

· 论 著 ·

大鼠脑皮质 NF- κ B 和 miR-146a 在轻型脑创伤后炎症反应过程中的协同作用

贺学农, 张毅[△], 周昌龙, 夏小辉

(重庆医科大学附属永川医院神经外科 402160)

摘要:目的 探讨轻型脑创伤后大鼠皮质区核因子 κ B(NF- κ B)活化及其 microRNA(miRNA)-146a 转录调控模式在炎症反应过程中的作用机制。方法 选择健康雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为对照组($n=10$)、轻型脑创伤组($n=50$)。轻型脑创伤组分为创伤后 1、3、6、12 和 24 h 5 个时间点,10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔内注射,采用 Marmarou's 方法,用质量 450 g、直径 18 mm 的铜棒由 1.0 m 高度自由落下,造成大鼠轻型脑创伤。对照组仅给予相应麻醉、头皮切开及缝合处理。采用实时定量 PCR 及 Western blot 方法比较两组大鼠脑皮质 NF- κ B 和 miR-146a 表达水平的变化。结果 脑创伤 1、3、6、12、24 h 后 miR-146a 表达水平显著上调,分别为对照组的 1.21 ± 0.15 , 1.73 ± 0.29 , 2.36 ± 0.24 , 3.60 ± 0.37 , 1.97 ± 0.26 倍。伤后 6~12 h 为表达高峰,24 h 其转录水平有所下调。NF- κ B 的活化与核转位与 miR-146a 的表达模式基本一致。结论 轻型脑创伤后皮质区 miR-146a 表达水平显著上调,NF- κ B 通过 miR-146a 上游调控元件增强了 miR-146a 的转录水平,NF- κ B-miR-146a 途径可能在促进脑创伤后炎症反应过程中发挥重要作用。

关键词:脑损伤;微 RNAs;NF- κ B;皮质

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.14.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)14-1355-03

Synergistic effect of NF- κ B and miR-146a in inflammatory reaction process after mild traumatic brain injury in rats

He Xuenong, Zhang Yi[△], Zhou Changlong, Xia Xiaohui

(Department of Neurosurgery, Affiliated Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract: **Objective** To investigate the action mechanism of cortex NF- κ B activation and the miR-146a transcription regulation mode in the inflammatory reaction process after mild traumatic brain injury(TBI) in rats. **Methods** The 60 healthy male SD rats were selected and randomly divided into the control group($n=10$) and the mild traumatic brain injury(TBI) group($n=50$). The mild TBI group was sub divided into five subgroups according to different time points: 1, 3, 6, 12, 24 h after brain injury. 10% chloral hydrate(0.3 mL/100 g) was intraperitoneally injected. The Marmarou's method was adopted to induce rat mild TBI by dropping the copper rod, weighed 450 g and 18 mm in diameter, from 1 M height. The control group was only given corresponding anesthesia, scalp incision and suture. The changes of cortex NF- κ B and miR-146a were compared between the two groups using real-time quantitative PCR and Western blot methods. **Results** At 1, 3, 6, 12, 24 h after TBI, miR-146a expression was significantly up-regulated by 1.21 ± 0.15 , 1.73 ± 0.29 , 2.36 ± 0.24 , 3.60 ± 0.37 , 1.97 ± 0.26 fold compared with the control group, which reached to the expression peak at 6-12 h after TBI, its transcription level was down-regulated at 24 h. The activation and nuclear translocation of NF- κ B was basically similar to the expression pattern of miR-146a. **Conclusion** The expression of miR-146a in mild TBI is significantly up-regulated, NF- κ B enhances the transcription level of miR-146a by upstream control components. NF- κ B-miR-146a pathway may play an important role in promoting the inflammatory reaction process after TBI.

Key words: brain injuries; microRNAs; NF-kappa B; cortex

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类序列长度约为 22 个核苷酸的非编码小 RNA 分子,以碱基互补配对原则识别靶向基因,通过转录后翻译抑制作用参与细胞增殖、分化以及凋亡等过程,与人类疾病的发生与发展密切相关^[1-3]。miR-146a 是一个与炎症反应密切相关的小 RNA 分子,其上游调控序列包含了核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)的顺式作用元件,NF- κ B 结合该作用元件后正调控 miR-146a 的转录水平,从而介导一系列 miR-146a 靶向基因的翻译抑制过程,参与炎症反应^[4]。创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)所诱发的炎症反应直接影响脑组织修复、神经元的存活。本研究采用实时定量 PCR 方法和蛋白质印迹技术分别检测轻型脑创伤后大鼠皮质区 miR-146a、NF- κ B 的表达水平,了解 miR-146a 在脑创伤后炎症反应中的作用。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 选择健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量(275 \pm 23)g,由中国医学科学院实验动物中心提供。随机分为对照组

