

不同增生程度星形胶质细胞对癫痫大鼠
多药耐药基因 *MDR* 表达的影响

陈小聪 黄绍平 王雪莹

(西安交通大学医学院第二附属医院儿科,陕西 西安 710004)

[摘要] 目的 探讨星形胶质细胞增生与癫痫大鼠多药耐药基因(*MDR*)表达的关系。方法 将新生 Sprague-Dawley 大鼠大脑皮层星形胶质细胞分离、纯化并培养至第3代后,采用肿瘤坏死因子(TNF-α)分别作用2 h、24 h及48 h以刺激星形胶质细胞增生。将不同增生程度的星形胶质细胞培养液分别注入到癫痫大鼠侧脑室,用PCR法、免疫组化法和免疫印记法测定脑组织*MDR*产物P-糖蛋白(P-gp)表达。结果 TNF-α刺激后2 h胶质细胞开始增生,24 h达高峰;增生的胶质细胞培养液可使癫痫大鼠*MDR*表达上调,表达量与增生程度一致。结论 星形胶质细胞增生可使癫痫大鼠*MDR*基因表达上调,可能参与了难治性癫痫的形成。

[中国当代儿科杂志,2010,12(11):908-911]

[关键词] 星形胶质细胞;增生;多药耐药基因;癫痫;大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)11-0908-04

Effect of astrocytes with different degrees of proliferation on multidrug resistance gene expression in rats with epilepsy

CHEN Xiao-Cong, HUANG Shao-Ping, WANG Xue-Ying. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China (Huang S-P, Email: zhengtu1127@163.com)

Abstract: Objective To study the relationship of activated astrocytes and multidrug resistance gene (*MDR*) expression in rats with epilepsy. **Methods** Astrocytes of neonatal Sprague-Dawley rats were separated and cultured. The cultured cells of passage 3 were activated by TNF-α for 2, 24 or 48 hrs. The culture media of cells with different degrees of proliferation were infused to the lateral cerebral ventricle of rats with epilepsy. The expression of *MDR* in the brain tissue was ascertained by PCR, immunocytochemistry and Western blot. **Results** After 2 hrs of TNF-α stimulation, astrocytes began to proliferate, and reached a peak at 24 hrs. The expression of *MDR* in the brain tissue increased after infusion of culture medium of proliferated astrocytes in the TNF stimulation group compared with that in the control group without TNF stimulation. The level of *MDR* expression in the TNF stimulation group was positively correlated with the degrees of cell proliferation. **Conclusions** Proliferation of astrocytes can increase the expression of *MDR* in rats with epilepsy and is probably involved in the development of refractory epilepsy. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (11):908-911]

Key words: Astrocyte; Proliferation; Multidrug resistance gene; Epilepsy; Rats

癫痫是一种反复发作的神经系统疾病,其中20%~25%为难治性癫痫^[1]。许多研究都认为,难治性癫痫与多药耐药基因(*MDR*)表达上调有密切关系^[2-9]。反应性胶质细胞增生、神经元丢失及苔藓纤维出芽是癫痫患者最重要的病理学特征,其中胶质细胞增生、活化,并释放某些活性物质使神经元的兴奋性提高,与癫痫脑的兴奋性、易感性升高有着直接而密切的关系,是癫痫反复发作的重要诱因之一^[10]。近年来,越来越多实验已证实星形胶质细胞在癫痫发病机制中起重要作用,一些研究发现难治

性癫痫患者及试验动物脑部病灶区胶质细胞*MDR*表达增强,提示胶质细胞与癫痫耐药的形成有一定相关^[4-7]。为进一步了解胶质细胞增生及活化程度与*MDR*表达之间的相关性,本研究利用肿瘤坏死因子(TNF)在体外培养基激活星形胶质细胞,使其发生不同程度反应性增生后注入氯化锂-匹鲁卡品癫痫大鼠侧脑室,通过PCR和免疫组织化学方法观察*MDR*基因表达情况,以期了解难治性癫痫耐药的发生机制提供一些实验依据。

[收稿日期]2010-02-08;[修回日期]2010-04-12
[基金项目]国家自然科学基金(30672263)。
[作者简介]陈小聪,女,硕士研究生,副主任医师。现工作单位:西安市儿童医院神经康复科,邮编:710003。
[通信作者]黄绍平,教授。

