基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1810-04

# 罗格列酮对局灶性脑缺血再灌注后 NF-κB 和 COX-2 表达的影响

李 岩[1],王东玉[2]

(1.辽宁医学院研究生学院,锦州 121001;2.辽宁省锦州市中心医院神经内科,辽宁 121000)

【摘 要】目的:探讨罗格列酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑组织表达核因子 -κB(Nuclear factor-κB,NF-κB)和环氧化酶 2(Cyclooxygenase,COX-2)的影响。方法:SD 大鼠分为假手术组、模型组、2 个剂量的罗格列酮组[2 mg/(kg·d)和 4 mg/(kg·d)],测定各组脑梗死体积和缺血侧皮层 NF-κB 和 COX-2 蛋白空间分布和含量的变化。结果:与模型组比较,罗格列酮组脑梗死体积明显减少,且不同剂量组间脑梗死体积有显著差异($P<0.05$);缺血侧皮层 NF-κB 和 COX-2 蛋白表达量明显减少,且 2 个不同剂量组间有显著差异($P<0.05$)。结论:罗格列酮通过降低缺血侧皮层 NF-κB 和 COX-2 蛋白表达减小局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积,对缺血再灌注损伤可能具有神经保护作用。

【关键词】罗格列酮;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ;核因子 -κB;环氧化酶 2

【中国图书分类法分类号】R743.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-31

# The effects of rosiglitazone on the expressions of NF-κB and COX-2 in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury

*LI Yan, et al*

(*Graduated School, Liaoning Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of rosiglitazone on the expressions of NF-κB and COX-2 in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury. *Methods*: SD rats were randomly divided into four groups: sham group, model group, low-dose (2 mg/(kg·d)) and high-dose (4mg/(kg·d)) rosiglitazone group. Infarct volume and the expressions of NF-κB and COX-2 protein were measured in the rat brain. *Results*: Compared with the model group, rosiglitazone reduced the cerebral infarction volume significantly ($P<0.05$), and the effect of high-dose was more predominant than that of low-dose ($P<0.05$). Rosiglitazone also decreased the expressions of NF-κB and COX-2 protein greatly ($P<0.05$), and high-dose group showed significant difference with low-dose group ($P<0.05$). *Conclusion*: Rosiglitazone can significantly reduce the infarct volume and the expressions of NF-κB and COX-2 in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury. Rosiglitazone has a neuroprotective effect on cerebral ischemia/reperfusion injury.

【Key words】Rosiglitazone; Peroxisome proliferator-activated receptor γ; Nuclear factor-κB; Cyclooxygenase 2

缺血性脑血管疾病具有发病、致残、致死率高的特点,其中炎症损伤是缺血损伤中的重要环节,对此因素进行早期干预治疗,将对减轻脑缺血再灌注损伤有重要意义。过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR)γ 属于核受体超家族成员,是一种配体激活的转录因子,调控多种基因的转录和表达,近来研究表明 PPAR γ 的激活与神经系统的炎症[1]密切相关,有望成为治疗缺血性卒中新的干预靶点。本实验以 PPAR γ 特异性激动剂罗格列酮作为干预因素,利用线栓法建立大鼠大脑中动脉栓塞模型,观察脑梗死体积和核因子 -κB(Nuclear factor-κB, NF-κB)和环氧化酶 2(Cyclooxygenase, COX-2)的表达,探讨 PPAR γ 在脑缺血再灌注损伤中的作用。

作者介绍:李 岩(1980- ),女,硕士,研究方向:脑血管疾病基础与临床研究。

通讯作者:王东玉,女,教授,E-mail:wdy210@sohu.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康 SD 大鼠 78 只,250 ~ 300 g,由辽宁医学院动物实验中心提供。

### 1.2 主要试剂

罗格列酮(葛兰素史克公司);NF-κB P65、COX-2 一抗及二抗(武汉博士德生物工程有限公司);2,3,5 三苯基四氮

唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride,TTC,中国医药上海化学试剂公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、低剂量罗格列酮组、高剂量罗格列酮组,每组 21 只。低剂量罗格列酮组和高剂量罗格列酮组于术前分别给予 2 mg/(kg·d)和 4 mg/(kg·d)罗格列酮灌胃 3 d,假手术和模型组在相同时间给予等剂量的生理盐水,末次给药时间为术前 30 min。

