

· 基础研究 ·

电刺激小脑顶核对缺血/再灌注大鼠脑组织内 NF- κ B 活性及其活化的影响

万东 罗勇 谢鹏

【摘要】目的 观察 Wistar 大鼠局灶脑缺血/再灌注后, 脑内核因子- κ B (NF- κ B) 活性及其活化的基本规律, 并探讨电刺激小脑顶核 (FNS) 对其影响。**方法** 成年雄性 Wistar 大鼠 27 只, 随机分为正常组、单纯局灶脑缺血/再灌注组 (模型组) 和局灶脑缺血/再灌注 + 电刺激小脑顶核治疗组 (FNS 治疗组)。采用线栓法制备右侧大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型, 缺血时间均为 2 h, 根据再灌注时间分为缺血 2 h/再灌注 3, 6, 12 和 24 h 组。模型组不给予任何干预处理, FNS 治疗组在缺血 2 h 再灌注即刻给予 FNS 治疗 1 h。用 Western blot 法检测缺血脑组织核抽提物中 NF- κ B p65 蛋白的表达, 用电泳迁移率改变分析法 (EMSA) 检测核抽提物中 NF- κ B DNA 的结合活性。**结果** 正常组大鼠脑组织核抽提物中有少量 NF- κ B p65 蛋白, NF- κ B DNA 结合活性较弱。模型组再灌注各时间点, 即再灌注 3, 6, 12 和 24 h, NF- κ B p65 蛋白含量均高于正常组, 其中再灌注 6 h 和 12 h 均显著高于正常组 ($P < 0.05$)。模型组 NF- κ B p65 蛋白含量变化趋势为: 再灌注 3 h < 再灌注 6 h < 再灌注 12 h, 再灌注 12 h 达峰值, 各组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 再灌注 24 h 时 NF- κ B p65 蛋白含量明显低于再灌注 6 h 和 12 h ($P < 0.05$)。模型组 NF- κ B DNA 结合活性除再灌注 3 h 外, 其余 3 个时间点均显著高于正常组 ($P < 0.05$); 模型组再灌注 3 h 时, NF- κ B DNA 结合活性明显弱于组内其余 3 个时间点 ($P < 0.05$), 这 3 个时间点均为高活性状态, 组内差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。FNS 治疗组 NF- κ B p65 蛋白含量及 NF- κ B DNA 结合活性的变化趋势与模型组相似。其中, 再灌注 6 h 和 12 h 时, FNS 治疗组 NF- κ B p65 蛋白含量明显低于模型组相应时间点 ($P < 0.05$); 再灌注 6, 12 和 24 h 时, FNS 治疗组 NF- κ B DNA 结合活性也明显低于模型组相应时间点 ($P < 0.05$)。**结论** 大鼠局灶脑缺血/再灌注后缺血脑组织中 NF- κ B 活化明显, 活性增强; FNS 可下调 NF- κ B 活化程度, 抑制 NF- κ B DNA 结合活性, 这可能是 FNS 具有“抗炎”作用的重要机理之一。

【关键词】 电刺激小脑顶核; 局灶脑缺血/再灌注; 核因子- κ B; DNA 结合活性; 电泳迁移率改变分析法

The effects of electrostimulation of the fastigial nucleus on the activation and the activity of nuclear factor κ B after cerebral ischemia-reperfusion WAN Dong, LUO Yong, XIE Peng. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China

【Abstract】Objective To explore changes in the activation and activity of nuclear factor kappa B (NF κ B) after cerebral ischemia-reperfusion (CIR) in rats, and to investigate the effects of electrostimulation of the fastigial nucleus (FNS) on these indicators. **Methods** Twenty-seven adult male Wistar rats were randomly divided into three groups; a normal control group ($n = 3$), a CIR group ($n = 12$) and a CIR + FNS group ($n = 12$). Middle cerebral artery obturation (MCAO) was established by suturing the right MCA, and the treated rats were then randomly divided into four subgroups reperused for 3 h, 6 h, 12 h and 24 h. FNS was administrated to the CIR + FNS groups at 2 h after CIR for 1 h, while there was no treatment of the CIR group. Then the expression of NF κ B p65 protein in nuclear extracts was detected using western blotting, and the DNA binding activity of NF κ B was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results** NF κ B p65 protein concentrations in the nuclear extracts were increased at the different reperfusion time points, especially at 6 h and 12 h ($P < 0.05$) compared with the normal control group. NF κ B DNA binding activities were also significantly improved at 6 h, 12 h and 24 h ($P < 0.05$). Compared with the CIR group, the levels of NF κ B p65 protein in the CIR + FNS group were distinctly decreased at 6 h and 12 h after reperfusion ($P < 0.05$), while the NF κ B DNA binding activities were obviously decreased at 6 h, 12 h and 24 h ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of NF κ B protein and NF κ B DNA binding activity can

