

论著·实验研究

持续惊厥后不同年龄大鼠海马凋亡 调控基因表达的变化

苑爱云 蒋莉 张晓萍

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

[摘要] 目的 比较惊厥持续状态(SC)后不同年龄大鼠海马凋亡调控基因 bcl-2 和 c-Jun 表达的变化,探索未成熟脑耐受惊厥性脑损伤的分子基础。方法 制作幼年 and 成年 Wistar 大鼠 SC 模型,同时设置正常对照组和实验对照组,每组 8 只。于 SC 后 3 h,6 h,12 h,1 d,3 d 和 7 d 分别处死动物,免疫组化、原位杂交和 RT-PCR 测定海马 bcl-2 和 c-Jun 蛋白及 mRNA 的表达。结果 SC 后幼年组和成年组海马 c-Jun 蛋白表达均升高,SC 后 6 h 达高峰,显著高于正常对照组($P < 0.01$),12 h 后开始回落。幼年 SC 组 c-Jun 蛋白表达于 SC 后 1 d 已降至幼年正常对照组水平,而成年 SC 组直至 SC 后 7 d 仍显著高于成年正常对照组($P < 0.05$)。SC 后 6 h,12 h,1 d,3 d 和 7 d 成年 SC 组 c-Jun 蛋白表达均显著高于幼年 SC 组($P < 0.05$)。SC 后幼年组和成年组海马 c-Jun mRNA 的表达与其蛋白表达规律类似。SC 后幼年组和成年组海马 bcl-2 蛋白及 mRNA 表达升高不明显。结论 SC 诱导海马凋亡促进基因 c-Jun 表达增高,幼年鼠较成年鼠表达明显为弱,且持续时间短,这可能是未成熟脑抵抗惊厥性脑损伤的机制之一。SC 未能明显诱发凋亡抑制基因 bcl-2 的强表达,其表达受年龄影响小。

[中国当代儿科杂志,2011,13(5):411-414]

[关键词] 惊厥持续状态; c-Jun; bcl-2; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)05-0411-04

Differences of apoptotic-regulating gene expression in the hippocampus in rats with different ages after status convulsion

YUAN Ai-Yun, JIANG Li, ZHANG Xiao-Ping. Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China (Jiang L, Email: dr_jiangli@126.com)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of brain protection against convulsive brain damage in premature brains by observing the changes of apoptotic-regulating genes of bcl-2 and c-Jun expression in the hippocampus in Wistar rats with different ages after status convulsion (SC). **Methods** SC was induced in infant Wistar rats (IRs) and adult Wistar rats (ARs) by intraperitoneal injection of lithium-pilocarpine. The rats were sacrificed at 3 hrs, 6 hrs, 12 hrs, 1 day, 3 days and 7 days after SC ($n = 8$). Bcl-2 and c-Jun protein and mRNA levels were measured using immunocytochemistry, RT-PCR and *in situ* hybridization. **Results** c-Jun protein levels increased significantly at 3 hrs and reached the peak at 6 hrs after SC in both IRs and ARs compared to those in the normal control group ($P < 0.01$). c-Jun protein levels started to decrease 12 hrs after SC in both IRs and ARs. The expression of c-Jun protein in IRs returned to the basal level 1 day after SC, while remained higher in ARs than in the normal control group by 7 days after SC. The expression of c-Jun protein in ARs was much higher than that in IRs from 6 hrs to 7 days after SC ($P < 0.05$). c-Jun mRNA level was in parallel with the protein level as mentioned in IRs and ARs after SC. There were no changes observed in both bcl-2 protein and bcl-2 mRNA levels after SC in IRs and ARs. **Conclusions** SC may induce an up-regulation of proapoptotic gene c-Jun in the hippocampus after SC, with a less strong extent and shorter duration in IRs compared to that in ARs. This might be one mechanism of brain protection against convulsive brain damage in IRs. The expression of bcl-2 remains unchanged after SC and is not affected by age in both IRs and ARs.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (5):411-414]

