文章编号:1000-5404(2007)21-2067-03

论著

美满霉素对脑缺血再灌注大鼠脑组织 COX-2、NF-κB 表达的影响

蔡志友[1],余昌胤[2],晏 勇[1],张 骏[2],黄良国[2],袁胜山[2],王凤英[2] ([1]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,重庆 400016;[2]遵义医学院附属医院神经内科,遵义 563003)

提 要:目的 观察美满霉素对脑缺血再灌注大鼠 COX-2、NF-κB 表达的影响。**方法** 54 只 Wistar 大鼠,适应性喂养 1 周,分为:正常组(N 组)、假手术组(NS 组)、美满霉素对照组(M 组)、美满霉素预处理组(MP 组),美满霉素治疗组(MT 组),缺血再灌注组(IR 组)。HE 染色观察大鼠脑组织的病理改变;采用免疫组织化学法检测大鼠脑组织 COX-2、NF-κB 的表达,用图像分析仪测定光密度值。**结果** NF-κB p65 和 COX-2 光密度值、阳性细胞百分率 MP 组较 NS 组明显增高($P<0.01$),较 IR 组明显降低($P<0.01$)。MT 组较 NS 组明显增高($P<0.01$),较 IR 组明显降低($P<0.05$)。**结论** 美满霉素能抑制大鼠脑缺血再灌注后脑组织 COX-2、NF-κB 的表达,发挥脑保护作用。

关键词: 脑缺血再灌注;美满霉素;环氧合酶-2;核转录因子-κB
中图法分类号: R741.02; R743.31; R978.14 **文献标识码:** A

Minocycline inhibits COX-2 and NF-κB expressions in rats of focal cerebral ischemia-reperfusion

CAI Zhi-you[1], YU Chang-yin[2], YAN Yong[1], ZHANG Jun[2], HUANG Liang-guo[2], YUAN Sheng-shan[2], WANG Feng-ying[2] ([1]Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Objective To observe the influence of minocycline on the expressin of COX-2, NF-κB in the rats of focal cerebral ischemia-reperfusion (I/R). **Methods** Fifty-four healthy Wistar rats were randomly divided into normal group (N), sham-operation group (NS), minocycline group (M), minocycline preconditioning group (MP) in which the rats were intragastrically administered with minocycline 30 min before I/R and respectively ischemia for 12 and 24 h; minocycline treatment group (MT) in which the rats were intragastrically administered with minocycline after ischemia for 12 or 24 h and reperfusion, IR group. The expressions of COX-2 and NF-κB were measured by immunohistochemistry. The light density value was measured by image analyzer. **Results** The light density values and cell positive rates of NF-κB and COX-2 after reperfusion in MP and MT group were significantly higher than that of in NS group ($P<0.01$) and obviously less than that of in IR group ($P<0.05$). **Conclusion** Minocycline can decrease the expression of COX-2, NF-κB in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion to protect brain function.

Key words: cerebral ischemia-reperfusion; minocycline; cyclooxygenase-2; nuclear factor-kappaB

缺血性脑损伤是一个多因素、多机制、多环节的恶性级联过程,兴奋性氨基酸毒性、钙超载、自由基反应、梗死周围除极化、炎症和细胞凋亡是造成缺血性脑损伤的中心环节[1,2]。COX-2 参与了脑缺血后脑损伤的发生、发展,并与脑缺血的预后关系密切。NF-κB 是一种广泛存在于真核细胞中的重要转录因子,NF-κB 被认为是脑缺血后炎症级联反应的始动因素。美满霉素作为四环素类药物中一种有效的神经细胞保护剂,在抗炎、抑制小胶质细胞、抑制基质金属蛋白酶表达、氧化氮类产物的产生和细胞凋亡等过程中也具有作用[3-7]。本实验采用美满霉素对大鼠脑缺血再灌注进行预处理和治疗干预,通过检测大鼠脑组织 COX-2、NF-κB 表达的变化,探讨美满霉素对脑缺血再灌注大鼠神经功能的影响。

作者简介:蔡志友(1972-),男,河南省固始县人,博士研究生,主治医师,主要从事阿尔茨海默病方面的研究。电话:(023)60991145,E-mail:czy000806@163.com
通讯作者:余昌胤,电话:(0852)8608181,E-mail:yuchangyin68@163.com
收稿日期:2006-12-26;修回日期:2007-05-17

