论著

文章编号:1000-5404(2009)04-0318-04

NF-κB靶向性哑铃形"圈套"ODNs抑制大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧后TNF-α的表达

何兰英,罗 勇 (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)

摘 要:目的 设计合成靶向哑铃形寡核苷酸(oligodeoxynucleotides, ODNs)圈套,检测其对大鼠大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧(OGD/R)后TNF-α表达的抑制效应。**方法** 原代大脑皮质神经元体外培养,建立氧糖剥夺/复氧模型,以正常组、OGD4 h/R6 h组、NF-κB decoy ODNs组、无关decoy ODNs组、脂质体组为实验组,采用Western blot检测NF-κB p65蛋白表达,分别采用免疫细胞化学和逆转录-聚合酶链反应法(RT-PCR)检测TNF-α蛋白和mRNA表达。**结果** Western blot检测显示NF-κB decoy ODNs组NF-κB P65蛋白表达明显低于OGD4 h/R6 h组、脂质体组、无关decoy ODNs组($P<0.05$),与OGD4 h/R6 h组、脂质体组、无关decoy组相比NF-κB decoy ODNs组TNF-α蛋白和mRNA表达明显降低($P<0.05$);而脂质体组、无关decoy ODNs组对NF-κB P65蛋白、TNF-α蛋白和mRNA表达未见抑制($P>0.05$)。**结论** 靶向性NF-κB的哑铃形圈套ODNs可有效抑制大脑皮质神经元OGD/R后炎症因子TNF-α mRNA及蛋白的表达。

关键词: NF-κB decoy ODNs;大脑皮质神经元;氧糖剥夺/复氧;肿瘤坏死因子-α

中图法分类号: R322.81;R392.1;R743.310.2 **文献标识码:** A

Inhibitory effect of circular dumbbell decoy ODNs targeting NF-κB on TNF-α expression in cortical neurons under oxygen glucose deprivation/reoxygenation

HE Lan-ying, LUO Yong (Department of Neurology, Chongqing Key Laboratory of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effects of circular dumbbell decoy oligodeoxynucleotides targeting NF-κB on TNF-α expression in cortical neurons under the oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R). **Methods** The cultured neurons dissociated from the cortex of neonatal rats were observed on the 7th day after culture. To make the ischemia/reperfusion model *in vitro*, the neurons were exposed to OGD 4 h before cultured in normal culture media. The neurons were divided into 5 groups according to different processing methods 2 h before exposure to OGD, including normal group, OGD4 h/R6 h treated, NF-κB decoy ODNs treated, scrambled decoy ODNs treated and TransfastFast™ Transfection Reagent treated groups. The protein level of NF-κB P65 in primary neurons was detected by Western blotting. The protein and mRNA levels of TNF-α were detected by immunocytochemical method and RT-PCR, respectively. **Results** NF-κB decoy ODNs could effectively inhibit the expression levels of NF-κB P65 protein, TNF-α mRNA and protein in neurons ($P<0.05$), compared with other groups. **Conclusion** Circular dumbbell decoy ODNs targeting NF-κB could effectively inhibit the expressions of TNF-α mRNA and protein in neurons through restraining NF-κB activity.

Key words: NF-κB decoy ODNs; cortical neurons; oxygen glucose deprivation/reoxygenation; TNF-α

急性炎症反应在脑缺血再灌注所引发的继发性脑损伤中起着重要的作用。核因子κB(nuclear factor-kappaB)与炎症反应密切相关,多种炎症介质基因的启动子和增强子中含有κB位点,如细胞粘附分子1(ICAM-1)、白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF-α)等,脑缺血再灌注后可引起NF-κB的活化,后者可调控上述介质基因的表达[1]。已经证实,在不同类型的组织细胞内NF-κB的活化规律及作用不同,而既往的研究主要着眼于脑缺血再灌注后,NF-κB在整个脑组织和脑微血管内皮细胞中的活化规律及作用,对其在

基金项目:重庆市卫生局项目([2003]61号,03-2-179)
Supported by the Chongqing Bureau of Public Health (03-2-179)

作者简介:何兰英,女,四川省成都市人,博士研究生,医师,主要从事缺血性脑血管病损伤及保护机制方面的研究。E-mail: helanying2007@yahoo.com.cn

