

. 实验研究 .

cAMP 对大鼠颅脑损伤后神经功能及脑水肿的影响

陈 伟 郑 平 任大斌 童武松 刘 宁 赵 麟

【摘要】目的 探讨蛋白激酶 A(PKA) 激活物 cAMP 对颅脑损伤(TBI)大鼠神经功能、脑水肿的影响。**方法** 选取 120 只成年雄性 SD 大鼠随机分为 6 组(每组 20 只):假手术组(暴露硬脑膜而不给予液压打击);高、中、低剂量 cAMP 组(TBI 后 1 h 腹腔注射 60、40、20 mg/kg PKA 激活物 8-Bromo-cAMP);溶媒组(TBI 后 1 h 腹腔注射 cAMP 溶媒二甲基亚砷 10 μl);模型组(液压打击处理)。TBI 后 48 h,采用神经损伤严重程度评分(NSS)评估神经功能,干湿重法测定脑含水量,免疫印迹法检查海马细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)、非磷酸化缝隙连接蛋白 43(NP-Cx43)、谷氨酸转运蛋白-1(GLT-1)及钠钾 ATP 酶的表达,高效液相色谱法检测海马谷氨酸(Glu)的含量。**结果** TBI 后,大鼠 NSS 明显增高($P<0.05$),脑含水量明显增加($P<0.05$),海马 ERK1/2 表达水平明显增加($P<0.05$),海马 Glu 含量明显增加($P<0.05$),而 NP-Cx43、GLT-1、钠钾 ATP 酶表达水平明显降低($P<0.05$);cAMP 干预后,显著逆转这些反应($P<0.05$),而且呈剂量依赖性。**结论** 大鼠 TBI 后,给予 cAMP 干预,激活 PKA,可通过门卫效应抑制 ERK1/2,使 NP-Cx43、GLT-1 及钠钾 ATP 酶水平明显增高,进一步降低 Glu 等脑毒性代谢产物,缓解脑水肿,从而改善大鼠神经功能。

【关键词】 颅脑损伤;脑水肿;缝隙连接蛋白 43;谷氨酸转运蛋白-1;钠钾 ATP 酶;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2019)04-0226-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1*5

Role of inhibition of phosphorylated Cx43 by PKA pathway in treatment for traumatic brain injury

CHEN Wei¹, ZHENG Ping², REN Da-Bin², TONG Wu-Song², LIU Ning³, ZHAO Lin³. 1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330008, China; 2. Department of Neurosurgery, The People's Hospital of Shanghai Pudong New Area, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201299, China; 3. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, 210009, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of inhibition of phosphorylated connexin (Cx)43 by protein kinase A (PKA) on the treatment of traumatic brain injury (TBI). **Methods** One hundred and twenty rats were randomly divided into 6 groups of 20 animal each, i.e. sham operation group, treatment groups, 1, 2 and 3 in which the rats received peritoneal injection of 20, 40 and 60 mg/kg 8-Bromo-cAMP respectively 1 hour after TBI, vehicle group in which the rats received peritoneal injection of dimethyl sulphoxide 1 hour after TBI and TBI group in which the rats underwent TBI only and did not receive any treatment. TBI models were established with fluid percussion device in the rats. Ten rates were sacrificed 48 hours after TBI and their brain water content was determined after the behavioral disorders were determined by Neurological Severity score (NSS) in all the groups. Another 10 rates were sacrificed 48 hours after TBI and their hippocampal astrocytes were obtained in order to determine the expressions of extracellular regulated protein kinase (ERK)1/2, nonphorylated (NP)-Cx43, glutamic transducin (GLT)-1 and Na-K-ATP determined by western blot and glutamic acid (Glu) by high pressure liquid chromatography. **Result** The levels of NP-Cx43, GLT-1 and Na-K-ATP expressions were significantly higher in all the treatment groups and sham operation group than those in other two groups ($P<0.05$). The levels of ERK1/2 and Glu expressions, brain water content and the scores of NSS were significantly lower in all the treatment groups and sham operation operation group than those in the TBI and vehicle groups ($P<0.05$). These changes were 8-Bromo-cAMP dose-dependent. **Conclusions** Activation of PKA pathway can inhibit ERK1/2 pathway, and up-regulate the levels of NP-Cx43, GLT-1 and Na-K-ATP protein expressions in the hippocampal astrocytes, which can reduce the contents of brain water and Glu on the brain in the rate with TBI.