Key words: Status convulsivus; c-Jun; Bcl-2; Rats

国内外动物实验发现,惊厥持续状态(status convulsion, SC)发作后将导致以海马神经元死亡为

主的选择性脑损伤^[1-2]。本课题组的前期研究证实未成熟脑虽对惊厥具有较高易感性,但对惊厥性脑

[收稿日期]2010-08-12; [修回日期]2010-11-17

[基金项目]国家自然科学基金(No. 30271382)。

[作者简介]苑爱云,女,硕士,住院医师。现单位为青岛市妇女儿童医院神经康复科,邮编 266011。

[通信作者]蒋莉,教授。

损伤具有相对耐受性,未成熟脑内可能存在抑制惊厥后神经元凋亡的机制^[1-3],这与临床上婴幼儿SC发作后的病死率和致残率较年长儿和成人明显为低的现象一致^[2]。然而,未成熟脑耐受惊厥性脑损伤的机理尚不清楚。众所周知,包括神经元在内的细胞凋亡是受基因调控的程序性死亡过程,鉴于c-Jun和bcl-2分别是调控细胞凋亡的凋亡促进基因和凋亡抑制基因的关键基因之一,本研究以幼年成年大鼠作对照,在调控细胞凋亡的基因水平进行对比研究,观察SC后年龄对大鼠海马上述凋亡调控基因表达的影响,以探讨惊厥性脑损伤年龄差异性的分子生物学机理。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备与分组

健康成年和生后20d的幼年(按不同时期脑发育的组织学特征推算,相当于人类成年期和婴儿期)Wistar大鼠各64只(重庆医科大学实验动物中心提供)。其中各48只参照文献^[4]采用氯化锂-匹罗卡品(Sigma公司)诱发SC模型。在大鼠惊厥发作15min后,腹腔注射阿托品(上海禾丰制药有限公司)1mg/kg。在惊厥发作30min(30min SC)后,腹腔注射水合氯醛(上海禾丰制药有限公司)300mg/kg止惊,分别于SC后3h,6h,12h,1d,3d,7d处死动物,每组8只。成年鼠和幼年鼠均设正常对照和实验对照组(先腹腔注射阿托品,15min后腹腔注射水合氯醛),于水合氯醛注射后3h两组同时处死,每组8只。动物断头取脑,取双侧海马,左侧海马采用免疫组化和原位杂交观察bcl-2蛋白/mRNA、c-Jun蛋白/mRNA的分布,并进行半定量分析;右侧海马采用RT-PCR半定量分析bcl-2 mRNA和c-Jun mRNA。

1.2 bcl-2和c-Jun的免疫组化检测

左侧海马连续冠状冰冻切片(8μm),按SP法进行免疫组化染色,观察bcl-2和c-Jun蛋白在海马中的表达变化(兔抗鼠bcl-2、c-Jun多抗及SP免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司)。每只大鼠取3张切片,每张切片分别在海马CA1区、CA3区和齿状回各随机取3个视野(200倍),应用北航CM-2000B型生物学图像分析系统测定其平均光密度值,对惊厥后海马bcl-2和c-Jun蛋白的表达进行半定量观察。

1.3 bcl-2和c-Jun mRNA的原位杂交检测

取与免疫组化相邻的脑组织切片用原位杂交观

察bcl-2和c-Jun mRNA的表达(bcl-2、c-Jun原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司)。应用上述方法及软件测定每张切片的平均吸光度,对惊厥后海马c-Jun和bcl-2 mRNA的表达进行半定量分析。

1.4 bcl-2和c-Jun mRNA的RT-PCR检测

取右侧海马组织约50mg,采用RT-PCR检测bcl-2和c-Jun mRNA的表达(RNA提取试剂盒和RT-PCR检测试剂盒购自大连宝生物工程有限公司)。引物由上海生物工程有限公司合成(表1)。基因序列及长度见表1。采用凝胶成像分析系统测定扩增产物条带平均光密度值。将bcl-2和c-Jun条带光密度值与相应β-actin光密度值比较,计算平均光密度比值。