1 材料与方法

1.1 材料

2~3 d Sprague-Dawley (SD) 新生大鼠 6 只(雌雄不限)用于皮层分离,15 d SD 幼鼠 80 只用于癫痫模型制备。DMEM/F12 培养基、胎牛血清、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(rabbit anit-rat GFAP)、异硫氰酸荧光素标记羊抗兔二抗、兔抗大鼠 P-糖蛋白(P-gp) IgG (Santa Cruz 公司)、胰蛋白酶、重组大鼠 TNF- α (Peprotech 公司)、匹鲁卡品、氯化锂、Hanks 液和 PBS 液、Trizol (Invitrogen 公司)、PCR 及逆转录试剂盒(MBI 公司)、琼脂糖粉(沃尔森公司)、EB(沃尔森公司)、PCR 引物由上海三博远志公司合成等。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脑皮质细胞的原代和传代培养及鉴定
参照 McCarthy 等方法^[11],大鼠冷冻麻醉消毒后在超净台剥下皮层,结合机械分离和胰酶消化后制备单细胞悬液接种,差速贴壁 1 h,培养 14 d 以后上摇床以去除混杂细胞,细胞融合后传代,每次传代前都经历胰酶冲洗和差速贴壁,传 3 代后利用 GFAP-FITC 免疫荧光法对所获细胞进行鉴定。

1.2.2 TNF- α 干预 将传代稳定的细胞随机分为:TNF- α 组(培养液内含终浓度为 2 ng/mL 的 TNF- α);对照组(不加任何刺激物)。TNF- α 组又按照孵育时间不同分为 2 h、24 h 和 48 h 组。

1.2.3 MTT 法测试 TNF- α 对星形胶质细胞的增殖作用 取传代稳定的细胞,接种于 96 孔板中,分别加入 TNF- α 2 ng/mL 作用 2 h、24 h、48 h 后加入 MTT 作用 3 h,在 490 nm 测试吸光度,每组 7 孔。

1.2.4 条件培养基(ACM)收集 将各组星形胶质细胞收集培养液,经直径为 22 μ m 的 ZEISS 滤器(Millipore Bedford)过滤后离心(5 000 r/min) 20 min,弃去沉淀储于-80℃备用。

1.2.5 氯化锂-匹鲁卡品癫痫大鼠模型制备及条件培养基侧脑室注射 生后 15 d SD 幼鼠 80 只,体重 45~70 g,分为对照组、2 h、24 h 和 48 h 组($n=20$),每组中 10 只用于 RT-PCR 和免疫印迹法,另 10 只用于免疫组化。建立氯化锂-匹鲁卡品癫痫大鼠模型^[12]参照包新民等^[13]所著大鼠脑立体定向图谱,将大鼠头部固定在 BAS 立体定向仪上,定位侧脑室,于前囟后 1 mm,旁开 2 mm 进针,深度 3.5 mm,用 1 μ L 的微量注射器和微量推进器以 1 μ L/min 的速度向侧脑室内分别注入不同增生程度星形胶质细胞培养液 10 μ L,对照组同法注射无任何刺激条件下

的星形胶质细胞培养液 10 μ L,动物存活 2 h 后处死进行检测。

1.2.6 RT-PCR 检测 *MDR1* 表达 各组取 10 只大鼠置于-20℃冰箱 15 min 后,75% 乙醇浸泡消毒。在冰上取脑,剥切海马,置于无 RNA 酶的 Eppendorf 管中,-80℃保存。取 100 mg 脑组织按照说明书利用 Trizol 法进行 mRNA 提取操作,使用 DEPC 处理无菌水溶解 RNA 样品,紫外分光光度计定量 RNA 浓度,提取 RNA 在 A260/A280 值在 1.6~1.8 之间。RNA 提取成功后,严格按 MBI 说明书进行逆转录 PCR 操作,成功扩增出 cDNA 作为 PCR 模板, β -actin 作为对照。*MDR1*、 β -actin 引物序列见表 1。采用 25 μ L 体系,退火温度为 56℃,35 个循环。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,数码凝胶图像分析系统进行图像分析,PCR 所测 *MDR1* 的表达值以 mRNA 的灰度值/相应 β -actin 的灰度值表示。

表 1 大鼠 *MDR1* 和 β -actin 引物序列

引物名称	引物序列	PCR 产物大小
R- <i>MDR1</i> -P1	5'-TCCAGCGGCAGAACAGCAAC-3'	231 bp
R- <i>MDR1</i> -P2	5'-GAGCAGCGTCATTGGCAAGC-3'	
R- β -actin-P1	5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTCC-3'	146 bp
R- β -actin-P2	5'-TGTGTTGGCATAGAGGTCTTTACG-3'	

