

电针对脑缺血大鼠 NF- $\kappa$ B 及 TNF- $\alpha$  表达的影响\*孔立红<sup>1</sup> 刘胜洪<sup>2</sup> 毛娟娟<sup>1</sup> 周 华<sup>1</sup> 杜艳军<sup>1</sup>

**摘要** 目的:探讨核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)活性和肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )在脑缺血再灌注大鼠海马表达变化的规律和电针干预对其影响。方法:将 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、电针治疗组。采用改良线栓法制备局灶性脑缺血(MCAO)再灌模型,电针“大椎”、双侧“内关”穴。运用免疫组化检测法观察海马组织 NF- $\kappa$ B-p65 蛋白的表达及核转位;用放射免疫法测定各组大鼠海马组织中 TNF- $\alpha$  含量的变化。结果:模型各组大鼠缺血侧海马 CA1 区 NF- $\kappa$ B-p65 蛋白表达和海马组织 TNF- $\alpha$  含量显著增高( $P<0.01$ )。与模型各组大鼠相比,电针治疗组缺血侧海马组织 CA1 区 NF- $\kappa$ B-p65 蛋白表达和 TNF- $\alpha$  含量均显著降低。结论:TNF- $\alpha$  的表达上调后可活化 NF- $\kappa$ B,参与脑损伤后继发性炎症反应过程,电针能抑制其活化可以减轻脑缺血再灌注时的炎症反应,发挥神经保护作用。

**关键词** 电针;脑缺血再灌注;海马;核转录因子;肿瘤坏死因子

中图分类号:R245,R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-08-0711-04

Effects of acupuncture on the expression and content of nuclear factor- $\kappa$ B and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rat brain after cerebral ischemia/reperfusion/KONG Lihong, LIU Shenghong, MAO Juanjuan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(8):711—714

**Abstract Objective:** To investigate effects of acupuncture on the expression and content of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in hippocampus of rat brain after cerebral ischemia/reperfusion. **Method:** SD rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, and electroacupuncture group. The rat's middle cerebral artery was blocked to establish cerebral ischemia (MCAO)/reperfusion model with suturing MCA. “Dazhui”(BU14), “Neiguan”(PC6) of both side were treated with electroacupuncture. The expression and content of nuclear factor- $\kappa$ B in hippocampus were detected with immunohistochemistry and the content of TNF- $\alpha$  in hippocampus were detected by means of radio-immunoassay (RIA). **Result:** The expression of NF- $\kappa$ B-p65 in ischemic hippocampi CA1 and content of TNF- $\alpha$  in hippocampus of rats in model group were significantly higher than those in electroacupuncture group ( $P<0.01, <0.05$ ). **Conclusion:** NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  may play an essential role in injury-induced inflammatory response that leads to secondary insults after brain injury. Electroacupuncture may inhibit the expression of NF- $\kappa$ B in hippocampus of rat brain after cerebral ischemia/reperfusion, reduce the inflammatory response and block it migrating into nucleus. Electroacupuncture can provide the protective effects on neuronal cells after cerebral ischemia/reperfusion in rats.

**Author's address** Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, 430061

**Key words** electroacupuncture; cerebral ischemia reperfusion; hippocampus; nuclear factor- $\kappa$ B; tumor necrosis factor- $\alpha$

脑缺血再灌注时的炎症反应促进了继发性脑损害,是脑缺血再灌注损伤的主要原因之一。近年来的研究发现,核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)与炎症反应机制密切相关,并且是多种信号转导途径的汇聚点。缺血再灌注后产生的炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 等激活后,可诱导 NF- $\kappa$ B 转录各种急性期蛋白的基因表达,进一步促进炎症的反应,而这些复苏后的局部和全身的炎症反应又可能通过 NF- $\kappa$ B 信号转导途径诱导相关的细胞发生凋亡<sup>[1]</sup>。为了探讨电针对短暂脑缺血再灌注后炎性细胞因子介导选择性易损区—海马凋亡的信号转导途径的影响,本研究观察了大鼠局灶性脑缺血后海马组织中 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  表达和含量及针刺对其的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

