

# 电刺激小脑顶核对局灶脑缺血再灌注大鼠脑组织 C-Rel、BxL-xL表达的影响

龚家明, 蒋瑛子, 赵雪, 胡德荣, 渠翔, 谢雪梅

**摘要** 目的:检测电刺激小脑顶核干预后局灶性缺血再灌注大鼠脑组织核因子C-Rel、BxL-xL表达的变化,探讨电刺激小脑顶核中枢神经源保护的作用机制。**方法**:60只Wistar大鼠随机分为正常组(NC组)、缺血再灌注组(I/R)、电刺激小脑顶核组(FNS组),每组20只。采用线栓法制作脑缺血再灌注动物模型,FNS组予以电刺激小脑顶核干预。免疫组织化学染色法检测C-Rel和Bcl-xL蛋白表达,逆转录聚合酶链反应法检测C-Rel和Bcl-xL mRNA转录水平。**结果**:FNS组C-Rel和BxL-xL蛋白表达水平和mRNA转录水平均高于其他2组( $P<0.05$ ),但I/R组和NC组之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论**:电刺激小脑顶核可诱导局灶性缺血再灌注大鼠脑组织C-Rel和BxL-xL的表达上调,这可能是其发挥中枢神经源性保护作用的机制之一。

**关键词** 电刺激小脑顶核;脑局灶性缺血再灌注;核因子C-Rel;核因子BxL-xL

**中图分类号** R741;R741.02;R743 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.12.014

**作者单位**

安康市中心医院神  
经内科

陕西 安康 725000

**收稿日期**

2016-11-29

**通讯作者**

胡德荣

AKhdr28@163.com

研究发现,电刺激小脑顶核能减轻局灶性脑缺血再灌注后神经损伤,缩小梗死体积,其机制可能与减轻炎症反应、抑制神经细胞凋亡有关<sup>[1-4]</sup>。缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡受一系列基因调控,涉及许多蛋白的表达及相互影响。本实验采用电刺激小脑顶核干预脑局灶性缺血再灌注大鼠,检测核因子C-Rel、BxL-xL表达的变化,探讨电刺激小脑顶核的中枢神经源性保护作用机制。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物和分组 健康雄性Wistar大鼠60只,体质量250~300g,由重庆医科大学实验中心提供。所有大鼠随机分为正常组(NC组),缺血再灌注组(I/R组),电刺激小脑顶核组(FNS组),各20只。I/R组为缺血2h后再灌注24h,FNS组再灌注同时电刺激小脑顶核1h。

### 1.2 方法

1.2.1 缺血/再灌注模型制备 线栓法制作大鼠脑缺血再灌注模型<sup>[5]</sup>,参考Longa等的评分法,>2分者入选。排除标准:取脑时发现病灶蛛网膜下腔出血,切片HE染色未见梗死病灶,观察时间内动物死亡。按随机抽样原则补足相应例数。

1.2.2 电刺激小脑顶核 大鼠麻醉后固定于脑立体定向仪上,小脑顶核定位:前囟后11.6mm,左旁开1.1mm,深度5.6mm。钻开颅骨后,插入双极同心圆电极(100 $\mu$ m),予以强度50 $\mu$ A、频率70Hz、时程0.5ms的电刺激,持续1h。

1.2.3 免疫组织化学染色法检测C-Rel和Bcl-xL蛋白表达 于缺血再灌注后24h,各组取10只大鼠,4%甲醛灌注固定后,冠状切取视交叉后部脑组织,制作石蜡切片,常规免疫组化染色,不同的切片分

别加入bcl-xL(1:100)和C-Rel(1:100)单克隆抗体(均购于北京中杉生物公司),4 $^{\circ}$ C湿盒内过夜。滴加生物素化二抗,37 $^{\circ}$ C孵育20min;PBS洗涤3次,然后滴加辣根酶标记链霉卵白素,37 $^{\circ}$ C孵育20min,DAB显色。每只大鼠取3张切片采集图像,在400倍下,每张切片随机取5个视野,应用Image-pro plus 6.0图象分析软件进行平均光密度值测定分析。

