

· 论 著 ·

大鼠海马线粒体解偶联蛋白-4 在热性惊厥后的表达

李朝阳,秦炯,韩颖,常杏芝,杨艳玲

(北京大学第一医院儿科,北京 100034)

[摘 要] **目的** 人类热性惊厥多发生于 6 个月~5 岁的儿童。小儿热性惊厥的发生率随体温上升明显升高,惊厥发生时体温为 38.0~42℃。但是热性惊厥的病理生理机制目前仍不明确。该实验拟通过研究热性惊厥(febrile seizures, FS)对发育期大鼠脑内海马区神经元线粒体解偶联蛋白 UCP4 表达的影响,探讨热性惊厥过程中细胞能量代谢的变化。**方法** 采用热水浴诱导大鼠热性惊厥模型。72 只发育期大鼠分为 3 组:对照组(n=24),热性惊厥组(n=24),高热未惊厥组(n=24)。该实验通过免疫组化、原位杂交两种定性实验;以及 Western blot 半定量实验,测定大鼠海马 UCP4 在热性惊厥后的含量的变化。**结果** 惊厥组大鼠脑内海马区神经元细胞内 UCP4 的蛋白含量高于高热组和对照组,高热组 UCP4 的表达低于惊厥组和对照组。与对照组(14 830.75±641.91)相比,热性惊厥组 IDV/area 值增高(22 150.63±423.4)($P<0.05$),而高热组的 IDV/area 值降低(10 511.63±302.07)($P<0.05$)。**结论** 热性惊厥可能导致解偶联蛋白表达增多,作用增强,热能释放增多,基础代谢率增高,防止活性氧族(ROS)的形成;同时 ATP 的产生减少,可能反复的热性惊厥影响了线粒体能量储备的功能。

[中国当代儿科杂志,2004, 6(4): 261—264]

[关 键 词] 热性惊厥;解偶联蛋白;海马;线粒体;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008—8830(2004)04—0261—04

Changes of uncoupling protein-4 expression after febrile seizures in the hippocampus of developing rats

Chao-Yang LI, Jiong QIN, Ying HAN, Xing-Zhi CHANG, Yan-Ling YANG. Department of Pediatrics, First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China (Email:qinjiong@263.net)

Abstract: Objective Febrile seizures (FS) occur more frequently in children between the ages of six months and five years, especially when they have a fever (38—42℃). The pathophysiological mechanism for FS is not clear at the moment. To explain the changes of cellular energy metabolism during FS, the expression of uncoupling protein-4 (UCP4) was studied after recurrent FS in the hippocampus using developing rats. **Methods** FS were induced in the rats by exposure to a hot water bath. Seventy-two developing rats were divided into a Control group (n=24), a FS group (n=24), and a Febrile without seizure group (Febrile group, n=24). The mRNA and protein expression of UCP4 in the rat hippocampus was studied after the hyperthermia stimulation using immunohistochemistry, in situ hybridization and Western blot analysis. **Results** The UCP4 content in the hippocampus was higher in the FS group than that in both of the Control and Febrile groups, while the UCP4 content in the Febrile group was the lowest among the three groups. The highest mean intergrated density value (IDV) /area was 22 150.63±423.40 in the FS group, followed by the Control group (14 830.75±641.91) and the Febrile group (10 511.63±302.07) (both $P<0.05$). **Conclusions** Increased expression of UCP4 in the FS group suggested an increased uncoupling process in mitochondria. Consequently, recurrent FS could decrease ATP production and affect the mitochondrial reserve function. [Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(4): 261—264]

Key words: Febrile seizures; Uncoupling protein; Hippocampus; Mitochondrion; Rat

[收稿日期] 2004—05—31; [修回日期] 2004—06—29
[基金项目] 卫生部临床学科重点项目(编号 2001—0912)。
[作者简介] 李朝阳(1971—),男,博士研究生。主攻方向:小儿神经系统疾病。
[通讯作者] 秦炯,北京市西城区西安门大街 1 号,北京大学第一医院儿科,邮编:100034。
• 261 •

热性惊厥(febrile seizures, FS)是婴幼儿时期常见的中枢神经系统器质或功能异常的紧急症状,其病理生理基础为高热使脑细胞功能紊乱。但FS的发生及其反复发作的细胞和分子机制仍然不完全明确。常杏芝等^[1]已发现热性惊厥大鼠海马神经元线粒体出现皱缩、嵴模糊、消失等损伤后结构改变。而线粒体的主要功能是产生ATP,这一功能是通过氧化磷酸化的偶联作用来完成的。线粒体内膜的解偶联蛋白能破坏这种偶联作用,使质子通过线粒体内膜产生质子漏,影响ATP的生成,同时伴随着热能的释放,这种热能为基础代谢率提供了50%的能量^[2]。

