定为 TBI 后 48 h。每组取 10 只大鼠进行行为学检测和脑组织含水量测定, 另 10 只则获取海马区胶质组织通过蛋白免疫印记法 (WB) 法测定神经元缝隙连接蛋白 40 (Cx40) 及磷酸化 Cx43 蛋白 (p-Cx43) 的变化、采用酶联免疫荧光 (ELFA) 检测神经元氧化应激因子 NADPH 氧化酶活性的变化。**结果** 实验结果显示, 采用 CFX 干预组神经损伤严重度评分 (NSS)、脑水肿程度、腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶活性及海马胶质细胞 Cx40、p-Cx43 表达均溶媒组及损伤组明显下降 ($P < 0.05$)。而 CBX 可明显抑制上述 CFX 对 Cx40、p-Cx43 蛋白表达下调及降低 NADPH 氧化酶的活性的作用 ($P < 0.05$)。**结论** CFX 可能通过抑制 Cx43 蛋白磷酸化和 Cx40 蛋白异常增多, 从而抑制氧化应激反应以达到脑损伤缓解作用。

关键词: 缝隙连接 43; 缝隙连接 40; 头孢曲松; 甘珀酸; 创伤性颅脑损伤

中图分类号: R651.1⁺5

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2019.06.016

MECHANISM OF CEFTRIAXONE BY INHIBITING THE PHOSPHORYLATION OF CX43 IN THE TREATMENT OF TRAUMATIC BRAIN INJURY

LIU Wei-xiang¹, ZHENG Ping², *CHEN Wei³

(1. Department of Pharmacy, The People's Hospital of Shanghai Pudong New Area Affiliated to Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201299, China;

2. Department of Neurosurgery, The People's Hospital of Shanghai Pudong New Area Affiliated to Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201299, China; 3. Department of Neurosurgery, The first affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330008, China)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of protective effects of Ceftriaxone (CFX) against traumatic brain injury. **Methods:** Traumatic brain injury model were established by Sprague-Dawley rats at the age of 4 months with fluid percussion device and given intraperitoneal injection of Ceftriaxone and Cx43 inhibitor Cerbenoxolone (CBX). CBX was substituted by Normal Saline (NS) in Vehicle group, and injury group was not given any intervention after TBI. 100 rats were randomly divided into 5 groups: Sham operation, Treatment group

收稿日期: 2019-06-13; 修改日期: 2019-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81701231); 上海市自然基金项目(16ZR1431500)

作者简介: 刘伟香(1989-), 女, 江西南昌人, 药剂师, 主要从事神经保护药物的研究工作(Email: 814187277@qq.com);

郑平(1982-), 男, 上海浦东人, 副主任医师, 博士, 主要从事神经损伤及认知功能方面的研究(Email: yoyo_Ras@163com);

*陈伟(1980-), 男, 江西南昌人, 副主任医师, 博士, 主要从事神经创伤及修复方面的研究(Email: 22248223@qq.com).

(TBI+CFX), Inhibitor group (TBI+CFX+CBX), Vehicle group (TBI+ NS) and Injury group (TBI). Half rats in each group were tested for behavioral disorder by NSS and brain edema by measuring brain water content at 48 hours after TBI, and another half of rats were sacrificed and hippocampal astorcytes were obtained for investigating p-Cx43, Cx40 by western blot, NDAPH oxidase activity by ELFA. **Results:** NSS, brain water content, p-Cx43, Cx40 and NDAPH oxidase activity in treatment group were significantly lower than those in veichle and injury group, and the protective effects induced by CFX could be alleviated by CBX. **Conclusion:** Protective effect of CFX to TBI is involved in inhibiting the phosphorylation of Cx43, which can reduce the oxidative stress, injuries of form and function of brain after TBI.

Key words: Cx43; Cx40; ceftriaxone; cerbenoxolone; TBI

创伤性颅脑损伤(TBI)的致死及致残率较高,其机制目前仍不完全明确,且目前临床上缺乏针对性的治疗手段。头孢曲松(CFX)为第三代 β -内酰胺类抗生素,因其具有长效性及对脑血屏障良好通透性,已经被神经外科作为术后预防颅内感染首选抗生素^[1]。但CFX对脑损伤治疗的具体作用机制仍不完全明确。有大量研究显示,CFX在抗感染的基础上还具有一定的脑保护作用,且CFX有保护Cx43的功能^[2-5]。同时结合我们的前期研究:Cx43磷酸化的增强、Cx40异常升高与氧化应激损伤有关^[5-6]。因此我们推测CFX可能通过抑制上述的Cx蛋白的异常表达从而产生脑保护的机制。本研究通过采用Cx43抑制剂CBX,观察CFX与Cx43蛋白的相关性及对脑损伤的影响,旨在进一步深入地了解CFX的脑保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器

