

· 实验研究 ·

一氧化碳和一氧化氮对热性惊厥 大鼠海马神经元凋亡的影响

杨志仙, 秦炯, 常杏芝, 韩颖, 单英

(北京大学第一医院儿科, 北京 100034)

[摘要] 目的 热性惊厥(FS)是小儿时期最常见的惊厥性疾病,反复FS可造成海马神经元的损伤,同时血红素氧合酶(HO)/一氧化碳(CO)系统和一氧化氮合酶(NOS)/一氧化氮(NO)系统明显上调并相互影响。该研究使用HO的抑制剂锌原卟啉IX(ZnPP-IX)和NOS的抑制剂N^ω硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)对FS时两个系统进行干预,探讨此两个系统对反复FS大鼠海马神经元凋亡的影响。方法 采用热水浴诱导大鼠FS,隔日诱导1次,共诱导10次。21日龄SD大鼠随机分为4组:对照组,FS组,FS+ZnPP-IX组,FS+L-NAME组。TUNEL法对各组大鼠海马CA1区神经元进行凋亡检测。结果 FS组大鼠海马CA1区凋亡细胞数较对照组多225%,两组比较,差异有显著性($P < 0.01$),FS+ZnPP-IX组大鼠海马CA1区凋亡细胞数较FS组和对照组分别多62%和425%(均 $P < 0.01$),FS+L-NAME组大鼠海马CA1区凋亡细胞数较FS组低38%($P < 0.01$),较对照组多100%($P < 0.05$)。结论 反复FS时,外源性给予HO抑制剂ZnPP-IX可导致海马神经元的凋亡增多,而NOS的抑制剂L-NAME可致海马神经元的凋亡减少,提示HO/CO系统可保护FS神经元的损伤,NOS/NO系统可加重FS神经元的损伤。

[中国当代儿科杂志,2006,8(3):231-234]

[关键词] 惊厥,发热性;一氧化碳;一氧化氮;凋亡;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)03-0231-04

Effect of carbon monoxide and nitric oxide on the apoptosis of hippocampal neurons in rats with febrile seizures

YANG Zhi-Xian, QIN Jiong, CHANG Xing-Zhi, HAN Ying, SHAN Ying. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China (Qin J, Email: qinjiong@263.net)

Abstract: Objective Febrile seizure (FS) is the most common type of seizure disorders in children. Recurrent FS can cause hippocampal neurons injury. At the same time heme oxygenase / carbon monoxide (HO/CO) system and nitric oxide synthase / nitric oxide (NOS/NO) system were up-regulated and interacted each other. This study examined the effects of the two systems on the apoptosis of hippocampal neurons in rats with recurrent FS. **Methods** FS was induced in rats by exposure to warm water bath (45.2 °C), once every 2 days, 10 times in all. Sprague-Dawley (SD) rats aged 21 days were randomly assigned into four groups: Control (37 °C water bath exposure), FS, FS + ZnPP-IX (HO inhibitor) and FS + L-NAME (NOS inhibitor) groups. The apoptosis of hippocampal CA1 neurons was detected by TUNEL. **Results** After recurrent FS, the apoptotic cells in the hippocampal CA1 neurons increased by 225% compared with those in the Control group ($P < 0.01$). The apoptotic cells in the FS + ZnPP-IX group increased by 62% and 425% compared with those in the FS and the Control groups (both $P < 0.01$). The apoptotic cells in the FS + L-NAME group decreased by 38% compared with those in the FS group ($P < 0.01$) and increased by 100% compared with those in the Control group ($P < 0.05$). **Conclusions** In recurrent FS, exogenous administration of HO inhibitor ZnPP-IX may induce an increase of apoptotic cells in hippocampal neurons, while NOS inhibitor L-NAME may decrease the apoptotic cells. The results suggest that the HO/CO system might alleviate neuronal damage, while NOS /NO system might augment neuronal damage.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(3):231-234]

Key words: Seizures, febrile; Carbon monoxide; Nitric oxide; Apoptosis; Rats

[收稿日期]2005-08-01;[修回日期]2005-10-12

[基金项目]卫生部临床学科重点项目基金(编号20010912)

