

Alpha DHEC 神经保护作用依赖核因子 Kappa B 的激活

郑淑秋*, 李 彤, 榻亦雄, 林穗珍, 陈丽君, 颜光美

(中山医科大学药理教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 目的 探讨 α -二氢麦角隐亭 (α -DHEC) 的神经保护作用与核因子 Kappa B (NF- κ B) 激活的相关性。方法 采用大鼠大脑中动脉闭塞诱导神经元凋亡, 用迁移率改变法 (EMSA) 检测 NF- κ B 活性, 流式细胞仪 (FCM) 和 TUNEL 法检测神经元凋亡。结果 脑缺血 1, 3, 6 和 12 h 均伴有 NF- κ B 激活, 其中以缺血 3 h 尤为显著。100 μ g \cdot kg $^{-1}$ 和 150 μ g \cdot kg $^{-1}$ 的 α -DHEC 预防给药均可明显抑制缺血 3 h 诱发的神经元凋亡, 当用 PDTC 选择性阻断 NF- κ B 活性后, α -DHEC 的神经保护作用明显减弱。结论 α -DHEC 的神经保护作用可能依赖 NF- κ B 的激活。

关键词: α -二氢麦角隐亭; 核因子 kappa B; 脑缺血; 细胞凋亡

中图分类号: R966; R743

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2000)12 - 0898 - 04

α -二氢麦角隐亭 (α -dihydroergocryptine, α -DHEC) 属 α 受体阻断剂, 动物实验和临床观察均表明, α -DHEC 对缺血诱发的神经元损伤有保护作用^[1, 2], 近年已用于临床做为缺血性脑血管疾病的防治, 一直认为其作用机制与其 α 阻断作用, 从而解除脑血管痉挛和增加脑血流量等因素有关。利用体外培养的小脑颗粒神经元我们偶然发现, α -DHEC 可抑制缺氧缺糖所诱发的细胞凋亡, 当用 SN50 选择性阻断 NF- κ B 活性后, α -DHEC 的抗凋亡作用明显减弱, 提示 α -DHEC 的神经保护作用机制可能与 NF- κ B 激活有关。本研究采用大鼠大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型, 旨在探讨 α -DHEC 的神经保护作用与 NF- κ B 激活的相关性, 以进一步阐明 α -DHEC 的神经保护作用机制。

材 料 与 方 法

试剂和药品 α -DHEC 由法国 Logeais 药厂提供; NF- κ B 寡核苷酸探针和 EMSA 检测试剂盒为 Promega 公司产品; TUNEL 检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司; [γ -³²P]ATP 购自北京原子能物理所; PDTC (NF- κ B 抑制剂) 和蛋白酶 K 均为 Sigma 公司产品。

实验动物及分组 取健康 δ Wistar 大鼠, 体重 (260 \pm 20) g, 由中山医科大学动物中心提供。大鼠随机分 5 组, 每组 5 只动物。(1) 假手术组, (2) 单纯缺血组, (3) α -DHEC (100 μ g \cdot kg $^{-1}$, 150 μ g \cdot kg $^{-1}$) 加缺血组, (4) PDTC (100 mg \cdot kg $^{-1}$) 加 α -DHEC (100 μ g \cdot kg $^{-1}$) 加缺血组, (5) 溶媒对照组。

MCAO 模型制备 大鼠用 3% 戊巴比妥钠 (0.1 mL \cdot kg $^{-1}$) 腹腔麻醉, 颈部正中切口, 分离右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA), 将制备好的 3-0 号尼龙龙线自 ECA 残端插入, 插入深度约 2.5 cm, 以阻塞大脑中动脉 (MCA) 的血流。术后以出现典型的 Horner 征 (即动物躯体左转、左前肢偏瘫) 为模型成功的标志。假手术组栓子自 ECA 插入 1 min 后拔出。不同浓度的 α -DHEC 分别于大鼠 MCAO 模型 2 h 前腹腔给药, PDTC 于 MCAO 模型 1 h 前腹腔注射, 溶媒对照组注射等体积的生理盐水。

核蛋白提取和 EMSA 检测 参照 Dignam (1983) 的方法进行。脑组织匀浆后迅速加入 5 倍体积冷 PBS 液悬浮, 2 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 沉淀加入 A 液 (mmol \cdot L $^{-1}$: Hepes 110, MgCl₂ 1.5, KCl 10, DTT 0.35, pH 7.9), 冰水浴 10 min 后, 加入 10% NP-40 震荡 10 s, 4 000 \times g 室温下离心 30 s, 沉淀加入 B 液 (mmol \cdot L $^{-1}$: Hepes 20, glycerol 20%, EDTA 0.2, PMSF 0.5, pH 7.9), 混匀后置 4 $^{\circ}$ C 摇床震荡 30 min, 6 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 收集上清液 - 80 $^{\circ}$ C 储存备用。蛋白浓度测定采用 lorry 法。