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30470606); 重庆市科委应用基础项目 (渝科计 [2002] 18-93); 重庆市卫生局中医药科研计划项目 (渝中医 [2002] 42-30); 重庆市科委攻关项目 (渝科计 [2003] 43-6)

作者单位: 400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆市神经病学重点实验室

通讯作者: 罗勇

be inhibited by FNS, which might be one of the mechanisms of the anti-inflammatory effects of FNS.

【Key words】 Electrostimulation; Fastigial nucleus; Focal cerebral ischemia-reperfusion; Nuclear factor kappa B; DNA binding activity; Electrophoretic mobility shift assay

近年来国内外学者研究发现,电刺激小脑顶核(electrostimulation of fastigial nucleus, FNS)可产生广泛的神经保护作用。FNS 可上调脑缺血后多种脑保护因子的表达^[1];减少脑缺血后多种继发性炎性损伤因子的产生^[2-4]。预先 FNS 1 h,可使随后 10 d 内大鼠永久性大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)所致脑梗死体积缩小约 50%,肢体功能明显改善^[5,6];还可使大脑皮质局部脑血流(regional cerebral blood flow, rCBF)增加达正常对照组的 300%,但不伴随脑组织糖代谢率的改变^[7]。大鼠 MCAO 以后才给予 FNS 1 h,亦可使脑梗死体积减少达 50% 以上,且能够恢复缺血皮质区脑电图的波幅;只要在大鼠 MCAO 后最初 6 h 内给予 FNS 治疗,均可使梗死体积缩小,脑水肿减轻^[8]。

FNS 究竟是通过什么机制发挥其神经保护作用呢?董为伟^[6]认为,FNS 的即刻脑保护作用可能与脑内钾通道的开放有关,晚发长程的脑保护效果可能是通过抑制脑缺血后炎症反应,减少细胞凋亡而实现。既往的研究发现,FNS 确实能够明显减少脑缺血灶内炎性白细胞的浸润,下调细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等炎症相关因子在脑缺血(包括脑缺血/再灌注)后的表达,而这些因子的表达则受核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)调控。NF- κ B 在脑缺血后过度活化被认为是介导脑缺血后炎性损伤的中心环节。至于 FNS 对脑缺血后 NF- κ B 的过度活化有无直接的调控作用,目前尚未进行深入研究。

本实验选用 Wistar 大鼠 MCAO 模型,以 FNS 为干预措施,应用 Western blot 和电泳迁移率改变分析法(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测脑缺血/再灌注大鼠缺血脑组织核抽提物中 NF- κ B p65 蛋白表达和 NF- κ B DNA 结合活性,观察 Wistar 大鼠局灶脑缺血/再灌注后缺血脑组织中 NF- κ B 的活性及其活化的基本规律,并探讨 FNS 对其影响,从核转录水平进一步阐释 FNS 的“抗炎”作用及其脑保护作用机制。

材料与方法

一、实验动物与材料

成年健康雄性 Wistar 大鼠 27 只,体重 200 ~ 250 g,由四川省医学科学院实验动物研究所提供。NF- κ B p65 兔多克隆抗体、碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG

为 Santa Cruz 公司产品;凝胶迁移率改变分析系统试剂盒为 Promega 公司产品,内含 HeLa 细胞核抽提物、T4 多核苷酸激酶、NF- κ B 结合位点的双链寡聚核苷酸探针(5'-A GTT GAG GGG ACT TTC CCA GGC-3', 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5')、AP-1 结合位点的双链寡核苷酸探针(5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3', 3'-GCG AAC TAC TCA GTC GGC CTT-5')以及 5 × 结合缓冲液等;poly (dI-dC) poly (dI-dC) 购自 Sigma 公司;[γ -³²P] ATP (5 000 Ci/mmol) 为北京福瑞生物工程公司产品。垂直电泳槽、电泳仪、电转槽为美国 Bio-Rad 公司产品,图像扫描采用 Scan-Maker E6 系统,图像灰度分析采用 2.0 版 ImageMaster VDS 软件。

