

· 实验研究 ·

严重惊厥发作过程中核因子- κ B 活化与神经元凋亡的关系

刘月影, 袁宝强

(徐州医学院附属医院儿科 江苏 徐州 221002)

[摘要] 目的 探讨戊四氮(PTZ)所致大鼠严重惊厥发作模型中核因子- κ B(NF- κ B)活化与神经细胞凋亡的关系。方法 42只大鼠随机分为7组,即对照组、致惊后3 h、6 h、12 h、24 h、48 h和吡咯啉烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)+PTZ组。免疫组织化学法检测海马CA1区NF- κ B亚基p65核移位;TUNEL和流式细胞仪检测海马细胞凋亡。结果 流式细胞仪和TUNEL法显示惊厥发作后有细胞凋亡的发生,24 h达高峰,与对照组相比分别为 $(12.54 \pm 4.99)\%$ vs $(2.24 \pm 0.57)\%$ 和 (61.62 ± 4.99) 个/gcs vs (3.35 ± 0.89) 个/gcs, P 均 <0.001 ;对照组大鼠海马未见p65核移位细胞,而致惊后p65核移位细胞显著上调,24 h达高峰 (32.30 ± 4.71) 个/gcs。PDTC预处理组与致惊24 h组相比p65核移位及细胞凋亡明显减少。结论 NF- κ B活化在严重惊厥发作所致的细胞凋亡发生中发挥重要作用;PDTC可通过抑制NF- κ B的表达而减少惊厥后的细胞凋亡。[中国当代儿科杂志,2005,7(3):253-256]

[关键词] 惊厥;核因子- κ B p65;凋亡;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)03-0253-04

Relationship between nuclear factor-kappaB activation and neuronal apoptosis in rats with pentylenetetrazol-induced serious seizures

Yue-Ying LIU, Bao-Qiang YUAN. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China (Yuan B-Q, Email: yuanbaoqiang@163.com)

Abstract: Objective The effects of nuclear factor-kappaB (NF- κ B) on neurons in the brain remain controversial. This study examined the relationship between NF- κ B activation and neuronal apoptosis in rats with pentylenetetrazol (PTZ)-induced serious seizures. **Methods** Forty-two rats were randomly assigned into a Seizure group, a pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)-pretreatment seizure group and a Normal control group. The model of serious seizures was induced by an intraperitoneal injection of PTZ (60 mg/kg). Rats in the Seizure group were sacrificed 3, 6, 12, 24, and 48 hrs after seizure induction. The PDTC pretreatment group was administered with PDTC (100 mg/kg) 1 hr before PTZ injection, and sacrificed 24 hrs later. The immunohistochemistry method was used to detect the activity of NF- κ B protein in the CA1 region of the hippocampus. The in situ dUTP end-labeling (TUNEL) technique and flow cytometry (FCM) were used to measure the neuronal apoptosis in the hippocampus. **Results** Significant neuronal apoptosis was observed in the Seizure group and peaked at 24 hrs, with an apoptosis rate of $12.54\% \pm 4.99\%$, compared with $(2.24\% \pm 0.57\%)$ in the Normal control group ($P < 0.001$). The activity of NF- κ B was detected at 6 hrs following seizure induction, and increased to maximal expression at 24 hrs (32.30 ± 4.71 /gcs) in the Seizure group. NF- κ B activation was not found in the Normal control group. The PDTC pretreatment group showed a lower neuronal apoptosis rate and less NF- κ B activity than the Seizure group. **Conclusions** The activation of NF- κ B may play important roles in the process of neuronal apoptosis following serious seizures. PDTC pretreatment could reduce the neuronal apoptosis, perhaps by inhibiting the expression of NF- κ B. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(3): 253-256]

Key words: Seizures; NF-kappa B p65; Apoptosis; Rats

癫痫是小儿神经系统疾病中最常见的一种发作性疾病。大量研究已证实,癫痫引起的神经元死亡包括凋亡和坏死两种形式,由于凋亡是一个可调控的过程,故通过抑制凋亡的发生,可能减少神经细胞的死亡。在中枢神经系统中,核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)作为一种重要的信号转导因子,可

通过其P65/P50异源二聚体的活化形式进入胞核与DNA上相应靶基因位点结合对细胞内外界刺激作出快速反应。早期研究结果显示NF- κ B具有脑保护作用^[1],但近年的研究指出NF- κ B在缺氧缺血性脑病等疾病中也具有促进细胞凋亡的作用^[2,3],但在惊厥发生过程中的作用以及与细胞凋亡的关系

