

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01333

## 大鼠皮质神经元氧糖剥夺/复氧后 NF-κB P50 及 c-Rel 蛋白的表达

何兰英, 罗 勇\*

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 Wistar 大鼠大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧(OGD/R)后不同时间点 NF-κB 亚基 P50 及 c-Rel 蛋白表达情况。**方法:**体外培养原代大脑皮质神经元,采用免疫细胞化学鉴定神经元,建立氧糖剥夺/复氧模型,以正常组、OGD 4 h 组、OGD 4 h/R 2 h 组、OGD 4 h/R 6 h 组、OGD 4 h/R 12 h 组、OGD 4 h/R 24 h 组为实验组,采用免疫细胞化学、Western 印迹检测 NF-κB 亚基 P50 及 c-Rel 蛋白表达。**结果:**(1)免疫细胞化学(神经元烯醇化酶相关抗原及 β-tubulin 3)鉴定所培养的细胞为神经元;(2)免疫细胞化学、Western 印迹结果显示 OGD 4 h 组 NF-κB P50 蛋白表达开始增加明显高于正常组( $P < 0.05$ ), OGD 4 h/R 2 h 组、OGD 4 h/R 6 h 组 NF-κB P50 蛋白表达持续性升高,并在复氧后 6 h 达高峰( $P < 0.01$ ),此后逐渐下降,至 OGD 4 h/R 12 h 时与正常组有显著差异( $P < 0.05$ ), OGD 4 h/R 24 h NF-κB P50 蛋白表达降低与正常组比较无统计学差异( $P < 0.05$ );(3)NF-κB c-Rel 蛋白表达 OGD 4 h 组与正常组无差异( $P > 0.05$ ), OGD 4 h/R 2 h 至 OGD 4 h/R 12 h 表达持续增加,并在复氧后 12 h 达高峰( $P < 0.01$ ), OGD 4 h/R 24 h 仍未恢复到正常水平( $P < 0.05$ )。**结论:**大鼠大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧后激活了 NF-κB P50 及 c-Rel 蛋白的表达,并具有时间相关性。

**[关键词]** NF-κB; P50; c-Rel; 大脑皮质神经元; 脑缺氧缺血; 再灌注损伤

**[中图分类号]** R 741.02

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1333-04

### Expression of NF-κB subunits P50 and c-Rel protein in primary cortical neurons after oxygen glucose deprivation/reoxygenation

HE Lan-ying, LUO Yong\*

Department of Neurology, Chongqing Key Laboratory of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the expression of nuclear factor-κB (NF-κB) subunits P50 and c-Rel protein in primary cortical neurons of Wistar rats at different time points of oxygen glucose deprivation/reoxygenation(OGD/R). **Methods:** The neurons dissociated from the cortex of the neonatal rats were primary cultured and were identified by immunocytochemistry. OGD/R model was established. The study was divided into 6 groups according to different processing methods, including normal group, OGD 4 h treated, OGD 4 h/R 2 h treated, OGD 4 h/R 6 h treated, OGD 4 h/R 12 h treated and OGD 4 h/R 24 h treated groups. The expression of NF-κB P50 and c-Rel protein in neurons was examined by immunocytochemistry method and Western blotting. **Results:** (1) Immunocytochemistry detection targeting neuron specific enolase (NSE) and beta-III tubulin confirmed that the cultured cells were neurons. (2) The expression of NF-κB P50 protein was significantly higher in OGD 4 h group than in control group( $P < 0.05$ ); the expression continued to increase in OGD 4 h/R 2 h and OGD 4 h/R 6 h groups, and reached its peak 6 h after reoxygenation ( $P < 0.01$ ), then began to decrease, but the expression in OGD 4 h/R 12 h group was significantly different from that of the control group ( $P < 0.05$ ); there was no significant difference between OGD 4 h/R 24 h group and control group. (3) The expression of NF-κB c-Rel protein was similar between OGD 4 h group and the control group; the expression increased in OGD 4 h/R 2 h and OGD 4 h/R 12 h groups and reached its peak 12 h after reoxygenation( $P < 0.01$ ), and did not recover to the normal level in OGD 4 h/R 24 h group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Oxygen glucose deprivation/reoxygenation can activate NF-κB subunits P50 and c-Rel in the primary cortical neurons in rats in a time-associated manner.

