

论著·实验研究

# 新生大鼠反复惊厥对皮质区糖皮质激素受体表达的影响

王团美<sup>1</sup> 薄涛<sup>1</sup> 王曼芝<sup>2</sup> 朱晓华<sup>1</sup> 里健<sup>1</sup> 李杏芳<sup>1</sup> 毛定安<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅二医院儿科, 湖南 长沙 410011; 2. 长沙市中心医院儿科, 湖南 长沙 410004)

**[摘要]** **目的** 研究新生儿反复惊厥对大鼠大脑皮层内糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)表达的影响。**方法** 生后(postnatal, PN)7 d的Sprague-Dawley大鼠48只,随机分成两组,惊厥组每日吸入三氟乙醚诱导惊厥发作1次,每次持续30 min,连续6 d;对照组同样操作但不吸入三氟乙醚。分别于PN-13 d、15 d和19 d每组各处死8只大鼠,Western blot法和免疫组化法观察大鼠大脑皮层GR表达的变化。**结果** 与对照组相比,在PN-15 d时惊厥组大鼠大脑皮层胞浆中GR的表达明显下调( $P < 0.01$ ),在PN-15 d、PN-19 d时胞核中GR表达水平明显下调( $P < 0.05$ )。与对照组相比较,PN-13 d时,惊厥组大鼠顶叶区GR免疫化学累积光密度(AOD)明显降低( $P < 0.05$ );PN-15 d时,惊厥组大鼠皮层顶叶区GR免疫化学AOD明显降低( $P < 0.01$ );PN-19 d时,惊厥组大鼠皮层顶叶、颞叶、额叶区GR免疫化学AOD明显降低( $P < 0.01$ )。**结论** 新生大鼠反复惊厥造成皮质GR表达的异常,可能参与发育期脑损伤。  
[中国当代儿科杂志,2010,12(1):47-50]

**[关键词]** 惊厥;糖皮质激素受体;脑损伤;新生大鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)01-0047-04

## Effects of neonatal recurrent seizures on glucocorticoid receptor expression in the rat brain

WANG Tuan-Mei, BO Tao, WANG Man-Zhi, ZHU Xiao-Hua, LI Jian, LI Xing-Fang, MAO Ding-An. Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Bo T, Email:bot1114@tom.com)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of flurothyl-induced neonatal recurrent seizures on glucocorticoid receptor (GR) expression in the rat brain. **Methods** Forty-eight seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: control and seizure. Seizures were induced by inhalant flurothyl daily for six consecutive days. Brains were sampled on postnatal days 13, 15 and 19. The expression of GR protein in the cerebral cortex was detected by Western blot and immunohistochemical method. **Results** The expression of GR in the cerebral cortical plasma protein was significantly lower in the seizure group than in the control group on postnatal day 15. The expression of GR protein in the cerebral cortical nuclear protein decreased significantly in the seizure group compared with that in the control group on postnatal days 15 and 19 ( $P < 0.05$ ). Compared to the control group, the accumulated optical density (AOD) of GR immunoreactivity (IR) decreased significantly in the parietal cortex on postnatal day 13 ( $P < 0.05$ ), the AOD of GR IR decreased significantly in the parietal cortex and the temporal cortex on postnatal day 15 ( $P < 0.05$ ), and the AOD of GR IR decreased significantly in the parietal cortex, temporal cortex and the frontal cortex in the seizure group on postnatal day 19 ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Recurrent seizures in neonatal rats result in abnormal GR expression in the cerebral cortex which might play an important role in short-term brain injury induced by early recurrent seizures.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(1):47-50]

**Key words:** Seizure; Glucocorticoid receptor; Brain injury; Neonatal rats

普遍认为引起发育中脑损伤的机制除兴奋毒性机制、氧自由基损伤等以外,炎症损伤占有重要地位<sup>[1]</sup>。糖皮质激素(glucocorticoid, GC)作为强有力的抗炎物质,能有效地抑制致炎症信号和相关基因表达,理论上应用GC治疗发育中脑损伤应有良好

