

癫痫大鼠海马中脂蛋白脂酶表达的动态观察 及其对维生素 E 含量的影响

石璇 姚宝珍 刘丹

(武汉大学人民医院儿科,湖北 武汉 430000)

[摘要] 目的 研究大鼠癫痫模型海马中脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)表达的变化规律,探讨 LPL 在癫痫持续状态(status epilepticus)后对维生素 E 含量的影响。方法 采用匹罗卡品(PILO)腹腔注射法建立癫痫大鼠模型,免疫荧光方法观察癫痫损伤后不同时间点海马中 LPL 的表达,比色法测量海马中维生素 E(Vit E)的含量。结果 免疫荧光发现正常组和癫痫组海马中均有 LPL 表达,且大鼠癫痫持续状态后 24 h 海马区 LPL 表达开始增加($P<0.05$),3 d 达高峰($P<0.01$),以后逐渐下降,7 d 时仍维持较高水平,14 d 后基本恢复正常。大鼠癫痫持续状态后 12 h 海马 Vit E 含量开始迅速降低,且明显低于正常($P<0.01$),于 24 h 达到低谷($P<0.01$),3~7 d 逐渐升高,但仍显著低于正常($P<0.05$),14 d 后基本恢复正常。结论 LPL 在癫痫大鼠模型海马中表达上调,代偿性加速对 Vit E 的摄取,从而可能对痫性发作后氧化应激机制产生影响。[中国当代儿科杂志,2010,12(5):377-381]

[关键词] 癫痫;脂蛋白脂酶;维生素 E;大鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)05-0377-05

Lipoprotein lipase expression in the hippocampus and its effects on vitamin E levels in rats with epilepsy

SHI Xuan, YAO Bao-Zhen, LIU Dan. Department of Pediatrics, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430000, China (Yao B-Z, Email:yydy8623@163.com)

Abstract: Objective To investigate the dynamic changes of lipoprotein lipase (LPL) expression in the hippocampus of epileptic rats and to study its effect on vitamin E levels in rats following status epilepticus (SE). **Methods** Rat model of SE was induced by intraperitoneal injection of pilocarpine. The rats receiving an injection of normal saline were used as a control group. The expression of LPL in the hippocampal tissue was determined using immunofluorescent methods and the level of vitamin E was examined by the colorimetric method 12 hrs, 24 hrs, 3 days, 7 days and 14 days after SE. **Results** LPL was expressed in the control and SE groups. In the SE group, the LPL expression began to increase 24 hr after SE ($P<0.05$), reached a peak 3 days after SE ($P<0.01$), and kept at a high level 7 days after SE ($P<0.01$). By 14 days, the LPL expression was reduced to the level similar to the control group. The level of vitamin E began to decline 12 hrs after SE ($P<0.01$), and decreased to a nadir 24 hrs after SE ($P<0.01$). At 3 and 7 days after SE, the levels of vitamin E were still significantly lower than the controls ($P<0.05$). By 14 days, the vitamin E level increased to the level similar to the control group. **Conclusions** The over-expression of LPL in the hippocampus may play an important role in the oxidative stress mechanisms following SE by regulating the uptake of vitamin E.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (5):377-381]

Key words: Epilepsy; Lipoprotein lipase; Vitamin E; Rats

癫痫(epilepsy)是大脑兴奋性和抑制性神经递质失衡导致的脑神经元异常放电的神经系统疾病,具有起病突然,反复发作,持续时间较短,但有时可呈癫痫持续状态(status epilepticus, SE)等特征^[1]。癫痫发作,尤其是 SE 可造成持久的脑损伤,认知能力受损和癫痫易感性增加等^[2],其机制错综复杂,但近年来众多研究均证明氧化应激(oxidative stress)在癫痫的病理改变中起着重要作用。脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)是甘油三酯降解为甘油和游离脂肪酸反应的限速酶^[3]。现有研究表明, LPL 在脑部和周围神经系统有丰富的表达,在神经系统中具有至关重要的作用^[4-5],并参与多种神经系统疾病的发生以及演变过程^[4,6-7]。此外还有实验表明, LPL 能维持维生素 E(Vit E)的代谢平衡,从