**[KEY WORDS]** NF-κB; P50, c-Rel; cortical neurons; brain hypoxia-ischemia; reperfusion injury

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1333-1336]

**[收稿日期]** 2008-04-27

**[接受日期]** 2008-06-25

**[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(No. [2003]61, 03-2-179).

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

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-89012307, E-mail: luoyong1998@163.com

研究表明,NF- $\kappa$ B具有双重作用,不同的细胞及不同刺激活化的NF- $\kappa$ B亚基不同,目前国内外对脑缺血/再灌注神经元内NF- $\kappa$ B P50及c-Rel表达的研究还较少,并且其对神经元的作用机制还不明确。本实验通过动态检测大脑皮质神经元离体缺血模型观察神经元内NF- $\kappa$ B亚单位P50及c-Rel蛋白表达规律,旨在探讨NF- $\kappa$ B P50及c-Rel在大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧后活性变化及其意义。

## 1 材料和方法

1.1 大鼠原代大脑皮质神经元的培养 参考文献<sup>[1]</sup>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%的乙醇消毒全身,用手捏住其颈部依次剥离其头皮颅骨,暴露脑组织,用眼科镊取出放入盛有预冷的D-Hank's液中,仔细分离大脑皮质,去除脑膜,用D-Hank's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几次后用D-Hank's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,悬液离心 $100 \times g$ 、6 min,弃上清。用完全培养基重新悬浮细胞,调整细胞密度 $2.5 \times 10^6$ /ml,接种于用多聚赖氨酸处理过的培养板中。置37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>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日半量换液,以后每2 d半量换液。

1.2 神经元的鉴定 (1)细胞固定:将培养7 d的大脑皮质神经元用0.01 mol/L PBS漂洗后,4%的多聚甲醛固定15 min,0.01 mol/L PBS漂洗3 min $\times$ 3次;(2)加入0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>甲醇,作用10 min,以去除内源性过氧化氢酶;0.01 mol/L PBS漂洗3 min $\times$ 3次;(3)移到37℃湿盒,将10%绵羊血清滴加在盖玻片上,每张盖玻片3~4滴,放入37℃温箱孵育30 min,用滤纸吸取山羊血清;(4)加入一抗[分别为1:200兔抗鼠NSE抗体或(和)1:2000兔抗鼠 $\beta$ -tubulin 3],每片加3~4滴,PBS代替一抗作空白对照,4℃冰箱过夜;(5)次日0.01 mol/L PBS清洗3次,每次5 min;将二抗(1:200生物素化的山羊抗兔或羊抗鼠IgG)滴加在盖玻片上,每孔3~4滴,放入37℃温箱孵育60 min,0.01 mol/L PBS漂洗3 min $\times$ 3次;(6)滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,37℃温箱孵育30 min,0.01 mol/L PBS漂洗3 min $\times$ 3次;(7)滴加DAB显色。自来水冲洗终止显色,乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片。

1.3 离体神经元氧糖剥夺/复氧模型的建立 将培养7 d的大脑皮质神经元,用预热的无糖D-Hank's

液替换原来培养基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 $\times$ 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,通入体积分数95%N<sub>2</sub>、体积分数5%CO<sub>2</sub>的混合气体,洗涤保险袋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's液换成完全培养基,置37℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>孵箱中继续培养。

1.4 实验分组 将Wistar大鼠大脑皮质神经元分为正常组、OGD 4 h组、OGD 4 h/R 2 h组、OGD 4 h/R 6 h组、OGD 4 h/R 8 h组、OGD 4 h/R 12 h组、OGD 4 h/R 24 h组,每一样本设10个复孔。

1.5 免疫细胞化学检测 采用免疫细胞化学检测原代大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧后NF- $\kappa$ B P50及c-Rel蛋白表达,按照免疫细胞化学说明书操作进行测定,以PBS代替一抗作为对照。结果判定:排除边缘细胞,10 $\times$ 10低倍镜下随机选取10个细胞分布均匀的视野,10 $\times$ 20低倍镜下随机计数50个细胞/视野。按照着色强弱分为4个等级:无色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分,按公式HSCORE= $\sum pi(i+1)$  ( $i=0,1,2,3$ ;  $pi$ 表示评分为*i*的比例)计算HSCORE得分。该评分方法考虑到了单个细胞是否为阳性及其强弱,能够更具体地反映细胞蛋白表达情况。

1.6 Western印迹检测 弃培养液,用预冷的PBS清洗2次,每孔加入100  $\mu$ l细胞裂解液,冰面上裂解30 min,14 000 $\times g$ ,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后分别加入一抗多克隆兔抗鼠P50、单克隆兔抗鼠c-Rel、 $\beta$ -actin内参单克隆兔抗鼠抗体,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定量扫描灰度值,将与 $\beta$ -actin比值作为其表达水平的参数。