EMSA 检测 参照试剂盒内说明书进行: 取

收稿日期: 2000-03-18

基金项目: 国家杰出青年基金 (39625022) 和广东省博士启动基金资助项目 (1100)

作者简介: 郑淑秋, 女, 副教授。

* Tel: (020) 87330578, Fax: (020) 87331679,

E-mail: shuqiouz@yahoo.com.cn

1. $75 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 未标记的双链 NF- κ B 寡核苷酸探针 ($5'$ -AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C- $3'$; $3'$ TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G- $5'$) 和 T_4 多核苷酸激酶, 用 [γ - ^{32}P]ATP ($3.7 \times 10^8 \text{ Bq} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行标记, 总反应体积为 $25 \mu\text{L}$ (核蛋白 $3 \mu\text{L}$, poly dIdC $2 \mu\text{L}$, [γ - ^{32}P]ATP 标记的 NF- κ B 探针 $2 \mu\text{L}$, 反应液 $18 \mu\text{L}$), 混匀后室温放置 20 min , 上样于聚丙烯酰胺凝胶样品孔中, 恒压 150 V 电泳。电泳结束后轻轻揭下凝胶, 放入暗盒中 -70°C 曝光、显影。NF- κ B 激活的阳性片状显色采用 Kontron IBAS 2.0 型全自动图像分析系统测量显色阳性区及背景阴性区的平均灰阶值。

TUNEL 检测 参照试剂盒内说明书进行。大鼠用 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后, 迅速取出脑组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 切片 (厚度 $4 \mu\text{m}$)。切片组织经脱蜡, 梯度乙醇复水化, 加入 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶 K 室温下消化 30 min , PBS 冲洗, 加入 TUNEL 反应液, 阴性对照反应液中不加 TdT, 37°C 湿盒中 1 h 后 PBS 冲洗, 加入生物素抗体, NBT 显色, 核固红衬染。光镜下凋亡细胞呈紫蓝色。于凋亡阳性细胞分布区随机选择视野, 以每个高倍镜视野 (10×40) 内的细胞凋亡数作为凋亡的量化指标, 计算凋亡阳性细胞百分比。

流式细胞仪 (FCM) 检测 DNA 断裂百分率 脑组织用 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, $200 \times g$ 离心 5 min , 沉淀加入 70% 无水乙醇 4°C 固定过夜, 离心后沉淀用 PBS 悬浮, $400 \mu\text{m}$ 尼龙网过滤, 加入 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNAase 置 37°C 消化 30 min , 然后加入 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 碘化丙啶 (PI) 4°C 避光 1 h , 用 FACS-420 型流式细胞仪检测并计算凋亡细胞 DNA 断裂百分比。

统计处理 试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。

结 果

1 脑缺血诱发 NF- κ B 激活的时相变化

EMSA 检测结果显示, 脑缺血 $1, 3, 6$ 和 12 h 均伴有 NF- κ B 激活, 其中以缺血 3 h 尤为显著, 图像分析平均灰阶值为 180 ± 6 , 与正常对照组 (平均灰阶值为 67 ± 16) 相比差异显著 ($P < 0.01$, $n = 5$)。而缺血 6 h 和 12 h 后 NF- κ B 活性逐渐减弱, 平均灰阶值分别为 149 ± 6 和 125 ± 18 , 但与正常对照组相比也有显著差异 ($P < 0.05$, $n = 5$), 结果见图 1。

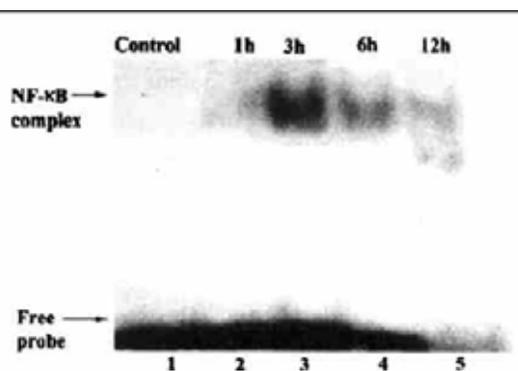


Fig 1 Time course and mean greyvalue of NF- κ B activation after cerebral ischemia. Five mg of nuclear protein were used for electromobility gel shift assay

Lane 1: Control, mean greyvalue of NF- κ B is 67 ± 16 . Lane 2 ~ 5: The activity of NF- κ B induced by cerebral ischemia after $1, 3, 6$ and 12 h , mean greyvalue of NF- κ B are $84 \pm 4, 180 \pm 6, 149 \pm 19$ and 125 ± 18 respectively. The results show that cerebral ischemia 3 h potentially induced NF- κ B activation.