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

Wistar 大鼠 54 只(雌性,体质量 200 ~ 250 mg,第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。分为 9 组:正常组(N 组,不做任何处理),美满霉素对照组(M 组,只予以美满霉素灌胃),假手术组(NS 组,NS 组予以等容生理盐水灌胃),缺血再灌注组(IR 组,左侧颈内动脉插入线栓,建立大脑中动脉缺血再灌注模型,分为缺血 12 h 和 24 h 组),美满霉素预处理组(MP 组,在 IR 组实验前半小时予以美满霉素进行灌胃,分为缺血 12 h 和 24 h 组),美满霉素治疗组(MT 组,在 IR 组的基础上,予以美满霉素进行灌胃,分为缺血 12 h 和 24 h),每组 6 只。参照文献[8]描述的大脑中动脉线栓方法制作大鼠脑缺血再灌注模型。

1.2 主要试剂、仪器和给药方法

美满霉素胶囊(100 mg/粒):中国惠式制药有公司(批号:0501034);COX-2、NF-κB p65 检测试剂盒:福建福州迈新生物科技公司;电子天平:北京赛多利斯电子有限公司产品;光学显微镜:重庆光学仪器厂;Nikon 显微照相机:日本 Nikon 公司。

将美满霉素用生理盐水稀释成 0.5 mg/ml 浓度备用。正常组不给予任何处理;M 组除予以 50 mg/kg 美满霉素灌胃外,不作其他处理;假手术组插入 0.5 ~ 1.0 cm 线栓,予以与 M 组等量的生理盐水灌胃;IR 组行缺血和再灌注处理并予以 M 组等量的 NS 灌胃;在 IR 组的基础上,MP 组于缺血前 30 min、MT 组于缺血后 120 min 及 14 h 各给予美满霉素 50 mg/kg 灌胃。美满霉素的剂量选择参考 Stirling 等[9] 和 Yrjanheikki 等[10] 的美满霉素神经保护作用机制研究。

1.3 取材和检测方法

实验大鼠于缺血 12 h 和缺血 24 h,用 3.5% 水合氯醛麻醉,经升主动脉快速灌注生理盐水,直至右心房流出液清亮为止。然后用 4% 多聚甲醛(pH 7.4 的磷酸缓冲液配制)灌注固定,断头取脑。冠状切取视交叉后部脑组织,将大脑置于 4% 甲醛中固定备用。制成 7 μm 厚的脑组织切片黏于多聚赖氨酸处理后的切片上,进行 SABC 法染色。严格按照说明书操作进行。

采用 Miase3.0 图像分析系统,每组大鼠各取 5 张免疫组化切片,选取 5 个视野,分别分析 COX-2、NF-κB 的光密度值,取平均值作为统计参数;COX-2 和 NF-κB 测其面密度值,取平均值作为统计参数。全部数据输入计算机进行统计学处理。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件进行 t 检验。

2 结果

本实验对 COX-2 和 NF-κB 面密度值和光密度值研究显示,局灶性脑缺血 12 h 和 24 h IR 组 COX-2 和 NF-κB 明显表达。与同时点 IR 组比较,各治疗组、预处理组其光密度值均有不同程度升高,以 MT 组变化最为显著($P < 0.01$)。见表 1、表 2,图 1 - 5。

表 1 各组大鼠脑组织 COX-2、NF-κB 的表达(光密度)

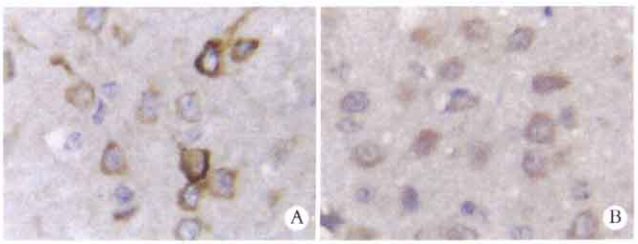
组别	COX-2		NF-κB	
	12 h	24 h	12 h	24 h
N 组	195.3 ± 5.1	197.1 ± 4.2	194.3 ± 7.2	198.8 ± 6.5
NS 组	197.7 ± 8.0	199.6 ± 4.7	196.3 ± 5.1	191.3 ± 5.1
M 组	192.6 ± 8.1	193.6 ± 3.2	193.9 ± 5.4	194.3 ± 4.3
MP 组	161.3 ± 5.0[a]	162.7 ± 7.1[a]	164.3 ± 8.3[a]	166.3 ± 9.1[a]
MT 组	150.6 ± 5.6[a]	155.3 ± 5.4[a]	151.3 ± 7. 4[a]	160.1 ± 8.6[a]
IR 组	114.3 ± 5.6	118.6 ± 5.1	111.7 ± 9.1	114.4 ± 5.7

a: $P < 0.01$,与 N、NS、M 组比较; $P < 0.05$,与 IR 组比较

表 2 各组大鼠脑组织 COX-2、NF-κB 的表达[面密度值(%)]