的作用。但在脑发育期不恰当应用GC可能严重影响脑的发育<sup>[2-3]</sup>,随着相关病例增加,人们发现在围产期接受GC治疗的早产儿发生脑瘫危险性明显增高<sup>[4]</sup>。因此是否应用GC治疗发育中脑损伤颇多争议。在脑内,GC是通过盐皮质激素受体(minerocor-

[收稿日期]2009-07-19; [修回日期]2009-09-07

[基金项目]国家自然科学基金青年科学基金资助项目(项目批准号30400483);湖南省自然科学基金资助项目(项目批准号07JJ5020)。

[作者简介]王团美,女,硕士,副主任医师。现工作于长沙市中心医院儿科。

[通信作者]薄涛,教授。

ticoid receptor, MR)和糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)发挥作用的,如果相关受体在脑内表达发生改变将影响GC对脑的作用,而且GR与脑发育密切相关。本实验通过制作新生大鼠反复惊厥致发育中脑损伤模型,观察脑内GR表达的变化规律,以期从GR角度为发育中脑损伤治疗中如何应用GC提供线索。

## 1 材料与方 法

### 1.1 三氟乙醚致大鼠惊厥模型的制作及标本采集

生后7 d的Sprague-Dawley(SD)仔鼠48只(中南大学湘雅二医院实验动物中心提供),雌雄随机,用随机数字表法将大鼠随机分入惊厥组和对照组。惊厥模型制作参照Holmes方法<sup>[5]</sup>:将仔鼠放置于40 cm × 20 cm × 20 cm的透明实验舱中,通过舱顶的注射孔滴入0.1 mL三氟乙醚,封闭实验舱,从仔鼠出现惊厥开始记时,30 min后取出仔鼠,观察仔鼠4 h。仔鼠每天诱导惊厥1次,连续6 d,建立惊厥性脑损伤模型。对照组仔鼠除不给予三氟乙醚外,其他处理与惊厥组完全相同。于生后(postnatal, PN)13 d、15 d、19 d随机各选取8只大鼠处死取脑,在相同时间点正常对照组处死相同数目大鼠取脑。左侧皮层用于Western blot测定,右侧皮层用于免疫组织化学实验。

### 1.2 细胞蛋白提取

依据核蛋白提取试剂盒说明书进行。将保存于核蛋白提取液的大脑皮层组织液氮匀浆,室温孵育15 min,用250 × g的转速离心5 min,弃除上清液,2倍体积胞浆裂解缓冲液(CLB)重悬沉淀,使用7号针头注射器反复抽吸,再予8 000 × g离心20 min,留取上清液即胞浆蛋白(-70℃保存)。沉淀加入660 μL核提取缓冲液,再用7号针头反复抽吸,使用混悬器轻轻振荡60 min,16 000 × g离心5 min,留取上清液即核蛋白(-70℃保存)备用。应用微量板全波段酶标仪采用紫外吸收法测定蛋白浓度。

### 1.3 Western blot测定皮层GR表达

蛋白标本加入等体积的加样缓冲液[125 mmol/L, Tris-HCl (pH 6.8), 20% (v/v)甘油, 0.002% (v/v)溴酚蓝, 10% (v/v)β-巯基乙醇和4% (v/v)十二烷基磺酸钠(SDS)]在7% (w/v)SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,每条泳道蛋白上样量50 μg,每次电泳包括两组所有个体的蛋白标本。电泳结束后,用半干法电转蛋白至硝酸纤维素(NC)膜上。转移后的NC膜用5% (w/v)脱脂奶粉封闭

1 h,加入兔抗大鼠GR(1:500, Santa Cruz公司USA),4℃过夜。用TTBS洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗(山羊抗兔IgG, 1:2 500,北京中杉金桥生物技术有限公司),室温孵育1 h,TTBS充分洗膜,通过DAB显色法,显示目的条带。应用Imagine-Pro 5.0图像处理软件(Media Cybernetic Inc. USA,计算累积光密度值(accumulate optical density, AOD)代表目的蛋白表达水平。