1.3.2 模型制备 参照改良的 Longa 法[2]制备大鼠左侧大脑中动脉局部脑缺血再灌注模型。大鼠经 10% 水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉后,颈部正中切口,在左侧肩胛舌骨肌与胸锁乳突肌三角处暴露左颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,结扎左颈总动脉近心端、颈外动脉起始端。将鱼线一端烧成圆头,圆头直径约(0.26~0.30) mm,经 CAA 分叉处通过颈内动脉入颅,插至大脑中动脉起始部,插入深度约为(18.0 ± 0.5) mm。缺血 2 h 后,固定大鼠,轻轻提拉所留线头,拔出 10 mm,使血流再通。假手术组动物麻醉和手术过程与模型组相同,但不插鱼线。在手术结束大鼠麻醉清醒后按 Longa(0~4 分)5 分制评分标准[2]进行神经功能缺失程度评分。评分为 1~3 分的大鼠为合格脑缺血再灌注模型,对不合格大鼠所在组进行补充。术后保持环境温度在 25℃~30℃,再灌注 24 h 处死大鼠。

1.3.3 TTC 染色法测定脑梗死体积 4 组大鼠每组取 7 只,快速断头取脑 -20℃速冻 30 min,去除嗅球、小脑和低位脑干,脑组织从额极向后做连续冠状切面,厚度约为 2 mm,将脑片置入 37℃ TTC 染料中温浴 30 min。白色为梗死灶,红色为正常脑组织。数码相机拍照,应用图像分析系统测量脑梗死面积并计算脑梗死体积占大脑总体积的百分比。

1.3.4 NF-κB P65、COX-2 免疫组化检测 缺血再灌注大鼠以 10%水合氯醛 3 ml/kg 麻醉后,快速打开胸腔,经左心室灌流内固定后,断头取脑,在视交叉前 2 mm 至视交叉后 2 mm 处冠状切面切开,取中间脑组织放入相同固定液中继续外固定,4℃过夜。常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,连续冠状切片(厚 5 μm),每隔 5 片取 1 片,用 SABC 免疫组化染色法检测 NF-κB P65 和 COX-2 的表达。操作步骤严格按试剂盒说明书进行,阴性对照以 PBS 代替NF-κB P65 和COX-2 一抗。光镜下观察缺血侧 NF-κB P65 和 COX-2 蛋白阳性细胞的空间分布。

1.3.5 NF-κB P65 和 COX-2 Western blot 检测 取缺血侧视交叉后 2 mm 皮层脑组织用于 Western blot 检测。将脑组织剪成碎块,加入 0.3 ml 裂解液,超声波细胞破碎 20 s。5℃12 000 r/min、离心 30 min,取上清分装 50 μl/ 管,用 Bradford 蛋白染色法检测蛋白含量。2 × 上样缓冲液 30 μl+30 μl 样品上清裂解液,混匀后沸水浴上煮沸 5 min。制备 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶,每孔加变性后的总蛋白含量皆为 50 μg。在 100 V 下电泳,至溴酚兰到凝胶底部。电压 80 V 恒压,1.5 h 将蛋白电转移到 PVDF 膜上。用含 5%脱脂奶粉的封闭缓冲液室温封闭 1 h。加入抗体 4℃孵育过夜,加入辣根酶标记过的二抗,室温震荡孵育 1 h。用 ECL 试剂盒显色,用发光法进行 X 光胶片曝光,然后进行条带扫描和分析 NF-κB P65 和 COX-2 的表达。

1.3.6 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析,检测数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。$P<0.05$ 提示差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 脑梗死体积

缺血/再灌注后,假手术组大鼠脑组织未见梗死灶;模型组大鼠左侧额顶叶和纹状体可见较明显的苍白梗死灶。低剂量罗格列酮组较模型组脑梗死体积减小($P< 0.05$);高剂量罗格列酮组较模型组脑梗死体积减小($P< 0.01$);2 个不同剂量的罗格列酮组,脑梗死体积有显著差异($P< 0.05$),见表 1。