清洁级健康 SD 大鼠 120 只,雌雄不限,体重为  $200\pm 20$ g,由湖北中医学院实验动物中心提供。随机分为 4 组:正常对照组 10 只,假手术对照组 27 只,模型组 36 只,模型加电针组 36 只。余下 11 只以造模备用。

### 1.2 试剂及主要仪器

NF- $\kappa$ B-p65 兔单克隆抗体,购于 Santa Cruz, USA;牛血清白蛋白,辣根过氧化物酶, $\beta$ -巯基乙醇,

\* 基金项目:湖北省自然科学基金课题(2003ABA154)

1 湖北中医学院,武汉,430061

2 华中科技大学同济医学院

作者简介:孔立红,女,副教授,博士

收稿日期:2008-10-25

DAB 蛋白免疫印迹检测试剂,均购于 Sigma,USA; SABC 系统及 DAB 显色系统等,购于北京中山生物技术有限公司。日产 Olympus 光学显微镜。日产 Nikon 数码照相机。

TNF- $\alpha$  放射免疫试剂盒,购于北京科美东雅生物技术有限公司;50mM 醋酸缓冲液(pH4.75),无水乙醇,生理盐水,由华中科技大学同济医学院组胚教研室提供(北京中山生物技术有限公司)。LG-10 低温高速离心机,(北京医用离心机厂);GC-1200  $\gamma$  放射免疫计数器(中国科技大学科技实业公司中佳光电仪器分公司)。

### 1.3 造模方法

选择直径为 0.26—0.28mm 单股缝合尼龙线,长 60mm,将插入端加热熔化,使之成为光滑球面,直径约 0.30mm,用酒精清洁后置于生理盐水中备用。

局灶型脑缺血(MCAO)再灌模型的建立采用改良线栓法<sup>[2]</sup>。

### 1.4 模型的筛选标准

采用 Zea-longa<sup>[3]</sup>评分方法,当造模大鼠清醒后,即评定动物神经功能缺损。0 分:正常;1 分:对侧肢体屈曲;2 分:拖住尾巴后拉时,对侧肢体无力。3 分:拖住尾巴后拉时,向对侧转圈;4 分:自发向对侧转圈或倾倒;5 分:无任何自发活动。

神经功能障碍在 1 分以上的大鼠才视为成功模型。

### 1.5 实验动物处理方法

正常对照组:10 只,正常给水给食,不予处理,其中 6 只灌注固定处死取脑,另 4 只大鼠,断头处死,在冰盘上迅速取海马组织。

假手术对照组:27 只,大鼠麻醉切开颈部皮肤后,仅分离 CCA,ECA 及 ICA 至 PPA,不插线栓。按时相分为 24h、48h、72h 3 组,各 9 只。其中,假手术后第 24、48、72 小时分别灌注固定处死取脑,每组各 6 只。另每组中各取 3 只大鼠,按时相断头处死,在冰盘上迅速取海马组织。

模型组:36 只,栓塞 30min 后再灌注。按时相分为 24h、48h、72h 3 组,各 12 只。其中,于缺血再灌后第 24、48、72 小时分别灌注固定处死取脑,每组各 8 只。另每组中各取 4 只大鼠,按时相断头处死,在冰盘上迅速取海马组织。

电针治疗组:36 只,栓塞 30min 后再灌注。按时相分为 24h、48h、72h 3 组,各 12 只。造模成功后进行电针治疗,参照华兴邦制定的《实验动物穴位图谱》取大椎、双侧内关穴。用 28 号 1 寸毫针针刺,大椎与缺血侧(右侧)内关接通 G-6805 电针治疗仪,

采用连续波,频率 120 次/min,强度 1mA,以局部肌肉轻微抖动为度,每次持续刺激 30min。于缺血再灌后 3h 针刺 1 次,以后每 12h 针刺 1 次。其中,于缺血再灌后第 24、48、72 小时分别灌注固定处死取脑,每组各 8 只。另每组中各取 4 只大鼠,按时相断头处死,在冰盘上迅速取海马组织。