二、动物分组

实验动物适应性喂养 1 周后,随机分为正常组 3 只、单纯局灶脑缺血/再灌注组(简称模型组)12 只和局灶脑缺血/再灌注 + 电刺激小脑顶核治疗组(简称 FNS 治疗组)12 只。其中,模型组和 FNS 治疗组分别根据再灌注时间分为脑缺血 2 h/再灌注 3 h、6 h、12 h 和 24 h 等 4 个亚组,每亚组 3 只动物。正常组不给予任何干预处理。

三、脑缺血/再灌注模型的制备

参照 Longa 等^[9]和罗勇等^[10]报道的方法,采用经颈内动脉线栓法制备大鼠右侧 MCAO 模型。腹腔注射 3.5% 水合氯醛(350 mg/kg 体重)麻醉大鼠后,将其仰卧位固定于手术台上,经颈正中切口,分离和暴露右侧颈总动脉,再向头端分离和暴露颈内、外动脉,结扎并切断颈外动脉。用尖刀在颈外动脉残端作一纵行小切口,用头端约 5 mm 涂有聚胺酯的尼龙钓鱼线(直径为 0.25 ~ 0.26 mm)从右侧颈外动脉插入颈内动脉。从颈总动脉分叉处送入颈内动脉约 1.9 ~ 2.1 cm 时遇到阻力为大脑中动脉起始处栓塞成功的标志。栓塞大脑中动脉 2 h 后,再次麻醉动物,拔除线栓至颈外动脉残端内,实现再灌注。

模型成功的判断标准:(1)左侧肢体疼痛回缩迟钝或消失;(2)提尾倒悬时左上肢不能向前下伸;(3)行走时向左侧偏倒或原地向左侧转圈;(4)右侧出现 Honer 征。

四、FNS 方法

参照 Nakai 等^[7]和王健等^[11]的方法进行小脑顶核电刺激。大鼠大脑中动脉栓塞 2 h 实施再灌注即刻(此时大鼠仍处于麻醉状态),将其以俯卧位固定于江

湾 II 型大鼠脑立体定位仪上。根据大鼠脑立体定位图谱^[12]确定小脑顶核座标:以前囟为零点,头颅矢状位正中线向后 11.4~11.8 mm、旁开 0.8~1.0 mm、深 5.2~5.7 mm。在左侧颅骨上钻孔,插入双极同芯圆针电极(直径 0.1 mm),以刺激左侧小脑顶核。用小脑顶核电刺激仪(由重庆大学理论电气工程研究所研制)进行刺激,刺激电流为频率 50~100 Hz、时程 0.5 ms 的直角方波脉冲,电流强度为 50 μ A,调节小脑顶核刺激部位,以刺激时大鼠出现摆尾、竖毛,伴随短暂性呼吸、心跳加快和血压增高作为刺激成功的标志,持续刺激 1 h。刺激过程中动物均处于浅麻醉状态。刺激结束后拔除针电极,缝合头皮。术后将大鼠置于电热毯上保暖,麻醉清醒后放回笼中。

五、实验取材

各组实验动物于各观察时间点用 3.5% 水合氯醛深麻醉,并经心脏灌注约 100 ml 生理盐水后断头取脑,以右侧大脑中动脉支配的脑区(即缺血侧)为取材对象,准确称取 0.1 g 脑组织,置液氮中保存备用。另取等量正常大鼠脑组织作为对照。

六、制备脑组织核抽提物

于 0.1 g 脑组织中加入 1 ml 冰冷的胞浆裂解液[成分为蔗糖 0.5 mol/L、HEPES 10 mmol/L (pH 值 7.9)、 $MgCl_2$ 1.5 mmol/L、KCl 10 mmol/L、EDTA 1 mmol/L、甘油 10% (V/V)、DTT 1 mmol/L、PMSF 1 mmol/L、Aprotinin 5 μ g/ml、Leupeptin 5 μ g/ml],于冰上匀浆 2~3 min,至脑组织完全变成匀浆;冰浴 30 min;应用 Sigma 公司产 1-15K 型低温离心机,4℃ 下 4 000 $\times g$ 离心 10 min;取上清(含胞膜和胞浆裂解物)置于 4℃ 预冷的 Ep 管中,液氮速冻、-70℃ 保存备用。再用 0.5 ml 冰冷的胞浆裂解液垂直悬沉淀,震荡混匀;4℃ 下 4 000 $\times g$ 离心 10 min;弃上清,向沉淀(含有胞核成分)中加入 0.2 ml 冰冷的胞核裂解液[成分为 HEPES 20 mmol/L (pH 值 7.9)、 $MgCl_2$ 1.5 mmol/L、甘油 20% (V/V)、EDTA 0.2 mmol/L、NaCl 0.3 mol/L、DTT 0.5 mmol/L、PMSF 0.5 mmol/L、Aprotinin 5 μ g/ml、Leupeptin 5 μ g/ml],震荡混匀,冰浴 60 min;4℃ 下 12 000 $\times g$ 离心 30 min;取上清(含核抽提物)置于 4℃ 预冷的 Ep 管中,液氮速冻、-70℃ 保存。用 Bradford 法^[13]测定核抽提物中蛋白浓度,并用胞核裂解液将核抽提物的蛋白浓度调至 2 μ g/ μ l。

