

. 实验研究 .

抑制 ERK1/2 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

任大斌 郑 平 冯九庚 段 剑 邹树峰 洪 涛 赵 麟 陈 伟

【摘要】目的 探讨抑制细胞外调节蛋白激酶(ERK)1/2 对脑缺血再灌注(I/R)损伤大鼠的作用及对缝隙连接蛋白(Cx)40/Cx43 异型缝隙连接表达以及核因子-κB(NF-κB)相关炎症因子 p-IκBa、肿瘤坏死因子(TNF)-α 及干扰素(IFN)表达的影响。**方法** 选取成年雄性 100 只大鼠随机分为 5 组,每组 20 只:假手术组(仅暴露双侧颈总动脉而不夹闭);治疗组 4 h 组和治疗组 8 h 组(I/R 后立即腹腔注射 ERK1/2 特异性抑制剂 SCH772984, 25 mg/kg);④溶媒组(I/R 后立即腹腔注射溶媒二甲基亚枫);⑤模型组(阻断双侧颈总动脉血流 30 min 后,恢复血流,产生 I/R 损伤)。采用神经功能损伤程度量表(NSS)评分评估大鼠神经功能。采用干湿重法测定脑组织含水率。采用免疫印迹法测定损伤侧海马区皮质 p-IκBa、TNF-α 及 IFN 的表达,采用免疫共沉淀法检测 Cx40/Cx43 异型连接表达。**结果** 模型组 NSS 评分脑含水率、p-IκBa、TNF-α、IFN 及 Cx40/Cx43 异型连接的表达水平较假手术组均明显增高($P<0.05$),SCH772984 干预后,均明显下降($P<0.05$)。**结论** 抑制 ERK1/2 途径,可明显抑制 Cx40/Cx43 异型连接和 NF-κB,减少炎症因子,缓解脑水肿,从而改善大鼠神经功能。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤;缝隙连接蛋白 43;缝隙连接蛋白 40;异型连接;核因子-κB;细胞外调节蛋白激酶;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2019)05-0295-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743

Protective effetc of inhibition of ERK1/2 on rats after cerebral ischemia-repufusion injury

REN Da-bin¹, ZHENG Ping¹, FENG Jiu-geng², DUAN Jian², ZOU Shu-feng², Hong Tao³, ZHAO Lin³, CHEN Wei^{1,2}. 1. Department of Neurosurgery, Affiliated People's Hospital of Shanghai Pudong New Area, Shanghai College of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201299, China; 2. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330008, China; 3. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of inhibition of extracellular regulated protein kinase (ERK) 1/2 on rats after the cerebral ischemia-repufusion (I/R) injury. **Methods** One hundred adult SD rats were randomly divided into 5 groups 20 animals each, i. e. sham operation; treatment groups 1 and 2 in which the animals received the intraperitoneal injection of ERK1/2 inhibitor SCH 772984 (25 mg/kg) immediately after I/R and then were sacrificed 4 and 8 hours after I/R, respectively; vehicle group in which the animals received intraperitoneal injection of isovolumetric DMSO and then were sacrificed 8 hours after I/R; injury group in which the animals without receiving any treatment were sacrificed 8 hours after I/R. The cerebral I/R injury model was established by clipping bilateral common carotid arteries. The cerebral water content was measured by Hatashita wet-weight method in 10 rats of each group. The levels of p-IκBa, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interferon (IFN) and Cx40/Cx43 heterotypic gap junction expressions were determined in the hippocampal tissues of 10 rats of each group by western blot and co-immunoprecipitation, respectively. **Results** Water content and levels of p-IκBa, TNF-α, IFN and Cx40/Cx43 heterotypic gap junction expressions were significantly lower in the treatment groups 1 and 2 than those in the vehicle and injury groups ($P<0.05$) and were significantly higher than those in the sham group ($P<0.05$). There were no significantly differences in the cerebral water content and the levels of p-IκBa, TNF-a, IFN and Cx40/Cx43 heterotypic gap junction expressions between both the treatment groups ($P>0.05$). **Conclusion** Inhibition of ERK1/2 may relieve the cerebral oedema and improve the neurological function which may be by down-regulation of Cx40/Cx43 heterotypic gap junction and p-IκBa protein expressions, then reducing the levels of inflammatory factors such as TNF-α and INF expressions in the rats after I/R injury.

