

· 实验研究 ·

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

韩颖¹, 秦炯¹, 卜定方², 杨志仙¹, 常杏芝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 气体信号分子一氧化碳(CO)与 γ -氨基丁酸 B 受体(GABA_BR)亚基均参与了热性惊厥(FS)发病机制。该研究旨在探讨 CO 对 FS 大鼠 GABA_BR 亚基表达的影响。方法 32 只大鼠随机分为对照组(37.0℃水浴), FS 组(45.2℃水浴), FS + 锌原卟啉 IX 组(45.2℃水浴), FS + 血晶素组(45.2℃水浴), 每组 8 只。采用热水浴诱导大鼠 FS, 隔日诱导 1 次, 共 10 次。采用双波长分光光度计测定大鼠血浆中 CO 含量; 用原位杂交观察 GABA_BR 亚基 mRNA 和 c-fos 基因表达情况; 用免疫组化方法观察 GABA_BR 亚基和 Fos 蛋白表达情况。结果 FS + 血晶素组 CO 含量较 FS 组升高, GABA_BR1 和 GABA_BR2 表达也高于 FS 组。FS + 锌原卟啉 IX 组 CO 含量较 FS 组降低, 其 GABA_BR2 表达亦低于 FS 组, 而 GABA_BR1 表达与 FS 组相比差异无显著性。血晶素的干预使 c-fos 基因和 Fos 蛋白表达降低, 而锌原卟啉 IX 的干预使其表达增强。结论 CO 可通过调节 GABA_BR 的功能在反复热性惊厥中发挥作用。

[中国当代儿科杂志, 2005, 7(6): 513-516]

[关键词] 惊厥, 发热性; 一氧化碳; 血红素氧合酶; γ -氨基丁酸; 受体; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)06-0513-04

Influence of heme oxygenase/carbon monoxide system on γ -aminobutyric acid B receptor subunits in hippocampus of rats with febrile seizures

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

Abstract: Objective Some studies have found that both heme oxygenase (HO)/carbon monoxide (CO) system and γ -aminobutyric acid B receptor subunits are involved in the pathogenesis of febrile seizure (FS). The aim of the study was to explore the effect of HO/CO system on GABA_BR subunits during FS. **Methods** Thirty-two Sprague-Dawley rats aged 21 days were randomly assigned into four groups: Control (37.0℃ water), FS, FS + hemin and FS + ZnPPIX groups ($n = 8$ each). FS was induced in the last three groups by exposure to a hot water bath (45.0℃ water). Hemin (50 mg/kg) and ZnPPIX (45 μ mol/kg) were intraperitoneally injected half an hour after the water bath in the FS + hemin and FS + ZnPPIX groups respectively. The Control and FS groups were administered with normal saline instead. The plasma level of CO was detected by the dual wavelength spectrophotometer. The expressions of GABA_BR subunit mRNA and c-fos gene were examined by *in situ* hybridization. The expressions of GABA_BR subunit and Fos protein were observed by immunohistochemistry. **Results** The CO content in the FS group was significantly higher than that of the Control group. Hemin treatment increased the CO content while ZnPPIX treatment decreased the CO content. The expressions of GABA_BR₂ and GABA_BR₁ increased in the FS + hemin group compared with those in the FS group. In the FS + ZnPPIX group, the expression of GABA_BR₂ decreased while the GABA_BR₁ expression was not different compared with that in the FS group. Hemin treatment decreased the expression of c-fos gene and Fos protein, while ZnPPIX treatment elevated their expression. **Conclusion** CO may play a role in the pathogenesis of FS through regulating GABA_BR function.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(6): 513-516]

Key words: Seizure, febrile; Carbon monoxide; Heme oxygenase; γ -aminobutyric acid; Receptor; Rats

热性惊厥(febrile seizure, FS)是小儿时期最常见的惊厥性疾病之一。大多数热性惊厥患儿预后良

好,但反复发作的热性惊厥可造成脑损伤^[1,2]。不成熟的 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)体

[收稿日期] 2005-07-11; [修回日期] 2005-08-24

[基金项目] 卫生部临床学科重点项目基金(编号:20010912)

[作者简介] 韩颖(1972-),女,在读博士,住院医师。主攻方向:惊厥性脑损伤。

[通讯作者] 秦炯,北京大学第一医院儿科,北京西城区西安门大街1号,邮编:100034

系是导致热性惊厥发生、发展的重要原因^[3]。GABA主要通过离子型受体GABA_AR、GABA_CR及代谢型受体GABA_BR来发挥作用。GABA_BR(γ-氨基丁酸B受体)由具有G蛋白双受体功能的两部分组成,通过增加神经元的钾离子传导及减少钙离子内流在维持中枢神经系统兴奋/抑制平衡中发挥着重要作用^[4,5]。一氧化碳(carbon monoxide, CO)是继一氧化氮(nitric oxide, NO)之后被发现的另一种新型气体信号分子,在神经系统多种生理和病理生理过程中发挥着重要的作用^[6]。CO生成的一条重要途径是血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)降解血红素而产生的。

