

咖啡酸苯乙酯通过下调LRRK2抑制JNK信号通路减轻大鼠创伤性颅脑损伤

薛卫星¹, 刘卫平^{2*}

1. 河南省巩义市人民医院 神经外科, 河南 巩义 451200

2. 空军军医大学西京医院 神经外科, 陕西 西安 710032

摘要: 目的 探究咖啡酸苯乙酯(CAPE)对创伤性颅脑损伤(TBI)大鼠的作用及机制。方法 54只SD大鼠随机分为假手术组,模型组,CAPE低、高剂量(5、10 mg·kg⁻¹)组,CAPE(10 mg·kg⁻¹)+腺相关病毒阴性对照(oe-NC, 1×10⁹ pfu, 200 μL)组,CAPE(10 mg·kg⁻¹)+过表达LRRK2腺相关病毒(oe-LRRK2, 1×10⁹ pfu, 200 μL)组,每组9只。采用改良的Feeney法制备TBI模型,造模后30 min,CAPE和oe-NC、oe-LRRK2均ip给药,假手术组和模型组大鼠ip等量溶剂。所有大鼠每天给药1次,连续7 d。改良神经功能缺损评分(mNSS)评估大鼠神经功能缺损程度;转棒实验评价大鼠综合运动能力;检测各组大鼠脑组织含水量;ELISA法检测血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)、白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)-α和IL-1β水平;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测LRRK2 mRNA表达;Western blotting检测LRRK2、p-JNK和JNK蛋白表达;TUNEL染色检测大鼠皮层细胞凋亡;FJB染色检测神经元细胞死亡。结果 与假手术组相比,模型组大鼠mNSS、脑组织含水量、大脑皮层细胞凋亡率、FJB⁺细胞数以及血清中NSE、IL-6、TNF-α和IL-1β含量显著升高($P<0.05$),LRRK2 mRNA和LRRK2、p-JNK/JNK蛋白水平显著升高($P<0.05$),转棒时间显著降低($P<0.05$);与模型组相比,CAPE低、高剂量组大鼠mNSS、脑组织含水量、大脑皮层细胞凋亡率、FJB⁺细胞数以及血清中NSE、IL-6、TNF-α和IL-1β含量显著降低($P<0.05$),LRRK2 mRNA和LRRK2、p-JNK/JNK蛋白表达显著降低($P<0.05$),转棒时间显著升高($P<0.05$);与CAPE+oe-NC组相比,CAPE+oe-LRRK2组大鼠mNSS、脑组织含水量、细胞凋亡率、FJB⁺细胞数以及血清中NSE、IL-6、TNF-α和IL-1β含量显著升高($P<0.05$),LRRK2 mRNA和LRRK2、p-JNK/JNK蛋白表达显著升高($P<0.05$),转棒时间显著降低($P<0.05$)。结论 CAPE可能通过下调LRRK2表达抑制JNK通路活化,在TBI中发挥保护作用。

关键词: 创伤性颅脑损伤;咖啡酸苯乙酯;LRRK2;JNK信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)03-0473-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.03.010

Caffeic acid phenethyl ester reduces traumatic brain injury in rats by down-regulating LRRK2 and inhibiting JNK signaling pathway

XUE Weixing¹, LIU Weiping²

1. Department of Neurosurgery, People's Hospital of Gongyi City, Henan Province, Gongyi 451200, China

2. Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To explore the effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on rats with traumatic brain injury (TBI) and its possible mechanism. **Methods** Totally 54 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, CAPE low and high dose (5, 10 mg·kg⁻¹) group, CAPE (10 mg·kg⁻¹) + adeno-associated virus negative control (oe-NC, 1 × 10⁹ pfu, 200 μL) group, CAPE (10 mg·kg⁻¹) + over expression of LRRK2 adeno-associated virus (oe-LRRK2, 1 × 10⁹ pfu, 200 μL) group, nine in each group. TBI model was prepared by modified Feeney method, 30 min after modeling, CAPE, oe-NC, oe-LRRK2 were all administered with ip, and rats of sham operation group and model group was ip the same amount of solvent. All rats were administered once a day for seven days. The neurological function score (mNSS) was used to assess the degree of neurological deficit in rats; the rotating rod test was used to evaluate the comprehensive exercise capacity of rats; The brain water content of rats

收稿日期: 2021-08-12

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20190814)