2 α -DHEC 抑制脑缺血诱发的神经元凋亡

TUNEL 检测结果显示, 脑缺血 $1, 3, 6$ 和 12 h 均发现有神经元凋亡, 但以缺血 $2.5 \sim 3 \text{ h}$ 最多, 结果见表 1。 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $150 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 α -DHEC 预防给药均可明显抑制缺血 3 h 诱发的神经元凋亡, 给药后凋亡细胞百分比分别为 $12.4\% \pm 2.2\%$ 和 $10.9\% \pm 2.0\%$, 与单纯缺血 3 h 组比较差异显著 ($P < 0.05$, $n = 5$)。

Tab 1 Percent of neuroapoptosis induced at various time of cerebral ischemia in rats subjected to middle cerebral artery occlusion. Neuroapoptosis was measured by deoxynucleotidy transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

Group	Time / h	Percent of neuroapoptosis / %
Control		5.2 ± 1.4
Ischemia	1	7.3 ± 1.7
	2	$19 \pm 4^*$
	2.5	$33 \pm 6^{**}$
	3	$31 \pm 9^{**}$
	6	$21.8 \pm 1.9^*$
	12	12.3 ± 1.8

$n = 5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control

3 PDTC 减弱 α -DHEC 的神经保护作用

TUNEL 检测结果显示: 当用 PDTC ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 阻断大鼠 NF- κ B 活性后, α -DHEC

($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的神经保护作用消失,凋亡细胞百分比为 $38.8\% \pm 12.5\%$,与单纯缺血 3 h 组比较无显著性差异 ($P > 0.05, n = 5$),提示 α -DHEC 的神经保护作用被 PDTC 所阻断。流式细胞检测结果显示:脑缺血 3 h 后 DNA 直方图上呈现特征性的细胞凋亡峰 (AP 峰),给予 α -DHEC ($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

后 AP 峰明显减弱。当大鼠预先用 PDTC ($100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 抑制 NF- κ B 活性后, α -DHEC 抑制神经元凋亡的作用减弱,DNA 直方图上 AP 峰明显增强,提示神经元损伤程度加重,其结果与 TUNEL 检测一致,结果见图 2。

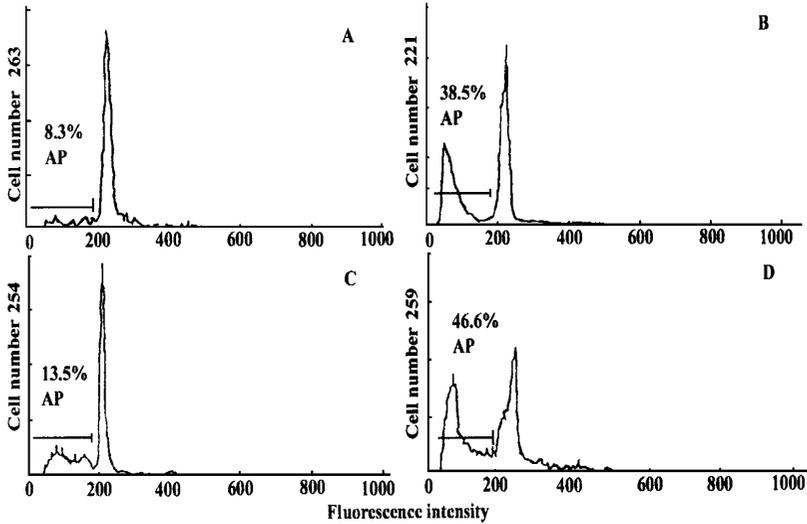


Fig 2 The results of flow cytometry analysis. The cells were stained immediately following fixation at 4°C with propidium iodide (PI) and measured by flow cytometry. A: Control; B: After 3 h of cerebral ischemia; C: Pretreated with α -DHEC ($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$); D: Pretreated with PDTC ($100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). AP represents percentage of apoptotic cells DNA fragmentation

讨 论

EMSA 检测结果显示,脑缺血在诱发神经元产生凋亡的同时,也伴有 NF- κ B 激活,这一结果与近年的文献报道一致^[3,4]。TUNEL 检测和流式细胞检测结果均表明 α -DHEC 对大鼠脑缺血诱发的神经元凋亡有保护作用,当用 PDTC 阻断 NF- κ B 活性后, α -DHEC 的神经保护作用明显减弱,这一结果与我们在体外培养的小脑颗粒神经元实验中所观察到的结果一致(待发资料),提示 NF- κ B 激活介导了 α -DHEC 的神经保护作用。

NF- κ B 是体内广泛存在的一种核转录因子,在失活态 NF- κ B 与其抑制亚基 I κ B 以无活性的三聚体 (P50-P65-I κ B) 形式存在于胞浆,在激活态与 I κ B 解离以有活性的二聚体 (P50-P65) 结合形式存在于胞核。研究表明,凡是能引起胞浆 I κ B 磷酸化或被体内泛素/蛋白酶体系 (ubiquitin/proteasome system) 识别而降解的因素均可以激活 NF- κ B。近年研究发现 NF- κ B 激活可减弱许多有害刺激(如: TNF α 、氧自由基、化疗药物、缺血缺氧及 HIV-1 感

