

大鼠大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧后 NF- κ B P50/c-Rel 对 Bcl-x_L 表达的影响

何兰英¹, 罗 勇^{2*}

1. 成都市第二人民医院神经内科, 成都 610017

2. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆市神经病学重点实验室, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨脂质体(TransfastFast™ Transfection Reagent)介导转录因子 NF- κ B 圈套物(decoy)寡聚脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODNs)对 Wistar 大鼠大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧(OGD/R)后受 NF- κ B P50、c-Rel 调控的抗凋亡因子 Bcl-x_L 表达的影响。**方法** 原代大鼠皮质神经元体外培养, 建立 OGD/R 模型, 分为 OGD 4 h/R 6 h 组、NF- κ B decoy ODNs 组、无关 decoy ODNs 组、脂质体组; 同时设立正常对照组。采用蛋白质印迹分析检测 NF- κ B P50、c-Rel 蛋白表达; 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测大鼠皮质神经元内 Bcl-x_L mRNA 表达。**结果** 蛋白质印迹分析显示 OGD 4 h/R 6 h 组 P50、c-Rel 蛋白表达较正常组升高($P < 0.01$); 转染 NF- κ B decoy ODNs 后 P50、c-Rel 蛋白表达低于 OGD 4 h/R 6 h 组、脂质体组、无关 decoy ODNs 组($P < 0.05$); RT-PCR 显示 OGD 4 h/R 6 h 组 Bcl-x_L mRNA 表达较正常组升高($P < 0.05$); NF- κ B decoy ODNs 组 Bcl-x_L mRNA 表达低于 OGD 4 h/R 6 h 组、脂质体组、无关 decoy 组($P < 0.05$)。**结论** NF- κ B decoy ODNs 可有效抑制大鼠皮质神经元 OGD/R 后受 NF- κ B 亚基 P50、c-Rel 调控的抗凋亡因子 Bcl-x_L mRNA 表达, 这可能是 NF- κ B 神经保护作用的部分机制。

[关键词] NF- κ B; 大脑皮质; 神经元; 氧糖剥夺/复氧; 再灌注损伤; Bcl-x_L

[中图分类号] R 741.02

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)03-0258-04

Influence of NF- κ B P50/c-Rel on Bcl-x_L expression in primary cortical neurons of rats after oxygen glucose deprivation/reoxygenation

HE Lan-ying¹, LUO Yong^{2*}

1. Department of Neurology, the Second People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610017, Sichuan, China

2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Neurology, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of TransfastFast™ Transfection Reagent-mediated transfection of NF- κ B decoy oligodeoxynucleotides (ODNs) on expression of anti-apoptosis factor Bcl-x_L in the primary cultured cortical neurons after oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R). **Methods** OGD/R model was established using primary cultured rat cortical neurons, and the model neurons were divided into 4 groups according to different treatments: OGD 4 h/R 6 h, NF- κ B decoy ODNs, scrambled decoy ODNs and TransfastFast™ Transfection Reagent groups. Untreated neurons served as normal control. The protein expression of NF- κ B P50 and c-Rel in the neurons was determined by Western blotting analysis; the expression of Bcl-x_L mRNA was examined by RT-PCR. **Results** The expression of NF- κ B P50 and c-Rel protein was significantly higher in the OGD 4 h/R 6 h than that in the normal control group ($P < 0.01$); and the expression in NF- κ B decoy ODNs group was significantly lower than that in the OGD 4 h/R 6 h, scrambled decoy ODNs and TransfastFast™ Transfection Reagent groups ($P < 0.05$). RT-PCR results showed that Bcl-x_L mRNA expression in OGD 4 h/R 6 h was significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.05$), and that in NF- κ B decoy ODNs group was significantly lower than that in the OGD 4 h/R 6 h, scrambled decoy ODNs and TransfastFast™ Transfection Reagent groups ($P < 0.05$). **Conclusion** NF- κ B decoy ODNs can effectively inhibit NF- κ B P50- and c-Rel-mediated Bcl-x_L mRNA expression in primary cortical neurons, which may be one of the mechanisms for the neuroprotective function of NF- κ B.

[Key words] NF-kappaB; cerebral cortex; neurons; oxygen glucose deprivation/reoxygenation; reperfusion injury; Bcl-x_L

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(3):258-261]

[收稿日期] 2010-12-17

[接受日期] 2011-01-12

[基金项目] 重庆市卫生局资助项目(渝卫科教[2003]61号, 03-2-179). Supported by Health Bureau of Chongqing, China([2003]61, 03-2-179).