七、Western blot 检测

用 10% 变性不连续十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离含 50 μ g 蛋白的核抽提物;电泳结束后,将蛋白电转印至硝酸纤维素膜;TTBS 洗膜后,用 NF- κ B p65 兔多克隆抗体工作液(稀释比例为 1:500)孵膜,4℃ 过夜(16~18 h);TTBS 洗膜 4

次后,用碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 工作液(稀释比例为 1:1 000)孵膜,37℃ 下 1 h;TTBS 洗膜 4 次后,将膜片移入碱性磷酸酶底物 BCIP/NBT 工作液中,避光显色 5~10 min;终止显色反应后,用自来水漂洗膜片,自然晾干后扫描并采集图像。

八、EMSA

根据凝胶迁移率改变分析系统试剂盒说明书及操作指南进行预实验后,拟定主要操作步骤:用 T4 多核苷酸激酶将 NF- κ B 探针标记上 γ -³²P;建立 DNA-核蛋白结合反应体系;结合反应物进行 7% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳;电泳结束后,取下凝胶,置于滤纸上,另一面用保鲜膜覆盖,37℃ 下干燥 1 h;-70℃ 下放射自显影 3 d;冲洗胶片后扫描并照像。

九、凝胶电泳迁移率竞争抑制实验

建立 4 种不同反应体系,即阳性对照反应体系(含 HeLa 细胞核提取物 2 μ l)、阴性对照反应体系(含 HeLa 细胞核提取物 0 μ l)、非特异性竞争抑制反应体系[含 HeLa 细胞核提取物 2 μ l、未标记的 AP1 探针 1 μ l(相当于 γ -³²P 标记的 NF- κ B 探针的 100 倍)]、特异性竞争抑制反应体系(含 HeLa 细胞核提取物 2 μ l、未标记的 NF- κ B 探针 1 μ l)。在 4 种不同反应体系中各加入 5 $\times$ 结合缓冲液 2 μ l,并用无核酸酶纯水补足至总体积 9 μ l。上述各体系室温下反应 10 min 后,加入 γ -³²P 标记的 NF- κ B 探针 1 μ l,室温下反应 20~30 min 后,进行 EMSA 检测和放射自显影。

十、半定量分析

Western blot 硝酸纤维素膜片和 EMSA 放射自显影(自显影时间相同)胶片用 ScanMaker E6 系统进行灰度扫描,并用 ImageMaster VDS 图像分析软件测定 Western blot 各显色条带的积分光密度值(OD 值)和 NF- κ B 结合带的积分 OD 值。Western blot 结果以 OD 值/ μ g 蛋白表示,EMSA 结果以积分 OD 值表示。

十一、统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SAS 8.0 版统计分析软件进行 ANOVAS 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、缺血脑组织核抽提物中 NF- κ B p65 含量的动态变化及 FNS 对其影响

Western blot 检测结果显示:正常组大鼠脑组织核抽提物中有少量 NF- κ B p65 蛋白。模型组及 FNS 治疗组再灌注 3 h、6 h、12 h 和 24 h 时 NF- κ B p65 蛋白含量均比正常组高;其中,再灌注 6 h 和 12 h 时,模型组及 FNS 治疗组明显高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$);表明脑缺血/再灌注可明显激活脑内 NF-

κB。模型组 NF-κB p65 蛋白含量的变化趋势为:再灌注 3 h < 再灌注 6 h < 再灌注 12 h (均 $P < 0.05$), 再灌注 24 h 时, NF-κB p65 蛋白含量均明显低于再灌注 6 h 和 12 h ($P < 0.05$), 接近再灌注 3 h 时的水平 ($P > 0.05$)。FNS 治疗组的变化趋势与模型组相似, 提示脑缺血/再灌注后脑内 NF-κB 的活化具有再灌注时间依赖性。再灌注 6 h 和再灌注 12 h 时, FNS 治疗组 NF-κB p65 蛋白含量明显低于模型组 ($P < 0.05$); 表明 FNS 可抑制脑缺血/再灌注后脑内 NF-κB 的活化。见表 1、图 1。