($n=10$)和轻型脑创伤组($n=50$)。轻型脑创伤组又分为创伤后 1、3、6、12 和 24 h 5 个时间点,每个时间点各 10 只。

1.2 脑创伤模型的建立 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔内注射,采用 Marmarou's 方法^[5],用质量 450 g、直径 18 mm 的铜棒由 1.0 m 高度自由落下,造成大鼠轻型脑创伤。对照组仅给予相应麻醉、头皮切开及缝合处理。

1.3 实时定量 PCR 检测脑皮质区 miR-146a 的表达水平 用 mirVanaTM miRNA Isolation Kit 试剂盒(Ambion, USA)提取脑皮质区 miRNA 分子。采用 TaqMAN microRNA 逆转录试剂盒(美国应用生物系统公司)将 miR-146a 逆转录后,进行实时定量 PCR 反应(TaqMAN Universal PCR Master Mix no AmpErase UNG,美国应用生物系统公司)。miR-146a 逆转录及定量 PCR 所用引物试剂盒为 TaqMAN MicroRNA Assay, has-miR-146a(美国应用生物系统公司)。反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环。基因表达相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析表达差异。

[△] 通讯作者, Tel:13500359995; E-mail:1253081420@qq.com。

1.4 Western blot 检测脑皮质区 NF- κ B 蛋白水平 剥离大鼠脑皮质区,将脑皮质标本用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)洗涤 2 次后,加入 RIPA 裂解液,冰浴内匀浆,4 °C 12 000 r/min 离心 30 min 以除去组织碎片。取上清液,用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)检测试剂盒(上海碧云天生物工程有限公司)检测总蛋白浓度。取 50 g 蛋白溶于 2× 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate,SDS)上样缓冲液中,将样本 100 °C 煮沸 5 min 后,将对照组、实验组各时相点蛋白样本经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis,PAGE)后,4 °C 条件下转移至二氟化树脂(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜。PBS 洗涤 2 次后,用 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h,将 PVDF 膜与一抗(NF- κ B 抗体、 β -actin 抗体)4 °C 孵育过夜,用 TBST 洗涤 3 次后将膜与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的二抗孵育 2 h。经 TBST 洗涤 3 次后,加入 BCIP/NBT 显色液显色。使用 fluorchem 5500 凝胶成像系统对显色条带进行吸光度分析,表示样本蛋白的相对含量。

1.5 NF- κ B 免疫组化 染色石蜡切片厚 6 μ m,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,微波抗原修复后滴加 NF- κ B 一抗(1 : 100),4 °C 孵育过夜。滴加羊抗兔 IgG 抗体孵育 1 h,经二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine,DAB)显色反应 5 min。黄色或黄棕色为阳性细胞。高倍镜($\times 200$)下每张切片,观察 NF- κ B 活化核转位现象。

1.6 统计学处理 应用 SPSS11.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本双侧 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

轻型创伤组各时间点脑皮质的 miR-146a 表达水平均高于对照组(图 1)。创伤后 1、3、6、12、24 h miR-146a 的表达水平较对照组上调 1.21 \pm 0.15、1.73 \pm 0.29、2.36 \pm 0.24、3.60 \pm 0.37、1.97 \pm 0.26 倍。对照组脑皮质区神经细胞 NF- κ B 阳性产物弱表达,细胞胞质可见少量棕黄色颗粒,此时 NF- κ B 以无活性的形式存在。伤后 1 h 在胞质和细胞核均可见有阳性表达,开始出现转位聚集于细胞核,随时间呈上升趋势,细胞质和细胞核可见大量棕黄色颗粒(封 2 图 2)。Western blot 检测显示,伤后 1 h 脑皮质 NF- κ B 的表达水平开始升高,在随后的 24 h 内 NF- κ B 持续升高,活化的 NF- κ B 蛋白水平也随之升高,出现明显的核转位现象(图 3)。