[作者简介] 何兰英, 博士生, 主治医师. E-mail: helanying2007@yahoo.com.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89012307, E-mail: luoyong1998@163.com

缺血性脑血管病是最常见的危及生命的神经系统疾病,目前是第一位致死性疾病,并且在老年人当中,它是最主要的致残性疾病。临床上挽救卒中患者最有效的方法是早期恢复血液/再灌注。但脑缺血超过一定时间后,恢复再灌注可造成炎症级联反应引起神经细胞的进一步损伤,加重患者的病情,即再灌注损伤,并且由于神经元死亡而造成功能障碍。因此,探讨脑缺血/再灌注损伤的机制,对减轻脑缺血损伤和提高人类的生存质量极其重要。基于 NF- κ B 是调控炎症因子基因表达的桥梁,靶向 NF- κ B 的抗炎治疗成为国内外许多学者研究的热点,而圈套策略以其特异性、高效性较其他策略有一定优势,成为一种新型的基因治疗方案。本实验设计合成靶向 NF- κ B 的哑铃形圈套核苷酸(ODNs)验证其在大鼠大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧(oxygen glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)中对 P50、c-Rel 亚基及其抗凋亡因子 Bcl-x_L表达的影响,探讨其可能的神经保护机制。

1 材料和方法

1.1 原代大脑皮质神经元培养 参考文献^[1]的方法,并做适当改进。无菌条件下取新生 24 h 内 Wistar 大鼠,分别用碘酒和 75%乙醇消毒全身,用手捏住其颈部依次剥离其头皮颅骨,暴露脑组织,用眼科镊取出放入预冷的 D-Hank 液中,仔细分离大脑皮质,去除脑膜,用 D-Hank 液洗涤 3 次,在筛网上通过巴氏管一边轻轻充分吹打脑组织至糜状后用 D-Hank 液将单细胞洗入无菌的玻璃培养皿中,直至得到单细胞悬液为止,筛网过滤 1 次除去组织块,悬液以 800 r/min 离心 6 min,弃上清。用完全培养液重新悬浮细胞,调整细胞密度为 2.5×10^6 /ml,接种于用多聚赖氨酸处理过的培养板中。置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后全量换液,48 h 后加入终浓度为 5 mg/L 的阿糖胞苷抑制胶质细胞生长,第 4 天半量换液,以后每 2 d 半量换液。培养 7 d 后进行实验。

1.2 离体神经元 OGD/R 模型的建立 将培养 7 d 的大脑皮质神经元,用预热的无糖 D-Hank 液替换原来培养液 3 次,使无糖组葡萄糖的终浓度小于 1 mmol/L,利用家用加厚型保鲜袋(18 cm×25 cm)在其底部剪一小孔接输液器作为出气管,在输液器加液处连接一医用肝素帽,备多次抽气检测用,放入无菌的湿润纱布,将培养板放入保险袋中,通入 95% N₂、5% CO₂ 的混合气体,洗涤保鲜袋 3 次以赶走袋

内空气,迅速扎紧袋口和小孔,置入恒温 37℃ 孵箱中,4 h 后取出将 D-Hank 液换成完全培养液,置 37℃、5% CO₂ 孵箱中继续培养。

1.3 实验分组 将 Wistar 大鼠大脑皮质神经元分为:(1)正常组:正常培养的原代大脑皮质神经元,不加任何刺激因素;(2)OGD 4 h/R 6 h 组:给予培养的原代大脑皮质神经元 OGD 4 h/R 6 h;(3)NF- κ B decoy ODNs 组:在 OGD/R 前 2 h 转染靶向的 NF- κ B decoy ODNs,然后进行 OGD 4 h/R 6 h;(4)无关 decoy ODNs 组:在 OGD/R 前 2 h 转染无关 decoy ODNs,然后进行 OGD 4 h/R 6 h;(5)脂质体组:在 OGD/R 前 2 h 加入与圈套组相同体积的脂质体,再给予 OGD 4 h/R 6 h;每一样本设 10 个复孔。

1.4 NF- κ B 圈套的设计、合成 参照文献^[2]设计合成哑铃形 NF- κ B decoy ODNs,含有 44 个碱基,包含有 1 个拷贝的 NF- κ B 特异结合序列;设计相同结构及碱基数相等的无关序列作为对照。经 GenBank 检索,未查到与其他基因有高度同源性。由上海英俊生物技术公司合成并纯化。序列如图 1 所示。

