

. 实验研究 .

头孢曲松钠对大鼠蛛网膜下腔出血后认知功能的影响

陈 旭 吴 琳 冯达云 王举磊 秦怀洲 高国栋 张治国

【摘要】目的 探讨头孢曲松钠(CEF)对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后的认知功能的影响及其机制。**方法** 将 68 只成年 SD 大鼠随机分为 4 组:正常组(n=12)、对照组(n=24)、CEF 低剂量治疗组(n=8)和 CEF 高剂量治疗组(n=24)。采用枕大池双次注血方法建立大鼠 SAH 模型。SAH 后 3 h 经小脑延髓池缓慢注射 100 μ l CEF(高剂量组浓度为 100 μ mol/L,低剂量组浓度为 50 μ mol/L),对照治疗组注射等体积生理盐水。采用 Morris 水迷宫检测各组动物学习记忆能力;Western blot 检测各组大鼠海马 Caspase-3 和兴奋性氨基酸转运体 2(EAAT2)的表达水平。**结果** 与对照组相比,CEF 治疗组 SAH 后动物的水迷宫实验中的逃逸时间显著减少($P<0.05$),大鼠海马组织中 EAAT2 的表达增加($P<0.05$),Caspase-3 的表达减少($P<0.05$)。**结论** CEF 对 SAH 后具有显著的神经保护作用,CEF 治疗可能通过上调星形胶质细胞 EAAT2 的表达逆转 SAH 诱导的神经损伤。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;星形胶质细胞;头孢曲松钠;谷氨酸转运体

【文章编号】 1009-153X(2015)04-0228-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.9

Effect of ceftriaxone on cognitive function after subarachnoid hemorrhage in the adult rats

CHEN Xu¹, WU Lin², FENG Da-yun³, WANG Ju-lei³, QIN Huai-zhou³, GAO Guo-dong³, ZHANG Zhi-guo³. 1. Student Brigade, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032 China; 3. Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】Objective To explore the effect of ceftriaxone (CEF) on cognitive function after subarachnoid hemorrhage (SAH) and its mechanism in rats. **Methods** Sixty-eight adult rats were randomly divided into 3 groups i.e. CEF treatment group (n=32), control group (n=24) and normal group (n=12). The model of SAH was established by two injections of autogeneic blood into the cerebellar cisterna magna in the rats of the treatment and control groups. Thirty-two rats in the treatment group were divided into two subgroups, i. e. low dose subgroup (n=8) in which 50 μ l CEF at concentration of 50 μ mol/L was injected into the cerebellar cisterna magna 3 hours after SAH and high dose subgroup (n=24) in which 100 μ l CEF at concentration of 100 μ mol/L was injected into the cerebellar cistern magna 3 hours after SAH. The functions of learning and memory were by Morris water maze test in all the groups 5 days after SAH. The levels of EAAT2 and Cleaved Caspase-3 expressions in the hippocampal tissues by Western Blot in all the groups 6, 12, 24 and 48 hours after SAH. **Results** The escape latent period was significantly shorter in the high-dose group than that in the control group ($P<0.01$). The level of EAAT2 expression was significantly higher, and the level of cleaved Caspase-3 expression was significantly lower in the hippocampal tissues in the high dose group than those in the control group 48 hours after SAH ($P<0.05$). **Conclusion** It is suggested that CEF has neuroprotective effect after SAH by the upregulation of EAAT2 expression in the hippocampal tissues in the rats.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; Ceftriaxone; EAAT2; Cognitive function

临床上,蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)占所有脑卒中的 5%~7%,颅内动脉瘤破裂是主要原因,即使动脉瘤完全治愈,但仍有部分病人可出现严重的认知功能障碍^[1-3]。已有报道证实,