组别	COX-2		NF-κB	
	12 h	24 h	12 h	24 h
N 组	10.3 ± 5.1	11.1 ± 6.3	11.3 ± 8.2	12.2 ± 5.6
NS 组	11.9 ± 5.8	11.7 ± 2.1	10.6 ± 8.6	11.4 ± 5.8
M 组	10.6 ± 6.2	11.4 ± 5.5	10.3 ± 5.8	11.3 ± 7.1
MP 组	44.1 ± 5.2[a]	43.6 ± 3.7[a]	45.6 ± 7.8[a]	42.1 ± 6.3[a]
MT 组	36.3 ± 5.2[a]	34.3 ± 6.1[a]	37.3 ± 5.8[a]	32.3 ± 4.1[a]
IR 组	63.2 ± 5.2	60.8 ± 7.3	61.3 ± 5.9	60.3 ± 8.1

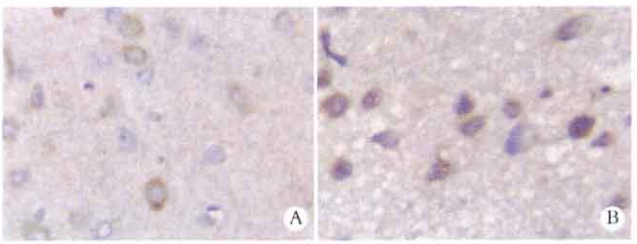
a: $P < 0.01$,与 N、NS、M 组比较; $P < 0.05$,与 IR 组比较



A: COX-2; B: NF-κB

细胞质黄染,细胞核少量黄染,COX-2 和 NF-κB 在细胞质中大量表达,在细胞核中少量表达

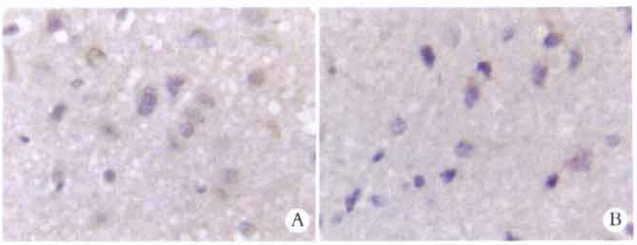
图 1 IR 组大鼠脑组织 COX-2 和 NF-κB 的表达 (SABC 法 ×400)



A: COX-2; B: NF-κB

细胞质少量黄染,细胞核无黄染,COX-2 和 NF-κB 细胞质中少量量表达,在细胞核中无表达

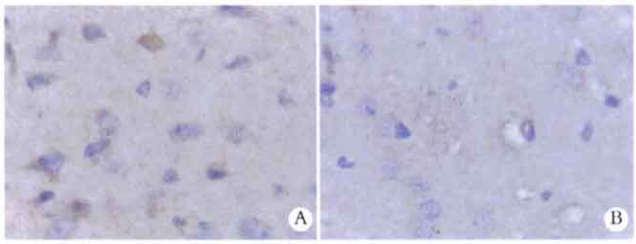
图 2 MT12 h 组大鼠脑组织 COX-2 和 NF-κB 的表达 (SABC 法 ×400)



A: COX-2; B: NF-κB

细胞质微量黄染,细胞核无黄染,COX-2 和 NF-κB 细胞质中微量表达,在细胞核中无表达

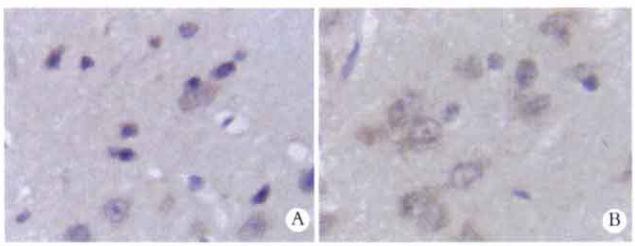
图 3 MT24 h 组大鼠脑组织 COX-2 和 NF-κB 的表达 (SABC 法 ×400)



