

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01171

美满霉素抑制血管性痴呆大鼠脑组织 NF- κ B、GFAP 与 IL-1 β 的表达

蔡志友¹, 晏宁², 晏勇^{1*}, 承欧梅¹, 余昌胤³, 张骏³, 杨丽³, 黄良国³, 詹剑³, 周妮³

1. 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

2. 重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016

3. 遵义医学院附属医院神经内科, 遵义 563003

[摘要] 目的: 观察美满霉素(minocycline)对血管性痴呆大鼠脑组织核因子 κ B (NF- κ B)、星形胶质细胞标志物 GFAP 和炎症因子 IL-1 β 表达的影响, 探讨美满霉素对血管性痴呆脑保护作用的机制。方法: 双侧颈总动脉结扎法建立血管性痴呆大鼠动物模型。随机分为假手术组, 4、8、16 周模型组, 美满霉素治疗 4、8、16 周模型组。穿梭箱实验、Morris 水迷宫实验检测认知行为学改变, ELISA 法、蛋白质免疫印迹法和免疫组织化学法检测 GFAP, ELISA 法和免疫组织化学法检测 NF- κ B, ELISA 法检测 IL-1 β 。结果: 美满霉素可以显著改善血管性痴呆的行为学症状, 提高学习记忆力和反应能力。模型组和美满霉素治疗组 NF- κ B、GFAP 与 IL-1 β 表达均较假手术组显著增高 ($P < 0.01$), 但美满霉素治疗组三者表达较模型组明显降低 ($P < 0.01$)。结论: 美满霉素可能通过降低血管性痴呆大鼠脑组织 NF- κ B、GFAP 与 IL-1 β 的表达, 抑制星形胶质细胞激活和脑内炎症反应, 发挥脑保护作用。

[关键词] 血管性痴呆; 美满霉素; 核因子 κ B; 星形胶质细胞; 炎症

[中图分类号] R 743.3

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)10-1171-05

Minocycline inhibits expression of NF- κ B, GFAP and IL-1 β in brain of rats with vascular dementia

CAI Zhi-you¹, YAN Ning², YAN Yong^{1*}, CHENG Ou-mei¹, YU Chang-yin³, ZHANG Jun³, YANG Li³, HUANG Liang-guo³, ZHAN Jian³, ZHOU Ni³

1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016

3. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the influence of minocycline on expression of NF- κ B, GFAP, and IL-1 β in rats with vascular dementia, so as to study the neuroprotective mechanism of minocycline for vascular dementia. **Methods:** An animal model of vascular dementia was established by chronic bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO). Animals were randomly divided into sham-operation group (S), 4-week model group (M4), 8-week model group (M8), 16-week model group (M16), 4-week model + Minocycline group (T4), 8-week model + Minocycline group (T8), and 16-week model + Minocycline group (T16). The behaviors of animals were tested with Morris water maze and shuttle box task. Expression of NF- κ B and GFAP was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), immunohistochemistry and Western blotting, and IL-1 β by ELISA. **Results:** Minocycline greatly improved the behaviors of mice with vascular dementia, and promoted the learning, memory and responding abilities. The expression of NF- κ B, GFAP and IL-1 β in all the model groups and Minocycline treatment groups were significantly higher than that in the sham-operation group ($P < 0.01$); and those of Minocycline treatment groups were significantly lower than the corresponding model groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Minocycline can decrease the expression of NF- κ B, GFAP, and IL-1 β in the brain of rats with vascular dementia, and protect brain by inhibiting the activation of astrocytes and neuroinflammation.

[KEY WORDS] vascular dementia; minocycline; nuclear factor-kappaB; astrocyte; inflammation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(10):1171-1175]

[收稿日期] 2008-03-26 **[接受日期]** 2008-06-10

[基金项目] 国家民政部中国老年学学会资助课题(2007-18-3-05); 重庆医科大学博士课题基金(2006010068). Supported by Subject of Gerontology Association of China(2007-18-3-05) and Doctoral Project of Chongqing Medical University(2006010068).

