

神经生长因子和托吡酯对红藻氨酸致痫大鼠 海马神经细胞 caspase-3 表达的影响

张彦¹ 朱凤莲² 郭学鹏³

摘要 目的:观察红藻氨酸(KA)致痫大鼠海马 caspase-3 表达情况,探讨神经生长因子(NGF)和托吡酯(TPM)对 KA 致痫大鼠脑神经细胞的保护作用。方法:60 只日龄 25—35 天健康大鼠随机分成 4 组(n=15 只):A 组(正常 NS 对照组),B 组(KA 致痫模型对照组),C 组(TPM 治疗组),D 组(TPM 和 NGF 联合治疗组)。分别于 KA 注射后第 1d,3d,7d 将各组动物处死 5 只,常规方法灌注固定,制作冰冻切片,用免疫组化方法检测大鼠海马 caspase-3 的表达情况,HPAS-2000 显微图像定量分析系统进行定量分析。结果:TPM 和 NGF 联合治疗组(D 组)大鼠海马 caspase-3 阳性神经元计数和平均光密度值与 B 组相同时间点相比表达明显减少,有显著性差异($P<0.05$),与 TPM 治疗组(C 组)相同时间点相比表达亦均有明显减少,并有显著性意义($P<0.05$)。结论:TPM 能抑制致痫大鼠海马 caspase-3 的表达,与 NGF 联用有协同作用。

关键词 癫痫;caspase-3;神经生长因子;托吡酯

中图分类号:R742.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-02-0109-03

Effect of nerve growth factor and topiramate on the expression of caspase-3 in the hippocampus in rats with kainic acid induced seizures/ZHANG Yan,ZHU Fenglian,GUO Xuepeng//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(2): 109—111

Abstract Objective: To observe the expression of caspase-3 in hippocampus of epileptic rat induced by kainic acid(KA),and explore the neuroprotective effect of Topiramate(TPM) and nerve growth factor(NGF) to epileptic rat induced by kainic acid. **Method:** Sixty healthy age from 25 to 35 days rats were randomly divided into 4 groups (n=15): normal sodium (NS) treated as control group (A),KA treated as model group (B),TPM treated as group C, combination of NGF and TPM handled as group D. Five rats in each group were sacrificed by perfusion with Polyoxymethylene respectively on the 1st day, 3rd day and 7th day after injection of KA and frozen section were made. The expression of caspase-3 in hippocampus of rats were indicated by immunohistochemical method and quantified by HPAS-2000.**Result:** In the same time,the expression of caspase-3 in group D decreased remarkably compared with group B and C ($P<0.05$). **Conclusion:** TPM can inhibit the expression of caspase-3 caused by epileptic seizure in rat. Combination of TPM and NGF have synergistic effect.

Author's address Dept. of Paediatrics,The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College,453100

Key words epilepsy;caspase-3;nerve growth factor;topiramate

癫痫是儿科常见的神经系统疾病。常规抗癫痫药对约 25% 的患儿治疗效果欠佳^[1]。癫痫后期常见的智能减退、精神症状以及耐药性癫痫的形成都与神经元坏死和继之的神经网络重建有关。因而,抑制癫痫发作所致的神经元凋亡,是改善癫痫患者预后的关键因素之一。神经生长因子(nerve growth factor,NGF)作为一种多肽因子,目前已用于治疗外周神经系统疾病,而近些年来,体内、外试验亦证实 NGF 具有明显的中枢效应^[2],外源性 NGF 具有抑制神经细胞凋亡的作用。托吡酯(topiramate,TPM)是 2,3,4,5-双氧-1-甲基亚乙基- β -D 吡喃果糖氨基磺酸盐,是儿科临床常用抗癫痫新药。对于 NGF 与抗癫痫药联合应用治疗癫痫,目前国内外尚缺乏相关的实验或者临床报道。

本文通过建立红藻氨酸(kainic acid,KA)诱导

癫痫的大鼠动物模型,应用 NGF 联合 TPM 治疗大鼠癫痫,观察大鼠海马 caspase-3 表达情况,探讨两者联用对癫痫大鼠神经细胞凋亡的影响,为提高癫痫的疗效和改善癫痫的预后提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于 2005 年 7 月—12 月在新乡医学院形态学研究室完成。选用健康 25—35 日龄大鼠 60 只,体重 38—52g,由新乡医学院实验动物中心提供。大鼠饲养期间避免噪音及强光刺激,保证动物食水供应

