维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0329-02

大鼠脑缺血再灌注损伤后 NF-κB 表达的研究

吴 禹,胡长林

(重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨 NF-κB 在大鼠脑缺血再灌注后炎性反应中的作用。方法:制备脑缺血再灌注模型。24h 后,免疫组化检测假手术组、模型组和干预组中 NF-κB p65 的表达,测定脑组织匀浆中性粒细胞趋化因子(CINC)含量变化,同时观察海马 CA1 区病理组织学改变。结果:模型组大鼠脑组织的 NF-κB p65 阳性表达和 CINC 含量与假手术组相比明显增高,$P<0.05$;干预组大鼠脑组织的 NF-κB p65 阳性表达和 CINC 含量与模型组相比明显受抑制,$P<0.05$。干预组脑组织病理改变较模型组轻。结论:NF-κB 参与了脑缺血再灌注后炎性反应中前炎性因子的调控过程。

【关键词】核转录因子 -κB;缺血再灌注;大鼠

【中国图书分类法分类号】R743.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-24

Study on the expression of nuclear factor-κB in ischemia-reperfusion rats

WU Yu, et al

(*Department of Neurology, the Second Affliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of nuclear factor-κB (NF-κB) in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. *Methods*: Rat models of cerebral ischemia-reperfusion were established. 24hours later, the expression of NF-κB in rat brain of sham-operation group, operation group and intervention group was detected with immunohistochemistry method, Cytokin-induced neutrophil chemotactics(CINC) in rat brain were measured and histopathological examinations were conducted on the hippocampal CA1. *Results*: The expression of NF-κB p65 and CINC in the operation group increased significantly compared with the sham-operation group($P<0.05$). But the expression of NF-κB p65 and CINC in the intervention group were inhibited significantly compared with the operation group($P<0.05$).The pathological changes of the intervention group were slighter than those of the operation group. *Conclusion*: The results suggest that NF-κB may play an important role in the release of inflammation factors and gathering of inflammation cells induced by ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 Nuclear factor-kappa B; Ischemia-reperfusion; Rat

脑缺血再灌注时的炎症反应促进了继发性脑损害的发生,是脑缺血再灌注损伤的主要原因之一。NF-κB 与炎症反应密切相关,参与多种炎症介质及细胞因子的基因调控[1]。因此,本研究采用 NF-κB 特异性抑制剂吡咯烷二硫氨基甲酸盐(PDTC)对大鼠脑缺血再灌注模型进行干预,观察脑组织核转录因子 -κB 水平和细胞因子诱导的中性粒细胞趋化因子(CINC)含量变化,探讨大鼠脑缺血再灌注时脑组织炎性作用机制。

1 材料和方法

作者介绍:吴 禹(1972-),男,主治医师,硕士,研究方向:缺血性脑血管病的炎性反应机制。

通讯作者:胡长林,男,教授,E-mail:hhccll@yahoo.com.cn。

1.1 试验动物

选择 36 只健康雄性 SD 大鼠,10~12 月龄,体重(220±19)g,由重庆医科大学动物中心提供。随机分为 3 组,假手术组、模型组和干预组每组 12 只,室温 22℃下,颗粒饲料喂养。

1.2 主要试剂

一抗兔抗鼠单克隆 NF-κB p65 抗体、二抗小鼠抗兔 IgG 及亲和素 - 辣根过氧化物酶复合物(北京中杉生物技术有限公司);XSZ-D2 型光学显微镜(重庆光学仪器厂);德国 leicaQ500 图文处理系统。CINC 试剂盒(日本免疫生物研究所)。

1.3 大鼠全脑缺血再灌注模型的制备

动物用 0.4%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔麻醉,取仰卧位,暴露颈部,从颈部正中切开,分离暴露双侧颈总动脉,用无创微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 5min 后松开动脉夹,制成再灌

维普资讯 http://www.cqvip.com

脑缺血模型大鼠脑组织 NF-κB p65 阳性细胞数和 CINC 变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NF-κB p65 阳性细胞数(个)	CINC(ng/L)
假手术组	6	3.54 ± 0.38	5.86 ± 0.72
模型组	6	62.78 ± 7.47*	18.46 ± 3.89*
干预组	6	17.17 ± 1.78△	8.13 ± 1.09△

模型组与假手术组比较,* 表示 $P<0.05$;干预组与模型组比较,△表示 $P<0.05$

注模型。干预组于术后 6h 经尾静脉注射 PDTC 50mg/kg。假手术组动物麻醉后仅分离双侧颈总动脉,不阻断血流。

1.4 实验方案

动物模型复制 24h 后 3 组大鼠被断头处死,快速取脑,去除脑干和小脑,大脑半球用 0℃生理盐水冲洗,除去血液,滤纸拭干。每组中 6 只称重,加入预冷的双蒸水中(0℃),用组织匀浆机 13 000r/min 制成 10%的脑组织匀浆。离心 3 000 r/min× 15min,取上清液待检。CINC 测定采用 ELISA 法。