第一作者: 薛卫星(1970—),男,汉族,副主任医师。Tel:17603883858 E-mail:asredas@163.com

*通信作者: 刘卫平,男,汉族,医学博士,教授/主任医师,博士研究生导师。E-mail:asredas@163.com

in each group was measured; ELISA was used to detect the levels of NSE, IL-6, and TNF- α and IL-1 β in serum; qRT-PCR was used to detect the expression of LRRK2 mRNA; Western blotting was used to detect the expression of LRRK2, p-JNK and JNK protein; TUNEL staining was used to detect neuronal cell apoptosis; FJB staining was used to detect the neuronal cell death. **Results** Compared with the sham operation group, the scores of neurological deficit, brain water content, apoptosis rate, number of FJB⁺ cells, and levels of serum NSE, IL-6, TNF- α and IL-1 β in the model group were significantly increased ($P < 0.05$), expressions of LRRK2 mRNA, LRRK2 and p-JNK/JNK protein were significantly increased ($P < 0.05$), and the time of rod transfer was significantly reduced ($P < 0.05$); compared with model group, the neurological deficit score, brain water content, cell apoptosis rate, number of FJB⁺ cells, and levels of serum NSE, IL-6, TNF- α and IL-1 β in CAPE group were significantly reduced ($P < 0.05$), expressions of LRRK2 mRNA and LRRK2 and p-JNK/JNK protein was significantly reduced ($P < 0.05$), and the rod time was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with CAPE + oe-NC group, the neurological deficit score, brain water content, apoptosis rate, number of FJB⁺ cells, and levels of serum NSE, IL-6, TNF- α and IL-1 β in CAPE + oe-LRRK2 group increased significantly ($P < 0.05$), the expressions of LRRK2 mRNA, LRRK2 and p-JNK/JNK protein was significantly increased ($P < 0.05$), and the rod-rotating time was significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** CAPE may inhibit the activation of JNK pathway by down-regulating the expression of LRRK2 and play a protective role in TBI.

Key words: traumatic brain injury; caffeic acid phenethyl ester; LRRK2; JNK signaling pathway

创伤性颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是一种由外力作用于头部造成的脑损伤,通常由交通事故、跌倒等引起。TBI是世界范围内死亡和残疾的主要原因,特别是在年轻人中,构成了一个重要的健康和社会经济问题^[1]。颅脑损伤包括血脑屏障破坏、脑水肿等原发性损伤,以及炎症、应激、细胞凋亡等一系列复杂的相互作用所致的继发性损伤,最终导致神经细胞丢失。更重要的是,脑外伤可导致严重的运动、感觉、认知和情绪障碍^[2]。细胞凋亡已被证实是TBI患者神经细胞死亡和预后较差的主要原因^[3]。因此,靶向抑制细胞凋亡和炎症可能是改善TBI后继发性损伤的重要策略。富含亮氨酸的重复激酶2(leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2)是家族性和散发性帕金森病中最常见的突变基因,是一种大的多域蛋白(2 527个氨基酸,相对分子质量为 2.86×10^5),在许多组织和细胞中广泛表达,特别是大脑中^[4]。已有研究表明^[5],在TBI后的小鼠大脑中发现LRRK2的表达上调,抑制LRRK2的表达可发挥神经保护作用。咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)是一种存在于多种植物中的天然酚类化合物,是蜂胶的主要成分,具有抗炎、抗凋亡、抗癌、抗病毒、抗氧化和促进伤口愈合等多种生物学活性^[6]。CAPE对蛛网膜下腔出血后早期脑损伤具有预防作用,可减轻脑血管痉挛^[7]。目前,CAPE对TBI的作用及其可能的作用机制尚不明确。因此,本研究旨在探究CAPE对大鼠TBI和LRRK2表达的影响,以期为明确CAPE在TBI中的作用机制及开发新的TBI治疗策略提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

54只6周龄健康雄性SD大鼠,购自空军军医大学实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(陕)2019-001,体质量(240 ± 20)g,饲养在温度(23 ± 2)℃、湿度(58 ± 2)%、光照可控(12 h光/暗周期)的环境下,所有大鼠自由进食和饮水。待适应性喂养1周后,进行造模。动物实验符合相关伦理要求(伦理编号为IACUC-200403)。

1.2 药物及主要试剂

CAPE购自美国Sigma-Aldrich公司,批号104594-70-9,质量分数 $\geq 97\%$;腺相关病毒阴性对照(oe-NC)和过表达LRRK2的腺相关病毒(oe-LRRK2)购自上海吉凯生物技术有限公司;TUNEL染色试剂盒购自英国Abcam公司;神经元特异性烯醇化酶(NSE)、白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和IL-1 β ELISA试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所;2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix购自美国APEX BIO公司;LRRK2、c-jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和p-JNK抗体购自美国cell signaling technology;TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(FITC)购自上海翊圣生物科技有限公司;Fluoro-Jade B(FJB)染液购自美国Millipore公司。

1.3 主要仪器

75006590高速离心机购自赛默飞世尔科技公司;TS2倒置荧光显微镜购自日本Nikon公司;ZH-ZYQ大鼠自由落体打击器购自淮北正华生物仪器设备有限公司;EPS-600数显式稳压稳流电泳仪、VE586湿转转膜仪、5200化学发光成像系统购自上

海天能科技有限公司; EG-1160 石蜡包埋机、RM2245 切片机、ST5010 全自动染色机购自德国 Leica 公司。

2 方法

2.1 造模及给药处理

54只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、CAPE低、高剂量(5、10 mg·kg⁻¹)组, CAPE(10 mg·kg⁻¹) + oe-NC(1×10⁹ pfu, 200 μL)组, CAPE(10 mg·kg⁻¹) + oe-LRRK2(1×10⁹ pfu, 200 μL)组, 每组9只。参考文献报道^[8], 采用改良的Feeney法制备TBI大鼠模型。所有大鼠造模前12 h, 禁食不禁水, 2%戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)ip麻醉, 无菌条件下正中切开头皮, 于右侧冠状缝后2 mm、中线旁2 mm处, 磨钻磨1个直径为5 mm的骨孔。使用撞击头(直径3 mm)撞击硬膜, 将砣码(30 g)从高20 cm的地方自由坠落打击小孔, 导致大鼠颅脑损伤。使用骨蜡封闭骨孔, 缝合头皮。假手术组大鼠仅开骨窗, 不进行撞击操作。造模后30 min, CAPE和oe-NC、oe-LRRK2均ip给药, 假手术组和模型组大鼠ip等量溶剂。所有大鼠每天给药1次, 连续7 d。

