

· 论 著 ·

黄芩甙对大鼠感染性脑水肿 NF- κ B 活性的影响

俞燕, 杨于嘉, 毛定安, 陶永光

(湖南医科大学附属湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 探讨核因子- κ B(NF- κ B)及其抑制蛋白(I κ B)在百日咳菌液所致的大鼠感染性脑水肿模型中的变化及黄芩甙对感染性脑水肿的保护作用是否与抑制 NF- κ B 活化和 I κ B 降解有关。方法 健康 SD 大鼠 45 只随机分成三组:生理盐水对照组(NS组);百日咳菌感染性脑水肿模型组(PB组);黄芩甙治疗组(BC组)。BC组动物从注菌后 1 h 起每 4 h 腹腔注射黄芩甙一次。用电泳迁移率改变法(EMSA)检测各组动物脑组织的 NF- κ B 与靶基因 DNA 的结合活性,用 Western 印迹分析法检测各组动物脑组织的 I κ B α 表达。结果 在 NS 组、PB 1 h 组 NF- κ B 活性较弱, PB 2 h 组 NF- κ B 活性增加,以后持续升高,并以 PB 24 h 组活性最强;PB 2 h 组 I κ B α 表达开始减少,24 h 降到最低。BC 2 h, 4 h, 8 h, 24 h 组 NF- κ B 活性低于相应 PB 组。黄芩甙组 I κ B α 表达比相应 PB 组增多。结论 百日咳菌所致的大鼠感染性脑水肿模型中 NF- κ B 的活性明显增强, NF- κ B 活化可能参与了感染性脑水肿发病机制。黄芩甙对感染性脑水肿的保护作用可能是通过抑制 NF- κ B 异常活化和 I κ B α 降解起作用的。

[关键词] 核因子- κ B; 抑制因子 κ B; 脑水肿; 黄芩甙; 大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)06-0386-04

Influence of Baicalin on NF- κ B Activity in Infectious Brain Edema of Rats

YU Yan, YANG Yu-Jia, MAO Ding-An, et al.

Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Hunan Medical University, Changsha 410008, China

Abstract: **Objective** To explore changes of NF- κ B and its inhibitory protein (I κ B) in infection-induced cerebral edema, and to determine whether the protective effect of baicalin on infection-induced cerebral edema was related to the inhibitory effect on NF- κ B activation and I κ B degradation. **Methods** Forty-five healthy Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into three groups: the normal saline group (NS), the pertussis bacilli group (PB), and the baicalin-treated group (BC). In the BC group, baicalin was administered intraperitoneally every 4 hours from the first hour after the injection of pertussis bacilli. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed on the nuclear extracts to detect the activity of NF- κ B and Western blot analysis was performed to detect the expression of I κ B- α . **Results** There was no significant NF- κ B activation in the NS group. In the PB group, at 1 hour, the levels of NF- κ B activation were similar to those in the NS group. In the PB group, at 2 hours, NF- κ B started to be activated. The activity of NF- κ B reached the highest level in the PB group at 24 hours. The expression of I κ B α began to decrease in the PB group at 2 hours and reached the lowest level in the PB group at 24 hours. There was no significant inhibitory effect on NF- κ B activity and I κ B- α degradation in the BC group at 1 hour. In the BC group, at 2 hours, 4 hours, 8 hours and 24 hours, the activities of NF- κ B were lower than those in the relevant PB groups, and the expressions of I κ B α were higher than those in the relevant PB groups. **Conclusions** NF- κ B is strongly activated in infection-induced cerebral edema by pertussis bacilli. The elevation of NF- κ B may be a key factor that induces brain edema. The protective effect of baicalin on infection-induced cerebral edema may be associated with the inhibitory effect on NF- κ B activation and I κ B degradation.