我们前期研究表明,CO/血红素氧合酶-1体系与GABA_BR均参与了反复热性惊厥过程^[7,8],CO/血红素氧合酶-1体系在反复热性惊厥过程中发挥了重要的保护作用^[7]。然而CO/血红素氧合酶-1体系在反复热性惊厥过程中发挥作用的机制尚不清楚。因此,我们利用热性惊厥动物模型,通过给大鼠注射血晶素外源性升高CO含量或锌原卟啉降低CO含量,探讨CO/血红素氧合酶-1体系在热性惊厥脑损伤发病机制中可能的作用环节及机制。

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)32只,日龄21d,体重50~80g,随机分为对照组(37.0℃水浴),FS组(45.2℃水浴),FS+锌原卟啉IX组(45.2℃水浴),FS+血晶素组(45.2℃水浴),每组8只。采用热水浴诱导大鼠FS,每次诱导时间不超过5min,隔日诱导1次,共诱导10次。每次水浴处理后0.5h,FS+锌原卟啉IX组大鼠腹腔注射锌原卟啉IX(45 μmol/kg),FS+血晶素组大鼠腹腔注射血晶素(50 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2h处死。用10%水合氯醛麻醉,经下腔静脉留取大鼠肝肝素化抗凝血3mL左右,离心后取血浆,置-70℃冰箱保存以备检测CO含量。打开胸腔,左心室快速灌注生理盐水10~30mL,4%多聚甲醛磷酸缓冲液内固定,断头取脑,置上述缓冲液中后固定18~20h。液氮速冻脑标本,冰冻冠状切片,切片厚度10 μm,用于免疫组化和原位杂交。

1.3 血浆CO含量的间接测定

根据碳氧血红蛋白(HbCO)和氧合血红蛋白(HbO₂)吸收光谱的差异,选择HbCO吸光度之差最大而HbO₂吸光度之差为零的两个波长(564nm和582nm),应用双波长分光光度计法测定血浆在这两个波长下的吸光度之差(ΔA),而后将ΔA代入由标准曲线得出的公式中,求出HbCO的百分比。标准曲线是将100% HbCO和100% HbO₂按不同比例配制,在564nm和582nm下求得的HbCO%与ΔA的相关曲线^[7]。参考Chalmers公式计算CO含量^[9]:

$$\text{血浆CO}(\mu\text{mol/L}) = \text{HbCO}(\%) \times \text{Hb}(\text{mg/L}) \times 4000 / (64456 \times 100 \times X)$$

式中X为所测血浆的容积(mL),64456为Hb分子量。

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。操作流程参照试剂盒说明书。DAB显色,中性树脂封片。阴性对照采用正向RNA探针代替RNA探针。结果判断:棕黄色为阳性反应颜色,显微镜下观察比较海马区阳性反应的着色程度。在40×显微镜下采用双盲半定量评估:每实验组中每个标本随机切取6张切片,每张切片在40×显微镜下随机选取6个视野,按每个视野阳性细胞数百分比进行计算,每组鼠中所有切片所有视野的百分比的平均值计为该组的阳性表达值。每组鼠阳性细胞数评估标准为:0,(-);~25,(+);~50,(++);~75,(+++);~100,(++++).

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。GABA_BR₁一抗(豚鼠抗大鼠)为Oncogene生物公司产品,GABA_BR₂一抗(兔抗大鼠)为Santa Cruz生物公司产品,Fos一抗(兔抗大鼠)为Santa Cruz生物公司产品;山羊抗豚鼠二抗为Santa Cruz生物公司产品,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

用SPSS10.0进行数据处理,计量资料以均数 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠血浆CO含量的变化

FS组大鼠血浆CO含量较对照组增高 $4.66 \pm$

0.28 $\mu\text{mol/L}$ vs $2.59 \pm 0.51 \mu\text{mol/L}$, FS + 锌原卟啉IX组 CO 含量 $2.92 \pm 0.43 \mu\text{mol/L}$ 较 FS 组降低, FS + 血晶素组 CO 含量 $6.15 \pm 0.19 \mu\text{mol/L}$ 较 FS 组升高, 差异均有显著性 ($F = 50.31, P < 0.05$)。