2.2 改良神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)

给药1、3、5、7 d后, 应用mNSS^[10]对大鼠运动、感觉和肢体反射功能进行检查, 包括平衡木实验、行走测试、反常运动、感觉测试、反射缺失和提尾反射等。最高分数为18, 0分为正常, 1~6分为轻度损伤, 7~12分为中度损伤, 13~18分为重度损伤。

2.3 转棒实验评价大鼠综合运动能力

大鼠在给药1、3、5和7 d后, 参考文献报道^[11], 采用KW-6D大鼠转棒疲劳仪, 检测在5 min内转速从5 r·min⁻¹加速到45 r·min⁻¹期间, 大鼠跌落的潜伏期(转棒时间), 以评估大鼠综合运动能力。

2.4 脑组织含水量

大鼠最后1次神经功能缺损评分结束后, 2%戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)ip麻醉大鼠, 处死后, 在骨窗边缘约2 mm处获取脑皮质(200±20)mg。用滤纸去除脑组织表面多余的血液和脑脊液后, 称质量, 此为组织湿质量。随后将脑组织在100 °C的烤箱中干燥24 h, 称质量, 此为组织干质量。

脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量

2.5 ELISA法检测血清NSE、IL-6、TNF-α和IL-1β水平

2%戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)ip麻醉大鼠后, 股动脉采血, 室温条件下静置20 min后, 3 000 r·min⁻¹离心

20 min, 收集血清。按照ELISA试剂盒说明书检测血清中脑损伤的特异性生物标志物NSE、IL-6、TNF-α和IL-1β的含量。

2.6 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测LRRK2 mRNA表达

收集骨窗边缘约2 mm处脑损伤皮质约100 mg, 加入Trizol试剂提取组织总RNA, 并将mRNA反转录为cDNA。按照2×SYBR Green qPCR Master Mix说明书所示, 配制qRT-PCR反应体系, 反应程序为: 95 °C、2 min; 95 °C、15 s, 60 °C、15 s, 72 °C、1 min, 40个循环; 72 °C、10 min。以GAPDH为内参, 采用2^{-ΔΔCt}法计算LRRK2 mRNA表达。实验所需引物序列为LRRK2(Forward: 5'-AAAGGGCGACAAC CAGGTCA-3'; Reverse: 5'-CCGGAGCACTTTCC TCGCTA-3'), GAPDH(Forward: 5'-TGGCCTTCC GTGTTCTCTACC-3'; Reverse: 5'-CGCCTGCTTC ACCACCTTCT-3')。

2.7 Western blotting检测LRRK2、p-JNK和JNK蛋白表达

收集骨窗边缘约2 mm处脑损伤皮质约100 mg, 冰上研磨成浆, 随后加入蛋白裂解液冰上裂解30 min, 4 °C条件下12 000 r·min⁻¹离心20 min, 收集上清液, BCA蛋白定量试剂盒测定上清液的蛋白浓度。随后取25 μg蛋白加入凝胶中进行SDS-PAGE凝胶电泳。电泳结束后, 进行转膜操作, 随后用5%脱脂奶粉室温封闭2 h以去除非特异性结合位点。加入LRRK2(1:2 000)、p-JNK(1:2 000)和JNK(1:1 000)抗体, 4 °C条件下孵育过夜。加入特异性二抗(1:5 000), 室温条件下孵育1 h, 随后滴加ECL化学发光底物, 暗室曝光。应用Image J软件对蛋白条带进行灰度分析。

2.8 TUNEL染色检测细胞凋亡

取大鼠大脑皮层组织, 4%多聚甲醛固定24 h, 流水冲洗。梯度酒精脱水、二甲苯透明。常规石蜡包埋、切片。石蜡切片常规脱蜡至水。PBS清洗切片后, 将Proteinase K工作液滴加至样本上, 使其被全部覆盖, 室温孵育10 min。PBS清洗切片2次, 随后每个样本滴加100 μL 1×Equilibration Buffer使其全部覆盖待检样本区域, 室温孵育30 min。加入50 μL TdT孵育缓冲液, 切片置于湿盒中37 °C避光孵育60 min。PBS清洗后, 随后加入DAPI染液, 室温避光孵育5 min, 去离子水清洗切片。在荧光显微镜下观察。其中凋亡的细胞核显示绿色荧光, DAPI显示蓝色荧光, 以Image J软件对照片中阳性细胞进

行计数。

凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数 / 总细胞数

2.9 FJB 染色检测神经元细胞死亡

石蜡切片脱蜡至水,用现配的0.1%冰醋酸做溶剂,按1:100比例配制FJB的工作液,混匀,滴加到组织上室温孵育20 min;纯水冲洗,DAPI染核,再用PBS冲洗;切片室温条件下风干,二甲苯透明,滴加中性树脂封片,晾干。坏死神经元胞浆和细胞核呈绿色荧光,正常神经元无着色。