通信作者:罗 勇,E-mail: luoyong1998@163.com

收稿日期:2008-06-11;修回日期:2008-07-08

神经元中存在怎样的活化规律及其对下游炎症因子的影响了解甚少。因此,我们采用原代培养的大鼠大脑皮质神经元经氧糖剥夺/复氧模拟在体脑缺血再灌注进行研究,探讨 NF-κB 在神经元中的表达规律,并通过合成的 NF-κB“decoy”圈套竞争抑制活化的NF-κB与启动子区域的结合位点结合,观察其对炎症因子表达的影响,以期为临床在恰当的时间窗内针对NF-κB进行神经保护治疗奠定基础并提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　原代大脑皮质神经元培养

参考文献[2]的方法,并做适当改进。无菌条件下取新生 24 h 内 Wistar 大鼠,分别用碘酒和 75% 的酒精消毒全身,用手捏住其颈部依次剥离其头皮颅骨,暴露脑组织,用眼科镊取出放入盛有预冷的 D-Hanks 液中,仔细分离大脑皮质,去除脑膜,用 D-Hanks 液洗涤 3 次,在筛网上通过巴氏管一边轻轻充分吹打脑组织至糜状后,用 D-Hanks 液将单细胞洗入无菌的玻璃培养皿中,直至得到单细胞悬液为止,筛网过滤 1 次除去组织块,悬液离心 800 r/min、6 min,弃上清。用完全培养基重新悬浮细胞,调整细胞数 2.5×10^6 ml^{-1},接种于用多聚赖氨酸处理过的培养板中。置 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养 24 h 后全量换液,48 h 后加入终浓度为 5 mg/L 的阿糖包苷抑制胶质细胞生长,第 4 天半量换液,以后每 2 天半量换液。培养 7 d 后进行实验。

1.2　离体神经元氧糖剥夺/复氧模型的建立

将培养 7 d 的大脑皮质神经元,用预热的无糖 D-Hanks 液替换原来培养基 3 次,使无糖组葡萄糖的终浓度小于 1 mmol/L,利用家用加厚型保鲜袋(18 cm×25 cm)在其底部剪一小孔接输液器作为出气管,在输液器加液处连接一医用肝素帽,备多次抽气检测用,放入无菌的湿润纱布,将培养板放入保险袋中,通入 95% N_2、5% CO_2 的混合气体,洗涤保险袋 3 次以赶走袋内空气,迅速扎紧袋口和小孔,置入恒温 37 ℃孵箱中,4 h 后取出将 D-Hanks 液换成完全培养基,置 37 ℃、5% CO_2 孵箱中继续培养。

1.3　实验分组

将 Wistar 大鼠大脑皮质神经元分为:①正常组:正常培养的原代大脑皮质神经元,不加任何刺激因素;②OGD 4 h/R 6 h 组:给予培养的原代大脑皮质神经元 OGD 4 h/R 6 h;③NF-κB“decoy”ODNs 组:在氧糖剥夺前 2 h 转染靶向的 NF-κB“decoy”ODNs,然后进行 OGD 4 h/R 6 h;④无关“decoy”ODNs 组:在氧糖剥夺前 2 h 转染无关“decoy”ODNs,然后进行 OGD 4 h/R 6 h;⑤脂质体组:在氧糖剥夺前 2 h 加入与圈套组相同体积的脂质体,再给予 OGD 4 h/R 6 h;每一样本设 10 个复孔。

1.4　NF-κB 圈套的设计、合成

参照文献[3]设计合成哑铃形 NF-κB“decoy”ODNs 含有 44 个碱基,包含有 1 个拷贝的 NF-κB 特异结合序列;设计相同结构及碱基数相等的无关序列作为对照。经 GenBank 检索,未查到与其他基因有高度同源性。由上海英骏生物技术公司合成并纯化。序列如下:



1.5　脂质体-寡核苷酸的制备

将快速转染脂质体(TransfastFast™ Transfection Reagent, Promega 公司 美国)与寡核苷酸(质量比为 2∶1;按脂质体 4.6 μl,寡核苷酸 0.75 μg)分别溶解在加入 200 μl 不含双抗和血清的 DMEM/F12 培养基中,将两者混匀,于室温中放置 10 ~ 15 min 待用。