每组余 6 只于视交叉后 1mm 及 4mm 冠状切开脑组织,甲醛固定,包埋成石蜡切片,采用连续切片行 HE 染色和免疫组织化学染色。部分切片常规脱蜡水化,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶 10min,滴加复合消化液消化 5min,蒸馏水洗涤,滴加正常山羊血清封闭 20min。滴加一抗兔抗鼠单克隆 NF-κB p65 后,按 ABC 试剂盒说明书操作。DAB 充分显色,镜下控制反应时间,常规脱水、透明、封片,阴性对照以 PBS 代替一抗,余步同上。光学显微镜下细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。100 倍物镜下随机选择 5 个不重叠视野观察,采用德国 leicaQ500 图文处理系统计数阳性细胞,取其平均值为最后结果。

1.5 统计学方法

实验结果运用 SPSS12.0 统计学软件包分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 q' 检验。

2 结 果

2.1 大鼠脑组织内 NF-κB p65 的表达和 CINC 含量变化

假手术组可见极少量阳性表达细胞;模型组可见较多 NF-κB p65 阳性表达,并有核移位现象,包括神经元、神经胶质细胞、血管内皮细胞等,与假手术组比较有显著性差异($P<0.05$)。干预组可见少量阳性表达细胞与模型组比较有显著性差异($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组的 CINC 含量增高有显著性差异($P<0.05$);与模型组比较,干预组的 CINC 含量明显受抑制($P<0.05$)。

2.2 大鼠脑组织病理学观察

光镜下假手术组大鼠神经细胞排列整齐,神经元结构完整,核染色较淡,尼氏体丰富,神经基质无水肿;模型组神经元呈现坏死性改变,结构模糊,胞体肿胀,细胞核和细胞浆界线不清,其周围出现宽大的透亮区。在梗塞灶的中央区的神经元消失,在梗塞灶的周边区仍有少许残存的神经元,均被一些深染色的呈圆形、三角形或梭形细胞所包围。干预组的病理学改变较模型组轻。

3 讨 论

有研究表明,炎症反应在脑缺血再灌注损伤中起重要作用,主要是多形核中性粒细胞聚集于梗死区,加重脑组织的坏死,细胞因子在缺血再灌注的炎症变化中扮演重要角色[2,3]。

NF-κB 是一组重要的转录调节因子,正常情况下为 RelA(p65)和 NF-κB1(p50)的异源二聚体。NF-κB 通常与抑制蛋白 I-κBα结合成无活性的形式存在于胞质中,当受刺激后被激活,经历快速和大量的磷酸化后被非特异性蛋白酶水解,从而使 Rel 蛋白的核定位信号暴露,导致 NF-κB 快速移至核内,结合在被诱导基因启动子序列上与之相同的 κB 位点,致转录增加,蛋白质合成增加[4]。缺血缺氧作为刺激,激活 NF-κB p65,诱导神经元、血管内皮细胞和胶质细胞产生前炎性因子,如细胞因子诱导的中性粒细胞趋化因子(CINC)、肿瘤坏死因子(TNF)-α、白介素(IL)-1 等,诱使炎性细胞渗出。

CINC 作为大鼠中性粒细胞趋化因子,在功能上相当于人体内 IL-8,不仅具有强烈的趋化中性粒细胞作用,引起白细胞侵入脑实质,机械阻塞微循环通道,影响周围组织的血液供应;而且能诱导中性粒细胞的活化,包括多形核中性粒细胞(PMN)表面粘附分子的表达和 PMN 脱颗粒作用形成呼吸爆发,释放大量蛋白酶,引起自由基诱发脂质过氧化反应,损伤神经元。

PDTC 作为一种抗氧化剂,可通过选择性抑制 I-κB 降解和 NF-κB 核转位,从而抑制 NF-κB 活

(下转第 340 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

显微镜下呈现为黑色。由于龋病病变区域脱矿产生孔隙,孔隙大者病变区显示为正性双折射,孔隙小者,由于不易被介质浸入,当偏振光通过时,产生了散射,偏光显微镜下呈现为黑色。本次实验借助釉质脱矿反应区域在偏光显微镜下的形态学改变,测量釉质脱矿后龋损深度大小、范围以及形态学变化。