2.10 统计学分析

采用SPSS 21.0软件进行数据统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。

3 结果

3.1 CAPE 对 TBI 大鼠的神经保护作用

与假手术组比较,模型组大鼠1、3、5、7 d的mNSS显著升高($P < 0.05$),1、3、5、7 d的转棒时间显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,CAPE低、高剂量组大鼠3、5、7 d的mNSS评分显著降低($P < 0.05$),5、7 d的转棒时间显著升高($P < 0.05$);与

CAPE+oe-NC组相比,CAPE+oe-LRRK2组大鼠3、5、7 d的mNSS评分显著升高($P < 0.05$),5、7 d的转棒时间显著降低($P < 0.05$)。结果见表1、2。

3.2 CAPE 对 TBI 大鼠血清 NSE 水平和脑水肿程度的影响

与假手术组相比,模型组大鼠血清NSE水平和脑组织含水量显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,CAPE低、高剂量组大鼠NSE水平和脑组织含水量显著降低($P < 0.05$);与CAPE+oe-NC组相比,CAPE+oe-LRRK2组大鼠NSE水平和脑含水量显著升高($P < 0.05$)。结果见表3。

3.3 CAPE 对 TBI 大鼠 LRRK2 的影响

与假手术组相比,模型组大鼠LRRK2 mRNA和蛋白表达显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,CAPE低、高剂量组大鼠LRRK2 mRNA和蛋白表达显著降低($P < 0.05$);与CAPE+oe-NC组相比,CAPE+oe-LRRK2组大鼠LRRK2 mRNA和蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。结果见图1和表4。

表1 各组大鼠mNSS比较($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Comparison of mNSS of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量	mNSS/分			
		1 d	3 d	5 d	7 d
假手术	—	1.57±0.18	1.53±0.14	1.55±0.17	1.58±0.13
模型	—	12.59±0.78*	12.03±0.53*	11.24±0.63*	10.45±0.47*
CAPE	5 mg·kg ⁻¹	11.28±0.64	10.31±0.43 [#]	9.41±0.38 [#]	8.17±0.36 [#]
	10 mg·kg ⁻¹	11.46±0.73	9.42±0.37 [#]	8.56±0.34 [#]	7.33±0.40 [#]
CAPE+oe-NC	10 mg·kg ⁻¹ +1×10 ⁹ pfu	11.79±0.55	9.45±0.41	8.50±0.42	7.24±0.45
CAPE+oe-LRRK2	10 mg·kg ⁻¹ +1×10 ⁹ pfu	12.36±0.71	11.78±0.64 [△]	10.86±0.53 [△]	9.65±0.39 [△]

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与CAPE+oe-NC组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs CAPE+oe-NC group

表2 各组大鼠转棒时间的比较($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Comparison of rod rotation time of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量	转棒时间/s			
		1 d	3 d	5 d	7 d
假手术	—	128.48±16.83	123.98±18.51	125.39±15.97	130.28±18.63
模型	—	15.93±2.18*	38.76±5.34*	53.11±7.13*	71.13±7.69*
CAPE	5 mg·kg ⁻¹	15.82±1.94	44.85±5.27	70.01±6.21 [#]	91.04±8.16 [#]
	10 mg·kg ⁻¹	16.63±2.06	46.74±5.38	86.75±7.83 [#]	109.58±9.05 [#]
CAPE+oe-NC	10 mg·kg ⁻¹ +1×10 ⁹ pfu	15.47±1.82	45.20±6.13	85.28±7.11	107.35±9.52
CAPE+oe-LRRK2	10 mg·kg ⁻¹ +1×10 ⁹ pfu	16.33±2.12	40.48±4.72	68.23±6.44 [△]	82.82±8.77 [△]

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与CAPE+oe-NC组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs CAPE+oe-NC group

表3 各组大鼠血清NSE水平和脑水肿程度比较($\bar{x}\pm s, n=9$)Table 3 Comparison of serum NSE level and cerebral edema degree of rats among all group ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量	NSE/ (mg·mL ⁻¹)	脑组织含水量/%
假手术	—	6.24±0.58	73.23±2.85
模型	—	14.81±1.17*	83.67±3.12*
CAPE	5 mg·kg ⁻¹	12.25±0.79 [#]	78.22±2.05 [#]
	10 mg·kg ⁻¹	9.34±0.85 [#]	76.92±2.64 [#]
CAPE+	10 mg·kg ⁻¹ +	9.21±0.88	75.74±2.26
oe-NC	1×10 ⁹ pfu		
CAPE+oe-	10 mg·kg ⁻¹ +	12.52±1.16 [△]	81.84±3.31 [△]
LRRK2	1×10 ⁹ pfu		

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与CAPE+oe-NC组比较: [△] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs CAPE+oe-NC group