【Key words】 Ischemia reperfusion injury; Cx43; Cx40; Heterotypic gap junction; Nuclear factor-κB; Rat

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.05.012
基金项目:上海健康医学院种子基金项目(SFP-18-21-13-007,SFP-18-21-13-005);上海市浦东新区科委民生项目(PKJ2016-Y31);国家自然科学基金(81701231);上海市自然科学基金(16ZR1431500)
作者单位: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(任大斌、郑 平、陈 伟);330008 南昌,南昌大学第一附属医院神经外科(冯九庚、段 剑、邹树峰、洪 涛、陈 伟);210029 南京,南京医科大学第一附属医院神经外科(赵 麟)
通讯作者:陈 伟,E-mail:22248223@qq.com

脑缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤病死率及致残率仍然较高^[1]。研究显示,核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)途径激活所致的炎症因子的大量增多,是脑 I/R 损伤发生、发展的最为重要的原因之一^[2]。研究发现缝隙连接蛋白(connexin, Cx)40 与 Cx43 所形成的异型连接与脑 I/R 损伤密切相关^[3-6]。Cx40 与 NF- κ B 的抑制蛋白 I κ Ba 具有同源性^[7]。因此, Cx40/Cx43 异型连接形成可能导致 I κ Ba 对 NF- κ B 途径抑制功能减弱是脑 I/R 损伤的原因。受损胶质细胞 Cx40/Cx43 异型连接表达明显上调与细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK) 1/2 的激活密切相关^[5]。本实验通过抑制 ERK1/2, 观察其对脑 I/R 大鼠的作用及对 Cx40/Cx43 异型缝隙连接表达以及 NF- κ B 相关炎症因子 p-I κ Ba、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 及干扰素(interferon, IFN)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 将 100 只雄性 SD 大鼠[350~450 g, 上海毕凯实验动物有限责任公司(沪 ICP 备 05033115)]随机分为 5 组, 每组 20 只: ①假手术组; ②治疗 4 h 组; ③治疗 8 h 组; ④溶媒组; ⑤模型组。

1.2 大鼠脑 I/R 模型的建立 将 3%戊巴比妥(65 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后, 取颈部正中切口, 找到双侧颈总动脉, 分离周围组织, 用微血管夹夹闭双侧颈总动脉, 大鼠体温维持在 37℃。夹闭效果用激光多普勒血流仪(Stockholm, 瑞典)进行测量, 以小于正常血流量的 25%作为有效。阻断双侧颈总动脉血流 30 min 后, 撤去血管夹, 恢复血流, 产生 I/R 损伤。

1.3 干预方法 假手术组仅暴露双侧颈总动脉而不夹闭; 治疗组伤后立腹腔注射 SCH772984(25 mg/kg; Adooq Bioscience, 美国); ④溶媒组腹腔注射 SCH772984 溶媒 5%二甲基亚砷 10 μ l。治疗 4 h 组为伤后 4 h 进行实验, 而治疗 8 h、溶媒组、模型组伤后 8 h 进行实验。

1.4 神经功能评估 采用神经功能损伤程度量表(neurological severity scale, NSS)评分评估大鼠神经功能。采用双盲法, 根据以下原则评估: 提起大鼠尾巴离地面约 1 尺, 观察前肢情况, 正常大鼠两前肢对称地伸向地面, 左肩内旋、左前肢内收为 4 分, 否则 0 分; 将大鼠置平滑地板上, 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, 阻力下降, 根据下降程度

的不同评为 1~3 分; 将大鼠两前肢置一金属网上, 观察两前肢张力, 正常大鼠两前肢的张力明显对称, 发现左前肢肌张力下降, 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, 说明动物的功能损伤越严重。

1.5 脑含水量测定 NSS 评分结束后, 每组取 10 只大鼠测定脑组织含水量。拉颈法处死大鼠后, 快速开颅取脑, 迅速移到冰面, 并测定大脑湿重。再将大脑放入蒸箱中, 在 110℃下, 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%。