星形胶质细胞兴奋性氨基酸转运体 2(excitatory amino acid transporter 2, EAAT2)表达下调,以及由此造成的谷氨酸兴奋性毒性是 SAH 后神经元损伤的重要机制^[4];并且离体实验发现 CEF(ceftriaxone, CEF)能够上调 EAAT2 的表达^[5]。本研究探讨 CEF 对 SAH 后大鼠学习记忆功能的影响及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 68 只成年雄性 SD 大鼠,体重 280~350 g,由第四军医大学动物中心提供,随机分为 4 组:正常组(n=12)、对照组(n=24)、CEF 低剂量

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.04.012

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(2014M552710)

作者单位:710032 西安,第四军医大学学员旅(陈旭);710032 西安,第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室(吴琳);710038 西安,第四军医大学唐都医院神经外科(冯达云、王举磊、秦怀洲、高国栋、张治国)

通讯作者:张治国, E-mail: zhiguofnmu@163.com

治疗组(50 μmol/L, 100 μl, n=8)和高剂量治疗组(100 μmol/L, 100 μl, n=24)。

1.2 主要试剂 单克隆兔抗 EAAT2、单克隆兔抗 Caspase-3、单克隆小鼠抗β-actin 购于 Cell Signaling 公司, CEF 购于上海罗氏公司。

1.3 大鼠 SAH 模型建立 具体步骤如下:用 4%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉动物(40 mg/kg),大鼠头颈部、右侧腹股沟区备皮、消毒,大鼠俯卧位固定在小动物脑立体定向仪上,头俯屈 45°,沿头颈部正中线做一长约 2 cm 切口,小心分离颈部皮肤和肌肉,暴露环枕膜;将一 PE-10 规格导管置入枕大池,并用牙科水泥固定于枕骨上;用 1 ml 注射器将 0.3 ml 自体动脉血缓慢注入枕大池,注射时间不少于 10 min(防止颅内压急剧升高而导致动物死亡),缝合、消毒伤口,常规饲养。

1.4 脑池内给药 术后 3 h 通过置于小脑延髓池的 PE-10 导管缓慢注射 100 μl 不同浓度(高剂量组 100 μmol/L;低剂量组 50 μmol/L)的 CEF(生理盐水稀释)。对照组给予相同体积的生理盐水。

1.5 Morris 水迷宫测试 术后 5 d 待动物股骨沟及头颈部伤口愈合后,每组各取 8 只大鼠同时进行 Morris 水迷宫测试^[6]。动物的空间学习记忆能力通过反复的定向航行训练实验来检测,每天训练 4 次,持续 5 d。动物从一系列半随机的与目标站台等距的起始点入水,限制时间为 60 s。如果动物在限制时间内没有找到站台,通常会被引导至目标站台,并在站台上停留观察 15 s,以熟悉和认识周围环境。逃逸时间即记为动物成功找到站台(淹没在水面下 2 cm)的时间。未找到站台,记录为 60 s。为保证动物伤口恢复,避免感染发生,行为学实验在造模后 5 d 进行。

1.6 免疫印迹分析 对照组(n=16)和 EF 高剂量治疗组(n=16)分别于造模后 6、12、24、48 h 断头处死,冰上分离海马组织,每 1 mg 组织加入 200 μl RIPA 裂解液,用超声细胞破碎仪破碎组织,提取蛋白,BCA 法

定量(40 μg/μl)。每组上样 40 μg 蛋白,5~10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白(100 V, 1.5 h);PVDF 转膜(300 mA, 2 h),5%脱脂牛奶室温封闭 1 h;加入一抗[EAAT2(1:2000),Caspase-3(1:1000),β-actin(1:2000)],4 ℃孵育过夜;TBST 洗膜,3×10 min;加入二抗[羊抗小鼠/兔(1:5000)]室温孵育 1 h;TBST 洗膜,3×10 min;ECL 发光,暗室冲洗 X 线胶片。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 *t* 检验和方差分析,*P*<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CEF 对 SAH 后动物学习记忆能力的影响 SAH 后,大鼠学习记忆能力明显下降。CEF 可显著改善 SAH 后大鼠记忆能力,剂量越高,效果越好。见表 1。