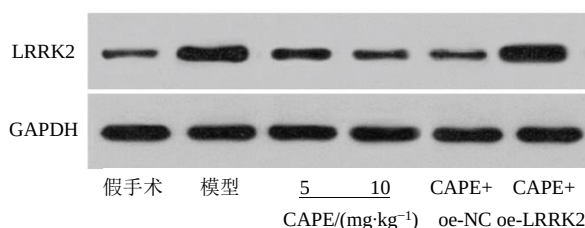


图1 Western blotting检测各组大鼠LRRK2蛋白表达
Fig. 1 Expression of LRRK2 protein of rats in each group was detected by Western blotting

3.4 CAPE对TBI大鼠大脑皮层细胞的影响

与假手术组相比,模型组大鼠大脑皮层细胞凋亡率和FJB⁺细胞数显著升高($P<0.05$);与模型组相比,CAPE低、高剂量组大鼠细胞凋亡率和FJB⁺细胞数显著降低($P<0.05$);与CAPE+oe-NC组相比,

表4 各组大鼠脑组织LRRK2 mRNA和蛋白表达的比
较($\bar{x}\pm s, n=9$)Table 4 Comparison of LRRK2 mRNA and protein expression in rat brain tissues of each group ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量	LRRK2 mRNA 表达	LRRK2 蛋 白表达
假手术	—	1.00±0.07	0.23±0.03
模型	—	2.86±0.25*	1.58±0.05*
CAPE	5 mg·kg ⁻¹	2.01±0.15 [#]	0.62±0.05 [#]
	10 mg·kg ⁻¹	1.37±0.13	0.35±0.03
CAPE+oe-NC	10 mg·kg ⁻¹ + 1×10 ⁹ pfu	1.34±0.14	0.33±0.02
CAPE+oe-	10 mg·kg ⁻¹ + 1×10 ⁹ pfu	3.15±0.38 [△]	1.42±0.13 [△]
LRRK2			

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与CAPE+oe-NC组比较: [△] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs CAPE+oe-NC group

CAPE+oe-LRRK2组大鼠细胞凋亡率和FJB⁺细胞数显著升高($P<0.05$)。结果见图2、3和表5。

3.5 CAPE对TBI大鼠血清炎症因子产生的影响

与假手术组相比,模型组大鼠血清IL-6、TNF- α 和IL-1 β 含量显著升高($P<0.05$);与模型组相比,CAPE低、高剂量组大鼠血清IL-6、TNF- α 和IL-1 β 含量显著降低($P<0.05$);与CAPE+oe-NC组相比,CAPE+oe-LRRK2组大鼠血清IL-6、TNF- α 和IL-1 β 含量显著升高($P<0.05$)。结果见表6。

3.6 CAPE对TBI大鼠JNK信号通路的影响

与假手术组相比,模型组大鼠p-JNK/JNK蛋白表达显著升高($P<0.05$);与模型组相比,CAPE低、高剂量组大鼠p-JNK/JNK蛋白表达显著降低($P<0.05$);与CAPE+oe-NC组相比,CAPE+oe-

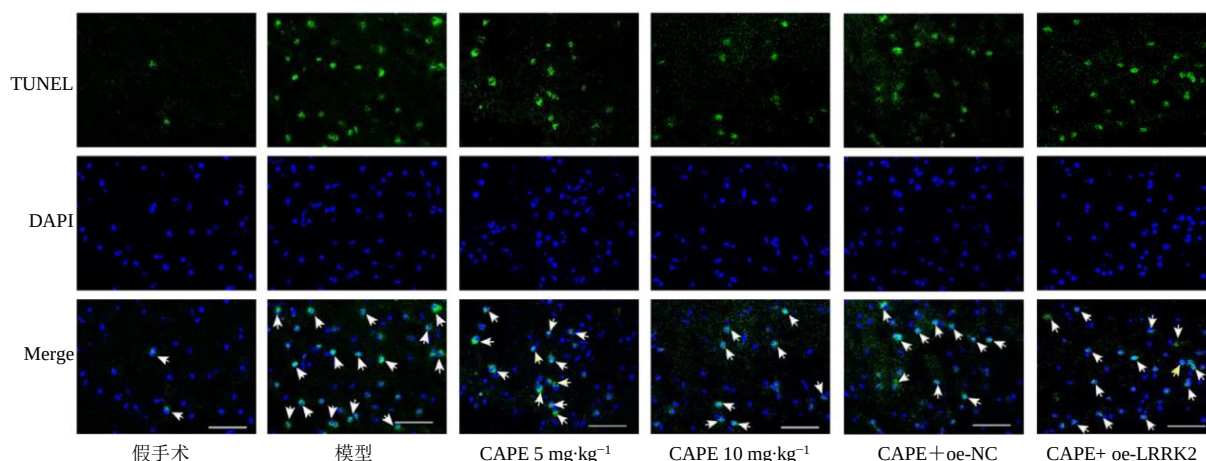


图2 TUNEL染色检测各组大鼠大脑皮层细胞凋亡($\times 100$)

Fig. 2 TUNEL staining was used to detect apoptosis of rat cell from cerebral cortex in each group ($\times 100$)

