

大鼠脑创伤对学习记忆及海马环磷腺苷反应元件结合蛋白的影响*

熊 翱¹, 金 戈², 李利锋³, 吴 双¹, 熊仁平^{4▲}, 鲁 宏^{3△}

(1. 郑州大学临床医学系 450001; 2. 郑州大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室 450001;

3. 重庆市第七人民医院放射科 400054; 4. 陆军军医大学大坪医院野战外科研究所/

创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室分子生物学中心, 重庆 400042)

[摘要] **目的** 观察脑创伤早期的脑含水量、环磷腺苷反应元件结合蛋白(CREB)及其磷酸化水平,探讨脑创伤和磷酸化 CREB(p-CREB)水平的改变对学习记忆的影响。**方法** 将 54 只成年雄性 Wistar 大鼠,按随机数字表法分为正常组、对照组、创伤性脑损伤(TBI)组,每组 18 只。采用改良的 Feeney 法和前期实验参数建立 TBI 大鼠模型,Western blot 观察创伤后 12 h 脑海马组织 CREB 和 p-CREB 表达、干湿质量法测定脑组织含水量和 Morris 水迷宫实验。**结果** 大鼠 TBI 后 12 h 脑组织含水量,与正常组和对照组相比,TBI 组升高明显($P<0.01$)。与正常组和对照组比较,TBI 组大鼠 TBI 后 12 h 海马 CREB 和 p-CREB 蛋白的表达量降低明显;潜伏期增加,2 min 内寻求正确次数减少,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** TBI 后脑水肿明显,CREB 和 p-CREB 水平降低,可能是使认知和学习记忆功能受损的原因之一。

[关键词] 创伤性脑损伤;Morris 水迷宫;环磷腺苷反应元件结合蛋白**[中图法分类号]** R651 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)14-1850-03

Effects of traumatic brain injury on learning and memory ability and hippocampal CREB protein in rat*

XIONG Ao¹, JIN Ge², LI Lifeng³, WU Shuang¹, XIONG Renping^{4▲}, LU Hong^{3△}

(1. Faculty of Clinical Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China;

2. Teaching and Researching Section of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical

College of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China; 3. Department of

Radiology, Chongqing Municipal Seventh People's Hospital, Chongqing 400054, China; 4. Molecular Biology Center, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury/Research Institute of Field Surgery and Daping Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400042, china)

[Abstract] **Objective** To observe the change of brain water content, levels of cAMP response element binding protein(CREB)and phosphorylated CREB(p-CREB) in the early stage of traumatic brain injury(TBI) and to investigate the effect of TBI and p-CREB on learning and memory. **Methods** Fifty-four male adult Wistar rats were randomized into the normal group(18 cases), control group(18 cases) and TBI group(18) according to the random number table method. The TBI model was built according to the modified Feeney method and previous experimental parameters. At 12 h after TBI, Western blot analysis were performed to measure the expressions of hippocampal tissue CREB and p-CREB, the Morris water maze test was used to detect the behavior of rats in each group and the wet-dry method was applied to test brain water content. **Results** The brain water content at 12 h after TBI in the TBI group was remarkably risen compared with the normal group and control group; the expression levels of hippocampal CREB and p-CREB at 12 h after TBI in the TBI group were significantly decreased compared with the normal group and control group, the latent stage was increased and the frequency searching the accuracy within 2 min was decreased. **Conclusion** Brain edema is obvious after TBI and the levels of CREB and p-CREB are decreased, which maybe one of the reasons for the impairment of learning and memory function after TBI.