1.6 免疫印迹法测定 p-I κ Ba、TNF- α 及 IFN 的表达 每组剩余 10 只大鼠则取伤侧海马区组织测定蛋白。取海马区域皮质组织, 冰冷 PBS 洗涤两次; 加入 RIPA 裂解缓冲液(Santa Cruze, 含 1%蛋白酶抑制剂)冰上匀浆 10 min, 低温离心 12 000 转/min \times 25 min, 收集上清液, BCA 法测定蛋白含量, 按每泳道 30 μ g 蛋白上样电泳, 其余标本在 -80℃冻存。12%的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 常规方法转印至 NC 膜上, 5%脱脂牛奶-TBST 封闭 2 h, 再分别将 I κ Ba(1:1 500)、p-I κ Ba(1:1 000)、TNF- α (1:1 000)、IFN(1:1 000)及内参 GAPDH(1:2 000)(Santa Cruze, 美国)加入封闭液, 4℃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抗体(1:2 000; 中山金桥生物科技), 37℃孵育 1 h。采用化学发光试剂盒(中山金桥生物科技)进行发光显影。扫描蛋白条带, 采用 Image J 1.36b 软件下行吸光度分析, 蛋白吸光度值/GAPDH 为相对含量, 以假手术组目标蛋白/GAPDH 为 100%。

1.7 免疫共沉淀法测定 Cx40/Cx43 异型连接的表达 提取冻存的蛋白标本, 按照参考文献[5]方法, 加以 Cx40 一抗(Zymed, 美国)及正常大鼠血清 10 μ l, 低温孵育过夜, 再将处理好的液体置入蛋白琼脂糖珠中, 孵育 4 h, 将琼脂糖珠用裂解液冲洗数次, 加入上样液、煮沸、测定浓度、上样, 采用 Cx40、Cx43 一抗(Zymed, 美国), 与免疫印迹法步骤及分析方法相同, 以 Cx40 蛋白析出液体中 Cx43 蛋白含量的表达为 CX40/Cx43 异型连接的含量^[5], 以各组 Cx43/假手术组 Cx43 \times 100%为相对含量。

1.8 统计学分析 使用 SPSS 17.0 和 Graph Prism 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用方差分析和 t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSS 评分比较 模型组和溶媒组 NSS 评分较假手

术组明显增高($P<0.05$),而模型组和溶媒组无统计学差异($P>0.05$)。治疗 4 h 组和治疗 8 h 组 NSS 评分较模型组明显降低($P<0.05$),但均明显高于假手术组($P<0.05$)。见表 1。

2.2 脑组织含水率的比较 模型组和溶媒组脑组织含水率较假手术组明显增高($P<0.05$),而模型组和溶媒组无统计学差异($P>0.05$)。治疗 4 h 组和治疗 8 h 组脑组织含水率较模型组明显降低($P<0.05$),但均明显高于假手术组($P<0.05$)。见表 1。

2.3 p-I κ Ba、TNF- α 、IFN 表达水平的比较 模型组和溶媒组 p-I κ Ba、TNF- α 及 IFN 表达水平较假手术组明显增高($P<0.05$),而模型组和溶媒组无统计学差异($P>0.05$)。治疗 4 h 组和治疗 8 h 组 p-I κ Ba、TNF- α 及 IFN 表达水平较模型组明显降低($P<0.05$),但均明显高于假手术组($P<0.05$)。见图 1。

2.4 Cx40/Cx43 异型连接表达水平的变化 模型组和溶媒组 Cx40/x43 共表达(异型连接)水平较假手术组

明显增高($P<0.05$),而模型组和溶媒组无统计学差异($P>0.05$)。治疗 4 h 组和治疗 8 h 组 Cx40/x43 共表达(异型连接)水平较模型组明显降低($P<0.05$),但均明显高于假手术组($P<0.05$)。见图 2。

3 讨论

大面积脑梗死发病率逐年升高,尽管随着机械

表 1 各组大鼠 NSS 评分和脑组织含水率比较

组别	NSS 评分	脑组织含水率
假手术组	0	(68.2 \pm 4.1)%
治疗 4 h 组	2.7 \pm 0.3 ^{*#}	(75.0 \pm 5.5)% ^{*#}
治疗 8 h 组	3.2 \pm 0.4 ^{*#}	(76.2 \pm 3.1)% ^{*#}
溶媒组	6.5 \pm 0.5 [*]	(88.5 \pm 4.3)% [*]
模型组	6.7 \pm 0.6 [*]	(87.4 \pm 6.3)% [*]