### 1.4 免疫组化染色

取双侧大脑半球制作石蜡切片。用3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭1 h,滴加兔抗大鼠GR(1:80, Santa Cruz公司USA),4℃孵育过夜,应用ABC法免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)进行免疫组织化学染色,具体过程参照说明书。每个切片的相关区域以×400倍随机分别留取2个视野,应用Imagine-Pro 5.0图像处理软件,计算AOD,代表相关亚单位蛋白表达水平。

### 1.5 统计学分析

所有数据采用SPSS 11.5统计软件分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。方差齐性检验应用Levene's test,两组间均数差异性比较采用独立样本t检验;组间均数差异比较采用单因素方差分析,以 $\alpha = 0.05$ 作为检验标准, $P < 0.05$ 显示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 三氟乙醚诱导惊厥大鼠的行为特点

实验组大鼠吸入三氟乙醚后约1~2 min,惊厥开始发作,首先表现为烦躁不安,摇头,尖叫,继之四处乱窜,最终出现强直阵挛发作,每次发作持续5~8 min,间歇3~5 min,惊厥间歇期意识不恢复。脱离实验舱时大鼠处于嗜睡状态,呼吸急促,30 min左右恢复正常活动,各组大鼠均无自发性惊厥发生。

### 2.2 Western blot测定的皮层GR的表达

在对照组中,各时间点皮层胞浆蛋白GR均有表达,在PN-19 d时GR表达较PN-13 d及PN-15 d时显著增高( $P < 0.05$ )。在核蛋白中,PN-13 d时未检出GR表达,PN-19 d时GR表达较PN-15 d显著增高( $P < 0.05$ )。与对照组比较,惊厥组PN-13 d及PN-19 d时胞浆蛋白中GR表达差异无显著性( $P > 0.05$ ),PN-15 d时GR表达显著降低( $P < 0.05$ );惊厥组PN-13 d、PN-15 d时皮层核蛋白中未检出GR的表达,PN-19 d时皮层核蛋白中GR表达显著降低( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 大脑皮层 GR 表达定量 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	胞浆			胞核		
	PN-13 d	PN-15 d	PN-19 d	PN-13 d	PN-15 d	PN-19 d
对照组	82 ± 23	61 ± 15	193 ± 21	-	52 ± 16	201 ± 77
惊厥组	79 ± 18	41 ± 14	120 ± 28	-	-	28 ± 12
t 值	0.005	1.764	4.235	-	-	4.94
P 值	0.947	0.006	0.059	-	-	0.043

注: - 无阳性表达

### 2.3 免疫组化法测定的 GR 表达

在各时间点对照组大鼠的额叶、顶叶、颞叶区均有 GR 阳性细胞分布。在 PN-13 d 时, GR 阳性部位

表2 大脑皮层 GR 免疫化学积分光密度的变化 (n=16,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	PN-13 d			PN-15 d			PN-19 d		
	额叶	顶叶	颞叶	额叶	顶叶	颞叶	额叶	顶叶	颞叶
对照组	8 360 ± 679	8 219 ± 860	14 016 ± 902	4 507 ± 394	10 902 ± 991	6 955 ± 874	15 366 ± 1 102	21 207 ± 1 684	14 460 ± 1 073
惊厥组	7 903 ± 852	5 447 ± 616	11 826 ± 1 190	4 741 ± 452	6 357 ± 795	5 288 ± 389	8 541 ± 901	11 191 ± 794	9 944 ± 1 077
t 值	0.176	6.872	2.147	0.153	12.803	3.034	22.995	27.285	8.815
P 值	0.667	0.012	0.150	0.698	0.001	0.088	0.00072	0.00094	0.005

