

· 实验研究 ·

甘珀酸对戊四氮点燃癫痫大鼠海马 Fos NMDAR2 GFAP 表达的影响

兰莉¹, 王宝西¹, 赵新¹, 段丽², 曹荣², 刘煜¹, 饶志仁²

(1. 第四军医大学唐都医院; 2. 第四军医大学神经科学研究所, 陕西 西安 710038)

[摘要] 目的 缝隙连接(GJ)是细胞间直接通道,对同步化放电有重要作用。该研究旨在探讨 GJ 阻断剂甘珀酸(CBX)对戊四氮(PTZ)点燃大鼠癫痫样活动的影响。**方法** 30只SD雄性大鼠随机分为3组:对照组(NS组),点燃组(K组),干预组(CBX组),每组10只大鼠。NS组每日腹腔注射生理盐水;K组和CBX组大鼠每日腹腔注射PTZ(35 mg/kg)至点燃,再分别腹腔注射生理盐水、CBX(10 mg/kg)干预3 d。观察3组大鼠惊厥行为的变化,以及免疫组化染色方法观察 Fos、NMDAR2、GFAP 在海马内的表达变化。**结果** ①PTZ 点燃癫痫大鼠出现自发性抽搐,自发性抽搐次数 K 组 > CBX 组 > NS 组 ($P < 0.05$)。②点燃癫痫大鼠海马 Fos-Li 神经元、NMDAR2-Li 神经元增多,GFAP-Li 星形胶质细胞增多,胞体肥大,突起丰富。CBX 干预后,Fos-Li、NMDAR2-Li 神经元减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),GFAP-Li 星形胶质细胞无明显改变 ($P > 0.05$)。**结论** CBX 抑制自发性抽搐和神经元活动,CBX 有潜在的抗惊厥或协助抗惊厥的作用。
[中国当代儿科杂志,2007,9(5):465-468]

[关键词] 癫痫;星形胶质细胞;神经元;甘珀酸;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)05-0465-04

Effect of carbenoxolone on expression of Fos, NMDAR2 and GFAP in the hippocampus of pentylenetetrazo-kindled epileptic rats

LAN Li, WANG Bao-Xi, ZHAO Xin, DUAN Li, CAO Rong, LIU Yu, RAO Zhi-Ren. Department of Pediatrics, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China (Rao Z-R, Email: zrrao@fmmu.edu.cn)

Abstract: Objective Gap junctions, the clusters of intercellular channels, play an important role in synchronizing electrical activity. This study investigated the effect of gap junction blocker carbenoxolone (CBX) on epileptic activity in pentylenetetrazo (PTZ)-kindled rats. **Methods** Thirty adult male SD rats were randomly divided into three groups: control, PTZ-kindled and CBX-treated groups ($n = 10$ each). The rats from the PTZ-kindled and the CBX-treated groups were intraperitoneally injected with PTZ (35 mg/kg · d) to induce epilepsy. After epilepsy kindling, they were intraperitoneally injected for 3 days with CBX (10 mg/kg) (CBX-treated group) or with normal saline (PTZ-kindled group). The control group received intraperitoneal injections of normal saline. Anti-GFAP, anti-Fos, and anti-NMDAR2 immunohistochemical ABC methods were used to detect the expression of GFAP-Li, Fos-Li and NMDAR2-Li in the hippocampus respectively. **Results** Spontaneous seizures occurred in PTZ-kindled epileptic rats. CBX administration reduced spontaneous seizures. The NMDAR2-Li and Fos-Li neurons as well as GFAP-Li astrocytes in hippocampi increased in PTZ-kindled epileptic rats compared with controls. The numbers of Fos-Li (93.75 ± 7.94 vs 165.25 ± 15.87 , $P < 0.05$) and NMDAR2-Li neurons (61.47 ± 3.62 vs 148.72 ± 14.53 , $P < 0.01$) in the CBX-treated group were significantly less than in the PTZ-kindled group. There were no significant differences in the GFAP-Li expression between the CBX-treated and the PTZ-kindled groups. **Conclusions** CBX may inhibit spontaneous seizures and decrease the numbers of Fos-Li and NMDAR2-Li neurons, thus providing anti-epileptic effects.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(5):465-468]