[Key words] traumatic brain injury; Morris water maze; cAMP response element binding protein

脑创伤早期的病理改变主要是脑水肿,创伤后 6 h 明显,12 h 达到峰值,维持至 24 h,随着创伤时间的

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160181);重庆市卫计委重点项目(2016ZDXM040)。 作者简介:熊翱(1995—),医师,本硕连读研究生,主要从事创伤临床与基础研究。 △ 通信作者, E-mail: 471739847@qq.com。 ▲ 共同通信作者, E-mail: xiong_ren_ping@163.com。

延长,脑损伤往往变得错综复杂,使之成为不可逆性损伤^[1-2]。创伤性脑损伤(trumatic brain injury,TBI)恢复后出现以认知功能障碍为主要特征的神经功能异常,而已知环磷腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein,CREB)通过 CREB 133 位磷酸化(p-CREB),活化 CREB,翻译各种神经活性蛋白,最终增强学习记忆功能^[3-7]。因此,本实验通过测定脑创伤早期的脑含水量、CREB 及 p-CREB 水平,探讨脑创伤及其 p-CREB 水平的改变,对学习记忆的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 动物:Wistar 大鼠 54 只,购于重庆市陆军军医大学野战外科研究所实验动物中心[动物生产许可证号:SCXK(渝)2012-0005;动物使用许可证号:SYXK(渝)2012-0010],健康成年雄性,体质量 220~250 g。主要试剂及仪器:兔抗 CREB 单克隆抗体(abcam 公司,ab32515,美国),兔抗 p-CREB(ser133)单克隆抗体(Thermo 公司,PA1-4619,美国),山羊抗 GAPDH 多克隆抗体(Santa cruz 公司,sc-20357,美国),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和检测系统(Bio-Rad 公司,美国);PinPoint™ 颅脑撞击仪(Hatteras 公司,美国),扫描分析软件系统(Labworks™ Analysis Software,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将 54 只大鼠采用随机数字表法分为正常组、对照组、TBI 组。每组 18 只,用于海马组织 CREB 和 CREB 的 133 位丝氨酸磷酸化[(p-CREB(ser133)]水平检测($n=6$)、脑含水量测定($n=6$)和 Morris 水迷宫实验($n=6$)。

1.2.2 动物模型的建立 借鉴 FEENEY 等^[8]的成熟技术方法,依据本课题前期实验结果的撞击参数^[9],用 PinPoint™ 颅脑损伤撞击器建立中度 TBI 动物模型。对照组开骨窗后不进行打击致伤其余处理同 TBI 组。正常组不开骨窗不进行打击致伤其余处理同 TBI 组。

1.2.3 脑含水量测定 采用干湿质量法^[10],TBI 后 12 h 麻醉,断头处死,开颅取大鼠脑组织,用滤纸吸尽表面血渍后,置于已烤干并称质量的锡纸上,称湿质量后置于 85 ℃ 恒温干燥箱内干燥 72 h 至恒质量,再称干质量后按 Elliot 公式计算脑含水量:

脑含水量(ω)=(湿质量-干质量)/湿质量×100%

1.2.4 Morris 水迷宫实验 TBI 前,随机选择 1 个人入水点,将大鼠面向池壁放入水中,3 次分别从 3 个象限(目标象限除外)的入水点入水,直至大鼠入水后能够找到平台。历时 3 d,第 1 天让大鼠自由游泳 2 min;从第 2 天起,每天训练 3 次,每次间隔 1 h;第 4 天开始如下实验:(1)潜伏期(定位航行实验,反映空间记忆的获得和参照物记忆能力),即大鼠由入水到

爬上隐匿平台的时间(s)。如果大鼠在 120 s 内未找到平台,将其引至平台上放置 20 s,这时潜伏期记为 120 s。(2)寻求正确次数(空间搜索实验,检测空间记忆的保持和工作记忆能力),撤去原有平台,即大鼠 2 min 内经过原平台上方水域的次数。(3)TBI 后 7 d,重复以上实验,训练 3 d,第 11 天开始实验。

1.2.5 Western blot 检测 CREB 和 p-CREB(ser133)表达 TBI 后 12 h,取大鼠伤侧海马组织,参照文献[11]的方法,分别在盛有液氮的研钵中研粹,置于 0.4 mL 含蛋白酶抑制剂的组织裂解液(RIPA)中,提取蛋白并定量。电泳后进行海马组织 CREB 和 p-CREB(ser133)水平测定。GAPDH 抗体滴度 1:200;CREB 和 p-CREB(ser133)抗体滴度 1:800。扫描分析软件系统扫描 X 射线光片目的条带,进行密度分析,结果用灰阶×面积表示灰度值。校正上样量采取目的蛋白的灰度值与 GAPDH 内参蛋白的灰度值相比取其比值的方法,目的蛋白与内参蛋白的比值,进行归一。