1.7 统计学处理 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 10.0软件比较多组均数间的显著性差异。

## 2 结果

2.1 免疫细胞化学对原代大脑皮质神经元鉴定 采用神经元烯醇化酶相关抗原(NSE)及神经元早期标志物 $\beta$ -tubulin 3两种抗体对原代大脑皮质神经元进行鉴定发现,神经元胞质可见明显的黄色,细胞核

成空泡状,表明该细胞为大脑皮质神经元(图 1)。

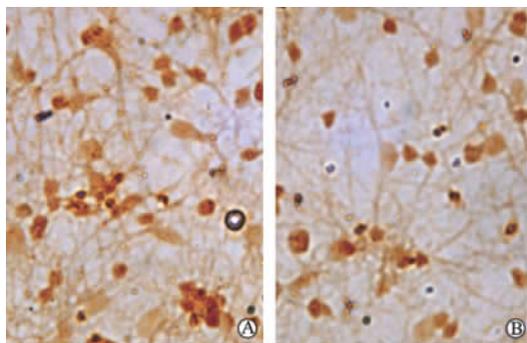


图 1 免疫细胞化学对大脑皮质神经元鉴定

Fig 1 Neurons were identified by immunocytochemical examination(DAB)

A: NSE; B:  $\beta$ -tubulin 3. Original magnification:  $\times 200$

2.2 免疫细胞化学 P50 和 c-Rel 蛋白表达 正常情况下大脑皮质神经元有少量的 NF- $\kappa$ B P50 和 c-Rel 蛋白表达,大脑皮质神经元在氧糖剥夺/复氧后可引起 NF- $\kappa$ B P50 和 c-Rel 蛋白表达的改变。本实验中,我们采用免疫细胞化学评价氧糖剥夺/复氧后不同时间大脑皮质神经元 NF- $\kappa$ B P50 和 c-Rel 蛋白表达规律,与正常组( $0.87 \pm 0.049$ )相比 OGD 4 h 时 NF- $\kappa$ B P50 蛋白表达开始升高(HSCORE 评分  $1.42 \pm 0.052$  vs  $0.87 \pm 0.049$ ,  $P < 0.05$ , 图 2A), OGD 4 h/R 2 h 至 OGD 4 h/R 6 h 呈持续增加过程,在复氧后 6 h 时表达达到高峰(HSCORE 评分  $3.64 \pm 0.078$ ,  $P < 0.05$ , 图 2B),且持续到复氧后 12 h(HSCORE 评分  $2.49 \pm 0.065$ ,  $P < 0.05$ ), OGD 4 h/R 24 h 时 NF- $\kappa$ B P50 蛋白表达降低与正常组无统计学差异(HSCORE 评分  $0.96 \pm 0.098$ ,  $P > 0.05$ , 图 2C)。NF- $\kappa$ B c-Rel 蛋白表达在 OGD 4 h 时无显著升高( $0.78 \pm 0.61$ , 图 2D),在 OGD 4 h/R 2 h 时开始增加,与正常组比较有差异(HSCORE 评分  $2.37 \pm 0.071$  vs  $0.74 \pm 0.024$ ,  $P < 0.05$ ), OGD 4 h/R 6 h 蛋白表达的 HSCORE 评分为  $2.48 \pm 0.053$  (图 2E), NF- $\kappa$ B c-Rel 蛋白表达在 OGD 4 h/R 12 h 达高峰(HSCORE 评分  $3.21 \pm 0.092$ ,  $P < 0.01$ ),并在 OGD 4 h/R 24 h 仍有较强表达(HSCORE 评分  $1.33 \pm 0.067$ ,  $P < 0.05$ , 图 2F)。

2.3 Western 印迹检测 NF- $\kappa$ B P50 和 c-Rel 蛋白表达 氧糖剥夺/复氧可诱导大脑皮质神经元 NF- $\kappa$ B P50 和 c-Rel 蛋白表达增加,Western 印迹结果显示 NF- $\kappa$ B P50 蛋白表达 OGD 4 h 组及 OGD 4 h/R 2 h 较正常组比较有意义( $P < 0.05$ ),在 OGD 4 h/R 6 h 表达达高峰,是正常组的 2 倍( $P < 0.01$ ),后逐渐降

低, OGD 4 h/R 12 h 组与正常组比较有差异( $P < 0.05$ ),复氧后 24 h 表达降低至正常水平( $P > 0.05$ , 图 3)。NF- $\kappa$ B c-Rel 蛋白表达在 OGD 4 h 与正常组比无差异( $P > 0.05$ ),在 OGD 4 h/R 2 h 至 OGD 4 h/R 6 h 时逐渐增加( $P < 0.05$ ),并在 OGD 4 h/R 12 h 达到高峰,是正常组的 1.6 倍( $P < 0.01$ ),于 OGD 4 h/R 24 h 时仍未恢复正常水平( $P < 0.05$ , 图 3)。

