

过表达CYLD对氧糖剥夺/复氧大鼠原代皮质神经元中NF- κ B信号通路的影响

朱君 胥虹贝 周雪灵 卢文豪 罗勇*

(重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

摘要 脑卒中是目前导致我国人口寿命缩短的最主要原因之一。在缺血性脑卒中的局灶性缺血/再灌注后, 受损脑组织中存在多种复杂的病理生理机制, 核因子- κ B(nuclear factor kappaB, NF- κ B)信号通路参与的炎症反应是重要机制之一。相关研究显示, 头帕肿瘤综合征蛋白(cylindromatosis, CYLD)可以参与NF- κ B信号通路的调节。在脑缺血/再灌注损伤中, 上调CYLD表达水平, 对氧糖剥夺/复氧后NF- κ B信号通路是否存在影响? 如何影响? 尚未见明确报道, 这需要我们进一步探究。该研究通过上调CYLD在SD大鼠原代皮质神经元中的表达水平, 观察其对氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)后神经元中NF- κ B信号通路的影响。使用过表达慢病毒感染体外培养的原代皮质神经元, 采用免疫荧光实验鉴定神经元, Western blot及RT-qPCR验证CYLD的过表达情况, CCK-8实验检测细胞活力, Western blot检测p-I κ B α 的蛋白表达情况, RT-qPCR检测NF- κ B p65的mRNA表达情况。结果显示, 过表达CYLD慢病毒可有效提高神经元中CYLD的表达水平; 过表达CYLD后, 较对照组相比, 神经元在氧糖剥夺/复氧处理后的活力有所增高, p-I κ B α 的表达水平有所下降, 同时NF- κ B p65的mRNA表达水平也明显降低。研究结果表明, 在原代皮质神经元中过表达CYLD, 能减轻氧糖剥夺/再复氧对神经元的损伤、抑制NF- κ B信号通路的激活。

关键词 CYLD; NF- κ B信号通路; 原代皮质神经元; 氧糖剥夺/复氧

Effect of CYLD Overexpression on NF- κ B Signaling Pathway after Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation in Rat Primary Cortical Neurons

Zhu Jun, Xu Hongbei, Zhou Xueling, Lu Wenhao, Luo Yong*

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Stroke is one of the most leading cause of years of life lost (YLLs) in our population. After cerebral ischemia/reperfusion in ischemic stroke, there are many complex pathophysiological mechanisms in the damaged brain tissue. The inflammatory response in which nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway participates is one of the most important mechanisms. Studies have shown that cylindromatosis (CYLD) can regulate NF- κ B signaling pathway. However, can up-regulation of CYLD expression regulate the NF- κ B signaling pathway in neurons after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation? How to? So far no study has been reported yet, it needs to be researched. Our study up-regulates the expression of CYLD in neurons to investigate the effect of CYLD on

收稿日期: 2019-03-25

接受日期: 2019-07-05

重庆市卫生局中医药科研重点项目(批准号: ZY20131027)和重庆市卫生局中医药科研项目(批准号: 渝中医2005-B-24)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-86715399, E-mail: luoyong1998@163.com

Received: March 25, 2019

Accepted: July 5, 2019

This work was supported by the Traditional Chinese Medicine Science and Technology Key Project of Chongqing (Grant No.ZY20131027) and the Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project of Chongqing (Grant No.YZY2005-B-24)

*Corresponding author. Tel: +86-23-86715399, E-mail: luoyong1998@163.com

网络出版时间: 2019-09-12 14:54:04

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190912.1453.028.html>

NF- κ B signaling pathway after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) in rat primary cortical neurons. Primary cortical neurons were infected by lentiviral vector-mediated overexpression of CYLD. Neurons were identified by immunofluorescence. The protein levels and mRNA levels were detected respectively by Western blot and RT-qPCR to confirm the expression of CYLD. Cell viability was detected by CCK-8 assay. The protein levels of p-I κ B α were detected by Western blot. The mRNA levels of *NF- κ B p65* were detected by RT-qPCR. The results indicated that lentiviral vector-mediated CYLD overexpression can efficiently upregulate CYLD expression in neurons. After OGD/R, neuronal viability was enhanced significantly in CYLD-overexpressing neurons compared to control neurons. Meanwhile, the expression of p-I κ B α and *NF- κ B p65* were decreased. The results suggested that overexpression of CYLD in primary cortical neurons could attenuate neuronal damage and inhibit the NF- κ B signaling pathway induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation.