### 1.6 标本采集与处理

每组中各取 6 或 8 只大鼠,动物完成观察时间后,以 10%水合氯醛按标准量麻醉大鼠,开胸暴露心脏,将灌注针头从心尖部位插入升主动脉,剪开右心耳,依次迅速灌注 20℃的 0.9%生理盐水 200ml、4℃的 4%多聚甲醛 200ml(含 0.1%DEPC),灌毕迅速取脑,在视交叉平面前后 2mm 处将脑冠状切面切开,留取中间部分置于 4℃的 4%多聚甲醛固定液中过夜。常规上行脱水、透明后用石蜡包埋,连续切片,切片厚 5 $\mu$ m,每隔 10 张取一张,使每一张切片上都有海马,然后在 60℃左右的温水中充分展开,用玻片贴片。每份组织取 2 张待用。

每组中各取 3 或 4 只大鼠,按时相断头处死,在冰盘上迅速分离出病灶侧(正常组相对应侧)的海马区脑组织,称取 50mg 左右置于冰浴中盛有 50mM 醋酸缓冲液(pH4.75)的匀浆器中,将组织粉碎匀浆后的悬浮液移入 10ml 试管内,用 2ml 无水乙醇洗匀浆器,然后将洗后的乙醇倒入悬浮液内静置 5min,3500r/min 离心 15min,将上清液收集在青霉素小瓶内,再用 75%乙醇 1ml 洗匀浆器连续 2 次,用该 2ml 75%乙醇洗沉淀,混匀,3500r/min 离心 15min,合并上清液,60℃水浴中吹干。4℃保存备测。

### 1.7 指标检测及方法

**1.7.1 免疫组化(SABC 法):**切片经常规脱蜡、脱水、3% $H_2O_2$  灭和内源性酶、微波抗原修复,正常山羊血清封闭,滴加 NF- $\kappa$ B-p65 兔单克隆抗体一抗(1:50),湿盒中 37℃孵育,120min。滴加一滴相应二抗, SABC 反应, DAB 显色,苏木素不复染。分色、脱水、透明、封片、光学显微镜下观察各组大鼠病灶侧(右侧),正常组取相对应侧。阴性对照:用正常山羊血清代替一抗。

**1.7.2 TNF- $\alpha$  含量测定:** TNF- $\alpha$  含量测定用放射免疫法,具体操作依据试剂盒说明书进行。

### 1.8 图像分析

在光镜下 NF- $\kappa$ B-p65 免疫反应阳性细胞为细胞核染成棕黄色或有棕黄色颗粒沉积(见图 1),在光镜 400 倍高倍镜视野下,实验各组片缺血侧海马 CA1 区域中随机取 8 个非重叠的视野,采用 HPIAS-1000 计算机高清晰彩色图像分析仪(湖北)

对切片进行定量分析。用显微测微尺进行计数。

### 1.9 统计学分析

所有数据以平均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较若满足正态性且方差齐,采用方差分析和  $q$  检验,否则采用  $H$  检验和  $q$  检验。所有数据均输入数据库,以 SPSS11.0 软件统计包处理。

## 2 结果

### 2.1 大鼠海马 NF- $\kappa$ B-p65 蛋白的表达

正常组,假手术组大鼠海马 CA1 区中可见 NF- $\kappa$ B-P65 蛋白表达,多数阳性细胞 NF- $\kappa$ B 未发生核转位,极少数的阳性细胞 NF- $\kappa$ B 已转位入核,但胞浆和胞核着色均较浅淡。模型组缺血侧海马 CA1 区 NF- $\kappa$ B-P65 蛋白表达明显,NF- $\kappa$ B 核转位细胞增多,可见胞浆和胞核均深染的核转位大锥体神经细胞,见图 1(见彩色插页),与正常组,假手术组相比有极显著性差异( $P<0.01$ );电针治疗各组大鼠缺血侧海马 CA1 区中也可见 NF- $\kappa$ B-P65 蛋白表达,NF- $\kappa$ B 核转位阳性细胞,见图 2(见彩色插页),但与同时相模型各组比较有非常显著性意义( $P<0.01$ )。电针可降低 NF- $\kappa$ B-P65 蛋白的活性,阻滞其转位于核,见表 1。