Key words: Epilepsy; Astrocyte; Neuron; Carbenoxolone; Rats

癫痫是一种常见的神经系统疾病,以脑神经元发作性异常放电导致临床反复发作为特征的脑功能障碍综合征。目前约有三分之一的癫痫现有治疗手段难以奏效,亟待寻找新的药物或方法。甘珀酸

(CBX)又名生胃酮,最初是用来治疗消化道溃疡病,具有较好的血脑屏障通透性^[1]。后来发现是一种缝隙连接(GJ)阻断剂。本实验通过观察CBX对戊四氮(PTZ)点燃癫痫大鼠行为、海马神经元、星形

[收稿日期]2007-01-31; [修回日期]2007-04-15

[基金项目]军队“十五”重点课题(01Z082)。

[作者简介]兰莉,女,博士,主治医师。主攻方向:小儿发育与神经系统疾病。

[通讯作者]饶志仁,男,教授,博士生导师,第四军医大学神经科学研究所,邮编:710032。

胶质细胞的影响,探讨 CBX 的抗癫痫作用。

1 材料与方法

1.1 模型制作和分组

选用健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只(由第四军医大学实验动物研究中心提供),体重 170~200 g,置于温暖(20℃)、安静、避强光的环境中饲养 48 h,自由活动,随机分组。① PTZ 点燃组(kindled, K 组, $n = 10$),动物腹腔注射 PTZ 每日 35 mg/kg 直至点燃,平均点燃时间 19 d。点燃后生理盐水腹腔注射 3 d。② 点燃后阻断(CBX 组, $n = 10$)组,先行 PTZ 注射,完全点燃后,改用腹腔注射 CBX 每日 10 mg/kg,连续 3 d;③ 生理盐水对照组(NS 组, $n = 10$),腹腔注射生理盐水,22 d 处死。

1.2 行为学观察

每日 9:00~10:00 观察大鼠腹腔注射后行为,参考 Racine 标准,评定癫痫发作级别。点燃后,于温暖、安静、避强光的环境中观察 1 h,记录自发性抽搐的次数。

动物癫痫发作分级标准:0 级:无反应;I 级:面部抽搐、点头、奔跑;II 级:阵挛;III 级:肌阵挛,有后退动作;IV 级:全身阵挛、肌阵挛发作,伴直立位或摔倒;V 级:全身强直阵挛发作,失去体位控制。凡连续出现 3 次 IV 级以上发作,为完全点燃。

1.3 免疫组织化学染色

1.3.1 材料制备 以戊巴比妥钠(80 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,迅速开胸经左心室至升主动脉插管,先以 100 mL 生理盐水洗去血液,随后用冷的(4℃)含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PB, pH 7.4)先快后慢灌流固定 2 h,取脑置于 20% 蔗糖中(4℃)直至沉底。自海马平面于冰冻切片机连续冠状切片(厚 30 μm),隔 4 取 1,置于 0.01 mol PBS 中存放。

1.3.2 免疫组织化学染色 切片在 0.01 mol/L PBS 中漂洗后,入含 0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 中浸泡 30 min(室温)。切片分别入:①兔抗 Fos(1:3 000, Santa Cruz)、小鼠抗 GFAP 的抗体稀释液(1:3 000, Sigma)、兔抗 NMDAR2(1:500, Chemicon),孵育 24 h(室温);②生物素标记羊抗兔 IgG(1:500, Sigma)或抗小鼠 IgG(1:500, Sigma)放置 2~4 h(室温);③生物素-卵白素-HRP 复合物(ABC, 1:500, Sigma)浸泡 2~4 h(室温)。然后用葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍铵法呈色。染色的切片经漂洗后裱片、晾干、脱水、透明,封固后在光