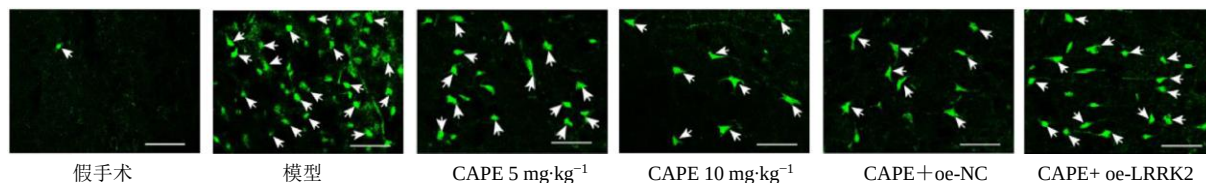


图3 FJB染色检测神经元细胞死亡($\times 100$)

Fig. 3 FJB staining was used to detect neuronal cell death ($\times 100$)

表5 各组大鼠大脑皮层细胞凋亡率和FJB⁺细胞数比较($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 5 Comparison of cell apoptosis rate and number of FJB⁺ cells of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量	细胞凋亡率/%	FJB ⁺ 细胞数/(个 $\cdot$ mm ⁻²)
假手术	—	7.86 $\pm$ 0.58	7.27 $\pm$ 0.86
模型	—	43.29 $\pm$ 4.26 [*]	84.97 $\pm$ 9.21 [*]
CAPE	5 mg $\cdot$ kg ⁻¹	30.78 $\pm$ 2.58 [#]	52.83 $\pm$ 3.13 [#]
	10 mg $\cdot$ kg ⁻¹	21.78 $\pm$ 2.64 [#]	28.47 $\pm$ 3.05 [#]
CAPE+oe-NC	10 mg $\cdot$ kg ⁻¹ +1 $\times$ 10 ⁹ pfu	19.42 $\pm$ 2.17	27.29 $\pm$ 3.25
CAPE+oe-LRRK2	10 mg $\cdot$ kg ⁻¹ +1 $\times$ 10 ⁹ pfu	35.37 $\pm$ 3.21 Δ	49.53 $\pm$ 5.24 Δ

与假手术组比较:^{*} $P < 0.05$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$;与CAPE+oe-NC组比较: $\Delta P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs CAPE+oe-NC group

表6 各组大鼠炎症因子水平的比较($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 6 Comparison of inflammatory factors of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量	IL-6/(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	TNF- α /(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg $\cdot$ mL ⁻¹)
假手术	—	70.37 $\pm$ 8.82	41.76 $\pm$ 5.27	25.46 $\pm$ 3.25
模型	—	182.29 $\pm$ 22.42 [*]	128.25 $\pm$ 14.33 [*]	73.74 $\pm$ 5.83 [*]
CAPE	5 mg $\cdot$ kg ⁻¹	135.87 $\pm$ 15.27 [#]	88.16 $\pm$ 9.44 [#]	54.47 $\pm$ 3.95 [#]
	10 mg $\cdot$ kg ⁻¹	102.94 $\pm$ 9.23 [#]	63.53 $\pm$ 7.87 [#]	38.65 $\pm$ 4.02 [#]
CAPE+oe-NC	10 mg $\cdot$ kg ⁻¹ +1 $\times$ 10 ⁹ pfu	105.71 $\pm$ 11.02	67.21 $\pm$ 7.43	42.76 $\pm$ 4.33
CAPE+oe-LRRK2	10 mg $\cdot$ kg ⁻¹ +1 $\times$ 10 ⁹ pfu	151.24 $\pm$ 17.80 Δ	93.52 $\pm$ 10.84 Δ	58.23 $\pm$ 6.13 Δ

与假手术组比较:^{*} $P < 0.05$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$;与CAPE+oe-NC组比较: $\Delta P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs CAPE+oe-NC group

LRRK2组大鼠p-JNK/JNK蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。结果见图4、表7。

4 讨论

TBI是全世界相对年轻的个体发病和死亡的主要原因之一,它可导致患者的生活质量严重下降^[12]。据报道,TBI会导致运动和认知障碍,如空间定向力和记忆力障碍。由于谷氨酸毒性、氧化应激、炎症、迟发性和长期性继发性脑损伤导致的血脑屏障通透性增加、脑水肿和神经功能损害,可以在很大程度上决定TBI患者的预后^[13]。因此,开发新的药物治疗TBI后继发性脑损伤十分迫切。

CAPE是一种天然存在的咖啡酸衍生物,进入细胞后酯键可被细胞内的酯酶裂解,释放出活性成分咖啡酸^[14]。CAPE是一种有效的神经保护剂,可明显减少 β -淀粉样蛋白寡聚体(A β O)诱导的神经细胞凋亡和神经炎症,并改善学习、记忆和空间认知

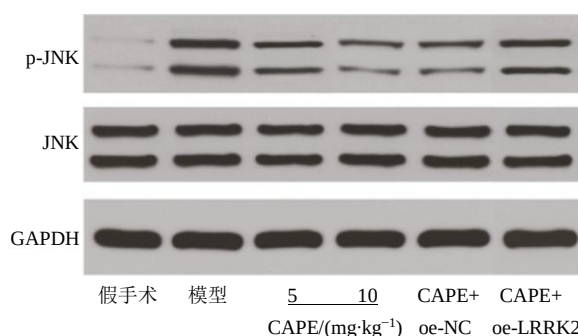


图4 Western blotting检测各组大鼠脑组织p-JNK/JNK蛋白表达

Fig. 4 P-JNK/JNK protein expressions in rat brain tissues of each group were detected by Western blotting