1.6　Western blot 检测 NF-κB P65 蛋白表达

弃培养液,用预冷的 PBS 清洗 2 次,每孔加入 100 μl 细胞裂解液,冰面上裂解 30 min,14 000×g,4 ℃离心 10 min,取上清,Bradford 法进行蛋白定量。以 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,半干电转移法转移至 PVDF 膜,室温下用封闭液封闭 1 h后分别加入一抗单克隆兔抗鼠 P65、β-actin 内参抗体,以 1∶500 稀释,4 ℃孵育过夜,分别用相应的抗鼠二抗(1∶750 稀释)室温孵育 2 h,化学发光法显色并用凝胶图像处理系统定量扫描灰度值,将与 β-actin 比值作为其表达水平的参数。

1.7　免疫细胞化学测定 TNF-α 蛋白水平

按照免疫细胞化学说明书操作进行测定各组 TNF-α 蛋白水平,以 PBS 代替一抗作为对照。结果判定:排除边缘细胞,10×10 低倍镜下选取 10 个细胞分布均匀的视野,10×20 低倍镜下随机计数 50 个细胞/视野。按照着色强弱分为 4 个等级:无色 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分,按公式 HSCORE = $\sum$pi(i + 1)(i = 0,1,2,3;pi 表示评分为 i 的比例)计算 HSCORE 得分。该评分方法考虑到了单个细胞是否为阳性及其强弱,能够更具体地反应细胞蛋白表达情况。

1.8　RT-PCR 测定 TNF-α mRNA 表达

各组大脑皮质神经元总 RNA 的提取按照上海华舜生物工程有限公司的提取试剂盒说明进行,TNF-α mRNA 表达水平的测定参照大连宝生物 RT-PCR 试剂盒说明进行,引物设计如下:β-actin(684 bp):上游 5′-GACCCAGATCATGTTTGAGAC-3′,下游 5′-GCCAGGATAGAGCCACCAAT-3′; TNF-α(251 bp):上游 5′-GTCAGCCGATTTGCCATTTCAT-3′, 下游 5′-ACACGCCAGTCGCTTCACAGAG-3′。

各实验组 RT-PCR 产物电泳影像进行积分光密度量化。通过凝胶扫描仪进行 DNA 电泳条带积分光密度值分析,将与 β-actin 的比值作为其表达水平的参数,对 TNF-α mRNA 产物进行相对定量分析。

1.9　统计学处理

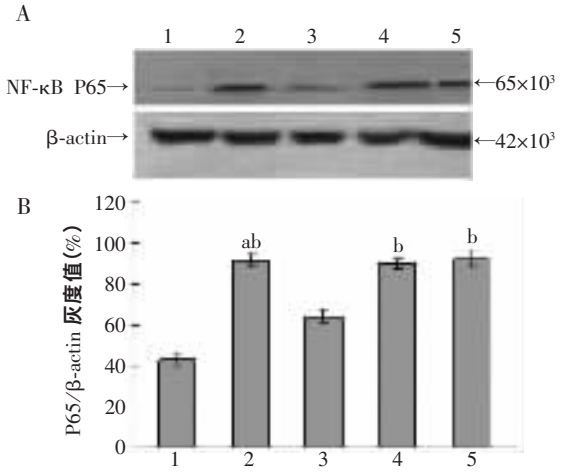
计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 统计软件进行多组均数间的 t 检验。

2　结果

2.1　Western blot 检测 NF-κB P65 蛋白表达

氧糖剥夺/复氧可诱导大脑皮质神经元 NF-κB P65 蛋白表

达增加，Western blot 结果显示 OGD 4 h/R 6 h 组 NF-κB P65 蛋白表达升高较正常组比较有意义（$P<0.01$），转染 NF-κB“decoy”ODNs 后 NF-κB P65 蛋白表达与 OGD 4 h/R 6 h 组、无关“decoy”ODNs 组、脂质体组相比显著减少（$P<0.05$）（图 1）；而无关“decoy”ODNs 组、脂质体组与 OGD 4 h/R 6 h 组比较，表达未见明显改变（$P>0.05$）。