[收稿日期]2009-11-19;[修回日期]2010-01-05
[作者简介]石璇,女,硕士研究生。
[通信作者]姚宝珍,教授。

而提示该酶具有潜在的抗氧化应激损伤的作用^[8]。LPL与癫痫发作后的病理改变有何明确联系,迄今尚无相关报道。本研究通过观察大鼠正常情况下和SE后不同时间点海马中LPL的表达及Vit E含量的变化,探讨LPL在癫痫持续状态后氧化应激过程中可能发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 实验分组及模型制作

健康成年Sprague-Dawley雄性大鼠72只(由武汉大学中南医院实验动物研中心提供),体重220~280 g,置于温暖、安静、避强光的环境分笼饲养48 h,允许其自由活动和进食,注意避免特异性应激反应的发生。随机将其分为6组,即生理盐水对照(NS)组、SE后12 h、24 h、3 d、7 d、和14 d组,每组12只。造模步骤:腹腔注射匹罗卡品(PILO)350 mg/kg,并于注射PILO前30 min腹腔注入氢溴酸东莨菪碱1 mg/kg,以拮抗其外周胆碱能反应。致痫处理后按Racine^[9]标准,将大鼠癫痫发作的程度分为5级判定。0级:无任何发作迹象;I级:咀嚼、眨眼、立须等面部肌肉的抽搐;II级:以点头运动为主的颈部肌肉的抽搐;III级:单侧前肢的阵挛、抽搐;IV级:双侧前肢阵挛、抽搐伴身体立起;V级:双侧后肢强直、身体背曲强直、跌倒,达到III-V级并持续30 min以上为SE,可认为PILO模型制作成功,归入模型组。如观察60 min,大鼠无反应可再注射PILO 1次。当大鼠SE持续3 h,或濒死时腹腔注射安定4 mg/kg,以终止发作。凡SE持续时间未达到预定要求或中途死亡者均从本研究中排除。NS组:用等量生理盐水代替PILO注射,余处理同上。

1.2 行为学观察

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

1.3 标本采集

将各组造模成功的大鼠中随机选取一半,于上述时间点以10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉,迅速开胸经动脉插管,先以100 mL生理盐水洗去血液,随后用4℃含4%多聚甲醛的PBS溶液先快后慢灌流固定2 h,取脑置于4℃ 20%蔗糖中直至沉底。自海马平面于冰冻切片机连续冠状切片(厚15 μm),隔4取1,置于-80℃冰箱保存备用。其余大鼠则在麻醉之后迅速断头取脑,无菌

操作分离双侧海马,将海马置于-80℃冰箱保存。

1.4 免疫荧光染色

切片用50%冷丙酮(乙醇:丙酮=1:1)4℃固定15 min;PBS洗3 min×2次,3%双氧水封闭15 min;PBS洗3 min×2次,加入一抗(兔抗LPL,1:100,SANTA CRUZ),4℃过夜;室温复温20 min,PBS洗5 min×3次;加入二抗(FITC抗兔荧光二抗,SIGMA),室温孵育50 min;PBS洗5 min×3次;Hoechst染核3 min,水洗;荧光封片剂封片后,立即荧光显微镜下显影照相;每只大鼠选取海马水平最大平面切片5张,在光学显微镜下观察,拍照得到图像,应用Image-Pro Plus 6.0图像处理分析软件对图像进行数字化分析,LPL免疫产物表达强度以累积光密度值(integrated optical density,IOD)表示,IOD值与阳性产物的含量成正比。

1.5 海马中Vit E含量的测定

先准确称取待测海马的重量,按质量比1:9加入组织匀浆介质制备成10%的组织匀浆,3 000转/min离心10 min,取组织匀浆上清液,比色法测定海马中Vit E的吸光度,根据其吸光度大小计算出标本中的Vit E含量。具体操作步骤严格按试剂盒说明书(南京建成生物公司)进行。

1.6 数据处理和统计分析

所有实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 13.0统计软件作统计处理,两样本均数比较采用Student's *t*检验,多个样本均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学观察

大鼠在腹腔注射PILO 5~20 min后,出现立毛、流涎、颤抖及流血泪,同时或先后出现刻板行为:凝视不动或咀嚼、吸鼻加强并伴眨眼、面肌痉挛、点头、湿狗样震颤、反复头颈上仰,最后出现反复前肢阵挛、伴直立、跌倒、失去体位控制或在笼内上下翻跳及狂奔。在腹腔注射PILO的60只大鼠中,2只没有发作,5只为I~II级发作,其余53只大鼠均进展为SE(SE 12h组11只,SE 24h组12只,SE 3d、SE 7d、SE 14d组各10只),其中5只死亡(SE 12h组1只,SE 24h组、SE 3d组各2只),每次发作持续约30~90 s,连续5~24 h。NS组安静、温顺,亦无大鼠死亡。