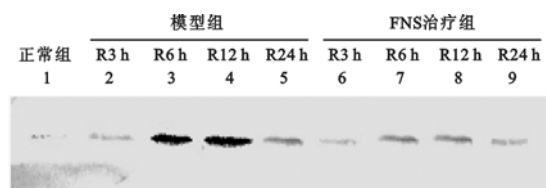
二、缺血脑组织核抽提物中 NF-κB 活性的动态变化及 FNS 对其影响

EMSA 检测结果显示: 正常组大鼠脑组织核抽提物中 NF-κB 活性较低。与正常组比较, 除再灌注 3 h 外, 其余 3 个再灌注时间点的模型组和 FNS 治疗组脑组织核抽提物中 NF-κB 活性均显著增高 ($P < 0.05$)。模型组再灌注 6 h、12 h 和 24 h, 脑组织核抽提物中 NF-κB 均呈高活性状态, 3 个时间点间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 且明显高于再灌注 3 h 时 NF-κB 的活性 ($P < 0.05$)。FNS 治疗组的变化趋势与模型组相似。除再灌注 3 h 外, 其余 3 个再灌注时间点 FNS 治疗组 NF-κB 活性均明显低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1、图 2。

表 1 各组脑组织核抽提物中 NF-κB p65 蛋白含量及 NF-κB DNA 结合活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

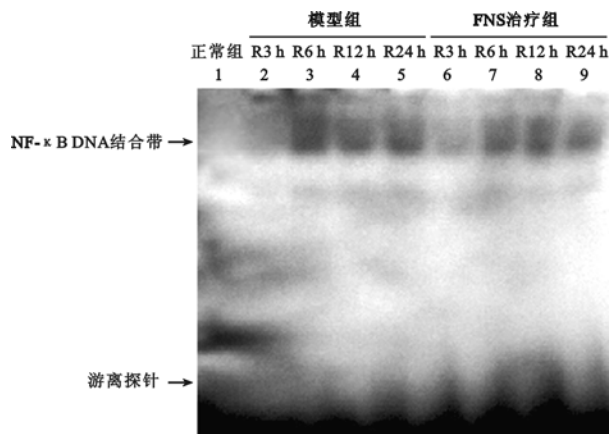
组别	n	NF-κB p65 蛋白含量 (OD 值/μg 蛋白)	NF-κB DNA 结合活性 (积分 OD 值)
正常组	3	9.28 ± 1.41	210.97 ± 3.61
模型组			
再灌注 3 h	3	10.42 ± 3.24	214.91 ± 9.38
再灌注 6 h	3	20.59 ± 2.83 *△	335.07 ± 17.41 *△
再灌注 12 h	3	33.98 ± 3.56 *△☆	404.25 ± 7.25 *△
再灌注 24 h	3	12.42 ± 2.07 *▲	351.73 ± 20.94 *△
FNS 治疗组			
再灌注 3 h	3	9.53 ± 1.54	209.68 ± 13.29
再灌注 6 h	3	13.03 ± 1.45 *#△	249.30 ± 17.47 *#△
再灌注 12 h	3	15.19 ± 1.35 *#△☆	257.11 ± 15.79 *#△
再灌注 24 h	3	11.54 ± 0.99 *▲	237.18 ± 8.76 *#△

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组相应时间点比较, # $P < 0.05$; 与再灌注 3 h 组内比较, △ $P < 0.05$; 与再灌注 6 h 组内比较, ☆ $P < 0.05$; 与再灌注 12 h 组内比较, ▲ $P < 0.05$



注: R 代表再灌注

图 1 各组脑组织核抽提物中 NF-κB p65 蛋白含量 (Western blot 检测)

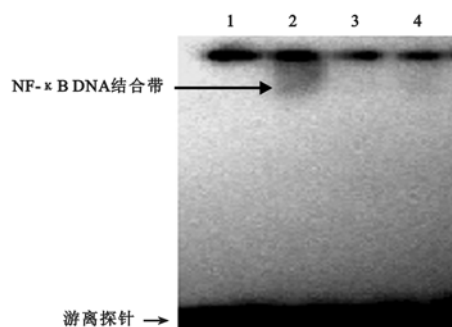


注: R 代表再灌注

图 2 各组脑组织核抽提物中 NF-κB DNA 结合活性 (EMSA 检测)