Keywords CYLD; NF- κ B signaling pathway; primary cortical neurons; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

脑卒中是导致人类寿命缩短的第二大原因^[1], 包括缺血性脑卒中和出血性脑卒中, 以缺血性脑卒中为主^[2]。缺血性脑卒中在局灶性缺血再灌注后, 在受损脑组织中存在多种复杂的病理生理机制, 进而对脑组织造成损伤, 包括: 兴奋毒性、线粒体反应、自由基释放、蛋白质错误折叠和炎症反应等^[3]。其中, 核因子- κ B(nuclear factor kappaB, NF- κ B)信号通路的激活是参与其中的重要机制之一^[4]。

1986年, Sen等^[5]在研究免疫球蛋白增强序列的相互作用中发现, NF- κ B是核因子- κ B的简称。从NF- κ B发现至今已超过三十年, 其间发现NF- κ B信号通路参与调节了哺乳动物细胞中的免疫调节、细胞生存、增殖、炎症反应等过程^[6]。而对于NF- κ B信号通路经典途径中的NF- κ B激活, 最关键的步骤是通过IKK复合物调节的I κ B α 的磷酸化^[6-8]。在上述过程中, IKK复合物的调节原件——NEMO(NF- κ B essential modulator)的泛素化是启动IKK的重要步骤^[7,9]。围绕NF- κ B信号通路的研究中, 去泛素化对其调节的相关研究也在逐渐兴起。

头帕肿瘤综合征蛋白(cylindromatosis, CYLD)是一种去泛素化酶, 其具有与肿瘤坏死因子受体相关因子2(tumor necrosis factor receptor-associated factor 2, TRAF2)和NF- κ B的NF- κ B必须调节蛋白(NF- κ B essential modulator, NEMO)结合的特异性位点^[10], 从而参与了TRAF2作为接头蛋白和调控因子的一系列过程, 在几乎所有的肿瘤坏死因子受体1(TNF receptor-1, TNF-R1)介导的NF- κ B和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)激活过程中起重要作用^[11]。2003年, Trompouki等^[10,12]发现, CYLD

是NF- κ B的负向调节因子。Urbanik等^[13]研究表明, CYLD是NF- κ B依赖性抗凋亡信号中调节小鼠肝细胞凋亡的主要调节因子。这为进一步探究CYLD参与NF- κ B信号通路的调节, 打下了基础。

目前针对CYLD调节NF- κ B信号通路的研究主要围绕肿瘤相关疾病, 而在神经系统中CYLD对NF- κ B信号通路的调节相关研究却并不常见。因此, 本课题组前期在大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注模型的基础上, 讨论了CYLD转录和蛋白水平在局灶脑缺血/再灌注后的表达规律, 研究表明, CYLD阳性蛋白主要表达于大脑皮质缺血周边区神经元的胞质中^[4]。然而, 在脑缺血/再灌注损伤中, 上调CYLD的表达水平, 对氧糖剥夺/复氧后NF- κ B信号通路是否存在影响? 如何影响? 尚未见明确报道, 这需要我们进一步探究。

本实验通过在体外采用大鼠原代皮质神经元氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)模型, 模拟体内脑缺血/再灌注模型, 以调控NF- κ B信号通路激活为切入点, 探索过表达CYLD对神经元内NF- κ B信号通路的影响, 尝试为与局灶性脑缺血再灌注相关的疾病提供治疗的新方案。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康新生24 h内Sprague-Dawley(SD)大鼠, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(渝)2018-0003。所有动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定, 并已