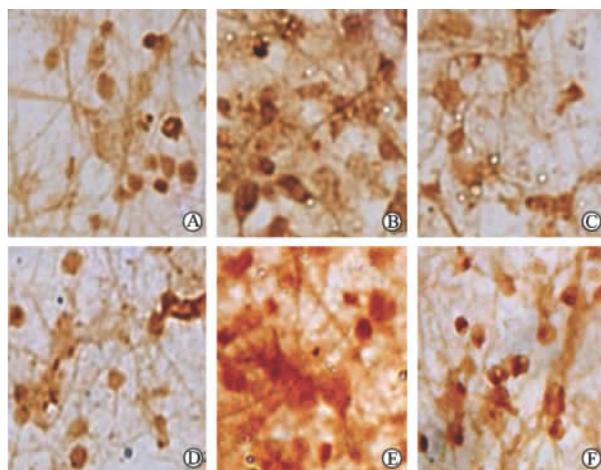


图 2 大鼠大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧后不同时间 NF- $\kappa$ B P50(A~C)和 c-Rel 蛋白(D~F)表达变化

Fig 2 Expression of NF- $\kappa$ B P50(A~C) and c-Rel(D~F) protein in primary cortical neuron after OGD/R(DAB)

A, D: OGD 4 h group; B, E: OGD 4 h/6 h group; C, F: OGD 4 h/24 h group. Original magnification:  $\times 200$

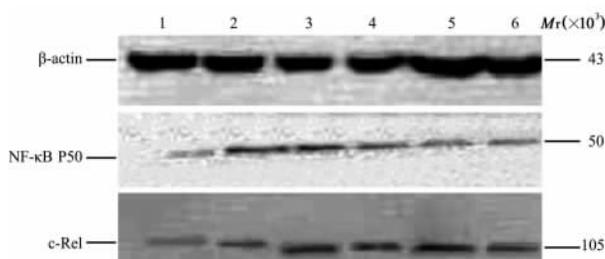


图 3 大鼠大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧后 P50 和 c-Rel 蛋白表达变化

Fig 3 Expression of NF- $\kappa$ B P50 and c-Rel protein in primary cortical neurons after OGD/R

1: Normal group; 2: OGD 4 h group; 3: OGD 4 h/R 2 h group; 4: OGD 4 h/R 6 h group; 5: OGD 4 h/R 12 h group; 6: OGD 4 h/R 24 h group

### 3 讨论

静止状态下, NF- $\kappa$ B 以非活性形式存在于胞质中,由 P50~P65 和 I $\kappa$ B 组成三聚体复合物,不具有调节基因转录的能力。当细胞受到刺激后, I $\kappa$ B 激酶使 I $\kappa$ B 发生磷酸化,并从 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 复合物中解离下来,使 NF- $\kappa$ B 迅速通过核膜进入核内与相应的靶基因  $\kappa$ B 位点结合,迅速诱导靶基因的转录。

