

## 厄贝沙坦对大鼠脑缺血再灌注后 NF- $\kappa$ B 和 I $\kappa$ B $\alpha$ 的影响

董靖德<sup>1\*</sup>, 靳 凌<sup>1</sup>, 张 丽<sup>1</sup>, 石静萍<sup>2</sup>, 王小珊<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属脑科医院老年神经科,<sup>2</sup>神经科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:观察厄贝沙坦对大鼠脑缺血再灌注后缺血区炎症因子的影响。方法:将健康的雄性 SD 大鼠随机分为 3 组,即假手术组、缺血再灌注(I/R)组、厄贝沙坦预处理组。厄贝沙坦预处理组在制备模型前给予厄贝沙坦 30 mg/(kg·d)干预 3 周,采用线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型。脑缺血 90 min 再灌注 24、72 h 后用 Longa 标准进行神经功能评分,用 Western blot 法测大鼠脑缺血组织内 NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  的表达水平。结果:①与 I/R 组相比较,厄贝沙坦组神经功能缺损程度评分明显改善( $P < 0.05$ );②脑缺血再灌注后 24 及 72 h,I/R 组缺血区 NF- $\kappa$ B p65 的表达明显高于假手术组( $P < 0.01$ ),与 I/R 组相比较,厄贝沙坦干预组缺血区 NF- $\kappa$ B p65 的表达明显降低( $P < 0.05$ );③脑缺血再灌注后 24 h,I/R 组缺血区 I $\kappa$ B $\alpha$  的表达高于假手术组( $P < 0.05$ ),与 I/R 组相比较,厄贝沙坦干预组缺血区 I $\kappa$ B $\alpha$  的表达明显增高( $P < 0.05$ )。结论:厄贝沙坦可通过提高 I $\kappa$ B $\alpha$  的表达,抑制 NF- $\kappa$ B 的表达,改善大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经功能缺损,对脑缺血再灌注起保护作用。

**[关键词]** 脑缺血;厄贝沙坦;NF- $\kappa$ B;I $\kappa$ B $\alpha$

**[中图分类号]** R743

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)08-1079-04

## Effect of Irbesartan on NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$ in the ischemic brain of ischemia-reperfusion rat

DONG Jing-de<sup>1\*</sup>, JIN Ling<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, SHI Jing-ping<sup>2</sup>, WANG Xiao-shan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Geriatric Neurology,<sup>2</sup>Department of Neurology,Nanjing Brain Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Irbesartan on inflammatory factors in the brain of ischemia-reperfusion rat. **Methods:** The male SD rats were randomly assigned to sham operated group, ischemia-reperfusion (I/R) group and Irbesartan pretreatment group. The focal I/R model was made by suture occlusion of right middle cerebral artery (MCAO) for 90 min followed by suture retreat which was defined as the beginning of reperfusion. Irbesartan [30 mg/(kg·d)] was administered for 3 weeks before MCAO. After 24 h or 72 h of reperfusion, the neurologic function impairment was evaluated by Longa standard, NF- $\kappa$ B p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  protein levels were examined by Western blot technique. **Results:** ① Compared with I/R group, pretreatment with Irbesartan could significantly improve neurologic function ( $P < 0.05$ ). ② Compared with the sham group, the NF- $\kappa$ B p65 protein was significantly increased after either 24 h or 72 h of reperfusion in I/R group ( $P < 0.01$ ). Compared with I/R group, however, the NF- $\kappa$ B p65 protein was significantly decreased in Irbesartan pretreatment group ( $P < 0.05$ ). ③ Compared with the sham group, the I $\kappa$ B $\alpha$  protein was significantly increased after 24 h of reperfusion in I/R group ( $P < 0.05$ ). Compared with I/R group, the I $\kappa$ B $\alpha$  protein was significantly increased in Irbesartan pretreatment group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Irbesartan can protect brain and may improve the rat neurologic function through enhancing I $\kappa$ B $\alpha$  protein expression and inhibiting NF- $\kappa$ B protein expression in rat brain with ischemia-reperfusion injury.