1 新乡医学院第一附属医院儿内二科,河南省新乡市,453100

2 新乡医学院第一附属医院儿内一科

3 新乡医学院

作者简介:张彦,女,住院医师

收稿日期:2006-06-19

并保持室温 20℃左右。

1.2 主要仪器和试剂

HPIAS-2000 显微图像定量分析系统, MLAWBT9 Powerlab 生理记录仪 (澳大利亚), CM-1800 型冰冻切片机 (德国 Leica), KA (美国 sigma 公司, 货号: K0250), TPM (西安杨森, 批号: H20020555), NGF (厦门北大之路, 批号: S20020116), 即用型 SABC 试剂盒 (武汉博士德)。

1.3 实验动物分组

健康 25—35 日龄大鼠 60 只。随机分为 4 组, 每组 15 只。A 组为生理盐水对照组; B 组为红藻氨酸致痫模型对照组; C 组为托吡酯治疗组; D 组为神经生长因子和托吡酯联合治疗组。

1.4 癫痫动物模型的制作

KA 用生理盐水配成 2mg/ml, 以 2ml/kg 予 B、C、D 组大鼠腹腔注射, 仅 1 次。注射完观察记录痫性发作的级别, 并录像, 做脑电图。C 组每只大鼠自腹腔注射 KA 后 15—20min 予 TPM 50mg/kg 灌胃, 首次用药 8h 后死亡 3 只, 随即补缺; D 组每只大鼠自腹腔注射 KA 后 20—30min 给予 NGF 2000AU/kg 腹腔注射, 同时予 TPM 50mg/kg 灌胃。A 组用生理盐水 2ml/kg 灌胃和腹腔注射。以上操作均每日 1 次, 于上午 8:00—10:00 完成, 连续用 7d。参照 Racine^[3] 分级法制定惊厥标准。

1.5 caspase-3 的检测

分别于红藻氨酸注射后 1d, 3d, 7d 时将各分析组动物处死 5 只。大鼠麻醉下行左心室主动脉插管后, 予 4% 多聚甲醛 (4℃) 灌注固定, 迅速断头取脑进行后固定。用恒冷冰冻切片机行冠状面连续切片, 从视交叉处开始切片, 片厚 10—12μm, 每个标本切片 10 到 12 张。0.3% H₂O₂ 室温下孵育 10min; 滴加 5% BSA 血清封闭液 37℃ 20min; 滴加一抗 (Rabbit anti-Caspase-3) 4℃ 过夜; 加生物素化二抗 37℃ 30min; 加 SABC 37℃ 20min; DAB 显色, 剃度酒精脱水; 二甲苯透明; 中性树脂胶封片。每组次染色切片数均衡以避免 DAB 显色时间不等对组间造成的影响。一抗稀释浓度为 1:200。采用 HPIAS-2000 显微图像定量分析系统进行图像分析。每组次选取 8 个视野, 采用统一的照相倍数, 统一采样, 对其染色强度进行定量分析, 并进行阳性细胞计数。

1.6 统计学分析

本实验结果均为计量资料, 所得数据用均数±标准差表示, 用 SPSS11.0 软件进行统计分析, 单因素多均数间比较用方差分析, 均值间两两比较作 *q* 检验。α=0.05 为检验水准, *P*<0.05 有显著性差异。

2 结果

2.1 行为学和脑电图表现

注射 KA 30min 左右开始出现凝视、动须、竖毛、下肢频繁抓挠面部、咀嚼动作、湿狗样抖动 (I 级); 然后出现闭眼、点头、头部震颤、头部左右摇摆 (II 级); 竖尾、原地旋转、单侧肢体抬起抖动 (III 级); 双上肢抬起抖动伴口吐白沫 (IV 级); 跌倒伴四肢强直抽搐和竖尾 (V 级)。间断发作, 持续约 5h。给药后 60—100min, 模型大鼠脑电图开始出现以棘波、尖波、尖慢综合波等波形为主的散在癫痫波形, 间断发作。对照组生理盐水腹腔注射后, 未见癫痫样波发放 (见图 1—2, 见前置彩色插页 7)。