A：Western blot 检测结果；B：定量分析结果；1：正常组；2：OGD 4 h/R 6 h 组；3：NF-κB “decoy” ODNs 组；4：无关“decoy” ODNs 组；5：脂质体组；a：$P<0.01$，与正常组比较；b：$P<0.05$，与 NF-κB “decoy”ODNs 转染组比较

图 1 各组大脑皮质神经元 NF-κB P65 蛋白表达

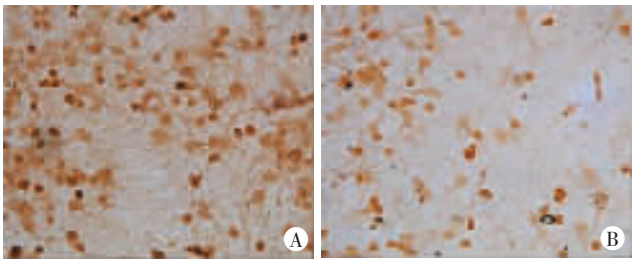
2.2 免疫细胞化学测定 TNF-α 蛋白水平

正常情况下大脑皮质神经元仅有少量的 TNF-α 蛋白表达，在本实验中，我们采用免疫细胞化学评价各组大脑皮质神经元 TNF-α 蛋白表达，与正常相比 OGD 4 h/R 6 h 组 TNF-α 蛋白表达升高（$P<0.01$）；转染 NF-κB“decoy”ODNs 后与 OGD 4 h/R 6 h 组、无关“decoy”ODNs 组、脂质体组相比 TNF-α 蛋白表达显著减少（$P<0.05$）（表 1、图 2）；而无关“decoy”ODNs 组、脂质体组与 OGD 4 h/R 6 h 组比较，TNF-α 蛋白表达未见明显改变（$P>0.05$）。

表 1 NF-κB decoy ODNs 对原代大脑皮质神经元 OGD 4 h/R 6 h TNF-α 蛋白表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	HSCORE 评分
正常组	10	0.96 ± 0.05
OGD4 h/R6 h 组	10	3.07 ± 0.04[ab]
NF-κB “decoy”ODNs 组	10	1.89 ± 0.04b
无关“decoy”ODNs 组	10	3.01 ± 0.09[b]
脂质体组	10	3.02 ± 0.05[b]

a：$P<0.01$，与正常组比较；b：$P<0.05$，与 NF-κB “decoy”ODNs 组比较

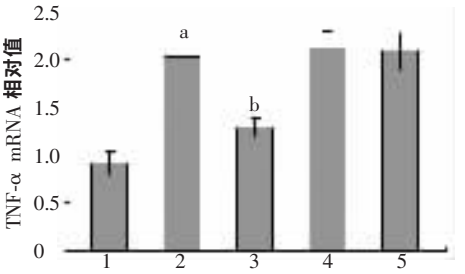


A：OGD 4 h/R 6 h 组；B：NF-κB “decoy”ODNs 组

图 2 大脑皮质神经元 TNF-α 蛋白表达 （×200）

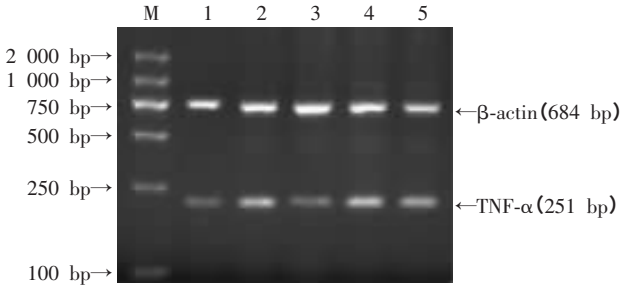
2.3 RT-PCR 方法测定 TNF-α mRNA 的表达水平

用 RT-PCR 方法测定各组大脑皮质神经元 TNF-α mRNA 表达，OGD 4 h/R 6 h 后 TNF-α mRNA 表达较正常组显著升高（$P<0.01$），经转染圈套 NF-κB“decoy” ODNs 后 TNF-α mRNA 表达较 OGD 4 h/R 6 h 组、无关“decoy”ODNs 组、脂质体组相比显著减少（$P<0.05$），而无关“decoy”ODNs 组、脂质体组与 OGD 4 h/R 6 h 组比较，TNF-α mRNA 表达未见明显改变（$P>0.05$），见图 3、4。



