DOI:10.16016/j.1000-5404.202009102

电针上调 Cezanne 表达抑制 NF-κB 信号通路介导的大鼠脑缺血/再灌注炎性损伤

卢文豪[1],周雪灵[1],任义昆[1],王静文[1],朱 君[1],胥虹贝[1],李佳妮[2],罗 勇[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科[1];404010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经内科[2]

[摘要] **目的** 探讨电针上调 Cezanne 的表达及对局灶脑缺血/再灌注大鼠炎性损伤的神经保护作用。**方法** 将 SD 大鼠按简单随机分组分为假手术(sham)组、电针(EA)组、缺血/再灌注(MCAO/R)组和缺血/再灌注+电针(MCAO/R+EA)组,颅内注射 Cezanne 沉默慢病毒(LV-shCezanne),空载慢病毒(vehicle)作为对照。采用改良线栓法制备右侧大脑中动脉缺血/再灌注模型,电针刺激"百会"穴和病侧"四关"穴("合谷"/"太冲"穴)。缺血 2 h 后分别再灌注 6、12、24、48、72 h 和 7 d。分别采用 Garcia 评分、TTC 染色、Western blot、细胞计数,免疫荧光检测各组神经功能评分、梗死灶体积、缺血大脑皮质区 Cezanne 蛋白表达、Cezanne 阳性细胞数、Cezanne 的细胞分布类型、细胞核与细胞质 NF-κB p65 蛋白的表达。**结果** 与 sham 组相比,EA 组 Cezanne 蛋白表达在 6 h 和 48 h 增加($P<0.05$),MCAO/R 组 Cezanne 蛋白表达在 12、24、48、72 h 和 7 d 时增加($P<0.05$);与 MCAO/R 组相比,MCAO/R+EA 组 Cezanne 蛋白表达在 12、24、72 h 时进一步增加($P<0.05$)。相较于 sham 组,MCAO/R 组神经评分降低($P<0.05$),Cezanne 阳性细胞数、脑梗死体积增加($P<0.05$);相较于 MCAO/R 组,MCAO/R+EA 组神经评分升高($P<0.05$),Cezanne 阳性细胞数增多($P<0.05$),脑梗死体积($P<0.05$)、p-IκBα/IκBα 比值($P<0.05$)、细胞核 p65/细胞质 p65 比值降低($P<0.05$);免疫荧光显示 Cezanne 主要分布在缺血大脑皮质区神经元细胞质。**结论** 电针通过上调 Cezanne 蛋白的表达,抑制大鼠局灶脑缺血/再灌注后 NF-κB 信号通路的激活,从而发挥神经保护作用。

[关键词] 电针;锌指蛋白 Cezanne;脑缺血/再灌注;神经炎症;NF-κB 信号通路
[中图法分类号] R245.97; R363.21; R743.31 [文献标志码] A

Electroacupuncture upregulates Cezanne expression and alleviates focal cerebral ischemia/reperfusion inflammatory injury by inhibiting nuclear factor kappa B signal pathway in rats

LU Wenhao[1], ZHOU Xueling[1], REN Yikun[1], WANG Jingwen[1], ZHU Jun[1], XU Hongbei[1], LI Jiani[2], LUO Yong[1]
[1]Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 404010, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the roles of electroacupuncture (EA) in the upregulation of zinc finger protein Cezanne and in its neuroprotective effect on inflammatory injury induced by focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) in rats. **Methods** SD rats were randomized into sham group, EA group, I/R group and I/R+EA group. Cezanne silencing lentivirus (LV-shCezanne) was injection into the cerebral cortex to study the possible effect of Cezanne silencing on I/R injury, and injection of blank lentivirus (vehicle) as the control. The I/R model was established by conventional method of middle cerebral artery occlusion with

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30470606);国家自然科学基金青年科学基金(81403243);重庆市渝中区科技计划项目(20160102)
[通信作者] 罗 勇,E-mail:luoyong1998@163.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

ischemia for 2 h followed by reperfusion for 6, 12, 24, 48 and 72 h and 7 d, respectively, and then EA was adopted to stimulate the Baihui acupoint and the Hegu and Taichong acupoints on the affected side. Garcia score, TTC staining, Western blotting, cell counting and immunofluorescence assay were performed in each group, so as to detect the neurological deficit score (NDS), infarct size, Cezanne expression in the ischemic cerebral cortex, number and distribution of Cezanne positive cells, and expression of nuclear factor kappa B (NF-κB) p65 in the nucleus and cytoplasm. **Results** Compared with the sham group, the protein level of Cezanne was increased in EA group at 6 and 48 h ($P<0.05$), and also in the I/R group at 12 , 24, 48 and 72 h ($P<0.05$). While the level was further increased in the I/R+EA group at 12, 24, 72 and 7 d than the I/R group ($P<0.05$). The NDS was significantly lower in the I/R group than the sham group ($P<0.05$), whereas the number of Cezanne positive cells and the size of cerebral infarct were obviously larger ($P<0.05$). Compared with the I/R group, the I/R+EA group had higher NDS, more Cezanne positive cells, and smaller cerebral infarct size ($P<0.05$), and the ratios of both p-IκBα/IκBα and nucleus-p65 to cytoplasm-p65 were decreased in the MCAO/R+EA group ($P<0.05$). Immunofluorescence assay showed that Cezanne was mainly distributed in the cytoplasm of neurons in ischemic cerebral cortex. **Conclusion** EA inhibits the activation of NF-κB signal pathway after focal cerebral I/R injury in rats by upregulating the expression of Cezanne protein, and then play a neuroprotective role in the process.

[**Key words**] electroacupuncture; zinc finger protein Cezanne; focal cerebral ischemia/reperfusion; neuroinflammation; NF-κB signal pathway

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30470606), the National Natural Science Foundation for Young Scholar of China (81403243), and the Project of Science and Technology Plan of Yuzhong District, Chongqing (20160102). Corresponding author: LUO Yong, E-mail: luoyong1998@163.com

脑卒中是导致患者长期残疾的主要疾病之一[1],其中缺血性脑卒中约占总体80%以上[2],尤以大脑中动脉梗塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)最为常见。缺血性脑卒中目前常用的治疗手段是溶栓,它可以使脑组织重新获得血液灌注。然而,在脑缺血发生一段时间后,如果恢复缺血区的血供,会引发组织损伤加重甚至发生不可逆性损伤,称为脑缺血/再灌注损伤(cerebral ischemia/reperfusion injury,CIRI)。其机制较为复杂,主要与自由基过度形成、兴奋性氨基酸毒性作用、细胞内钙超载、炎性反应、细胞凋亡等有关[3],而炎症反应在其中担当重要的角色。核因子-κB(nuclear factor kappa B,NF-κB)转录因子家族是许多细胞信号通路的多效性调节因子,调控细胞对多种与炎症相关的刺激做出反应。NF-κB信号通路的过度激活是神经性炎症加重的主要机制之一[4]。Cezanne(OTUD7B)隶属卵巢肿瘤蛋白酶(ovarian tumour proteases,OTUs)去泛素化酶家族,最初于2001年作为锌指蛋白A20(Tumor necrosis factor alpha induced protein 3)的类似蛋白被发现[5]。Cezanne同时在NF-κB通路经典激活途径和非经典激活途径发挥重要调控作用[6],然而,Cezanne对脑缺血/再灌注炎症损伤的作用有待进一步研究。

在我国,电针被广泛运用于治疗缺血性卒中和面瘫等炎性疾病,疗效肯定[7]。目前的研究表明,电针通过抑制炎性反应、减轻氧化应激损伤、抑制兴奋性氨基酸毒性作用、抑制脑水肿形成、抑制细胞凋亡、促进神经与血管再生等作用减轻脑缺血/再灌注炎症损伤[8]。本课题组之前的研究表明,电针可调控NF-κB上游重要负性调控因子去泛素化酶的表达,包括A20、CYLD和OTULIN,从而抑制NF-κB信号通路过度激活[9-11]。