[作者简介] 蔡志友, 博士生. E-mail: czy000806@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 023-89012454, E-mail: yyanpro@yahoo.com

核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 是一种广泛存在于真核细胞中的转录因子, 现已证实脑缺血损伤可使 NF- κ B 激活, NF- κ B 直接或间接地参与脑缺血损伤机制过程。脑缺血性损伤激活星形胶质细胞引起的炎症反应和氧化应激是脑血管疾病的重要病理特征。美满霉素作为四环素类药物中一种有效的神经细胞保护剂, 通过参与抑制神经炎症^[1]、抑制小胶质细胞激活^[2]、抑制基质金属蛋白酶表达^[3-4]、抑制活性氧产物和氧化应激的发生^[5]、抑制细胞凋亡^[6]等过程发挥脑保护作用。本研究以慢性脑低灌注方法建立血管性痴呆大鼠动物模型, 并采用美满霉素对血管性痴呆大鼠进行干预, 观察血管性痴呆大鼠脑组织 NF- κ B、星形胶质细胞标志物 GFAP 和炎症因子 IL-1 β 的表达, 探讨美满霉素对血管性痴呆脑保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 10 周龄 Wistar 大鼠 (雌性, 体质量 200~250 g, 第三军医大学野战医院动物研究所提供, 动物中心许可证号: 渝实动设施准第 260 号)。GFAP、NF- κ B ELISA 试剂盒: 福建迈新生物科技有限公司; IL-1 β ELISA 试剂盒: 武汉博士德生物科技有限公司; 水迷宫和大鼠穿梭箱程序自动控制仪均由重庆市神经病学重点实验室和重庆医科大学药学院提供。美满霉素胶囊 (100 mg/粒): 中国惠氏制药有限公司, 生产批号: 0501034。

1.2 动物模型和分组 参照文献^[7-8]制备血管性痴呆模型: 用 3.5% 的水合氯醛按 1 ml/100 g 将大鼠腹腔麻醉后, 仰卧固定, 颈正中切口, 分离双侧颈总动脉, 模型组大鼠用 5 号丝线结扎双侧颈总动脉, 假手术组大鼠仅分离双侧颈总动脉。分别选取造模 4 周、8 周、16 周作为观察点 (造模成功后大鼠平均生存时间为 16 周)。随机原则分为: 假手术组 (S 组), 4、8、16 周模型组 (M4、M8、M16), 美满霉素治疗 4 周、8 周、16 周模型组 (MT4、MT8、MT16), 每组 6 只大鼠。将美满霉素用生理盐水稀释成 0.5 mg/ml, MT 组于建模成功后给予美满霉素 50 mg/kg 灌胃^[9-10], 假手术组与 M 组予以等量生理盐水灌胃。至观察点时, 用水合氯醛麻醉大鼠, 打开胸腔, 右心室内取血, 分离血清保存, 待检备用。取血后立即经升主动脉快速灌注生理盐水, 直至右心房流出液清亮为止。然后用 4% 多聚甲醛灌注固定, 断头取脑备用。

1.3 行为学检查

1.3.1 穿梭箱实验 穿梭箱底部铺以 60 cm×16

cm×25 cm 的不锈钢电栅, 箱顶部装有蜂鸣器。训练时, 将大鼠放在箱内任一侧, 20 s 后出现蜂鸣音, 持续 15 s, 蜂鸣 5 s 后由底部电栅给予电刺激 (电流强度 1.5 mA), 大鼠受到电刺激后逃到另一端, 电击蜂鸣自动停止。记录动物在单独蜂鸣期间逃避的时间 (主动逃避时间) 和遭受电刺激的时间以及电击的次数。全部动物每日测试 1 次, 每次 20 个循环, 全程训练。

1.3.2 水迷宫实验 (1) 定位航行实验 (place navigation test), 用于测量大鼠获取经验 (学习) 的能力。实验前 1 d 下午将大鼠放入水中自由游泳 2 min, 观察其游泳姿势并使其熟悉实验环境。实验历时 4 d, 每日上、下午两个时间段, 每个时间段训练 4 次, 每次训练随机选择一个入水点, 将大鼠面向池壁放入水池, 同一次训练所有大鼠入水点相同。记录大鼠找到平台的时间, 即潜伏期 (latency)。(2) 空间探索实验 (spatial probe test), 用于测量大鼠保存经验 (记忆) 的能力, 即大鼠学会寻找平台后, 对平台空间位置记忆的能力。在训练的最后时段撤除平台, 然后在 B 象限任选一个入水点将大鼠面向池壁放入水中, 观测其在 120 s 内在各象限的游泳距离及其占总距离的百分比; 以及 120 s 内穿越各象限平台相应位置 (即平台在 D 象限所在的位置) 的次数。记录大鼠找到平台的时间 (学习潜伏期), 及 120 s 内穿越各象限平台相应位置的次数 (记忆潜伏期), 比较各组潜伏期, 评价大鼠学习记忆功能。

