文章编号:1000-5404(2014)12-1303-04

论著

慢性间断性缺氧对大鼠脑缺血再灌注 NF-κB 及其靶基因 TNF-α 表达的影响

杨美丽[1],黄银辉[2],姚 力[3],曾奕明[4],卓识途[1],李明媚[5],许盈盈[1],张碧月[1],蔡若蔚[1] (362000 福建 泉州,福建医科大学附属第二医院:神经内科[1],呼吸内科[4];362200 福建 晋江,福建省晋江市医院神经内科[2]; 710061 西安,西电集团医院神经内科[3];362400 福建 安溪,安溪县铭选医院神经内科[5])

[摘要] **目的** 观察大鼠脑皮质炎症因子[核转录因子 κB (NF-κB p65)]及其靶基因 TNF-α 的表达,探讨慢性间断缺氧对脑缺血再灌注后炎症反应影响。**方法** 将 SD 大鼠 24 只按随机数字表法分为空白对照组、慢性间断缺氧组、线栓组、慢性间断缺氧+线栓组,每组 6 只。建立 SD 大鼠慢性间断缺氧联合局灶性脑缺血再灌注模型,免疫组化染色检测脑皮质中 NF-κB p65、TNF-α 的表达。**结果** 与空白对照组比较,CIH、CIR、CIH+CIR 均可促使 NF-κB p65 及 TNF-α 的表达增多,差异存在统计学意义($P<0.05$);CIH 与 CIR 存在交互作用($P<0.05$),CIH+CIR 与 CIH 及 CIR 比较可促使 NF-κB p65 及 TNF-α 表达明显增多,差异存在统计学意义($P<0.05$)。大鼠脑皮质 NF-κB p65 与 TNF-α 呈正相关($r=0.90$,$P<0.01$)。**结论** 慢性间断性缺氧可使大鼠脑缺血再灌注 NF-κB p65 及其靶基因 TNF-α 的表达显著增多。

[关键词] 慢性间断性缺氧;缺血再灌注;核转录因子-κB;肿瘤坏死因子-α
[中图法分类号] R364.4;R392.13;R743.31 [文献标志码] A

Effect of chronic intermittent hypoxia on NF-κB and TNF-α expression in cortex of rat after cerebral ischemia reperfusion injury

Yang Meili[1], Huang Yinhui[2], Yao Li[3], Zeng Yiming[4], Zuo Shitu[1], Li Mingmei[5], Xu Yingying[1], Zhang Biyue[1], Cai Ruowei[1] ([1]Department of Neurology, [4]Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian Province, 362000; [2]Department of Neurology, Jinjiang Hospital, Jinjiang, Fujian Province, 362000; [3]Department of Neurology, XD Group Hospital, Xi'an, Shaanxi Province, 710061; [5]Department of Neurology, Mingxuan Hospital of Anxi County, Anxi, Fujian Province, 362000, China)

[**Abstract**] Objective To study the roles of chronic intermittent hypoxia (CIH) in the expression of inflammatory cytokines, nuclear factor-κB (NF-κB) p56 and tumor necrosis factor-α (TNF-α), in the brain cortices of rats with cerebral ischemia reperfusion (CIR) injury. Methods In this experiment, 36 Sprague-Dewley rats were randomly divided into 4 groups, a control group, a CIH group, a CIR group, and a CIH+CIR group. The rat model of CIH was made, and then the rats were exposed to CIR injury. The effusion of polymorphonuclear leucocytes in the brain tissue was detected by HE staining. The expression of NF-κB p65 and TNF-α in the brain cortex was detected by immunohistochemistry assay. Results The expression of NF-κB p65 and TNF-α in the cortices of rats was significantly higher in the CIH group, the CIR group and the CIH+CIR group than in the control group ($P<0.05$). Moreover, there was an interactive activity between CIH and CIR ($P<0.05$). The expression of NF-κB p65 and TNF-α in the cortices of rats was significantly higher in the CIH+CIR group than in the CIH group and the CIR group ($P<0.05$). The expression of NF-κB p65 was positively correlated with the expression of TNF-α ($r=0.90$, $P<0.01$). Conclusion CIH increases the expression of NF-κB p65 and TNF-α in the cortices of rats with CIR injury.

