

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.06.006

头孢曲松钠对大鼠液压脑损伤后 TLR4 介导的神经炎症反应的作用*

李 萍,解东兴,刘 伟,王丹宜,周洪霞[△]
(唐山工人医院功能检验科,河北唐山 063000)

[摘要] 目的 观察头孢曲松钠(Cef)治疗对大鼠液压冲击脑损伤后 TLR4 介导的神经炎症反应的影响。方法 选用雄性 SD 大鼠 72 只,随机分为假手术组、脑损伤组、Cef 治疗组,每组 24 只。采用液压冲击法制备 SD 大鼠脑损伤模型,Cef 治疗组于致伤前 5 d 注射 Cef(200 mg/kg),连续 5 d。通过干湿比重法检测各组大鼠脑组织含水量,ELISA 法检测大鼠脑皮层 TNF- α 、IL-1 β 水平,免疫组织化学及 Western blot 法检测脑皮层 TLR4 的蛋白表达情况。结果 与脑损伤组比较,Cef 治疗组明显减轻液压冲击性脑损伤的脑组织含水量($P<0.05$),降低大鼠脑皮质组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 水平($P<0.05$),明显下调 TLR4 蛋白的表达量($P<0.05$)。结论 Cef 可以通过抑制 TLR4 介导的神经炎症反应,下调炎症因子的表达,改善脑水肿情况。

[关键词] 脑损伤;头孢曲松钠;脑水肿;神经炎症反应

[中图分类号] R605.97 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)06-0737-03

Effect of ceftriaxone on TLR4 mediated nerve inflammatory reaction after hydraulic brain injury in rats*
Li Ping, Xie Dongxing, Liu Wei, Wang Danyi, Zhou Hongxia[△]
(Department of Functional Laboratory, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ceftriaxone(Cef) on TLR4 mediated nerve inflammatory reaction after hydraulic brain injury in rats. **Methods** Seventy-two male SD rats were randomly divided into the sham operation group, brain injury group and ceftriaxone treatment group($n=24$). The rat model of brain injury was prepared by the hydraulic impact method. The Cef treatment group was treated with Cef(200 mg/kg) on 5 d before injury for successive 5 d. The wet-dry weight method was used to detect the water content in the brain tissue in each group. The levels of TNF- α and IL-1 β in the cerebral cortex were tested with the ELISA method. The expression of TLR4 protein in the cerebral cortex was measured by immunohistochemical staining and Western blot methods. **Results** Compared with the brain injury group, the brain tissue water content caused by the hydraulic impact in the Cef treatment group was significantly reduced($P<0.05$), the levels of TNF- α and IL-1 β in the cerebral cortex tissue were decreased($P<0.05$), and the expression of TLR4 protein was significantly down-regulated($P<0.05$). **Conclusion** Cef could down-regulate the expression of inflammatory factors and improve the cerebral edema by inhibiting TLR4 mediated nerve inflammation reaction.

[Key words] brain injuries; ceftriaxone; brain edema; inflammation

β -内酰胺类抗生素头孢曲松钠(ceftriaxone, Cef)是一种临床常用的抗生素^[1]。近几年多数研究发现 Cef 除有抗菌作用外,还具有一定的神经保护作用,例如在脑缺血缺氧、脑缺血再灌、细菌性脑膜炎及创伤性脑损伤中均显示积极的疗效^[2-4]。然而,Cef 对大鼠液压冲击脑损伤后 TLR4 介导的神经炎症反应的影响,目前鲜有文献报道。作者通过建立液压冲击脑损伤大鼠模型,通过 ELISA、免疫组织化学及免疫印迹的方法,观察 Cef 处理后大鼠脑组织含水量,TLR4 蛋白及炎症因子的变化。以期探讨 Cef 对脑损伤大鼠的脑保护作用及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 SD 大鼠 72 只,雄性,普通级,体质量 280~300 g,河北医科大学实验动物中心提供,标准鼠饲料常规喂养。兔抗大鼠的 TLR4 多克隆抗体和小鼠抗大鼠的 β -action 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。羊抗兔及羊抗鼠的兔辣根过氧化物酶标记的 II 抗均购自美国 Southern Biotech

公司。ELISA 试剂盒、SABC 试剂盒及 DAB 试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。枸橼酸盐缓冲液及 PBS 缓冲液均购自北京中杉金桥有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及分组