Key words: NF- κ B; I κ B- α ; Baicalin; Brain edema; Rat

[收稿日期] 2000-06-20; [修回日期] 2000-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39870251)

[作者简介] 俞燕(1969-),女,博士,主治医师。

核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种重要的转录因子,它编码很多在炎症和免疫反应中起重要作用的蛋白质,越来越多的证据显示 NF- κ B 的激活是炎症反应的关键。已有研究表明 NF- κ B 也是脑组织中炎症、损伤及病毒感染的重要信号,在缺血性、创伤性、感染性脑损伤的脑组织中都发现有 NF- κ B 激活^[1,2,3],NF- κ B 活化在感染性脑水肿发病机制中起着重要作用。我们曾证明黄芩甙对感染性脑水肿有保护作用^[4],但它的机理还不十分清楚。本研究采用百日咳菌致大鼠感染性脑水肿模型,运用电泳迁移率改变法(Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)及 Western blot 印迹分析法检测 NF- κ B 与其靶基因 DNA 的结合活性和 NF- κ B 抑制蛋白(inhibitory κ B, I κ B)的表达,旨在阐明黄芩甙对感染性脑水肿的保护作用与 NF- κ B 活性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

百日咳菌液,含菌 10.8×10^9 /ml(北京生物制品研究所,批号:93-24-①);黄芩甙,分子量为 446.35(湘雅医院药剂科提供),经 HPLC 测定纯度 >95%;EMSA 试剂盒(美国 PROMEGA 提供);兔抗 I κ B- α 多克隆抗体(美国 PHARMINGEN 提供);羊抗兔 IgG,DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司提供)。

1.2 动物分组

健康 Sprague-Dawley 大鼠 45 只,雌雄各半,体重(212 ± 38)g,随机分为 3 组:生理盐水对照组(normal saline, NS),百日咳菌液组(pertussis bacilli, PB),百日咳菌液+黄芩甙治疗组(baicalin-treated, BC)。其中各组又分为 1 h,2 h,4 h,8 h,24 h 5 个亚组,分别在向左颈内动脉注射百日咳菌(PB 组,BC 组)或等体积 NS(NS 组)后 1 h,2 h,4 h,8 h,24 h 断头处死,每亚组重复 3 例。

1.3 百日咳菌液脑水肿模型的制作

使用我科建立的百日咳菌致大鼠感染性脑水肿模型。大鼠用 25% 乌拉坦 3 ml/kg 腹腔注射进行麻醉,仰卧位。颈正中切口,分离左颈总动脉,颈外动脉、颈内动脉及分支,结扎翼腭动脉和枕动脉,夹闭左颈外动脉,向左颈内动脉注射百日咳菌 0.2 ml/kg (PB 组,BC 组)或等体积 NS(NS 组)。所注百日咳菌液用前经超声粉碎,显微镜下证实无完整细菌。

BC 组从注菌 1 h 后每 4 h 重复腹腔注射 BC 每次 120 mg/kg。各组动物观察到相应时间点后断头取脑。黄芩甙用生理盐水配成 24 mg/ml 的注射液。

1.4 脑组织细胞核提取物制备

断头取脑后,用冰预冷的 $1 \times$ PBS (PH 7.4)漂洗净脑组织的血液,经纵裂均匀切分为左右半球,取左半脑皮层及海马区脑组织,用 SMTD-PMSF (0.25 mol/L 蔗糖、1 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L Tris-HCl PH 7.85, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF)匀浆,匀浆经 300 目钢网过滤后 2000 r/min 低温离心 8 min,收集沉淀。将沉淀用 SMTD-PMSF (含 1% TritonX-100)匀浆,冰上孵育 15 min 后 3400 r/min 低温离心 10 min,收集沉淀。再将沉淀用 SMTD-PMSF (含 0.5% TritonX-100)匀浆,离心后将沉淀用 SMTD-PMSF (含 1 mmol/L CaCl₂)洗涤,离心收集细胞核。将细胞核用 0.3 M KCL-MTD 裂解 60 min,并每隔 15 min 剧烈振荡一次,14000 r/min 低温离心 15 min,收集核蛋白^[5]。