本研究通过检测发育期大鼠解偶联蛋白在热性惊厥后的表达来探讨热性惊厥过程中线粒体的功能改变。

1 材料和方法

1.1 热性惊厥模型制作

参照韩颖等^[3]方法进行。热水浴箱,箱内的水深以大鼠沿箱壁站立时仅露出头部为准。对照组水温37℃,高热处理组水温为44.5℃,5 min内发生惊厥者立即取出为热性惊厥组;5 min内未发生惊厥者立即取出为高热未惊厥组。此后热性惊厥组热水浴时间为至惊厥发作为止,高热未惊厥组大鼠置于44.5℃热水中的时间为前一次惊厥组在44.5℃热水中的平均时间,隔日诱导惊厥1次,共10次。

1.2 实验动物分组

SD大鼠由北京大学医学部实验动物中心提供。实验期间动物保证环境安静和昼夜节律,自由摄食、饮水。21日龄SD大鼠76只,体重60~100 g,分为对照组24只,高热未惊厥组24只,热性惊厥组(惊厥10次者)24只。

每组大鼠分成3亚组:免疫组化亚组、原位杂交亚组、Western blot亚组,每亚组8只。

1.3 原位杂交

分别在最后一次诱导惊厥后24 h将大鼠行心脏灌注,然后断头取脑,液氮速冻,切片,片厚10 μm。分别进行原位杂交,检测海马的UCP4的mRNA的表达(UCP4原位杂交试剂盒,寡核苷酸探针,天津TBD公司提供),具体步骤参照试剂盒说明书,DAB显色,中性树脂封片。结果判断:阳性细胞为胞浆内棕黄色颗粒,位于细胞浆,背景无颜色。根据海马齿状回内阳性细胞染色颗粒(棕黄色色颗粒)

的浓密程度进行半定量分级:(-)~(+++++)。

1.4 免疫组化

切片及切片之前的步骤同上,免疫组化检测海马的UCP4的蛋白表达。UCP4一抗(羊抗鼠)由天津TBD公司提供;二抗及免疫组化试剂盒由北京中山公司提供。具体步骤参照免疫组化试剂盒说明书,DAB显色,中性树脂封片。阴性对照采用PBS代替UCP4一抗。结果判断:阳性细胞为胞浆内棕黄色颗粒,位于细胞浆,背景无颜色。根据海马齿状回内阳性细胞染色颗粒(棕黄色色颗粒)的浓密程度进行半定量分级:(-)~(+++++)。

1.5 Western blot 分析

分别在最后一次诱导惊厥后24 h将大鼠断头取脑,剥离海马。液氮速冻,-80℃保存。提取蛋白(蛋白提取液:50 mM Tris-HCl,pH 7.5,50 mM MgCl₂,5 mM EGTA,0.25% Triton X-100,和蛋白酶抑制剂;超声匀浆,4℃离心机10 000 r/min,30 min,吸取上清液分装,-80℃保存),比色法(Bradford法)测蛋白含量,电泳(8%的聚丙烯酰胺凝胶,每个加样孔上样量为80 μg),转膜,封闭过夜(4℃),一抗过夜(浓度为1:250,4℃,TTBS 10 min×3次),二抗(浓度1:2000)室温2 h,TTBS洗膜10 min×3次,用ECL发光试剂盒(Santa Cruz公司提供)显示目的蛋白条带,其中UCP4一抗(羊抗鼠)、二抗(兔抗羊)天津TBD公司提供。结果判断:根据X线上目的条带的IDV(integrated density value)/area来判定目的蛋白的含量(Multimage light cabinet, alphascreenTM 2000,计算机图像分析系统)。

1.6 统计学分析

应用SPSS统计软件,等级资料用非参数检验多个独立样本秩和检验(Kruskal-Wallis Test)进行分析;计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行均数比较。

2 结果

2.1 原位杂交

热性惊厥组海马细胞内阳性颗粒的染色程度(++++~+++++),含量均高于对照组(++~+++和高热组(+),而高热组阳性程度又低于对照组。经统计学分析后结果同免疫组化,均 $P < 0.05$ 。见图1。

2.2 免疫组化

热性惊厥组海马细胞内阳性颗粒的染色程度

(+++~++++),含量均高于对照组(++~+++),而高热组(+)而高热组阳性程度又低于对照组,统计学分析均 $P<0.05$ 。见图 1。

图 1 各组 UCP4 原位杂交与免疫组化(DAB 染色,×200)
Figure 1 UCP4 mRNA expression in situ hybridisation and immunohistochemistry (DAB, ×200)
Compared with the Control group, the expressions of UCP4 mRNA and protein in hippocampus increased in the FS group and decreased in the Febrile group

2.3 Western blot 结果

与对照组相比(14830.75 ± 641.91),大鼠脑海马区热性惊厥组 UCP4 的蛋白表达增强($22\ 150.60\pm423.40$),高热组 UCP4 的蛋白表达减弱($10\ 511.63\pm302.07$), ($F_{2,21}=152.15, P<0.05$)。各组均数两两比较,差异有显著性,均 $P<0.05$ 。

