

· 实验研究 ·

反复热性惊厥过程中 γ -氨基丁酸 B 受体 对硫化氢的调节作用

韩颖¹, 秦炯¹, 卜定方², 常杏芝¹, 杨志仙¹, 杜军保¹

(北京大学第一医院 1. 儿科; 2. 中心实验室, 北京 100034)

[摘要] 目的 热性惊厥(febrile seizure, FS)是婴幼儿时期最常见的惊厥性疾病之一, 阐明其发生机制一直是该领域的重要研究课题。该课题前期的研究证明, γ -氨基丁酸 B 受体(γ -aminobutyric acid B receptor, GABA_BR)亚基和气体信号分子硫化氢(H₂S)均在反复热性惊厥中发挥了重要作用。该文使用 GABA_BR 激动剂 baclofen, 抑制剂 Phaclofen, 探讨 GABA_BR 对 FS 大鼠硫化氢/胱硫醚- β -合成酶(cystathionine- β -synthase, CBS)体系表达的影响。**方法** 大鼠随机分为对照组, FS 组, FS + baclofen 组, FS + phaclofen 组。采用热水浴诱导大鼠 FS, 隔日诱导 1 次, 共 10 次。采用分光光度计测定大鼠血浆中 H₂S 含量; 用原位杂交方法观察 CBS mRNA 表达情况; 用免疫组化方法观察 CBS 蛋白表达情况。**结果** FS + baclofen 组 H₂S 含量较 FS 组升高 $427.45 \pm 15.91 \mu\text{mol/L}$ vs $362.14 \pm 19.71 \mu\text{mol/L}$, 同时 CBS 表达也较 FS 组增强; 而 FS + phaclofen 组 H₂S 含量较 FS 组降低 $189.72 \pm 21.53 \mu\text{mol/L}$ vs $362.14 \pm 19.71 \mu\text{mol/L}$, 同时 CBS 表达也较 FS 组减弱。**结论** 反复热性惊厥过程中, GABA_BR 的改变可影响 H₂S/CBS 体系的表达。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(2):141-143]

[关键词] 惊厥, 发热性; γ -氨基丁酸; 受体; 硫化氢; 胱硫醚- β -合成酶; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)02-0141-03

Gamma-aminobutyric acid B receptor regulates the expression of hydrogen sulfide / cystathionine- β -synthase system in recurrent febrile seizures

HAN Ying, QIN Jiong, BU Ding-Fang, CHANG Xing-Zhi, YANG Zhi-Xian, DU Jun-Bao. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China (Qin J, Email: qingjiong@263.net)

Abstract: Objective Febrile seizure (FS) is one of the most common seizure types in children. Our previous studies have demonstrated that both γ -aminobutyric acid B receptor (GABA_BR) and hydrogen sulfide (H₂S) are involved in the pathogenesis of FS. This study was designed to explore the effect of GABA_BR on H₂S / cystathionine- β -synthase (CBS) system in recurrent FS. **Methods** Sixty-four Sprague-Dawley rats aged 21 days were randomly assigned into four groups: Control (37°C water bath exposure), FS, FS + baclofen (GABA_BR excitomotor), and FS + phaclofen (GABA_BR inhibitor) groups ($n = 16$ each). FS was induced by warm water bath exposure (45.2°C), once every 2 days, 10 times in total. The plasma level of H₂S was detected by the spectrophotometer. The expression of CBS mRNA was examined by *in situ* hybridization. The expressions of CBS protein was observed by immunohistochemistry. **Results** The plasma level of H₂S increased in the FS + baclofen group ($427.45 \pm 15.91 \mu\text{mol/L}$) but decreased in the FS + phaclofen group ($189.72 \pm 21.53 \mu\text{mol/L}$) compared with that in the FS group ($362.14 \pm 19.71 \mu\text{mol/L}$). The expressions of CBS mRNA and protein were up-regulated in the FS + baclofen group but were down-regulated in the FS + phaclofen group compared with those in the FS group. **Conclusions** GABA_BR modulated the expression of H₂S / CBS system in recurrent FS.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(2):141-143]