表1 引物序列及长度

基因	引物序列	基因长度(bp)
bcl-2	上游 5' TGCACCTGACGCCCTTCAC 3'	203
	下游 5' ACAGCCAGGAGAAATCAAACAG 3'	
c-Jun	上游 5' GTCTACGCCAACCTCAGCAAC 3'	291
	下游 5' GTTCCTCATGCAGCTTCCTCT 3'	
β-actin	上游 5'-ATCGTGGGTGACATTAAGAGAAG 3'	410
	下游 5'-GAGCCACCAATCCACACAGA 3'	

1.5 统计学分析

采用SAS软件进行统计分析。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。同一年龄组多个时间点间比较采用方差分析,不同年龄组相同时点间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 惊厥后海马bcl-2蛋白/mRNA表达的动态变化

bcl-2免疫组化阳性反应出现于神经元胞膜和胞浆内,原位杂交阳性反应位于神经元胞浆,均呈棕黄色。两者阳性细胞均主要分布于海马CA1区、CA3区及齿状回。免疫组化结果显示,SC后幼年鼠及成年鼠海马bcl-2蛋白表达略有增加,但各组间差异均无统计学意义。RT-PCR和原位杂交结果发现bcl-2 mRNA表达亦呈现上述规律。结果提示,无论在幼年鼠或成年鼠,无论在蛋白水平还是在mRNA水平,SC均未能明显诱发抑制性凋亡基因bcl-2的强表达。

2.2 惊厥后海马c-Jun蛋白/mRNA表达的动态变化

c-Jun免疫组化阳性反应主要出现在神经元胞核内,原位杂交阳性反应出现在神经元胞浆,均呈棕黄色。阳性细胞均主要分布于海马CA1区、CA3区

及齿状回。免疫组化(图1)、RT-PCR和原位杂交结果(图2)均显示,在正常情况下,幼年鼠海马 c-Jun 蛋白/mRNA 表达较成年鼠明显为高($P < 0.05$)。30 min SC 后 3 h,幼年 SC 组和成年 SC 组海马 c-Jun 蛋白/mRNA 表达较正常对照明显升高(F 值分别为 5.82 和 6.95, $P < 0.05$),均于 SC 后 6 h 达到高峰,12 h 后开始回落。SC 后 1 d,幼年鼠海马 c-Jun 蛋白/mRNA 表达已接近正常对照水平。成年鼠在 SC 后 7 d 仍显著高于正常对照水平。SC 后成年鼠海马 c-Jun 蛋白/mRNA 表达较幼年鼠更为明显,SC 后 6 h 反超幼年鼠,SC 后 6 h 至 7 d 的 5 个时点均显著高于幼年组。

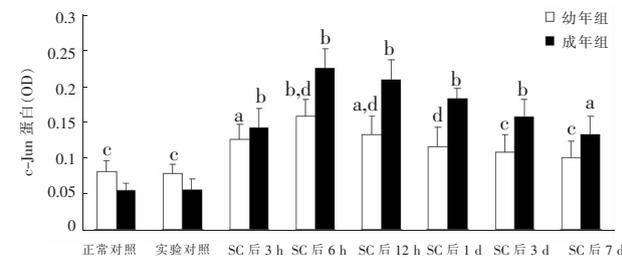


图1 SC 后不同龄期大鼠海马 c-Jun 蛋白表达的平均光密度(免疫组化)与同年龄正常对照组相比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与成年组相同时间点比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