【Key words】 Traumatic brain injury; Cx43; GLT-1; Na-K-ATP; Glutamate; Expression; Roles

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.04.012

基金项目:国家自然科学基金(81701231);上海市自然科学基金(16ZR1431500);上海市浦东新区科委民生项目(PKJ2016-Y31);上海健康医学院种子基金(SFP-18-21-13-007;SFP-18-21-13-005)
作者单位:330008 南昌,南昌大学第一附属医院神经外科(陈 伟) 201299 上海,上海健康医学院附属上海浦东新区人民医院神经外科(郑 平、任大斌、童武松);210009 南京,南京医科大学第一附属医院神经外科(刘 宁、赵 麟)

通讯作者:赵 麟,E-mail:z_l_nirvana@126.com

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)急性期出现的脑水肿是造成病人残疾及死亡的重要因素之一。TBI 后脑水肿的发生及发展的机制较为复杂,至今仍未完全明确。既往研究表明,脑损伤与细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 途径的激活导致的缝隙连接蛋白(connexin, Cx)43 磷酸化水平增高密切相关^[1],而激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 可通过“门卫

效应”抑制 ERK1/2, 从而抑制 Cx43 磷酸化^[2,3]。本研究通过建立大鼠 TBI 模型, 探讨 PKA 激活物 cAMP 对大鼠 TBI 后神经功能、脑水肿的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 120 只 3 月龄、体重 350~450 g 的雄性 SD 大鼠[购自上海毕凯实验动物有限责任公司(沪 ICP 备 05033115)]随机分为 6 组, 每组 20 只: 假手术组; 高、中、低剂量 cAMP 组; 溶媒组; 模型组。大鼠使用经上海健康医学院附属上海浦东新区人民医院及南京医科大学第一附属医院实验动物伦理委员会同意。

1.2 模型建立及干预 采用液压打击法制作大鼠 TBI 模型。大鼠经异氟烷吸入麻醉后, 固定于立体实验台。头部正中分层切开皮肤和骨膜, 暴露右侧顶骨。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 个大气压(重型 TBI 标准)液压击打。

高、中、低剂量 cAMP 组在 TBI 后 1 h 腹腔注射 60、40、20 mg/kg 的 PKA 激活物 8-Bromo-cAMP 治疗。溶媒组在 TBI 后 1 h 腹腔注射 cAMP 溶媒二甲亚砜 10 μ l。假手术组仅暴露硬脑膜而不给予液压打击。模型组液压打击形成后不给予处理。

1.3 大鼠神经功能评估 TBI 后 48 h, 每组取 10 只大鼠采用神经损伤严重程度评分(neurological severity score, NSS)评估神经功能。采用双盲法, 并根据以下原则进行评估: 提鼠尾离地面约 30 cm, 观察前肢情况, 正常大鼠两前肢对称地伸向地面, 如果左肩内旋、左前肢内收, 评为 4 分, 否则 0 分; 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, 如果右肩向左侧移动时, 发现阻力下降时, 根据下降程度的不同, 评为 1~3 分; 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, 如果发现左前肢肌张力下降, 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, 说明动物的神经功能障碍越严重。

1.4 脑含水量测定 将完成 NSS 评估的动物处死, 迅速取脑, 并移到冰面, 测定大脑湿重。再将大脑放入蒸箱中, 110 $^{\circ}$ C 烘蒸 24 h, 测得大脑干重。含水量=(大脑湿重-大脑干重)/大脑湿重 \times 100%。

1.5 免疫印迹法测定 ERK1/2、非磷酸化 Cx43(NP-Cx43)、谷氨酸转运蛋白(glutamate transporter,

GLT)-1 及钠钾 ATP 酶的变化 TBI 后 48 h, 每组取 10 只大鼠分离海马组织, 用冰冷 PBS 洗涤两次; 加入 RIPA 裂解缓冲液(美国 Santa Cruze 公司), 含 1% 的蛋白酶抑制剂。冰上匀浆、裂解 10 min, 12 000 转/min 低温离心 15 min, 收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度, 取 30 μ g 总蛋白, 经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 常规方法转印至 NC 膜上, 封闭液封闭 2 h。再加入一抗: ERK1/2(1:1 000), NP-Cx43(1:500), GLT-1(1:1 000), 钠钾 ATP 酶(1:1 000)及内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH; 1:2 500)(美国 Santa Cruze 公司)4 $^{\circ}$ C 轻摇过夜。TBST 溶液洗涤 NC 膜, 再加入辣根酶标记山羊抗兔二抗(1:2 000; 中山金桥生物科技公司)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。采用化学发光试剂盒(中山金桥生物科技公司)进行显影。Image J 软件分析灰度值, 相对含量=(目标蛋白/GAPDH)/(Sham 组目标蛋白/GAPDH) \times 100%。