2.2 脑组织内 caspase-3 表达情况

caspase-3 阳性细胞呈棕褐色或者棕黄色分布于皮质各层和海马及齿状回。正常对照组海马内存有少量 caspase-3 基础表达, 但染色强度极弱 (图 3)。C 组海马 caspase-3 阳性神经元计数与 B 组相同时间点比较均减少, 并有显著性差异 (*P*<0.05), 见表 1、图 3, 见前置彩色插页 7)。caspase-3 阳性神经元平均光密度值的测定亦显示相同结果 (见表 2)。D 组海马相同时间点 caspase-3 阳性神经元计数和平均光密度值与 B 组相比表达均明显减少, 有显著性差异 (*P*<0.05), 见表 1—2, 图 3), 与 C 组相比表达亦均有明显减少, 并有显著性意义 (*P*<0.05)。

表 1 实验各组海马 caspase-3 阳性细胞计数 ($\bar{x}\pm s$)

组别	1d	3d	7d
A 组	0.30±0.05	0.34±0.06	0.29±0.01
B 组	15.00±3.02 ^①	18.40±3.86 ^①	16.45±2.70 ^①
C 组	7.07±1.46 ^②	10.10±2.02 ^②	8.30±1.83 ^②
D 组	3.20±1.81 ^{②③}	5.01±1.09 ^{②③}	2.30±1.56 ^{②③}

①与 A 组比较 *P*<0.05; ②与 B 组比较 *P*<0.05; ③与 C 组比较 *P*<0.05

表 2 实验各组海马 caspase-3 阳性细胞平均光密度值的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	1d	3d	7d
A 组	0.216±0.272	0.298±1.077	0.187±0.103
B 组	3.950±0.839 ^①	6.242±0.221 ^①	2.916±0.272 ^①
C 组	1.261±0.148 ^②	2.241±0.027 ^②	2.598±0.117 ^②
D 组	0.353±0.224 ^{②③}	0.314±2.089 ^{②③}	0.394±0.142 ^{②③}

①与 A 组比较 *P*<0.05; ②与 B 组比较 *P*<0.05; ③与 C 组比较 *P*<0.05

3 讨论

自 1883 年 Openchowski 首先采用冷冻大脑组织造成致痫灶以来, 实验性癫痫动物模型的建立已积累了大量经验和资料。近年较常用的是 KA 诱发癫痫动物模型。全身或局部给予惊厥剂量的 KA, 可以与谷氨酸、天冬氨酸能末梢的突触前膜 KA 受体相结合, 产生突触后电位, 选择性的激活边缘系统, 引起急性癫痫发作及以后长期反复发作, 这就是 KA 癫痫模型。

本实验所得结果与 Racine 分级法的描述基本

一致, 发作期脑电图显示出典型的高幅棘波、尖波和尖慢叠加波等癫痫波形。其发作时的行为学表现及脑电图表现均表明本 KA 癫痫模型是成功的。

TPM 是一种不同于其他 AEDs 的单糖类新型抗癫痫药物。近年来 TPM 在临床试验中已被证实是广谱的抗癫痫药, 在部分发作性癫痫、全身发作性癫痫、Lennox-Gastaut 综合征、West 综合征及 Dravet 综合征治疗中均有效^[4]。

本实验结果显示: C 组海马 caspase-3 阳性神经元计数与 B 组相同时间点比较均减少, 并有显著性差异。caspase-3 阳性神经元平均光密度值的测定亦显示相同结果。说明 TPM 能抑制 KA 所致癫痫的神经元凋亡, 对神经细胞有保护作用。国内学者研究发现^[5], 惊厥后应用 TPM 同样可减少神经元的死亡、凋亡, 缓解胶质细胞增生, 具有保护作用。国内常桂芬^[6]等通过建立点燃发育期大鼠癫痫模型, 并给予 TPM 灌胃, 观察癫痫大鼠血清神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE) 水平变化及海马区病理改变, 得到如下结果: 托吡酯治疗组大鼠惊厥出现时间晚, 发作程度轻, 海马区神经元坏死较轻, NSE 水平在第 7 天曾有明显增高, 此后有逐渐下降趋势, 第 14, 21 天降至正常范围, 证明托吡酯具有可靠的控制惊厥发作的抗癫痫作用, 并有一定程度的神经元保护作用。TPM 神经保护作用可能机制为: ①与其调节神经传递有关^[7]; TPM 通过作用于 Na⁺通道、KA/AMPA 型谷氨酸受体, 来改变这些受体惊厥后的序列变化; ②TPM 能够减轻神经元 Ca²⁺内流及突触前兴奋性氨基酸的释放; ③TPM 可能是一种结构独特的神经营养因子^[8]。