注:与假手术组相应值比较,* $P<0.05$;与模型组相应值比较,# $P<0.05$;NSS. 神经功能损伤程度量表

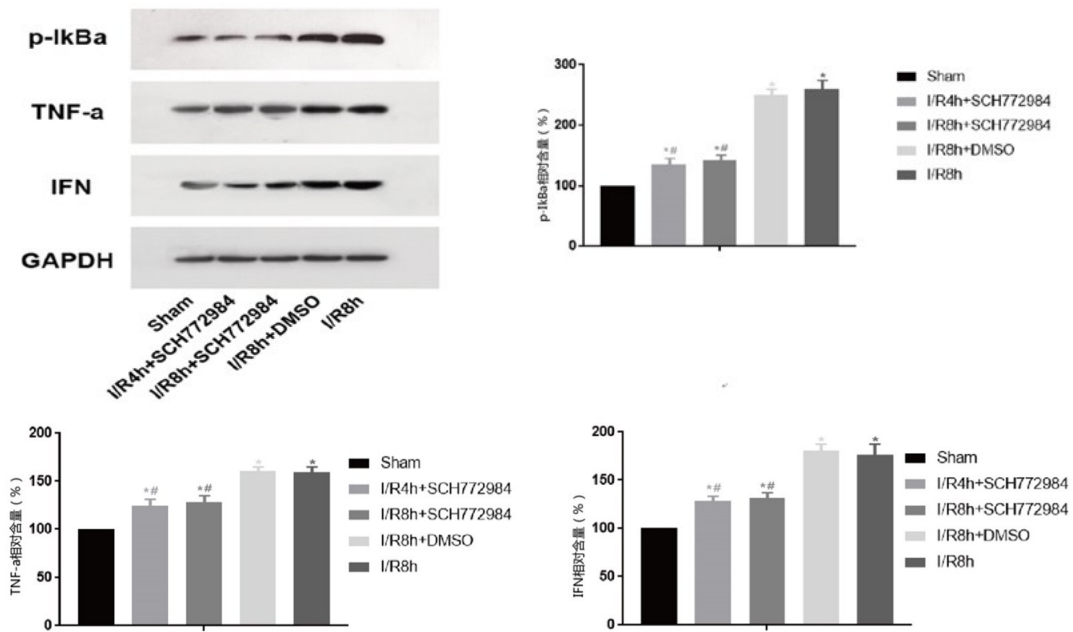


图 1 各组 p-I κ Ba、TNF- α 、IFN 表达水平的比较

与假手术组相应值比较,* $P<0.05$;与模型组相应值比较,# $P<0.05$;TNF- α . 肿瘤坏死因子- α ;INF. 干扰素

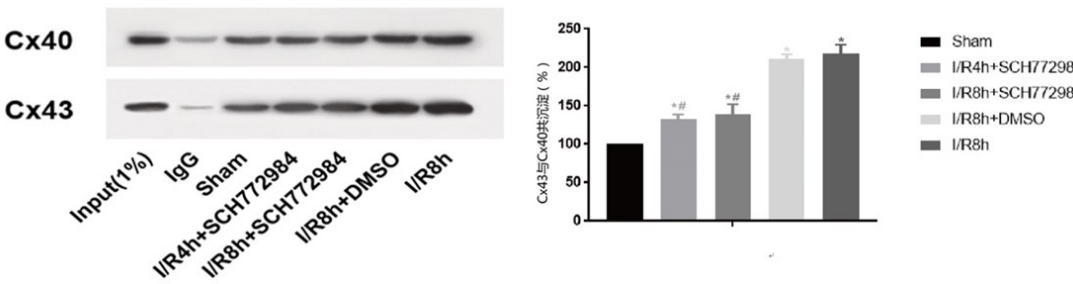


图 2 各组 Cx40/Cx43 异型连接表达水平的比较

与假手术组相应值比较,* $P<0.05$;与模型组相应值比较,# $P<0.05$

取栓术的普及,但治疗效果仍不理想。目前普遍认为脑 I/R 损伤可能是导致这一现象最重要的原因之一。Cx 为跨膜蛋白^[8],可维持细胞正常形态及功能^[9]。Cx43 为中枢神经系统最为丰富的 Cx,其表达异常与神经系统疾病的发生、发展有着密切的关系。研究发现,Cx43 蛋白磷酸化程度与脑损伤程度有关^[10,11]。而 Frantseva 等^[12]则认为,某些 Cx 的降低具有神经保护作用。我们前期研究显示,抑制神经元 Cx40 蛋白,可改善神功功能损伤^[13]。这提示 Cx 表达的异常可能参与脑损伤的发生、发展。