[作者简介]杨志仙,女,博士研究生,主治医师,助理研究员。主攻方向:气体分子与热性惊厥脑损伤。

[通讯作者]秦炯,教授,北京大学第一医院儿科,邮编:100034。

热性惊厥(febrile seizure, FS)是小儿时期最常见的惊厥性疾病,在6个月到6岁儿童中发病率约为2%~5%^[1]。一氧化碳(carbon monoxide, CO)和一氧化氮(nitric oxide, NO)是两种新型的气体信号分子,分别在血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化作用下而生成。我们的研究发现反复FS后内源性HO/CO系统及NOS/NO系统明显上调^[2,3],同时两个系统之间存在着相互影响,并共同对FS脑损伤起调节作用^[4]。既往的研究还发现反复FS可造成海马凋亡神经元增多^[5],本研究通过应用HO和NOS各自的抑制剂锌原卟啉IX(zinc protoporphyrin IX, ZnPP-IX)和N ω -硝基-L-精氨酸甲酯(N ω -nitro-L-arginine Methyl ester, L-NAME)^[6],探讨CO和NO对反复FS大鼠海马神经元凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 反复FS动物模型建立和实验分组

实验动物为SD大鼠(购自中国医学科学院动物研究所),日龄21 d,体重50~80 g,随机分为对照组(37.0℃水浴, $n=8$),FS组(45.2℃水浴, $n=8$),FS+ZnPP-IX组(45.2℃水浴, $n=8$),FS+L-NAME组(45.2℃水浴, $n=8$)。采用热水浴诱导大鼠FS^[7],每次诱导时间不超过5 min,隔日诱导1次,共诱导10次。每次水浴处理前30 min予FS+ZnPP-IX组大鼠腹腔注射ZnPP-IX(45 $\mu\text{mol/kg}$),予FS+L-NAME组大鼠腹腔注射L-NAME(10 mg/kg),对照组及FS组大鼠腹腔注射相同容积的生理盐水,4组大鼠的饲养条件相同。大鼠惊厥的判断标准:0级无惊厥;1级面部抽动;2级点头;3级前肢阵挛抽搐;4级整个身体突然举起(大鼠依靠尾和由于肌强直而侧伸的下肢呈站立姿势);5级整个身体突然举起并摔倒。

1.2 标本的取材和制备

各组大鼠最后一次水浴处理后24 h处死,经左心室灌注固定,断头取脑后进行后固定并蔗糖置换,待脑组织下沉后,OCT包埋,液氮快速冷冻,于恒冷冰冻切片机中进行冰冻冠状切片,切片厚度10 μm ,贴敷在经APES防脱片剂处理的载玻片上。

1.3 原位末端标记(TUNEL)检测的步骤

脑组织冰冻切片从-20℃冰箱中取出,室温晾干;4%多聚甲醛室温固定30 min,0.01 mol/L PBS洗片。新鲜配置0.3% H_2O_2 甲醇溶液,室温孵育30 min;将切片放入通透液(0.1% Triton X-100溶于

0.1% 枸橼酸钠溶液中),在冰浴中孵育2 min;切片滴加50 μL 的TUNEL反应混合溶液,在湿盒中37℃孵育60 min;切片滴加50 μL 的转化剂-POD,在湿盒中37℃孵育60 min;新鲜配制的DAB显色试剂室温下显色5~20 min,自来水充分冲洗;苏木精轻度复染数秒,梯度酒精脱水,二甲苯透明,树脂封片。

1.4 结果分析

细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。显微镜下观察阳性反应的着色程度及分布范围。40 $\times$ 显微镜下,每张切片分别计数海马CA1区高倍视野的阳性细胞数,再与此区高倍视野的细胞总数相比,即凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.5 统计学方法

采用SPSS 10.0进行统计学处理。所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组之间比较用单因素方差分析(F 检验)及 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 热水浴诱导大鼠FS

所有暴露于37.0℃水浴中的大鼠均未发生惊厥,而暴露于45.2℃热水浴中的大鼠,每次均在5 min内发展为惊厥。大鼠的惊厥级别多为4~5级。FS组,FS+ZnPP-IX组及FS+L-NAME组的惊厥强度无明显区别。

2.2 TUNEL检测结果

应用TUNEL方法对4组大鼠海马神经元进行凋亡检测。结果显示,FS组大鼠海马CA1区凋亡细胞数较对照组明显多225% ($P < 0.01$);FS+ZnPP-IX组大鼠海马CA1区凋亡细胞数较FS组和对照组分别多61.54%和425% (均 $P < 0.01$);FS+L-NAME组大鼠海马CA1区凋亡细胞数较FS组低38.46% ($P < 0.01$),较对照组多100% ($P < 0.05$)。(表1,图1)。

表1 各组大鼠海马CA1区凋亡神经元计数

($\bar{x} \pm s$)		
组别	例数(n)	海马CA1
对照组	8	0.04 $\pm$ 0.02
FS组	8	0.13 $\pm$ 0.03 ^b
FS+ZnPP-IX组	8	0.21 $\pm$ 0.04 ^{b,c}
FS+L-NAME组	8	0.08 $\pm$ 0.03 ^{a,c}