### 2.2 大鼠海马 TNF- $\alpha$ 含量变化

假手术组大鼠海马组织 TNF- $\alpha$  含量虽有一定升高,但与正常组比较无显著意义( $P>0.05$ );模型第 24 小时组大鼠海马组织 TNF- $\alpha$  含量即明显升高达到峰值,之后含量仍维持在较高水平,与正常组、假手术组比较有显著性差异( $P<0.01$ );电针组大鼠缺血侧海马组织 TNF- $\alpha$  含量均有所降低,与模型组同时相比较有显著意义( $P<0.05$ ),并随时间的推移逐渐趋于正常,见表 2。

表 1 各组大鼠海马 CA1 区 NF- $\kappa$ B

转位于核阳性细胞数比较 ( $\bar{x}\pm s$ , 个数/mm<sup>2</sup>)

| 组别   | 鼠数 | 第 24 小时                     | 第 48 小时                     | 第 72 小时                     |
|------|----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常组  | 6  | 5 $\pm$ 0.62                | —                           | —                           |
| 假手术组 | 18 | 9 $\pm$ 1.16 <sup>①</sup>   | 10 $\pm$ 1.49 <sup>①</sup>  | 8 $\pm$ 0.95 <sup>①</sup>   |
| 模型组  | 24 | 18 $\pm$ 2.53 <sup>②③</sup> | 43 $\pm$ 5.62 <sup>②③</sup> | 34 $\pm$ 4.17 <sup>②③</sup> |
| 治疗组  | 24 | 10 $\pm$ 1.62 <sup>④①</sup> | 29 $\pm$ 3.08 <sup>④②</sup> | 16 $\pm$ 1.78 <sup>④⑤</sup> |

①与正常组比较  $P>0.05$ ;②与正常组比较  $P<0.01$ ;③与假手术组比较  $P<0.01$ ;④与模型组比较  $P<0.01$ ;⑤与正常组比较  $P<0.05$

表 2 各组大鼠海马组织 TNF- $\alpha$  含量比较 ( $\bar{x}\pm s$ , pg/mg)

| 组别   | 鼠数 | 第 24 小时                       | 第 48 小时                       | 第 72 小时                       |
|------|----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常组  | 4  | 2.43 $\pm$ 0.21               | —                             | —                             |
| 假手术组 | 9  | 2.51 $\pm$ 0.18 <sup>①</sup>  | 2.55 $\pm$ 0.14 <sup>①</sup>  | 2.52 $\pm$ 0.11 <sup>①</sup>  |
| 模型组  | 12 | 9.79 $\pm$ 1.04 <sup>②③</sup> | 8.47 $\pm$ 0.97 <sup>②③</sup> | 7.14 $\pm$ 0.75 <sup>②③</sup> |
| 电针组  | 12 | 7.54 $\pm$ 0.72 <sup>④①</sup> | 5.67 $\pm$ 0.53 <sup>④②</sup> | 3.79 $\pm$ 0.30 <sup>④③</sup> |