1.5 电泳迁移率改变法检测 NF- κ B 活性

采用 EMSA 试剂盒。用 T₄ 多核苷酸激酶将含 NF- κ B 探针(5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3')末端标记 [γ -³²]ATP。将标有 γ -³²P 每 min 衰变数为 50,000~200,000 的探针与 20 μ g 核蛋白在 2~4 μ l 结合缓冲液中室温下反应 20 min,然后加入 1~2 μ l 10 $\times$ 加样缓冲液,在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中,0.5 $\times$ TBE 缓冲液中电泳,溴酚蓝电泳到接近 3/4 凝胶高度后停止电泳。将凝胶进行放射自显影。并设 4 组对照:阳性对照、竞争性抑制、非竞争性抑制(用试剂盒提供的 Hela 细胞核提取物取代上述脑组织细胞核提取物)及阴性对照(不加任何核提取物)。阴性对照、阳性对照按上述方法与 γ -³²P 标记的 NF- κ B 探针反应;竞争性抑制、非竞争性抑制的核提取物中除了加入标记的 NF- κ B 探针,另分别加入未标记的 NF- κ B 探针或未标记的非竞争性寡核苷酸探针。电泳凝胶进行放射自显影。

1.6 Western blot 印迹分析

按《分子克隆实验指南》所载方法进行。断头取脑后,立即取左脑组织 150 mg 左右,并用 PBS 漂洗尽血迹,用 $1 \times$ SDS 加样缓冲液裂解细胞,收集蛋白质样本。用全自动生化分析仪对样本进行蛋白质定量。以 90 μ g 蛋白每泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转膜到硝酸纤维素膜后,加入兔抗 I κ B- α

多克隆抗体及 HRP 标记的羊抗兔 IgG 孵育, DAB 显色试剂盒显色, 拍摄照片, 记录结果。

1.7 用 Eagle Eye II 型扫描仪(美国)对 EMSA 和 Western 印迹分析结果进行扫描及密度分析。

2 结果

2.1 细胞核的收集

经 SMTD-PMSF 反复机械匀浆, 离心后收集沉淀涂片, HE 染色。镜下见脑组织细胞膜破坏彻底, 细胞核成堆排列。

2.2 EMSA 检测 NF- κ B 与 DNA 的结合活性

阳性对照、非竞争性抑制组检测到活化的 NF- κ B 滞留条带; 阴性对照、竞争性抑制组未见活化的 NF- κ B 滞留条带, 见图 1。NS 组、PB 1 h 组有较弱的活性, NF- κ B 活性在 PB 2 h 组开始增加, PB 4 h, 8 h, 24 h 组仍持续增加, 并以 PB 24 h 组的活性最强; BC 1 h 组 NF- κ B 活性与 PB 1 h 组相近, BC 2 h, 4 h, 8 h, 24 h 组 NF- κ B 活性低于相应 PB 组。见图 2。

2.3 Western 印迹分析检测脑组织 I κ B- α 的表达

动态观察表明 PB 组 I κ B- α 的表达在注菌后 2 h 开始减少, 并以 24 h 表达最少。黄芩甙组 I κ B α 表达比相应 PB 组增多。黄芩甙可抑制 I κ B- α 表达的减少。见图 3。

阴性对照 阳性对照 竞争性抑制 非竞争性抑制



图 1 EMSA 检测 HeLa 细胞核提取物 NF- κ B 活性
Figure 1 NF- κ B activity in the nucleus of HeLa cells demonstrated by EMSA analysis