1.2.4 逆转录聚合酶链反应法检测C-Rel和Bcl-xL mRNA转录水平 于缺血再灌注后24h,各组取10只大鼠,动物麻醉后直接断头取脑,冰上取右侧大脑中动脉供血的皮质区。C-Rel引物正义链:5'-GTGCGTGGAAGCGTAGACA-3',反义链:5'-CAGCCAAGGTGACCCATTAC-3',bcl-xL引物正义链:5'-CGGAATTCGCCACCATGACCAC-3',反义链:5'-GCCTTAAGCGGTGGTAGGTG-3'。由重庆海韵生物技术公司合成。提取各组大鼠脑组织总RNA并定量,用DNAase I去除DNA污染,各实验组取同等量的RNA,合成cDNA,PCR扩增。2%的琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad凝胶成像系统成像并测定光密度值,以目的基因与 $\beta$ -actin条带平均光密度比值表示目的基因mRNA的相对表达量,对各组产物进行半定量分析。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件处理数据,计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫组织化学检测结果与分析

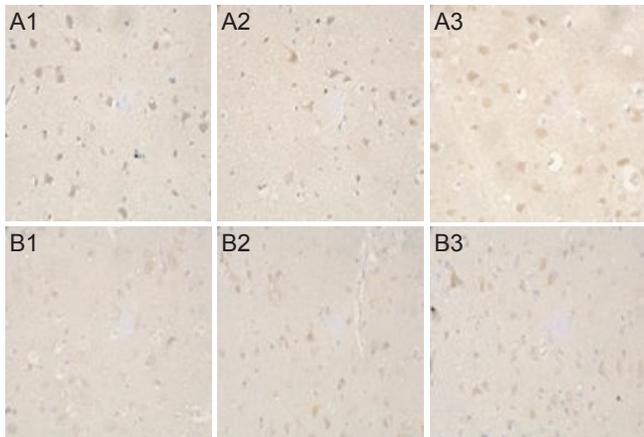
免疫组化染色结果显示,C-Rel阳性细胞和BxL-xL阳性细胞均呈胞浆黄染,FNS组C-Rel和BxL-xL表达均高于其他2组( $P<0.05$ ),I/R组和NC

组之间表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图1,表1。

表1 各组 C-Rel、BxL-xL 蛋白表达光密度值比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别   | 只数 | C-Rel                  | BxL-xL                 |
|------|----|------------------------|------------------------|
| NC组  | 10 | 0.25±0.06 <sup>①</sup> | 0.38±0.05 <sup>①</sup> |
| I/R组 | 10 | 0.35±0.01 <sup>①</sup> | 0.42±0.03 <sup>①</sup> |
| FNS组 | 10 | 1.48±0.02              | 1.37±0.01              |

注:与FNS组比较,<sup>①</sup> $P<0.05$



注:(A1) NC组 C-Rel;(A2) I/R组 C-Rel;(A3) FNS组 C-Rel;(B1) NC组 BxL-xL;(B2) I/R组 BxL-xL;(B3) FNS组 BxL-xL

图1 免疫组织化学法检测 C-Rel 及 BxL-xL 结果(光镜,×400)

## 2.2 RT-PCR 检测结果与分析

FNS组 C-Rel 和 BxL-xL mRNA 转录水平均高于其他2组( $P<0.05$ ),I/R组和NC组之间转录水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表2。

表2 各组 C-Rel、BxL-xL mRNA 转录水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别   | 只数 | C-Rel                  | BxL-xL                 |
|------|----|------------------------|------------------------|
| NC组  | 10 | 0.27±0.03 <sup>①</sup> | 0.35±0.04 <sup>①</sup> |
| I/R组 | 10 | 0.31±0.01 <sup>①</sup> | 0.43±0.03 <sup>①</sup> |
| FNS组 | 10 | 1.43±0.02              | 1.53±0.01              |