1.2.7 免疫组织化学法检测 P-gp 表达 各组取 10 只大鼠处死后经灌注固定取脑,恒冷箱切片,依次加入兔抗 P-gp (1:1 000) 4℃,72 h 湿盒孵育,辣根标记的山羊抗兔 IgG (1:200) 37℃ 1 h,SABC 复合物 (1:200) 37℃ 1 h,DAB 显色 5~15 min。上述每步间均用 PBS 充分洗涤。所有切片脱水、透明、中性树脂胶封片,光镜下观察、摄片。以 PBS 缓冲液替代一抗作阴性对照。应用彩色病理图文报告分析系统,对各组大鼠大脑海马随机抽取的不重叠 4 个视野进行分析,有棕黄色颗粒沉着者为阳性细胞,计算阳性吸光度值。

1.2.8 免疫印迹法检测 P-gp 表达 取冻存的组织 100 mg 提取总蛋白。制备 SD-PAGE 凝胶,加样电泳。采用湿转法转膜,将 PVDF 膜浸入含 10 g/L 的脱脂奶粉辣根过氧化物酶的 TBST 封闭液中,置于水平摇床上,室温封闭 1 h,然后用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min。用 TBST 配制一抗(兔抗大鼠 P-gp,1:400),将 PVDF 膜的放入配好的抗体稀释液中,保证抗体吸附面全部与液体接触,中间无气泡,4℃过夜,TBST 清洗 3 次,每次 10 min。用 TBST 配制 HRP 标记的山羊抗兔二抗(工作浓度为 1:2000)。化学显色后将光片采用 Bio-Rad2000 型凝胶成像系统扫描后,P-gp 的表达量以测定的 P-gp 的灰度值/

相应的 β -actin 的灰度值表示。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件处理数据。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用方差分析及 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 星形胶质细胞的纯化培养

取 3 次传代的细胞,接种至鼠尾胶原包被的盖玻片上,用胶质纤维酸性蛋白抗体做免疫荧光检测,GFAP 阳性细胞约为 $(95 \pm 2)\%$ 。

2.2 MTT 法测定

发现 TNF- α 干预后 2 h 无明显增生,24 h 增生明显,48 h 回落。见表 2。

2.3 不同增生程度星形胶质细胞对 MDR1 表达的影响

2.3.1 PCR 测定 MDR1 表达 经灰度分析, TNF- α 组的 MDR1 较对照组表达增高,且和星形胶质细胞的增生程度正相关。见图 1、表 3。

2.3.2 免疫组化测定 P-gp 表达 TNF- α 组的 P-gp 表达量较对照组增高,且和增生程度正相关,2 h 开始升高,24 h 达高峰,48 h 回落。见图 2、表 3。

2.3.3 免疫印迹法测定 P-gp 表达 免疫印迹法检测 P-gp 蛋白表达及灰度值比值分析见图 3、表 3, TNF- α 刺激组与正常对照组相比,P-gp 表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 TNF- α 干预后的星形胶质细胞吸光度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	吸光度
对照组	6	0.533 $\pm$ 0.033
2 h 组	6	0.568 $\pm$ 0.030
24 h 组	6	1.202 $\pm$ 0.042 ^{a,b}
48 h 组	6	0.643 $\pm$ 0.014 ^{a,c}
F 值		756.27
P 值		<0.05

a: 与对照组相比 $P < 0.05$; b: 与 2 h 组比较, $P < 0.05$; c: 与 24 h 组比较, $P < 0.05$

表 3 PCR 法、免疫组化法及免疫印迹法检测 MDR1 或 P-gp 灰度分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PCR 检测 MDR1	免疫组化法检测 P-gp	免疫印迹法检测 P-gp
对照组	10	5 440 $\pm$ 193	0.277 $\pm$ 0.020	879 $\pm$ 45
2 h 组	10	9 209 $\pm$ 227 ^a	0.392 $\pm$ 0.020 ^a	1 201 $\pm$ 103 ^a
24 h 组	10	21 229 $\pm$ 546 ^{a,b}	0.421 $\pm$ 0.070 ^{a,b}	1 914 $\pm$ 88 ^{a,b}
48 h 组	10	14 311 $\pm$ 478 ^{a,c}	0.361 $\pm$ 0.024 ^{a,c}	937 $\pm$ 40 ^{a,c}
F 值		3036.41	25.20	412.47
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