2.2 CEF 调节 SAH 后海马 EAAT2 的表达 EAAT2 的表达在 SAH 后 48 h 显著减少,CEF 治疗后显著增加(图 1);SAH 后 48 h,对照组和 CEF 高剂量治疗组 EAAT2 蛋白水平分别达到正常组的(20.62±7.01)%和(93.88±6.15)%,两组差异显著(*P*<0.05;图 1)。

2.3 CEF 对 SAH 后海马 Caspase-3 表达的影响 详见图 2。与正常组相比,对照组 Caspase-3 表达在术后 12、24、48 h 显著增加(*P*<0.05),并在 48 h 达到高峰[达到正常组的(354.11±26)%]。CEF 治疗后显著减少(*P*<0.05),48 h 最为显著[达到正常组的(135.01±24)%]。

3 讨论

EAAT2 特异性地表达于神经系统星形胶质细胞,通过摄取突触间隙的谷氨酸,调节神经元的兴奋性活动,在参与神经元-星形胶质细胞相互调控中发挥重要的作用。很多急性和慢性神经系统疾病均素 EAAT2 表达减少或功能障碍造成的谷氨酸兴奋性毒性损伤有关^[4,5]。

表 1 Morris 水迷宫检测各组大鼠定向航行训练中逃逸时间的差异($\bar{s}, \bar{x} \pm s$)

时间	正常组	对照组	CEF 低剂量治疗组	CEF 高剂量治疗组
第 1 天	50.88±2.86	58.29±0.86*	56.15±1.75*	53.21±2.43**Δ
第 2 天	35.28±4.76	56.29±2.09*	51.46±2.86*	45.61±2.74**Δ
第 3 天	22.27±2.57	53.40±2.68*	47.39±3.64*	34.69±5.18**Δ
第 4 天	16.44±2.54	50.29±4.13*	40.31±2.84*	28.40±4.17**Δ
第 5 天	12.88±2.49	46.16±4.19*	31.02±3.24*	22.24±3.74**Δ

注:与正常组相应值比较,* *P*<0.01;与对照组相应值比较,# *P*<0.05;与 CEF 低剂量治疗组相应值比,Δ *P*<0.05;CEF:头孢曲松钠

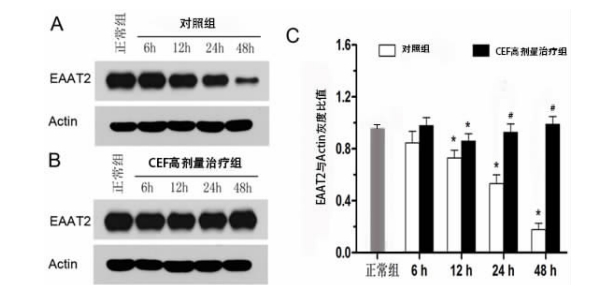


图 1 CEF 对大鼠 SAH 后海马 EAAT2 蛋白表达的影响
与正常组相应比值, * $P<0.05$; 与对照组相应比值, # $P<0.05$; CEF: 头孢曲松钠; SAH: 蛛网膜下腔出血; EAAT2: 兴奋性氨基酸转运体 2

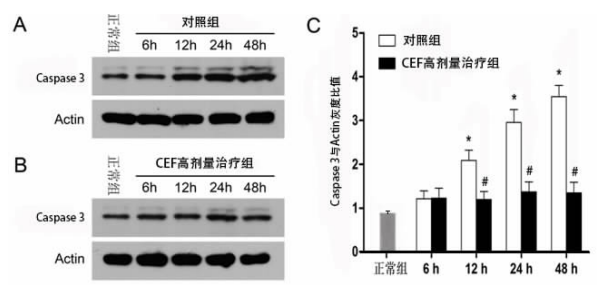


图 2 CEF 对大鼠 SAH 后海马 Caspase 3 表达的影响
与正常组相应比值, * $P<0.05$; 与对照组相应比值, # $P<0.05$; CEF: 头孢曲松钠; SAH: 蛛网膜下腔出血