[**Key words**] chronic intermittent hypoxia; ischemia reperfusion; NF-κB p65; tumor necrosis factor-α

Corresponding author: Cai Ruowei, E-mail: rwcai@163.com

[通信作者] 蔡若蔚,E-mail:rwcai@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140126.0818.003.html(2014-01-26)

近年来流行病学研究认为睡眠呼吸暂停综合征(sleep apnea syndrome,SAS)是脑血管病的独立危险因素,并发现SAS影响脑梗死的预后[1]。睡眠呼吸暂停诱发并加重脑血管病的可能机制为睡眠呼吸暂停的慢性间断性缺氧机制激活炎症级联反应。在脑缺血再灌注动物模型中以及脑梗死临床观察中证实:炎症反应在脑缺血再灌注损伤中也具有重要的作用[2]。NF-κB作为一个重要转录因子,参与多数促炎症因子的转录和表达,如IL-1、IL-2、IL-12、TNF-α、血管内皮细胞黏附分子(vascular endothelial cell adhesion molecule,VCAM)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)、干扰素等[3]。TNF-α可促进炎症因子的释放引起炎症反应,进而促进微血管内血栓形成[4]。我们通过建立慢性间断缺氧(chronic intermittent hypoxia,CIH)联合大脑中动脉缺血再灌注(cerebral ischemia reperfusion,CIR)动物模型,观察其对大鼠脑皮质核转录因子κB(NF-κB p65)及其靶基因TNF-α表达的影响,旨在为进一步探讨慢性间断缺氧对脑缺血再灌注后炎症反应影响奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂 间断低氧舱(本实验室设计):由有机玻璃箱及控制系统;压缩氧气、压缩氮气,氧气检测报警仪;大鼠线栓手术器械、直径0.235 mm尼龙线,PBS缓冲液;兔抗鼠NF-κB p65的多克隆抗体、兔抗鼠TNF-α的多克隆抗体(美国Santa Cruz公司);MaxVision™一步法免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂(均由福州迈新生物技术开发公司生产);高清晰彩色病理图文分析系统。

1.1.2 动物 24只雄性12周龄SD大鼠,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,体质量180~220g,清洁级。SD大鼠按随机数字表法分为空白对照组、慢性间断缺氧组(CIH组)、线栓组(CIR组)、慢性间断缺氧+线栓组(CIH+CIR组),每组6只。

1.2 研究方法

1.2.1 大鼠进行慢性间断性缺氧2个月 本实验室间断低氧舱是根据参照文献[5]来设计的(具体组成如下:控制程序、显示器、氧气检测仪、氧气氮气瓶、排气装置等),通过控制程序及设定各种气体的吹入流量和时间,调控箱内氧浓度。将CIH组、CIH+CIR组两组大鼠置于间断缺氧舱中,每一循环按氮气120 s、静息30 s、氧气60 s、空气30 s的顺序吹入气体,每一循环时间为4 min,每日从早上8:00至下午4:00间断缺氧8 h,CIH组、CIH+CIR组大鼠置于间断缺氧舱中经历间断缺氧,下午4:00后将大鼠置于大气环境中,连续2个月。空白对照组、CIR组大鼠在相同环境的条件下饲养,但不给予间断缺氧。

1.2.2 脑缺血再灌注损伤模型的建立 参照Longa等[6]的方法,用石蜡包被尼龙线头端做栓线,建立大脑中动脉栓塞模型,对CIH+CIR组大鼠在慢性间断缺氧2个月后亦进行大脑中动脉栓塞,并都于大脑中动脉缺血2 h后,将栓线拉出制造再灌注模型,于术后24 h断头取脑。空白对照组、CIH组大鼠未给予缺血再灌注干预。模型成功标准[7]:同侧horner征;提尾时出现对侧前肢内收屈曲;爬行时向对侧转圈或向对侧倾倒;入选的大鼠在断头取脑后发现有蛛网膜下腔出血的予以剔除。

1.2.3 免疫组化染色 慢性间断缺氧2个月对4组大鼠统一处理,灌注后断头取脑,用MaxVision™一步法免疫检测NF-κB p65、TNF-α的表达情况。在同一强度的镜下随机选取右侧额顶部皮质5个不重叠的400倍视野进行摄片,用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件测量阳性区域的累积光密度(IOD),反映相应蛋白的表达总量,其染色阳性程度越高,IOD值越高,并将所测得值的均值分别作为NF-κB p65、TNF-α的含量,取其均数作统计学分析。采用随机盲法下读片,并由特定的病理科专业人员复核并确认。