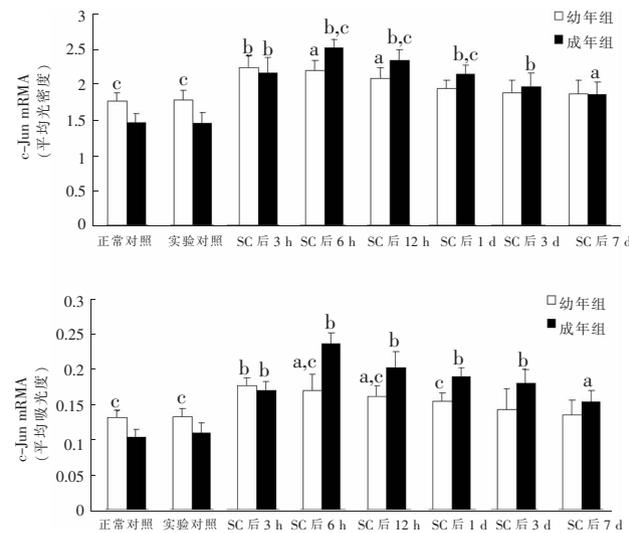


图2 SC 后不同龄期大鼠海马 c-Jun mRNA 的表达(原位杂交)与同年龄正常对照组相比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与成年组相同时间点比较, c: $P < 0.05$

3 讨论

神经元死亡率明显低于成熟脑^[5]。本课题组前期在对细胞凋亡和凋亡早期细胞色素 C 释放的研究发现,未成熟脑对惊厥性脑损伤具有相对耐受性^[1-2,6]。本研究进一步在调控细胞凋亡的基因水平探索此年龄的差异性。

众所周知,凋亡是细胞受基因调控的程序性死亡过程。c-Jun 和 bcl-2 均是调控细胞凋亡的关键基因。c-Jun 为核内原癌基因,其编码的蛋白质参与细胞凋亡的调控。在正常情况下,c-Jun 参与细胞生长、发育、分化等生理过程;病理状况下,可增加线粒体膜通透性,并通过对 bcl-2 家族的抑制,促进线粒体内细胞色素 C 释放,诱导细胞凋亡^[7]。大量研究发现惊厥可以导致 c-Jun 表达的增加^[8-9]。本研究发现,严重惊厥发作将诱导促凋亡基因 c-Jun 在蛋白和 mRNA 水平的表达增高,其表达的部位与前期实验证实的惊厥后海马神经元凋亡的部位呈现一致性,提示惊厥后海马 c-Jun 的表达可能参与了 SC 后海马神经元的凋亡过程,与文献报道一致^[8-9]。Storey 等^[9]在三氟乙醚致惊模型中发现,不同程度的惊厥发作后幼年大鼠海马 c-Jun 表达均没有显著升高,而成年大鼠海马则呈现 c-Jun 的显著升高,呈现年龄依赖性。本研究显示 SC 后海马 c-Jun 表达也呈现明显年龄差异性,成熟脑 c-Jun 表达的程度明显高于未成熟脑。SC 后 c-Jun 的表达呈动态变化过程,与成年组相比,幼年组海马 c-Jun 的表达呈迅速回落趋势,SC 后 1 d 已降至正常水平,而成年鼠 SC 后 7 d 仍显著高于正常对照。与 SC 后海马细胞凋亡及凋亡早期事件的变化规律一致^[2,6],支持 SC 后成熟脑细胞凋亡的发生较未成熟脑更为持续而严重这一特征。幼年鼠海马 c-Jun 的高表达持续时间较短,降低时间早,此年龄特异性可能是 SC 后幼年鼠海马细胞凋亡过程迅速被抑制的内在基础,也可能是未成熟脑抵抗惊厥性脑损伤的机制之一。

bcl-2 与细胞凋亡密切相关,具有“主开关”的作用^[10]。已经证实,bcl-2 编码蛋白的表达可直接影响线粒体膜的功能,阻止细胞凋亡早期事件的发生,包括线粒体膜电位下降、细胞色素 C 释放等,促进细胞生存,防止其死亡。尽管 bcl-2 对细胞凋亡有抑制作用,但惊厥后神经元 bcl-2 表达的变化,目前尚存在争议。Henshall 等^[11]认为兴奋毒性诱导神经元损伤过程中,神经元 bcl-2 表达上调以抵抗脑损伤。安仁哲等^[12]用匹罗卡品诱导惊厥,却未发现 bcl-2 表达的上调。Ferrei^[13]用海人酸致惊后,甚至发现海马 bcl-2 表达降低。本课题组前期实验研究中,曾用美解眠致惊模型,发现惊厥后幼年及成年