Key words: Seizure, febrile; Gamma-aminobutyric acid; Receptors; Hydrogen sulfide; Cystathionine- β -synthase; Rats

热性惊厥(febrile seizures, FS)是造成婴幼儿兴奋毒性脑损伤的常见原因^[1], 阐明其机制十分必要。内源性气体信号分子的发现, 将热性惊厥发病

机制的研究带入一个全新阶段。我们近期的研究发现, 气体信号分子一氧化氮(NO)、一氧化碳(CO)和硫化氢(H₂S)均在热性惊厥的发病机制中发挥了

[收稿日期] 2005-07-30; [修回日期] 2005-10-31

[基金项目] 卫生部临床学科重点项目基金资助(20010912)

[作者简介] 韩颖, 女, 在读博士, 医师。主攻方向: 惊厥性脑损伤。

[通讯作者] 秦炯, 教授, 北京大学第一医院儿科, 邮编: 100034。

重要作用^[2-4]。我们的研究也发现,神经系统内主要的抑制性神经递质 γ -氨基丁酸的代谢型受体 GABA_BR (γ -aminobutyric acid B receptor) 也参与了热性惊厥的发病机制^[5]。但作为代谢性受体的 GABA_BR,除了经典的作用途径,是否还参与了气体信号分子如 H₂S/胱硫醚- β -合成酶(cystathionine- β -synthase, CBS)体系的调节,目前还不清楚。基于这些问题,我们利用热性惊厥动物模型,使用 GABA_BR 激动剂 baclofen,抑制剂 Phaclofen,探讨 GABA_BR 在热性惊厥过程中对 H₂S/ CBS 体系的作用及意义。

1 材料与方法

1.1 反复 FS 动物模型建立和实验分组

SD 大鼠(北京大学医学部实验动物中心提供) 64 只,日龄 21 d,体重 50 ~ 80 g,随机分为对照组 (37.0℃ 水浴, $n = 16$), FS 组 (45.2℃ 水浴, $n = 16$), FS + baclofen 组 (45.2℃ 水浴, $n = 16$), FS + phaclofen 组 (45.2℃ 水浴, $n = 16$)。采用热水浴诱导大鼠反复惊厥,每次诱导时间不超过 5 min,隔日诱导 1 次,共诱导 10 次。每次水浴处理后 1 h 分别予 FS + baclofen 组大鼠腹腔注射 baclofen (5 mg/kg)、FS + phaclofen 组大鼠腹腔注射 phaclofen (1 mg/kg)。对照组及 FS 组大鼠予腹腔注射相同容积的生理盐水,4 组大鼠的饲养及饮食条件相同。

1.2 标本的取材和制备

所有大鼠于最后一次水浴处理后 2 h 取材。用 10% (w/v) 水合氯醛麻醉,经下腔静脉留取大鼠肝素化抗凝血 3 mL 左右,离心后取血浆,置 -70℃ 冰箱保存以备测 H₂S 含量。免疫组化和原位杂交标本的取材见参考文献^[6]。

1.3 血浆 H₂S 含量的间接测定

在试管中加入 1% 醋酸锌 0.5 mL,然后加入 0.1 mL 血浆混匀,使血浆中的硫离子与醋酸锌充分结合形成硫化锌胶体,再加入 20 mmol/L 对苯二胺盐酸盐 0.5 mL 和 30 mmol/L 三氯化铁 0.5 mL,室温孵育 20 min 使之充分显色,加入 10% 三氯醋酸

1 mL 使蛋白沉淀下来,加 2.5 mL 蒸馏水补足体积至 5 mL。离心 6 000 r/min, 5 min,吸取上清液,用分光光度计在波长 665 nm 处检测吸光度。根据 H₂S 标准曲线计算上清液中 H₂S 含量。