Cezanne作为特殊的去泛素酶,是阻止IKK复合物激活,进而抑制NF-κB信号通路过度激活的关键因子之一。因此,本实验通过建立SD大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注模型,以电针为治疗方法,引入基因干扰技术,进一步探讨了电针对脑缺血/再灌注缺血区脑皮质中Cezanne表达的影响及其对小胶质细胞的作用,并研究了Cezanne对局灶脑缺血/再灌注早期的神经保护作用及Cezanne的时空特征,为电针在脑缺血/再灌注早期的临床应用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

1.1.1 实验动物 本研究中动物相关操作和处置均按照重庆医科大学动物伦理委员会的相关规定进

行。实验动物由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(渝)2018-0003。选取 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 315 只,质量 280~300 g。

1.1.2 实验一分组 将 120 只 SD 大鼠简单随机分组分为假手术(sham)组、电针(EA)组、缺血/再灌注(MCAO/R)组和缺血/再灌注+电针(MCAO/R+EA)组,每组 30 只;每组大鼠再按简单随机分组分为局灶脑缺血 2 h/再灌注 6、12、24、48、72 h 和 7 d 共 6 组,每组 5 只,用于 RT-qPCR 和 Western blot 检测。

1.1.3 实验二分组 175 只 SD 大鼠按简单随机分组分为假手术(sham)组、缺血/再灌注(MCAO/R)组、缺血/再灌注+LV-shCezanne(MCAO/R+LV-shCezanne)组、缺血/再灌注+vehicle(MCAO/R+vehicle)组、缺血/再灌注+电针(MCAO/R+EA)组、缺血/再灌注+电针+LV-shCezanne(MCAO/R+EA+LV-shCezanne)组和缺血/再灌注+电针+vehicle(MCAO/R+EA+vehicle)组,每组 25 只。每组从中选取 10 只,在局灶脑缺血 2 h/再灌 24 h 时,进行免疫荧光、RT-qPCR 和 Western blot 检测;每组从中选取 15 只,在局灶脑缺血 2 h/再灌 72 h 时,进行神经功能缺损情况、TTC 和免疫荧光检测。

1.1.4 实验三分组 将 20 只 SD 大鼠按简单随机分组随机分为 LV-shCezanne 组和 vehicle 组,每组 10 只,病毒注射后,行 RT-qPCR 和 Western blot 检测。

1.2 试剂与仪器

主要试剂包括 LV-Otud7b-RNAi、LV-control:上海吉凯基因。Otud7b 兔多克隆抗体、Iba-1 羊多克隆抗体、GFAP 鼠多克隆抗体:美国,Novus。NF-κB p65 多克隆兔抗、P-IκBα 兔多克隆抗体:美国,Cell Signaling Technology。山羊抗兔二抗:美国,Boster。NeuN 鼠多克隆抗体:美国 Millipore。IκBα 兔多克隆抗体、山羊抗鼠二抗、驴抗兔荧光二抗 594、羊抗兔荧光二抗 594、羊抗鼠荧光二抗 FITC、羊抗鼠荧光二抗 488:武汉三鹰。PrimeScript RT with gDNA Eraser、TB Green:日本 TaKaRa。核质蛋白提取试剂盒:上海碧云天。

主要仪器包括,立体定位仪:美国 Stoelting。SDZ-Ⅲ电针治疗仪:苏州医疗用品厂。电泳、电转仪及 iQ5 梯度实时 PCR 检测系统:美国 Bio-Rad。激光共聚焦荧光显微镜:德国 Carl Zeiss。

1.3 动物模型的建立

运用本课题组报道的经验方法[11],规范运用线栓法制备 SD 大鼠右侧大脑中动脉缺血/再灌注模型。腹腔注射 2%戊巴比妥钠(10 mL/kg)麻醉大鼠,取仰卧位,颈正中腹侧切口,结扎大鼠的颈外动脉,从颈外动脉插栓至大脑中动脉,距颈动脉分叉处 18~20 mm。缺血 2 h 后拔栓实现再灌注。大鼠清醒后,运用 LONGA 大鼠神经功能评分[12]对模型进行评估:0 分,没有神经系统缺陷;1 分,无法完全伸展左前爪;2 分,向左侧转圈;3 分,向左侧倾倒;4 分,意识水平降低,无自发行走。模型成功标准:LONGA 评分 2 分或 3 分;未合并蛛网膜下腔出血。

1.4 慢病毒的管理与颅内注射

根据脑组织 80%的细胞感染率确定注射剂量。在造模前 2 周,用 5 μL Cezanne shRNA(LV-Otud7b-RNAi,5×10^8 U/mL)或 LV-control(con077,7×10^8 U/mL)对不同组大鼠进行病毒颅内注射。2%戊巴比妥钠(10 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,固定于立体定位仪。从颅顶切开头皮中线,在右侧大脑半球脑桥后 1.3、1.5 mm 处钻颅孔,在硬脑膜表面下 3.8 mm 处垂直插入 10 μL 微量注射器[9]。以 0.5 μL/min 缓慢注射 Cezanne shRNA 或 LV-contro 至脑皮质。

1.5 电针治疗

根据大鼠穴位图谱,选取“百会”穴(GV 20,矢状线与耳间线交点)、病侧“合谷”穴(LI 4,左第 2 掌骨中点桡侧)和“太冲”穴(LR 3,左第 1、第 2 跖骨之间的凹陷)。用直径 0.38 mm、长 1 寸(≈3.33 cm)的不锈钢银针(斜刺入“百会”穴 1 mm,直刺“合谷”穴和“太冲”穴 2 mm。接 SDZ-Ⅲ电针治疗仪,设置频率 20 Hz,疏密波,强度 1 mA,刺激时间 5 min,后调整频率为 2 Hz,刺激时间 25 min,共计 30 min。线栓被拔除时,大鼠立即接受电针刺激,每日 1 次,直至处死。MCAO/R+EA 组、MCAO/R+LV-shCezanne+EA 组、MCAO/R+Vehicle+EA 组的大鼠接受电针治疗。

1.6 神经行为学评分

由 1 名对动物分组不知情的研究人员在指定的时间点(6、12、24、48、72 h 和 7 d)分别采用 LONGA 等[12]和 GARCIA 等[13]的方法对大鼠进行评估。LONGA 评分仅用于模型的筛选,不纳入统计学分析。

1.7 梗死体积估算

腹腔注射 2%戊巴比妥钠(10 mL/kg)麻醉大鼠,迅速断头取出大脑并在-20 ℃冷冻 30 min。从距额叶前部 5 mm 处开始,连续切取 2 mm 厚的冠状切片,用 2% TTC 溶液在 37 ℃孵箱中染色 20 min。拍照后传输到电脑上用图像分析软件(Image J)评估梗死体积。白色未染色区域为梗死区,梗死体积以完整半球的百分比表示。

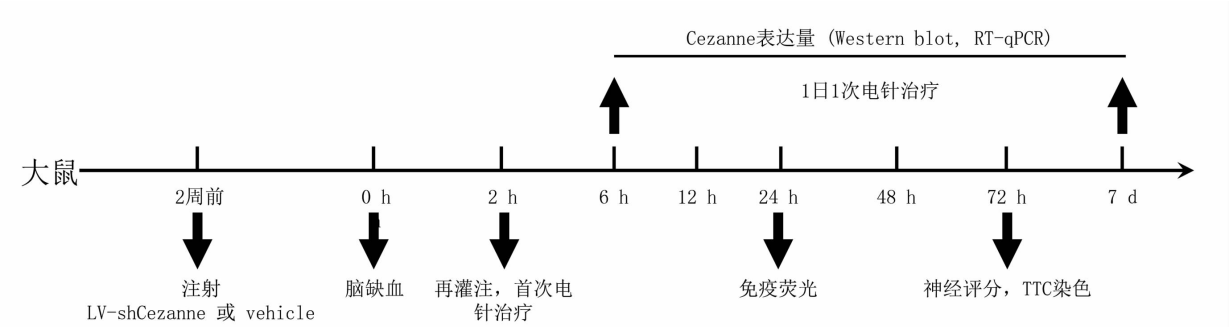


图 1 实验设计流程图

表 2 Garcia 大鼠神经功能评分

项目	0 分	1 分	2 分	3 分
自主运动(鼠笼中观察 5 min)	无自主运动	很少运动	运动并触及至少一侧笼壁	运动并触及至少三侧笼壁
体态的对称性(悬空观察四肢状态)	患侧无运动	患侧稍运动	患侧运动迟缓	双侧体态对称
前肢伸展运动(后肢悬空观察前肢)	左前肢无伸展动作	左前肢轻微伸展	左前肢有伸展运动不及右侧	两侧伸展对称
网屏实验		不能爬上	左侧劣势	正常攀爬
两侧身体触觉反射		左侧无反应	左侧弱于右侧	反应性相同
两侧胡须触觉反射		左侧无反应	左侧弱于右侧	反应性相同