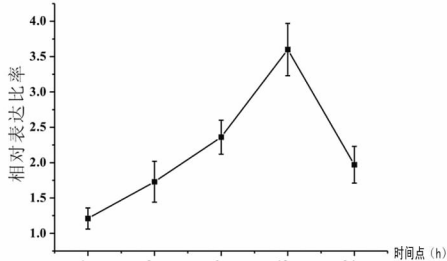


图 1 轻型脑创伤组大鼠脑皮质 miR-146a 表达折线图

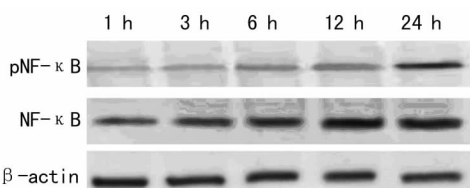


图 3 轻型脑创伤组各时间点脑皮质 NF- κ B 蛋白表达电泳图

3 讨 论

炎症反应在脑创伤继发性损伤中发挥着关键性作用。白

介素-1(interleukin-1 β ,IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、IL-6 等促炎性细胞因子能够引起级联反应,加重脑创伤所引起的神经细胞损伤。NF- κ B 作为细胞内重要的核转录因子,参与这些基因的表达调控,致使效应细胞释放大促炎性细胞因子,加重组织损伤过程。在对脑缺血、创伤动物模型的研究发现,神经细胞本身 NF- κ B 过度活化,调控多种凋亡相关基因的转录过程,在神经细胞凋亡中发挥着不容忽视的作用。NF- κ B 在脑创伤的神经细胞损伤以及继发性炎症反应中的作用机制十分复杂,积极寻求新的调控途径是众多学者的研究重点。

近年来,miRNA 的生物学特征和功能研究取得了巨大的成果,在生理、病理条件下的生物学作用得到了广泛认可。miRNA 的相关研究为脑创伤后神经细胞凋亡、修复与再生、继发性损伤机制的研究提供了契机。人类 miR-146a 分子属于 miR-146 家族成员之一,其转录调控依赖于 NF- κ B 活化,在固有免疫防御方面发挥着作用^[4]。在免疫抑制性调节中发现,miR-146a 是调节性 T 细胞抑制辅助性 Th1 细胞所必须的,抑制过度的炎症反应^[6]。这些结果表明,miR-146a 能够缓解炎症反应,在免疫抑制方面发挥着重要作用。有研究发现,乳腺癌细胞系(MDA-MB-231)组成型表达 miR-146a 能够破坏 NF- κ B 的活化,抑制 NF- κ B 靶向基因 IL-6、IL-8 和金属蛋白酶-9 的表达,从而破坏癌细胞的侵袭和迁移能力,预示着其可能具有抗肿瘤侵袭和迁徙作用^[7]。虽然 miR-146a 已被证实多种疾病组织中高表达,如类风湿关节炎滑膜组织^[8]、老年痴呆症^[9]、颞叶癫痫^[10]等,然而其在病理条件下的表达模式、作用机制尚不明确,仍处于探索阶段。老年痴呆症患者病变组织中 miR-146a 的表达被上调,它可能通过抑制补体 H 翻译过程,加重炎症反应。颞叶癫痫患者病灶位点的反应性星型胶质细胞高表达,该细胞可能参与癫痫发作、持续状态下的炎症反应。本研究发现,脑创伤后皮质区 miR-146a 被显著上调,其表达模式与 NF- κ B 的活化基本一致,miR-146a 的转录调控是 NF- κ B 敏感型的,NF- κ B 的活化增强 miR-146a 的转录水平^[4]。本研究结果显示,脑创伤后 24 h 内皮质区 NF- κ B 的表达和活化后核转位现象逐渐增强,而 miR-146a 在伤后 12 h 为表达高峰,伤后 24 h 有所下调。已知 NF- κ B 可以通过 miR-146a 上游转录调控序列 NF- κ B 作用元件增强 miR-146a 转录过程^[4]。本研究发现,NF- κ B 诱导 miR-146a 的转录调控在轻型脑创伤早期阶段(12 h)占主导地位;虽然创伤后 24 h 内皮质 NF- κ B 的活化与核转位持续增强,然而,随着伤后局部微环境复杂程度的改变,更多因素影响了 miR-146a 的转录调控。

miR-146a 靶向基因包括 IL-1 受体相关激酶(interleukin-1 receptor-associated kinase,IRAK1)、肿瘤坏死因子受体相关蛋白(TNF receptor-associated factor,TRAF-6)和 Rho 相关蛋白激酶(Rho-associated protein kinase 1,ROCK1)等^[4,11],这些蛋白在炎症反应、细胞凋亡等方面发挥着重要作用。已知 IL-1 β 受体和 TNF- α 受体拮抗剂能够缓解脑创伤后的炎症反应,发挥脑保护作用^[12]。由于 miR-146a 在 IL-1 β 和 TNF- α 信号转导通路中发挥负调控作用,因此,本研究推测,创伤后脑皮质区 miR-146a 的表达上调,可能是一种脑保护性反馈信息,它可能促炎性细胞因子所诱发的炎症反应及细胞凋亡等,发挥脑保护作用。另外,诸多研究表明,NF- κ B 的活化加重细胞凋亡,与脑损伤程度有关^[13-14]。然而也有报道指出,NF- κ B 的活化可以阻断神经细胞凋亡,发挥保护性作用^[15-16]。