[收稿日期]2004-10-20;[修回日期]2005-01-10

[作者简介]刘月影(1975-),女,硕士,主治医师。主攻方向:小儿神经系统疾病。

[通讯作者]袁宝强,江苏徐州医学院附属医院儿科,邮编221002。

报道较少。本研究运用戊四氮 (pentylenetetrazol, PTZ) 致大鼠惊厥模型探讨严重惊厥发作对脑神经细胞损伤的影响, 同时探讨 NF- κ B 在惊厥发生过程中与细胞凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雄性 SD 大鼠 42 只, 鼠龄约 2.5 月, 由徐州医学院实验动物中心提供。随机分为对照组、致惊后 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 组和治疗组即吡咯啉二硫代氨基酸甲酸盐 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) + PTZ 组, 每组 6 只。

1.2 主要试剂

PTZ (溶于生理盐水配成 10 g/L), 碘化丙啉 (propidium iodide, PI), PDTC (Sigma), NF- κ Bp65 多抗 (SantaCruz)、即用型 SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒 (北京中山)、原位凋亡试剂盒 (北京华美)。其他生化试剂为国产分析纯。

1.3 动物惊厥模型制备

大鼠腹腔注射 PTZ (60 mg/kg), 参照 Ono (0 ~ 6) 评定发作标准^[4]。0 级: 无任何发作; I 级: 点头或湿狗样抖动; II 级: 肌肉颤动; III 级: 前肢局限性阵挛; IV 级: 后肢站立; V 级: 站立并摔倒; VI 级: 全身强直-阵挛性发作。选择出现 V 级以上发作者作为惊厥研究模型。对照组用等容生理盐水代替 PTZ 注射。治疗组先腹腔注射 PDTC (100 mg/kg) 1 h 后再注射 PTZ, 24 h 后断头取脑。

1.4 标本采集

所有实验动物于规定的时间点腹腔注射 0.4% 的戊巴比妥 (40 mg/kg) 麻醉后立即断头, 冰上取脑, 纵向平分, 一半用 10% 多聚甲醛固定 24 h。取含海马结构的两块相邻组织约 3 mm, 制作石蜡标本, 以 5 μ m 厚冠状连续切片, 取相邻的三套切片, 分别行苏木精-伊红染色、免疫组化和原位细胞凋亡的检测。

1.5 免疫组织化学染色

按试剂盒说明书进行, 一抗 NF- κ Bp65 浓度为 1:50, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。以胞核出现棕黄色颗粒为阳性染色。每张切片分别在海马 CA1 区随机观察 3 个不连续的视野 (400 $\times$) 计数, 取其平均值作为该只动物的 NF- κ Bp65 核移位阳性细胞数。

1.6 TUNEL 法检测细胞凋亡

按试剂盒说明书进行, 主要过程包括: (1) H₂O₂

室温孵育; (2) 蛋白酶 K 消化; (3) TdT 反应液 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min; (4) DAB 显色。实验设立不加 TdT 的阴性对照。以胞核出现棕黄色颗粒为阳性细胞。同上计算阳性细胞数。

1.7 流式细胞仪测细胞凋亡

冰上取另一半海马, 匀浆, PBS 漂洗 2 次 (1 200 r/min, 10 min/次), 过滤后制成海马单细胞悬液。乙醇固定 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 漂洗 2 次, 调整细胞数在 1×10^6 /mL, 加入碘化丙啉染液, 4 $^{\circ}$ C 染色 30 min 上机分析。得出凋亡细胞百分率。

1.8 统计学处理

所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 多样本中两组间均数比较用 q 检验。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色

对照组海马锥体细胞排列紧密、细胞呈圆形或椭圆形, 染色质在核内分布均匀, 核仁清晰 (图 1A); 致惊组海马 CA1 区锥体细胞排列逐渐散乱, 继之出现特征性凋亡改变如核固缩浓染、染色质浓集边集、细胞变小、细胞外出现空晕等, 24 h 达高峰 (图 1B); PDTC 治疗组受损神经元数目明显减少, 偶见固缩细胞 (图 1C)。