表 3 基因的核苷酸引物序列

基因	登记号	正义链	反义链	产物大小/bp
Cezanne	NM_001107697.1	5′-CAGAAGGAGGCTGAGAGGAAGA-3′	5′-CCCAGAAGGTCGAGGAATAGTAAA-3′	177
IL-1β	NM_031512.2	5′-GATGATGACGACCTGCTAGTGTGT-3′	5′-TTGGCTTATGTTCTGTCCATTGAG-3′	141
TNF-α	NM_012675.3	5′-CTCATTCCTGCTCGTGGCG-3′	5′-CGTGGGCTACGGGCTTGT-3′	176

1.8 实时定量多聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 Cezanne 的 mRNA 含量

腹腔注射 2%戊巴比妥钠(10 mL/kg)麻醉大鼠,迅速断头后取右侧缺血区大脑皮质,运用 TRIzol 法提取总 RNA,冻存于-80 ℃冰箱。调整 RNA 浓度后,使用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。调整 cDNA 浓度,进行 PCR 实验。Cezanne、IL-1β 及 TNF-α 的引物核苷酸序列见表 3。

1.9 Western blot 检测 Cezanne 的蛋白含量

腹腔注射 2%戊巴比妥钠(10 mL/kg)麻醉大鼠,断头后取前文所述的右侧缺血区大脑皮质,加入 RIPA 裂解液(7.5 μL/mg)、PMSF(5×10^{-2} μL/mg)和额外的磷酸酶抑制剂,离心后提取总蛋白。另取脑组织,使用核质蛋白提取试剂盒(碧云天,中国)提取细胞核蛋白。

配制 10%SDS-PAGE 凝胶,分离 80 μg 蛋白,恒压(60 V-120 V)电泳,电转(250 mA 100 min),脱脂奶粉常温封闭 2 h,PVDF 膜与一抗 4 ℃孵育过夜。一抗分别为:Otud7b 兔多克隆抗体(NBP1-88095,1∶500)、NF-κB p65 多克隆兔抗(#8242,1∶1000)、IκBα 兔多克隆抗体(18220-1-AP,1∶500)和 P-IκBα 兔多克隆抗体(#2859,1∶500)。TBST 漂洗(10 min×3 次)后分别与二抗在 37 ℃孵育 1 h。二抗分别为:羊抗小鼠抗体(SA00001-1,1∶5 000)和羊抗兔抗体(BA1054,1∶5 000)。TBST 漂洗(10 min×3 次)后用凝胶成像仪扫描免疫印迹,并用软件(FUSION-CAPT)进行分析。

1.10 免疫荧光观察 Cezanne 在脑缺血皮质区的细胞分布位置

腹腔注射 2%戊巴比妥钠(10 mL/kg)麻醉大鼠,剪开肋骨,充分暴露心脏,经心尖主动脉灌注生理盐水和 4%多聚甲醛。迅速取脑,多聚甲醛浸泡 24 h,依次更换浸泡液为 20%蔗糖、30%蔗糖,每个浓度浸泡 24 h。从额叶前部 5 mm 处开始,连续切成 10 μm 厚的冠状面冰冻脑片。切片滴加 1% triton X-100,于 37 ℃孵育 30 min 后用 PBS 漂洗,用山羊或驴血清在 37 ℃下封闭 1 h。切片在 4 ℃与一抗孵育过夜。一抗分别为:Otud7b 兔多克隆抗体(NBP1-88095,1∶100,)、Iba-1 羊多克隆抗体(NB100-1028,1∶100)、GFAP 小鼠多克隆抗体(BM0055,1∶100)、NeuN 小鼠多克隆抗体(MAB377,1∶100)。PBS 洗涤后,用荧光二抗在 37 ℃孵育 1 h。荧光二抗分别为:驴抗兔荧光抗体 594(SA00013-8,1∶200),羊抗兔荧光抗体 594(SA00013-4,

1∶200),羊抗小鼠荧光抗体 FITC(SA00003-1,1∶200,武汉三鹰),羊抗小鼠荧光抗体 488(SA00013-1,1∶200)。

采用双盲法在激光共聚焦荧光显微镜下观察缺血区大脑皮质,每个样本在 200 倍下随机选取 5 个视野拍照,使用图像处理软件(ZEN 2 blue edition)进行处理。对缺血区皮质中的 Cezanne 细胞数进行计数,并以每平方毫米的细胞数(细胞密度由 200 倍图像中 9×10^4 像素/英寸的细胞数转换而来)表示。阳性细胞计数为蛋白(红色荧光)和细胞核(蓝色荧光)共表达的细胞计数。

1.11　统计学分析

使用 GraphPad Prism 7.0 统计软件。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。用双因素方差分析比较电针对各组 Cezanne mRNA 或蛋白的影响。其余数据均采用单因素方差分析进行组间差异分析。$P<0.05$ 具有统计学意义。