1：正常组；2：OGD4 h/R6 h；3：NF-κB “decoy” ODNs 组；4：无关“decoy” ODNs 组；5：脂质体组；a：$P<0.01$，与正常组比较；b：$P<0.05$，与 NF-κB “decoy” ODNs 组比较

图 3 NF-κB “decoy” ODNs 对大脑皮质神经元 OGD 4 h/R 6 h 后 TNF-α mRNA 表达的抑制作用



M：DNA 标准（DL 2000）；1：正常组；2：OGD4 h/R6 h；3：NF-κB “decoy”ODNs 组；4：无关“decoy” ODNs 组；5：脂质体组

图 4 RT-PCR 显示 NF-κB “decoy” ODNs 转染前后 TNF-α mRNA 表达的变化

3 讨论

随着脑缺血病理生理机制研究的进展，目前认为脑缺血再灌注后的炎症级联反应是脑缺血再灌注损伤的重要机制之一。脑缺血再灌注后 NF-κB 被大量激活，激活的 NF-κB 移位入细胞核，转录调节多种细胞因子和炎症介质，被认为是炎症级联反应的中心靶点[3]，故对 NF-κB 转录活性的研究成为脑缺血再灌注损伤研究的热点。

在静息状态下，NF-κB 在细胞质内以无活性的形式存在，与 NF-κB 抑制分子（inhibitory κBα，IκBα）非共价结合成三聚体复合物，使其无法进入细胞核内发挥作用。脑缺血再灌注后可诱导 IκBα 磷酸化，泛素化，最终 IκBα 降解，释放游离的 NF-κB，后者向细胞核内移位，调节许多下游靶基因的转录，参与一系列基因

的表达和调控(如 TNF-α, IL-1a)。这些被诱导的基因产物可进一步参与炎症和免疫反应,在机体生理和病理条件下发挥重要的功能[4]。针对上述 NF-κB 的激活途径,国内外提出一系列以拮抗 NF-κB 活化的治疗策略如:阻断 NF-κB 与 DNA 的结合、阻断 IκB 蛋白裂解、阻断 IκB 的磷酸化过程、上调 IκB 的表达量、抗氧化物质抑制 NF-κB 活化、阻止 NF-κB 向核内迁移等,但都由于某些副作用而受到限制,要获得最佳的治疗效果并尽可能减少毒性,NF-κB 靶向性治疗的特异性非常重要。

NF-κB 能特异性识别并结合目的基因上的 κB 序列,合成包含 κB 序列的双链 ODNs,并转入靶细胞核,竞争性结合细胞核内激活的 NF-κB,阻断其促炎症反应活性,这一策略被称为 decoy[5]。NF-κB “decoy” ODNs 已经在心血管疾病、炎症性疾病、器官移植和肿瘤等治疗研究中取得了满意结果[6-8]。但是,由于一般的寡核苷酸 ODNs 在体内滞留时间短,易被细胞内外核酸酶降解,进入核内的量较少,故成本较高,且对细胞毒性大。而本实验采用的哑铃形圈套 ODNs 既保持了其合成简单、低毒、高效、特异性强的优点,同时又具有较强的抗核酸酶的特性[9],而且较 NF-κB 的其他抑制物如抗氧化剂、蛋白酶抑制剂具有高度的特异性和可控性等优点引起广泛关注。