通过重庆医科大学实验动物中心及重庆医科大学生物医学伦理委员会审查批准。

1.2 主要试剂与仪器

Neurobasal培养基、B-27、0.25%胰酶、青霉素/链霉素双抗、D-Hank's平衡盐溶液购自Gibco公司; DMEM/F12(1:1)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、L-谷氨酰胺购自Hyclone公司; 多聚赖氨酸(poly-L-lysine)溶液购自Sigma公司; 包装完备的LV-CYLD、LV-CON238慢病毒载体购自上海吉凯基因科技有限公司; 兔抗CYLD多克隆抗体及兔抗 β -actin多克隆抗体购自Proteintech公司; 兔抗NeuN单克隆抗体、小鼠抗p-I κ B α 单克隆抗体购自Cell Signaling Technology公司; Alexa Fluor 488标记羊抗兔二抗购自Proteintech公司; HRP标记驴抗兔IgG二抗、HRP标记驴抗小鼠IgG二抗购自北京博奥森生物技术有限公司; 山羊血清、DAPI购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; CCK-8试剂盒购自博士德生物工程有限公司; 蛋白裂解液RIPA、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、超敏ECL发光试剂盒及DEPC水购自碧云天生物技术有限公司; RNAiso Plus、RNA逆转录试剂盒及TB Green™ Premix Ex Taq™ II购自TaKaRa公司。

超净工作台、恒温培养箱、三气恒温培养箱、多功能酶标仪购自Thermo公司; 荧光倒置显微镜购自Olympus公司; 激光共聚焦荧光显微镜购自Carl Zeiss Microimaging公司; 低温高速离心机购自Sigma公司; 电泳电转仪、荧光定量PCR仪购自Bio-Rad公司; Fusion FX成像系统购自Vilber公司。

1.3 大鼠原代皮质神经元的分离及培养

取新生24 h内SD大鼠, 浸入75%酒精中消毒5 min, 无菌条件下剥离全脑, DMEM/F12培养基冲洗干净, 仔细剥离大脑皮质表面的血管和脑膜, 除去海马, 将其剪成约1 mm³的小块, 静置2 min, 弃去上清, 用0.25%胰酶在37 °C、5% CO₂培养箱中消化15 min(其间每隔5 min, 取出培养皿摇晃数次, 以使其充分消化), DMEM/F12培养基(含10% FBS)终止消化, 巴氏管轻轻吹打混匀, 用200目筛过滤悬液, 离心后弃去悬液, 留离心沉淀细胞加入DMEM/F12培养基(含10% FBS)收集细胞, 计数活细胞, 将细胞接种于预先用多聚赖氨酸(0.01%)处理的孔板中(内含10% FBS的DMEM/F12培养基), 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。细胞培养4 h贴壁后, 更换培养基为Neuro-

basal培养基(2% B27、1%青霉素/链霉素、1% L-谷氨酰胺), 隔日半量换液1次。培养至第6天的细胞用于实验。

1.4 慢病毒转染

同上述神经元培养步骤, 以4 \times 10⁴/mL的密度将提取的神经元接种于6孔板, 更换完全培养基24 h后, 分别取4 μ L的过表达CYLD(LV-CYLD)、空白对照(LV-CON238)慢病毒(滴度1.0 \times 10⁹)感染神经元; 感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10, 感染24 h后换新鲜培养基, 感染48 h后半量换液1次, 隔日半量换液1次。用荧光倒置显微镜观察细胞GFP绿色荧光表达及其形态学的改变。培养至第6天的细胞用于实验。

1.5 神经元氧糖剥夺/复氧

吸弃神经元完全培养基, D-Hank's平衡盐溶液清洗3次后加入D-Hank's平衡盐溶液, 置于37 °C三气培养箱缺氧4 h, 通入1% O₂、5% CO₂和94% N₂厌氧混合气体。缺氧缺糖后将细胞培养基更换为神经元完全培养基, 并置于37 °C、5% CO₂培养箱中继续培养6 h, 模拟体内脑缺血/再灌注损伤。

1.6 实验分组

根据实验需要, 在验证细胞CYLD过表达时, 我们将细胞分为3组, 分别是: 正常细胞组(Normal)、过表达CYLD组(LV-CYLD)、空白病毒组(LV-CON238)。后续实验将细胞分为4组, 分别是: 正常组(Normal)、OGD/R组(OGD/R, 即Control)、过表达CYLD+OGD/R组(LV-CYLD+OGD/R)和空白病毒+OGD/R组(LV-CON238+OGD/R)。正常组按照原代皮质神经元培养方法培养; 对照组进行氧糖剥夺/复氧处理; 过表达CYLD+OGD/R组(LV-CYLD+OGD/R)即给予神经元慢病毒LV-CYLD转染, 再行OGD/R处理; 空白病毒+OGD/R组(LV-CON238+OGD/R), 即给予神经元慢病毒LV-CON238转染, 再行OGD/R处理。