神经生长因子是 20 世纪 50 年代初由 Levi-Montalcini R 在小鼠肉瘤细胞内发现的第一个神经营养因子, 它是由 2 条肽链借共价键联成的二聚体, 每条链由 3 个亚单位即 α , β , γ 组成的大分子蛋白, 其中 β 亚单位是其活性单位。80 年代之前, 人们已认识到 NGF 对外周神经系统的作用。近些年来, 国内外学者通过体内、外实验证实 NGF 有明显的中枢效应^[1]。外源性 NGF 在中枢神经系统损伤时可保护脑内胆碱能神经元, 促进神经纤维再生, 逆转由于损伤造成的胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 活力下降^[9]。离体实验结果证明在培养液中除去 NGF 能够诱导神经元凋亡^[10]。

国外学者已经通过动物实验证实 NGF 能够增加钙结合蛋白的表达, 缓冲 Ca²⁺内流, 降低细胞内 Ca²⁺浓度, 从而起到保护神经细胞功能的作用。因此, 我们认为 NGF 可减轻癫痫所致脑细胞损伤。

NGF 如何作用于 caspase-3 目前还不清楚, 可能与 NGF 拮抗兴奋性氨基酸毒性、增加自由基清除剂活性、稳定细胞内钙离子浓度等有关^[11]。Shimoke 等^[12]在 2004 年证实了以下结果: caspase-12 经由 NGF 介导的磷脂酰肌醇-3 激酶的信号转导途径的失活导致了包括 caspase-3 和 caspase-9 在内的 caspase 级联反应的失活, 从而间接说明了 NGF 有抑制凋亡的作用。

本文结果显示, D 组海马相同时间点 caspase-3 阳性神经元计数和平均光密度值与 B 组相比表达明显减少, 有显著性差异, 与 C 组相比表达亦均有明显减少, 并有显著性意义。说明 TPM 和 NGF 联合应用能有效抑制癫痫脑损伤所致的神经元凋亡, 并达到比单用 TPM 更好的神经细胞保护作用。

4 结论

抗癫痫新药 TPM 对 KA 致痫大鼠具有明显的神经保护作用, 神经生长因子亦可透过血脑屏障抑制 KA 致痫大鼠的神经元凋亡, 并且二者具有协同作用。为临床联合应用抗癫痫药和神经营养因子治疗癫痫、改善癫痫的预后提供理论依据。

参考文献

- [1] 杨锡强, 易著文主编. 儿科学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 455.
- [2] Shelton DL, Reichardt LF. Studies on the expression of the beta nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: level and regional distribution of NGF mRNA suggest that NGF functions as a trophic factor for several distinct populations of neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(8): 2714—2718.
- [3] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation II: Motor seizure [J]. Electroencephal Clin Neurophysiol, 1972, 32: 281—294.
- [4] Mikaeloff Y, deSaint-Martin A, Mancini J, et al. Topiramate: efficacy and tolerability in children according to epilepsy syndromes[J]. Epilepsy Res, 2003, 53(3): 225—232.
- [5] 施亿赞, 王艺, 邵肖梅, 等. 幼鼠持续惊厥状态脑损伤时托吡酯的神经保护作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(3): 194—195.
- [6] 常桂芬, 胡晓兰, 郭虎, 等. 托吡酯对发育期大鼠癫痫模型神经元损伤的保护作用[J]. 中国临床康复, 2004, 8(13): 2468—2469.
- [7] Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited [J]. Curr Opin Neurol, 2003, 16(2): 165—170.
- [8] Koliatsos VE, Ratan R. Cell death and diseases of the nervous system[M]. New Jersey: Humana Press, 1999, 361—378.
- [9] Phillips HS, Nishimura M, Amanini MP, et al. Rescue of NGF-deficient mice 11 basal forebrain cholinergic projections require NGF for target innervation but not guidance [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 124(1): 1—11.
- [10] Lindholm D, Mercer EA, Yu LY, et al. Neuronal apoptosis inhibitory protein: Structural requirements for hippocampal binding and effects on survival of NGF dependent sympathetic neurons[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1600: 1382147.
- [11] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD[J]. Nature, 1998, 391: 43—50.
- [12] Shimoke K, Amano H, Kishi S, et al. Nerve growth factor attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via suppression of caspase-12 activity [J]. Biochem (Tokyo), 2004, 135(3): 439—446.