**[Key words]** cerebral ischemia; Irbesartan; NF- $\kappa$ B; I $\kappa$ B $\alpha$

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(8): 1079-1082]

局灶性脑缺血再灌注(I/R)后伴随着一系列的  
组织损伤、坏死。研究认为炎症反应在继发性的脑

损伤中起关键作用。血管紧张素 II 目前被认为是一种前炎症因子<sup>[1]</sup>,脑缺血后它的激活将引起炎症反应,其作用主要通过 AT1 受体实现的。血管紧张素 II 的 1 型受体(AT1R)拮抗剂厄贝沙坦,非竞争性拮抗 AT1R 能够通过血脑屏障,作用于脑部和外周的

**[基金项目]** 南京医科大学科技发展基金(08NMUM114)

\*通讯作者,E-mail: dongjingde1978@163.com

血管紧张素 II 系统。本课题组研究发现厄贝沙坦可以通过减少脑缺血后炎症因子的表达,对缺血后脑组织起保护作用<sup>[2-3]</sup>。本文将研究厄贝沙坦对大鼠脑缺血后炎症因子的上游因素 NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  表达的影响,探讨厄贝沙坦预处理对脑缺血再灌注后炎症反应影响的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康的雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠,体重 150~180 g,由中国科学院上海实验动物中心提供。厄贝沙坦(Irbesartan,杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司);NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  及  $\beta$ -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及用药

雄性 SD 大鼠 60 只,根据随机数字表分为 3 组,即假手术组(Sham)、缺血再灌注组(I/R)、厄贝沙坦预处理组(Irbesartan),厄贝沙坦预处理组每日上午予厄贝沙坦 30 mg/(kg·d),6 mg/ml 灌胃给药 1 次,假手术组及 I/R 组均于相同时间给予等量的生理盐水灌胃,连续用药 3 周后构建 I/R 模型。每个组又分为 I/R 24 h 和 I/R 72 h 2 个亚组,每个亚组 10 只大鼠。

#### 1.2.2 缺血再灌注损伤动物模型建立

参照 Longa 等<sup>[4]</sup>的大鼠大脑中动脉内线栓阻断法作适当改进后进行。10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉后,将大鼠固定于手术操作台,取颈正中切口,游离右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。结扎颈总动脉和颈外动脉。于颈总动脉分叉部下剪一小口,将一预先烧成圆头的尼龙线(3-0, Ethicon)插入颈内动脉,直到遇到轻微阻力为止,平均插入深度由分叉部计(18.5  $\pm$  0.5) mm。固定尼龙线,依次关闭切口。缺血 2 h 后,拔线恢复再灌。

#### 1.2.3 缺血再灌注后神经功能评分

大鼠缺血再灌注处死前神经功能评分参照 Longa 5 级 4 分法<sup>[4]</sup>评分:0 分:无神经功能缺失症状;1 分:轻度局灶性神经功能缺失症状(不能完全伸展左侧前肢);2 分:中度局灶性神经功能缺失症状(行走时向左侧转圈);3 分:中度神经功能缺失(自主行走时向左侧倾倒);4 分:不能自发行走,意识水平降低。动物清醒后出现左前爪下垂,爬行时向左侧转圈,行动迟缓等表现为模型成功。提尾有左前肢屈曲内收者方可入组。

#### 1.2.4 Western blot 检测缺血区 NF- $\kappa$ B p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$ 表达的变化

各组动物于规定时间点处死,取缺血区脑组织, RIPA 提取总蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。行 SDS-PAGE 不连续凝胶电泳,蛋白上样量 50  $\mu$ g。湿式转膜后脱脂牛奶封闭 2 h,分别加入相应的 NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  及内参  $\beta$ -actin 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。再分别加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1.5 h 后, DAB 显色。Image-pro plus 5.02 图像分析软件对条带行灰度扫描分析,结果以样品条带灰度值/相应内参灰度值表示。

### 1.3 统计学方法

实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 SPSS13.0 统计软件对所得数据进行方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验。显著性以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 神经功能评分

根据 Longa 评分标准,各组大鼠神经功能缺损程度评分结果如表 1 所示。在大鼠缺血再灌注模型(I/R 组和厄贝沙坦预处理组)中,24 h 和 72 h 的神经功能缺损程度与假手术组比较具有显著差异性( $P < 0.01$ )。而厄贝沙坦预处理组大鼠 24 h 和 72 h 的神经功能缺损程度与 I/R 组比较具有差异性( $P < 0.05$ )。表明厄贝沙坦能明显改善脑缺血再灌注损伤后神经功能缺损程度,具有脑保护作用。

表 1 厄贝沙坦对缺血再灌注后神经功能评分的影响  
Table 1 The effect of Irbesartan on the neurologic function of I/R rats

	24 h	72 h
假手术组	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
缺血再灌注组	2.20 $\pm$ 0.79*	2.40 $\pm$ 0.97*
厄贝沙坦预处理组	1.70 $\pm$ 0.82* $\blacktriangle$	1.70 $\pm$ 0.67* $\blacktriangle$

与假手术组比较,\* $P < 0.01$ ;与缺血再灌注组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