2.2 免疫组化

在对照组海马 CA1 区中可见少量 NF- κ Bp65 蛋白表达, 主要分布在胞浆, 着色较浅淡 (图 2A)。致惊后 6 h NF- κ Bp65 核移位阳性细胞较正常组有增加趋势; 12 h 明显多于正常组和 3 h 组; 24 h 增加达高峰 (图 2B); 48 h 较 24 h 明显减少。治疗组 NF- κ Bp65 的阳性细胞较致惊 24 h 组明显降低 (图 2C)。各时间点 NF- κ Bp65 核移位阳性细胞数见表 1。

表 1 各实验组海马 CA1 区 NF- κ Bp65 核移位细胞及凋亡细胞计数 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	NF- κ Bp65	TUNEL	FCM
对照	0	3.35 $\pm$ 0.89	2.24 $\pm$ 0.57
致惊后 3 h	0	8.38 $\pm$ 0.71	3.19 $\pm$ 0.94
致惊后 6 h	2.00 $\pm$ 1.15	20.63 $\pm$ 4.71 ^a	4.86 $\pm$ 1.93
致惊后 12 h	14.27 $\pm$ 3.79 ^a	37.87 $\pm$ 6.31 ^b	6.95 $\pm$ 2.11 ^a
致惊后 24 h	32.30 $\pm$ 4.71 ^b	61.62 $\pm$ 4.99 ^b	12.54 $\pm$ 4.99 ^b
致惊后 48 h	19.27 $\pm$ 2.41 ^a	22.17 $\pm$ 3.96 ^a	6.07 $\pm$ 3.63
PDTC + PTZ	10.58 $\pm$ 1.82 ^{ac}	14.52 $\pm$ 3.97 ^{ac}	3.33 $\pm$ 0.78 ^c

