

NF- κ B 和 AQP-4 在亚低温治疗大鼠脑出血中的作用

蓝琳友 洪溪屏 蔡元晖

摘要 目的 探讨亚低温对大鼠急性脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)后脑水肿及核转录因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和水通道蛋白4(aquaporin-4, AQP-4)表达的影响。**方法** 将96只健康雄性SD大鼠,采用数字表法随机分为假手术组(SO)、常温组(NT)、亚低温组(HT),每组再分为1、2、3和4天4个时间点,每个时间点8只大鼠,采用大鼠基底节注入自体不凝血制作脑出血模型。SO组和NT组大鼠控制体温在 $37.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$;亚低温组在脑出血后迅速降温至 $33.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$ 并保持2h。检测在不同时间点大鼠脑组织含水量,凝胶电泳迁移率实验(EMSA)检测NF- κ B活性;Western blot法检测AQP-4蛋白的表达。**结果** 与SO组相比较,NT组在各时间点大鼠脑含水量、NF- κ B活性及AQP-4蛋白表达均明显升高,差异有统计学意义;在各时间点,HT组大鼠脑含水量、NF- κ B活性及AQP-4蛋白表达均显著低于NT组($P < 0.05$);NF- κ B的活性表达与AQP-4蛋白表达呈正相关。**结论** 早期亚低温治疗可抑制大鼠脑出血后NF- κ B活性和AQP-4蛋白的表达,从而减轻脑水肿。

关键词 脑出血 亚低温 核转录因子 水通道蛋白4

[中图分类号] R651 [文献标识码] A

Down-regulation of the NF- κ B and AQP-4 by Mild Hypothermia in the Brain Tissue of the Rats Following Intracerebral Hemorrhage.

Lan Linyou, Hong Xiping, Cai Yuanhui. The Fifth Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 323000, China

Abstract Objective To elucidate the effect of mild hypothermia on brain edema and the expression of NF- κ B and AQP-4 in rats after intracerebral hemorrhage. **Methods** Ninety six healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly (random number) divided into three groups ($n=8$) for experiments; sham-operated group (SO), normothermic group (NT), hypothermic group (HT). Rats in each groups were examined at 4 different time points of 1, 2, 3 and 4 days. The intracerebral hemorrhage (ICH) model was established with stereotactic infusion of autologous blood into caudate nucleus. The rats in NT group and SO group were kept at $37.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$ of body temperature. Animals in the HT group after ICH were kept at $33.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$ of body temperature for 2 hours. The brain water content was determined at different times. The NF- κ B DNA-binding activity was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The expression of AQP-4 was detected by Western blot. **Results** The content of brain water and the expression of NF- κ B and AQP-4 were significantly higher in NT group than those in SO group at 4 different time points ($P < 0.05$). There was statistically difference in the content of brain water and the expression of NF- κ B and AQP-4 between HT groups and NT group. The correlation analysis between NF- κ B and AQP-4 was positively relative. **Conclusion** Hypothermia can relieve the severity of brain damage in rats after ICH by down-regulating the NF- κ B DNA-binding activity and protein level of AQP-4.

Key words Cerebral hemorrhage; Hypothermia; NF- κ B; AQP-4

脑出血具有高发生率、高致残率和高致死率的特点,目前尚无明确和有效的治疗手段。当前研究表明,脑出血后脑水肿和脑组织继发性损伤与炎症介质的表达密切相关^[1]。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)作为一种广泛存在、功能多样的转录因子,其活化后可调控多种炎症因子的表达,从而在炎症级联反应中发挥了关键调控作用,但NF- κ B如何在脑出血后炎症反应机制中发挥作用,尚不十分清楚^[2]。为此,本研究建立大鼠脑出