2.2 NF-κB P65 和 COX-2 蛋白免疫组化染色

各组大鼠缺血侧脑组织 NF -κB P65 蛋白的空间分布。假手术组偶见 NF-κB P65 阳性细胞;模型组在缺血侧额顶叶皮层和纹状体 NF-κB P65 阳性细胞显著增加,胞核着色;与模型组比较,低剂量罗格列酮组 NF-κB P65 阳性细胞数减少,高剂量罗格列酮组 NF-κB P65 阳性细胞数减少明显,见图 1~4。

各组大鼠缺血侧脑组织 COX-2 蛋白的空间分布。假手术组偶见 COX-2 阳性表达;模型组在缺血侧额顶叶皮层和纹状体 COX-2 阳性细胞显著增加,胞浆内着色;与模型组比较,低剂量罗格列酮组 COX-2 阳性表达减弱,高剂量罗格列酮组 COX-2 阳性表达明显减弱,见图 5-8。

2.3 Western blot 检测 NF-κB P65 和 COX-2 蛋白的含量

各组大鼠缺血侧皮层 NF-κB P65 蛋白含量表达比较,见表 1 和图 9。与假手术组比较,模型组 NF-κB P65 蛋白表达量增加($P<0.01$);与模型组比较,低剂量罗格列酮组NF-κB P65

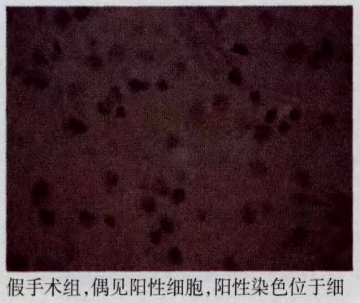
表 1 各组大鼠脑梗死体积与皮层 NF-κB P65 和 COX-2 蛋白表达灰度值($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 梗死体积(%) | NF-κB P65($\times 10^3$) | COX-2($\times 10^3$) |
|---|---|---|---|
| 假手术组 | 0.00 ± 0.00 | 95.63 ± 1.56 | 116.00 ± 1.29 |
| 模型组 | 36.41 ± 0.46* | 160.87 ± 4.94* | 228.79 ± 2.44* |
| 低剂量罗格列酮组 | 33.98 ± 0.70△ | 140.14 ± 2.64△ | 217.80 ± 1.43△ |
| 高剂量罗格列酮组 | 31.53 ± 0.61▲※ | 129.69 ± 1.83▲※ | 204.30 ± 2.97▲※ |

注:*$P<0.01$ 与假手术组比较;△$P<0.05$ 与模型组比较;▲$P<0.01$ 与模型组比较;※$P<0.05$ 与低剂量罗格列酮组比较

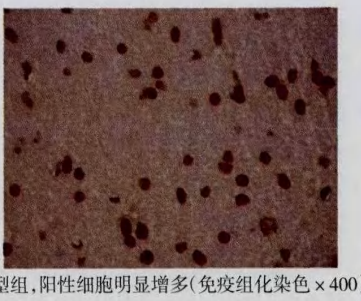
蛋白表达量减少（$P<0.05$），高剂量罗格列酮组 NF-κB P65 蛋白表达量减少（$P<0.01$）不同剂量组间 NF-κB P65 蛋白表达量有显著差异（$P<0.05$）。

各组大鼠缺血侧皮层 COX-2 蛋白含量表达比较，见表 1 和图 9。与假手术组比较，模型组 COX-2 蛋白表达量增加（$P<0.01$）；与模型组比较，低剂量罗格列酮组 COX-2 蛋白表达量减少（$P<0.05$），高剂量罗格列酮组 COX-2 蛋白表达量减少（$P<0.01$），不同剂量组间 COX-2 蛋白表达量有显著差异（$P<0.05$）。