2.2 各组 GABA_BR 亚基的改变

对照组 GABA_BR₁ 与 GABA_BR₂ 散在分布于内侧松果体、海马 CA1-CA3 区的锥体细胞、齿状回的颗粒层和大脑皮层, 染色为深棕色, 强度为 (+++)。FS 组大鼠海马齿状回、CA1-CA3 区 GABA_BR₁ 和 GABA_BR₂ 表达低于对照组。GABA_BR₁ 在齿状回下降更明显, 染色为浅黄色, 强度为 (+ ~ ++), 而 GABA_BR₂ 在 CA3 区下降更明显。FS + 血晶素组 GABA_BR₁ 和 GABA_BR₂ 表达均高于 FS 组, 强度为 (+++ ~ ++++); FS + 锌原卟啉IX组 GABA_BR₂ 表达低于 FS 组, 而 GABA_BR₁ 表达与 FS 组相比无明显改变 (见图 1)。

2.3 c-fos 基因与 Fos 蛋白表达的改变

FS 组 c-fos 基因与 Fos 蛋白表达均高于对照组, FS + 血晶素组 c-fos 基因与 Fos 蛋白表达均低于 FS 组, 而 FS + 锌原卟啉IX组 c-fos 基因与 Fos 蛋白表达均高于 FS 组 (见图 2)。

3 讨论

本研究表明, 应用血晶素外源性增加 CO 含量, 可使 c-fos 基因与 Fos 蛋白表达降低; 而应用血红素氧合酶-1 抑制剂锌原卟啉IX则增强了 c-fos 基因与 Fos 蛋白表达。c-fos 是即刻早期基因 (immediate

early genes, IEGs) 家族的主要成员, 被认为是惊厥发作后神经细胞的兴奋损伤性标志, 其表达程度和惊厥所致的神经突触的兴奋程度有关^[10], 从而表明外源性增加 CO 含量可降低惊厥所致的神经突触的兴奋性。CO 调节神经突触兴奋性的作用环节尚不清楚。Shinomura 等^[11]的研究表明, CO 对突触的谷氨酸释放起着重要的调节作用。CO 可能通过抑制谷氨酸受体的功能而降低惊厥所致的神经突触的兴奋性。然而, 由于谷氨酸受体在惊厥性脑损伤中的作用目前尚无定论, 不能仅仅依靠 CO 对谷氨酸受体的作用来解释其在热性惊厥过程中的作用机制。

为了考察 CO 对抑制性神经递质 GABA 代谢性受体 GABA_BR 的作用, 我们采用了给大鼠注射血晶素, 观察外源性升高 CO 含量后对 GABA_BR 的影响。结果发现, 血晶素可增强 GABA_BR₁ 和 GABA_BR₂ 的表达。血晶素对 GABA_BR 表达的增强作用表明, CO 可能是通过增强 GABA_BR 的功能而降低惊厥所致的神经突触的兴奋性。CO 调节 GABA_BR 的机制尚不清楚。既往研究表明^[12], CO 主要通过增加钾离子外流发挥作用。推测 CO 可能通过对钾离子的调节作用而完成对 GABA_BR 的调节。

血红素氧合酶-1 介导的血红素代谢是内源性 CO 的主要来源。为了进一步验证 CO 对 GABA_BR 的作用, 我们应用血红素氧合酶-1 的抑制剂锌原卟啉IX对 FS 大鼠进行干预。结果显示, 干预组大鼠血浆 CO 水平明显下降。同时, 大鼠海马 GABA_BR₂ mRNA 和蛋白表达较 FS 组明显降低, 而 GABA_BR₁ mRNA 和蛋白表达较 FS 组无明显改变。传统的观

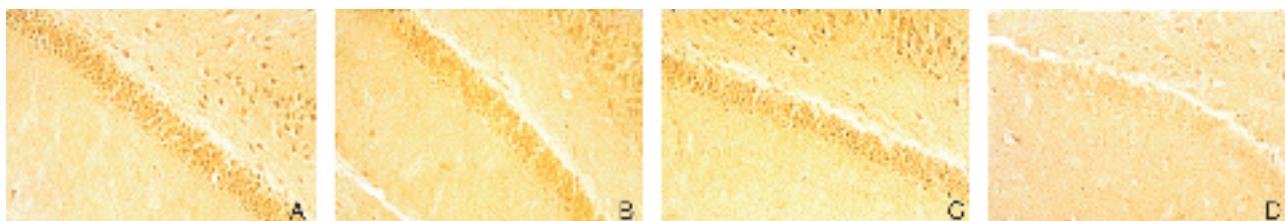


图 1 各组海马齿状回颗粒细胞 GABA_BR₂ 的表达 (免疫组化, $\times 250$)。A: 对照组表达丰富; B: FS 组表达减弱; C: FS + 血晶素组表达较 FS 组增强; D: FS + 锌原卟啉IX组表达较 FS 组减弱。