血模型,观察亚低温对模型大鼠脑水肿及NF- κ B和AQP-4表达的影响,为亚低温在脑出血中的应用提供实验依据。

材料与方法

1. 动物和材料:成年雄性SD大鼠96只,4周龄,体重 $304.5 \pm 25.4\text{g}$,购自上海斯莱克实验动物公司;EMSA试剂盒购自美国Pierce公司;AQP-4和 β -actin抗体购自美国Epitomics公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自美国Sigma公司。

2. 动物分组和模型制备:将SD大鼠按照随机数字表法分成3组:假手术组(SO)、常温组(NT)和亚低温组(HT),每组再分别按1、2、3和4天4个时间点分为4个亚组,每组8只大鼠。按照Xue等^[3]报道的将自体股动脉血注入大鼠尾壳核的

基金项目:温州市科技计划项目(Y20110012)

作者单位:323000 丽水,温州医科大学附属第五医院

方法制备实验性脑出血模型,假手术组制备过程完全一致,但进针尾壳核后不注血。大鼠醒麻醉后,根据 Longa EZ 等^[4]的方法进行神经功能评分,首次评分在 1~3 分者为造模成功,作为本次实验用大鼠。

3. 实施亚低温:HT 组在制备脑出血模型后即刻开始用冰袋及动物表面喷洒乙醇实施亚低温,使大鼠肛温在 10min 内降至 $33.0 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$,并维持 2h,治疗结束后采用白炽灯局部加热法,使动物肛温恢复正常;假手术组和常温组采用白炽灯局部加热法,通过调节灯泡与大鼠的距离使大鼠肛温保持在 $37.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 。脑温的测试和维持采用电子温度计测量大鼠肛温间接代替脑温。

4. 脑组织水分含量测定:实验大鼠分别在脑出血后第 1、2、3 和 4 天,戊巴比妥钠麻醉后断头取脑,将大脑半球自中线切开,切取血肿周围脑组织,滤纸吸干脑组织表面水分及血渍,称取脑湿重(g)后至 60°C 烤箱中干燥 48h 至恒重后称取干重(g),计算脑含水量。脑组织含水量(%) = (湿重 - 干重) $\times$ 100%。

5. EMSA 实验:取不同组别脑组织提取核蛋白。EMSA 实验方法参考文献[5],探针序列为: $5' - \text{TACTAGCTACCTCGT-GTCAG} - 3'$,将 6.5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶在电压为 120V 条件下恒压电泳 60min,取 $10\mu\text{g}$ 核蛋白加入超纯水中室温反应 30min 后再加入生物素标记探针,在室温下反应 30min 后电泳 100min 再印迹转移,用带正电荷尼龙膜 380mA 恒电流转 40min,转移完后将尼龙膜至于紫外灯下交联 15min,将膜再用 30ml 封闭液在室温下反应 20min,最后将膜放入平衡液中反应 15min,化学发光显色,条带曝光强度用 Quantity One 4.6.2 (BIO, RAD) 软件分析,计算灰度值。

6. Western blot 法检测脑组织中蛋白的表达:将脑组织粉碎后加入 RIPA 裂解液裂解细胞,提取上清液。用 Bradford 法测量蛋白浓度后取等量蛋白质样品(20 微克/孔),常规 8% SDS-PAGE 电泳,半干转膜仪转膜,5% 脱脂奶粉封闭,加入一抗(1:1000)于 4°C 下孵育过夜,HRP 标记的羊抗兔 IgG 为

二抗(1:2500)室温孵育 1h,ECL 显色,条带曝光强度用 Quantity One 软件分析,以 $\beta - \text{actin}$ 为内参,通过与内参的灰度比,得出目的条带的相对表达水平。