a: 与对照组相比 $P < 0.05$; b: 与 2 h 组相比, $P < 0.05$; c: 与 24 h 组相比, $P < 0.05$

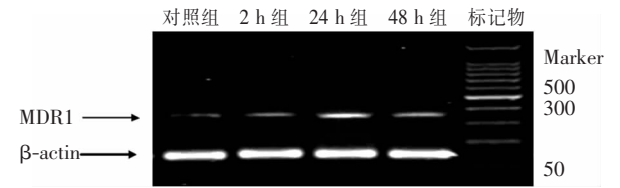


图 1 各组大鼠 MDR1 表达 PCR 结果

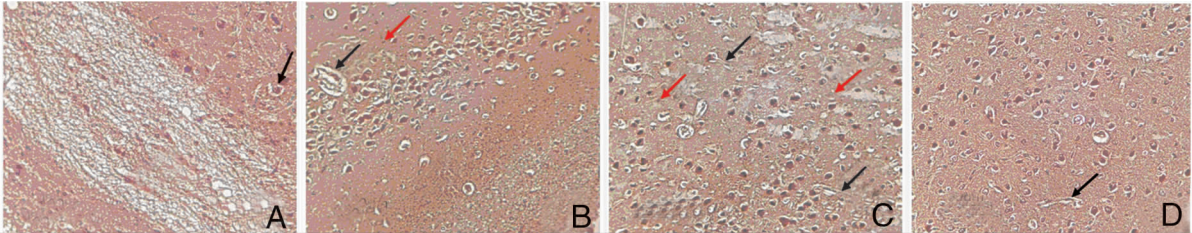


图 2 P-gp 在各组脑组织中的表达(免疫组织化学染色, $\times 100$) A: 对照组 P-gp 表达很少,主要在毛细血管内皮细胞及少数星形胶质细胞胞浆中; B: 2 h 组 P-gp 表达稍增高,主要在毛细血管内皮细胞及少数星形胶质细胞胞浆中和部分神经元上; C: 24 h 组 P-gp 表达明显增高,主要在毛细血管内皮细胞及少数星形胶质细胞胞浆中和神经元上; D: 48 h 组 P-gp 表达回落,但仍可在毛细血管内皮细胞及少数星形胶质细胞胞浆中和神经元上表达(黑色箭头示毛细血管内皮细胞,红色箭头示星形胶质细胞)。

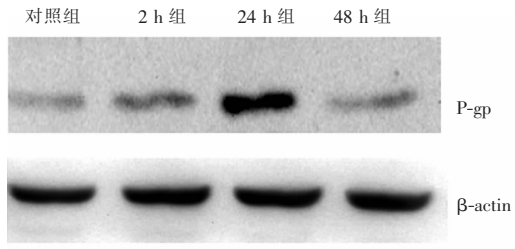


图 3 免疫印迹法检测 P-gp 蛋白表达

3 讨论

难治性癫痫是长期困扰癫痫临床治疗的难题,近年来对难治性癫痫研究重点集中在其耐药机制上。一些难治性癫痫患者脑组织免疫组化研究表明,在胶质细胞特别是一些增生性星形胶质细胞胞体以及突起都有 MDR 蛋白的不同程度表达^[2-7],说

明星形胶质细胞和难治性癫痫的形成之间有相关性。星形胶质细胞是如何影响耐药基因表达的,其机制目前尚不清楚。

本研究通过 TNF- α 诱导体外星形胶质细胞增生,观察不同增生程度星形胶质细胞培养液对癫痫 SD 大鼠脑组织 *MDR* 表达的影响,结果表明,增生的星形胶质细胞培养液可使惊厥大鼠脑组织 *MDR* 表达上调,表达量与增生程度一致,与既往在体研究^[8-10]结果一致。丁成云等^[5]和 Marchi 等^[6]的研究还发现,表达升高的 *MDR* 蛋白(P-gp)的阳性标记细胞几乎均为星形胶质细胞,*MDR1* 和星形胶质细胞活化标志物 GFAP 的免疫双标记结果显示,在难治性癫痫的反应性脑星形胶质细胞内同时具有 GFAP 和 *MDR1* 蛋白的高表达。这些研究大多是在体研究,内环境复杂,而本研究为体外实验,实验干扰因素少,有力地证实星形胶质细胞增生可使 *MDR* 表达上调,和难治性癫痫的形成有一定相关。