研究证实 TNF-α 在脑损伤后高度表达,并与脑损伤严重程度密切相关[10]。TNF-α 的分泌可引起其他因子如 IL-6 等的释放,而这些因子在炎症启动,维持和消退中都起着重要作用[11],因此,TNF-α 是炎症反应的重要介质。本研究表明,正常情况下大脑皮质神经元 NF-κB 活性处于低水平状态;氧糖剥夺/复氧后,神经元内 NF-κB 活性显著增强。提示 NF-κB 活化参与脑缺血再灌注后大脑皮质神经元继发性损伤过程。TNF-α 在脑组织中高表达具有神经毒性,可加速神经细胞的死亡[12]。另一方面,TNF-α 也是 NF-κB 活化的重要刺激物之一,可促进 NF-κB 的激活,最终引发过度的组织炎症反应和损伤[13]。本研究表明,氧糖剥夺/复氧后神经元内 TNF-α 水平高度表达,神经元中 TNF-α mRNA 及蛋白含量明显增加。转染 NF-κB “decoy”ODNs 后,抑制了 NF-κB 活化,神经元内 NF-κB 活性减低,同时 TNF-α mRNA 及蛋白表达也明显减低,而对照的无关序列 ODNs[虽然碱基相同,但不含有与 NF-κB 亚单位 P50(GGGAC)和 P65(TTCC)结合的位点]以及转染介质——脂质体都无此作用,说明NF-κB 活化与 TNF-α 表达有密切关系,由于 NF-κB 活化,使 NF-κB 编码的 TNF-α 等许多促炎细胞因子表达增加,对神经细胞产生毒性作用,导致神经元的损伤。

NF-κB “decoy” ODNs 能特异性竞争结合细胞内活化的 NF-κB 结合位点,阻断其活性,使炎症因子表达降低,同时克服了传统抗炎药物(如皮质内固醇等)所具有的缺点,如缺乏特异性,对机体有一定的毒、副作用。因此,NF-κB “decoy” ODNs 为脑缺血再灌注的治疗提供了新思路,可能成为一种新型的基因治疗方案。

参考文献:

[1] Yi J H, Park S W, Kapadia R, *et al*. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage[J]. Neurochem Int, 2007, 50(7-8): 1014-1027.

[2] Gong Q H, Wang Q, Shi J S, *et al*. Inhibition of caspases and intracellular free Ca^{2+} concentrations are involved in resveratrol protection against apoptosis in rat primary neuron cultures[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(11): 1724-1730.

[3] Fabian R H, Perez-Polo J R, Kent T A. A decoy oligonucleotide inhibiting nuclear factor-kappaB binding to the IgG kappaB consensus site reduces cerebral injury and apoptosis in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. J Neurosci Res, 2007, 85(7): 1420-1426.

[4] Williams A J, Dave J R, Tortella F C. Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: relation to nuclear factor kappaB (NF-kappaB), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration[J]. Neurochem Int, 2006, 49(2): 106-112.

[5] Isomura I, Morita A. Regulation of NF-kappaB signaling by decoy oligodeoxynucleotides[J]. Microbiol Immunol, 2006, 50(8): 559-563.

[6] Nakashima H, Aoki M, Miyake T, *et al*. Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in the rat by use of decoy oligodeoxynucleotides suppressing activity of nuclear factor kappaB and ets transcription factors[J]. Circulation, 2004, 109(1): 132-138.

[7] Tang C H, Tan T W, Fu W M, *et al*. Involvement of matrix metalloproteinase-9 in stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway of lung cancer metastasis[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(1): 35-43.

[8] Fisher L, Samuelsson M, Jiang Y, *et al*. Targeting cytokine expression in glial cells by cellular delivery of an NF-kappaB decoy[J]. J Mol Neurosci, 2007, 31(3): 209-219.

[9] Lee I K, Ahn J D, Kim H S, *et al*. Advantages of the circular dumbbell decoy in gene therapy and studies of gene regulation[J]. Curr Drug Targets, 2003, 4(8): 619-623.

[10] Xing B, Chen H, Zhang M, *et al*. Ischemic post-conditioning protects brain and reduces inflammation in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion[J]. J Neurochem, 2008, 105(5): 1737-1745.

[11] Cojocaru I M, Musuroi C, Iacob S, *et al*. Investigation of TNF-alpha, IL-6, IL-8 and of procalcitonin in patients with neurologic complications in sepsis[J]. Rom J Intern Med, 2003, 41(1): 83-93.

[12] Kaushal V, Schlichter L C. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra[J]. J Neurosci, 2008, 28(9): 2221-2230.

[13] Stephenson D, Yin T, Smalstig E B, *et al*. Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(3): 592-603.

(编辑　汪勤俭)