镜下(BX-60, Olympus, Japan)采集图像。

1.3.3 数据处理和统计分析 应用 Leica 公司的 Quantimet570c 图像分析仪采集图像、数字化分析。每只大鼠选取海马水平最大平面 5 张切片,在 10(目镜)×20(物镜)倍率下得到图像。Fos-Li 神经元胞核计数;GFAP、NMDAR2 免疫产物表达强度以光密度值(Optical Density, OD 值)表示,OD 值与阳性产物的含量成正比。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0 统计软件作统计处理,各组之间采用单因素方差法统计分析。

2 结果

2.1 行为学观察

NS 组大鼠安静、温顺。点燃后 K 组大鼠,出现自发性点头、面部抽搐、阵挛、肌阵挛 III 级和 III 级以下发作,易激惹、相互厮打。CBX 组大鼠也有自发性点头、面部抽搐,阵挛少见,未见肌阵挛,即 III 级以下发作,喜卧,活动减少。自发性抽搐次数 K 组 > CBX 组 > NS 组。(图 1)。

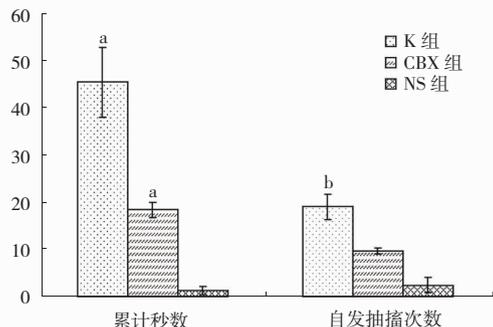


图 1 三组大鼠累计抽搐秒数、自发抽搐次数比较。(a:与 NS 组相比, $P < 0.01$; b: K 组与 CBX 组比较, $P < 0.05$)

2.2 免疫组化结果

2.2.1 Fos-Li 神经元的表达 NS 组海马的 Fos-Li 神经元零星出现,染色浅。PTZ 点燃后各组海马 Fos-Li 神经元增多,胞核为圆形或椭圆形,深黑色,胞浆不着色。多分布于 CA1, CA2, CA3, 齿状回略少。CBX 组 Fos-Li 神经元比 K 组明显减少(图 2,4)。

2.2.2 NMDAR2-Li 神经元的表达 NMDAR2 出现在神经元的胞浆、胞膜上,胞核不着色。NS 组 NMDAR2-Li 神经元 OD 值 91.45。K 组大鼠 NMDAR2 的表达明显增高,其 OD 值为 148.72。CBX 显著减少了 NMDAR2 的表达。CBX 组 OD 值为 61.47,与 K 组比较, $P < 0.01$;与 NS 组比较, $P < 0.05$ (图 3,5)。

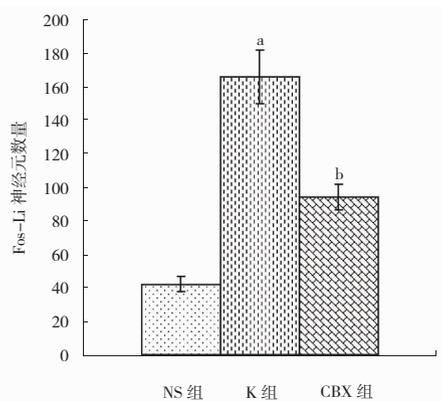


图2 三组大鼠海马 Fos-Li 神经元的数量比较。CBX 明显减少了 Fos-Li 神经元的表达(a:与 NS 组相比, $P < 0.01$; b:与 K 组比较, $P < 0.05$)。

2.3 星形胶质细胞的改变

NS 组海马 GFAP-Li 星形胶质细胞数量少, 表现为“静止型”: GFAP 淡染, 胞浆着色, 胞体小, 突起纤细, 其 OD 值 69.36。点燃大鼠海马 GFAP-Li 星形胶质细胞数量明显增多, 表现为“反应型”, 其特点是 GFAP 深染, 胞体肥大, 突起丰富, 并且增粗、增长,