1.7 免疫荧光检测神经元纯度

吸弃神经元完全培养基, 各组用PBS洗涤3次, 先后用4%多聚甲醛室温固定15 min, PBS洗3次, 每次3 min, 0.1% tritonX-100室温下破膜20 min, PBS洗3次, 每次3 min, 山羊血清室温封闭30 min, 吸去血清, 不洗, 加入一抗(NeuN 1:50), 4 °C过夜, PBS洗3次, 每次3 min, 加入标记荧光二抗(1:100), 避光湿盒37 °C孵育1 h, PBS洗3次, 每次3 min, 吸干液体后用50%甘油封片, 激光共聚焦荧光显微镜下观察并摄

片。神经元鉴定及纯度检测是在倒置荧光显微镜下分别计数3个孔各3个视野的NeuN阳性细胞数占总细胞数的百分比,以此代表神经元纯度。

1.8 CCK-8法测定神经元活力

将原代皮质神经元分别接种至96孔培养板,每组3个复孔,每孔100 μ L体系,细胞密度为 5×10^3 个/孔。培养按分组处理后第6天,吸弃96孔培养板内培养基,每孔避光加入100 μ L含10% CCK-8溶液的神经元完全培养基,37 $^{\circ}$ C孵育4 h后终止培养,摇床室温混匀3 min。在酶标仪上测定450 nm波长处吸光度(D)值。按下列公式计算细胞活性:细胞增殖率(%)=[(处理组 D 值-空白组 D 值)/(对照组 D 值-空白组 D 值)] $\times 100\%$ 。

1.9 蛋白质印记法(Western blot)检测各组细胞目的蛋白的表达

准备各组神经元的孔板,吸弃培养基后加入适量蛋白裂解液RIPA及蛋白酶、磷酸酶抑制剂,用细胞刷刮取孔板内细胞,30 min后收集清液,振荡数次,在4 $^{\circ}$ C 14 000 r/min离心15 min,取上清,以BCA法检测蛋白浓度。各组蛋白质分别上样,进行聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离,然后电转至PVDF膜,摇床上5%脱脂奶粉封闭2 h,加入一抗兔抗CLYD单克隆抗体(1:750),或小鼠抗p-I κ B α 单克隆抗体(1:1 000),及兔抗 β -actin抗体(1:2 000),4 $^{\circ}$ C过夜后,TBST洗3次,

每次15 min,加入相应二抗37 $^{\circ}$ C孵育1 h,后用ECL化学发光试剂盒在Fusion XF发光系统中显影。目的条带以 β -actin为内参,采用配套软件Fusion-Capt进行条带灰度值分析。

1.10 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测目的基因mRNA的表达

用RNAiso Plus试剂分别提取各组细胞的总mRNA,使用TaKaRa反转录试剂盒,按说明书将各组反转录为cDNA。反转录条件:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C。扩增条件:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性5 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,再循环39次;65 $^{\circ}$ C检测信号。后得到数据,根据 ΔC_t 值(C_q β -actin为 C_q 内参)统计出的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值为该基因相对表达水平。实验中所有引物均由TaKaRa公司合成(表1)。

1.11 统计学分析

采用SPSS 23.0统计学软件进行分析,实验数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠原代皮质神经元的鉴定

通过免疫荧光染色鉴定神经元,神经元特异性抗体NeuN阳性细胞率可达90%,神经元纯度可满足

表1 RT-qPCR引物序列

Table 1 List of primers used for RT-qPCR

基因名 Gene	上游引物(5'→3') Forward (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse (5'→3')	记录号 Accession number
<i>CYLD</i>	GTT CTA TGG GGT TAT CCG TTG G	TCA GGG CAC AGG TGA AAT AGC	NM_001017380
<i>NF-κB p65</i>	CGA CGT ATT GCT GTG CCT TC	TTG AGA TCT GCC CAG GTG GTA	NM_199267.2
<i>β-actin</i>	ACG GTC AGG TCA TCA CTA TCG	GGC ATA GAG GTC TTT ACG GAT G	NM_031144.3