2　结果

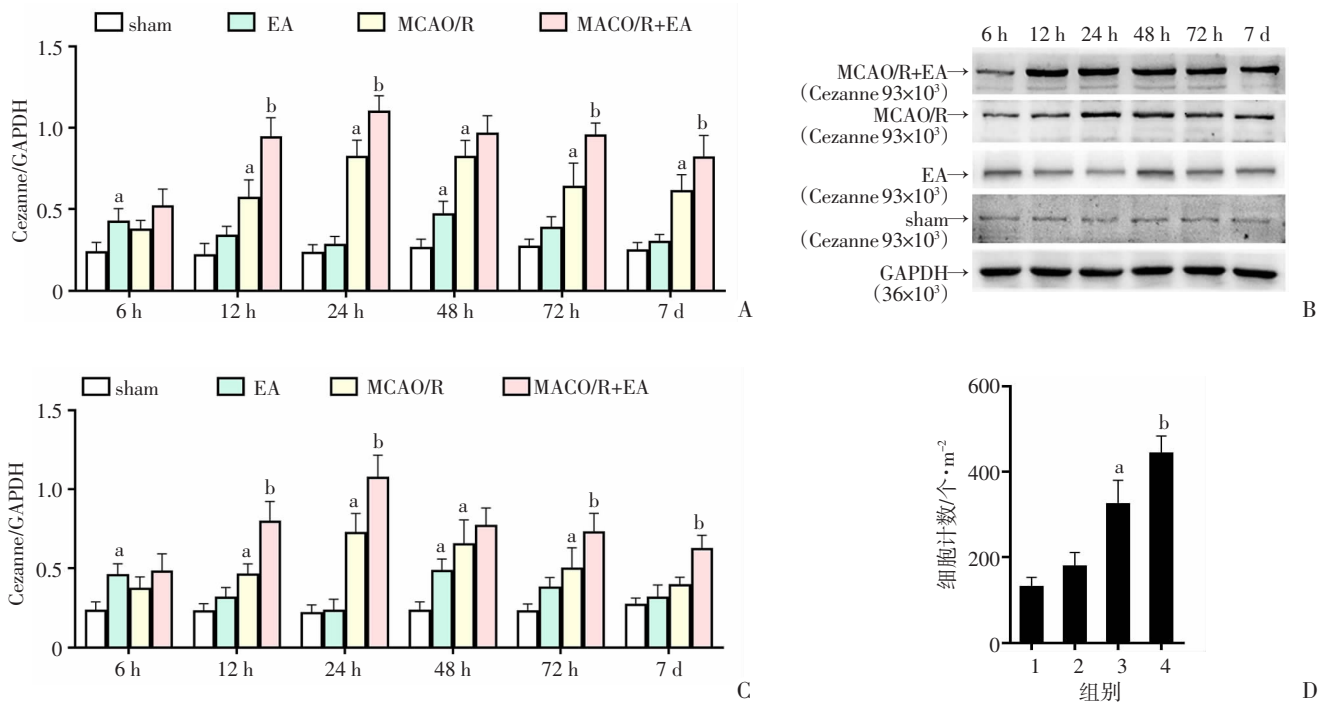
2.1　电针上调局灶脑缺血/再灌注大脑皮质缺血区 Cezanne 的表达

分别于再灌注 6、12、24、48、72 h 和 7 d 采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测 Cezanne mRNA 和蛋白表达。sham 组有少量 Cezanne mRNA 表达,而 EA 组在缺血/再灌注 6、48 h mRNA 含量增加($P<0.05$);相较于 sham 组,MCAO/R 组 Cezanne mRNA 除 6 h 外,其余时间点表达增加($P<0.05$),并在 24 h 达到高峰($P<0.05$);除 6、48 h 外,MCAO/R+EA 组各时间点 Cezanne mRNA 的表达均高于 MCAO/R 组($P<0.05$,图 2A)。在 6、48 h,相对于 sham 组,EA 组 Cezanne 蛋白表达增加($P<0.05$),MCAO/R 组 Cezanne 蛋白在 12 h 后增加($P<0.05$),并于 24 h 达到高峰($P<0.05$);而相较于 MCAO/R 组,MCAO/R+EA 组在各时间点(除 6、48 h)Cezanne 蛋白表达更强($P<0.05$,图 2B、C)。

免疫荧光法标记缺血/再灌注 24 h 后脑组织内 Cezanne 阳性细胞数。相较于假手术组,MCAO/R 组缺血区 Cezanne 阳性细胞数显著增加($P<0.05$);相较于 MCAO/R 组,MCAO/R+EA 组 Cezanne 阳性细胞数显著增多($P<0.05$,图 2D、图 3)。

2.2　Cezanne 在局灶脑缺血/再灌注中发挥神经保护作用

为探讨基因干扰对 Cezanne 基因敲除的影响,分别采用 PCR 和 Western blot 检测 sham 组、LV-shCezanne 组和 vehicle 组 Cezanne 基因的 mRNA 和蛋白表达。LV-shCezanne 组中 Cezanne mRNA 和蛋白含量低于 sham 组($P<0.05$,图 4,Cezanne mRNA 下降约 46.98%,Cezanne 蛋白含量下降约 43.32%。



A:RT-PCR 检测不同时间点各组大鼠缺血区 Cezanne mRNA 表达;B、C:Western blot 检测 Cezanne 在各组大鼠脑内特定时间点的表达;D:各组大鼠缺血大脑皮质区 Cezanne 阳性细胞计数　1:sham 组;2:EA 组;3:MCAO/R 组;4:MCAO/R+EA 组;a:$P<0.05$,与 sham 组比较,b:$P<0.05$,与 MCAO/R 组比较

图 2　电针对大鼠局灶脑缺血/再灌注大脑皮质缺血区 Cezanne 表达的影响

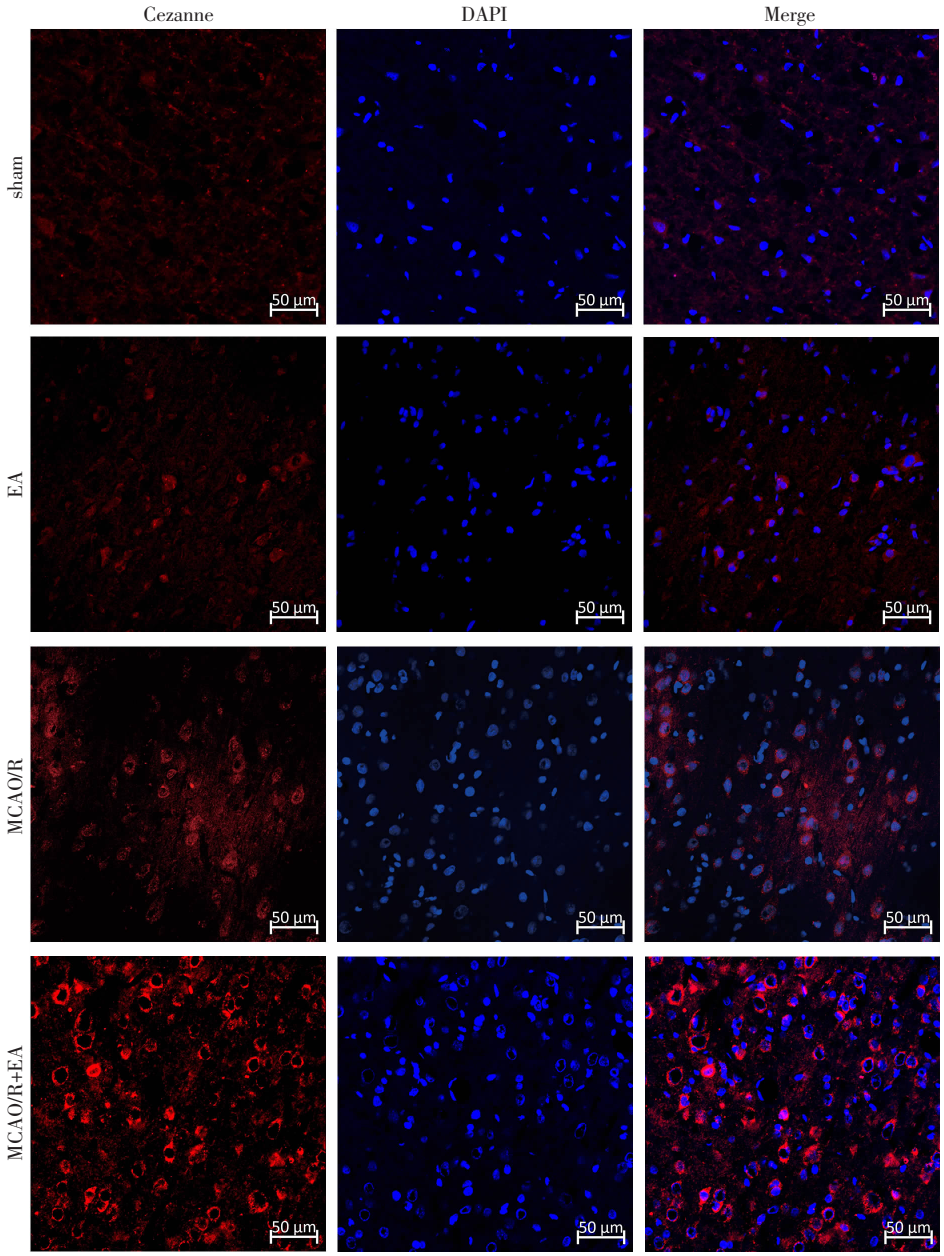


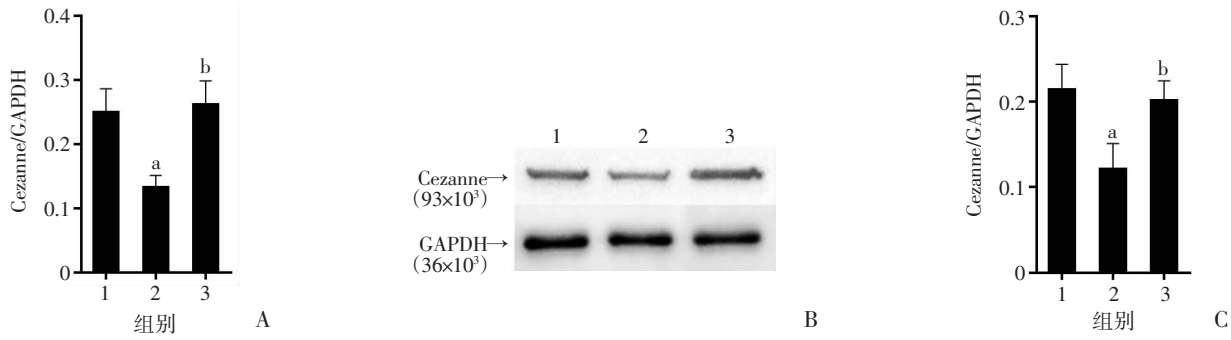
图 3 免疫荧光观察缺血再灌注 24 h 后,各组大鼠缺血大脑皮质区 Cezanne 表达