三、凝胶电泳迁移率竞争抑制实验结果

HeLa 细胞核抽提物中加入 γ - 32 P 标记的 NF-κB 探针后, 出现明显的 NF-κB DNA 结合条带, 而在加入 100 倍未标记的 NF-κB 探针体系中和没有加入 HeLa 细胞核抽提物的体系中均未出现 NF-κB DNA 结合条带, 且未标记的无关探针 (AP-1) 对 NF-κB 与 DNA 结合无明显影响, 提示 EMSA 检测结果具有特异性、稳定性和可靠性。见图 3。



注: 1 为阴性对照; 2 为阳性对照; 3 为特异性竞争抑制; 4 为非特异性竞争抑制

图 3 凝胶电泳迁移率竞争抑制实验结果

讨 论

NF-κB 是转录因子家族中的重要成员, 参与多种炎症细胞因子、趋化因子和成纤维细胞因子的合成, 调控细胞增殖、分化和凋亡等生理或病理过程。NF-κB 主要由 p50 和 p65 两个亚基组成, 其蛋白质分子 N 端的 300 个氨基酸与 Rel 原癌基因编码的产物具有高度的同源性, 称之为 Rel 同源区。Rel 同源区包括 DNA 结合功能域、二聚体化功能域、cAMP 依赖性蛋白激酶 A 磷酸化位点和一段核定位序列。细胞在静息状态下, NF-κB 与其抑制因子 IκB 结合, 形成 NF-κB/IκB 复合物, 封闭了 NF-κB 的核定位序列, 使 NF-κB 以无

活性的形式存在于胞浆中;当细胞受到细菌内毒素、氧自由基、前炎症细胞因子(如肿瘤坏死因子- α 、白介素-1 β 等)、缺氧/复氧等刺激后,I κ B 发生快速泛素化及蛋白酶解,暴露出 NF- κ B 的核定位序列,NF- κ B 即被活化,并很快转位入核,与靶基因启动子或增强子上的 κ B 位点结合,启动靶基因的转录和蛋白合成。尤其在脑缺血/再灌注损伤时,NF- κ B 受氧自由基、细胞因子、钙超载等因素刺激而活化,活化的 NF- κ B 又可诱导细胞因子、黏附分子、免疫受体、炎性酶类的表达,氧自由基形成以及细胞内钙超载,从而形成炎症反应的恶性循环,加剧脑缺血后继发性炎症性脑损伤^[14,15]。

非活化状态的 NF- κ B 位于胞浆中,而活化状态的 NF- κ B 主要位于细胞核内。因此,检测细胞核内 NF- κ B 的表达量,可以大致了解 NF- κ B 活化及核转位的水平。本研究应用 Western blot 法检测了各组大鼠缺血脑组织核抽提物中的 NF- κ B p65 蛋白水平,发现正常组大鼠脑组织核抽提物中存在少量 NF- κ B p65 蛋白,表明在正常的生理状态下,NF- κ B 的活化水平比较低,仅有极少量 NF- κ B 转位进入细胞核,这种低水平的活化可能是 NF- κ B 参与多种生理功能所必需。大鼠局灶脑缺血 2 h/再灌注 3 h、6 h、12 h 和 24 h,缺血脑组织核抽提物中 NF- κ B p65 蛋白水平均高于正常组,尤其是再灌注 6 h 和 12 h 时与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);其总体变化趋势是再灌注 3 h < 再灌注 6 h < 再灌注 12 h (均 $P < 0.05$),再灌注 24 h 时 NF- κ B p65 蛋白水平呈明显下降趋势,显著低于再灌注 6 h 和 12 h 的水平($P < 0.05$),提示局灶脑缺血/再灌注损伤可诱导和促进缺血脑组织中 NF- κ B 的活化及核转位的发生,并具有再灌注时间依赖性。在本研究所观察的时间点内,再灌注 12 h 是局灶脑缺血/再灌注大鼠脑内 NF- κ B 活化及核转位发生的高峰时间,这一峰值出现的时间正好与脑缺血/再灌注损伤后脑内众多炎症损伤因子表达和释放的高峰时间相吻合,如促炎性细胞因子、黏附分子(如细胞间黏附分子-1、内皮细胞黏附分子-1 等)以及选择素(如 P-选择素、E-选择素等)等,这些炎症损伤因子大多在损伤后 1 h 表达上调,12 h 达高峰,2~5 d 后表达减少,这提示脑缺血/再灌注后脑内活化的 NF- κ B 在其病理生理过程中可能发挥重要的作用。大鼠局灶脑缺血 2 h、再灌注即刻给予 1 h FNS 治疗后,同一时间点缺血脑组织核抽提物中的 NF- κ B p65 蛋白水平均低于模型组,特别是缺血 2 h/再灌注 6 h 和 12 h 时,FNS 治疗组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 FNS 可明显抑制局灶脑缺血/再灌注大鼠脑内 NF- κ B 活化及核转位的发生。