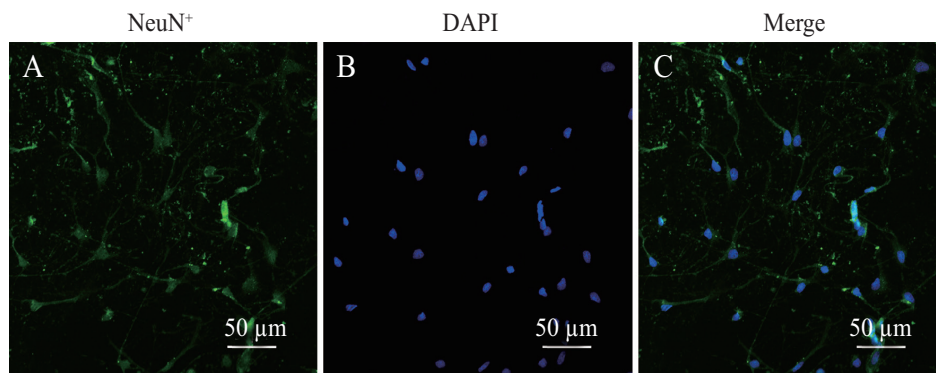
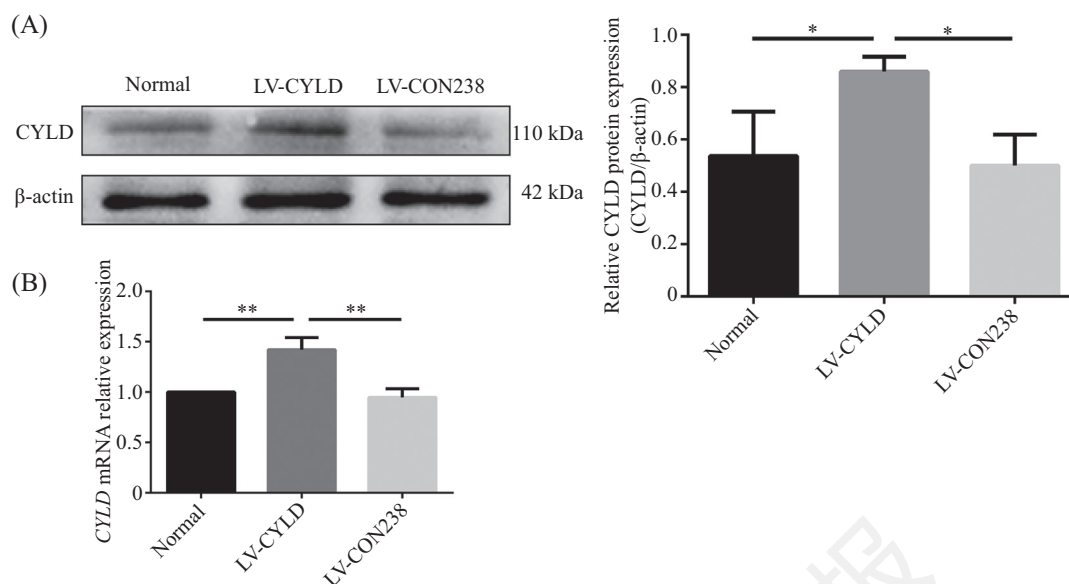


图1 原代皮质神经元的鉴定

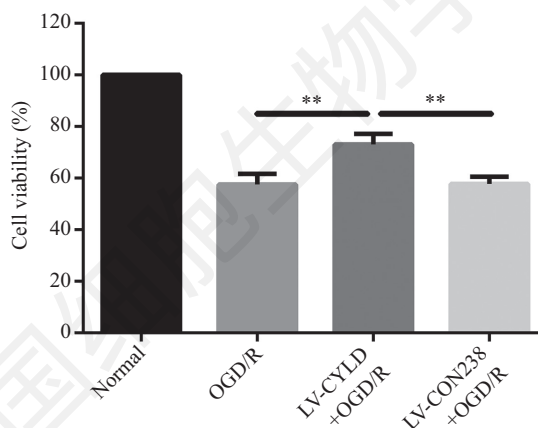
Fig.1 Identification of primary cortical neurons



A: Western blot法检测CYLD的蛋白质相对水平; B: RT-qPCR法检测CYLD的mRNA相对水平。* P <0.05, ** P <0.01。
A: protein levels of CYLD detected by Western blot; B: mRNA levels of CYLD detected by RT-qPCR. * P <0.05, ** P <0.01.