100只体重350~450 g的4月龄的SD雄性大鼠购置于上海毕凯实验动物有限责任公司(沪ICP备05033115),体重350~450 g; CFX(Roche, 美国); CBX(Sigma, 美国); 细胞裂解液(Solarbio, 中国); 兔抗Cx40及兔抗p-Cx43(均来自Santa Cruz, 美国)、小鼠抗GAPDH一抗(Abcam, 英国); 辣根酶标记二抗(Abcam, 英国); 化学发光试剂(中山金桥生物科技, 中国); 蛋白电泳仪(Bio-Rad, 美国); NADPH氧化酶活性试剂盒(Beyotime, 中国); M200Pro免疫酶标仪(TECAN, 奥地利)。

1.2 动物模型制作

实验用大鼠在通风房间内按照光照与黑暗时

间比例为12:12 h, 给予水和食物适应性喂养1 w, 动物伦理已得到上海健康医学院附属上海浦东新区人民医院实验动物伦理委员会的同意。采用液压撞击模型(Fluid Percussion Injury, FPI)来制作大鼠脑损伤模型。取成年大鼠, 称重后给予异氟烷吸入呈持续麻醉状态, 将动物固定于立体实验台, 常规消毒铺巾, 头部正中分层切开皮肤和骨膜, 暴露右侧顶骨, 大鼠脑部定位矢状缝旁开3 mm, 冠状缝后3.5 mm处, 采用开颅磨钻钻骨孔一枚, 暴露硬脑膜, 在硬膜上置一与骨孔大小相同的小帽, 固定液压管后施行3个标准大气压击打(重型颅脑损伤标准)。

1.3 药物的干预及分组

100只SD大鼠被随机分为: ①假手术(sham)组; ②药物(TBI+CFX)治疗组; ③甘珀酸(CBX)阻断(TBI+CFX+CBX)组; ④溶媒(TBI+生理盐水)组; ⑤损伤(TBI)组, 每组20只。①仅暴露硬脑膜而不给予打击, ②③为液压打击1 h后腹腔内分别腹腔注射CFX(200 mg/kg)及CFX(200 mg/kg)+CBX(20 mg/kg), ④为TBI后腹腔注射生理盐水(NS), 而⑤则是TBI形成后不给予处理。所有组实验时间均设定为TBI后48 h。每组取10只动物行行为学检测和脑组织含水量测定, 另10只动物则行蛋白学检测。根据我们之前预实验及前期实验显示, 为获得P值在0.05水平, 1-beta在0.20水平, 根据Effect-Size计算出所需要的每组动物数量为8(G-Power3.0)。在本实验中, 预定每组10只动物, 以防动物意外死亡引起样本量的不足。

1.4 大鼠NSS评分

采用双盲法, 根据以下原则: a) 提鼠尾离地面约1尺, 观察前肢情况。正常大鼠两前肢对称地

伸向地面。有左肩内旋,左前肢内收者,评为4分,否则0分。b)将动物置平滑地板上,分别推左(或右)肩向对侧移动,检查抵抗运动的阻力。正常大鼠两侧阻力明显对称。右肩向左侧移动时,发现阻力下降时,根据下降程度的不同,评为1~3分,c)将动物两前肢置一金属网上,观察两前肢的张力,正常大鼠两前肢的张力明显对称,发现左前肢肌张力下降者,根据下降的轻重,评为0~3分。根据以上评分,满分10分,分数越高,说明动物的行为障碍越严重。

1.5 脑含水量测定

采用 Hatashita 的干湿重法测定脑含水量的变化。将完成NSS的实验动物处死,快速开颅取出大脑,并移到冰面,并测定大脑的湿重。再将动物大脑放入蒸箱中,在110℃下烘蒸24h,测得大脑干重的量。含水率为(湿重大脑-干重大脑)/湿重大脑×100%。