1.3 统计学方法

应用SPSS 17.0统计软件,采用完全随机分组两因素两水平析因设计,并对各因素的主效应及交互作用行方差分析,Pearson相关分析NF-κB p65与TNF-α的关系,采用双侧检验。

2 结果

2.1 免疫组化染色检测脑皮质中NF-κB p65的表达

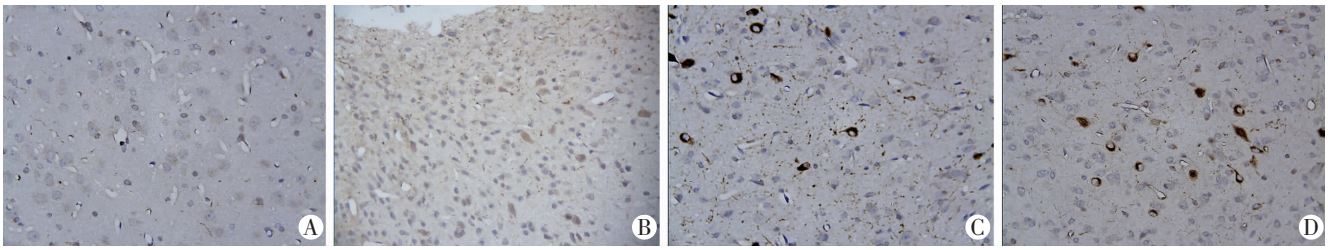
染色结果显示,NF-κB p65主要表达在神经元,较少表达在小胶质细胞和星形胶质细胞。空白对照组在额顶部有NF-κB p65少量表达,NF-κB p65主要在细胞质表达;CIH组额顶部有NF-κB p65阳性细胞表达,细胞质和细胞核呈棕黄色;而CIR组在缺血半暗带区及额顶部皮质有NF-κB p65的阳性细胞表达;CIH+CIR组NF-κB p65的阳性细胞表达增加,细胞核中沉积较多棕褐色物质(图1)。

定量分析结果显示,与空白对照组比较,CIH组、CIR组、CIH+CIR组NF-κB p65 IOD值显著增加($P<0.05$);CIH+CIR组相对于CIH组、CIR组IOD值增加更显著($P<0.05$,表1)。

表1 各组大鼠NF-κB p65和TNF-α的IOD值比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

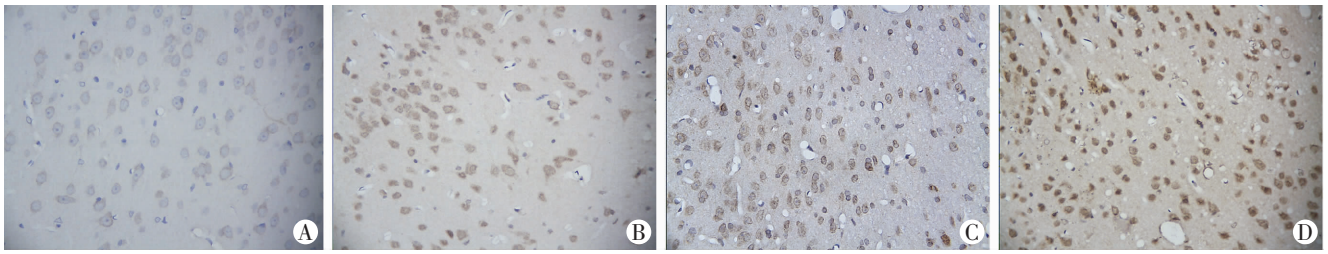
组别	NF-κB p65	TNF-α
空白对照组	1 068.9±134.9	3 804.7±330.2
CIH组	8 826.2±863.1[a]	6 520.0±747.9[a]
CIR组	17 181.4±3 208.3[a]	11 394.7±1 308.3[a]
CIH+CIR组	32 525.5±6 822.8[ab]	16 270.7±1 646.7[ab]
F	5.99	5.50
P	<0.05	<0.05

a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与CIH、CIR组比较



A:空白对照组;B:CIH 组;C:CIR 组;D:CIH + CIR 组

图 1　免疫组化染色检测各组大鼠脑皮质中 NF-κB p65 的表达　(一步法　×400)