①与正常组比较  $P>0.05$ ;②与正常组比较  $P<0.01$ ;③与假手术组比较  $P<0.01$ ;④与模型组比较  $P<0.05$

## 3 讨论

NF- $\kappa$ B 是一种普遍存在于真核细胞中具有序列特异性二聚体结构,能将信息从胞浆传至胞核引起相应基因表达的重要转录因子。中枢神经系统,尤其是大脑皮质和海马神经元内有高结构型活性的 NF- $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B 在大脑皮质、海马和小脑突触上的定位,提示 NF- $\kappa$ B 可能是突触活动中的一个重要信号转导者,其作为信使将突触信号传递到核内,同时在核内调控基因转录,发挥其生物学作用<sup>[4]</sup>。近年发现,转录因子 NF- $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B)与炎症反应密切相关,活化的 NF- $\kappa$ B 可直接调控参与脑缺血再灌注后炎症损伤的多种介质基因的表达,因而,NF- $\kappa$ B 活化被认为是介导或加剧脑缺血再灌注后炎症损伤的中心环节<sup>[5]</sup>。Nurmi 等<sup>[6]</sup>对死于大脑中动脉闭塞的 3 例脑梗死患者做了尸检,用免疫组化检测人脑 NF- $\kappa$ B 的免疫反应性,发现患者在脑梗死 1—2d 后,NF- $\kappa$ B 被诱导并移位至胞核:第 23 小时可见半暗带的神经元胞浆浓染,第 28 小时时胞核及胞浆均有染色,第 38 小时时则以胞核浓染为主,表明人脑缺血后,NF- $\kappa$ B 亦被激活,并从胞浆移位至胞核。

研究证实,有许多种促炎细胞因子在脑缺血损伤后高度表达,TNF- $\alpha$  是较早释放的具有多种生物效应的重要促炎细胞因子,在炎症反应过程中可以激活细胞因子级联反应,诱导白介素和次级炎症介质的合成,神经系统中星形细胞、血管内皮细胞、小胶质细胞以及神经元均可产生 TNF- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$  在脑组织中高表达具有神经毒性,可加速神经细胞的死亡<sup>[7]</sup>。临床上用三七总皂甙可通过抑制脑梗死患者的 TNF- $\alpha$ ,IL-6 介导的炎症反应,促进功能恢复<sup>[8]</sup>。另外,TNF- $\alpha$  也是 NF- $\kappa$ B 活化的重要刺激物之一,促进 NF- $\kappa$ B 激活,最终引发过度组织炎症反应和损伤。有学者发现敲除 TNF- $\alpha$  受体的大鼠,脑损伤后神经元和血脑屏障损害减轻,NF- $\kappa$ B 活性减低<sup>[9]</sup>。

本实验结果显示,在脑缺血再灌注后上述各观察指标,存在被诱导表达的时空变化。TNF- $\alpha$  因子的表达于再灌注第 24 小时达高峰;NF- $\kappa$ B 表达有所增强,结合本研究前期的实验,此时缺血侧海马 CA1 区未发现明显神经细胞凋亡<sup>[10]</sup>。提示 TNF- $\alpha$  主要参与急性脑缺血早期炎症性反应的损伤,导致神经细胞坏死,与神经细胞凋亡没有直接的关系;NF- $\kappa$ B 的表达于再灌注第 48 小时达高峰,同时 NF- $\kappa$ B 蛋白大量从胞浆移位至胞核,伴随缺血侧海马 CA1 区大量神经细胞凋亡出现<sup>[10]</sup>。提示 NF- $\kappa$ B 蛋白高表



达,NF- $\kappa$ B 蛋白移位于核,参与缺血性脑损伤再灌注海马组织神经元迟发性损伤;且 NF- $\kappa$ B 的激活可能是高表达的 TNF- $\alpha$  的继发结果。

值得重视的是,TNF- $\alpha$  不仅是 NF- $\kappa$ B 的靶基因,同时也是后者的重要诱导因子之一,参与构成 NF- $\kappa$ B 激活的正反馈环,NF- $\kappa$ B 激活后可能上调 TNF- $\alpha$  的 mRNA 转录,增高的 TNF- $\alpha$  反过来又可进一步促进 NF- $\kappa$ B 的活化,形成级联放大反应,故 TNF- $\alpha$  在观察的时间段中始终保持在一定的水平,而 NF- $\kappa$ B 转录因子的表达也可能存在多个峰值,如陈燕启等<sup>[11]</sup>发现 NF- $\kappa$ B 在全脑缺血再灌注时与 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  间可相互促进表达,并显著降低存活神经元数目。基于诱导调控基因的方式不同,上述实验结果内在的因素和机制,值得我们进一步研究。