与对照组比较, a $P < 0.05$, b $P < 0.01$; 与FS组比较, c $P < 0.01$

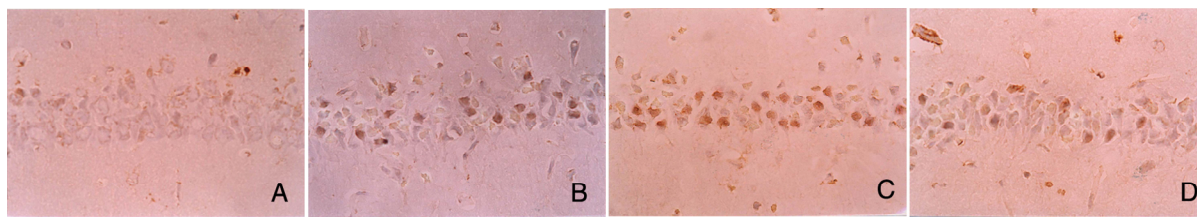


图1 4组大鼠海马CA1区神经元TUNEL染色结果(DAB染色 $\times 400$)。A:对照组偶见凋亡神经元;B:FS组,凋亡神经元较对照组明显增多;C:FS + ZnPP-IX组,凋亡神经元较FS组明显增多;D:FS + L-NAME组,凋亡神经元较FS组、FS + ZnPP-IX组明显减少。

3 讨论

FS是儿童时期最常见的惊厥性疾病,绝大多数预后良好,但是反复或长时间发作的高热惊厥可以造成脑损伤。我们曾经对反复FS大鼠的海马神经元进行了显微镜下和电镜下的观察,证实了神经元损伤的存在^[8]。对FS脑损伤的机制研究发现,在中枢神经系统中起重要作用的HO/CO系统和NOS/NO系统参与了FS脑损伤的调节机制,HO/CO系统上调可减轻FS大鼠海马神经元的显微结构和超微结构损伤改变,而NOS/NO系统上调可加重上述损伤^[4]。

细胞凋亡,即程序性细胞死亡,是由于细胞内外因素刺激,触发其主动死亡程序,通过内源性DNA内切酶激活而发生的一种主动的、受许多凋亡相关基因严格调控的细胞自我消亡过程。近年来的研究发现,惊厥性脑损伤有凋亡机制参与。在杏仁核点燃的惊厥模型中发现,惊厥1次及20次后海马TUNEL标记阳性细胞比对照组分别高30.4%和82.5%,且这些阳性细胞主要为中间神经元,推测这些神经元的凋亡可能导致海马失去抑制性神经元的抑制作用,从而增加对惊厥的易感性^[9]。Bengzon等^[10]发现点燃刺激所致的短暂的非痉挛性惊厥可引起大鼠齿状回神经元凋亡。我们课题组既往对反复FS大鼠神经元的凋亡检测也发现了细胞凋亡增多的现象^[5]。那么,参与了FS脑损伤发生机制的内源性HO/CO系统和NOS/NO系统对神经元凋亡有何影响呢?值得进行研究。由于反复FS后两个系统均出现了上调,因此我们分别应用HO和NOS的抑制剂ZnPP-IX和L-NAME进行了干预,观察两个系统下调后FS大鼠海马神经元凋亡数目的改变。研究结果发现HO抑制剂ZnPP-IX的干预使大鼠海马CA1区凋亡细胞数较对照组及FS组均明显多,NOS抑制剂L-NAME的干预使大鼠海马CA1区凋

亡细胞数较FS组明显少,较对照组多。这与上述两个系统对反复FS大鼠神经元的形态学影响相一致,即HO/CO系统对FS脑损伤起保护作用,而NOS/NO系统对FS脑损伤起有害作用。

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一类在进化上高度保守,广泛存在于原核及真核细胞内,因高温或病原体、理化有害因素的刺激应激产生的蛋白质。在侧脑室注入卡因酸所致大鼠癫痫持续状态模型中,HSP70免疫反应阳性神经元均保持正常形态结构,而不可逆性损伤的神经元均不表达HSP,提示HSP70的表达将决定神经元在应激情况下的存活,从而使神经元的凋亡减少^[11]。有资料证实HSP70和HSP32都属于HO-1^[12],因此认为HO/CO系统参与了热性惊厥的凋亡调节。

NO参与凋亡机制主要是由谷氨酸及NMDA受体在惊厥中的作用所诱发的。在惊厥发作中,谷氨酸从突触前膜释放后,作用于突触后膜上的谷氨酸受体,主要是NMDA受体,导致钙通道开放, Ca^{2+} 内流,当细胞内 Ca^{2+} 升高到一定水平时,与钙调蛋白结合,激活神经元型NOS,NO合成增加,当NO与 O_2^- 反应生成过氧化硝基阴离子(ONOO^-)以及链式反应生成毒性更强的 NO^2 和OH $^-$ 后,使DNA链断裂并影响DNA的修复作用,导致神经元凋亡。