异型缝隙连接指两个不同连接子所形成的 Cx,其功能的改变仍不完全明确。叶新运和洪涛^[14]首次提出 Cx43/Cx45 异型连接与脑血管痉挛有关。我们前期研究也发现,受损胶质细胞 Cx40/Cx43 异型连接表达明显上调,且并可能和 ERK1/2 的激活相关^[5]。NF- κ B 的激活所致的 TNF- α 及 IFN 等损伤性因子的异常增多参与 I/R 损伤^[15]。而 I κ B α 磷酸化增多,对 NF- κ B 抑制的减弱则是 NF- κ B 途径激活的主要形式。最新的研究显示,Cx40 与 I κ B α 末端具有同源性^[8]。我们推测,Cx43 可能与 I κ B α 竞争性地与 Cx40 结合,随着 Cx40/Cx43 异型连接的增多,I κ B α 与 Cx40 解离也增多,从而导致 I κ B α 的活化,启动 NF- κ B 途径。本文结果显示抑制 ERK1/2 后,Cx40/Cx43 异型连接减少,I κ B α 磷酸化程度也明显降低,下游的 TNF- α 、IFN 等炎症因子表达也明显减少。因此,我们认为,随着 Cx40/Cx43 异型连接的减少,Cx43 与 I κ B α 竞争性抑制作用减弱,可降低 I κ B α 磷酸化水平,对 NF- κ B 的激活有抑制作用。

综上所述,抑制 ERK1/2 途径,可明显抑制 Cx40/Cx43 异型连接和 NF- κ B,减少炎症因子,缓解脑水肿,从而改善大鼠神经功能。这提示 Cx40/43 异型连接的增多,导致 NF- κ B 抑制解除与脑 I/R 损伤有关。

【参考文献】

- [1] Jiang B, Wang WZ, Bao QJ, *et al.* Incidence and trend of stroke and its subtypes in China results from three cities [J]. *Stroke*, 2006, 37: 63-68
- [2] Kim E, Kim HC, Lee S, *et al.* Dexmedetomidine confer neuroprotection against transient global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting inflammation through inactivation of the TLR-4/NF- κ B pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 649: 20-27.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Chen W, Feng JG, Tong WS. Phosphorylation of astrocytic Cx43 by ERK1/2 impairs BBB in acute cerebral ischemia [J]. *Cell Biosci*, 2017, 7: 43.
- [6] Chen W, Zheng P, Feng JG, *et al.* Phosphorylation of Cx43 induced by TBI promotes exosome release [J]. *J Neurophysiol*, 2018, 119(1): 305-311.
- [7] Denis JF, Pfenniger A, Kwak BR, *et al.* Cx40 controls endothelial activation by dampening NF- κ B activation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 50972-50986.
- [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*, 129: 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, 300(3): C707-720.
- [10] Ohsumi A, Nawashiro H, Shima K, *et al.* Temporal and spatial profile of phosphorylated connexin43 after traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27: 1255-1263.
- [11] Chen B, Sun L, Ma J, *et al.* Correlation between connexin and traumatic brain injury in patients [J]. *Brain and Behav*, 2017, 7: e00770.
- [12] Frantseva MV, Kokarotseva 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.
- [13] Chen W, Guo YJ, Tong WS, *et al.* Involvement of Cx40 in the protective effects of ginsenoside Rb1 against TBI [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(7): 1057-1065.
- [14] 叶新运,洪涛. Cx43/Cx45 异型缝隙连接通道参与试验性蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的实验研究[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29(3): 196-199.
- [15] Jayakumar AR, Tong XY, Norenberg MD, *et al.* Activation of NF- κ B mediates astrocyte swelling and brain edema in TBI [J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(14): 1249-1257.

(2018-12-02 收稿, 2019-01-08 修回)