图2 CYLD过表达病毒转染验证

Fig.2 Confirmation of CYLD overexpression virus transfection



CCK-8检测细胞活力情况。** P <0.01。

The viability of neurons detected by CCK-8. ** P <0.01.

图3 过表达CYLD对OGD/R后神经元活力的影响

Fig.3 Effect of CYLD expression on neurons viability after OGD/R

进一步实验要求(图1)。

2.2 神经元中感染慢病毒效率的验证

为了验证过表达CYLD慢病毒的转染效率, 研究使用Western blot、RT-qPCR分别检测了3组细胞中CYLD的蛋白表达水平和CYLD的mRNA的水平。结果显示, LV-CYLD组较Normal组和LV-CON238组相比, 其蛋白表达水平表达明显升高, Western blot(图2A)与RT-qPCR(图2B)结果一致, 验证病毒转染成功。

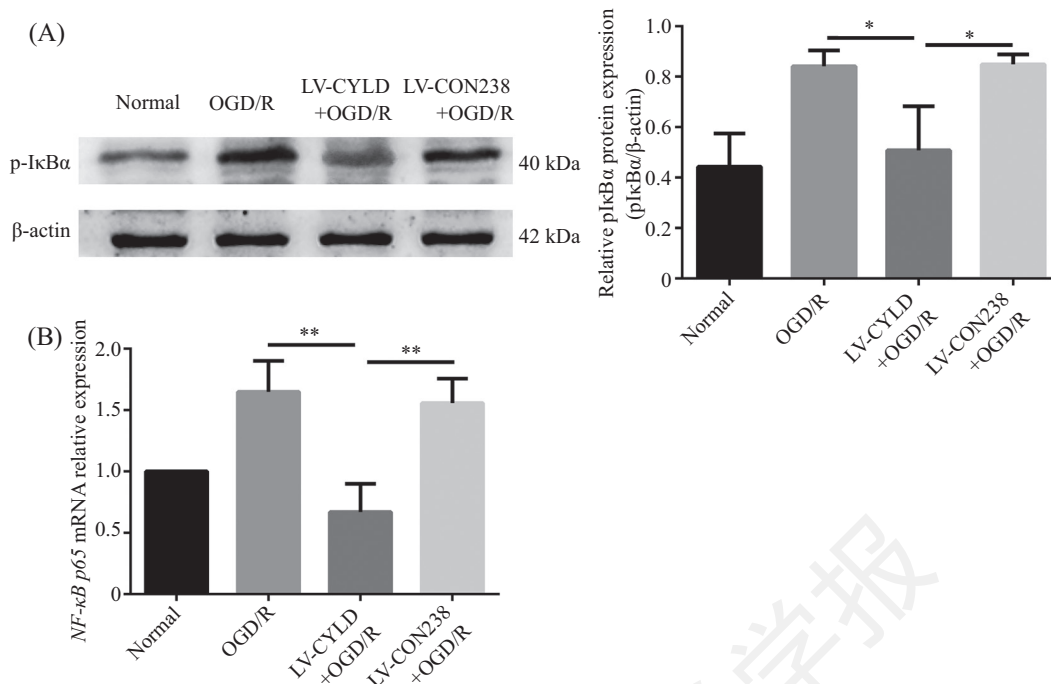
2.3 过表达CYLD对OGD/R后神经元活力的影响

使用CCK-8法检测过表达CYLD对OGD/R后神

经元活力的影响, 结果提示, LV-CYLD+OGD/R组、OGD/R组和LV-CON238+OGD/R组的细胞活力均较Normal组减低, 但LV-CYLD+OGD/R组细胞活力较OGD/R组、LV-CON238+OGD/R组明显增加(图3)。

2.4 过表达CYLD对OGD/R后神经元中NF- κ B信号通路中相关分子表达的影响

为探究过表达CYLD对OGD/R后神经元中NF- κ B信号通路中相关分子表达的影响, Western blot结果显示, 过表达CYLD、LV-CYLD+OGD/R组中p-I κ B α 的蛋白表达较OGD/R组、LV-CON238+OGD/R组有所降低(图4A), 同时RT-



A: Western blot法检测p-IκBα的蛋白质相对水平; B: RT-qPCR法检测NF-κB p65的mRNA相对水平。*P<0.05, **P<0.01。

A: protein levels of p-IκBα detected by Western blot; B: mRNA levels of NF-κB p65 detected by RT-qPCR. *P<0.05, **P<0.01.