总之,在反复FS过程中,内源性HO/CO系统和内源性NOS/NO系统均参与了神经元凋亡的调节,HO/CO系统使反复FS时神经元的凋亡减少,NOS/NO系统使神经元的凋亡增多,通过对反复FS时HO/CO系统及NOS/NO系统的诱导或抑制性干预,将有助于对FS脑损伤的治疗提供新的思路和方法^[13,14]。

[参 考 文 献]

- [1] Nelson KB, Ellenberg JH. Prognosis in children with febrile seizures[J]. Pediatrics, 1978, 61(5): 720-727.

- [2] 杨志仙,秦炯,杜军保. 高热惊厥大鼠血红素氧合酶1/一氧化氮体系的变化[J]. 北京大学学报(医学版), 2002,34(6): 696-699.
- [3] 杨志仙,秦炯,杜军保,常杏芝,韩颖. 反复热性惊厥大鼠脑内一氧化氮合酶/一氧化氮体系的变化[J]. 基础医学与临床, 2005,25(5): 414-417.
- [4] Yang ZX, Qin J. Interaction between endogenous nitric oxide and carbon monoxide in the pathogenesis of recurrent febrile seizures [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(2): 349-355.
- [5] 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.
- [6] Cardell LO, Lou YP, Takeyama K, Ueki IF, Lausier J, Nadel JA. Carbon monoxide, a cyclic GMP-related messenger involved in hypoxic bronchodilation in vivo[J]. Pulm Pharm Therap, 1998, 11(4): 309-315.
- [7] Jiang W, Duong TM, de Lanerolle NC. The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat[J]. Epilepsia, 1999, 40(1): 5-19.
- [8] 杨志仙,秦炯,周国平,常杏芝. 发育期大鼠高热惊厥脑损伤模型的建立[J]. 北京大学学报(医学版), 2002,34(3): 225-228.
- [9] Zhang LX, Smith MA, Li XL, Weiss SR, Post RM. Apoptosis of hippocampal neurons after amygdala kindled seizures [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 55(2): 198-208.
- [10] Bengzon J, Mohapel P, Ekdahl CT, Lindvall O. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures[J]. Prog Brain Res, 2002, 135: 111-119.
- [11] Vass K, Berger ML, Nowak TS Jr, Welch WJ, Lassmann H. Induction of stress protein HSP70 in nerve cells after status epilepticus in the rat[J]. Neurosci Lett, 1989, 100(1-3): 259-264.
- [12] Chong KY, Chang C, Su CY. Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection [J]. J Mol Cell Cardiol, 1998, 30(3): 599-608.
- [13] 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.
- [14] 施旭来,胡鸿文,李光乾,陈翔,叶秀云,杜忠东. 癫痫和热性惊厥病儿一氧化氮、一氧化氮合酶的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2004,16(5):394-396.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

2006 年全国首届“血脂与儿童健康”专题研讨会通知

血脂与儿童健康的关系密切,但全社会、医学界特别是儿科医生对此认识不足,很多人误认为血脂异常、冠心病是成人疾病,与儿童健康关系不大。因此普及小儿血脂学知识、扩展知识面、提高临床诊疗水平成为当务之急。为统一思想,统一认识,将我国儿童血脂研究与防治工作推向新的水平,中国医师协会儿童健康专业委员会举办的国家级继续医学教育项目—全国首届“血脂与儿童健康”专题研讨会[项目编号:2006-06-01-010(国),负责人:向伟]将于2006年9月15-20日在海南省海口市召开。

会议主要内容:学术交流;国内知名专家作讲座;讨论血脂与儿童健康及如何制定我国的儿童青少年国家胆固醇教育计划;讨论《小儿血脂异常—基础与临床》一书的再版工作;成立我国血脂与儿童健康协作组。

大会将邀请国内知名专家丁宗一教授、易著文教授、赵水平教授、向伟教授等作小儿血脂专题讲座。介绍小儿血脂代谢的基础与临床,成人心血管疾病的儿童起源及其与血脂的联系,小儿血脂代谢紊乱危害及防治,儿童肥胖、肾脏疾病及儿科其他疾病与血脂异常,儿科营养、喂养等方面国内外最新研究进展。

参加会议的代表将授予国家级继续教育学分10分。

联系人:海南省海口市秀英区秀华路19号海南省人民医院儿科向伟,邮政编码570311。传真:0898-68663485;电话:0898-68642128(办公室),手机:13907533529;E-mail:xiangwei8@163.com