2.2 免疫荧光检测结果

各组大鼠海马结构中可见绿色荧光,说明均有

LPL 表达,并主要于海马 CA1、CA3 区锥体细胞层和海马齿状回颗粒细胞层呈簇状分布(图 1~图 2),其中 NS 组海马 CA1、CA3 区和海马齿状回中的荧光最弱,其 LPL 免疫产物的 IOD 值低,提示正常情况下 LPL 于大鼠海马结构中仅有轻微表达。SE 后 12 h,上述区域仍仅可见较弱的荧光,其 LPL 免疫产物的 IOD 值与 NS 组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。SE 后 24 h,大鼠海马中 CA1、CA3 区以及海马齿状回结构中的 LPL 反应产物的 IOD 值开

始较 NS 组增多($P<0.05$),说明 LPL 开始上调;SE 后 3 d,上述区域的 LPL 反应产物的 IOD 值达高峰($P<0.01$),该时间点 LPL 表达最为强烈,以后逐渐下降,SE 后 7 d 时 CA1、CA3 区和海马齿状回中 LPL 反应产物的 IOD 值仍然明显高于 NS 组的相同区域($P<0.01$),SE 后 14 d LPL 反应产物的 IOD 值基本恢复正常,与 NS 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。各组海马 LPL 免疫反应产物 IOD 值的结果以及变化规律见表 1。

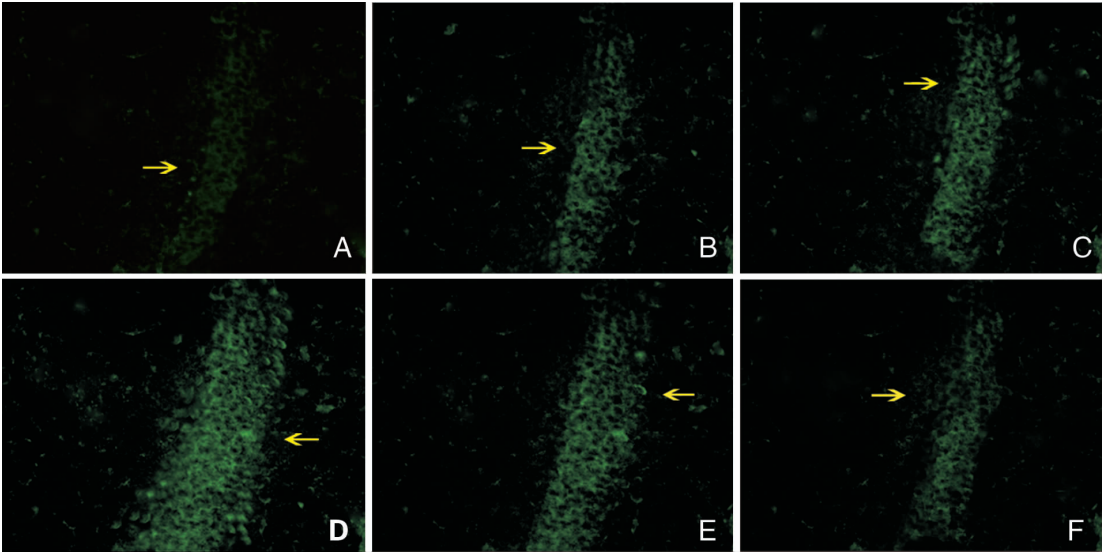


图 1 海马 CA1 区 LPL 免疫荧光图(×200) A 为 NS 组;B~F 分别为 SE 12h,SE 24h,SE 3d,SE 7d 及 SE 14d 组。NS 组、SE 12h 组和 SE 14d 组 CA1 锥体细胞层的荧光强度较弱,而 SE 24h、SE 3d 及 SE 7d 组 CA1 锥体细胞层发出较强的绿色荧光。箭头所指为 LPL 阳性表达区。