能力,从而在阿尔茨海默症中发挥神经保护作用^[15]。同时,CAPE可促进顺铂处理后的神经发生并上调神经可塑性标记物,提高神经元细胞存活率^[16]。目前,已有相关研究初步探索了CAPE在

表7 各组大鼠脑组织 p-JNK 和 JNK 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 7 Comparison of p-JNK and JNK protein expression in rat brain tissues of each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量	p-JNK/JNK 蛋白表达
假手术	—	0.12±0.01
模型	—	0.85±0.07*
CAPE	5 mg·kg ⁻¹	0.37±0.04 [#]
	10 mg·kg ⁻¹	0.25±0.02 [#]
CAPE+oe-NC	10 mg·kg ⁻¹ +1×10 ⁹ pfu	0.27±0.02
CAPE+oe-LRRK2	10 mg·kg ⁻¹ +1×10 ⁹ pfu	0.64±0.07 [△]

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与CAPE+oe-NC组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs CAPE+oe-NC group

TBI中的作用,其研究结果显示,CAPE治疗可明显抑制自由基产物F2-异前列腺素的产生,从而减轻TBI后的氧化应激反应^[17]。本研究结果显示,TBI后大鼠mNSS明显升高,转棒时间明显降低,血清中脑损伤的特异性生物标志物NSE以及炎症因子IL-6、TNF- α 和IL-1 β 的含量明显升高,细胞凋亡率和FJB⁺细胞数明显升高。而CAPE治疗后,TBI大鼠mNSS明显降低,转棒时间明显升高,血清中脑损伤的特异性生物标志物NSE以及炎症因子IL-6、TNF- α 和IL-1 β 的含量明显降低,细胞凋亡率和FJB⁺细胞数明显降低,且以上作用均呈现剂量相关性。该研究结果表明,CAPE可通过抑制炎症反应和神经元细胞凋亡,改善神经元细胞损伤,从而在TBI中发挥神经保护作用。

目前,LRRK2相关的研究主要集中在帕金森病^[18]。中枢神经系统应激和炎症将上调脑胶质细胞中LRRK2的表达^[19]。值得注意的是,Tau是一种微管相关蛋白,主要在中枢神经系统表达,调节轴突生长和轴突运输。而LRRK2可能通过调节Tau的磷酸化而促进脑缺血后的神经元细胞凋亡^[20]。目前,已有相关研究表明,TBI后内源性LRRK2表达增加。给予LRRK2抑制剂G1023可明显降低脑组织损伤、细胞死亡和炎症反应,并减轻了由皮质撞击损伤引起的运动和认知缺陷。该发现证明了TBI诱导的LRRK2上调在创伤后神经损伤诱导过程中的重要性^[21]。结果显示,TBI后大鼠大脑皮层中LRRK2表达增加,而CAPE治疗可明显抑制LRRK2的表达,且呈剂量相关性。进一步实验结果

显示,过表达LRRK2可明显抑制CAPE对TBI大鼠的治疗作用,上调CAPE治疗的TBI大鼠mNSS以及NSE、IL-6、TNF- α 和IL-1 β 的含量,上调细胞凋亡率和FJB⁺细胞数,下调转棒时间。该研究结果表明,CAPE通过抑制LRRK2表达在TBI中发挥保护作用。

作为一种高度保守的途径,c-jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路在调节生命活动中的基因表达和细胞内代谢方面起着至关重要的作用^[22]。研究表明,抑制JNK通路激活可改善神经功能缺损、学习能力、空间记忆、梗死体积、组织病理学和细胞凋亡,在局灶性脑缺血再灌注损伤中发挥保护作用^[23]。在TBI的相关研究中发现,TBI可导致JNK的磷酸化增加,而二十二碳六烯酸通过抑制JNK的过度磷酸化改善TBI诱导的神经功能障碍和肌张力障碍^[24]。本研究结果显示,TBI后大鼠大脑皮层中JNK的磷酸化增加,而CAPE治疗可明显抑制JNK的磷酸化,且呈剂量相关性。另有研究表明,LRRK2基因表达下调可抑制JNK通路的激活^[25]。LRRK2通过激活JNK通路,促进JNK磷酸化,导致帕金森病小鼠黑质致密部多巴胺能神经元变性^[26]。结果表明过表达LRRK2可明显逆转CAPE对TBI大鼠JNK磷酸化的抑制作用,促进CAPE治疗的TBI大鼠JNK通路活化。该研究结果表明,CAPE可能通过抑制LRRK2表达抑制JNK通路活化,在TBI中发挥保护作用。

本研究结果表明,CAPE可能通过下调LRRK2表达抑制JNK通路活化,抑制炎症反应和细胞凋亡,改善神经元细胞损伤,从而在TBI中发挥神经保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic brain injury: An overview of epidemiology, pathophysiology, and medical management [J]. Med Clin North Am, 2020, 104(2): 213-238.
- [2] Araki T, Yokota H, Morita A. Pediatric traumatic brain injury: Characteristic features, diagnosis, and management [J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2017, 57(2): 82-93.
- [3] Zhang P J, Ye Y Q, Qian Y H, et al. The effect of pyrroloquinoline quinone on apoptosis and autophagy in traumatic brain injury [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2017, 16(6): 724-736.
- [4] Kang U B, Marto J A. Leucine-rich repeat kinase 2 and Parkinson's disease [J]. Proteomics, 2017, 17(1/2):

