

雷公藤内酯对癫痫模型大鼠海马神经元凋亡的保护作用研究

杨宜承^{1*}, 曾常茜^{1#}, 向彬¹, 赵薇¹, 王思澍²(1.大连大学医学院, 辽宁大连 116622; 2.吉林大学, 长春 130012)

中图分类号 R285.5; R971 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2516-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.07

摘要 目的:研究雷公藤内酯对癫痫模型大鼠海马神经元凋亡的保护作用。方法:皮下注射海人酸(10 mg/kg)以复制大鼠癫痫模型。实验分为对照(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)与雷公藤内酯(15 μg/kg)组,腹腔注射给药,每天1次,连续7 d。结晶紫染色观察海马神经元形态;免疫组化染色和Western blot法检测海马神经元B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达水平。结果:模型组大鼠海马神经元变性或丢失,胞体皱缩,形态不规则;雷公藤内酯组大鼠海马神经元的数量和形态明显改善。与对照组比较,模型组大鼠Bcl-2蛋白表达水平显著减弱,Bax蛋白表达显著增强($P < 0.05$);与模型组比较,雷公藤内酯组大鼠Bcl-2蛋白表达水平显著增强,Bax蛋白表达显著减弱($P < 0.05$)。结论:雷公藤内酯可通过上调癫痫模型大鼠海马神经元Bcl-2、下调Bax蛋白表达而抑制大鼠神经元凋亡。

关键词 雷公藤内酯;海人酸;神经元;B细胞淋巴瘤/白血病-2;Bcl-2相关X蛋白

Protective Effects of Triptolide on Neuronal Apoptosis in Epileptic Model Rats

YANG Yi-cheng¹, ZENG Chang-qian¹, XIANG Bin¹, ZHAO Wei¹, WANG En-shu²(1. Medical College of Dalian University, Liaoning Dalian 116622, China; 2. Jilin University, Changchun 130012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the protective effects of triptolide on neuronal apoptosis in detect the epileptic model rats. METHODS: Epileptic model was induced by hypodermic injection of kainic acid (10 mg/kg). Model rats were divided into control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline) and triptolide group (15 μg/kg). They were given relevant medicine intraperitoneally once a day for consecutive 7 days. Crystal violet staining was used to observe the morphological change of the hippocampal neuron. immunohistochemistry staining and Western blot assay were used to examine the expression of Bcl-2 and Bax protein in the hippocampal neuron. RESULTS: Crystal violet staining showed that the neurons of the hippocampal region exhibited neuronal degeneration or loss, body shrinkage and irregular morphology in model group. The number and morphology of neurons in triptolide group had been improved significantly. Compared with control group, the expression of Bcl-2 protein in model group was decreased significantly, while the expression of Bax protein was increased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, the expression of Bcl-2 in triptolide group was obviously increased, while the expression of Bax was obviously decreased ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Triptolide can inhibit the neuronal apoptosis of rats through up-regulating the expression of down-regulating Bcl-2 and Bax protein in the hippocampal region.

KEY WORDS Triptolide; Kainite; Neuron; Bcl-2; Bax

癫痫(Epilepsy)是一种脑部神经元异常放电所致大脑功能失调的慢性疾病,具有反复性、突然性的特点。癫痫反复发作可导致海马神经元损伤,而海马神经元受损又可导致癫痫发作加剧^[1]。雷公藤内酯是从雷公藤中分离得到的内酯二酯类化合物,是雷公藤提取物的主要活性成分,具有显著的抗凋亡作用。据文献报道,雷公藤内酯对帕金森和阿尔茨海默病模型大鼠有抗神经元凋亡作用^[2-4]。对于发病与其相类似的癫痫,雷公藤内酯是否具有抗凋亡作用,国内外均未见报道。本研究通过观察雷公藤内酯对海人酸(Kainate, KA)致癫痫大鼠神经元形态和B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达的影响,旨在探讨雷公藤内酯抗癫痫模型大鼠海马神经元凋亡的机制。

* 硕士研究生。研究方向:神经免疫学。E-mail: abelxx@sina.com

通信作者:教授,硕士研究生导师。研究方向:神经免疫学。电话:0411-87403415。E-mail: zengchangqian@163.com

1 材料

1.1 仪器

CX41型荧光显微镜(日本Olympus公司);L2890063型转印电泳槽、Universal Hood II型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);BS210S型电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