7. 统计学方法:实验所得结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析,各组数据资料方差齐性,采用单因素方差分析;组间比较采用 SNK-q 检验;相关性分析采用 Pearson 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组脑组织含水量的变化:在不同时间点,与 SO 组相比较,NT 组脑组织含水量均明显升高($P < 0.05$),高峰出现在第 4 天。与 NT 组相比较,在第 1 天,HT 组大鼠脑组织含水量无明显差异($P > 0.05$),而在第 2 天、第 3 天和第 4 天中 HT 组大鼠脑组织含水量均显著减少($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 各组大鼠脑组织含水量的变化(%, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	1 天	2 天	3 天	4 天
SO 组	67.84 ± 12.54	68.18 ± 18.26	66.84 ± 15.29	67.38 ± 15.21
NT 组	$84.28 \pm 15.28^*$	$86.34 \pm 12.38^*$	$88.37 \pm 10.67^*$	89.36 ± 10.28
HT 组	77.28 ± 14.46	$71.30 \pm 15.85^{\#}$	$71.05 \pm 13.94^{\#}$	$72.19 \pm 13.57^{\#}$

与 SO 组相比较, * $P < 0.05$; 与 NT 组相比较, $^{\#}P < 0.05$

2. EMSA 检测 NF- κ B 活性:各组大鼠脑组织均有不同程度 NF- κ B 活性表达(图 1)。在不同时间点,NT 组与 SO 组相比较,NF- κ B 活性均明显增强($P < 0.05$),NF- κ B 活性在 NT 组中在第 1 天时达峰。HT 组大鼠 NF- κ B 活性在造模 1 天后开始呈时间依赖性下降,在各时间点 NT 组 NF- κ B 活性表达均明显低于 NT 组($P < 0.05$),详见表 2。

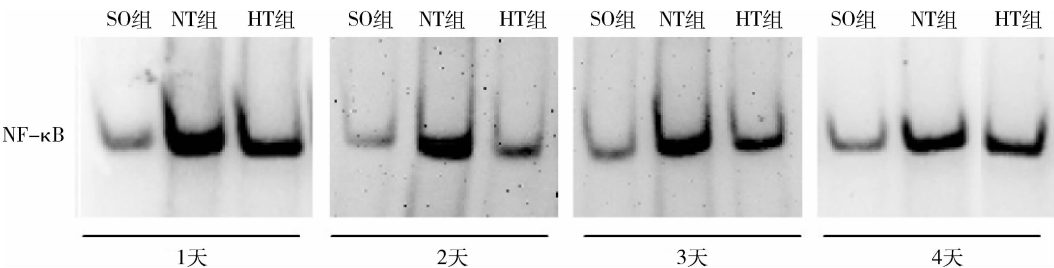


图 1 EMSA 检测各组在不同时间点时脑组织 NF- κ B 活性

表 2 各组大鼠脑组织 NF- κ B 活性灰度值比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	1 天	2 天	3 天	4 天
SO 组	0.598 ± 0.045	0.628 ± 0.051	0.574 ± 0.061	0.583 ± 0.076
NT 组	$3.658 \pm 0.328^*$	$2.749 \pm 0.435^*$	$2.692 \pm 0.258^*$	$2.464 \pm 0.317^*$
HT 组	$2.157 \pm 0.193^{\#}$	$1.042 \pm 0.098^{\#}$	$0.958 \pm 0.126^{\#}$	$0.884 \pm 0.094^{\#}$

与 SO 组相比较, * $P < 0.05$; 与 NT 组相比较, $^{\#}P < 0.05$

3. 亚低温对大鼠脑组织 AQP-4 蛋白表达的影响:各组大鼠脑组织中 AQP-4 蛋白均有表达。与 SO 组相比较,各时间点中 NT 组中 AQP-4 蛋白表达均显著增加($P < 0.05$),NT 组中大鼠脑组织 AQP-4 蛋白在第 2 天时达峰。与 NT 组相比较,亚低温作用后大鼠脑组织中 AQP-4 的表达水平均显著降低($P < 0.05$,表 3、图 2)。