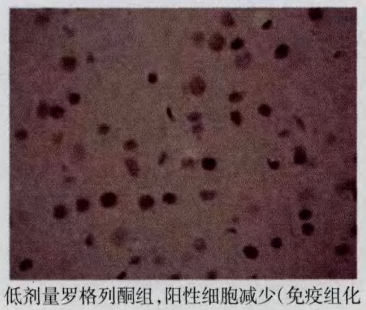
假手术组，偶见阳性细胞，阳性染色位于细胞核（免疫组化染色 × 400）

**图 1　假手术组缺血皮层 NF－κB P65 免疫组化染色**



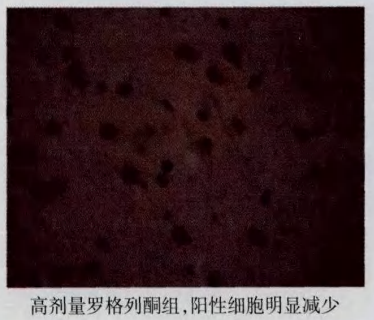
模型组，阳性细胞明显增多（免疫组化染色 × 400）

**图 2　模型组缺血侧皮层 NF－κB P65 免疫组化染色**



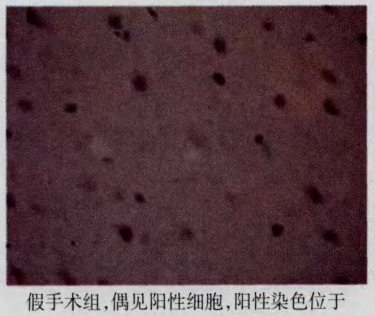
低剂量罗格列酮组，阳性细胞减少（免疫组化染色 × 400）

**图 3　低剂量罗格列酮组缺血皮层 NF－κB P65 免疫组化染色**



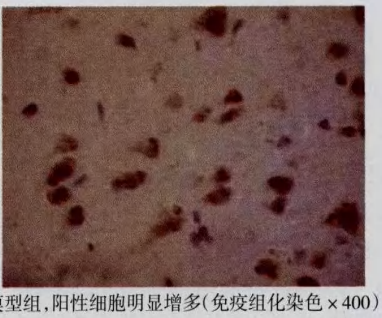
高剂量罗格列酮组，阳性细胞明显减少（免疫组化染色 × 400）

**图 4　高剂量罗格列酮组缺血侧皮层 NF－κB P65 免疫组化染色**



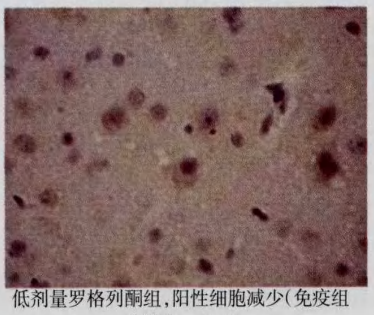
假手术组，偶见阳性细胞，阳性染色位于细胞浆（免疫组化染色 × 400）

**图 5　假手术组缺血皮层 COX-2 免疫组化染色**



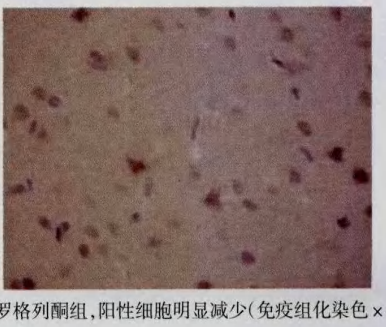
模型组，阳性细胞明显增多（免疫组化染色 × 400）

**图 6　模型组缺血侧皮层 COX-2 免疫组化染色**



低剂量罗格列酮组，阳性细胞减少（免疫组化染色 × 400）

**图 7　低剂量罗格列酮组缺血皮层 COX-2 免疫染色**



高剂量罗格列酮组，阳性细胞明显减少（免疫组化染色 × 400）

**图 8　高剂量罗格列酮组缺血侧皮层化 COX-2 免疫组化染色**

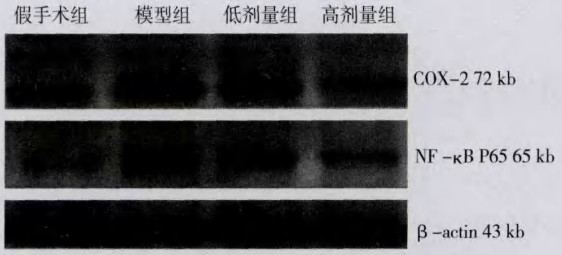



图 9 Western blot 检测各组大鼠皮层 NF -κB P65 和 COX-2 蛋白的表达

## 3 讨 论

PPAR 是一类由配体激活的核转录因子超家族成员。PPAR 存在 α、δ/β 和 γ 3 种表型。其中 PPARγ 研究最为深刻。罗格列酮是 PPARγ 的特异性激动剂，属于噻唑烷二酮类药物(Thiazolidionedine,TZDs),在糖尿病和肥胖症中研究的较多，近年来的研究表明,PPARγ 激动剂具有强大的抗炎作用,在心脏、肾脏、大脑等缺血(或再灌注)损伤中的有良好保护作用[3-5]。其机制复杂,可抑制 NF-κB、信号转导转录激活物和激活蛋白 -1 的转录表达[6],及单核细胞趋化蛋白、COX-2 、细胞间粘附分子 -1 、白介素 -8 、P- 选择素、诱导型一氧化氮合酶等细胞因子和粘附分子的表达,同时对一些可以导致基质水解的蛋白水解酶也表现出明显的抑制作用[6,7]。而上述因子在脑缺血病变时表达上调，并在脑缺血性炎性病理损伤的发生发展中起了重要的作用。

NF-κB 是参与体内多种免疫和炎症反应的转录因子。脑缺血后,活化的 NF-κB 进入细胞核内启动靶基因的转录,加重缺血再灌注损伤。COX-2 的启动子序列中含有 NF-κB 特异结合序列,该序列与 NF-κB 结合后可以促进 COX-2 基因的转录,即 COX-2 是 NF-κB 的下游靶基因之一。同时COX-2 也是花生四烯酸代谢为前列腺素(Prostaglandin,PG)和血栓烷素(Thromboxane,TX) 的关键酶。PG 和 TX 可加重血小板及中性粒细胞聚集,两者均加重缺血性损伤。近年来研究证明在缺氧性神经细胞中 COX-2 的高表达可直接损伤神经细胞[8]。