1.4 ELISA 法检测海马 GFAP、IL-1 β 、NF- κ B 在冰台上迅速分离大鼠一侧的海马, 按 2.5 ml/g 脑质量加入相当体积的冰生理盐水, 用匀浆器将组织研磨, 然后冰浴下超声波粉碎制成匀浆, 4℃, 10 000×g 离心 10 min, 取上清液。实验严格按照 GFAP、IL-1 β 、NF- κ B ELISA 法说明书步骤进行。

1.5 Western 印迹法检测海马 GFAP 切取海马组织, 按 10 ml/g 的比例加入全细胞裂解液, 组织经匀浆、超声破碎后, 用 BCA 法进行蛋白定量, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转 NC 膜。杂交步骤如下: 10% 脱脂牛奶封闭 NC 膜 1 h, TYBS (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 0.15 mmol/L NaCl; 0.05% Tween 20) 漂洗 3 次, 每次 10 min, 然后室温下与 APP 一抗 (1:3 000) 杂交反应 3 h, TTBS 漂洗同前。再将 NC 膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (1:5 000) 杂交反应 1 h。最后用 TTBS 漂洗 NC 膜 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 试剂反应 5 min, 保鲜膜包裹, 暗室进行 X 线胶片曝光、显影和定影。然后同一张 NC 膜再与 β -actin (1:1 000) 进

行杂交反应。Western 印迹条带经 Gel-oc 凝胶成像分析系统扫描处理, 计算单位光密度值和条带面积, 将各实验点的总光密度值与对照组比较, 得到相对百分数。

1.6 免疫组织化学染色法检测 GFAP、NF- κ B 冠状切取视交叉后部脑组织, 常规梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片脱蜡、水化, 3% H₂O₂ 室温 10 min 灭活内源性酶, 蒸馏水洗涤 3 次; 滴加正常血清封闭液, 室温 20 min, 甩去余液; 不同的切片分别适量加入即用型羊抗大鼠 GFAP、NF- κ B 抗体, 4 $^{\circ}$ C 湿盒内过夜。滴加生物素化山羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 20 min; 然后滴加链霉亲和素-生物素-过氧化氢酶复合物 37 $^{\circ}$ C 20 min。除加入正常血清封闭液外, 以上各步间均用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 充分洗涤。最后用 DAB 显色, 常规脱水、透明、封片。用已知阳性切片作为阳性对照, PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.7 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 全部数据采用 SPSS 11.0 软件包进行统计学处理, 同一组内不同时相点的比较采用方差分析, 两组之间同一时相点的比较采用 *t* 检验, One-way Pearson 线性相关分析, 检验水准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 水迷宫、穿梭箱实验结果 M 组大鼠的电击次数与 S 组比较显著增加 ($P < 0.01$), 主动逃避次数显著减少 ($P < 0.01$), 学习潜伏期显著延长 ($P < 0.01$), 穿梭 D 象限次数显著减少 ($P < 0.01$); MT 组与 M 组同时相点比较电击次数显著降低 ($P < 0.01$), 主动逃避次数显著增加 ($P < 0.01$), 学习潜伏期显著缩短 ($P < 0.01$), 穿梭 D 象限次数显著增多 ($P < 0.01$)。表明美满霉素可以显著改善血管性痴呆的行为学症状, 提高学习记忆力和反应能力。详见图 1。

2.2 美满霉素对炎症因子 IL-1 β 表达的影响 ELISA 检测显示 M 组脑组织内 IL-1 β 水平比假手术组明显增高 ($P < 0.001$), MT 组与 M 组同时相点比较 IL-1 β 表达显著降低 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.3 GFAP 检测结果与分析 Western 印迹法、ELISA 和免疫组织化学法结果均显示, 与假手术组相比, 模型鼠脑组织内 GFAP 水平显著增高, 经过美满霉素治疗后, GFAP 水平显著降低 ($P < 0.001$)。详见图 3~5。