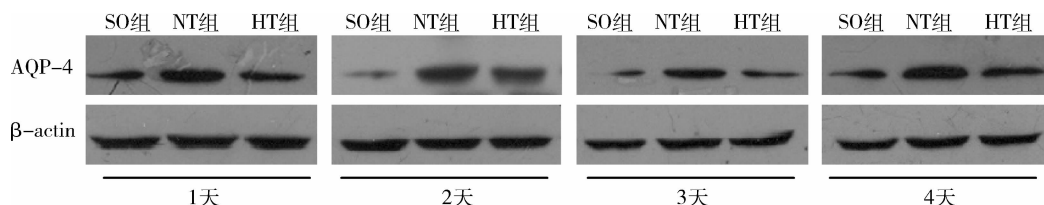


图2 Western blot 法检测各组大鼠脑组织中 AQP-4 蛋白表达(以 β -actin 为内参)

表3 各组大鼠脑组织 AQP-4 蛋白灰度值比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	1 天	2 天	3 天	4 天
SO 组	0.218 ± 0.029	0.184 ± 0.023	0.246 ± 0.034	0.347 ± 0.043
NT 组	0.652 ± 0.051 [*]	1.345 ± 0.084 [*]	0.964 ± 0.061 [*]	0.803 ± 0.094 [*]
HT 组	0.358 ± 0.045 [#]	0.759 ± 0.047 [#]	0.601 ± 0.057 [#]	0.542 ± 0.086 [#]

与 SO 组相比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 NT 组相比较, [#] $P < 0.05$

4. NF- κ B 活性与 AQP-4 蛋白表达的相关性:

对 NF- κ B 活性与 AQP-4 蛋白表达进行 Pearson 相关性分析, NF- κ B 活性表达与 AQP-4 蛋白表达呈显著正相关($r=0.945, P<0.01$)。

讨 论

目前我国每年新发 40 万例脑出血患者, 发生脑出血后 30 天的病死率可达 50%, 其中一半以上发生在发病后的 24h 内, 严重危害患者的生活质量^[5]。脑出血后脑组织损伤的机制相当复杂, 凝血酶、炎症反应、补体和血红蛋白及其产物等机制均参与了脑出血后周围组织水肿形成, 而炎症反应则是脑水肿形成的最直接因素。

NF- κ B 是近年来研究较多的一种功能多样的细胞转录因子, 通常以无活性的形式存在于细胞质中, 当细胞受到出血、炎症和损伤等刺激后 NF- κ B 被激活, 并进入细胞核中与相应的靶序列结合, 活化后的 NF- κ B 可诱导炎症细胞因子、趋化因子和炎症酶等基因的表达^[6]。有研究表明, 脑出血后数分钟可形成水肿, 在出血后 1h 开始继发性炎症反应, 而 NF- κ B 在脑出血后数小时就被激活, 从而在脑出血后脑水肿炎症反应中起着关键作用^[7]。另外, NF- κ B 激活后还可调控多种抗凋亡蛋白, 同时在保护神经元细胞对抗凋亡中也发挥了一定作用^[8]。水通道蛋白(AQPs)是一组近年来发现的细胞膜转运蛋白, 水通道蛋白广泛分布于机体组织中, 在介导水跨细胞膜转运中发挥作用, 其中水通道蛋白-4(AQP-4)在脑组织含量最为丰富, 主要分布在星形胶质细胞和室管膜细胞中, 并在脑血液灌注和水肿形成与消退中发挥关键作用, 因此与脑水肿的关系密切, 抑制 AQP-4 的表达可减轻脑出血后脑损伤^[9-11]。但目前尚