本实验应用罗格列酮干预后,脑梗死体积明显减小,提示其可能具有减轻脑缺血再灌注损伤。模型组缺血侧皮层 NF-κB 和 COX-2 表达较假手术组显著增多,与前人的实验结果一致，提示 NF-κB 和 COX-2 可能参与了脑缺血再灌注损伤过程[9]。应用罗格列酮后缺血侧 NF-κB 和 COX-2 表达明显下降,提示 PPAR γ 的激活降低了 NF-κB 和 COX-2 的表达,其程度随剂量的增加而增加,这可能是其减小脑梗死体积的机制之一。

综上所述,PPAR-γ 激动剂罗格列酮可能通过抑制NF-κB 和 COX-2 激活,减小缺血再灌注后的脑梗死体积,其可能具有减轻脑缺血再灌注损伤的作用。但 PPAR-γ 是通过哪些机制抑制 NF-κB 的激活还需进一步研究。

## 参 考 文 献

[1] Victor N A, Wanderi E W, Gamboa J, et al.Altered PPAR γ expression and activation after transient focal ischemia in rats[J].Eur J Neurosci, 2006,24:1653-1663.

[2] 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.

[3] Ravingerova T, Adameova A, Kelly T, et al.Changes in PPAR gene expression and myocardial tolerance to ischaemia: relevance to pleiotropic effects of statins [J].Can J Physiol Pharmacol, 2009,87(12):1028-1036.

[4] Matsuyama M, Yoshimura R, Hase T, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in renal ischemia-reperfusion injury [J].Transplant Proc, 2005,37(4):1684-1685.

[5] Zhao X, Strong R, Zhang J, et al. Neuronal PPAR gamma deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 2009,29(19):6186-6195.

[6] Ricote M, Li A C, Willson T M, et al.The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation[J].Nature, 1998,391(6662):79-82.

[7] Tureyen K, Kapadia R, Bowen K K, et al.Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents[J].Journal of Neurochemistry, 2007, 101(1):41-56.

[8] 张艳桥，张一娜，陈仁武，等.细胞周期蛋白 D1 在环加氧酶 - 2 诱导的大鼠神经细胞死亡中的作用[J].中风与神经疾病杂志，2005, 22(4):335-337.

[9] Nogawa S, Zhang F, Ross M E, et al. Cyclooxygenase-2 gene exoression in neurons contributes to ischemic brain damage [J]. J Neurosci, 2005, 17(18):2746-2755.

(责任编辑：冉明会)