A:空白对照组;B:CIH 组;C:CIR 组;D:CIH + CIR 组

图 2　免疫组化染色检测各组大鼠脑皮质中 TNF-α 的表达　(一步法　×400)

2.2　免疫组化染色检测脑皮质中 TNF-α 的表达

空白对照组主要在神经元和微血管内皮细胞有 TNF-α 的弱阳性表达;CIH 组 TNF-α 阳性细胞表达增多;CIR 组 TNF-α 阳性表达进一步增强;而 CIH + CIR 组 TNF-α 的阳性细胞呈强阳性表达(图 2)。

定量分析结果显示,与空白对照组比较,CIH 组、CIR 组、CIH + CIR 组 TNF-αIOD 值显著增加($P < 0.05$);CIH + CIR 组相对于 CIH 组、CIR 组 IOD 值增加更显著($P < 0.05$,表 1)。

2.3　NF-κB p65 蛋白与 TNF-α 蛋白的相关性分析

NF-κB p65 蛋白表达水平与 TNF-α 蛋白表达水平呈正相关($r = 0.90$,$P < 0.01$)。

3　讨论

SAS 是指夜间睡眠 7 h 内,口或鼻腔气流持续停止 10 s 以上,并超过 30 次或睡眠呼吸暂停低通气指数≥5 次/h,可导致以脑部损害为主的多器官损害[8]。文献[9]证实 SAS 患者更易发生脑血管疾病。据推测炎症反应在睡眠呼吸暂停诱发并加重脑血管病具有重要的作用。本实验以慢性间断缺氧,联合大脑中动脉缺血再灌注进行主要干预,通过观察干预后大鼠脑皮质核转录因子 κB、TNF-α 表达,并进行分析。

近年来还没有统一的 CIH 动物模型。本研究参考了陈晓阳等[5]实验方法成功制作了大鼠 CIH 模型。Koizumi 等[10]首次报道了用线栓法建立大鼠大脑中动脉闭塞模型,其经改进后被广泛用于脑缺血实验研究已成为目前最经典的局灶性脑缺血再灌注模型,为国内外广泛采用[11-12]。本实验建立了模拟人类的睡眠呼吸暂停模式的慢性间断缺氧模型,并把 CIH 动物模型和线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型结合起来。

有研究表明,SAS 患者白细胞及红细胞易出现聚集,造成脑微循环障碍,存在增高的炎性因子水平[13-15],提示 SAS 患者存在系统性炎症。我们前期研究结果显示,CIH 组大鼠脑 HE 染色可见脑细胞肿胀,间质水肿,有多形核细胞浸润,脑小血管内皮细胞肿胀,血管壁增厚,也从形态学角度上提示了模拟了人类睡眠呼吸暂停模式的慢性间断缺氧可造成炎症损害[16]。

脑缺血再灌注过程中炎性细胞聚集增加,浸润的炎性细胞产生大量的炎性介质,提示炎性反应是脑缺血再灌注损伤的机制并与级联炎症免疫反应有关[17-18]。

有研究表明,介导及加剧脑缺血再灌注损伤炎性级联反应的中心环节是 NF-κB 活化[19],此观点已被多数学者所接受。有研究者将成年大鼠大脑中动脉闭塞 2 h,再分别再灌注,采用免疫组化和电泳迁移阻滞分析都检测到 NF-κB 活化[20]。Nurmi 等[21]检测脑梗死患者 NF-κB 的免疫反应性,发现脑梗死 1 ~ 2 d 后,NF-κB 亦被激活,从细胞质移位到胞核。本研究表明,在正常脑组织中 NF-κB p65 有低表达;CIR 组较空白对照组 NF-κB p65 表达明显增多,说明缺血再灌注损伤可

诱发 NF-κB 的活化。本研究 CIH 组、CIH + CIR 组 NF-κB p65 的阳性表达明显增加,核移位明显,说明慢性间断缺氧可促进大鼠脑皮层 NF-κB p65 的进一步激活。