与对照组相比 a $P < 0.05$, b $P < 0.01$, c 与致惊 24 h 组比较 $P < 0.05$

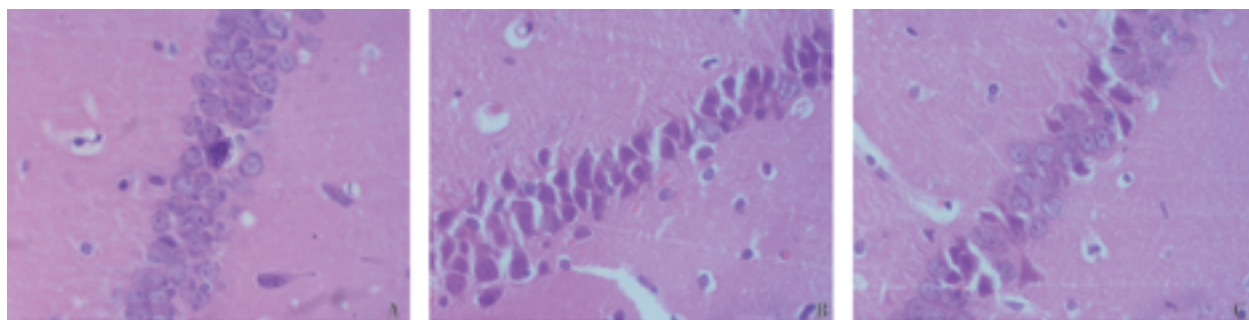


图1 海马 CA1 区细胞形态(苏木精-伊红 $\times 400$) A:对照组;B:致惊后 24 h 组;C:PDTC 治疗组。

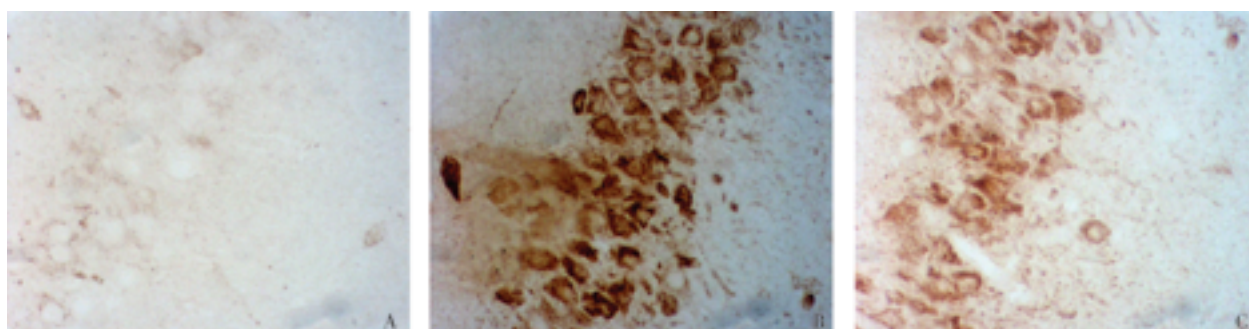


图2 海马 CA1 区 NF- κ Bp65 核移位 (p65 $\times 400$) A:对照组;B:致惊后 24 h 组;C:PDTC 治疗组。

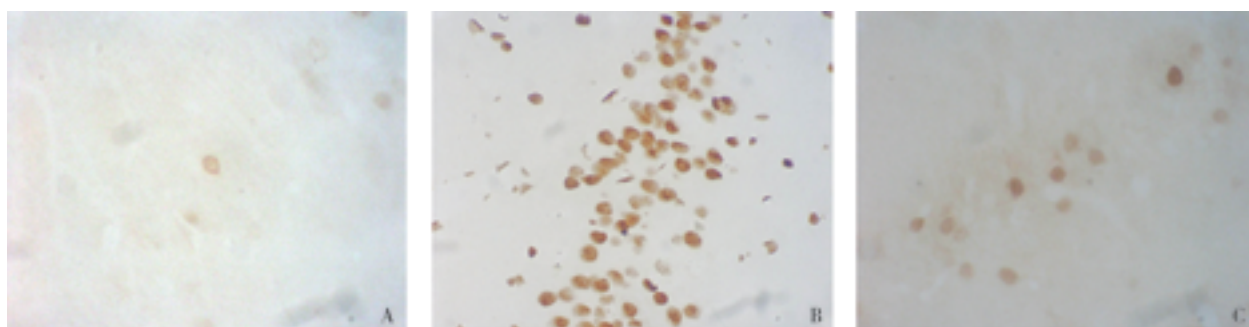


图3 海马 CA1 区细胞凋亡 (TUNEL $\times 400$) A:对照组;B:致惊后 24 h 组;C:PDTC 治疗组。

2.3 TUNEL 检测

对照组及致惊后 3 h 组均少见阳性结果(图 3A)。惊厥发作后 6 h 海马 CA1 区可见少数锥体细胞凋亡,核固缩,被染成棕黄色。12 h 凋亡的锥体细胞数明显增多,至 24 h 达高峰(图 3B),此后开始下降。治疗组与致惊 24 h 组相比凋亡细胞明显减少(图 3C)。各组海马 CA1 区细胞凋亡数据见表 1。

2.4 流式细胞仪检测

惊厥后 24 h 海马含亚 G1 期细胞最高达 14.04% (计数 10 000 个细胞),而对照组及致惊 3 h 组亚 G1 期细胞分别占 1.29% 和 3.04%。惊厥后 24 h 组与对照组凋亡细胞数量比较差异 3.70%。各组海马细胞凋亡数据见表 1。

3 讨论

目前惊厥发生后神经元凋亡的发生机制尚不明确,有研究显示是与凋亡相关的各种蛋白异常表达有关,如热休克蛋白、激活蛋白 1 (activating protein 1, AP-1)、NF- κ B 等,其中 NF- κ B 是目前倍受关注的与细胞凋亡关系密切的蛋白之一。NF- κ B 是一类与转录活性有关的蛋白质家族。其中起主要作用的是 P65/P50 异源二聚体,在胞浆中 P65/P50 因与抑制蛋白 I κ B (inhibitory protein kappaB) 结合而失活。当细胞受到内外刺激时如炎症、电信号等,I κ B 被上游激酶所降解,NF- κ B 被激活并转入核内,与特定的 DNA 序列结合发挥对靶基因调节而起到相应作用。

本研究发现,在严重惊厥发作过程中存在细胞

凋亡。免疫组化显示在惊厥发作过程中 NF- κ B p65 表达显著上调,随着核内 p65 的表达升高,同时可见胞浆内 p65 的免疫反应也明显增强,提示在 NF- κ B 核转移之前激活形的 NF- κ B 首先释放出来,源源不断地等待进入核内。本实验 NF- κ Bp65 表达的结果与 Rong^[5]等红藻氨酸(KA)致大鼠点燃模型的结果相似,但后者 NF- κ B 表达高峰在致惊后 8~16 h,而我们实验结果 NF- κ Bp65 表达高峰在 24 h,可能与致惊剂不同有关。