1.3 统计学处理 采用 sigmaplot v12.5 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠脑含水量比较 正常组、对照组、TBI 组大鼠脑创伤 12 h 脑组织含水量分别为(75.15±0.12)%、(76.29±0.14)%、(84.81±0.47)%,与正常组和对照组比较,TBI 组明显升高($P<0.01$)。

2.2 各组大鼠 Morris 水迷宫潜伏期及寻求正确次数比较 各组大鼠脑创伤前学习记忆比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常组和对照组比较,TBI 组大鼠脑创伤后 11 d 潜伏期增加,2 min 内寻求正确次数减少,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 脑创伤前后各组大鼠学习记忆情况比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	潜伏期(s)		寻求正确次数(次)	
	创伤前	创伤后	创伤前	创伤后
正常组	35.80±9.78	34.70±6.82 ^a	5.33±1.75	5.17±1.47 ^a
对照组	37.25±12.36	37.57±7.45 ^a	5.17±1.47	5.00±1.41 ^b
TBI 组	36.40±6.88	61.20±10.66	5.33±1.21	3.33±0.98

^a: $P<0.01$,^b: $P<0.05$,与 TBI 组比较

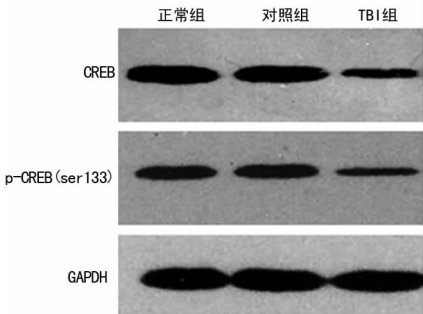


图 1 CREB 和 p-CREB(ser133)在大鼠海马组织的表达

2.3 各组大鼠 CREB 和 p-CREB(ser133)蛋白表达水平比较 与正常组比较,对照组大鼠 CREB 和 p-CREB(ser133)蛋白的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);TBI 组大鼠 CREB 和 p-CREB(ser133)蛋白的表达水平均明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 1、表 2。

表 2 CREB 和 p-CREB(ser133)蛋白在各组大鼠海马组织的相对表达量比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

项目	正常组	对照组	TBI 组
CREB	1.00±0.00 ^a	0.97±0.12 ^a	0.54±0.18
p-CREB(ser133)	1.00±0.00 ^a	0.97±0.16 ^a	0.67±0.11

^a, $P<0.01$,与 TBI 组比较

3 讨 论

TBI 随着交通事故和意外伤害的增加而增加,即使得到救治,生存的患者也可能发展成慢性创伤性脑病(chronic traumatic encephalopathy,CTE),表现为以认知功能障碍为主的神经功能异常。认知障碍是 TBI 最具代表性的后遗症,着重表现为学习记忆损害。本研究检测到脑创伤后,大鼠脑组织含水量明显增多,脑水肿明显。水迷宫实验,脑创伤大鼠潜伏期增加,2 min 内寻求正确次数减少,大鼠空间记忆的获得和保持能力、参照物记忆能力和工作记忆能力减弱,说明 TBI 减弱了大鼠的学习记忆能力。