选取缺血/再灌注后 72 h 作为评估时间。MCAO/R 组大鼠神经功能缺损程度较 sham 组加重($P<0.05$),而 MCAO/R +LV-shCezanne 组相对于 MCAO/R 组神经功能缺损程度更加严重($P<0.05$);MCAO/R 组与 MCAO/R+vehicle 组之间神经功能评分无明显差异(图 5A)。

TTC 染色后的脑梗死体积同样也证明了本结果。缺血/再灌注 72 h 后,MCAO/R 组大鼠脑梗死体积大于 sham 组($P<0.05$),而 MCAO/R +LV-shCezanne 组脑梗死体积大于 MCAO/R 组($P<0.05$);MCAO/R 组与 MCAO/R+vehicle 组之间脑梗死体积无明显差异(图 5B、C)。因此推测 Cezanne 可以减轻脑缺血/再灌注炎症损伤,而 Cezanne 含量减少会影响脑缺血/再灌注的预后。

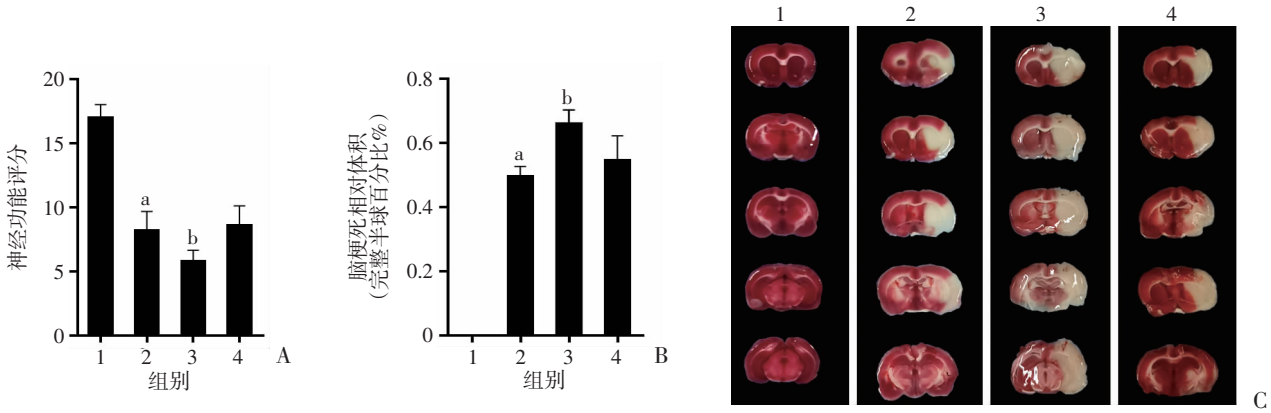
2.3 Cezanne 主要在局灶脑缺血/再灌注皮质缺血区的神经元中表达

为了解 Cezanne 在大鼠脑内的具体细胞定位,采用免疫荧光双标记法,使 Cezanne 分别与 NeuN、GFAP 和 Iba-1 结合,检测 Cezanne 在神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞中的定位。缺血 2 h 并再灌注 24 h 后,Cezanne 蛋白主要分布在神经元的胞质中,小胶质细胞少量表达,星形胶质细胞未见表达(图 6)。



1：sham；2：LV-shCezanne；3：vehicle；A:RT-PCR 检测大鼠脑皮质区 Cezanne mRNA 表达;B、C:Western blot 检测大鼠脑皮质区 Cezanne 蛋白的表达 a:$P<0.05$,与 sham 组比较,b:$P<0.05$,与 LV-shCezanne 组比较

图 4 基因干扰对 Cezanne 的抑制作用



1：sham；2：MCAO/R；3：MCAO/R+LV-shCezanne；4：MCAO/R+vehcile；A:神经功能评分;B:脑梗死体积;C:TTC 染色观察脑梗死情况 a:$P<0.05$,与 sham 组比较;b:$P<0.05$,与 MCAO/R 组比较

图 5 Cezanne 对脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用

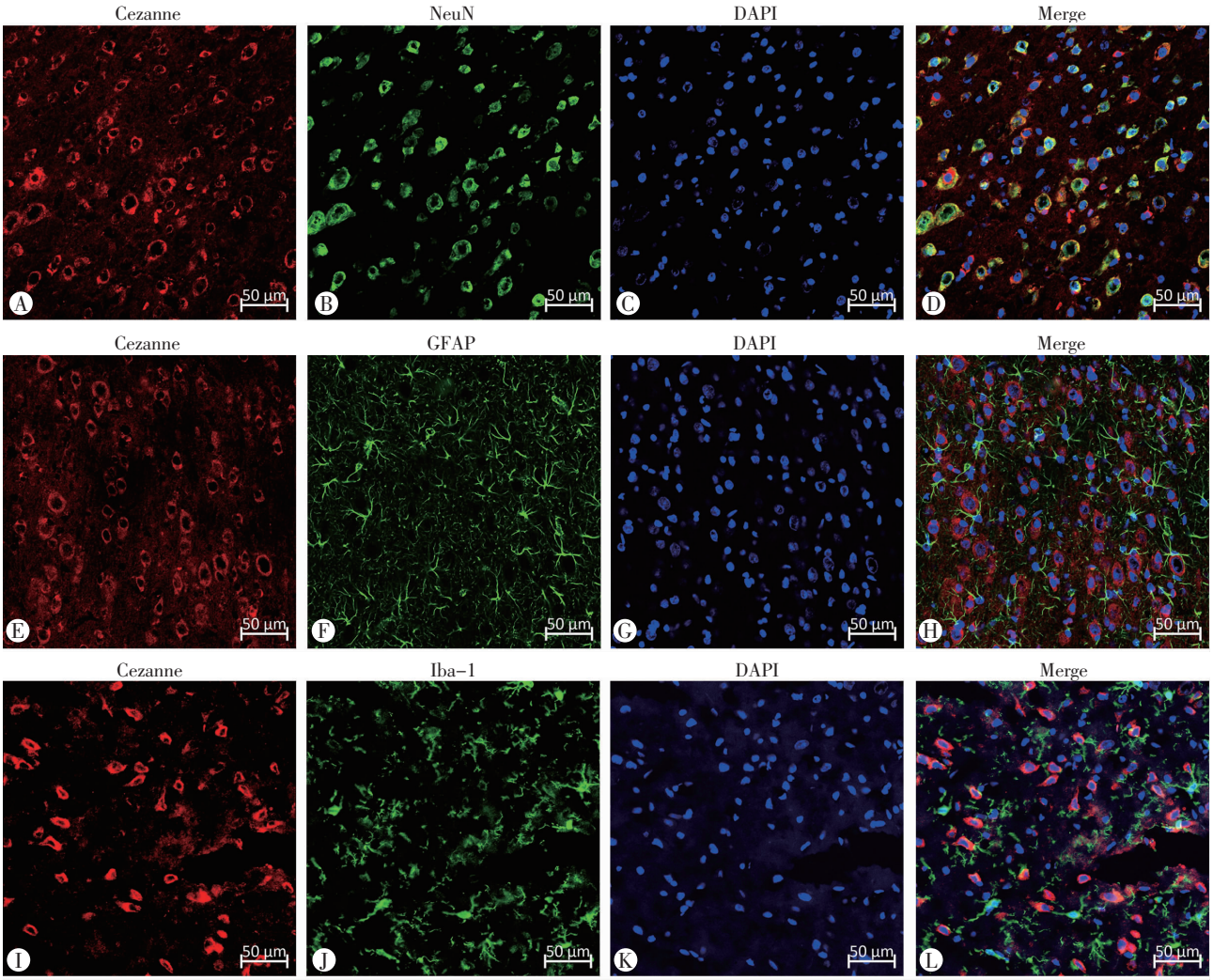
2.4 Cezanne 沉默在一定程度上抑制了电针在局灶脑缺血/再灌注中的神经保护作用