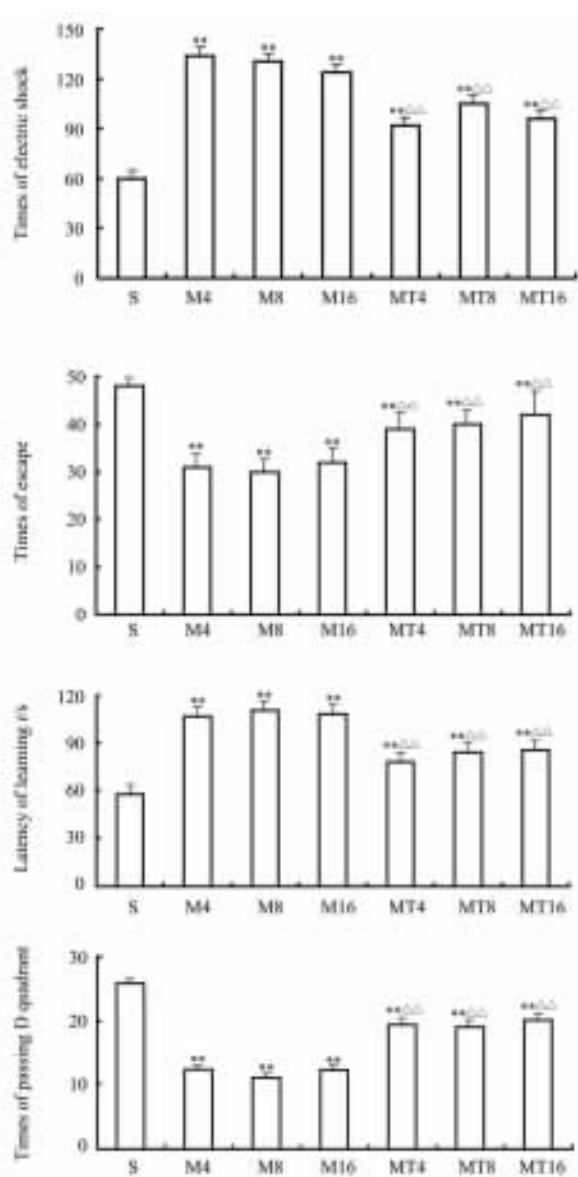


图 1 水迷宫、穿梭箱实验结果

Fig 1 Results of morris water maze and shuttle box task

** $P < 0.01$ vs sham-operation group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs model groups. $n = 6, \bar{x} \pm s$

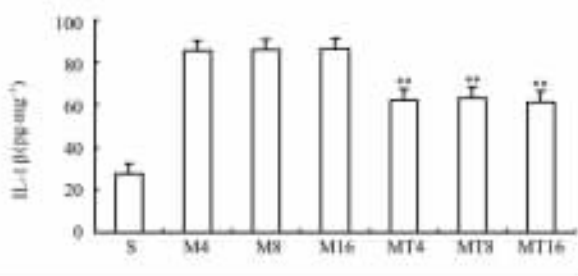


图 2 ELISA 法检测 IL-1 β

Fig 2 Enzyme linked immunosorbent assay analysis of IL-1 β

** $P < 0.01$ vs sham-operation and model groups. $n = 6, \bar{x} \pm s$

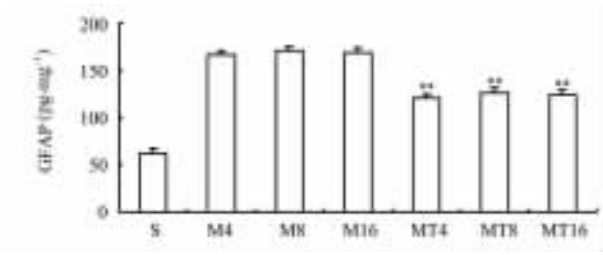


图3 ELISA法检测GFAP

Fig 3 Enzyme linked immunosorbent assay analysis of GFAP

** $P < 0.01$ vs sham-operation and model groups. $n = 6, \bar{x} \pm s$

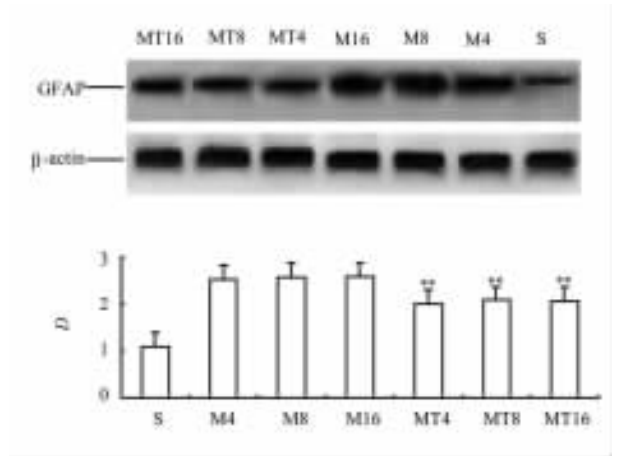


图4 Western印迹法检测GFAP

Fig 4 Western blotting analysis of GFAP

** $P < 0.01$ vs sham-operation and model groups. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.3 NF-κB检测结果与分析 免疫组织化学法与ELISA法检测显示模型鼠脑组织内NF-κB水平与假手术组比较显著增高 ($P < 0.001$), 经过美满霉素治疗后, NF-κB水平显著降低 ($P < 0.001$, 图6, 图7)。