图4 过表达CYLD的神经元OGD/R后p-IκBα及NF-κB p65的表达情况

Fig.4 Expression of p-IκBα and NF-κB p65 in neurons overexpressing CYLD after OGD/R

qPCR中对NF-κB p65 mRNA的检测结果显示, LV-CYLD+OGD/R组中的表达较OGD/R组、LV-CON238+OGD/R组均有明显降低(图4B)。

3 讨论

NF-κB是缺血性脑卒中病理过程中最重要的转录因子之一。在NF-κB信号通路的经典途径中,细胞外刺激配体与其特异性跨膜受体结合后,激活IκB激酶(IκB kinase, IKK)复合物(包含具有催化活性的IκKα、IκKβ亚基及作为调节亚基的IκKγ/NEMO),通过IKK在两个丝氨酸残基处磷酸化IκB,诱导其泛素化并降解,从而使NF-κB二聚体进入细胞核、参与特异性基因的表达^[15]。而CYLD作为泛素特异性蛋白酶家族(ubiquitin-specific proteases, USP)成员之一^[16],其包含细胞骨架关联蛋白甘氨酸富含结构域(CAP-Gly),及TRAF2和NF-κB NEMO结合的特异性位点^[17]。2003年, Trompouki等^[10,12]发现, CYLD是NF-κB的负向调节因子。Reiley等^[18]发现, CYLD是IKK的一个新靶点, CYLD的位点特异性磷酸化可调节其自身信号功能。后围绕其间的相关研究就逐渐展开,而在缺血性脑卒中方面围绕NF-κB信号通路中与CYLD联系的研究却较少,因此我们就从NF-κB

与CYLD的联系着手,尝试探究其在缺血性脑卒中的关系。

本课题组前期在大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注模型上,探讨了CYLD转录和蛋白水平在局灶脑缺血/再灌注后的时空表达规律,研究表明, CYLD阳性蛋白主要表达于大脑皮质缺血周边区神经元的胞质中,通过观察大鼠的神经行为学评分、TTC染色情况及ELISA法检测炎症因子,发现CYLD在局灶脑缺血再灌注后具有神经保护和抗炎作用^[9]。进而本研究主要通过在大鼠原代皮质神经元中转染慢病毒过表达CYLD,再给予相应组别OGD/R处理。我们通过观察皮质神经元中NF-κB信号通路中, p-IκKα的蛋白和NF-κB p65的mRNA表达水平,以及各组的细胞活力,进一步完善了在离体环境下, CYLD与NF-κB信号通路相关因子在大鼠皮质神经元中的改变。在皮质神经元中转染过表达CYLD慢病毒后,给予相应组别的OGD/R处理,观察到了皮质神经元在LV-CYLD+OGD/R组、OGD/R组和LV-CON238+OGD/R组的细胞活力均较正常组减低,但LV-CYLD+OGD/R组细胞活力较两组对照组明显增强。Urbanik等^[13]发现,在CYLD敲除的小鼠肝细胞中, NF-κB信号通路依赖的细胞凋亡敏感性增高,导致细胞活力减低,

这与我们的研究结果相符合。而针对NF- κ B信号通路中相关分子表达的变化情况, p-I κ B α 的蛋白表达及NF- κ B p65的mRNA表达在LV-CYLD+OGD/R组中较OGD/R组、LV-CON238+OGD/R组分别均有降低。Massoumi等^[20]发现, 在TNF- α 诱导的CYLD^{-/-}角质形成细胞中I κ B α 的蛋白表达减低速度较CYLD^{+/+}角质形成细胞中的更快, 同时, NF- κ B荧光素酶的激活在CYLD^{-/-}角质形成细胞中也较CYLD^{+/+}角质形成细胞中的更增加明显。这一发现与我们的结果提示, CYLD的上调可以在不同的病生环境下抑制NF- κ B信号通路的激活。该研究结果证明, 当上调大鼠皮质神经元中CYLD的表达水平, 给予OGD/R处理后, 可通过影响p-I κ B α 的表达, 进一步抑制NF- κ B通路的激活, 并增强神经元活力。Yan等^[21]发现, 雄甾-3 β ,5 α ,6 β -三醇可以通过调节CYLD表达, 负性调节NF- κ B信号通路以达到抗神经性炎症作用。虽然目前的多数研究中都提出, CYLD参与的NF- κ B信号通路在部分病理生理条件下有正性作用, 但相对的也有不同的结论出现, Ganjam等^[22]发现, 在神经HT-22细胞模型系统中, 抑制CYLD并不会改变NF- κ B的活性, 从而提出了新的不需要通过NF- κ B调控的CYLD依赖性细胞死亡信号通路, 这一结论与前文所述的CYLD与NF- κ B的负性调节关系相反。因此, 目前围绕CYLD与NF- κ B相关关系的研究还有待大家进一步探索。