TNF-α 在中枢神经系统中具有神经毒性作用,其表达增加可激活多形核白细胞[4]。本研究表明,正常情况下脑内即有少量 TNF-α 的表达,在空白对照组皮层、海马区等部位有少量 TNF-α 的表达,呈弱阳性表达,可能与脑神经细胞的正常维护有关,这可能与脑神经细胞的正常维护有关。而本实验 CIR 组 TNF-α 蛋白表达增强,提示 TNF-α 异常表达参与了脑缺血再灌注损伤,慢性间断缺氧与缺血再灌注在脑皮质 TNF-α 的蛋白表达存在交互作用,预示着更高水平炎症反应,这一结果提示 CIH 可能通过促进 TNF-α 表达参与了 SAS 脑血管损害的发病机制。

本研究结果还显示,NF-κB p65 蛋白表达水平与 TNF-α 蛋白表达间呈正相关,也提示 CIH 可能通过 NF-κB 的激活促使 TNF-α 表达增加参与了脑血管病的发病机制。

综上所述,NF-κB、TNF-α 参与 CIH 的炎症反应,也参与脑缺血再灌注的炎症反应,且二者具有明显相关性,NF-κB 的活化并增加靶基因 TNF-α 的表达,可能是睡眠呼吸暂停加重脑缺血再灌注损伤的机制。

参考文献:

[1] Sahlin C, Sandberg O, Gustafson Y, *et al*. Obstructive sleep apnea is a risk factor for death in patients with stroke[J]. Arch Intern Med, 2008, 168(3): 297-301.

[2] Ritter L S, Orozco J A, Coull B M, *et al*. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke[J]. Stroke, 2000, 31(5): 1153-1161.

[3] Silswal N, Singh A K, Aruna B, *et al*. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4): 1092-1101.

[4] Barone F C, Arvin B, White R F, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury[J]. Stroke, 1997, 28(6): 1233-1244.

[5] 陈晓阳, 曾奕明, 黄子扬, 等. 慢性间断缺氧小鼠缺氧诱导因子1α的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(2): 93-96.

[6] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[7] Danton G H, Dietrich W D. Inflammatory mechanism after ischemia and stroke[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62(2): 127-136.

[8] American Academy Sleep Medcine Task Force. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research[J]. Sleep, 1999, 22(5): 667-689.

[9] Yaggi H K, Concato J, Kernan W N, *et al*. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death[J]. N Engl J Med, 2005, 353(19): 2034-2041.

[10] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, *et al*. Experiment studies of ischemic brain edema. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. Jpn J Stroke, 1986, 8(1): 1-8.

[11] Prinz V, Laufs U, Gertz K, *et al*. Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: an animal study[J]. Stroke, 2008, 39(2): 433-438.

[12] Chang R, Algird A, Bau C, *et al*. Neuroprotective effects of guanosine on stroke models *in vitro* and *in vivo*[J]. Neurosci Lett, 2008, 431(2): 101-105.

[13] Yun C H, Jung K H, Chu K, *et al*. Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnea[J]. J Clin Neurol, 2010, 6(2): 89-98.

[14] Ursavas A, Karadag M, Rodoplu E, *et al*. Circulating ICAM-1 and VCAM-1 levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome[J]. Respiration, 2007, 74(5): 525-532.

[15] Ohga E, Tomita T, Wada H, *et al*. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1[J]. J Appl Physiol (1985), 2003, 94(1): 179-184.

[16] 杨美丽, 吴振纲, 邱建龙, 等. 慢性间断缺氧对大鼠脑皮层 NF-κB、ICAM-1 和 TNF-α 表达的影响[J]. 福建医科大学学报, 2011, 45(3): 177-181.

[17] Terao S, Yilmaz G, Stokes K Y, *et al*. Inflammatory and injury response to ischemic stroke in obese mice[J]. Stroke, 2008, 39(3): 943-950.

[18] 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.

[19] Willerson J T, Ridker P M. Inflammation as a cardiovascular risk factor[J]. Circulation, 2004, 109(21 Suppl 1): II2-II10.

[20] 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.

[21] Nurmi A, Lindsberg P J, Koistinaho M, *et al*. Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia[J]. Stroke, 2004, 35(4): 987-991.

(收稿:2013-10-28;修回:2013-12-23)

(编辑 王小寒)