NF- $\kappa$ B对神经细胞起保护还是损伤作用,目前还不十分清楚。伤害性刺激可引起NF- $\kappa$ B活化,从而调控其下游基因的表达<sup>[2-3]</sup>。在大鼠脑缺血再灌注后30 min或1 h时,NF- $\kappa$ B各亚基的表达即明显升高,通过抑制NF- $\kappa$ B活化可减少TNF- $\alpha$ 诱导的细胞死亡,从而提出抑制NF- $\kappa$ B活化可能对神经细胞有保护作用<sup>[4-7]</sup>。目前,NF- $\kappa$ B在中枢神经系统的保护作用也已被广泛研究,并提出NF- $\kappa$ B某亚基在中枢神经系统疾病中调控神经细胞存活,可能是由于激活了BCL-X、BCL-2等表达<sup>[8]</sup>,并提出BCL-X、BCL-2的表达可能与核转录因子NF- $\kappa$ B二聚体c-Rel/P50的活化有关<sup>[9]</sup>。其随后的实验发现在脑缺血后利用抑制c-Rel/P50的表达,可使bcl-x的表达减少<sup>[10]</sup>。本实验观察到正常情况下,大脑皮质神经元存在少量NF- $\kappa$ B c-Rel和P50蛋白表达,免疫细胞化学显示氧糖剥夺/复氧后大脑皮质神经元中NF- $\kappa$ B亚基c-Rel和P50蛋白表达增加,NF- $\kappa$ B P50蛋白在氧糖剥夺4 h开始增加,复氧后2~6 h呈持续增加过程,在复氧6 h表达到达高峰,延迟到复氧后12 h与正常组比较仍有显著差异,24 h时回复到正常水平。NF- $\kappa$ B c-Rel蛋白在复氧后2 h才开始增加,并延迟到复氧后12 h达高峰,其在复氧后24 h表达仍高,与正常组比较有统计学意义。采用Western印迹检测大脑皮质神经元中NF- $\kappa$ B P50和c-Rel蛋白表达,也观察到NF- $\kappa$ B P50蛋白表达在氧糖剥夺4 h即开始增加,而NF- $\kappa$ B c-Rel蛋白表达在复氧后2 h才开始增加,其分别在复氧后6 h和12 h达高峰,NF- $\kappa$ B P50蛋白在复氧后24 h恢复到正常水平,而NF- $\kappa$ B c-Rel蛋白在复氧后24 h仍维持在较高水平。通过Western印迹及免疫细胞化学2种方法测定氧糖剥夺/复氧后神经元内NF- $\kappa$ B P50和c-Rel蛋白表达规律是一致的。实验结果表明,NF- $\kappa$ B P50和c-Rel蛋白在不同时间点表达规律存在差异,提示NF- $\kappa$ B亚基P50可能在脑缺血再灌注后神经元内早、中期发挥作用,而NF- $\kappa$ B亚基c-Rel主要在中晚期发挥重要作用,两者在时间上有交叉重叠。NF- $\kappa$ B P50和c-Rel的作用可能是相互协调补充的,NF- $\kappa$ B c-Rel蛋白表达延迟于NF- $\kappa$ B P50蛋白可能是由于氧糖剥夺/复氧早期首先刺激P65/P50的活化,后者再进一步促进NF- $\kappa$ B c-Rel蛋白表

达。NF- $\kappa$ B两亚基P50和c-Rel之间存在怎样的相互协调,其对氧糖剥夺/复氧后大脑皮质神经元有怎样的影响,它们的作用机制如何这还需要进一步的探索。

## [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  $Ca^{2+}$  concentrations are involved in resveratrol protection against apoptosis in rat primary neuron cultures[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28:1724-1730.
- [2] Culmsee C, Siewe J, Junker V, Retiounskaia M, Schwarz S, Camandola S, et al. Reciprocal Inhibition of p53 and nuclear factor- $\kappa$ B transcriptional activities determines cell survival or death in neurons[J]. *J Neurosci*, 2003, 23:8586-8595.
- [3] Nurmi A, Lindsberg P, Koistinaho M, Zhang W, Juettler E, Karjalainen-Lindsberg M L, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B contributes to infarction after permanent focal ischemia[J]. *Stroke*, 2004, 35:987-991.
- [4] Zhang W, Petrovita I, Tarabin V, Herrmann O, Beer V, Weih F, et al. Neuronal activation of NF- $\kappa$ B contributes to cell death in cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25:30-40.
- [5] Huang C Y, Fujimura M, Noshita N, Chang Y Y, Chan P H. SOD1 down-regulates NF- $\kappa$ B and c-myc expression in mice after transient focal cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21:163-173.
- [6] Song Y S, Lee Y-S, Chan P H. Oxidative stress transiently decreases the IKK complex (IKK $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ), an upstream component of NF- $\kappa$ B signaling, after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25:1301-1311.
- [7] Botchkina G I, Geimonen E, Bilof M L, Villarreal O, Tracey K J. Loss of NF- $\kappa$ B activity during cerebral ischemia and TNF cytotoxicity[J]. *Mol Med*, 1999, 5:372-381.
- [8] Mattson M P, Culmsee C, Yu Z, Yu Z, Camandola S. Roles of nuclear factor  $\kappa$ B in neuronal survival and plasticity[J]. *J Neurochem*, 2000, 74:443-456.
- [9] Qiu J, Grafe M R, Schmura S M, Glasgow J N, Kent T A, Rassins D K, et al. Differential NF-kappa B regulation of bcl-x gene expression in hippocampus and basal forebrain in response to hypoxia[J]. *J Neurosci Res*, 2001, 64:223-234.
- [10] Qiu J, Hu X, Olivera N, Grafe M R, Rassins D K, Wood T G, et al. Effects of NF- $\kappa$ B oligonucleotide "decoys" on gene expression in P7 Rat hippocampus after hypoxia/ischemia[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 77:108-118.

[本文编辑] 孙岩,尹茶