NF- κ B 激活并转位进入细胞核是其完成转录调控功能的前提和基础,但是并非所有进入细胞核的 NF- κ B

都能与靶基因启动子或增强子上的 κ B 位点结合并完成其转录调节功能。事实上,有多种因素参与这一过程的调节,如外界因素的干扰、亚基自身的变构能力以及亚基与 DNA 的亲合力等,尤其是 I κ B 家族在调节 NF- κ B 与 DNA 结合这一环节中发挥了重要的作用。有研究发现^[16,17],I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 等都能进入核内抑制 NF- κ B 与 DNA 的结合,而且 I κ B α 还能将核内的 p65/p50 异源二聚体从 κ B 结合位点上解离下来并转运至胞浆,明显地抑制 NF- κ B 与 DNA 结合。还有研究发现^[18],糖皮质激素与胞浆中糖皮质激素受体形成复合物进入细胞核,能与核内处于活化状态的 NF- κ B 结合,阻止 NF- κ B 与靶基因上的 κ B 位点结合,降低 NF- κ B 的 DNA 结合活性。这些研究结果表明,细胞核蛋白中 NF- κ B p65 蛋白水平的高低只能反映 NF- κ B 的活化程度和核转位的多少,不直接反映 NF- κ B 的 DNA 结合活性的高低。因此,本实验进一步应用 EMSA 检测脑组织核抽取物中的 NF- κ B DNA 结合活性,结果发现,大鼠局灶脑缺血 2 h/再灌注 3 h、6 h、12 h 和 24 h,缺血脑组织核抽取物中 NF- κ B DNA 结合活性均高于正常组,尤其是再灌注 6 h、12 h 和 24 h 时,NF- κ B DNA 结合活性与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且这 3 个时间点 NF- κ B DNA 结合活性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),均为高活性状态。大鼠局灶脑缺血 2 h,再灌注即刻给予 1 h FNS 治疗后,再灌注各时间点缺血脑组织核抽提物中 NF- κ B DNA 结合活性均低于模型组,特别是再灌注 6 h、12 h 和 24 h 时,FNS 治疗组与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示 FNS 可明显抑制局灶脑缺血/再灌注大鼠脑内 NF- κ B DNA 结合活性。同时,本实验结果还显示,大鼠局灶脑缺血 2 h/再灌注 3 h、6 h、12 h 和 24 h 时,缺血脑组织核抽提物中 NF- κ B DNA 结合活性的总体变化趋势与 NF- κ B p65 蛋白水平的变化趋势并不完全一致,从而进一步证实了细胞核抽提物中 NF- κ B p65 蛋白水平的高低不能全面反映 NF- κ B DNA 结合活性的高低。

本研究从 NF- κ B p65 核转位和 NF- κ B DNA 结合活性这两个层面观察了 FNS 对局灶脑缺血/再灌注后脑内 NF- κ B 的影响,结果发现 FNS 可减少脑缺血/再灌注后脑内 NF- κ B p65 核转位的发生,直接抑制 NF- κ B DNA 结合活性。这意味着 FNS 在一定程度上可下调脑缺血/再灌注后脑内众多受 NF- κ B 调控的炎性介质的表达,能够有效遏制脑缺血/再灌注后继发性炎症性脑损伤的发生和发展,从而体现其确切的“广谱抗炎”效果和缺血脑保护作用。

FNS 究竟是通过什么途径来抑制 NF- κ B p65 核转位的发生呢? Galea 等^[2-4]在离体和在体实验中均发现,FNS 可明显增加脑缺血/再灌注大鼠脑微血管内皮细胞

中 I κ B- α mRNA 的表达,而 I κ B(尤其是 I κ B- α)的降解是 NF- κ B 活化的中心环节,因此 FNS 上调 I κ B- α 的表达可能是其抑制 NF- κ B p65 核转位发生的重要机制之一。同时,曾锦旗等^[5,19]发现,FNS 可上调急性脑出血大鼠血肿周围缺血区热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)的表达,HSP70 表达少的脑区 NF- κ B 的表达活跃,在 HSP70 表达活跃的皮质区,NF- κ B 的表达相对较少,并认为这可能与 HSP70 对 NF- κ B 表达的抑制作用有关。另有研究则进一步证实^[20,21],HSP70 可直接抑制 I κ B 的降解和直接抑制 NF- κ B 核转位的发生。因此,FNS 上调 HSP70 的表达可能是其抑制 NF- κ B 核转位发生的另一重要机制。至于 FNS 又是通过什么机制来抑制脑缺血/再灌注后脑内 NF- κ B DNA 结合活性,目前尚不完全清楚。总之,本研究结果显示,FNS 能明显抑制 NF- κ B p65 核转位的发生,减少 NF- κ B 在细胞核内的表达,这可能是 FNS 抑制脑缺血/再灌注后脑内 NF- κ B DNA 结合活性的重要途径之一。