1.6 免疫蛋白印记(WB)实验

将海马区域的皮质组织标本收集,并置入试管中,用冰冷的PBS洗涤两次;加入RIPA裂解缓冲液(Santa Cruze,美国),含1%的蛋白酶抑制剂混合物。冰上匀浆、裂解10min,低温离心12000r/min,15min,收集上清液,BCA法测定蛋白浓度。取30μg总蛋白,经12%的SDS-PAGE Gel电泳分离,常规方法转印至硝酸纤维素(NC)膜上,5%脱脂牛奶-TBST封闭2h,再分别将Cx40(1:1000)、p-Cx43(1:500)、GADPH(1:3000)一抗加入封闭液,4℃轻摇过夜,回收一抗液体,给予TBST溶液洗涤NC膜,加入辣根酶标记二抗与封闭液按1:2000的比例混合液,37℃下孵育1h,再采用化学发光试剂盒进行发光显影。采用Image J 1.36b软件下行吸光度分析,蛋白吸光度值/GADPH为相对含量,以Sham组目标蛋白/GADPH为100%,其余组与之进行比较。

1.7 ELFA 检测氧化应激因子 NADPH 氧化酶活性

自脑分离出海马的皮质组织,在冰上PBS中充分匀浆,以4℃,12000g,10min离心,取上清液,置入96孔荧光板中,再加入80μLPBS及6.25μL的1M的光泽精,再加入100μM的NADPH后开始发生反应。采用多功能酶标仪,在吸收波长340nm,检测速度30s,时间为5min。

1.8 统计学分析

将计量数据以 $\bar{x} \pm S$,使用SPSS17.0统计系统进行分析,组间比较用t检验, $P < 0.05$ 认定为有统计学意义。

2 结果

2.1 CFX 可明显降低实验动物神经损伤严重度评分(Neurological Severity Score, NSS)的影响

GS-Rb1治疗组尽管较假手术组0分明显升高($P < 0.05$),但相对于溶媒组及损伤组却明显降低($P < 0.05$),具有治疗效应。采用H-89后,此种效应可被明显抑制($P < 0.05$),具体结果见表1。

表1 头孢曲松神经损伤严重程度评分(NSS)(n=10)

Table 1 Effect on neurological severity score by CFX

实验组	NSS (分)
sham	0
TBI+CFX	3.2 ± 0.2 ^{##}
TBI+CFX+CBX	5.1 ± 0.5 [*]
TBI+NS	7.2 ± 0.4 [*]
TBI	7.1 ± 0.2 [*]

注:各实验组与假手术(Sham)组比较,^{*} $P < 0.05$;TBI+CFX组与TBI+CFX+CBX组比较,^{##} $P < 0.05$

2.2 CFX 可明显降低脑含水量

脑水肿含量测定结果表明,GS-Rb1治疗后,脑水肿程度较溶媒组及损伤组明显缓解($P < 0.05$),且与假手术组无明显差异($P > 0.05$)。但H-89可明显降低GS-Rb1的此种脑保护效应($P < 0.05$),具体结果见表2。

表2 头孢曲松对脑含水量的影响(n=10)

Table 2 Changes followed by using CFX in cerebral water

实验组	content 脑组织含水率(%)
sham	70.23 ± 4.67
TBI+CFX	71.08 ± 4.55 ^{##}
TBI+CFX+CBX	84.26 ± 5.32 [*]
TBI+NS	89.77 ± 8.77 [*]
TBI	90.12 ± 6.02 [*]

注:各实验组与假手术(Sham)组比较,^{*} $P < 0.05$;TBI+CFX组与TBI+CFX+CBX组比较,^{##} $P < 0.05$

2.3 蛋白学检测 CFX 对降低 Cx40、p-Cx43 表达功能

在给予 CFX 治疗后, Cx40 及 p-Cx43 蛋白表达但尽管未降至假手术组水平, 但较溶媒组及损伤组明确下降, 而 CBX 则可明显抑制 CFX 的此种效应, 具体结果见图 1。

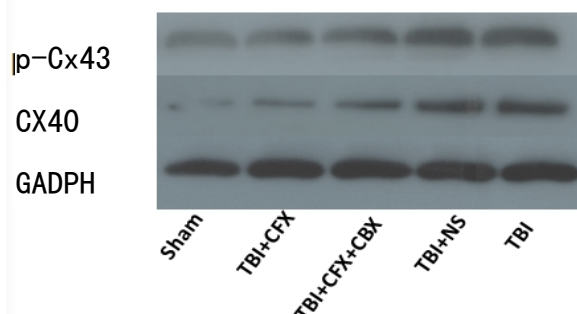


图 1 Cx40 和 p-Cx43 相对含量的表达 ($n=10$)

Fig.1 Expression of relative Content of Cx40 and p-Cx43

2.4 NADPH 氧化酶活性测定

CFX 可明显下调损伤后神经元 NADPH 氧化酶的活性 ($P < 0.05$), 且与假手术组相比亦无明显差异 ($P > 0.05$), 但是此种效应可被 CBX 明显的抑制 ($P < 0.05$), 具体结果见表 3。