将 72 只健康雄性的 SD 大鼠随机分为假手术组、脑损伤组、Cef 治疗组,每组 24 只。各组又分为 12、24、48、72 h 4 个时间亚组,每个亚组 6 只。2%戊巴比妥(40 ms/kg)腹腔麻醉大鼠,假手术组动物常规麻醉开颅,但不给予液压冲击处理。脑损伤组、Cef 治疗组大鼠参照文献[5]制备液压冲击性脑损伤动物模型,打击强度(1.50 $\pm$ 0.20)大气压(1 大气压=101.325 kPa),造成中度脑损伤。液压冲击伤后大鼠立即出现竖毛、弓背、前肢屈曲、后肢强直、肌张力明显增高及心率加快等表现。致伤后将大鼠放回专用鼠笼标准饲料和饮用纯净水,恒温 20~25℃饲养。Cef 治疗组大鼠于致伤前 5 d 腹腔注射 Cef(200 mg/kg),连续注射 5 d。

1.2.2 脑组织含水量测定

腹腔注射 10%水合氯醛麻醉大

* 基金项目:河北省唐山市科学技术研究与发展计划资助项目(12140209A-31)。 作者简介:李萍(1969—),主治医师,硕士研究生,主要从事脑损伤基础研究。[△] 通讯作者,Tel:15633910346;E-mail:lipinggnjy@yeah.net。

鼠,迅速断头取脑,采用干湿质量法测定脑组织含水量。去除脑干和小脑,取等量脑组织以滤纸吸去表面液体,置于电子分析天平称脑组织湿质量,放于 110℃ 恒温干燥箱内,烘烤 48 h 至恒重,称得干质量后,按 Elliot 公式计算脑组织含水量:脑组织含水量(%)=(湿质量-干质量/湿质量)×100%

1.2.3 ELISA 法检测 取出血肿周围脑组织加入生理盐水制成 10% 组织匀浆,低温 3 000 r/min 离心 20 min,留取上清液,严格按照大鼠的 ELISA 试剂盒说明书进行操作。用全自动酶标分析仪测定其吸光度值,波长设为 450 nm,分别计算 TNF-α 或 IL-1β 水平。

1.2.4 免疫组织化学法检测 10% 水合氯醛麻醉大鼠后,灌流固定,断头剥离脑组织,置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h。脑组织常规石蜡包埋,连续冠状切片,片厚 5 μm。后续步骤严格按 SABC 免疫组织化学试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 Western blot 法检测 大鼠断头取脑后立即在冰上分离海马组织,-80℃ 冰箱保存备用。低温充分裂解匀浆后离心,留取上清液,紫外分光光度计测定蛋白浓度。等体积上样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),干转发将凝胶上蛋白转至 PVDF 膜上,BSA 封闭 2 h。滴加兔抗大鼠的 TLR4 多克隆抗体(1:500),小鼠抗大鼠的 β-actin 单克隆抗体(1:1 000),4℃ 冰箱过夜。次日洗涤后滴加羊抗兔及羊抗小鼠二抗室温孵育 2 h。ECL 对条带进行显色曝光,以 β-actin 作为内参进行半定量分析。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本的 *t* 检验,多样本间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组大鼠术后各时间点脑组织含水量比较 假手术组大鼠脑组织有基础含水量,与假手术组比较,脑损伤组大鼠各时间点脑组织含水量明显增加,各时间点组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与脑损伤组比较,Cef 治疗组大鼠脑组织含水量显著减少,各时间点组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 3 组大鼠术后各时间点大脑皮层 TNF-α 及 IL-1β 水平比

较 与假手术组各时间点比较,脑损伤组大鼠大脑皮层组织中 TNF-α、IL-1β 水平明显升高($P < 0.05$),于 12 h 开始升高,24 h 达高峰,48~72 h 降低,且仍高于假手术组水平。与脑损伤组各时间点比较,Cef 治疗组大鼠皮层 TNF-α、IL-1β 水平显著降低($P < 0.05$),见表 2、3。

表 1 3 组大鼠术后各时间点脑组织含水量比较($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	71.35±3.14	71.46±3.57	71.32±3.25	71.49±4.17
脑损伤组	76.58±2.94 ^a	79.65±4.34 ^a	81.99±2.76 ^a	80.27±3.64 ^a
Cef 治疗组	72.92±4.75 ^b	73.88±3.25 ^b	76.63±4.15 ^b	74.02±2.75 ^b

^a: $P < 0.05$,与假手术组比较;^b: $P < 0.05$,与脑损伤组比较。

表 2 3 组大鼠术后各时间点皮层 TNF-α 水平比较($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/L}$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	204.86±13.54	205.48±14.02	205.37±14.69	204.69±16.49
脑损伤组	275.25±15.67 ^a	339.43±16.24 ^a	305.08±16.07 ^a	288.43±14.25 ^a
Cef 治疗组	239.31±14.57 ^b	287.82±12.38 ^b	254.28±15.31 ^b	231.02±16.05 ^b