NS PB PB PB PB PB BC BC BC BC BC
1h 2h 4h 8h 24h 1h 2h 4h 8h 24h

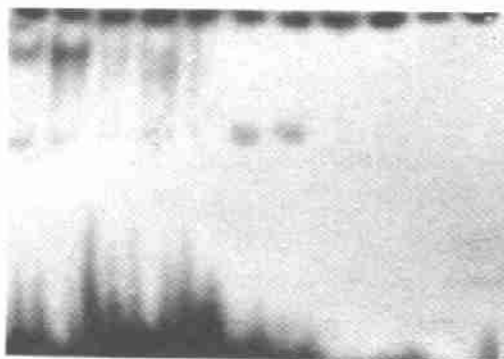


图 2 EMSA 示脑组织 NF- κ B 活性
Figure 2 NF- κ B activity in the rat brain demonstrated by EMSA analysis

NS PB PB PB PB PB BC BC BC BC BC
1h 2h 4h 8h 24h 1h 2h 4h 8h 24h



图 3 Western 示脑组织 I κ B 蛋白表达
Figure 3 Western Blot analysis demonstrates the expression of I κ B in rat brain

3 讨论

NF- κ B 是一种重要的转录因子, 因它的结合位点最早是在 B 细胞编码免疫球蛋白 Kappa 轻链基因的增强子中发现而得名。现在发现它广泛存在并参与许多基因的表达调控, 特别是与机体免疫和炎症反应有关的基因; 如细胞因子、粘附分子、急性期蛋白和诱导型一氧化氮合酶的基因。除了成熟的 B 细胞, 在其它所有的细胞中, NF- κ B 都是与它的抑制蛋白 I κ B 结合, 以潜伏的形式存在于细胞浆中。目前已克隆出 I κ B 家族 8 个成员的 cDNA: P 100, P 105, I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B-e, I κ B-R, Bcl-3, 其中 I κ B- α , I κ B- β 是两种重要的抑制蛋白。当细胞受到细菌内毒素、细胞因子、活性氧和神经递质(如兴奋性氨基酸)等细胞外因素的攻击时, I κ B 蛋白磷酸化、降解并与 NF- κ B 解离, 与 I κ B 脱

离后的 NF- κ B 移位到细胞核内,与其靶基因启动子区域的相应位点结合而发挥转录活性^[6]。电泳迁移率改变法是应用广泛的检测 NF- κ B 与其靶基因 DNA 结合状态的实验方法。本实验 Hela 细胞阳性对照及非竞争性抑制组可见 NF- κ B 与其靶基因 DNA 结合的滞留条带,而阴性对照和竞争性抑制组滞留条带消失。这说明本实验方法检测到的滞留条带特异性地代表了 NF- κ B 活性。我们发现:PB 组 I κ B- α 表达逐渐减少,NF- κ B 活性逐渐增强。这可能是在百日咳菌内毒素刺激下,兴奋性氨基酸、活性氧增加,促使 I κ B α 磷酸化、降解并与 NF- κ B 解离,NF- κ B 进入细胞核发挥转录活性,启动细胞因子、粘附分子等炎症介质的表达,导致炎症反应,加重脑水肿。这与我们以前的研究结果相吻合:谷氨酸、门冬氨酸在颈内动脉注入百日咳菌 5 min 即升高,TNF- α 则在注菌 6 h 后才开始增加^[7,8]。这提示:百日咳菌所致的脑损伤首先是通过使兴奋性氨基酸增加,继之通过 NF- κ B 而启动一系列细胞因子的转录而形成。