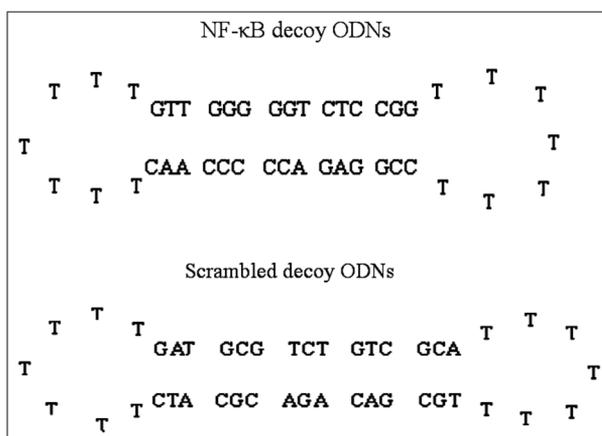


图 1 NF- κ B decoy ODNs 和无关哑铃形 ODNs
Fig 1 Sequence of NF- κ B decoy ODNs and scrambled decoy ODNs

1.5 脂质体-寡核苷酸的制备 将快速转染脂质体(TransfastFast™ Transfection Reagent,美国 Promega 公司)与寡核苷酸(质量比为 2:1;按脂质体 4.6 μ l,寡核苷酸 0.75 μ g)分别溶解在加入 200 μ l DMEM/F12 培养液中,将两者混匀,于室温中放置 10~15 min 待用。

1.6 蛋白质印迹检测 NF- κ B P50、c-Rel 蛋白表达 弃培养液,用预冷的 PBS 清洗 2 次,每孔加入 100 μ l 细胞裂解液,冰面上裂解 30 min,14 000×g,4℃ 离

心 10 min,取上清,Bradford 法进行蛋白定量。以 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,半干电转移法转移至 PVDF 膜,室温下用封闭液封闭 1 h 后分别加入一抗单克隆兔抗鼠 P50、c-Rel、 β -actin 内参抗体,以 1 : 500 稀释,4℃ 孵育过夜,分别用相应的抗鼠二抗(1 : 750 稀释)室温孵育 2 h,化学发光法显色并用凝胶图像处理系统分析目标带的相对分子质量和净光密度值,将与 β -actin 比值作为其表达水平的参数。

1.7 RT-PCR 测定 Bcl-x_L mRNA 表达 各组大脑皮质神经元总 RNA 的提取按照上海华舜生物工程有限公司的提取试剂盒说明进行, mRNA 水平测定参照大连宝生物 RT-PCR 试剂盒说明进行,引物序列: β -actin 上游引物 5'-GAC CCA GAT CAT GTT TGA GAC-3',下游引物 5'-GCC AGG ATA GAG CCA CCA AT-3' 下游,长度 684 bp; Bcl-x_L 上游引物 5'-GTG CGT GGA AAG CGT AGA CA-3',下游引物 5'-CAG CCA AGG TGA CCC ATT AC-3',长度 465 bp。各实验组 RT-PCR 产物电泳影像进行积分光密度量化。通过凝胶扫描仪进行 DNA 电泳条带积分光密度值分析,将其与 β -actin 的比值作为表达水平。

1.8 统计学处理 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行组间比较。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 各组 P50 和 c-Rel 蛋白表达 蛋白质印迹结果(图 2)显示,OGD/R 可诱导大脑皮质神经元 NF- κ B P50 和 c-Rel 蛋白表达增加,OGD 4 h/R 6 h 组 NF- κ B P50 和 c-Rel 蛋白表达较正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),转染 Bcl-x decoy ODNs 后 NF- κ B P50、c-Rel 蛋白表达与 OGD 4 h/R 6 h 组、无关 decoy ODNs 组、脂质体组相比减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),而无关 decoy ODNs 组、脂质体组 NF- κ B P50 和 c-Rel 蛋白表达与 OGD 4 h/R 6 h 组比较未见明显改变。

2.2 各组 Bcl-x_L mRNA 的表达水平 用 RT-PCR 方法测定各组大脑皮质神经元 Bcl-x_L mRNA 表达,结果如图 3 所示。可见 OGD 4 h/R 6 h 后 Bcl-x_L mRNA 表达较正常组升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);经转染圈套 NF- κ B“decoy”ODNs 后 Bcl-x_L mRNA 表达较 OGD 4 h/R 6 h 组、无关“decoy”ODNs 组、脂质体组相比减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);而无关“decoy”ODNs 组、脂质体组与 OGD 4 h/R 6 h 组比较,Bcl-x_L mRNA 表达未见明显改变。