注: - 无阳性表达

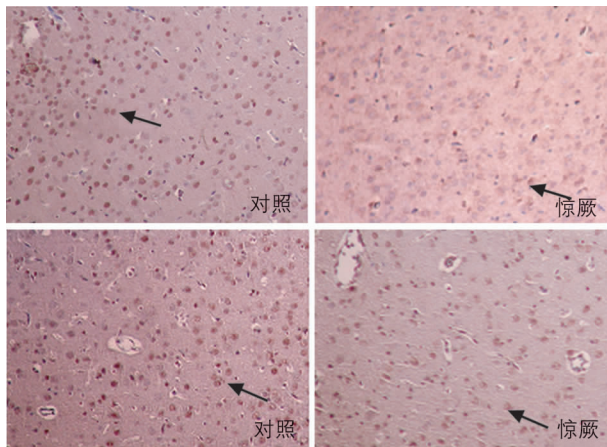


图1 皮质 GR 的表达 (DAB 显色, ×100) 上排为生后 13 d 皮质顶叶 GR 的表达, 下排为生后 19 d 皮质颞叶 GR 的表达, 均显示惊厥组阳性细胞数量和强度低于对照组 (箭头示阳性细胞)。

### 3 讨论

在脑内, GR 作为下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA) 轴的组成部分, 一方面参与 GC 反馈调节 HPA 轴, 另一方面属于核转录因子, 调节包括能量代谢、蛋白合成、信号传导在内的重要的细胞生命过程, 影响许多重要机体功能, 包括神经系统发育、记忆的形成、情感等<sup>[6-7]</sup>。GR 广泛分布于大脑各区, 包括海马、下丘脑、神经胶质细胞、垂体细胞<sup>[8-9]</sup>。脑内 GR 表达与脑发育密切相关, 在脑发育早期, 脑内 GR 表达呈现时相性和区

域性。生后第 1 周末大鼠脑内 GR 的表达仅为成年时的 30%, 在生后 1 个月才达到成年水平, 此时 HPA 轴的功能并不完善, 机体对应激反应的能力也相对不足<sup>[10]</sup>。本实验通过 Western blot 及免疫组化显示 GR 在生后早期大脑皮层即有表达, 随着日龄的增加大脑皮层 GR 的表达呈现迅速增加, 而且在额、颞、顶叶区的表达水平不尽相同, 提示 GR 的表达在发育期脑呈现一定的规律性变化。同时发现在生后早期新生大鼠 GR 主要表达于细胞胞浆, 而后细胞胞核中表达迅速增加。正常情况下, GR 在无皮质酮存在时主要存在于细胞胞浆, 当与皮质酮结合后转入核内, 结合到激素反应元素, 调节靶基因表达<sup>[11]</sup>。提示在脑处于迅速发育早期, GR 作为重要的核转录因子将调节神经细胞内相关靶基因表达, 参与到早期的脑发育过程。

除了发育因素外, 应激是影响脑内 GR 表达的一个重要因素, 不同的应激事件对脑内 GR 表达的影响有所差异。给予大鼠单一急性应激 30 h 后, 大鼠皮质的 GR mRNA 表达明显增高<sup>[12]</sup>, 相反遭受反复应激的大鼠, 其血浆皮质酮水平升高, 纹状体、皮质区的 GR 表达逐渐减少, HPA 轴功能持续亢进, 直接导致神经细胞树突数目、轴突和突触减少, 使神经元遭到破坏<sup>[13]</sup>。发育期所遭受的应激同样会导致 HPA 轴功能改变, 使脑的结构和功能发生变化, 并且这种变化可延续到成年期, 给脑带来更为深远的

影响<sup>[14]</sup>。Lsgor等<sup>[15]</sup>将28日龄的SD大鼠置于应激环境中4周后,大脑皮质GR基因表达持续下调。本实验通过Western blot发现与对照组相比较,PN-15 d时惊厥组大鼠大脑皮层胞浆中GR的表达较对照组明显下调,在PN-15 d、PN-19 d时胞核中GR表达水平明显下调,通过免疫组织化学分析进一步证实这些改变具有时空性,在不同区域变化也不尽相同,GR的表达降低由顶叶区逐渐波及到额叶和颞叶区。提示新生大鼠反复惊厥干扰皮层神经细胞内GR表达变化的规律,胞核内GR表达增加过程延迟,将影响到靶基因的表达,从而干扰脑的正常发育过程。