A：COX-2；B：NF-κB

细胞质少量黄染，细胞核无黄染，COX-2 和 NF-κB 细胞质中少量量表达，在细胞核中无表达

图 4　MP12 h 组大鼠脑组织 COX-2 和 NF-κB 的表达　（SABC 法 ×400）



A：COX-2；B：NF-κB

细胞质微量黄染，细胞核无黄染，COX-2 和 NF-κB 细胞质中微量表达，在细胞核中无表达

图 5　MP24 h 组大鼠脑组织 COX-2 和 NF-κB 的表达　（SABC 法 ×400）

3　讨论

COX-2 参与了脑缺血后脑损伤的发生、发展，并与脑缺血的预后关系密切。本实验采用美满霉素对缺血再灌注大鼠预处理和缺血后的治疗均显示，IR 组大鼠脑组织中 COX-2 的表达均高于对照组；MP、MT 各组与 IR 组比较，COX-2 的表达显著降低；MP、MT 各组大鼠脑组织中 COX-2 的表达均高于对照组；本实验进一步证实了 COX-2 参与了脑缺血脑损伤的病理生理过程。美满霉素可以抑制大鼠脑组织中 COX-2 的表达水平。Lin 等[11]报道，美满霉素可以显著抑制 NO 和 PGE_2 的产生所导致的 iNOS 和 COX-2 的表达。因此我们推测，本实验中美满霉素预处理和治疗后血清 SOD 增高与其抑制脑缺血再灌注后 COX-2 表达有关。

NF-κB 被认为是脑缺血后炎症级联反应的始动因素，脑缺血再灌注损伤后其主要表达于缺血区和缺血周边区。脑缺血后应用蛋白酶阻滞剂抑制 NF-κB 的活性可以缩小梗死体积。本研究显示，脑缺血再灌注后 NF-κB 表达显著高于对照组，表明 NF-κB 参与了脑缺血损伤过程。美满霉素预处理和治疗后，与单纯脑缺血再灌注比较，NF-κB 的表达显著降低，表明美满霉素可以抑制脑缺血再灌注后 NF-κB 的表达，国外文献报道发现美满霉素能够抑制小胶质细胞 p38 细胞分裂原激活蛋白酶，从而降低 NF-κB 的表达[12]，但本实验未对美满霉素降低 NF-κB 表达的机制进行进一步的研究。

本实验研究表明 COX-2、NF-κB 参与了脑缺血再灌注损伤的病理生理过程；美满霉素能抑制脑缺血再灌注后 COX-2、NF-κB 的表达。由于本组实验观察时间点少、观察时间短，对美满霉素增高降低脑组织 COX-2 和 NF-κB 表达的机制未进行充分研究。美满霉素耐受性好，安全性高，已广泛应用于各种感染性疾病的治疗。目前美满霉素尚未用于脑缺血性疾病的治疗，但其具有脑保护作用已被大量研究证实，作为一种潜在性的脑保护剂有待进一步研究。

参考文献：

[1] Zador Z, Benyo Z, Lacza Z, *et al*. Neuroprotection in brain ischemia—doubts and hopes[J]. Ideggyogy Sz, 2004, 57(3-4): 81-93.

[2] Fagan S C, Hess D C, Machado L S, *et al*. Tactics for vascular protection after acute ischemic stroke[J]. Pharmacotherapy, 2005, 25(3): 387-395.

[3] Elewa HF, Hilali H, Hess DC, *et al*. Minocycline for short-term neuroprotection[J]. Pharmacotherapy, 2006, 26: 515-21.

[4] Cho K O, La H O, Cho Y J, *et al*. Minocycline attenuates white matter damage in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. J Neurosci Res, 2006, 83(2): 285-291.

[5] Hua R, Walz W. Minocycline treatment prevents cavitation in rats after a cortical devascularizing lesion[J]. Brain Res, 2006, 1090(1): 172-181.

[6] Hewlett K A, Corbett D. Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia[J]. Neuroscience, 2006, 141(1): 27-33.

[7] Liu Z, Fan Y, Won S J, *et al*. Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2007, 38(1): 146-152.

[8] 李建生，刘敬霞，于海滨，等. 大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉制备脑缺血模型的建立与评价[J]. 中国危重病急救医学，2006, 18(5): 272-274.

[9] Stirling D P, Khodarahmi K, Liu J, *et al*. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2004, 24(9): 2182-2190.

[10] Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, *et al*. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(26): 15769-15774.

[11] Lin S, Zhang Y, Dodel R, *et al*. Minocycline blocks nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons[J]. Neurosci Lett, 2001, 315(1-2): 61-64.

[12] Nikodemova M, Duncan I D, Watters J J. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and Ikappa-Balpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia[J]. J Neurochem, 2006, 96(2): 314-323.

（编辑　张大春）