雷公藤内酯(批号:097K0663,纯度≥98%)、海人酸(美国Sigma公司);兔抗大鼠Bax抗体、兔抗大鼠Bcl-2抗体(美国Cell Signaling公司);Maker(加拿大Fermentas公司);免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 动物

清洁级SD大鼠30只,♂,体质量(230±10)g,由大连医科大学动物实验中心提供[动物使用许可证号:SCXK(辽)2008-0002]。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

大鼠sc海人酸(10 mg/kg)以复制癫痫模型。以Racine分类改良法^[6]为标准,达到第IV级为癫痫模型复制成功。实验分为3组^[1,3,5],即对照(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、雷公藤内酯(15 μg/kg)组。模型复制成功后ip给药,每天1次,连续7 d。

2.2 大鼠海马神经元形态的观察

末次给药后,通过心脏灌注、固定制成脑组织切片,脱蜡至水,0.1%结晶紫染液染色2 h,三蒸水洗2 min,75%、95%、100%酒精和二甲苯依次各洗1次,封片,镜下观察。

2.3 免疫组化染色法^[9]

末次给药后,通过心脏灌注、固定制成脑组织切片,脱蜡至水,修复抗原,抑制内源性过氧化酶活性,血清封闭20 min,一抗4℃过夜,二抗37℃作用1 h,三抗室温作用20 min,显色、复染、脱水、封片,镜下观察。用Image proplus图像分析软件测定海马Bcl-2、Bax蛋白表达的平均光密度(IOD)值,并进行统计分析。

2.4 Western blot法

通过梯度离心法分离神经元,加入裂解液于冰上裂解1 h,4℃下以12 000 r/min离心20 min,吸取上清,100℃水浴5 min,取出样品,冷却至室温后于-20℃贮藏。在595 nm波长处测定样品吸光度(A)值,根据A值计算出蛋白含量。加入100 μg预处理样品进行电泳、转膜,5%小牛血清封闭2 h,一抗孵育,4℃过夜,TBST(Tris-HCl缓冲盐溶液+Tween 80)洗涤,二抗孵育2 h,TBST洗涤,超敏发光液ECL显色,显影、定影、漂洗、晾干后用凝胶成像系统将图像扫描入计算机保存。用Quantity One软件进行灰度分析。以β-actin蛋白为内参,将各蛋白条带灰度值与β-actin的比值进行比较,以确定各蛋白在神经元上的表达水平。

2.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5软件进行统计分析,组间比较采用方差分析和LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 雷公藤内酯对模型大鼠海马神经元形态的影响

对照组大鼠神经元排列紧密,未见神经元损伤;模型组大鼠神经元胞体皱缩,排列不规则,且数量减少,呈凋亡形态学改变;雷公藤内酯组大鼠神经元排列较紧密,其数量和形态与对照组相似。

3.2 雷公藤内酯对模型大鼠神经元Bcl-2表达的影响

对照组可见Bcl-2阳性神经元一般为梭形,胞浆及细胞膜上有棕黄色阳性颗粒,神经元形态正常,排列紧密;模型组Bcl-2阳性神经元着色较浅,胞浆淡染,神经元形态及排列不规则,数量较对照组减少,且IOD较对照组显著降低($P < 0.05$);雷公藤内酯组Bcl-2阳性神经元染色较深,形态与正常组相似,排列较紧密,数量较模型组增多,IOD较模型组显著升高($P < 0.05$)。Bcl-2的表达见图1;大鼠神经元Bcl-2表达的IOD值见表1。

3.3 雷公藤内酯对模型大鼠神经元Bax表达的影响

Bax在对照组极少表达;模型组Bax阳性神经元着色较深,胞浆深染,数量较对照组多,且IOD较对照组明显升高($P < 0.05$)。雷公藤内酯组中,Bax阳性神经元染色较浅,数量较模型组显著减少,IOD较模型组显著降低($P < 0.05$)。Bax