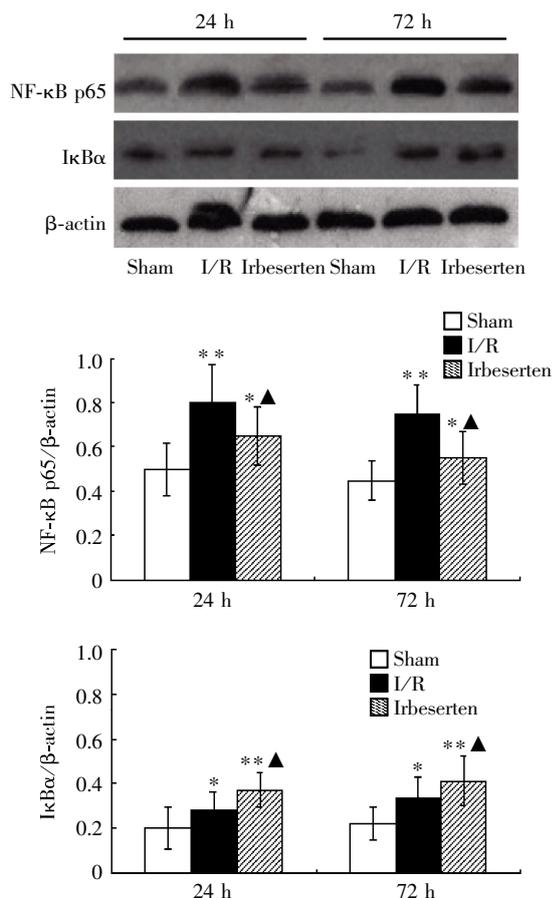
### 2.2 缺血再灌注后大鼠缺血区脑内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达

Western blot 条带行灰度扫描分析大鼠缺血区脑内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达结果(图 1)显示,I/R 组大鼠脑内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达 [24 h (0.80  $\pm$  0.17)、72 h (0.75  $\pm$  0.13)] 显著高于假手术组 [24 h (0.5  $\pm$  0.12)、72 h (0.45  $\pm$  0.09)],  $P < 0.01$ 。厄贝沙坦预处理组大鼠脑内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达在 24 h

( $0.65 \pm 0.17$ )、72 h( $0.55 \pm 0.12$ )也明显高于假手术组 ( $P < 0.05$ )。厄贝沙坦预处理组大鼠脑内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达与 I/R 组相比明显降低 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 缺血再灌注后大鼠缺血区脑内 I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白的表达

Western blot 条带行灰度扫描分析大鼠缺血区脑内 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达结果(图 1)显示,I/R 组大鼠脑内 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达[24 h( $0.28 \pm 0.08$ )及 72 h( $0.34 \pm 0.09$ )]明显高于假手术组 [24 h ( $0.20 \pm 0.09$ )、72 h( $0.22 \pm 0.07$ ), $P < 0.05$ ]。厄贝沙坦预处理组大鼠脑内 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达在 24 h ( $0.37 \pm 0.08$ )、72 h ( $0.41 \pm 0.11$ )显著高于假手术组 ( $P < 0.01$ )。厄贝沙坦预处理组大鼠脑内 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达与 I/R 组相比 24 h 明显增高( $P < 0.05$ ),而 72 h 没有明显改变。



与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与缺血再灌注组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图1 厄贝沙坦对缺血再灌注后 NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达的影响

Figure 1 The expression of NF- $\kappa$ B p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  protein when treated with Irbesertan in I/R rats

### 3 讨论

在脑缺血再灌注过程中,自由基损伤可导致炎症反应的发生<sup>[5]</sup>。过度的炎症反应不仅影响脑内局部的血液供应,而且直接破坏组织结构,造成缺血性脑组织损伤。在脑缺血再灌注后,局部血管内皮细胞及白细胞被病变组织产生的大量可扩散性炎症介质激活,黏附分子如细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管内皮细胞黏附分子-1(VCAM-1)等数量及活性升高<sup>[2]</sup>,致使白细胞黏附在血管内皮细胞表面,阻塞微循环通道。另外,活化白细胞可释放大量的毒性氧自由基和蛋白水解酶,导致局部脑血管损伤,通透性增大,加重脑水肿,导致不可逆损伤。本课题组既往应用厄贝沙坦对 SD 大鼠预处理后构建缺血再灌注模型,发现在厄贝沙坦预处理的大鼠脑缺血再灌注后缺血区域内 ICAM-1、VCAM-1 表达明显减少,大鼠的梗死面积减小,证实了厄贝沙坦可减轻脑缺血再灌注后的炎症反应,起到神经保护作用<sup>[2]</sup>。