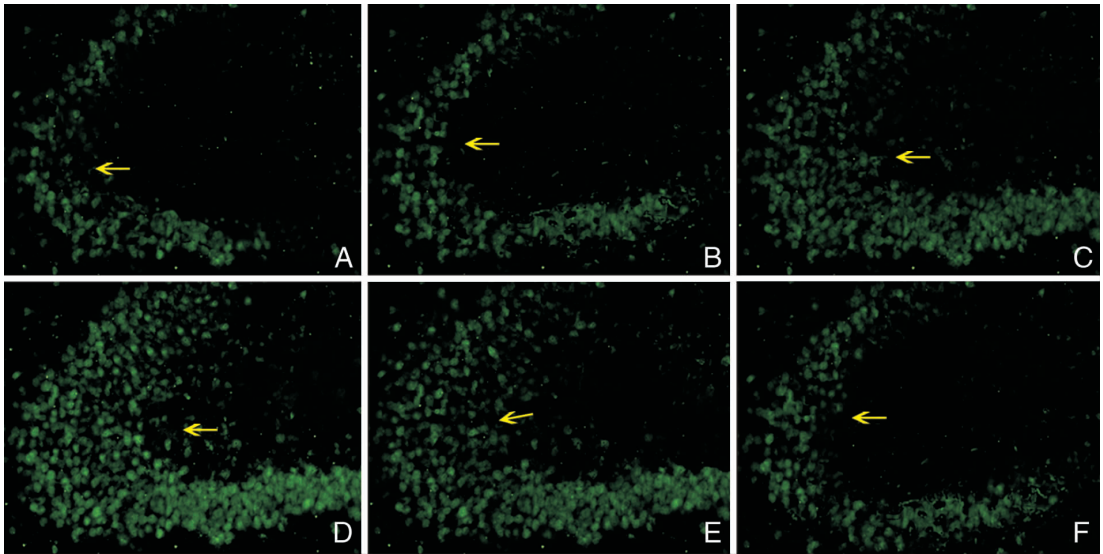


图 2 CA3 及齿状回 LPL 免疫荧光图(×200) A 为 NS 组;B~F 分别为 SE 12h,SE 24h,SE 3d,SE 7d 及 SE 14d 组。NS 组、SE 12h 组和 SE 14d 组 CA3 区锥体细胞层及齿状回颗粒细胞层的荧光强度较弱;而 SE 24h、SE 3d 及 SE 7d 组 CA3 区锥体细胞层及齿状回颗粒细胞层发出较强的绿色荧光。箭头所指为 LPL 阳性表达区。

表 1 各时间点海马 LPL 免疫荧光强度 ($\bar{x} \pm s$)

分组	CA1	CA3 及齿状回
NS	584 ± 70	1 408 ± 285
SE 12h	708 ± 106	1 588 ± 203
SE 24h	822 ± 96 ^a	1 760 ± 236 ^a
SE 3d	1 326 ± 138 ^b	2 866 ± 163 ^b
SE 7d	825 ± 65 ^b	1 911 ± 297 ^b
SE 14d	616 ± 67	1 534 ± 141

与 NS 组相比 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 。

2.3 海马中 Vit E 的含量

大鼠 SE 后 12 h, 海马 Vit E 含量迅速降低, 为 $6.19 \pm 1.09 \mu\text{g/g}$, 低于正常组的 $9.70 \pm 1.28 \mu\text{g/g}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), SE 后 24 h 达到 $4.39 \pm 1.10 \mu\text{g/g}$, 为最低值。SE 后 3 ~ 7 d 开始逐渐缓慢升高, 3 d 及 7 d 海马中 Vit E 含量分别为 8.01 ± 0.67 和 $8.27 \pm 1.51 \mu\text{g/g}$, 仍低于 NS 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SE 后 14 d CA1、CA3 区及齿状回的 Vit E 含量分别为 615.8 ± 66.6 和 $1\,534.3 \pm 141.4 \mu\text{g/g}$, 基本恢复正常 ($P > 0.05$)。