未有 NF- κ B 与 AQP-4 相关性研究报道。

本研究采用 Xue 等^[3]报道的自体股动脉血向大鼠尾壳核注射的方法, 注血量为 50 μ l, 与人类约 50ml 常见出血量相似, 同时脑出血大鼠出现明显对侧肢体运动障碍和意识障碍等神经功能损伤的表现, 从而成功复制出脑出血模型^[12]。对大鼠脑出血后脑组织含水量进行分析可知, 从第 1 天开始, 脑出血后脑组织含水量明显增加, 呈明显时间依赖性, 高峰出现在第 4 天; 通过检测脑出血后脑血肿周围组织 NF- κ B 活性, 发现 NF- κ B 在脑出血后被广泛激活, NF- κ B 活性在第 1 天时达到高峰, 然后逐渐下降, 在第 4 天时仍高于对照组, 与张轩等^[13]研究结果相似, 但高峰持续时间较短, 这可能与 NF- κ B 活性表达在不同脑出血模型中表达异常有关, 而 AQP-4 在脑出血后第 1 天开始表达明显增加, 随着损伤时间的延长, AQP-4 的表达也随之升高, 高峰出现在第 2 天, 较 NF- κ B 活性表达高峰(1 天)延迟, 在第 3 天和第 4 天, AQP-4 的表达又逐渐降低。分析可知, AQP-4 的表达与 NF- κ B 活性表达曲线基本吻合, 提示 AQP-4 的表达与 NF- κ B 活性在大鼠脑出血模型中存在关联, 对 NF- κ B 活性表达和 AQP-4 蛋白表达进行相关性分析表明两者呈正相关, 表明 NF- κ B 和 AQP-4 在大鼠脑出血后脑血肿及炎症中存在一定的协同作用, NF- κ B 被激活后可能通过上调 AQP-4 的表达从而发挥作用。在本研究中脑出血后脑血肿高峰时间在第 4 天, 迟于 NF- κ B 活性表达和 AQP-4 蛋白表达高峰, 进一步表明脑出血后可激活 NF- κ B, 进而调控 AQP-4 的表达, AQP-4 表达增加可引起血脑屏障通透性增加, 最终导致脑组织含水量的增加。因此, 大鼠脑出血后脑组织含水量与 NF- κ B 的激活显著相关, NF- κ B 在调控脑出血后水肿形成的病理生理过程中发挥了关键作用。

亚低温是一种利用物理手段使得机体温度降至 32~35℃, 研究表明, 亚低温在脑卒中和缺血再灌注等疾病中发挥了一定的保护脑神经功能的作用, 但机制尚未十分明确^[14]。有研究表明, 缺氧诱导因子-

1 α 和血管内皮生长因子可能在亚低温发挥脑神经保护作用中发挥了一定作用^[15]。另外亚低温需要考虑持续时间对疗效的影响,因此本次研究参考宋宇等^[16]的方法采用相对短的时间(2h)作为本次实验中亚低温的持续时间,从而避免深低温对机体的不良反应。在本次实验中,在大鼠脑出血后随机对实验动物实施亚低温治疗,笔者发现亚低温可明显降低大鼠脑出血后脑组织含水量,另外亚低温还可显著抑制 NF- κ B 的活性表达和 AQP-4 表达,从而表明亚低温可能通过抑制 NF- κ B 的活性表达来抑制 AQP-4 的表达,最终抑制脑出血后脑组织炎症程度,来达到对脑出血后脑保护的作用。虽然 NF- κ B 的活性表达在早期可能具有短暂性的抗神经元细胞凋亡的作用,但 NF- κ B 的持续激活可调控炎症级联效应中多种蛋白的表达,最终对脑组织产生损害作用。因此,鉴于 NF- κ B 的激活对脑组织具有保护和破坏的双重作用,在临床应用亚低温治疗脑出血时,如何将 NF- κ B 的活性表达控制在一个合理范围内,有待于进一步研究。

参考文献

- 1 He D, Zhao L, Li L, *et al.* Changes of blood flow perfusion by MR and NF- κ B expression in the region of perihematoma after experimental intracerebral hemorrhage: a correlation study [J]. *Int J Neurosci*, 2009, 119(6):806-814
- 2 Ito H, Yamamoto N, Arima H, *et al.* Interleukin-1 β induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor- κ B pathway in rat astrocytes [J]. *J Neurochem*, 2006, 99(1):107-118
- 3 Xue M, Del Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 283(3):230-232
- 4 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cere-