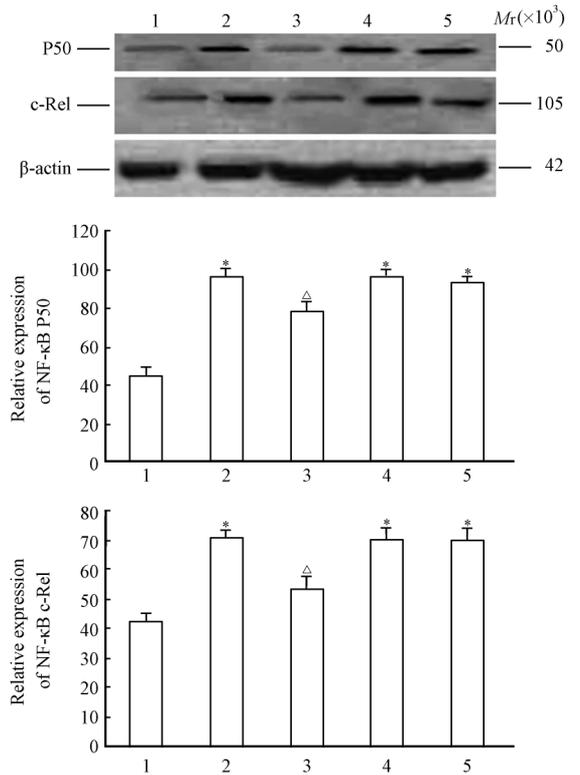


图 2 各组大脑皮质神经元 NF- κ B 亚基 P50 和 c-Rel 蛋白表达变化

Fig 2 Expression of NF- κ B P50 and c-Rel protein in primary cortical neurons

1: Normal control group; 2: OGD 4 h/R 6 h group; 3: NF- κ B decoy ODNs group; 4: Scrambled decoy ODNs group; 5: TransfastFast™ Transfection Reagent group. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs OGD 4 h/R 6 h group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

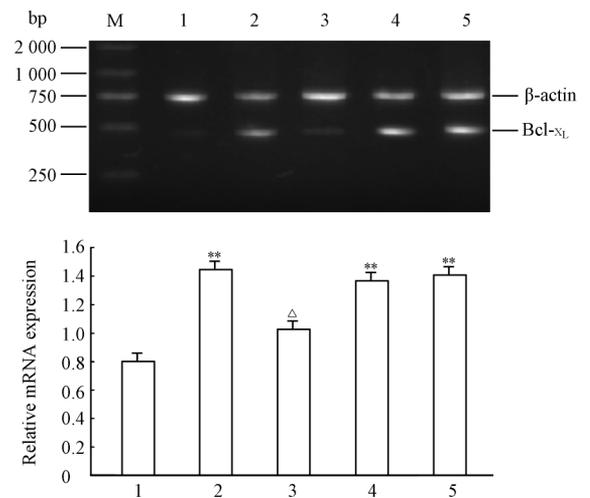


图 3 各组大脑皮质神经元 Bcl-x_L mRNA 表达

Fig 3 Expression of Bcl-x_L mRNA in primary cortical neurons

M: Marker; 1: Normal control group; 2: OGD 4 h/R 6 h group; 3: NF- κ B decoy ODNs group; 4: Scrambled decoy ODNs group; 5: TransfastFast™ Transfection Reagent group. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs OGD 4 h/R 6 h group. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

在静息状态下, NF- κ B 二聚体在胞质内以无活性的形式存在, 与 NF- κ B 抑制分子 (inhibitory κ B α , I κ B α) 非共价结合成三聚体复合物, 使其无法进入细胞核内发挥作用。脑缺血/再灌注后可诱导 I κ B α 磷酸化、泛素化, 最终 I κ B α 降解, 释放游离的 NF- κ B, 后者向细胞核内移位, 调节许多下游靶基因的转录, 参与一系列基因的表达和调控 (如 IL-1 α 、IL-1 β)。这些被诱导的基因产物可进一步参与炎症和免疫反应, 在机体生理和病理条件下发挥重要的功能^[3-4]。

动物研究发现脑缺血/再灌注后, 缺血侧大脑皮质神经元 COX-2 和 IL-1 α mRNA 及蛋白质表达明显增加, 并伴有 NF- κ B 激活, 给予 NF- κ B 的抑制剂后, 可使炎症因子表达减少, 减轻对神经元的损伤^[5-6]。近年研究发现 NF- κ B 在大鼠脑缺血缺氧中表达具有双相作用^[7], 抑制 P65 的表达可以减少脑缺血后的神经损伤, 而抑制 c-Rel 表达可以增加细胞的敏感性, 加剧神经元的损伤^[8]。因此, 提出 NF- κ B 活化后 P65/P50 二聚体可以导致细胞死亡, 而 c-Rel 具有神经保护作用。