图5 免疫组织化学法检测GFAP

Fig 5 Immunohistochemistry analysis of GFAP

A: Sham group; B: M4 group; C: M16 group; D: MT4 group; E: MT16 group. Original magnification: $\times 400$

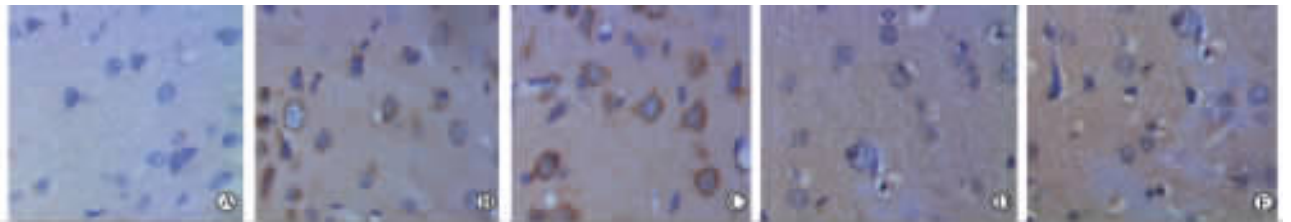


图6 免疫组织化学法检测NF-κB

Fig 6 Immunohistochemistry analysis of NF-κB

A: Sham group; B: M4 group; C: M16 group; D: MT4 group; E: MT16 group. Original magnification: $\times 400$

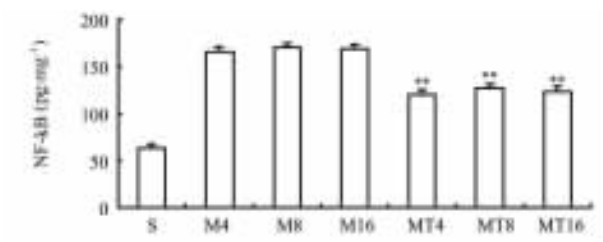


图7 ELISA法检测NF-κB

Fig 7 Enzyme linked immunosorbent assay analysis of NF-κB

** $P < 0.01$ vs sham-operation and model groups. $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

慢性脑缺血诱发行为学障碍是目前研究血管性

痴呆最常用的也是经典的动物模型。本实验采用永久结扎双侧颈总动脉方法建造慢性脑低灌注状态, Morris水迷宫实验和穿梭箱实验行为学检查表现模型组大鼠明显的记忆和学习障碍, 认知功能明显下降, 表明我们建模达到预期目的。同时我们的研究也发现GFAP、IL-1β、NF-κB在模型大鼠脑组织表达增高, 模型组大鼠GFAP、IL-1β、NF-κB表达均在相对固定水平, 而且GFAP、IL-1β、NF-κB的变化具有同方向性。所以, 我们推测星形胶质细胞激活后增强炎症介质释放以及NF-κB激活是一个级联过程, 即激活的星形胶质细胞释放炎症因子激活NF-κB, 激活的NF-κB促使炎症因子的释放激活星形胶

质细胞,但其具体机制有待进一步揭示。

GFAP 是星形胶质细胞中的一种标志蛋白,它参与神经元内环境的维持和血脑屏障。在脑损伤的炎症中会出现以胶质纤维酸性蛋白为特征的纤维化。本研究检测糖尿病大鼠海马内 GFAP 的表达,结果提示均高于对照组,免疫组织化学检查发现星形胶质细胞数目明显增加,表明 AC 被明显激活。美满霉素治疗后,与单纯模型组比较,GFAP 的表达显著降低,表明美满霉素可以抑制星形胶质细胞的激活,与国外文献报道一致^[11]。

激活的星形胶质细胞能够释放炎症因子,缺血后脑内也有神经炎症的发生,这里我们检测糖尿病大鼠海马内炎症因子 IL-1 β 的表达,结果提示均高于对照组,且和星形胶质细胞激活具有时间上的一致性,表明 AC 激活和脑内炎症密切相关。美满霉素治疗后,与模型组比较,IL-1 β 的表达显著降低,表明美满霉素不仅可以抑制星形胶质细胞的激活,还可以抑制大鼠脑内炎症。这与美满霉素能够抑制胶质细胞激活后神经炎症的发生相吻合^[12]。