1.6 谷氨酸(glutamate, Glu)含量测定 将免疫印迹法分析剩余的海马组织按 1:5 加入 0.01 mol/L HCl, 在冰浴下超声匀浆, 10 000 g 低温离心 15 min。取上清液 100 μ l, 加入 10 μ l 浓度为 1 g/L 正亮氨酸为内标物, 利用异硫氰酸苯酯衍生采用 LC-10Avp 高效液相色谱仪用内标法测定 Glu 的含量。

1.7 统计学分析 使用 SPSS17.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 *t* 检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 cAMP 对大鼠 TBI 后 NSS 的影响 假手术组 NSS 为 0 分, 大鼠神经功能完全正常。模型组、溶媒组以及低、中、高剂量 cAMP 组大鼠 NSS 分别为(8.7 \pm 1.3)分、(8.9 \pm 0.4)分、(7.2 \pm 1.2)分、(5.4 \pm 0.9)分、(3.2 \pm 0.2)分。模型组和溶媒组大鼠 NSS 较假手术组明显上升($P<0.05$), 但模型组和溶媒组大鼠 NSS 无统计学差异($P>0.05$)。cAMP 干预后, 大鼠 NSS 评分明显降低($P<0.05$); 而且, 随 cAMP 剂量增加, NSS 显著降低($P<0.05$), 但是均明显高于假手术组($P<0.05$)。

2.2 cAMP 对大鼠 TBI 后脑组织含水量的影响 假手术组、模型组、溶媒组、以及低、中、高剂量 cAMP 组脑组织含水量分别为(68.23 \pm 2.16)%、(90.35 \pm 3.22)%、(91.52 \pm 5.13)%、(84.08 \pm 3.48)%、(79.20 \pm 2.48)%、(73.20 \pm 3.05)%。模型组和溶媒组大鼠脑组织含水量较假手术组明显上升($P<0.05$), 但模型组和溶媒组大鼠脑组织含水量无统计学差异($P>0.05$)。cAMP 干预后, 大鼠脑组织含水量明显降低

($P < 0.05$); 而且, 随 cAMP 剂量增加, 脑组织含水量显著降低 ($P < 0.05$), 但是均明显高于假手术组 ($P < 0.05$)。

2.3 cAMP 对大鼠 TBI 后海马 ERK1/2、NP-Cx43、GLT-1 及钠钾 ATP 酶表达的影响 与假手术组相比, 溶媒组和模型组大鼠 TBI 后海马 ERK1/2 表达水平明显增高 ($P < 0.05$), 而 NP-Cx43、GLT-1 及钠钾 ATP 酶表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 溶媒组和模型组大鼠 TBI 后海马 ERK1/2、NP-Cx43、GLT-1 及钠钾 ATP 酶表达水平均无统计学差异 ($P > 0.05$)。cAMP 干预后, ERK1/2 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 而 NP-Cx43、GLT-1 及钠钾 ATP 酶表达水平明显增高 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.4 cAMP 对大鼠 TBI 海马 Glu 含量的影响 假手术组、模型组、溶媒组、以及低、中、高剂量 cAMP 组脑组织含水量分别为 (13.77 ± 1.24) $\mu\text{g/ml}$ 、(30.35 ± 4.12) $\mu\text{g/ml}$ 、(31.33 ± 6.08) $\mu\text{g/ml}$ 、(23.08 ± 3.08) $\mu\text{g/ml}$ 、(22.25 ± 1.78) $\mu\text{g/ml}$ 、(16.24 ± 2.05) $\mu\text{g/ml}$ 。模型组和溶媒组大鼠海马 Glu 含量较假手术组明显上升 ($P < 0.05$), 但模型组和溶媒组大鼠海马 Glu 含量无统计学差异 ($P > 0.05$)。cAMP 干预后, 大鼠海马 Glu 含量明显降低 ($P < 0.05$); 而且, 随 cAMP 剂量增加, 海马 Glu 含量显著降低 ($P < 0.05$), 但是均明显高于假手术组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