呈“树根样”伸展。K 组、CBX 组的 OD 值均显著升高, 分别为 130.9, 132.83, 与 NS 组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。相对于 K 组, CBX 组的 GFAP-Li 星形胶质细胞无减少, 两组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。(图 3, 6)。

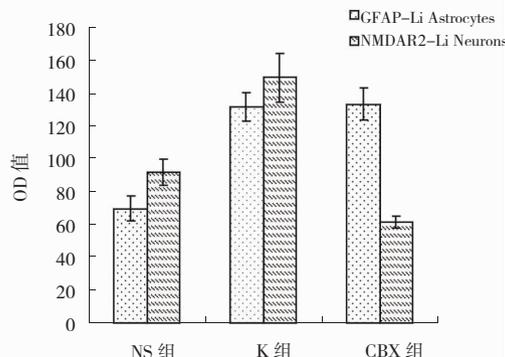


图3 三组大鼠海马 NMDAR2-Li 神经元、GFAP-Li 星形胶质细胞 OD 值比较。CBX 明显减少了 NMDAR2-Li 神经元(与 NS 组相比, $P < 0.05$; 与 K 组比较, $P < 0.01$)。CBX 对点燃后大鼠 GFAP 的表达无显著影响(与 NS 组相比, $P < 0.01$; K 组与 CBX 组比较, $P > 0.05$)。

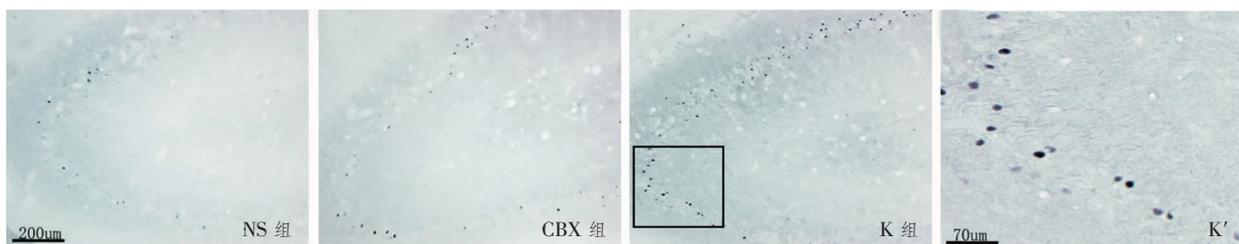


图4 三组大鼠海马 Fos-Li 神经元表达的差异。(K'为 K 的局部放大) Fos-Li 神经元于 NS 组零星出现, 在 CBX 组细小, K 组明显增多; CBX 与 K 组比较, Fos-Li 神经元表达减少。

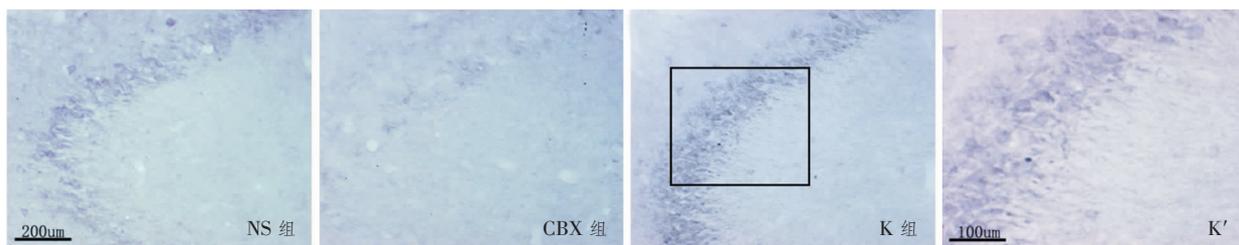


图5 三组大鼠海马 NMDAR2-Li 神经元表达的差异。(K'为 K 的局部放大) 相应于 NS 组, CBX 组 NMDAR2-Li 神经元表达的明显减少, K 组 NMDAR2-Li 神经元表达明显增多。