选取缺血/再灌注后 72 h 作为评估时间。与 MCAO/R 组相比,MCAO/R+EA 组大鼠神经功能改善($P<0.05$,图 7A),脑梗死体积显减小($P<0.05$,图 7B、C)。然而,MCAO/R+EA+LV-shCezanne 组相较于 MCAO/R+EA 组,神经功能缺损加重($P<0.05$,图 7A),脑梗死体积增加($P<0.05$,图 7B、C)。MCAO/R+EA 组与 MCAO/R+EA+vehicle 组神经行为评分和脑梗死体积无明显差异。

2.5 Cezanne 沉默部分抑制了局灶脑缺血/再灌注中电针的抗炎作用

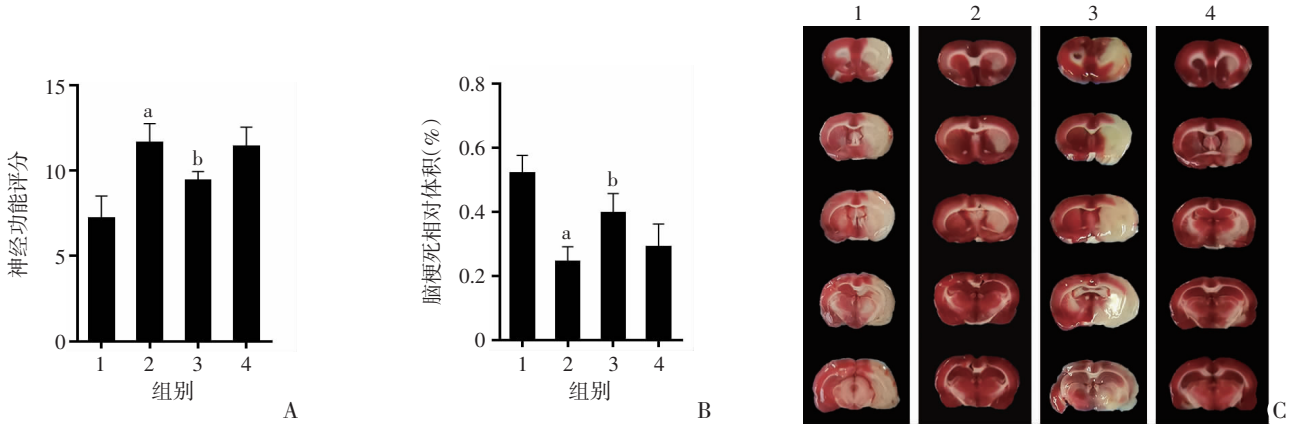
使用 RT-PCR 测定 TNF-α 和 IL-1β 这两种重要的缺血/再灌注后炎症指标的含量。与 sham 组相比,MCAO/R 组 TNF-α、IL-1β mRNA 表达上升($P<0.05$);相较于 MCAO/R 组,MCAO/R+EA 组 TNF-α、IL-1β mRNA 表达下降($P<0.05$)。而与 MCAO/R+EA 组比较,MCAO/R + EA + LV-shCezanne 组 TNF-α、IL-1β mRNA 表达上升;MCAO/R 组和 MCAO/R+EA+vehicle 组之间 TNF-α 和 IL-1β 表达水平无明显差异(图 8A、B)。

免疫荧光观察小胶质细胞的活化状态。与 sham 组相比,MCAO/R 组小胶质细胞呈激活状态,胞体明显增大,分枝增多;而相较于 MCAO/R 组,MCAO/R+EA+LV-shCezanne 组小胶质细胞胞体略微缩小,分枝轻微减少;最明显的是 MCAO/R+EA 组,小胶质细胞胞体明显缩小,分枝形态大幅减少(图 8C)。提示 EA 抑制了小胶质细胞在炎症中的活化。



采用免疫荧光双标法(A~D)对切片进行染色,可见 Cezanne 蛋白(红色)与神经元细胞(绿色,NeuN 标记)高度重合;E~H 中未见 Cezanne 表达阳性(红色)的星形胶质细胞(绿色,用 GFAP 标记);I~L 中见 Cezanne 与小胶质细胞(绿色,用 Iba-1 标记)有少量共表达

图 6 大鼠局灶脑缺血/再灌注后 Cezanne 的空间分布和细胞类型定位

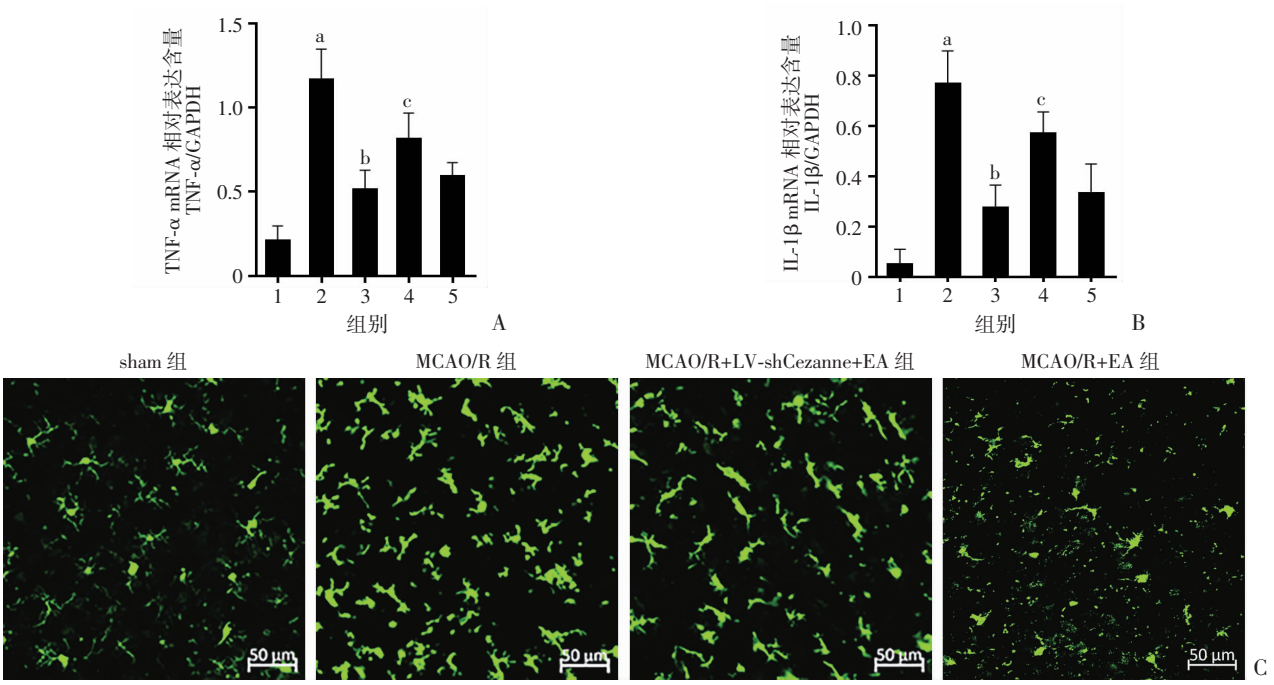


1: MCAO/R; 2: MCAO/R+EA; 3: MCAO/R+EA+LV-shCezanne; 4: MCAO/R+EA+vehicle; A:神经功能评分;B:脑梗死体积;C:TTC 染色观察脑梗死情况 a:$P<0.05$,与 MCAO/R 组比较,b:$P<0.05$,与 MCAO/R+EA 组比较