大量研究显示, TBI 后中枢神经系统内兴奋性氨基酸及水代谢紊乱与伤后脑水肿密切相关^[4,5]。本研究显示, 大鼠 TBI 后, 海马 GLT-1、钠钾 ATP 酶表达水平明显降低, Glu 含量明显增高。

近年来, 研究显示, Cx43 表达异常可能与脑损伤关系密切。Cx 为跨膜蛋白, 可维持细胞正常的形态及功能^[6]。Cx43 在中枢神经系统中表达最为丰富^[7], 其表达异常与神经系统疾病的发生及发展有着密切的关系。我们之前发现, 中枢神经细胞受损后, 总 Cx43 表达未出现明显变化, 而 NP-Cx43 却明显增多^[1]。这与文献[8,9]报道一致。本研究也发现, 大鼠 TBI 后, NP-Cx43 水平明显降低; 给予 cAMP 干预后, NP-Cx43 水平明显升高。有研究指出, Cx43 与 GLT-1、钠钾 ATP 酶互为粘联蛋白, Cx43 磷酸化的增多可导致 GLT-1、钠钾 ATP 酶功能的降低^[10,11]。本研究发现大鼠 TBI 后, 给予 cAMP 激活 PKA, 增加 NP-Cx43, 可使得 GLT-1 及钠钾 ATP 酶表达增多, 从而降低 Glu 含量、缓解脑水肿。这可能是增加 NP-Cx43 产生脑保护作用的机制。

研究显示, 不同蛋白通路磷酸化 Cx43 后, 对 Cx43 功能及形态的作用也不同, 以蛋白激酶 B、C 及 ERK 为主的传导通路可示 Cx43 磷酸化, 产生内转位