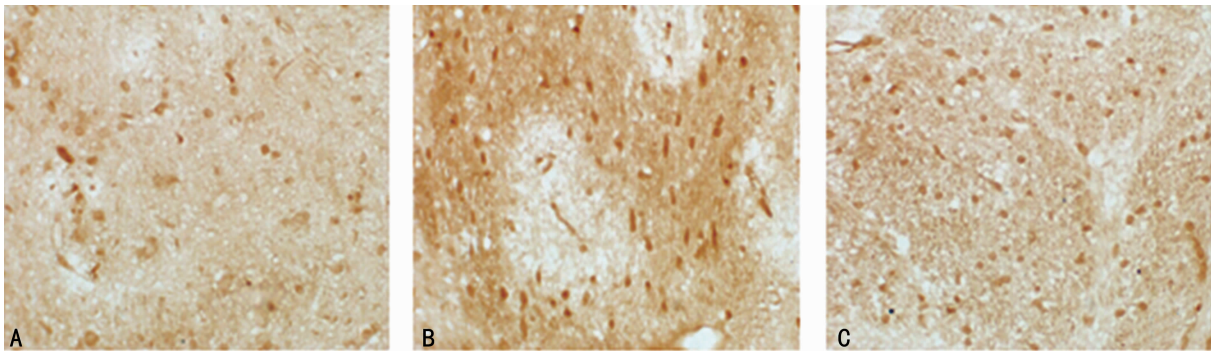
^a: $P < 0.05$,与假手术组比较;^b: $P < 0.05$,与脑损伤组比较。

表 3 3 组大鼠术后各时间点皮层 IL-1β 水平比较($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/L}$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	36.87±7.37	37.24±6.34	37.52±5.04	36.93±5.62
脑损伤组	97.82±5.29 ^a	139.18±9.35 ^a	115.43±7.64 ^a	100.38±8.15 ^a
Cef 治疗组	63.24±6.33 ^b	102.51±5.83 ^b	82.74±6.08 ^b	71.58±4.34 ^b

^a: $P < 0.05$,与假手术组比较;^b: $P < 0.05$,与脑损伤组比较。

2.3 TLR4 蛋白的分布及定位 选择各组 24 h 大鼠的石蜡标本进行免疫组织化学染色,结果提示,假手术组大鼠大脑皮层 TLR4 蛋白呈现弱阳性表达;脑损伤组大鼠皮层组织胞质及胞核中可见大量的阳性颗粒表达;Cef 治疗组大鼠大脑皮层组织 TLR4 的阳性表达颗粒减少,免疫反应性减弱,见图 1。



A:假手术组;B:脑损伤组;C:Cef 治疗组。

图 1 各组大鼠 TLR4 的免疫组织化学染色结果(×400)

2.4 TLR4 蛋白的表达量 假手术组各时间点大鼠皮层 TLR4 蛋白仅有微量的表达。与假手术组比较,脑损伤组大鼠

TLR4 的蛋白表达量在 12 h 开始升高($P < 0.05$),至 24 h 表达达到峰值($P < 0.05$),而后逐渐下降,但伤后 72 h 仍明显高于

假手术组水平($P<0.05$)。与脑损伤组相应各时间点比较,Cef 治疗组大鼠 TLR4 的蛋白表达量显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 3 组大鼠术后各时间点皮层 TLR4 蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s,n=6,OD$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	0.36±0.05	0.35±0.04	0.37±0.02	0.36±0.05
脑损伤组	0.67±0.07 ^a	1.28±0.06 ^a	1.04±0.08 ^a	0.79±0.06 ^a
Cef 治疗组	0.42±0.05 ^b	0.95±0.07 ^b	0.77±0.06 ^b	0.63±0.05 ^b

^a: $P<0.05$;与假手术组比较;^b: $P<0.05$;与脑损伤组比较。

3 讨 论

β -内酰胺类抗生素是第三代头孢类抗生素,可有效地透过血-脑屏障进入脑和脊髓中发挥药效。其中 Cef 经多数研究证实除了具有抗菌作用外还具有新的功能,应用后可发挥一定的神经保护作用^[2-4],然而其他 β -内酰胺类抗生素尚未见报道具有此功能。所以本实验应用液压冲击脑损伤大鼠模型,探讨 Cef 的脑保护作用及作用机制。干湿比重法测量脑组织含水量发现:在液压脑损伤的大鼠模型中,Cef 处理能够明显减轻脑组织含水量,缓解脑水肿改变。本结果提示,Cef 对脑损伤具有一定的治疗效果,与先前的文献报道相一致。肖国民等^[6]报道在大鼠致伤后立即一次性给予 Cef 200 mg/kg,可以明显减轻脑水肿并改善大鼠的学习记忆功能。潘向东等^[7]发现 Cef 通过降低创伤性脑损伤大鼠谷氨酸盐水平,减轻海马 CA1 区神经元死亡及脑水肿。但是有关 Cef 脑保护作用机制的研究较少。有研究报道显示,Cef 可以激活谷氨酸转运体-1 的表达及功能,从而阻断兴奋性氨基酸的神经毒性^[8]。本实验通过 ELISA 法检测各组大鼠大脑皮层组织中 TNF- α 和 IL-1 β 水平改变,结果显示,Cef 能够明显降低脑损伤后 TNF- α 和 IL-1 β 水平,减轻大脑皮层的神经炎症反应。脑损伤后出现的神经炎症反应是一个复杂的多因素共同参与的级联过程,是后续多种继发性脑损伤的病理生理基础。本发现揭示 Cef 降低炎症因子的表达可能是其在脑损伤大鼠模型中发挥脑保护作用的机制之一。同时证实了 Cef 抗菌之外的另一作用——抗感染作用。