图 7 Cezanne 沉默削弱了电针对局灶脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用

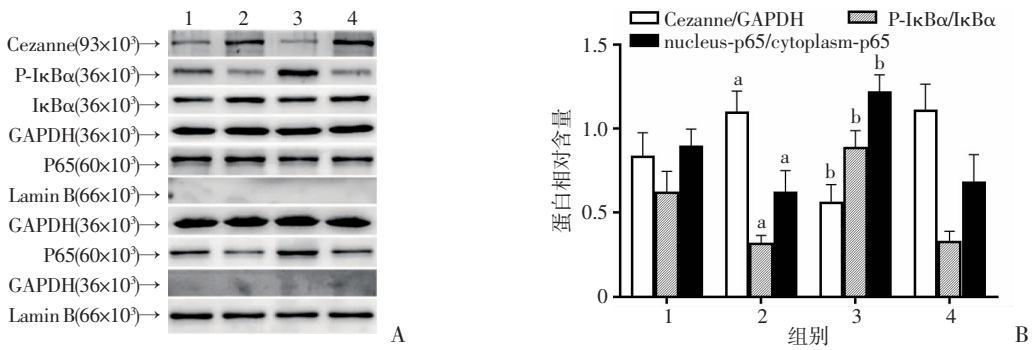
2.6　电针通过上调 Cezanne 表达抑制 NF-κB 信号通路激活

通过沉默 Cezanne 来探究电针是否通过 Cezanne 介导的 NF-κB 抑制作用减轻局灶缺血/再灌注后的炎性损伤。将大鼠随机分为 4 组(MCAO/R 组、MCAO/R+EA 组、MCAO/R+EA+LV-shCezanne 组、MCAO/R+EA+vehicle 组,n=5)。局灶脑缺血/再灌注后 24 h 后,运用 Western blot 检测大鼠局灶脑缺血/再灌注区 Cezanne、p-IκBα、IκBα、nucleus-p65 和 cytoplasm-p65 蛋白。p-IκBα/IκBα 代表 IκBα 的磷酸化比率,而 nucleus-p65/cytoplasm-p65 代表 NF-κB p65 的核转位比率。这些比率都作为各组 NF-κB 信号通路活跃程度的比较指标。局灶脑缺血/再灌注 24 h 后,与 MCAO/R+EA+LV-shCezanne 组相比,MCAO/R+EA 组 Cezanne 蛋白表达上升($P<0.05$),IκBα 磷酸化比率降低($P<0.05$),nucleus-p65/cytoplasm-p65 比值降低($P<0.05$);而相较于 MCAO/R+EA 组,MCAO/R 组 IκBα 磷酸化显著升高($P<0.05$),nucleus-p65/cytoplasm-p65 明显上升($P<0.05$);而 MCAO/R+EA 组与 MCAO/R+EA+vehicle 组 IκBα 的磷酸化比率与 NF-κB p65 的核转位比率无明显差异(图 9)。说明 Cezanne 的表达在电针抑制 NF-κB 信号通路的过程中发挥着重要的作用。



1:sham 组, 2: MCAO/R 组, 3: MCAO/R+EA 组, 4: MCAO/R+EA+LV-shCezanne 组, 5: MCAO/R+EA+LV+vehicle 组; A: RT-PCR 检测大鼠缺血区 TNF-α mRNA 表达;B: RT-PCR 检测大鼠缺血区 IL-1β mRNA 表达　a:$P<0.05$,与 sham 组比较,b:$P<0.05$,与 MCAO/R 组比较,c:$P<0.05$,与 MCAO/R+EA 组比较;C:免疫荧光染色观察 Cezanne 沉默部分减弱了电针抑制小胶质细胞(绿色,Iba-1 标记)激活的能力

图 8　Cezanne 沉默部分抑制电针抗炎作用



1: MCAO/R+EA+LV-shCezanne 组; 2: MCAO/R+EA 组; 3: MCAO/R 组; 4: MCAO/R+EA+vehicle 组; A: Western blot 检测大鼠缺血/再灌注 24 h 后大脑皮质 Cezanne、p-IκBα、IκBα、nucleus-p65 和 cytoplasm-p65 蛋白表达; B: 定量分析　a:$P<0.05$,与 MCAO/R+EA+LV-shCezanne 组比较,b:$P<0.05$ 与 MCAO/R+EA 组比较

图 9　电针上调 Cezanne 表达抑制 NF-κB 信号通路激活

3 讨论

尽管急性溶栓治疗目前取得了进展,但缺血性卒中仍然是导致长期残疾和死亡的主要原因之一[1],尤其是伴随病程进展而来的脑缺血/再灌注,严重威胁着病人的生命及远期生存质量。因此,探索脑缺血/再灌注炎性损伤的发生机制,寻找新的临床治疗方法,已成为迫在眉睫的任务。

目前研究表明,NF-κB 通路的过度激活,是造成脑缺血/再灌注炎性损伤的重要原因之一[4]。区别于其他的去泛素化酶,如 A20、CYLD(Cylindromatosis)和 OTULIN(OTU Deubiquitinase With Linear Linkage Specificity),Cezanne 同时在 NF-κB 通路经典激活途径和非经典激活途径发挥负性调控作用[6],并且是目前唯一能定向裁剪 Lys11 泛素链的去泛素化酶[14]。在动物实验中,LUONG 等[15]发现肾缺血/再灌注的大鼠肾组织中 Cezanne 的 mRNA 水平和蛋白质水平显著上升,并且在 Cezanne 基因沉默后,大鼠肾组织缺血/再灌注损伤加重。然而,目前 Cezanne 在脑缺血/再灌注所致急性炎症反应中发挥的作用以及动态表达规律有待进一步研究。本研究探讨了 Cezanne 在局灶脑缺血/再灌注中的时空表达特点及其作用。结果发现,在脑缺血/再灌注后 7 d 内,Cezanne mRNA 和蛋白表达迅速上升,24 h 达到峰值,随后缓慢下降。据此推测 Cezanne 可能与机体内源性炎症或抗炎反应的启动密切相关。本研究运用基因干扰技术沉默 Cezanne 的表达,发现 Cezanne 的沉默加重了局灶脑缺血/再灌注早期的炎性损伤,证明了 Cezanne 具有较强的抗炎作用。以上结果提示,上调 Cezanne 的表达可能是一种潜在的抵抗缺血性脑损伤的新策略。

在我国,电针是一种广泛应用的药物干预外补充疗法。多项研究发现,电针可以抑制 NF-κB 信号通路在脑缺血/再灌注中过度激活[16-18],而这一作用的具体机制有待进一步探讨。本研究发现,EA 组中电针上调了脑皮质 Cezanne mRNA 和蛋白的表达,且 MCAO/R+EA 组 Cezanne 的表达峰值高于 MCAO/R 组。在大鼠脑缺血/再灌注 24 h 后,我们观察到电针增加了皮质区神经元 Cezanne 阳性细胞数量。以上结果证实电针是快速上调 Cezanne 的有效方法。本研究再次证实,电针能够抑制 IκBα 的磷酸化和 P65 的核转位,从而阻断 NF-κB 的激活,减轻 MCAO/R 大鼠脑组织的炎性损伤,这与课题组前期结果相符[9, 11]。并且,Cezanne 基因的沉默部分逆转了电针的神经保护作用。结合目前 Cezanne 作用机制的其他研究,我们推测电针通过上调 Cezanne,裁剪 IKK 复合物上游与 TRAF6 相连的 Lys63 泛素链、与 TRAF3 相连的 Lys48 泛素链,抑制 IKK 复合物的活化,从而阻止 NF-κB 通路的过度激活,减轻卒中炎症反应[19-20]。该推测有待进一步的实验证实。然而,本研究尚未探讨电针上调 Cezanne 含量的机制,以及 Cezanne 在泛素化水平上对 NF-κB 的调控,这将是我们接下来的研究重点。

PAUL 等[5]报道 Cezanne 主要分布在多种细胞类型的细胞质中,只有一小部 Cezanne 分布于细胞核。但目前尚无研究指出脑缺血再灌注后,Cezanne 在大脑皮质缺血区的细胞分布类型以及位置。本次研究通过免疫荧光双标,观察到在大鼠局灶脑缺血/再灌注 24 h 后的急性期,Cezanne 主要分布在脑皮质缺血区神经元细胞胞质内,少量分布在小胶质细胞中,未发现其在星形胶质细胞中有分布。这与 ZHAN 等[9]发现的 Cezanne 同源蛋白 A20 的分布规律相似。PRANSKI 等[21]通过间接证据表明 A20 泛素编辑酶复合物中的一些成分主要在神经元中表达。考虑到 Cezanne 与 A20 结构与作用的高度相似性[5, 22-24],我们推测神经元中可能存在类似的 Cezanne 相关功能单位,协助 Cezanne 发挥去泛素化作用,调节大脑炎症。