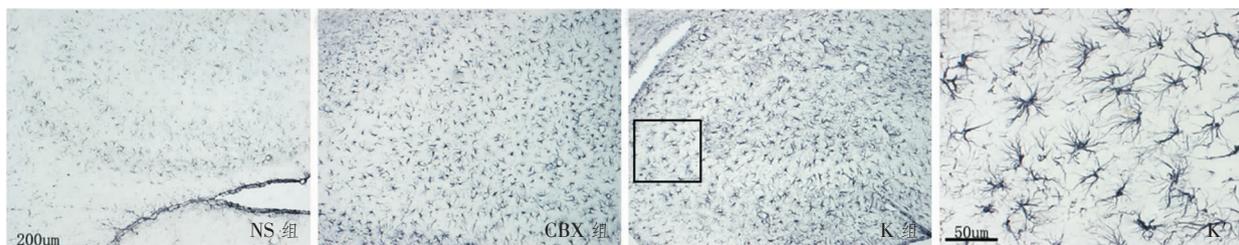


图6 三组大鼠海马 GFAP 表达的差异。(K'为 K 的局部放大) 与 NS 组比较, CBX 组、K 组 GFAP 表达明显增多。CBX 组与 K 组之间差异无显著性。

3 讨论

缝隙连接(GJ)是由相邻细胞的膜通道,允许小分子物质如离子、第二信使(Ca^{2+} 、IP₃、CAMP、ATP)等通过,实现偶联细胞间信息交流^[2]。CBX与缝隙连接结合,使之构象发生改变,可减少电偶联,导致通道关闭,具有很强的阻滞作用,并不影响神经元的固有特性^[3,4]。

c-fos是神经功能活动的常用指标。c-fos mRNA和Fos蛋白的表达程度和癫痫所致的神经活跃程度有关^[5]。本实验中点燃大鼠海马Fos-Li、NMDAR2-Li神经元增多,提示PTZ点燃癫痫大鼠海马一定数量神经元功能活跃,存在自发性痫性放电。而CBX应用后,自发性抽搐减少,Fos-Li神经元和NMDAR2-Li神经元明显下调,显示缝隙连接参与癫痫活动。GJ为神经元群提供低电阻导电途径,介导了N的同步化放电或迅速的信号传递,是重要的同步化机制。CBX可抑制大鼠海马神经元缝隙连接蛋白32的表达^[6];减低CA1区高频棘波自发性发放;延长大鼠痫性发作潜伏期;抑制癫痫大鼠棘慢波发放的数量和持续时间;腹腔注射CBX产生剂量依赖的抗癫痫保护作用^[7~10]。缝隙连接阻断剂CBX影响癫痫动物的神经元活动,可能具有潜在的抗惊厥作用。

胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)是星形胶质细胞的特征性标记物,阳性表达反映星形胶质细胞功能活动增强。中枢神经系统内80%星形胶质细胞通过GJ形成功能合胞体。功能偶联的星形胶质细胞网络对细胞外环境的改变及神经元活动产生反应^[11]。癫痫活动时,反应性星形胶质细胞增生,突起增多、增长,细胞网架重建,对增强的神经元活动产生更大的反应:最初的反应是增强摄取谷氨酸(Glu)的能力,驱除细胞外过多的Glu,这将导致星形胶质细胞内Glu集聚、过载;随后胶质细胞增生。本实验点燃后再应用CBX,GFAP的表达未受影响与此一致。癫痫病灶内星形胶质细胞若不能有效改善Glu过载,引起细胞溶解,Glu返回细胞外,产生神经元的兴奋性细胞毒性;另外,癫痫灶中细胞外 Ca^{2+} 流入神经元和星形胶质细胞内^[12]引起细胞内 Ca^{2+} 增高,增加神经元的兴奋性毒性;星形胶质细胞 Ca^{2+} 依赖性释放谷氨酸,可引起兴奋性调节^[13]。