本次研究证实,由于牙齿咬合面特殊结构的存在,点隙裂沟多,钙化程度较差,因此,其对抗人工龋蚀的能力较差,但是经过涂氟保护漆以后,咬合面脱矿反应受到控制,说明氟保护漆能够有效的使氟化物渗透到窝沟深处,发挥防龋的作用。

很多研究表明,局部用氟有显著的防龋作用。局部用氟时所形成的氟化钙和氟磷灰石与羟磷灰石相比抗酸溶解性更强,同时局部用氟时在釉质表面形成的氟化钙样物质可作为氟库释放氟离子,强化了抑制脱矿的能力[8]。候玮等[9]研究证实,氟保护漆和双氟漆局部使用后,能够有效抗酸脱矿能力,它们附着牙面时间长,一方面延长了氟化物与釉质表面的接触时间,提高了氟与牙齿的结合量,另一方面形成的氟化钙和氟化物涂膜本身作为氟库,不断释放氟离子,抑制釉质的脱矿。本次研究结果表明,离体人牙经过涂氟保护漆处理后, 与空白组比较,所形成的人工龋表层较厚,表层下脱矿较轻,形成的龋损深度较浅。

本次研究表明,虽然氟保护漆含氟浓度比 0.05% 氟化钠稍高一些,但是其预防脱矿的能力却大大提高,不论是光滑面还是窝沟,均体现了明显的抗龋优势,说明涂膜类含氟制剂的防龋作用一方面是氟离子起主要作用,另一方面是依靠涂膜基质的特性发挥缓释作用,氟保护漆良好的基质材料可能是其发挥良好抗酸溶解性能的原因[10]。

总之,2 种浓度氟保护漆之间抗龋存在差异性,但是两者均能够促进釉质的再矿化,阻碍早期龋的形成和发展,增强牙齿硬组织的抗龋能力。

参 考 文 献

[1] Ramires I, Buzalaf MA. Fifty years of fluoridation of public water supplies in Brazil: benefits for the control of dental caries[J]. Cien Saude Colet, 2007; 12(4): 1057-1065.

[2] 林居红,王金华,杨 刚,等.不同浓度氟保护漆在体外的释放研究[J]. 重庆医科大学学报,2005;30(1):111-113.

[3] 林居红,王金华,杨 刚,等.不同浓度氟保护漆抑制人牙釉质脱矿能力的体外研究[J]. 重庆医科大学学报,2005;30(3):429-434.

[4] Schmit JL, Staley RN, Wefel FS, et al. Effect of fluoride varnish on demineralization adjacent to brackets bonded with RMGI cement [J]. Am J Orthod Dentofacial Oentofacial Orthop, 2002; 122 (2): 125-134.

[5] Fjeld M, Ogaard B. Scanning electron microscopic evaluation of enamel surfaces exposed to 3 orthodontic bonding systems[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2006; 130(5): 575-581.

[6] Featherstone J, Barrett N, Fride D, et al. CO_2 laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel[J]. J Dent Res, 1998; 77(6): 1397-1403.

[7] Anderson AM, Kao E, Gladwin M, et al. The effects of argon laser irradiation on enamel decalcification: An in vivo study[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2002; 122(3): 251-259.

[8] Truin GJ, Vant Hof M. The effect of fluorid gel on incipient carious lesions in a low-caries child population[J]. Community Dent Oral Epidemiol, 2007; 35(4): 250-254.

[9] 候 玮,李玉晶,葛丽华.不同氟制剂抗龋作用的实验研究[J].北京口腔医学,2004;12(1):36-37.

[10] Shen C, Autio-Gold J. Assessing fluoride concentration uniformity and fluoride release from three varnishes[J]. J Am Dent Assoc, 2002; 133(2): 176-182.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 330 页)

性。通过观察 PDTC 干预大鼠脑缺血再灌注过程的结果,发现 NF-κB 水平与 CINC 含量呈一定相关性,NF-κB受到抑制后,CINC 含量也明显下降,说明 NF-κB主要参与了 CINC 的转录调节,可证实 NF-κB在脑缺血再灌注早期炎症反应过程中的重要作用。

参 考 文 献

[1] 黄 燕,刘兴奎,喻 田,等.缺血预处理和吡那地尔预处理对 NF-κB 的影响及其心肌保护作用[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(3):326-329.

[2] Nurmi A, Lindsberg PJ, Koistinaho M, et al. Nuclear factor-KappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia[J]. Stroke, 2004; 35(4): 987-991.

[3] Finkel E. The mitochondrion: Is it central to apoptosis[J]. Science, 2001; 292(5517): 624-626.

[4] Sun Z, Andersson R. NF-Kappa B activation and inhibition: a review[J]. Shock, 2002; 18(2): 99-106.

(责任编辑:冉明会)