本研究发现, 氧糖剥夺/复氧后, 神经元内 P50 和 c-Rel 蛋白较正常组明显增加。可见, NF- κ B 在脑缺血/再灌注后的炎症损伤及神经保护中扮演着极为重要的角色, 如果能明确 NF- κ B 各亚基活化后的作用则有望阻断急性炎症损伤的发展, 发挥其保护作用, 从而起到扬长避短的疗效。

针对 NF- κ B 的激活途径, 我们采用一种新型的基因治疗手段——圈套策略, 抑制 NF- κ B P50 和 c-Rel 活化, 在转录水平调节其基因的表达, 从而明确其保护作用。其原理为: 合成与顺式元件相一致的双链转录因子诱杀性寡核苷酸 ODNs, 转录入细胞, 竞争性抑制反式因子 (转录因子) 与顺式元件, 占有转录因子的 DNA 结合位点, 导致转录因子不能结合到靶基因的启动子区域, 从而失去其转录活性及其后续基因的表达^[9]。

本研究采用脂质体载 NF- κ B “decoy” ODN 转染原代皮质神经元, 研究其在氧糖剥夺后对 NF- κ B 亚基 P50 和 c-Rel 的影响, 从而探讨其对下游因子 Bcl-x_L 的调控作用。结果发现氧糖剥夺后神经元内 P50 和 c-Rel 蛋白表达显著升高, 并伴随着抗凋亡因子 Bcl-x_L mRNA 表达的增加, 而转染圈套后 P50 和 c-Rel 表达被抑制, 神经元中 Bcl-x_L mRNA 表达也降低 ($P < 0.05$), 而无 “decoy” ODNs 组和脂质体组与 OGD 4 h/R 6 h 组相比 P50 和 c-Rel 蛋白、Bcl-x_L mRNA 的表达均无明显变化。这说明该 NF-

κ B “decoy” ODN 可以通过抑制 OGD/R 后大脑皮质神经元中 P50 和 c-Rel 表达, 从而抑制 Bcl-x_L 的表达。

以往研究表明脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧能激活核因子 NF- κ B P65/P50, 引起其调控的靶因子 TNF- α 、IL-1 α 表达的增加^[5-6], 进一步产生炎症反应从而加重神经元损伤, 而本实验研究表明 NF- κ B c-Rel/P50 表达可以调控 OGD/R 后 Bcl-x_L 的表达。由于各亚基调控着不同下游基因的表达, 因此, 我们在今后的实验中可以采用 “鸡尾酒” 疗法, 协调不同圈套的作用, 从而达到扬长避短的疗效; 而圈套 NF- κ B decoy ODNs 为脑缺血/再灌注的治疗提供了新思路, 可能成为一种新型的基因治疗方案。

[参考文献]

- [1] Gong Q H, Wang Q, Shi J S, Huang X N, Liu Q, Ma H. Inhibition of caspases and intracellular free Ca²⁺ concentrations are involved in resveratrol protection against apoptosis in rat primary neuron cultures [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28: 1724-1730.
- [2] Qiu J, Hu X, Nestic O, Grafe M R, Rassini D K, Wood T G, Perez-Polo J R. Effects of NF-kappaB oligonucleotide “decoys” on gene expression in P7 rat hippocampus after hypoxia/ischemia [J]. J Neurosci Res, 2004, 77: 108-118.
- [3] Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, Utzel K, Bröcker E B, Rapp U R, et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells [J]. Blood, 2001, 97: 46-55.
- [4] Lau L T, Yu A C. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury [J]. J Neurotrauma, 2001, 18: 351-359.
- [5] Gao Y, Fang X, Sun H, Wang Y, Yao L J, Li J P, et al. Toll-like receptor 4-mediated myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway is activated by cerebral ischemia-reperfusion in hippocampal CA1 region in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32: 1665-1671.
- [6] Cai Z Y, Yan Y, Chen R. Minocycline reduces astrocytic reactivation and neuroinflammation in the hippocampus of a vascular cognitive impairment rat model [J]. Neurosci Bull, 2010, 26: 28-36.
- [7] Nijboer C H, Heijnen C J, Groenendaal F, May M J, van Bel F, Kavelaars A. A dual role of the NF-kappaB pathway in neonatal hypoxic-ischemic brain damage [J]. Stroke, 2008, 39: 2578-2586.
- [8] Sarnico I, Lanzillotta A, Boroni F, Benarese M, Alghisi M, Schwaninger M, et al. NF- κ B p50/RelA and c-Rel-containing dimers: opposite regulators of neuron vulnerability to ischemia [J]. J Neurochem, 2009, 108: 475-485.
- [9] Mann M J, Dzau V J. Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides [J]. J Clin Invest, 2000, 106: 1071-1075.