参 考 文 献

- 1 万东,罗勇.电刺激小脑顶核脑保护作用的分子机制.中国康复理论与实践杂志,2003,9:161-165.
- 2 Galea E,Golanov EV,Feinstein DL,et al. Cerebellar stimulation reduces nitric oxide synthase expression and protects brain from ischemia. Am J Physiol,1998,274:2035-2045.
- 3 Galea E,Glickstein SB,Feinstein DL,et al. Stimulation of cerebellar fastigial nucleus inhibits interleukin-1 β -induced cerebrovascular inflammation. Am J Physiol,1998,275:2053-2063.
- 4 Galea E,Feinstein DL,Golanov EV,et al. Reduction of inflammatory reactivity of brain microvessels by stimulation of the cerebellar fastigial nucleus:role of MAD-3(NF- κ B inhibitor). J Cereb Blood Flow Metab,1997,17:567.
- 5 曾锦旗,余刚,董为伟.预刺激小脑顶核对脑出血缺血半暗带 HSP70 表达的影响.重庆医学,2002,31:394-396.
- 6 董为伟.电刺激 FN 与中枢神经源性神经保护.中国工程科学,2001,3:32-38.
- 7 Nakai M,Iadecola C,Ruggiero DA,et al. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus increases cerebral cortical blood flow without change in local metabolism: evidence for an intrinsic system in brain for primary vasodilation. Brain Res,1983,260:35-49.
- 8 Golanov EV,Zhou P. Neurogenic neuroprotection. Cell Mol Neurobiol,2003,23:651-663.
- 9 Longa EZ,Weinstein PR,Carlson S,et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke,1989,20:84-91.
- 10 罗勇,董为伟. Wistar 大鼠插线法局灶性脑缺血/再灌注模型的实验研究.重庆医科大学学报,2002,27:1-3.
- 11 王健,董为伟,何为.小脑电刺激对大鼠脑缺血早期神经元线粒体的影响.中华物理医学与康复杂志,2005,27:9-13.
- 12 Paxinos G,Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. Orlando Florida:Academic Press,1998. 66.
- 13 Smith JA. 比色法测定蛋白质含量.见:Ausubel FM,主编,颜子颖,王海林,译.精编分子生物学实验指南.北京:科学出版社,2001. 332-333.
- 14 Tracey KJ. The inflammatory reflex. Nature,2002,420:853-859.
- 15 Zhang W,Potrovita I,Tarabin V,et al. Neuronal activation of NF- κ B contributes to cell death in cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab,2005,25:30-40.
- 16 Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS, et al. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. Mol Cell Biol,1995,15:2689-2696.
- 17 Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, et al. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. EMBO J,1997,16:1413-1426.
- 18 Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. Proc Natl Acad Sci USA,1994,91:752-756.
- 19 曾锦旗,彭泽峰,潘雷.急性脑出血大鼠脑内 HSP70 与 NF- κ B 的表达.卒中与神经疾病,2001,8:131-134.
- 20 Heneka MT,Sharp A,Klockgether T,et al. The heat shock response inhibits NF- κ B activation, nitric oxide synthase type 2 expression, and macrophage/microglial activation in brain. J Cereb Blood Flow Metab,2000,20:800-811.
- 21 Wong HR,Ryan M,Wispe JR. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I κ B degradation and NF- κ B nuclear translocation. Biochem Biophys Res Commun,1997,231:257-263.

(修回日期:2006-07-15)

(本文编辑:吴倩)

《中华物理医学与康复杂志》2006 年第 10 期“继续教育园地”答题卡

姓 名 _____
性 别 _____
职 称 _____
工作单位 _____
联系电话 _____
地 址 _____
邮 编 _____

1.	A	B	C	D	E
2.	A	B	C	D	E
3.	A	B	C	D	E
4.	A	B	C	D	E
5.	A	B	C	D	E

(该答题卡复印有效)

答题卡请寄: 430030 武汉市解放大道 1095 号同济医院《中华物理医学与康复杂志》编辑部收