1.4 原位杂交及免疫组织化学染色

原位杂交试剂盒购自天津灏洋生物制品公司,操作流程参照参考文献^[6]。免疫组化试剂盒购自天津灏洋生物制品公司,操作流程参照试剂盒说明书。CBS 一抗(兔抗大鼠)由 Santa Cruz 生物公司提供,山羊抗兔二抗为 Sigma 生物公司产品。阴性对照采用 PBS 代替一抗。封片后用光学显微镜进行观察。结果判断同原位杂交。

1.5 数据处理及统计学方法

应用 SPSS10.0 进行数据处理。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠血浆 H₂S 含量的改变

FS + baclofen 组 H₂S 含量较 FS 组升高,而 FS + phaclofen 组 H₂S 含量较 FS 组降低。FS + baclofen 组和 FS + phaclofen 组与 FS 组相比,差异有显著性意义,见表 1。

2.2 CBS 基因与蛋白表达的改变

FS + baclofen 组 CBS 基因与蛋白表达均高于 FS 组,而 FS + phaclofen 组 CBS 基因与蛋白表达均低于 FS 组,见图 1,表 1。

表 1 4 组大鼠血浆 H₂S 含量比较

组别	例数	H ₂ S (mmol/L)	CBS	
			蛋白	mRNA
对照组	16	281.33 $\pm$ 9.85	+	+
FS 组	16	362.14 $\pm$ 19.71 ^a	++	++
FS + baclofen 组	16	427.45 $\pm$ 15.91 ^b	++++	++++
FS + phaclofen 组	16	189.72 $\pm$ 21.53 ^b	+	+

a 与对照组比较, $P < 0.05$; b 与 FS 组比较, $P < 0.05$

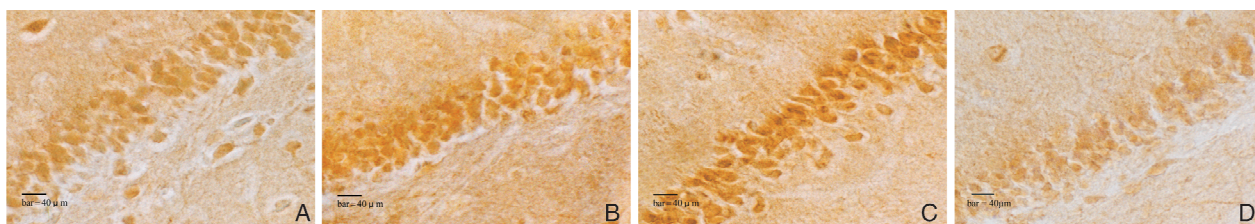


图 1 4 组 CBS mRNA 在海马中的表达 (DAB $\times$ 250)。A: 对照组 CBS mRNA 在海马表达较弱; B: FS 组 CBS mRNA 在海马表达较对照组增强; C: FS + baclofen 组 CBS mRNA 在海马表达较 FS 组增强; D: FS + phaclofen 组 CBS mRNA 在海马表达较 FS 组减弱。

3 讨论

GABA_BR 分布于突触前及突触后。突触后 GABA_BR 受刺激后,增加神经元的钾离子传导,诱导长时程增强(long-term potentiation, LTP);突触前 GABA_BR 激活后,可直接减少钙离子内流,从而调节谷氨酸、GABA 等多种神经递质的释放^[7~10]。目前关于 GABA_BR 在惊厥中作用的研究受到广泛的重视。而作为代谢型受体的 GABA_BR,除了经典的作用途径,是否还参与了其他的调节途径也成为一研究热点。

硫化氢是继一氧化氮和一氧化碳之后被发现的另一种具有神经调质作用的新型气体信号分子^[11]。内源性的 H₂S 由半胱氨酸在磷酸吡多醛-5'-磷酸-依赖性酶包括胱硫醚-β-合成酶、胱硫醚-γ-裂解酶(cystathionine-γ-lyase, CSE)及半胱氨酸转移酶催化作用下产生。其中, CBS 高度表达于神经系统,而 CSE 主要表达于血管组织,主动脉、肺动脉、肠系膜动脉、尾动脉、门静脉和回肠^[12]。