Toll 样受体(Toll-like receptors,TLRs)是生物体中非常重要的固有免疫模式识别受体,广泛分布于各种免疫细胞及多种组织中,在固有免疫应答过程中具有重要作用^[9-11]。在 TLRs 的受体家族中,TLR4 是最早被发现的成员。在脑组织内,TLR4 主要分布于星形胶质细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞中^[12]。值得注意的是脑组织中 TLR4 的异常表达在中风、多发性硬化和阿尔兹海默病等多种神经系统疾病的免疫病理过程中发挥作用^[13]。此外还有研究发现在脑缺血再灌注动物损伤模型中 TLR4 不仅能够诱导免疫应答反应,而且还可以触发炎症级联反应^[14]。小胶质细胞中 TLR4 的活化与创伤性神经炎症反应的启动和严重的神经变性密切相关^[15]。本实验的免疫印迹结果提示,Cef 处理可逆转脑损伤后 TLR4 的高表达,限制 TLR4 诱导的神经炎症反应,促进创伤的修复。

综上所述,本实验通过液压冲击制备大鼠脑损伤模型,研

究证实 Cef 治疗可以减轻脑水肿,对脑损伤发挥一定的脑保护作用。进一步探讨其机制发现,Cef 通过降低 TLR4 诱导的神经炎症反应促进脑损伤的修复。揭示了 Cef 抗菌作用之外的另一重要临床应用价值。

参考文献

[1] 李丹,张永信. 头孢曲松钠的特性及临床应用[J]. 上海医药,2013,34(13):12-16.

[2] 刘心洁,王玉珍,胡瑞梅,等. 基质金属蛋白酶抑制剂 GM6001 对肺炎链球菌性脑膜炎模型大鼠的脑保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2011,25(2):156-161.

[3] 刘畅,巴晓红,闵连秋,等. 头孢曲松钠预处理对局灶性脑缺血大鼠缺血周围脑组织白介素 1 β 和白介素 6 表达的影响[J]. 中国全科医学,2013,16(36):4293-4295.

[4] 颜志婷,熊建忠,林小小,等. 头孢曲松钠对脑缺血再灌注模型大鼠的脑保护作用[J]. 中国老年学杂志,2014,5(15):4241-4242.

[5] 孙国柱,刘性强,王目纲,等. 一种大鼠液压冲击脑损伤装置的研制[J]. 中华实验外科杂志,2011,28(5):749-750.

[6] 肖国民,危静,潘向东,等. 头孢曲松对创伤性脑损伤大鼠伤后脑水肿和学习记忆功能的影响[J]. 中华外科杂志,2013,51(3):272-273.

[7] 潘向东,危静,肖国民,等. β 内酰胺抗生素头孢曲松对创伤性脑损伤大鼠海马谷氨酸盐水平的影响[J]. 浙江大学学报:医学版,2011,40(5):522-526.

[8] Kim K, Lee SG, Kegelmann TP, et al. Role of excitatory amino acid transporter-2(EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(10):2484-2493.

[9] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling[J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(5):979-987.

[10] 常晓彤, 鞏晓峰, 王振辉, 等. Toll 样受体信号转导途径研究进展[J]. 生理科学进展, 2011, 42(5):340-346.

[11] 孙冰, 韩代书. Toll 样受体信号通路的负调控[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(12):1516-1522.

[12] 胡晓松, 宋海星, 刘静, 等. 缺血预处理对局灶性缺血大鼠脑梗死区周围 TLR4 及 GFAP 表达的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(29):3076-3078.

[13] Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease[J]. Trends Neurosci, 2011, 34(5):269-281.

[14] 高音, 王玉, 张翠香, 等. TLR4 与 TNF- α 在脑缺血再灌注小鼠海马 CA1 区神经元中的表达[J]. 神经解剖学杂志, 2010, 26(2):175-180.

[15] Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol[J]. J Immunol, 2009, 183(7):4733-4744.