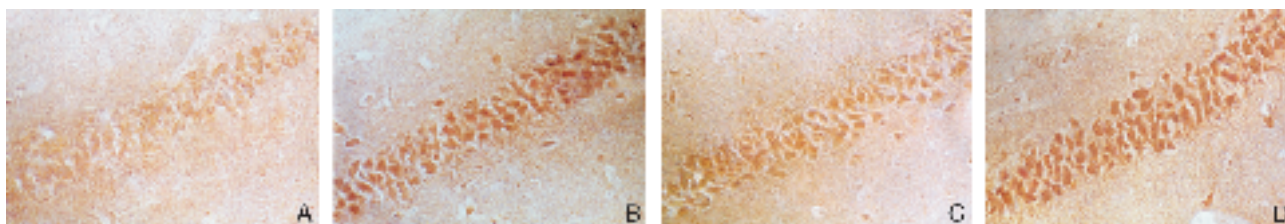


图 2 各组海马 CA3 区锥体细胞 c-fos 的表达 (原位杂交, $\times 400$)。A: 对照组表达较弱; B: FS 组表达增强; C: FS + 血晶素组表达较 FS 组减弱; D: FS + 锌原卟啉IX组表达较 FS 组增强。

念认为,功能性的 GABA_BR 由 GABA_BR₁ 和 GABA_BR₂ 两个亚单位组成,GABA_BR 功能的发挥需要两个亚单位同时参与^[13~15]。GABA_BR₁ 提供化学结合区域,GABA_BR₂ 则作为第二信使参与这一过程。在缺乏 GABA_BR₂ 的情况下,GABA_BR₁ 不能被有效的运送到细胞表面,也不能与 G 蛋白发生偶联。而在本次研究中,二者的改变不同,提示降低内源性 CO 含量,可抑制 GABA_BR₂ 的表达增加神经突触的兴奋性。

[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] 李朝阳,秦炯,韩颖,常杏芝,杨艳玲. 大鼠海马线粒体解偶联蛋白4 在热性惊厥后的表达[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6 (4): 261 - 264.
- [3] Fukuda M, Morimoto T, Nagao H, Kida K. The effect of GABAergic system activity on hyperthermia-induced seizures in rats [J]. Brain Res Dev Brain Res, 1997, 104 (1-2): 197-199.
- [4] Takahashi T, Kajikawa Y, Tsujimoto T. G-Protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by GABAB receptor [J]. J Neurosci, 1998, 18 (9): 3138-3146.
- [5] Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W. A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system [J]. Prog Neurobiol, 1995, 46 (4): 423-462.
- [6] 张姝娟,史源. 一氧化碳在新生儿缺氧缺血性脑病中的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4 (5): 367-369.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Chalmers AH. Simple, sensitive measurement of carbon monoxide in plasma [J]. Clin Chem, 1991, 37 (8): 1442-1445.
- [10] 任广立,王玲,王宝西,汪洋,刘莹,王茂贵,等. 新生鼠缺氧缺血再灌注后海马 p-CREB c-fos 表达的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(1): 12-16.
- [11] Shinomura T, Nakao SI, Mori K. Reduction of depolarization-induced glutamate released by heme oxygenase inhibitor: possible role of carbon monoxide in synaptic transmission [J]. Neurosci Lett, 1994, 166 (2): 131-134.
- [12] Wang R, Wang Z, Wu L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms [J]. Br J Pharmacol, 1997, 121 (5): 927-934.
- [13] Sands SA, Purisai MG, Chronwall BM, Enna SJ. Ontogeny of GABA B receptor subunit expression and function in the rat spinal cord [J]. Brain Res, 2003, 972 (1-2): 197-206.
- [14] Zhang R, Ashton J, Horii A, Darlington CL, Smith PF. Immunocytochemical and stereological analysis of GABA(B) receptor subunit expression in the rat vestibular nucleus following unilateral vestibular deafferentation [J]. Brain Res, 2005, 1037 (1-2): 107-113.
- [15] Correa SA, Munton R, Nishimune A, Fitzjohn S, Henley JM. Development of GABAB subunits and functional GABAB receptors in rat cultured hippocampal neurons [J]. Neuropharmacology, 2004, 47(4): 475-484.

(本文编辑:钟乐)