表 3 CFX 对 NADPH 氧化酶活性的影响 ($n=10$)

Table 3 Effect of CFX on NADPH oxidase activity

实验组	NADPH 活性 (RLU/mg protein/min)
sham	2734.27 $\pm$ 132.34
TBI+CFX	2803.18 $\pm$ 120.08 [#]
TBI+CFX+CBX	3202.25 $\pm$ 160.58 [*]
TBI+NS	3645.14 $\pm$ 201.21 [*]
TBI	3641.11 $\pm$ 181.35 [*]

注: 各实验组与假手术 (Sham) 组比较, ^{*} $P < 0.05$; TBI+CFX 组与 TBI+CFX+CBX 组比较, [#] $P < 0.05$

3 讨论

第三代头孢菌素 CFX 作为神经外科领域抗生素的一线用药的地位已得到大家公认。CFX 相对于其它第三代头孢菌素抗神经系统感染的基础上, 可能还具神经功能保护的效应, 但其机制不完全明确。随着现代化交通工具的使用及大范围的基础建设的开展, TBI 发病率日益增高。TBI 的发病机制较为复杂, 目前认为氧化应激因子的激活可能与脑损伤密切相关^[6]。在我们的前期实验中也发现, TBI 后 Cx40 蛋白的异常表达和氧化应激因子的表达密

切相关^[7]。因此可以推测, CFX 在抗感染的基础上可能还具有抗氧化应激损伤的功能。

缝隙连接蛋白为相邻细胞的形成直径为 0.2~0.5 μm 的通道^[8], 使两侧的胞质内小分子物质通过, 以维持正常的生理功能及保持细胞的通透性等细胞的稳定状态^[9]。Cx43 蛋白为中枢神经系统中表达最为丰富的缝隙连接蛋白^[10-11], 我们前期研究和 Feng J 等人研究认为非磷酸化 Cx43 (功能性 Cx43) 具有保护作用, 而磷酸化的 Cx43 在细胞内转位中可能导致细胞的损伤^[12-13]。在另一方面, Cx43 磷酸化后而产生内转位, 其与 GLT-1、Na-Ka-ATPase 解离, 导致兴奋性氨基酸和钠水转移功能障碍^[14-15], 进一步导致加重脑损伤的程度。而在另一方面, Frantseva 等人则认为, 某些 Cx 的降低具有神经保护作用^[16]。巧合的是 Chen B 等在临床研究及我们前期的动物研究中也发现了类似的现象, 随着 Cx43 磷酸化的上升, 原本在胶质细胞及神经元低表达的 Cx40 蛋白在损伤后呈现明显上调, 与脑损伤程度具有一致性^[17-18], 因此我们分析, 这可能和不同类型的缝隙连接对不同物质的通透性不同所致。有文献指出, Cx40 对钙离子的通透性为 Cx43 的数倍, 同时 Cx40/Cx43 异型无效型通道也是细胞钙离子沉积引起损伤的因素之一^[19]。有研究指出, CFX 具有抑制 Cx43 磷酸化的功能^[20], 我们推测 CFX 的这种功能可抑制 Cx40 代偿性升高及随后的氧化应激的过度激活。在本研究中, CFX 可抑制缓解缝隙连接的异常表达, 在进一步采用 Cx43 功能抑制剂 CBX (可激活 PKC 途径, 磷酸化 Cx43-C 端的 s368 位点^[21]), 观察到 CBX 可明显抑制 CFX 此种 Cx43 功能保护作用, 并可降低 Cx40 的异常表达。所以我们推测, CFX 的脑保护机制的作用位点在于对 Cx43 磷酸化及 Cx40 异常表达的抑制的基础上抑制氧化应激因子的活性。因此, 在确定了 CFX 的作用位点之后, 研究者又深入验证 CFX 对 Cx43 功能的保护, 降低了 NADPH 氧化酶的活性, 随后又在形态学及行为上明确了此种神经保护机制的存在, 而在给予 CBX 后此种神经功能保护作用可受到抑制。