NF- $\kappa$ B 是脑缺血再灌注后的炎症反应启动的关键因子<sup>[6]</sup>,可调节缺血区域内 ICAM-1、VCAM-1 表达,而 NF- $\kappa$ B 的表达又受 I $\kappa$ B 磷酸化调控。Liu 等<sup>[7]</sup>通过建立大鼠永久性大脑缺血模型,发现缺血皮质区细胞胞质及胞核内 NF- $\kappa$ B 表达增强,使用苦参素后缺血皮质区细胞的 NF- $\kappa$ B 表达明显降低,脑缺血梗死灶减小。Zhang 等<sup>[8]</sup>对局灶性脑缺血大鼠脑室注射前列腺素,发现前列腺素能够抑制 NF- $\kappa$ B p65 亚单位的表达,减少细胞凋亡,起到神经保护作用。而本实验发现在大鼠缺血再灌注 24 h 后,NF- $\kappa$ B p65 表达水平明显升高,而 I $\kappa$ B $\alpha$  水平也明显升高;72 h 后 NF- $\kappa$ B p65 表达水平虽然有所下降,但较假手术组仍高,I $\kappa$ B $\alpha$  表达水平较 24 h 有所上升,表明缺血再灌注后由于炎症反应被激活,NF- $\kappa$ B 水平迅速升高,而 I $\kappa$ B $\alpha$  也随着炎症反应的激活表达增加。Webster 等<sup>[9]</sup>利用低温干预大鼠脑缺血再灌注损伤,发现低温可以抑制 I $\kappa$ B 磷酸化,降低 NF- $\kappa$ B 的表达,从而减少梗死面积。Wang 等<sup>[10]</sup>在永久性大鼠大脑中动脉栓塞的模型中发现,应用银杏叶提取物对其进行干预,可以增加 p-NIK 和 p-IKK $\alpha$  的表达,从而提高 I $\kappa$ B $\alpha$  的水平,抑制 NF- $\kappa$ B p65 的表达,对脑缺血起到保护作用。可见 I $\kappa$ B $\alpha$  的表达水平增加可抑制 NF- $\kappa$ B 的表达,从而减轻炎症反应,起到神经保护作用。本实验通过厄贝沙坦对 SD 大鼠预处理后建立缺血再灌注模型,发现厄贝沙坦可明显提高缺血再灌注后脑缺血部位的 I $\kappa$ B $\alpha$  的表达,抑制 NF- $\kappa$ B p65 表

达,尤其在缺血再灌注后 24 h,从而发挥神经保护作用。

厄贝沙坦的脑缺血再灌注的脑保护作用不仅仅是抑制脑缺血后炎症反应,还可减少脑缺血再灌注后的细胞凋亡<sup>[11]</sup>。而本研究只涉及了炎症反应中的两个较为关键的蛋白,其他路径及相关的基因蛋白有待于今后进一步的实验验证。

#### [参考文献]

- [1] Nagai M, Terao S, Vital SA, et al. Role of blood cell-associated angiotensin II type 1 receptors in the cerebral microvascular response to ischemic stroke during angiotensin-induced hypertension [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2011, 3(1): 15
- [2] 董靖德, 石静萍, 林兴建, 等. 厄贝沙坦对大鼠局灶性脑缺血再灌注后炎症反应的影响 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2007, 24(4): 409-412
- [3] 石静萍, 董靖德, 戴文卓, 等. 厄贝沙坦对急性脑梗死患者血清超敏 C 反应蛋白水平的影响 [J]. *临床神经病学杂志*, 2008, 21(2): 105-107
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91
- [5] Katan M, Elkind MS. Inflammatory and neuroendocrine biomarkers of prognosis after ischemic stroke [J]. *Expert Rev Neurother*, 2011, 11(2): 225-239
- [6] Harari OA, Liao JK. NF- $\kappa$ B and innate immunity in ischemic stroke [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1207: 32-40
- [7] Liu Y, Zhang XJ, Yang CH, et al. Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF- $\kappa$ B expression [J]. *Brain Res*, 2009, 1268: 174-180
- [8] Zhang HL, Gu ZL, Savitz SI, et al. Neuroprotective effects of prostaglandin A in rat models of focal cerebral ischemia are associated with nuclear factor-kappaB inhibition and peroxisome proliferator activated receptor-gamma upregulation [J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(5): 1132-1141
- [9] Webster CM, Kelly S, Koike MA, et al. Inflammation and NF- $\kappa$ B activation is decreased by hypothermia following global cerebral ischemia [J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 33(2): 301-312
- [10] Wang X, Qin ZH, Shi H, et al. Protective effect of Ginkgolids (A+B) is associated with inhibition of NIK/IKK/ $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B signaling pathway in a rat model of permanent focal cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 2008, 1234: 8-15
- [11] Shi J, Dong J, Lu J, et al. Effects of chronic peripheral pretreatment with an angiotensin II type-1 receptor blocker on apoptosis-related molecules in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regen Res*, 2010, 5(15): 1150-1155

[收稿日期] 2011-12-21