3 讨论

LPL 的发现可以追溯到 1943 年^[3], 后来证实它是一种糖蛋白, 是甘油三酯 (TG) 降解为甘油和游离脂肪酸 (FFA) 反应的限速酶, 在神经系统中具有重要的生理功能, 涉及到多种神经系统疾病的发生及演变。既往有学者用原位杂交技术证实^[4], LPL mRNA 在大鼠海马结构中有丰富的表达, 其中以 CA1、CA2 和 CA3 区锥体细胞层为甚, 齿状回颗粒细胞层次之, 小神经胶质细胞和毛细血管内皮也有少量分布。本研究结果发现 LPL 在对照组及癫痫组大鼠海马神经元胞质内均有分布, 以锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层尤为明显, 与上述研究结果基本一致。本研究发现, SE 后大鼠海马中 LPL IOD 值普遍升高, 特别是 SE 状态后 3 ~ 7 d 在海马 CA1、CA3 区锥体细胞层和海马齿状回颗粒细胞层, IOD 值的升高与对照组比较差异有统计学意义。海马齿状回颗粒细胞是海马接受外部兴奋的主要部位, 在痫性损伤后由于门区大量神经元和 CA3 区锥体细胞死亡, 齿状回内分子层失神经传入, 同时颗粒细胞也失去投射靶, 苔藓纤维芽生侧枝便进入颗粒体层、齿状回内分子层以及 CA3 区始层, 重建海马神经网络^[10]。因此, 海马是癫痫发作敏感的脑区, 而齿状回颗粒细胞以及海马锥体细胞对兴奋性氨基酸的兴奋毒性损害也比海马其他区域更加敏感, 由此推测 SE 后大鼠

海马中 LPL 免疫荧光强度在锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层普遍升高是由于 LPL 表达增加所致, 而非锥体细胞和颗粒细胞数量的增多。本研究结果发现, 大鼠 SE 后 LPL 在海马上述区域的表达比海马其他区域更加强烈, 从而证实了上述推测。

癫痫发作所造成的脑损伤一直是临床上有待解决的问题, 近年来氧化应激造成的继发性损伤学说正逐渐引起人们的重视^[11]。已有证据表明, 大量自由基的产生是癫痫发生过程中导致脑损伤的重要因素。癫痫发作的核心是脑内神经元的超兴奋性。作为主要的兴奋性氨基酸谷氨酸及其 NMDA 受体的功能异常参与了癫痫的致病过程。癫痫发作后谷氨酸释放增多, NMDA 受体过度激活, 细胞外的 Ca^{2+} 内流, 激活胞浆内多种 Ca^{2+} 依赖酶, 如一氧化氮合酶 (NOS) 的活化, 导致细胞膜功能失调, 引起膜的电生理紊乱, 增加癫痫易感性^[12]。Vit E 是一种脂溶性维生素, 是良好的抗氧化剂, 可清除氧自由基, 阻断脂质过氧化, 稳定细胞膜, 保护神经细胞和线粒体免受自由基损害。目前已有临床资料和动物实验表明, Vit E 能降低癫痫发作后氧化应激对脑组织造成的伤害^[13], 亦可防治抗癫痫药物所致的周围神经损伤^[14], 有望成为抗癫痫药物的辅助治疗^[15]。本研究中大鼠 SE 后 12 h, 海马中 Vit E 含量迅速降低, 24 h 达到最低谷, 在 SE 后 3 ~ 7 d 逐渐缓慢回升, 但仍显著低于对照组。推测是由于痫性损伤后大鼠脑组织处于缺氧状态, 神经细胞过度兴奋而产生大量自由基, 同时正常呼吸链失代偿, 从而脑组织出于自我的保护和修复而消耗组织内大量的 Vit E 来对抗氧化应激所造成的损伤。SE 14 d 后大鼠进入慢性期, Vit E 的含量也基本恢复正常。

研究发现, LPL 基因缺陷小鼠海马内 Vit E 的含量明显低于正常小鼠, 证明 LPL 有利于细胞膜转运摄取 Vit E, 对维持 Vit E 的代谢平衡有重大作用^[8]。本研究发现大鼠 SE 后 12 h, 尽管海马中 LPL 的表达尚未发生变化, Vit E 含量却开始迅速降低, 当 SE 后 24 h Vit E 含量达到低谷时, LPL 的 IOD 值开始升高, 提示 LPL 表达开始上调。SE 后 3 d LPL 的 IOD 值达到高峰, 之后则成下降趋势, 而 Vit E 却随着逐渐升高, 14 d LPL 的 IOD 值回落至正常, Vit E 也基本恢复正常。SE 后 12 h 和 3 d LPL 的表达与 Vit E 含量的变化相背离的现象与文献报道的 LPL 表达变化与 Vit E 含量变化呈正相关这一现象不一致^[8], 可能是由于痫性发作后脑组织处于氧化应激状态, 随着自由基大量生成, 细胞膜脂质过氧化, 脑组织中的 Vit E 被大量消耗, 为了加速细胞膜对外周 Vit E 的