在此项研究中, 尽管上述的研究对 CFX 与 Cx43 磷酸化做出了明确, 但此项实验中尚未涉及大样本的动物模型及在临床标本上进行明确, 同时

本实验中也未完全涉及到更多的氧化应激因子的变化及下游的炎症因子分泌、细胞凋亡的变化等,这也需在今后进一步的实验去验证。

综上所述,本次研究结果进一步明确与 Cx43 磷酸化有关 CFX 在 TBI 中治疗机制,从而为临床上扩大 CFX 的使用范围、时间窗及主要可能的基因靶点治疗等研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 徐向东,徐伟东,周新民,等. 颅脑损伤患者术后颅内感染的诊治和预防[J]. 中国全科医学,2008,11(5B): 870-871.
- [2] 李萍,李月红,周洪霞,等. 头孢曲松钠对大鼠脑损伤后海马神经细胞凋亡的影响[J]. 中国老年医学杂志,2017, 37(22):5555-5557.
- [3] 颜志婷,熊建忠,林小小,等. 头孢曲松钠对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的脑保护作用[J]. 中国老年医学杂志, 2014, 34(15):4241-4242.
- [4] Hameed M Q, Hsieh T H, Rotenberg A, et al. Ceftriaxone treatment preserves cortical inhibitory interneuron function via transient salvage of GLT-1 in rat TBI model[J]. Cereb Cortex, 2018:22.
- [5] Hussein A M, Ghalwash M, Abulseoud O A. Beta lactams antibiotic ceftriaxone modulates seizures, oxidative stress and Cx43 expression in hippocampus of pentylentetrazole kindled rats[J]. J Epilepsy Res, 2016, 6(1):8-15.
- [6] Khatri N, Thakur M, Pareek V, et al. Oxidative stress: Major threat in traumatic brain injury[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2018, 17(9):689-695.
- [7] Chen W, Guo Y J, Tong W S, et al. Cx40 correlated with oxidative stress in brains of TBI rats[J]. Restor Neurol Neurosci, 2017, 35(2):217-224.
- [8] Elfgang C, Eckert R, Willecke K, et al. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected Hela cells[J]. J Cell Biol, 1995, 129(3):805-817.
- [9] Azarashvili T, Baburina Y, Reiser G, et al. Calcium-induced permeability transition in rat brain mitochondria is promoted by carbenoxolone through targeting connexin[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011 Mar, 300(3): 707-720.
- [10] De Bock M, Wang N, Leybaert L, et al. Endothelial calcium dynamics, connexin channels and blood-brain barrier function[J]. Prog Neurobiol, 2013, 108:1-20.
- [11] De Bock M, Culot M, Simon AM, et al. Connexins channels provide a target to manipulate brain endothelial calcium dynamic and blood-brain barrier permeability[J]. J Cere Blood Flow Metab, 2011, 31(9):1942-1957.
- [12] Chen Wei, Feng J G, Tong Wusong. Phosphorylation of astrocytic Cx43 by ERK1/2 impairs BBB in acute cerebral ischemia[J]. Cell Biosci, 2017(7):43.
- [13] Yin X, Feng L, Feng J, et al. Role of astrocytic Cx43 hemichannels, and gap junction in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury induced neuroinflammation and the possible regulatory mechanism of salvianolic acid B and carbenoxolone[J]. J Neuroinflammation, 2018,27, 15(1):97.
- [14] Langer J, Theis M, Rose CR, et al. Gap junction mediate intercellular spread of sodium between hippocampal astrocytes in situ[J]. Glia, 2012, 60(2):239-252.
- [15] Figiel M, Allritz C, Engele J, et al. Gap junction control of glial glutamate transport expression[J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 35(1):130-137.
- [16] Frantseva M V, Kokarovtseva L, Perez Velazquez JL, et al. Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury[J]. J Neurosci, 2002, 22 (3):644-653.
- [17] Chen W, Guo Y J, Tong W S, et al. Involvement of Cx40 in the protective effects of ginsenoside Rb1 against TBI[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(7):1057-1065.
- [18] Chen B, Sun L, Ma J, et al. Correlation between connexin and traumatic brain injury in patients[J]. Brain and Behav, 2017,(7):00770.
- [19] Mondal A, Moreno A P. Modulation of asymmetric flux in heterotypic gap junction by pore shape, particles size and charge[J]. Front Physiol, 2017:206.
- [20] Hussein A M, Magdy K, Abulseoud O A, et al. Beta Lactams Antibiotic Ceftriaxone Modulates Seizures, Oxidative Stress and Connexin 43 Expression in Hippocampus of Pentylentetrazole Kindled Rats[J]. J Epilepsy Res, 2016, 6(1):8-15.
- [21] Fan Z, Tong X, Dong S et al. Protective effect of propofol against cerebral ischemia/reperfusion injury may involve inhibition of gap junction[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2015, 35(12):1678-1682.