黄芩甙是从中药黄芩中提取的一种黄酮类单体物质,已有悠久的临床应用历史,我们以前的实验证实黄芩甙对感染性脑水肿具有保护作用,但对其机制还没有足够的认识。本实验观察了黄芩甙对大鼠感染性脑水肿 NF- κ B 活性的影响,发现 BC 2 h, 4 h, 8 h, 24 h 组 NF- κ B 活性均低于相应 PB 组,I κ B α 表达比相应 PB 组增多。提示黄芩甙能抑制 I κ B α 的降解和 NF- κ B 的活化,从而使受 NF- κ B 调控的炎症介质产生减少,脑组织损伤减轻。黄芩甙对感染性脑水肿的保护作用与 I κ B α 降解及 NF- κ B 活性受抑制有关。如前所述,NF- κ B 活化在感染性脑水肿的发病中起着重要作用,细菌内毒素、细胞因子、活性氧、兴奋性氨基酸等都是 I κ B α 降解、NF- κ B 活化的刺激因素。黄芩甙具有清除自由基、减少脑组织兴奋性氨基酸释放等作用,因此在黄芩甙的作用下,I κ B α 降解和 NF- κ B 活化受到抑制。国外也有大量实验表明抑制兴奋性氨基酸释放或抗氧化处理能抑制 NF- κ B 活化^[9,10,11];如 DMSO 可抑制巨噬细胞株及肝脏中内毒素诱导的 NF- κ B 活化和 TNF 形成;抗氧化剂可抑制酒精性肝炎病人单核细胞 NF- κ B 活化和 TNF 形成;非竞争性 N-甲基-D-门冬氨酸受体拮抗剂 MK-801 抑制大鼠缺氧模型中背侧脑干的 NF- κ B 活化。近年来实验还证实,临床上应用广泛的阿斯匹林、糖皮质激素是通过抑制 NF- κ B 的活性而起到抗炎、抑制免疫作

用^[12,13]。由此看来,黄芩甙是通过调控 NF- κ B 活性而起到保护脑组织、减轻继发性脑损伤作用的。这可能为感染性疾病包括感染性脑水肿的治疗提供新的机会。

[参 考 文 献]

- [1] Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig B, et al. Global ischemia activates nuclear factor - κ B in forebrain neurons of rats [J]. *Stroke*, 1997, 28(5): 1073-1080.
- [2] Nonaka M, Chen XH, Pierce JE, et al. Prolonged activation of NF- κ B following traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1999, 16(11): 1023-1034.
- [3] 毛定安,杨于嘉,俞燕,等.核因子- κ B 在大鼠脑水肿的变化及热休克反应对其影响的研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 1999, 1(12): 277-280.
- [4] 杨于嘉,朱彩云,陈翔,等.黄芩甙对百日咳菌液致大鼠脑水肿的保护作用 [J]. *中华医学杂志*, 1998, 78(8): 630-632.
- [5] Ichikawa K, Degroot LJ, Refetoff S, et al. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured human fibroblasts: improved method of isolation, partial characterization, and interaction with chromatin [J]. *Metabolism*, 1986, 35(9): 861-868.
- [6] O, Neil LAJ, Kaltschmidt C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function [J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20(6): 252-258.
- [7] 尹飞,杨于嘉,虞佩兰,等.细胞因子和一氧化氮在大鼠感染性脑水肿模型的时相变化 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2000, 15(1): 1-3.
- [8] 尹飞,杨于嘉,虞佩兰,等.百日咳菌诱发大鼠脑水肿时脑组织中兴奋性氨基酸时相的变化 [J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38(1): 9-12.
- [9] Essani NA, Fisher MA, Jaeschke H. Inhibition of NF- κ B by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF- α formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury [J]. *Shock*, 1997, 7(2): 90-96.
- [10] Hill DB, Devalaraja R, Joshi-Barve S, et al. Antioxidants attenuate nuclear factor - κ B activation and tumor necrosis factor - α production in alcoholic hepatitis patient monocytes and rat Kupffer cells, in vitro [J]. *Clin Biochem* 1999, 32(7): 563-570.
- [11] Gozal E, Simakajornboon N, Gozal D. NF- κ B induction during in vivo hypoxia in dorsocaudal brain stem of rat: effect of MK-801 and L-NAME [J]. *J Apply Physiol*, 1998, 85(1): 372-376.
- [12] Aljada A, Ghanim H, Assian E, et al. Increased I kappa B expression and diminished nuclear NF- κ B in human mononuclear cells following hydrocortisone injection [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84(9): 3386-3389.
- [13] Grilli M, Pizzi M, Mcmo M, et al. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation [J]. *Science*, 1996, 274(5291): 1383-1385.

(本文编辑:黄榕)