- 1600092.
- [5] Delic V, Beck K D, Pang K C H, et al. Biological links between traumatic brain injury and Parkinson's disease [J]. Acta Neuropathol Commun, 2020, 8(1): 45.
- [6] Cornara L, Biagi M, Xiao J B, et al. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 412.
- [7] Palaz M N, Akcay E. The impact of *Propolis* factor caffeic acid phenethyl-ester on the cerebral vasospasm and early brain damage in the experimentally induced subarachnoid hemorrhage on rats [J]. World Neurosurg, 2020, 138: 736-742.
- [8] Chen X R, Wu S K, Chen C N, et al. *Omega*-3 polyunsaturated fatty acid supplementation attenuates microglial-induced inflammation by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway following experimental traumatic brain injury [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14 (1): 143.
- [9] Bıçakçı N, Karaboğa I, Dökmeci A H, et al. Cardioprotective effect of caffeic acid phenethyl ester on cardiac contusion following blunt chest trauma in rats [J]. Biotech Histochem, 2019, 94(6): 442-448.
- [10] Chen Y, Constantini S, Trembovler V, et al. An experimental model of closed head injury in mice: Pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits [J]. J Neurotrauma, 1996, 13(10): 557-568.
- [11] Yang X Y, Wu Q M, Zhang L, et al. Inhibition of histone deacetylase 3 (HDAC3) mediates ischemic preconditioning and protects cortical neurons against ischemia in rats [J]. Front Mol Neurosci, 2016, 9: 131.
- [12] Davanzo J R, Sieg E P, Timmons S D. Management of traumatic brain injury [J]. Surg Clin North Am, 2017, 97 (6): 1237-1253.
- [13] Dixon K J. Pathophysiology of traumatic brain injury [J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2017, 28(2): 215-225.
- [14] Habtemariam S. Protective effects of caffeic acid and the Alzheimer's brain: An update [J]. Mini Rev Med Chem, 2017, 17(8): 667-674.
- [15] Morroni F, Sita G, Graziosi A, et al. Neuroprotective effect of caffeic acid phenethyl ester in a mouse model of Alzheimer's disease involves Nrf2/HO-1 pathway [J]. Aging Dis, 2018, 9(4): 605-622.
- [16] Ferreira R S, dos Santos N A G, Martins N M, et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects PC12 cells from cisplatin-induced neurotoxicity by activating the NGF-signaling pathway [J]. Neurotox Res, 2018, 34(1): 32-46.
- [17] Nasution R A, Islam A A, Hatta M, et al. Role of CAPE in reducing oxidative stress in animal models with traumatic brain injury [J]. Ann Med Surg (Lond), 2020, 57: 118-122.
- [18] von Linstow C U, Gan-Or Z, Brundin P. Precision medicine in Parkinson's disease patients with LRRK2 and GBA risk variants - Let's get even more personal [J]. Transl Neurodegener, 2020, 9(1): 39.
- [19] Kuhlmann N, Milnerwood A J. A critical LRRK at the synapse ? The neurobiological function and pathophysiological dysfunction of LRRK2 [J]. Front Mol Neurosci, 2020, 13: 153.
- [20] Kim T, Vemuganti R. Mechanisms of Parkinson's disease-related proteins in mediating secondary brain damage after cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(6): 1910-1926.
- [21] Bae Y H, Joo H, Bae J, et al. Brain injury induces HIF-1 α -dependent transcriptional activation of LRRK2 that exacerbates brain damage [J]. Cell Death Dis, 2018, 9 (11): 1125.
- [22] Ha J, Kang E, Seo J, et al. Phosphorylation dynamics of JNK signaling: Effects of dual-specificity phosphatases (DUSPs) on the JNK pathway [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (24): E6157.
- [23] Liu H L, Liu S W, Tian X C, et al. Bexarotene attenuates focal cerebral ischemia-reperfusion injury via the suppression of JNK/caspase-3 signaling pathway [J]. Neurochem Res, 2019, 44(12): 2809-2820.
- [24] Zhu W, Zhao L, Li T, et al. Docosahexaenoic acid ameliorates traumatic brain injury involving JNK-mediated Tau phosphorylation signaling [J]. Neurosci Res, 2020, 157: 44-50.
- [25] Jiang Z C, Chen X J, Zhou Q, et al. Downregulated *LRRK2* gene expression inhibits proliferation and migration while promoting the apoptosis of thyroid cancer cells by inhibiting activation of the *JNK* signaling pathway [J]. Int J Oncol, 2019, 55(1): 21-34.
- [26] Yang D J, Thomas J M, Li T X, et al. The *Drosophila* hep pathway mediates *Lrrk2*-induced neurodegeneration [J]. Biochimie Biol Cell, 2018, 96(4): 441-449.

[责任编辑 兰新新]