摄取来对抗氧化应激所致的脑损伤,LPL 的表达代偿性的增强。SE 14 d 后大鼠进入慢性期,Vit E 消耗量逐渐减少,Vit E 代谢处于平衡,LPL 的表达也随之恢复正常水平。

有研究认为 LPL 具有抗氧化和加重氧化损伤双重作用,在脑组织遭受慢性氧化应激时可能会加重大脑损害,而急性损伤造成的短暂或轻度氧化应激则可能起保护作用,根据不同的病理过程而定^[16]。本研究仅从 LPL 表达与 Vit E 含量的变化关系来探讨该酶对痫性损伤后氧化应激过程的影响,但其在癫痫损伤中的具体作用还有待继续研究。

综上所述,本研究显示大鼠在痫性损伤后海马中 LPL 表达普遍增强,表达的强度随时间而变化,并推测痫性损伤后脑组织可能通过上调 LPL 来代偿性加速细胞膜对抗氧化因子 Vit E 的摄取,从而对抗氧化应激所致的脑损伤。

[参 考 文 献]

[1] Papandreou D, Pavlou E, Kalimeri E, Mavromichalis I. The ketogenic diet in children with epilepsy[J]. Br J Nutr, 2006, 95(1): 5-13.

[2] 喻良,梁益,孙红斌. 癫痫持续状态后神经细胞凋亡途径[J]. 实用医院临床杂志, 2008, 5(6): 120-122.

[3] Hahn PF. Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin[J]. Science, 1943, 98: 19-20.

[4] Paradis É, Clavel S, Julien P, Murthy MRV, de Bilbao F, Arsenijevic D, et al. Lipoprotein lipase and endothelial lipase expression in mouse brain; regional distribution and selective induction following kainic acid-induced lesion and focal cerebral ischemia[J]. Neurobiol Disease, 2004, 15(2): 312-325.

[5] Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation[J]. J Lipid Res, 2002, 43(12): 1997-2006.

[6] Blain J, Paradis J, Gaudreault SB, Champagne D, Richard D, Poirier J, et al. A role for lipoprotein lipase during synaptic remodeling in the adult mouse brain[J]. Neurobiol Disease, 2004, 15(3): 510-519.

[7] Huey PU, Waugh KC, Etienne J, Eckel RH. Lipoprotein lipase is expressed in rat sciatic nerve and regulated in response to crush injury[J]. J Lipid Res, 2002, 43(1): 19-25.

[8] Xian XD, Liu TT, Yu J, Wang YH, Miao YF, Zhang JJ, et al. Presynaptic defects underlying impaired learning and memory function in lipoprotein lipase-deficient mice[J]. J Neurosci, 2009, 29(14): 4681-4685.

[9] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor Seizure[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 781-794.

[10] 郑丽华,陈阳关. 苔藓纤维出芽机制研究进展[J]. 卒中与神经疾病, 2005, 12(5): 309-311.

[11] Hayashi M. Oxidative stress in brain developmental brain disorders[J]. Neuropathology, 2009, 29(1): 1-8.

[12] 李春香,唐宁波,朱玉红,马云,于明,王明礼. 戊四唑致癫痫大鼠脑组织 NO 和 MDA 含量及其相关性研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3(4): 421-422.

[13] 钟敏,蔡方成,张晓萍,宋艳. 抗氧化剂防治抗癫痫药所致周围神经损伤的实验性研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(23): 2219-2222.

[14] 钟斌才,李焕琼,黄如章. 维生素 E 辅助治疗难治性癫痫患儿临床疗效观察[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(5): 533-534.

[15] Barros DO, Xavier SML, Barbosa CO, Silva RF, Freitas RLM, Maia FD, et al. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats[J]. Neurosci Lett, 2007, 416(3): 227-230.

[16] Paradis E, Clement S, Julien P, Ven Murthy MR. Lipoprotein lipase affects the survival and differentiation of neural cells exposed to very low density lipoprotein[J]. J Biol Chem, 2003, 278(11): 9698-9705.

(本文编辑:黄 榕)