以往研究发现 SAH 后诱发严重的兴奋性氨基酸毒性, 伴随着脑脊液谷氨酸浓度显著升高和 EAAT2 表达显著下调。尽管 EAAT2 在生理及病理状态下具有明显地调节突触兴奋性活动的作用, 然而目前依旧缺乏特效的针对调控 EAAT2 表达的药物。离体和在体实验中 CEF 可以显著地缓解神经细胞的缺血性损伤, 及在肌萎缩性脊髓侧索硬化症模型中 CEF 可保护运动神经元的变形、退化, CEF 的神经保护作用在于其有效上调 EAAT2 表达的作用, 减轻谷氨酸的兴奋性毒性^[7,8]。而且, 以往报道 CEF 在离体和在体实验中的抗谷氨酸兴奋性毒性的神经保护作用具有明显的作用浓度和作用时间依赖性^[9-11]。我们的研究结果也证实了 SAH 后 EAAT2 表达下调。

我们对 SAH 后大鼠的治疗采用脑池内给药的方式, 即直接将药物通过小脑延髓池的置管输入枕大池中, 结果显示, SAH 后脑池内直接给药具有作用直接、迅速、有效的特点, 对于缓解急性脑损伤 (SAH 后 48 h 内) 具有明显的优势。我们还发现 CEF 治疗可改善大鼠 SAH 后神经功能障碍, 减少 SAH 后大鼠海马区神经细胞的凋亡; 可逆转 SAH 后大鼠海马区 EAAT2 的下调。这提示 CEF 在 SAH 后具有神经保护作用, 可能是通过上调 EAAT2 的表达, 从而减轻 SAH 后神经细胞和神经功能的损伤。

我们的发现有助于更好地理解 SAH 后病理过程及 CEF 治疗缓解急性神经损伤的药理学分子机制, 并有可能为未来临床使用 CEF 治疗 SAH 提供部分依据, 尽管精确的药物使用剂量还有待进一步研究探索。

【参考文献】

[1] 周 东, 李治纲, 詹升全, 等. 动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者认知功能研究[J]. 中国临床神经外科杂志, 2010, 15: 73-75.

[2] 陈广鑫, 周 椿, 许民辉, 等. 前交通动脉瘤手术对患者认知功能的影响[J]. 中国临床神经外科杂志, 2011, 16: 497-498.

[3] 张香菊, 王强, 陈广鑫, 等. 高压氧治疗前交通动脉瘤术后认知功能障碍的效果分析[J]. 中国临床神经外科杂志, 2012, 17: 651-652.

[4] Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology [J]. J Nutr, 2000, 130: 1007S-1015S.

[5] Jagadapillai R, Mellen NM, Sachleben LR Jr, et al. Ceftriaxone preserves glutamate transporters and prevents intermittent hypoxia-induced vulnerability to brain excitotoxic injury [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e100230.

[6] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. Nat Protoc, 2006, 1: 848-858.

[7] Berry JD, Shefner JM, Conwit R, et al. Design and initial results of a multi-phase randomized trial of ceftriaxone in amyotrophic lateral sclerosis [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61177.

[8] Rothstein JD, Patel S, Regan MR, et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression [J]. Nature, 2000, 403: 73-77.

[9] Abulseoud OA, Camsari UM, Ruby CL, et al. Attenuation of ethanol withdrawal by ceftriaxone-induced upregulation of glutamate transporter EAAT2 [J]. Neuropsychopharmacology, 2014, 39(7): 1674-1684.

[10] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression [J]. Nature, 2006, 441: 431-436.

[11] Massa PT, Aleyasin H, Park DS, et al. NFkappaB in neurons? The uncertainty principle in neurobiology [J]. J Neurochem, 2006, 97: 607-618.

(2014-12-25 收稿, 2015-02-15 修回)