朱长庚等^[14]发现癫痫患者海马内增生的胶质细胞呈谷氨酸酶免疫反应阳性,认为星形胶质细胞通过某种形式释放的Glu,可使神经元的兴奋性增高而导致癫痫的再发。谷氨酸是神经元-星形胶质

细胞双向交流的一个关键递质。星形胶质细胞可通过 Ca^{2+} 依赖的形式、缝隙连接蛋白43半通道、胞吐等方式释放谷氨酸,调节突触传递^[13]。癫痫中星形胶质细胞激活、增生,合胞体功能增强,以及借助半通道释放谷氨酸,通过NMDA受体促进神经元的活动等,参与癫痫活动。

CBX作为非选择性缝隙连接阻断剂,CBX减少了大鼠的自发性抽搐,下调了Fos-Li、NMDAR2-Li神经元,影响了大鼠的癫痫活动,可能是潜在的抗癫痫药物。

[参 考 文 献]

- [1] Traub RD, Whittington MA, Buhl EH, LeBeau FE, Bibbig A, Boyd S, et al. A possible role for gap junction in generation of very fast EEG oscillations preceding the onset of and perhaps initiating seizures[J]. *Epilepsia*, 2001, 42(2):153-170.
- [2] Nemani VM, Binder DK. Emerging role of gap junctions in epilepsy[J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20(1):253-259.
- [3] Carlen PL, Skinner F, Zhang L, Naus CC, Kushnir M, Perez Velazquez JL. The role of gap junctions in seizures[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000, 32(1):235-241.
- [4] Gigout S, Louvel J, Kawasaki H, Antuono MD, Armand V, Kurcewicz I, et al. Effects of gap junction blockers on human neocortical synchronization[J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 22(3): 496-508.
- [5] Morgan JI, Curran T. Proto-oncogene transcription factors and epilepsy[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1991, 12(9): 343-349.
- [6] 赵秀鹤,迟兆富,迟令懿,尚伟,刘学伍. 缝隙连接蛋白Cx32和Cx43在大鼠癫痫放电后神经元的表达及生胃酮的干预作用[J]. *中华神经科杂志*, 2006, 39(4): 238-241.
- [7] Samoilova M, Li J, Pelletier MR, Wentlandt K, Adamchik Y, Naus CC, et al. Epileptiform activity in hippocampal slice cultures exposed chronically to bicuculline: increased gap junctional function and expression[J]. *J Neurochem*, 2003, 86(3): 687-699.
- [8] Gareri P, Condorelli D, Belluardo N, Russo E, Loiacono A, Barresi V, et al. Anticonvulsant effects of carbenoxolone in genetically epilepsy prone rats (GEPRs) [J]. *Neuropharmacology*, 2004, 47(8):1205-1216.
- [9] Gareri P, Condorelli D, Belluardo N, Citraro R, Barresi V, Trovato-Salinato A, et al. Antiabsence effects of carbenoxolone in two genetic animal models of absence epilepsy (WAG/Rij rats and lh/lh mice) [J]. *Neuropharmacology*, 2005, 49(4): 551-563.
- [10] 丁关萍,徐珑珑,包颖颖. 甘珀酸对点燃大鼠的保护作用和对连接蛋白32的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(3):182-184.
- [11] Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, et al. An astrocytic basis of epilepsy [J]. *Nat Med*, 2005, 11(9): 973-981.
- [12] Vessal M, Dugani CB, Solomon DA, McIntyre Burnham W, Ivy GO. Might astrocytes play a role in maintaining the seizure-prone state? [J]. *Brain Res*, 2005, 1044(2):190-196.
- [13] Parpura V, Scemes E, Spray DC. Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction "hemichannels", purinergic receptors and exocytotic release [J]. *Neurochem Int*, 2004, 45(2-3): 259-264.
- [14] 朱长庚,李龄,魏璞,童逸龄,蔡秋云,朱家祥,等. 癫痫病人手术切除标本的组织学、免疫组织化学和超微结构研究[J]. *解剖学报*, 1997, 28(3): 225-228.

(本文编辑:吉耕中)