脑创伤后皮质 NF- κ B 的活化、核转位及其 miR-146a 的转录调控机制是扮演脑损伤作用,还是保护作用,还有待深入、系统的研究。明确 NF- κ B-miR-146a 信号通路在脑创伤神经

胞凋亡或修复与再生的具体作用机制,将为脑创伤提供新的治疗靶点和手段。

参考文献:

- [1] Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors[J]. *Mol Cell*, 2004, 16(6):861-865.
- [2] Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(5):504-511.
- [3] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease [J]. *Development*, 2005, 132(21):4653-4662.
- [4] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2006, 103(33):12481-12486.
- [5] 洪军, 崔建忠, 高俊玲, 等. 海马区 c-fos 基因表达在大鼠脑创伤后认知功能障碍中的作用[J]. *中华创伤杂志*, 2009, 26(11):988-991.
- [6] Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses[J]. *Cell*, 2010, 142(6):914-929.
- [7] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. Expression of microRNA-146 suppresses NF- κ B activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27(42):5643-5647.
- [8] Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5):1284-1292.
- [9] Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF- κ B-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in

stressed human brain cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(46):31315-31322.

- [10] Aronica E, Fluiter K, Lyer A, et al. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy[J]. *Eur J Neuro Sci*, 2010, 1(6):1100-1107.
- [11] Lin SL, Chiang A, Chang DY, et al. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer[J]. *RNA*, 2008, 14(3):417-424.
- [12] Kadhim HJ, Duchateau J, S ebire G. Cytokines and brain injury: invited review[J]. *J Intensive Care Med*, 2008, 23(4):236-249.
- [13] Culmsee C, Siewe J, Junker V, et al. Reciprocal inhibition of p53 and nuclear factor- κ B transcriptional activities determines cell survival or death in neurons[J]. *J Neuro Sci*, 2003, 23(24):8586-8595.
- [14] Neubert M, Ridder DA, Bargiotas P, et al. Acute inhibition of TAK1 protects against neuronal death in cerebral ischemia[J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(9):1521-1530.
- [15] Kim HG, Hwang YP, Han EH, et al. Metallothionein-iii provides neuronal protection through activation of nuclear factor- κ B via the TrkA/phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling pathway[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 112(2):435-449.
- [16] Imielski Y, Schwamborn JC, L uningschr or P, et al. Regrowing the adult brain: NF- κ B controls functional circuit formation and tissue homeostasis in the dentate gyrus[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):30838.

(收稿日期:2012-01-20 修回日期:2012-03-05)

(上接第 1354 页)

存效应中, MALP-2 可能通过下调 PMN 内 Bax 蛋白的表达来延长 PMN 的生命期限,从而影响了机体炎症反应的强度和发生、发展进程。

参考文献:

- [1] Maianski NA, Mainaski AN, Kuijpers TW, et al. Apoptosis of neutrophils[J]. *Acta Haematol*, 2004, 111(1):56-66.
- [2] Tsukahara S, Yamamoto S, Shew TT, et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2006, 13(2):63-68.
- [3] Kong Y, Le Y. Toll-like receptors in inflammation of the central nervous system[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(10):1407-1414.
- [4] Wilde I, Lotz S, Engelmann D, et al. Direct stimulatory effects of the TLR2/6 ligand bacterial lipopeptide MALP-2 on neutrophil granulocytes[J]. *Med Microbiol Immunol*, 2007, 196(2):61-71.
- [5] O'Neill LA. Innate immunity: squelching anti-viral signaling with NLRX1[J]. *Curr Biol*, 2008, 18(7):R302-304.
- [6] Fukata M, Michelsen KS, Eri R, et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute

colitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(5):1055-1065.

- [7] O'Mahony DS, Pham U, Lyer R, et al. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages[J]. *Int J Med Sci*, 2008, 5(1):1-8.
- [8] Liaudet L, Szabo C, Evgenov OV, et al. Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis[J]. *Shock*, 2003, 19(2):131-137.
- [9] Liaudet L, Murthy KG, Mabley JG, et al. Comparison of inflammation, organ damage, and oxidant stress induced by salmonella enterica serovar muenchen flagellin and serovar enteritidis lipopolysaccharide [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(1):192-198.
- [10] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates pro-gammed cell death[J]. *Cell*, 1993, 74(4):609-619.
- [11] 吴敏, 倪鏖, 吴丽群. 重度子痫前期患者外周血 PMN 凋亡及其机制的研究[J]. *现代妇产科进展*, 2008, 3(17):185-186.

(收稿日期:2011-12-26 修回日期:2012-02-06)