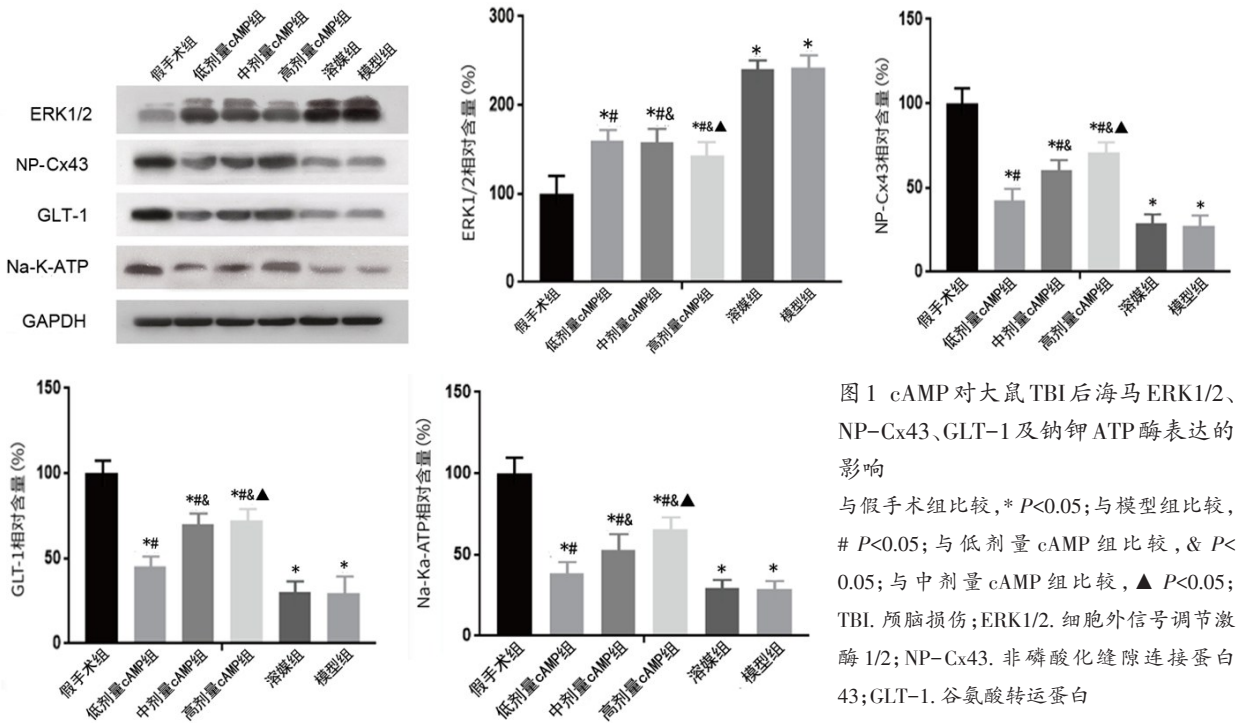


图 1 cAMP 对大鼠 TBI 后海马 ERK1/2、NP-Cx43、GLT-1 及钠钾 ATP 酶表达的影响

与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与低剂量 cAMP 组比较, & $P < 0.05$; 与中剂量 cAMP 组比较, ▲ $P < 0.05$; TBI 颅脑损伤; ERK1/2. 细胞外信号调节激酶 1/2; NP-Cx43. 非磷酸化缝隙连接蛋白 43; GLT-1. 谷氨酸转运蛋白

与粘联蛋白解离^[12]。而PKA则可通过锚定蛋白Erzin发挥效应,促进功能性Cx43的产生^[13]。我们之前通过多信号传导通路筛选的研究已经证实,ERK1/2通路与脑损伤后Cx43磷酸化相关性最为明显^[1]。近来多,信号传导通路间的“门卫效应”被较多提及,指在多条信号传导通路影响下,其中具有优势的传导通路可抑制其它的传导通路^[14]。研究发现通过PKA途径磷酸化Cx43-CT-S365,可抑制其它传导通路所致的Cx43功能的下调^[3,14,15]。因此,我们推测TBI后,ERK1/2途径占据明显主导地位,在导致细胞损伤基础上,还可抑制PKA途径及减少NP-Cx43。本研究中,我们通过给予PKA激活物8-Bromo-cAMP,观察到随着PKA对ERK1/2途径的抑制,NP-Cx43水平与PKA激活物剂量呈正向依赖关系。

因此,我们认为大鼠TBI后,给予cAMP干预,激活PKA,可通过门卫效应抑制ERK1/2,使NP-Cx43、GLT-1及钠钾ATP酶水平明显增高,进一步降低Glu等脑毒性代谢产物、缓解脑水肿,从而改善大鼠神经功能。

【参考文献】

- [1] Chen W, Feng JG, Tong WS. Phosphorylation of astrocytic connexin43 by ERK1/2 impairs blood-brain barrier in acute cerebral ischemia [J]. *Cell Biosci*, 2017, 7: 43.
- [2] Dukic AR, Gerbaud P, Pidoux G, *et al.* Ezrin-anchored PKA phosphorylates serine 369 and 373 on Cx43 to enhance gap junction assembly, communication and cell fusion [J]. *Biochem J*, 2018, 475(2): 455-476.
- [3] Pidoux G, Tasken K. Anchored PKA as a gatekeeper for gap junctions [J]. *Commun Inter Biol*, 2015, 8(4): e1057361.
- [4] Glenn TC, Hirt D, Martin NA, *et al.* Metabolomic analysis of CSF from patients with severe TBI [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2013, 118: 115-119.
- [5] Seitelberger F, Lassmann H, Hornykiewicz D. Some mechanism of brain edema studied in a kainic acid model [J]. *Acta Neurobiol Exp*, 1990, 50(4-5): 263-267.
- [6] 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*, 129, 805-817.
- [7] De Bock M, C μlot 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.
- [8] Avila MA, Boone DR, DeWitt DS, *et al.* Cerebrovascular connexin expression: effects of traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(9): 1803-1811.
- [9] Chen B, Sun L, Ma J, *et al.* Correlation between connexin and traumatic brain injury in patients [J]. *Brain Behav*, 2017, 7: e00770.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Vicenzova C, Szeiffova Bacova B, Tribulova N, *et al.* Myocardial Cx43 and PKC signaling are involved in adaptation of the heart to irradiation induced injury: Implication of miR-1 and miR-21 [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2016, 35(2): 215-222.
- [13] Guillaume P, Pascale G, Jim D, *et al.* A PKA-erzin-Cx43 signaling complex controls gap junction communication and thereby trophoblast cell fusion [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127: 4172-4185.
- [14] Pidoux G, Tasken K. Anchored PKA as gatekeeper for gap junction [J]. *Commun Integr Biol*, 2015, 8(4): e1057361.
- [15] Solan JL, Marquez L, Lamper PD, *et al.* Phosphorylation at S365 is gatekeeper event that changes structure of Connexin 43 and prevents down regulation by PKC [J]. *J Cell Biol*, 2007, 179(6): 1301-1309.

(2019-01-15收稿, 2019-02-18修回)