3 讨论

解偶联蛋白目前分 5 个亚型:UCP1、UCP2、UCP3、UCP4、UCP5。UCP 各亚型在体内的分布:UCP1 仅在棕色脂肪中表达,UCP3 仅在骨骼肌和心脏中表达,UCP4 脑组织中表达(多数脑组织含有丰富的 UCP4,而脊髓、胼胝体、黑质和含量很低),UCP5 在脑、睾丸和肝等组织中有表达^[4]。而 UCP2 的表达就很广泛,包括骨骼肌、白色脂肪组

织、脑(在脊髓、下丘脑、小脑、脑室系统)中含量丰富,其他脑组织中含量低^[5]。
UCP2 和 UCP4 在脑内的分布各有不同:UCP2 在海马和大脑缺乏,而在脑组织的下丘脑、小脑、脑室系统含量丰富,UCP4 的 mRNA 和蛋白则在海马和大脑皮层的含量较丰富^[6]。既往的文献认为大脑皮层和海马是惊厥的易损伤部位。
在免疫组化、原位杂交和 Western blot 检测中,均发现高热组 UCP4 的表达低于惊厥组和对照组。国外文献报道^[7],寒冷环境中 UCP 明显增多;UCP4 和 UCP5 低温时两者分别升高 1.5 倍和 1.7 倍。高热时,基础代谢率增加,氧耗和能量消耗也增加,本试验发现高热过程海马细胞内 UCP4 表达减少。解偶联过程中释放的热能为基础代谢率提供了 50% 的能量^[2],UCP4 表达减少则热能释放减少,推测高热过程中 UCP4 有使脑内增高的基础代谢率减低的作用,这可能是一种动物自身的保护调节反

应。

惊厥组海马神经元细胞内 UCP4 表达增多提示热性惊厥导致 UCP4 解耦联作用明显增强,进而使线粒体 ATP 的产生减少,这样就影响了线粒体能量储备的功能。另一方面,热性惊厥时解耦联作用增强,细胞产热增多,同时脑内细胞代谢率增强,这与惊厥时神经元异常放电所引起的高代谢率是一致的^[8]。而线粒体能量的损伤和改变时的自由基产物是神经变性病的重要机制^[9]。这可能是线粒体功能损伤的病理生理基础之一。Brand 等^[10]认为氧化磷酸化过程中产生很多的活性氧族(reactive oxygen species, ROS),Layton 等^[11]发现在卡因酸诱导的大鼠惊厥模型中 ROS 产生明显增多,这对细胞有明显的毒性作用。UCP 增高产生的质子漏能明显降低线粒体膜电位,同时防止 ROS 的形成^[12]。故我们认为本实验热性惊厥组中 UCP 明显增多则可以对神经细胞起到保护作用。

在热性惊厥过程中,UCP4 在高热阶段的表达减低有利于保护脑细胞,减少脑内热能的释放;而在惊厥发生时 UCP4 又明显增高以提高细胞代谢率,防止 ROS 的形成,同时 ATP 的产生减少,影响了线粒体能量储备的功能。提示 UCP4 随脑细胞不同情况而发生了功能性的改变,以适应机体的功能变化。

[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] Rolfe DFS, Newman JMB, Buckingham JA, Clark MG, Brand MD. Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR [J]. Am J Physiol, 1999, 276(3): C692—C699.

[3] 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.

[4] Kim-Han JS, Reichert SA, Quick KL, Dugan LL. BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production [J]. J Neurochem, 2001, 79(3): 658—668.

[5] Richard D, Rivest R, Huang Q, Bouillaud F, Sanchis D, Champigny O, et al. Distribution of the uncoupling protein 2 mRNA in the mouse brain [J]. J Comp Neurol, 1998, 397(4): 549—560.

[6] Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, et al. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells [J]. FEBS Letters, 1999, 443(3): 326—330.

[7] Yu XX, Mao W, Zhong A, Schow P, Brush J, Sherwood SW, et al. Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation [J]. FASEB J. 2000, 14(11): 1611—1618.

[8] Ingvar M. Cerebral blood flow and metabolic rate during seizures: relationship to epileptic brain damage [J]. Ann New York Acad Sci, 1986, 462(1): 194—206.

[9] Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? [J]. Ann Neurol, 1992, 31(2): 119—130.

[10] Brand MD. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing [J]. Exp Gerontol, 2000, 35(6—7): 811—820.

[11] Layton ME, Pazdernik TL. Reactive oxidant species in piriform cortex extracellular fluid during seizures induced by systemic kainic acid in rats [J]. Mol Neurosci, 1999, 13(1—2): 63—68.

[12] Kagawa Y, Cha SH, Hasegawa K, Hamamoto T, Endo H. Regulation of energy metabolism in human cells in aging and diabetes; FoF1, mtDNA, UCP, and ROS [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 266(3): 662—676.

(本文编辑:钟乐)