在脑缺血组织中,神经元和胶质细胞中 NF-κB 通路被强烈地激活[25-26]。小胶质细胞在中枢神经系统(CNS)中的功能是一个充满争议的话题。目前已知 M1 型小胶质细胞可分泌 IL-12 和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)等促炎因子,M2 型小胶质细胞可分泌 IL-4 和 IL-10 等抗炎因子[27-28]。本研究发现电针能抑制脑缺血/再灌注后小胶质细胞的过度激活。然而,本研究并未对小胶质细胞的亚型进行验证,因此无法明确电针抑制小胶质细胞后发挥的具体作用。这将是我们接下来的研究方向。在神经毒性炎症中,星形胶质细胞可增生形成瘢痕和屏障,阻挡炎症细胞进入[29],也能够增强脑缺血后神经元的凋亡[26, 30]。本研究并未在星形胶质细胞中发现 Cezanne 阳性细胞分布,我们推测可能是因为脑缺血炎症早期星形胶质细胞主要发挥促炎作用,与 Cezanne 的抗炎作用相反。

综上所述,Cezanne 可缓解局灶脑缺血/再灌注大鼠神经炎症。电针通过上调 Cezanne 蛋白的表达,抑制大鼠局灶脑缺血/再灌注后 NF-κB 信号通路的激活,发挥神经保护作用。在缺血性卒中的早期,电针可能是一种潜在的新型辅助治疗手段,改善患者的预后,

而这有待未来的进一步研究与应用。

参考文献:

[1] SIMPKINS A N, JANOWSKI M, OZ H S, *et al*. Biomarker application for precision medicine in stroke[J]. Transl Stroke Res, 2020, 11(4): 615-627. DOI: 10.1007/s12975-019-00762-3.

[2] VIDALE S, CONSOLI A, ARNABOLDI M, *et al*. Post-ischemic inflammation in acute stroke[J]. J Clin Neurol, 2017, 13(1): 1. DOI: 10.3988/jcn.2017.13.1.1.

[3] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion: from mechanism to translation[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1391-1401. DOI: 10.1038/nm.2507.

[4] SHIH R H, WANG C Y, YANG C M. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review[J]. Front Mol Neurosci, 2015, 8: 77. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00077.

[5] EVANS P C, TAYLOR E R, COADWELL J, *et al*. Isolation and characterization of two novel A20-like proteins[J]. Biochem J, 2001, 357(3): 617-623. DOI: 10.1042/bj3570617.

[6] ROTHSCHILD D E, MCDANIEL D K, RINGEL-SCAIA V M, *et al*. Modulating inflammation through the negative regulation of NF-κB signaling[J]. J Leukoc Biol, 2018, 103(6): 1131-1150. DOI: 10.1002/jlb.3mir0817-346rrr.

[7] RATMANSKY M, LEVY A, MESSINGER A, *et al*. The effects of acupuncture on cerebral blood flow in post-stroke patients: a randomized controlled trial[J]. J Altern Complement Med, 2016, 22(1): 33-37. DOI: 10.1089/acm.2015.0066.

[8] 杨杨, 孙华. 近10年针刺治疗脑缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中国针灸, 2015, 35(7): 749-752.
YANG Y, SUN H. Research progress of acupuncture for cerebral ischemia reperfusion injury in recent 10 years[J]. Chin Acupunct Moxibust, 2015, 35(7): 749-752.

[9] ZHAN J, QIN W Y, ZHANG Y, *et al*. Upregulation of neuronal zinc finger protein A20 expression is required for electroacupuncture to attenuate the cerebral inflammatory injury mediated by the nuclear factor-kB signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. J Neuroinflam, 2016, 13: 258. DOI: 10.1186/s12974-016-0731-3.

[10] XU H, QIN W, HU X, *et al*. Lentivirus-mediated overexpression of OTULIN ameliorates microglia activation and neuroinflammation by depressing the activation of the NF-κB signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. J Neuroinflam, 2018, 15(1): 83. DOI: 10.1186/s12974-018-1117-5.

[11] JIANG J, LUO Y, QIN W, *et al*. Electroacupuncture suppresses the NF-κB signaling pathway by upregulating cylindromatosis to alleviate inflammatory injury in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10: 363. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00363.

[12] 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. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.

[13] GARCIA J H, WAGNER S, LIU K F, *et al*. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. Stroke, 1995, 26(4): 627-634. DOI: 10.1161/01.str.26.4.627.

[14] MEVISSEN T E T, KULATHU Y, MULDER M P C, *et al*. Molecular basis of Lys11-polyubiquitin specificity in the deubiquitinase Cezanne[J]. Nature, 2016, 538(7625): 402-405. DOI: 10.1038/nature19836.

[15] LUONG LE A, FRAGIADAKI M, SMITH J, *et al*. Cezanne regulates inflammatory responses to hypoxia in endothelial cells by targeting TRAF6 for deubiquitination[J]. Circ Res, 2013, 112(12): 1583-1591. DOI: 10.1161/circresaha.111.300119.

[16] LAN L, TAO J, CHEN A Z, *et al*. Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR4/NF-κB pathway[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(1): 75-80. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1184.

[17] 徐翔, 杨陈丽, 赵宝华, 等. 局部脑缺血再灌注损伤对大鼠脑组织TLR4和NF-κB表达影响[J]. 青岛大学学报(医学版), 2020(2): 212-216.
XU X, YANG C L, ZHAO B H, *et al*. effect of cerebral ischemia-reperfusion on expression of TLR4 and NF-κb in rat brain tissue[J]. J Qingdao Univ Med Sci, 2020(2): 212-216.

[18] 叶涛, 朱路文, 唐强, 等. 电针预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能和缺血半暗区Tolls样受体4、核转录因子κB蛋白的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23(7): 745-749.
YE T, ZHU L W, TANG Q, *et al*. Effects of electroacupuncture pretreatment on neurological function, and expression of toll-like receptor 4 and nuclear factor κB in ischemic penumbra in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2017, 23(7): 745-749.

[19] ABE J, BERK B C. Cezanne paints inflammation by regulating ubiquitination[J]. Circ Res, 2013, 112(12): 1526-

1528. DOI: 10.1161/circresaha.113.301518.

[20] HU H, BRITTAIN G C, CHANG J H, *et al*. OTUD7B controls non-canonical NF-κB activation through deubiquitination of TRAF3[J]. Nature, 2013, 494(7437): 371-374. DOI: 10.1038/nature11831.

[21] PRANSKI E L, VAN SANFORD C D, DALAL N V, *et al*. Comparative distribution of protein components of the A20 ubiquitin-editing complex in normal human brain[J]. Neu Lett, 2012, 520(1): 104-109. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.05.043.

[22] KOMANDER D, CLAGUE M J, URBÉ S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(8): 550-563. DOI: 10.1038/nrm2731.

[23] JI Y, CAO L, ZENG L, *et al*. The N-terminal ubiquitin-associated domain of Cezanne is crucial for its function to suppress NF-κB pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(2): 1979-1991. DOI: 10.1002/jcb.26359.

[24] EVANS P C, SMITH T S, LAI M J, *et al*. a novel type of deubiquitinating enzyme[J]. J Biol Chem, 2003, 278(25): 23180-23186. DOI: 10.1074/jbc.M301863200.

[25] 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. DOI: 10.1523/jneurosci.5643-07.2008.

[26] GAO S, MO J, CHEN L, *et al*. Astrocyte GGTI-mediated Rac1 prenylation upregulates NF-κB expression and promotes neuronal apoptosis following hypoxia/ischemia[J]. Neuro pharmacology, 2016, 103: 44-56. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.12.002.

[27] MIZUMA A, YENARI M A. Anti-inflammatory targets for the treatment of reperfusion injury in stroke[J]. Front Neurol, 2017, 8: 467. DOI: 10.3389/fneur.2017.00467.

[28] HU X M, LI P Y, GUO Y L, *et al*. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2012, 43(11): 3063-3070. DOI: 10.1161/strokeaha.112.659656.

[29] SOFRONIEW M V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation[J]. Nat Rev Neurosci, 2015, 16(5): 249-263. DOI: 10.1038/nrn3898.

[30] DVORIANTCHIKOVA G, BARAKAT D, BRAMBILLA R, *et al*. Inactivation of astroglial NF-κB promotes survival of retinal neurons following ischemic injury[J]. Eur J Neurosci, 2009, 30(2): 175-185. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.06814.x.

(收稿:2020-09-13;修回:2020-10-10)

(编辑 吴培红)