综上所述, 过表达CYLD能减轻OGD/R处理后NF- κ B信号通路对大鼠原代皮质神经元造成的损伤。这为深入探讨CYLD在缺血性脑卒中里除NF- κ B信号通路外, 是否同时存在其他信号通路的影响, 进而改善神经功能, 奠定了基础。

参考文献 (References)

- Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, *et al*. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet* 2017; 390(10100): 1151-210.
- Collaborators GBDLROs, Feigin VL, Nguyen G, Cercy K, Johnson CO, Alam T, *et al*. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016. *N Engl J Med* 2018; 379(25): 2429-37.
- George PM, Steinberg GK. Novel stroke therapeutics: unraveling stroke pathophysiology and its impact on clinical treatments. *Neuron* 2015; 87(2): 297-309.
- Sun SC, Ley SC. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol* 2008; 29(10): 469-78.
- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46(5): 705-16.
- Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* 2011; 21(2): 223-44.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappa B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18(1): 621-63.
- Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and I kappa B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(1): 43-52.
- Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, *et al*. Complementation cloning of NEMO, a component of the I kappa B kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 1998; 93(7): 1231-40.
- Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 2003; 424(6950): 801-5.
- Komander D, Lord CJ, Scheel H, Swift S, Hofmann K, Ashworth A, *et al*. The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module. *Mol Cell* 2008; 29(4): 451-64.
- Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirtz T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 2003; 424(6950): 793-6.
- Urbanik T, Koehler BC, Wolpert L, Ellsner C, Scherr AL, Longenich T, *et al*. CYLD deletion triggers nuclear factor-kappaB-signaling and increases cell death resistance in murine hepatocytes. *World J Gastroentero* 2014; 20(45): 17049-64.
- 蒋锦. 电针上调Cylindromatosis对大鼠局灶脑缺血再灌注炎症损伤的影响和机制研究. 重庆医科大学(博士论文), 2018.
- Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 years of NF-kappaB: a blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell* 2017; 168(1/2): 37-57.
- Mevissen TET, Komander D. Mechanisms of deubiquitinase specificity and regulation. *Annu Rev Biochem* 2017; 86: 159-92.
- Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 2003; 424(6950): 797-801.
- Reiley W, Zhang M, Wu X, Granger E, Sun SC. Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I kappa B kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2005; 25(10): 3886-95.
- Jiang J, Luo Y, Qin W, Ma H, Li Q, Zhan J, *et al*. Electroacupuncture suppresses the NF-kappaB signaling pathway by upregulating cylindromatosis to alleviate inflammatory injury in cerebral ischemia/reperfusion rats. *Front Mol Neurosci* 2017; 10: 363.
- Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fassler R. Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* 2006; 125(4): 665-77.
- Yan M, Leng T, Tang L, Zheng X, Lu B, Li Y, *et al*. Neuroprotectant androst-3beta, 5alpha, 6beta-triol suppresses TNF-alpha-induced endothelial adhesion molecules expression and neutrophil adhesion to endothelial cells by attenuation of CYLD-NF-kappaB pathway. *Biochem Bioph Res Co* 2017; 483(2): 892-6.
- Ganjam GK, Terpolilli NA, Diemert S, Eisenbach I, Hoffmann L, Reuther C, *et al*. Cylindromatosis mediates neuronal cell death *in vitro* and *in vivo*. *Cell Death Differ* 2018; 25(8): 1394-407.