MDR 是一种能量依赖性膜蛋白基因超家族,啮齿类以 *MDR1* 为主。*MDR1* 所编码的 P-gp 表达增高可阻止抗癫痫药物(AEDs)进入靶细胞,以往的研究已经证实许多常用的抗癫痫药物均可作为 P-gp 的底物^[7]。在体微透析技术证实,P-gp 抑制剂可影响 *MDR1* 表达,可显著提高局部脑区细胞外液中 AEDs 的浓度^[8-9]。P-gp 通过利用分解 ATP 所释放出的能量,以主动转运的方式将多种 AEDs 泵出细胞外或者泵回到血液中,从而减少了 AEDs 在脑组织中的浓度,降低了抗癫痫药物的作用效果和神经元对药物的敏感性,参与了难治性癫痫患者对 AEDs 耐药的机制。本研究通过 TNF- α 刺激体外培养不同增生程度的星形胶质细胞后发现,星形胶质细胞培养液对 *MDR* 表达有调控作用,同时也证实星形胶质细胞增生与 *MDR* 表达呈时间依赖性。对星形胶质细胞分泌功能的研究证实,在癫痫发作前后星形胶质细胞所分泌的细胞因子等发生了明显的变化^[14]。由此推测星形胶质细胞对 *MDR* 的表达调控可能也是通过多种活性成分实现的。与癫痫相关研究较多的细胞因子是白细胞介素 1(IL-1)和 TNF- α 。在中枢神经系统中,星形胶质细胞上存在 TNF- α 的受体,本研究采用 TNF- α 作为激活物,TNF- α 与其受体结合后,可激活磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C,该酶活化后可水解细胞膜磷脂酰胆碱,释放甘油二酯,游离的甘油二酯激活使鞘磷脂水解,释放出神经酰胺,神经酰胺结合并激活 I- κ B 激酶与核因子- κ B(NF- κ B)解离。有活性的 NF- κ B 进入核内,启动含有 NF- κ B 序列的基因转录^[15]。这些靶基因不仅包括

了 TNF- α ,也包括 *MDR* 等。

本研究证实星形胶质细胞对难治性癫痫 *MDR* 的表达具有调控作用,这种作用可能是通过细胞因子作用于星形胶质细胞或者激活的星形胶质细胞能够产生多种的趋化因子和细胞因子,如 TNF- α 、IL-1 来实现的。今后的研究中有望通过调控星形胶质细胞增生和/或细胞因子的分泌或作用来抑制 *MDR* 的表达,从而为寻找新的控制难治性癫痫的作用靶点提供新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Lazarowski A, Massaro M, Schteinschnaider A, Intruvini S, Sevrer G, Rabinowicz A. Neuronal *MDR-1* gene expression and persistent low levels of anticonvulsants in a child with refractory epilepsy [J]. Ther Drug Monit, 2004, 26 (1): 44-46.
- [2] Golden PL, Pardridge WM. Brain microvascular p-glycoprotein and a revised model of multidrug resistance in brain [J]. Cell Mol Neurobiol, 2000, 20 (2): 165-181.
- [3] Sisodiya SM, Lin WR, Squier MV, Thom M. Multidrug-resistance protein 1 in focal cortical dysplasia [J]. Lancet, 2001, 357 (9249): 42-43.
- [4] Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, Squier MV, Thom M. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy [J]. Brain, 2002, 125 (1): 22-31.
- [5] 丁成云,徐群洲,栾国明,杨慧,王元身. *MDR-1* 和 GFAP 蛋白在难治性癫痫脑组织的表达 [J]. 中华神经外科杂志, 2002, 18 (40): 238-240.
- [6] Marchi N, Hallene KL, Kight KM, Cucullo L, Moddel G, Bingaman W. Significance of *MDR1* and multiple drug resistance in refractory human epileptic brain [J]. BMC Med, 2004, 2 (10): 37-49.
- [7] Christin E. Pharmacoresistance: Modern concept and basic data derived from human brain tissue [J]. Epilepsia, 2003, 44 (5): 9-15.
- [8] Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain [J]. Neuropharmacol Neurotoxicol, 2001, 12 (16): 3557-3560.
- [9] Potschka H, Loscher W. In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats [J]. Epilepsia, 2001, 42 (10): 1231-1240.
- [10] Qu H, Eloqayli H, Muller B, Aasly J, Sonnewald U. Glial-neuronal interactions following kainite injection in rats [J]. Neurochem Int, 2003, 42 (1): 101-106.
- [11] McCarthy KD, Devellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue [J]. J Cell Biol, 1980, 85 (3): 890-902.
- [12] 李丹,黄绍平,马伟军,张婕. 氯化锂-匹鲁卡品癫痫动物模型的建立 [J]. 陕西医学杂志, 2006, 1 (35): 15-17.
- [13] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1991.
- [14] Haspolat S, Mihci E, Coskun M, Gümüslü S, Ozbun T, Yeğin O. Interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and nitrite levels in febrile seizures [J]. Child Neurol, 2002, 17 (10): 749-751.
- [15] Diehl JA, Tong W, Sun G, Hannink M. Tumor necrosis factor-alpha-dependent activation of a RelA homodimer in astrocytes. Increased phosphorylation of RelA and MAD-3 precede activation of RelA [J]. J Biol Chem, 1995, 270 (6): 2703-2707.

(本文编辑:王庆红)