本研究结果显示, GABA_BR 激动剂 baclofen 可使大鼠海马 CBS mRNA 和蛋白表达明显增强,同时血浆 H₂S 含量也显著升高。而 GABA_BR 抑制剂 phaclofen 则可使 CBS mRNA 和蛋白表达减弱,血浆 H₂S 含量也降低。这一结果提示,反复热性惊厥过程中 GABA_BR 可上调 H₂S/CBS 系统的表达。H₂S/CBS 系统在反复热性惊厥过程中发挥了重要的保护作用,外源性阻断其表达可加重反复热性惊厥所致的脑损伤,而外源性低浓度升高其表达则可减轻反复热性惊厥所致的脑损伤^[4]。GABA_BR 对 H₂S/CBS 系统的上调作用提示,对气体信号分子的调节作用是 GABA_BR 在反复热性惊厥过程中发挥作用的途径之一。

GABA_BR 调节 H₂S/CBS 系统的机制尚不清楚。推测 GABA_BR 可能从以下几方面调节 H₂S/CBS 系统的功能:①GABA_BR 和 H₂S 均可影响惊厥时钙离子内流,二者可能通过这一反馈机制来完成对对方的调节;②GABA_BR 可调节惊厥时谷氨酸的释放,而这一过程直接影响 H₂S/CBS 系统的表达;③GABA_BR 对钾离子传导有重要的调节作用,这一过程与

H₂S/CBS 系统的表达密切相关。但是否还有其他机制的参与尚需进一步的实验证实。

本研究证实 GABA_BR 参与了气体信号分子网络的调节,从一个崭新的角度探讨 GABA_BR 在反复热性惊厥过程中发挥作用的机制及细胞间分子调节网络在热性惊厥发病机制中的作用,有助于进一步深化对热性惊厥及其脑损伤发生机制的认识。

[参 考 文 献]

- [1] 常杏芝,秦炯,吴希如. 幼年大鼠反复热性惊厥脑损伤的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(6): 439-442.
- [2] 杨志仙,秦炯,杜军保,常杏芝,韩颖. 内源性血红素氧合酶/一氧化碳体系对反复热性惊厥脑损伤的影响[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(4): 252-255.
- [3] 杨志仙,秦炯,卜定方,杜军保,常杏芝,韩颖. 内源性一氧化氮合酶/一氧化氮体系对反复高热惊厥脑损伤的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2004, 19(12): 1065-1067.
- [4] Han Y, Qin J, Chang XZ, Yang ZY, Tang XY, Du JB. Hydrogen sulfide may improve the hippocampal damage induced by recurrent febrile seizures in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(2): 431-436.
- [5] 韩颖,秦炯,常杏芝,杨志仙. 发育期大鼠高热惊厥前后海马 γ-氨基丁酸 B 受体亚基表达的变化[J]. 北京大学学报(医学版), 2003, 35(3): 288-291.
- [6] 韩颖,秦炯,卜定方,杨志仙,常杏芝,杜军保. 一氧化碳对热性惊厥大鼠 γ-氨基丁酸 B 受体亚基的调节作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(6): 513-516.
- [7] Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ. Expression cloning of GABAB receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors[J]. Nature, 1997, 386(6622): 293-246.
- [8] Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P. GABAB receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes[J]. Nature, 1998, 396(6712): 683-687.
- [9] Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M. GABAB receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2[J]. Nature, 1998, 396(6712): 674-678.
- [10] White JH, Wise A, Martin MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, et al. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABAB receptor[J]. Nature, 1998, 396(6712): 679-682.
- [11] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? [J]. FASEB J, 2002, 16(13): 1792-1798.
- [12] Eto K, Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation[J]. J Neurosci, 2002, 22(9): 3386-3391.

(本文编辑:吉耕中)