本实验还发现 PTZ 致惊后大鼠海马 CA1 区 NF- κ Bp65 蛋白表达出现的最早时间和高峰时间细胞凋亡反应的时序相吻合,阳性反应区域相同,说明 NF- κ Bp65 蛋白表达与神经细胞凋亡密切相关。Matsuoka^[6]和 Crespel 等^[7]研究也发现在 KA 致惊厥模型及颞叶癫痫病理检测中,NF- κ B 介导了海马神经元的凋亡。Levites^[8]和 Won 等^[9]通过事先给予绿茶提取物和地塞米松抑制 NF- κ B 表达而显著减少神经细胞凋亡,说明 NF- κ B 介导了惊厥发生后的神经细胞凋亡。PDTC 是一种 NF- κ B 抑制剂,一方面作为一种抗氧化剂,通过降低脂质过氧化物酶活性,减少 I κ B 降解,抑制 NF- κ B 的活化;另一方面 PDTC 是一种金属契合物,能够与巯基结合,影响 NF- κ B 的结合活性,从而降低 NF- κ B 的蛋白表达和活化^[10]。本实验中我们在大鼠惊厥发作前注射 PDTC,大鼠的惊厥发作潜伏期明显延长,同时神经细胞凋亡的数目亦明显减少,说明 NF- κ B 蛋白表达的确诱导了神经细胞的凋亡。目前对于 NF- κ B 过多表达所引起的神经细胞凋亡机制尚不完全清楚,结合其他研究结果推测,PTZ 注射大鼠后,机体受刺激后使胞内酪氨酸蛋白激酶激活,进而使 I κ B 磷酸化而降解,NF- κ B 由非活性状态转变为激活状态,转移入核,这些亚基以二聚体活性形式结合到一些凋亡活跃基因(如 Fas、c-fos、c-myc 等)的调控区,促使其高表达,产生相应蛋白,发挥相应生物学效应,最后导致细胞凋亡的形成。PDTC 可以通过抑制 NF- κ B 蛋白表达和活化而增加海马锥体神经元的存活

率而起到神经保护作用。

综上所述,我们认为严重惊厥发作过程存在神经细胞的凋亡,NF- κ B p65 参与其中,这为临床上早期进行抗癫痫药物治疗提供了实验依据,同时提示某些过氧化物酶抑制剂在癫痫治疗过程中具有辅助作用。

[参 考 文 献]

- [1] Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S. Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity [J]. J Neurochem, 2000, 74(2): 443-456.
- [2] 彭涛,汪薇,余小河,王霞,杨于嘉. 地塞米松预处理对新生大鼠缺氧缺血后脑内 NF- κ B 活性及神经细胞凋亡的影响 [J]. 中国当代儿科杂志,2004,6(4):251-255.
- [3] Del Rio MJ, Velez-Pardo C. Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of hydrogen peroxide (H₂O₂), caspase-3, and nuclear factor kappa-B (NF-kappaB), p53, c-Jun transcription factors [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(4): 677-688.
- [4] Ono J, Vieth RF, Walson PD. Electrocortical observation of seizures induced by pentylentetrazol (PTZ) injection in rats [J]. Funct Neurol, 1990, 5(4): 345-352.
- [5] Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures [J]. J Neurochem, 1996, 67(2): 662-668.
- [6] Matsuoka Y, Kitamura Y, Okazaki M, Terai K, Taniguchi T. Kainic acid-induced activation of nuclear factor-kappaB in rat hippocampus [J]. Exp Brain Res, 1999, 124(2): 215-222.
- [7] Crespel A, Coubes P, Rousset MC, Brana C, Rougier A, Rondouin G, et al. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis [J]. Brain Res, 2002, 952(2): 159-169.
- [8] Levites Y, Youdim MB, Maor G, Mandel S. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(1): 21-29.
- [9] Won SJ, Ko HW, Kim EY, Park EC, Huh K, Jung NP, et al. Nuclear factor kappa B-mediated kainate neurotoxicity in the rat and hamster hippocampus [J]. Neuroscience, 1999, 94(1): 83-91.
- [10] Nurmi A, Lindsberg PJ, Koistinaho M, Zhang W, Juettler E, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia [J]. Stroke, 2004, 35(4): 987-991.

(本文编辑:王霞)