CREB 的活化是通过 CREB 133 位磷酸化完成,翻译各种神经活性蛋白,最终增强学习记忆功能^[4]。本研究检测到 TBI 大鼠海马组织不但 CREB 蛋白水平明显降低,而且 p-CREB(ser133)水平也下降。CREB 的活化减少,这使其在负责的生物学功能启动中,很难发挥作用。p-CREB(ser133)下降,甚至功能失活,不能完成启动多种基因的转录,影响细胞内多种长期生物学效应,可能使依赖 p-CREB 通路诱导下游基因表达的记忆功能受损。有研究发现,p-CREB 介导的转录,还可以促使新的突触链接的生成,提高神经元的存活率,缓解脑损伤后认知障碍^[12]。海马是脑创伤易损区,且与认知功能有关,它的损伤可导致学习机功能障碍^[3,13-14],观察脑创伤后海马部位的 CREB 及 p-CREB 水平,可以从一个侧面反应动物的学习记忆能力,结合本次动物行为学实验结果,脑创伤后空间记忆的获得和保持能力、参照物记忆能力和工作记忆能力都减弱。为了缓解和治疗脑损伤后认知障碍,临床治疗的新思路可能是刺激 CREB 的表达和促使 p-CREB(ser133)发生。

综上所述,脑创伤后学习记忆功能受损。要缓解脑创伤后的认知功能障碍,需要标本兼治脑水肿,活化有利于记忆储存的分子(CREB 和 p-CREB),进而

激活细胞内蛋白激酶级联反应,诱导靶细胞基因表达而引发学习记忆突触水平的长时程增强(LTP)^[15],改善脑损伤后认知功能。

参考文献

[1] 张琳,袁芳.大鼠脑挫伤诱导水通道蛋白-4 表达增强加重脑水肿[J].首都医科大学学报,2008,29(6):732-736.

[2] PAPADOPOULOS M C,MANLEY G T,KRISHNA S, et al. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema[J].FASEB J,2004,18(11):1291-1293.

[3] 张涛,国建飞,邢琳琳,等.塞来昔布下调 Apaf-1 蛋白表达促进大鼠颅脑损伤后学习记忆功能恢复的研究[J].重庆医学,2017,46(13):1732-1735.

[4] WILLIAM A,CARLEZON J R,RONALD S,et al. The face of CREB[J].Trends Neurosci,2005,28(8):436-444.

[5] 李兴伟,吴鉴明.亚急性酒精中毒大鼠的学习记忆与海马 p-CREB 表达的相关性研究[J].皖南医学院学报,2011,30(3):180-184.

[6] 汤洋,罗佛全.学习记忆的分子生物学机制研究进展[J].南昌大学学报(医学版),2010,50(3):116-120.

[7] 石艳清,陈晓春.cAMP 反应元件结合蛋白磷酸化参与学习记忆过程的分子[J].福建医科大学学报,2008,42(1):85-88.

[8] FEENEY D M,BOYESON M G,LINN R T,et al. RESPONSES TO CORTICAL INJURY. 1. Methodology and local-effects of contusions in the rat[J].Brain Res,1981,211(1):67-77.

[9] 任欢欢,熊翱,鲁宏.大鼠脑创伤半暗带水肿与水通道蛋白-4 表达的相关性[J].中华创伤杂志,2016,32(4):363-369.

[10] 徐新,高伟伟,吕莉,等.小鼠颅脑创伤模型的构建及运动功能评估[J].中华实验外科杂志,2016,33(1):252-255.

[11] 熊仁平,周元国.蛋白免疫印迹法在 G 蛋白检测中的应用[J].第三军医大学学报,1998,20(2):145-147.

[12] 陈丹燕,黄晓龙,卢松,等.RBP4 对糖尿病肾病无症状脑梗死神经认知功能的影响[J].重庆医学,2018,47(4):473-476.

[13] 张红蕊,赵轶群,高晓红,等.川陈皮素对糖尿病大鼠海马 Nrf-2 表达及认知功能的影响[J].重庆医学,2017,46(6):732-734.

[14] 杨夏,彭生,刘功俭.cAMP/PKA/CREB 信号通路及相关调控蛋白 PDE-4 和 ERK 对学习记忆的影响[J].医学综述,2011,17(15):2241-2243.

[15] COSTA-MATTIOLI M,GOBERT D,HARDING H,et al. Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 alpha kinase GCN2[J].Nature,2005,436(754):1166-1170.