惊厥发作将导致海马神经元死亡,未成熟脑内

鼠海马 bcl-2 表达明显升高,但幼年鼠 bcl-2 表达持续时间更长,且其表达的程度也较高,提示惊厥后 bcl-2 的持续高表达可能是未成熟脑抵抗惊厥性脑损伤的分子机制之一,bcl-2 对惊厥性脑损伤可能具有保护作用^[14]。但本研究采用氯化锂-匹罗卡品致惊后,无论在幼年鼠还是成年鼠均未发现 bcl-2 表达的明显增强,提示惊厥后神经元 bcl-2 的表达无明显年龄差异,其对惊厥性脑损伤的抑制作用不明显。推测可能与 SC 后 c-Jun 的高表达对 bcl-2 的表达的抑制作用有关。另外,是否因模型不一致及检测方法的敏感性存在差异,尚待探索。

本研究结果提示,严重惊厥发作后海马内促凋亡基因 c-Jun 的表达与惊厥性脑损伤的发生存在一致性,年龄是影响其表达的重要因素,SC 后早期调控 c-Jun 的表达可能对减轻脑损伤具有积极作用;而凋亡抑制基因 bcl-2 的表达在本组不同年龄 SC 中变化不大,其在抑制 SC 后脑损伤中的价值,有待进一步证实。

[参 考 文 献]

[1] 蒋莉,蔡方成,张晓萍. 大鼠不同成熟期大脑对持续惊厥的耐受性[J]. 中华儿科杂志,2002,40(7):429-432.
[2] Moshé SL. Brain injury with prolonged seizures in children adults [J]. J Child Neurol, 1998, 13(Suppl 1): S3-S6.
[3] 胡越,蒋莉,李欣,张晓萍. 持续惊厥后影响海马神经元凋亡的相关因素[J]. 中华神经科杂志,2006,39(1):36-38.

[4] 胡越,蒋莉. 有效控制氯化锂-匹罗卡品诱发惊厥持续状态发作的实验研究[J]. 儿科药理学杂志,2003,9(4):5-8.
[5] Setkowicz Z, Janeczko K. Long-term changes in susceptibility to pilocarpine-induced status epilepticus following neocortical injuries in the rat at different developmental stages [J]. Epilepsy Res, 2003, 53(3):216-224.
[6] 苑爱云,蒋莉,李欣. 年龄和惊厥持续时间对持续惊厥发作后海马细胞色素 C 释放的影响[J]. 第四军医大学学报,2006,27(7):577-579.
[7] Eilers A, Whitfield J, Vekrellis K, Neame SJ, Shah B, Ham J. c-Jun and Bax: regulators of programmed cell death in developing neurons[J]. Biochem Soc Trans, 1999, 27(6):790-797.
[8] Szot P, White SS, Shen DD, Anderson GD. Valproic acid, but not lamotrigine, suppresses seizure-induced c-fos and c-Jun mRNA expression[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 135(1-2):285-289.
[9] Storey TW, Rho JM, White SS, Sankar R, Szot P. Age-dependent differences in flurothyl-induced c-fos and c-Jun mRNA expression in the mouse brain[J]. Dev Neurosci, 2002, 24(4):294-299.
[10] Gross A. Bcl-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program[J]. IUBMB Life, 2001, 52(3-5):231-236.
[11] Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(12):1557-1572.
[12] 安仁哲,尹永日,金春姬,金政,李根焕. 癫痫发作诱发的程序性细胞死亡机制与神经细胞坏死的关系[J]. 中华儿科杂志,2003,41(4):290-292.
[13] Ferrei I. Cell signaling in the epileptic hippocampus[J]. Rev, 2002, 34(6):544-550.
[14] 蒋莉,蔡方成,张晓萍. 未成熟大脑对惊厥性脑损伤耐受性的分子生物学机理研究[J]. 重庆医科大学学报,2005,30(5):640-643.

(本文编辑:王霞)