NF- κ B 是一种广泛存在于真核细胞中的转录因子,现已证实脑缺血损伤可使 NF- κ B 激活^[13]。NF- κ B 活化能调控一系列基因的表达,如炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 等,引发炎症级联反应^[14-15],加速细胞凋亡^[16-17],直接或间接地参与脑缺血损伤机制过程。脑缺血后发生的 NF- κ B 活化引发的一系列病理生理机制是脑损伤的重要环节。本研究发现 GFAP、IL-1 β 、NF- κ B 在血管性痴呆大鼠脑组织中的表达均较正常组增高,美满霉素治疗后显著降低,表明美满霉素对血管性痴呆的脑保护作用是通过抑制星形胶质细胞的激活,抑制血管性痴呆大鼠脑内炎症这一途径实现的。

本实验从行为学角度和传统生物学方法初步探讨了美满霉素对血管性痴呆的脑保护作用机制,由于本组实验观察时间点少,观察时间短,对美满霉素糖尿病的脑保护作用机制尚有待深入研究。但美满霉素的耐受性好,安全性高,目前临床上已广泛应用于各种感染性疾病的治疗,虽尚未用于脑血管性疾病的临床治疗,但其具有脑保护作用已被大量基础实验证实,作为一种潜在性脑保护剂有待进一步研究开发。

[参考文献]

- [1] Zhao C, Ling Z, Newman M B, Bhatia A, Carvey P M. TNF-alpha knockout and minocycline treatment attenuates blood-brain barrier leakage in MPTP-treated mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 26: 36-46.
- [2] Fan R, Xu F, Previti M L, Davis J, Grande A M, Robinson J K, et al. Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid[J]. *J Neurosci*, 2007, 27: 3057-3063.
- [3] Machado L S, Kozak A, Ergul A, Hess D C, Borlongan C V, Fagan S C. Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke[J]. *BMC Neurosci*, 2006, 7: 56.
- [4] 余昌胤, 蔡志友. 美满霉素对大鼠脑缺血再灌注脑组织基质金属蛋白酶表达的影响[J]. *贵州医药*, 2006, 30: 983-985.
- [5] Morimoto N, Shimazawa M, Yamashima T, Nagai H, Hara H. Minocycline inhibits oxidative stress and decreases *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage[J]. *Brain Res*, 2005, 1044: 8-15.
- [6] Liu Z, Fan Y, Won S J, Neumann M, Hu D, Zhou L, et al. Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 2007, 38: 146-152.
- [7] Tayebati S K. Animal models of cognitive dysfunction[J]. *Mech Ageing Dev*, 2006, 127: 100-108.
- [8] Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, Inzitari D. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models[J]. *J Neurol Sci*, 2002, 203-204: 263-266.
- [9] Stirling D P, Khodarahmi K, Liu J, McPhail L T, McBride C B, Steeves J D, et al. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2004, 24: 2182-2190.
- [10] Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15769-15774.
- [11] Lin S, Zhang Y, Dodel R, Farlow M R, Paul S M, Du Y. Minocycline blocks nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons[J]. *Neurosci Lett*, 2001, 315(1-2): 61-64.
- [12] Nikodemova M, Duncan I D, Watters J J. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and Ikappa B alpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia[J]. *J Neurochem*, 2006, 96: 314-323.
- [13] Schwanger M, Inta I, Herrmann O. NF-kappaB signalling in cerebral ischaemia[J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34: 1291-294.
- [14] Pradillo J M, Romera C, Hurtado O, C rdenas A, Moro M A, Leza J C, et al. TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic preconditioning[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25: 193-203.
- [15] 蔡文娥, 杨 斌, 刘华钢, 张锡流. 复方银黄微型灌肠剂调节细胞因子表达及核因子- κ B 信号通路的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22: 952-955.
- [16] Gao J F, Li J S, Zhou Y L, Liu K. Effects of Naomaitong Recipe on expressions of nuclear factor-kappaB and nitric-oxide synthases in brain tissue after focal cerebral ischemia reperfusion in aged rats[J]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2006, 4: 530-534.
- [17] Song Y S, Lee Y S, Narasimhan P, Chan P H. Reduced oxidative stress promotes NF-kappaB-mediated neuroprotective gene expression after transient focal cerebral ischemia: lymphocytotropic cytokines and antiapoptotic factors[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27: 764-775.