电生理研究显示生理情况下,GR通过电压依赖性钙通道(voltage-dependent calcium channels, VDCCs)增强钙内流,促进突触电位形成。应激状态下,体内大量分泌的GC会与GR结合,而GC与GR结合后可抑制长时程增强(long-term potentiation, LTP)的形成,不利于正常机能的发挥<sup>[16]</sup>,同时GC与GR结合,则会增大动作电位后超极化电位(after-hyperpolarization, AHP)的幅值并延长AHP的时程,即降低了神经元的兴奋性<sup>[17]</sup>。当细胞暴露在惊厥这样强烈的去极化情况时,GR活化后钙内流增强可能变成一种危险因素,损害细胞的功能,严重者导致细胞死亡。本实验显示GR在反复惊厥后短期内持续下调,可能为机体一种自我保护机制,减少因反复惊厥导致的异常钙内流增加,避免因反复惊厥所致应激引起GR过度激活导致细胞死亡。

正常的HPA轴对包括神经系统在内的机体发育是必须的,GC通过GR调节神经细胞存活、生长和凋亡过程,此时应用外源性GC干扰HPA轴的稳定,必将影响到脑的发育。但当脑损伤发生时,HPA轴将也随之发生变化,目前GC是否用于惊厥后脑损伤的治疗存在较大争议,本实验发现新生儿反复惊厥可以导致急性期大脑皮质GR表达下调,如果此时再给予过多的GC,不但不能达到抑制脑内炎症反应的目的,反而会带来许多不良反应。因此何时予以外源性GC治疗,治疗后能否起到预想的治疗作用,需要进一步探讨。

#### [参 考 文 献]

[1] Ferriero DM. Neonatal brain injury[J]. N Engl J Med, 2004, 351(19):1985-1995.

[2] Dammon O, Matthews SG. The effects of repeated antenatal glucocorticoid therapy in the developing brain[J]. *Pediatr Res*, 2001, 50(5):563-564.

[3] De Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? [J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22(10):422-426.

[4] Montilla P, Tunes I, Munoz MC, Salcedo M, Feijóo M, Muñoz-Castañeda JR, et al. Effect of glucocorticoids on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 488(1):19-25.

[5] Holmes GL, Gairisa JL, Chevasus-Au-Louis N, Ben-Ari Y. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects[J]. *Ann Neurol*, 1998, 44(6):845-857.

[6] Donley MP, Schülkin J, Rosen JB. Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear[J]. *Behav Brain Res*, 2005, 164(2):197-205.

[7] Velíšek L. Prenatal corticosteroid impact on hippocampus: implication for postnatal outcomes[J]. *Epilepsy Behav*, 2005, 7(1):57-67.

[8] Han F, Ozawa H, Matsuda K, Nishi M, Kawata M. Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus [J]. *Neurosci Res*, 2005, 51(4):371-381.

[9] Pryce CR, Feldon J, Fuchs E, Knuesel I, Oertle T, Sengstag C, et al. Postnatal ontogeny of hippocampal expression of the mineralocorticoid and glucocorticoid receptor in the common monkey [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(6):1521-1535.

[10] De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease [J]. *Endocr Rev*, 1998, 19(3):269-301.

[11] Nishi M, Kawata M. Dynamics of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor: implications from live cell imaging studies [J]. *Neuroendocrinology*, 2007, 85(3):186-192.

[12] Marini F, Pozzato C, Andreetta V, Jansson B, Arban R, Domenici E, et al. Single exposure to social defeat increases corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor on RNA expression in rat hippocampus [J]. *Brain Res*, 2006, 1067(1):25-35.

[13] Tamura G, Olson D, Miron J, Clark TG. Tolloid-like I is negatively regulated by stress and glucocorticoid [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 142(2):81-90.

[14] Pofetto R, Steibel JP, Siegford JM, Zanella AP. Effects of early weaning and social isolation on the expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 on mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of piglets [J]. *Brain Res*, 2006, 1067(1):36-42.

[15] Lsgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats [J]. *Hippocampus*, 2004, 14(5):636-648.

[16] Yang CH, Huang CC, Hsu KS. Behavioral stress modifies hippocampal synaptic plasticity through corticosterone-induced sustained extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase activation[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(49):11029-11034.

[17] Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats[J]. *J Neurosci*, 1995, 15(1):61-69.

(本文编辑:黄 榕)