- bral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91
- 5 赵芳芳,罗玉敏,徐敏,等. 高血压性脑出血病理生理研究进展 [J]. *卒中与神经疾病*, 2013, 20(3):189-192
- 6 Wang YX, Yan A, Ma ZH, *et al.* Nuclear factor- κ B and apoptosis in patients with intracerebral hemorrhage [J]. *J Clin Neurosci*, 2011, 18(10):1392-1395
- 7 Aronowski J, Hall CE. New horizons for primary intracerebral hemorrhage treatment: experience from preclinical studies [J]. *Neurol Res*, 2005, 27(3):268-279
- 8 Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, *et al.* Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- κ B pathway [J]. *J Neurochem*, 2013, 126(6):699-704
- 9 Ding Z, Zhang J, Xu J, *et al.* Propofol administration modulates AQP-4 expression and brain edema after traumatic brain injury [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(2):615-622
- 10 Yu L, Yi J, Ye G, *et al.* Effects of curcumin on levels of nitric oxide synthase and AQP-4 in a rat model of hypoxia-ischemic brain damage [J]. *Brain Res*, 2012, 26(1475):88-95
- 11 丁亚楠,王冀伟,杜磊,等. 七叶皂苷钠对大鼠脑出血后脑组织核转录因子和水通道蛋白的作用及相关分析 [J]. *中国医药导报*, 2013, 10(17):19-21
- 12 贾伟一,张舜. 高血压脑出血的综合治疗进展 [J]. *中国实用医刊*, 2013, 40(11):114-115
- 13 张轩,邵恩得,田世文. 高血压性大鼠脑出血血肿量对 NF- κ B 表达的影响 [J]. *河北医药*, 2009, 31(14):1732-1734
- 14 殷玉华,李明,贾锋,等. 亚低温干预对创伤性颅脑损伤大鼠海马组织 CIB1 表达的影响 [J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2013, 33(4):392-395
- 15 王晓萍,赵桑,林庆明,等. 亚低温对大鼠脑出血后脑水肿及缺氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2013, 22(5):496-500
- 16 宋宇,王立义,魏志玄. 亚低温对脑损伤大鼠海马区 Cyt-C、Bcl-XL、Bcl-XS 表达的影响 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2012, 21(12):1319-1321

(收稿日期:2014-03-10)

(修回日期:2014-03-20)

(上接第 13 页)

- 16 Wang JG, Geddings JE, Aleman MM, *et al.* Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer [J]. *Blood*, 2012, 119(23):5543-5552
- 17 Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, *et al.* Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets [J]. *Thrombosis Haemostasis* Stuttgart, 2007, 97(3):425
- 18 Schmitt M, Kuhn W, Harbeck N, *et al.* Thrombophilic state in breast cancer [M]. New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, 1999:157-166
- 19 Zwicker JJ, Liebman HA, Neuberg D, *et al.* Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy [J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(22):6830-6840
- 20 Varki NM, Varki A. Heparin inhibition of selectin-mediated interac-

tions during the hematogenous phase of carcinoma metastasis: rationale for clinical studies in humans [M]. New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, 2002:53-66

- 21 Shi J, Pipe SW, Rasmussen JT, *et al.* Lactadherin blocks thrombosis and hemostasis in vivo: correlation with platelet phosphatidylserine exposure [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2008, 6(7):1167-1174
- 22 Shi J, Gilbert GE. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites [J]. *Blood*, 2003, 101(7):2628-2636
- 23 Xie R, Gao C, Li W, *et al.* Phagocytosis by macrophages and endothelial cells inhibits procoagulant and fibrinolytic activity of acute promyelocytic leukemia cells [J]. *Blood*, 2012, 119(10):2325-2334
- 24 Fu Y, Zhou J, Li H, *et al.* Daunorubicin induces procoagulant activity of cultured endothelial cells through phosphatidylserine exposure and microparticles release [J]. *Thrombosis Haemostasis*, 2010, 104(6):1235

(收稿日期:2014-03-31)

(修回日期:2014-04-08)