染等) 诱发的组织损伤和细胞凋亡^[5-7],并发现 NF- κ B 的抗凋亡作用与减弱 ICE 家族(即 caspase 家族)的功能有关^[8,9],提示 NF- κ B 激活在凋亡的信号传导中起重要作用。

α -DHEC 属 α 受体阻断剂,但为什么抑制 NF- κ B 活性后其抗凋亡作用明显减弱,最近我们采用大鼠 MCAO 模型已初步发现, α -DHEC 本身即有增强 NF- κ B 活性的作用。根据上述实验结果和理论分析,我们认为 α -DHEC 的神经保护作用机制除了与其 α 受体阻断作用有关外,还与 NF- κ B 激活密切相关,推测 α -DHEC 很可能即是一个 α 受体的阻断剂,同时也是 NF- κ B 激活的诱导剂,但 α -DHEC 的 α 阻断作用和 NF- κ B 激活之间的内在关系还需进一步探讨。

REFERENCES:

[1] Coppi G. Neuroprotective activity of α -dihydroergocryptine in animal models [J]. *J Neural Transm Suppl*, 1995, 45 (Suppl):307-318.
 [2] Battistin L, Bardin PG, Ferro Milone F, et al. α -dihydroergocryptine in Parkinson's disease: a multicentre

- randomized double blind parallel group study [J]. *Acta Neurol Scand*, 1999, **99**(1) :36 - 42 .
- [3] Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, *et al.* Global ischemia activates nuclear factor- κ B in forebrain neurons of rats [J]. *Stroke*, 1997, **28**(5) :1073 - 1081 .
- [4] Zhang S, Tobaru T, Zivin JA, *et al.* Activation of nuclear factor Kappa B in the rabbit spinal cord following ischemia and reperfusion [J]. *Mol Brain Res*, 1998, **63**(1) :121 - 132 .
- [5] Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr, *et al.* TNF and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-Kappa B [J]. *Science*, 1996, **274**(5288) :784 - 787 .
- [6] Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, *et al.* Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- κ B [J]. *Trends Cell Biol*, 1998, **8**(3) :107 - 111 .
- [7] Deluca C, Kwon H, Pelletier N, *et al.* NF- κ B protects HIV-1-infected myeloid cells from apoptosis [J]. *Virology*, 1998, **244**(1) :127 - 138 .
- [8] Charriaut MC, Remolleau S, Aggout-Zouaoui D, *et al.* Apoptosis and programmed cell death: a role in cerebral ischemia [J]. *Biomed Pharmacother*, 1998, **52**(2) :264 - 269 .
- [9] Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, *et al.* NF-Kappa B antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation [J]. *Science*, 1998, **282**(5383) :1680 - 1683 .

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF ALPHA DIHYDROERGOCRYPTINE DEPENDS ON ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR KAPPA B

ZHENG Shu-qiu, LI Tong, XUAN Yi-xiong, LIN Su-zhen, CHEN Li-juan, YAN Guang-mei

(Department of Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the relationship between the neuroprotective effect of alpha-dihydroergocryptine (alpha-DHEC) and the activation of nuclear factor Kappa B (NF-Kappa B). **METHODS** Adult male rats were subjected to cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO). DNA binding activity of NF-Kappa B was determined with electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in animals subjected to varying durations of cerebral ischemia. Neuroapoptosis induced by ischemic damage was measured by deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay and flow cytometry (FCM) analysis. **RESULTS** No change was observed in nuclear NF-Kappa B DNA binding in normal animal. A low level of constitutive NF-Kappa B DNA binding was detected in animals subjected to cerebral ischemia of 1 h, and significant increase in the amount of active NF-Kappa B in nuclear extracts was observed after cerebral ischemia of 3 h, 6 h, and 12 h. Peak of NF-Kappa B DNA binding was observed at the time point of 3 h. Animals subjected to cerebral ischemia of 3 h potentially initiates neuroapoptosis and activates NF-Kappa B in nuclear extract. Alpha-DHEC ($100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $150 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) showed significant protective effect on neuroapoptosis-induced by cerebral ischemia of 3 h, and inhibiting NF-Kappa B activation using $100 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) in the continuous presence of alpha-DHEC, the neuroprotective effect of alpha-DHEC was blocked. **CONCLUSION** The findings suggest that the neuroprotective effect of alpha-DHEC may depend on the activation of NF-Kappa B.

KEY WORDS: alpha-dihydroergocryptine; nuclear factor kappa B; apoptosis; cerebral ischemia