#### 4 结论

本实验采用电针大椎,内关两穴,观察电针抗局灶性脑缺血再灌注损伤后海马组织中 NF- $\kappa$ B 表达及 TNF- $\alpha$  含量的变化。结果表明,电针能降低 TNF- $\alpha$  含量,下调信号分子转录因子 NF- $\kappa$ B 的表达,并阻滞其转位于核,纠正信号转导机制的紊乱,减轻有害信号转导对神经细胞的损害,阻断了炎症反应恶性循环,发挥脑保护作用。这可能是电针抗局灶性脑缺血再灌注损伤的神经细胞信号转导机制之一。

#### 参考文献

- [1] 潘曙明,杨兴易,林兆奋.全脑缺血再灌注后大鼠脑神经元中 NF- $\kappa$ B 的表达[J].中华急诊医学杂志,2003,12(11):742—744.
- [2] 孟宜良.线栓法大鼠脑中动脉局灶性脑缺血模型研究现状[J].国外医学·神经病学神经外科学分册,2002,2(29):113—115.
- [3] Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, et al. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms[J]. Brain Res, 2000, 863(1): 94—105.
- [4] 杨志华.脑内 NF- $\kappa$ B 及其病理生理学意义[J].国外医学·生理、病理科学与临床分册,2000,20(6):504—506.
- [5] Lentsch AB, Ward PA. The NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B system in acute inflammation [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2000, 48(2): 59—63.
- [6] 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.
- [7] 李丹萍,易莉,陈强,等.针刺对脑缺血损伤级联反应和再灌注影响的研究进展[J].中国康复医学杂志,2005,20(11):865—867.
- [8] 蒙兰青,韦叶生,韦世革.三七总皂甙对急性脑梗死患者血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的影响 [J]. 中国康复医学杂志,2008,(3): 205—207.
- [9] Sullivan PG, Bruce -Keller AJ, Rabchevsky AG, et al. Exacerbation of damage and altered NF- $\kappa$ B activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury[J]. Neurosci, 1999,19(15):6248—6256.
- [10] 孔立红,任婕,沈峰.电针对脑缺血再灌注大鼠海马神经细胞凋亡的影响[J].湖北中医学院学报,2006,8(1):24—26.
- [11] 陈燕启,刘德红,杨光田.大鼠急性全脑缺血再灌注时 NF- $\kappa$ B 表达及意义[J].临床医学研究,2004,21(7):772—775.

(上接第 710 页)

- anesthesia and a comparison of lumbar versus thoracic epidural anesthesia[J]. Anesth Analg, 2008,107(2):708—711.
- [12] Serradell A, Herrero R, Villanueva JA, et al. Comparison of three different volumes of mepivacaine in axillary plexus block using multiple nerve stimulation [J]. Br J Anaesth, 2003,91(4): 519—524.
  - [13] Myers MR. A numerical investigation into factors affecting anesthetic distribution during spinal anesthesia [J]. J Biomech, 1996, 29(2):139—149.
  - [14] Taboada Muñiz M, Rodríguez J, Bermúdez M, et al. Low volume and high concentration of local anesthetic is more

efficacious than high volume and low concentration in Labat's sciatic nerve block: a prospective, randomized comparison[J]. Anesth Analg, 2008,107(6):2085—2088.

- [15] 赵璇,王英伟,尤新民,等.低浓度左旋布比卡因用于多点腋路臂丛神经阻滞的研究[J].临床麻醉学杂志,2006,22(11):830—832.
- [16] Taboada M, Rodríguez J, Valiño C, et al. What is the minimum effective volume of local anesthetic required for sciatic nerve blockade? A prospective, randomized comparison between a popliteal and a subgluteal approach [J]. Anesth Analg, 2006, 102(2):593—597.