注:与FNS组比较,<sup>①</sup> $P<0.05$

## 3 讨论

NF- $\kappa$ B 是重要转录调节因子,在中枢系统具有破坏和修复的双重作用。脑缺血再灌注时,与NF- $\kappa$ B结合的抑制蛋白 I $\kappa$ B 磷酸化降解,暴露核定位信号区,NF- $\kappa$ B 蛋白转入细胞核内,启动下游相关靶基因的转录,调控炎症反应、神经细胞凋亡及死亡过程,在脑缺血再灌注的病理生理过程中发挥着重要的作用。C-Rel 是NF- $\kappa$ B 蛋白家族成员之一,C-Rel 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用。Marina 等<sup>[6,7]</sup>研究发现,用基因敲除和RNA干扰

技术抑制 c-Rel 基因表达后,缺血再灌注动物脑梗死面积增大,病理损伤程度加重。Alessandra 等<sup>[8,9]</sup>研究发现,缺血皮质可诱生动物脂肪激素 Leptin 发挥神经保护作用,Leptin 是通过激活含有 c-Rel 的二聚体入核,诱导 Bcl-xL 转录,抑制氧糖剥夺后的神经元凋亡。培养敲除 c-Rel 基因的神经元并行氧糖剥夺后,神经元凋亡未减少。Bcl-xL 是 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白,相关研究发现,Bcl-xL 参与了脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的调控,通过基因敲除、转基因动物等实验发现其有效的抑制细胞凋亡,缩小梗死面积。本实验研究显示,缺血再灌注后 24 h, C-Rel 和 Bcl-xL 表达增加,证实脑缺血可通过激活 C-Rel 上调 Bcl-xL 表达,发挥抗凋亡和脑保护作用。

既往研究表明,小脑顶核是调控脑血流量的神经中枢,电刺激小脑顶核可抑制加压素、肾上腺素等血管收缩的活性物质释放,导致脑血管扩张,改善微循环,增加局部脑血流。此外,电刺激小脑顶核还能减轻炎症反应,稳定细胞膜,降低神经元兴奋性,提高神经细胞对缺血缺氧的耐受性,发挥内源性神经保护作用。本实验结果显示,与正常组和缺血再灌注组比较,FNS组核因子 C-Rel 和 Bcl-xL 的表达明显增加,提示电刺激小脑顶核可能通过激活 C-Rel 和增加其表达,诱导下游靶基因 Bcl-xL 的表达。抗凋亡蛋白 Bcl-xL 表达增加后抑制脑缺血再灌注神经细胞的凋亡,减轻缺血再灌注损伤,可能是其发挥中枢神经源性神经的机制之一。

## 参考文献

- [1] Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2014, 383: 245-254.
- [2] 金玉玲, 谢艳萍, 朱晓峰. 电刺激小脑顶核促进大鼠中动脉缺血鼠共移植体中神经干细胞向神经元的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11: 4752-4755.
- [3] Liu J, Li J, Yang Y, et al. Neuronal apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion area following electrical stimulation of fas-tigial nucleus[J]. Neural Regen Res, 2014, 9: 727-734.
- [4] 刘阳, 孙谦, 王伟, 等. TREK-1 通道活性改变对大鼠局灶性脑缺血后细胞凋亡和凋亡相关蛋白的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2014, 9: 11-15.
- [5] 罗勇, 董为伟. Wistar 大鼠插线法局灶性脑缺血/再灌注模型的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2002, 27: 1-4.
- [6] Sarnico I, Lanzillotta A, Boroni F, et al. NF- $\kappa$ B p50/Rel A and c-Rel-containing dimers: opposite regulators of neuron vulnerability to ischemia[J]. J Neurochem, 2009, 108: 475-485.
- [7] Boonyatecha N, Sangphech N, Wongchana W, et al. Involvement of Notch signaling pathway in regulating IL-12 expression via c-Rel in activated macrophages[J]. Mol Immunol, 2012, 51: 255-262.
- [8] Valerio A, Dossena M, Bertolotti P, et al. Leptin is induced in the ischemic cerebral cortex and exerts neuroprotection through NF-kappa B c-Rel-dependent transcription[J]. Stroke, 2009, 40: 610-607.
- [9] Pizzi M, Goffi F, Boroni F, et al. Opposing roles for NF-kappa B/Rel factors p65 and c-Rel in the modulation of neuron survival elicited by glutamate and interleukin-1 $\beta$ [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 20717-20723.

(本文编辑:唐颖馨)