的表达见图2;大鼠神经元Bax表达的IOD值见表1。

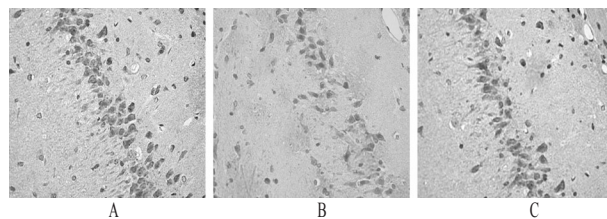


图1 Bcl-2的表达(400×)

A.对照组;B.模型组;C.雷公藤内酯组

Fig 1 The expression of Bcl-2 (400×)

A. control group; B. model group; C. triptolide group

表1 大鼠神经元Bcl-2和Bax表达的IOD值($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 IOD value of the expression of Bcl-2 and Bax in neuron of rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Bcl-2	Bax
对照组	0.186 ± 0.080	0.081 ± 0.013
模型组	0.061 ± 0.005*	0.192 ± 0.036*
雷公藤内酯组	0.210 ± 0.014 [#]	0.097 ± 0.008 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

vs. control group: * $P < 0.05$; vs. model group: [#] $P < 0.05$

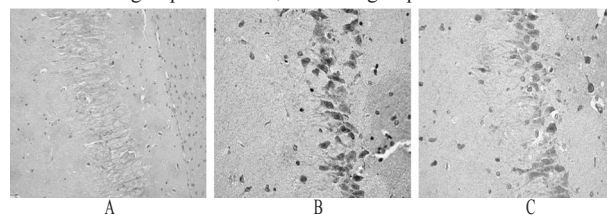


图2 Bax的表达(400×)

A.对照组;B.模型组;C.雷公藤内酯组

Fig 2 The expression of Bax (400×)

A. control group; B. model group; C. triptolide group

3.4 雷公藤内酯对模型大鼠Bcl-2和Bax蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组Bcl-2蛋白表达显著减弱($P < 0.05$),而Bax蛋白表达显著增强($P < 0.05$)。与模型组比较,雷公藤内酯组Bcl-2蛋白表达显著增强($P < 0.05$),而Bax蛋白表达水平显著减弱($P < 0.05$)。Bcl-2和Bax蛋白的表达见图3、表2。

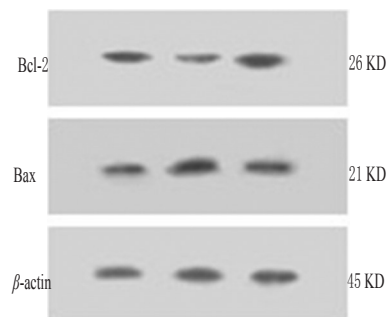


图3 Bcl-2和Bax蛋白的表达

Fig 3 Grey level of the expression of Bcl-2 and Bax protein

4 讨论

癫痫是由神经元异常放电引起的大脑功能失调性疾病。Engel T等^[7]在癫痫模型大鼠中发现线粒体凋亡蛋白在海马神经元中积聚,从而启动线粒体凋亡通路,释放凋亡相关的蛋白,导致海马神经元凋亡,而海马神经元受损又可加剧癫痫发

表2 Bcl-2和Bax蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Grey level of the expression of Bcl-2 and Bax protein ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Bcl-2	Bax
对照组	16.13±0.71	16.05±0.65
模型组	13.70±0.58*	19.73±0.89*
雷公藤内酯组	18.78±0.83*	17.94±0.79*

与对照组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: * $P<0.05$

vs.control group: * $P<0.05$;vs.model group: * $P<0.05$

作,因此研究癫痫后海马神经元凋亡具有重大意义。已有研究报道,雷公藤内酯对帕金森病和阿尔茨海默病均具有神经保护作用,其机制主要是通过调节Bcl-2蛋白家族的表达,抑制神经元凋亡^[2]。

Bcl-2家族是调节细胞凋亡的主要蛋白,由其抗凋亡成员与促凋亡成员组成。其中Bcl-2具有抑制细胞凋亡的作用,Bax具有促进细胞凋亡的作用,二者在细胞凋亡中起着中心作用。Bax与Bcl-2可构成异二聚体(Bcl-2/Bax),而Bax自身可组成同二聚体(Bax/Bax)。异二聚体与同二聚体的比值取决于Bcl-2与Bax蛋白量的比率,两者比率(Bcl-2/Bax)增大时促进细胞存活,反之则导致细胞凋亡。

本研究采用15 μg/kg雷公藤内酯进行研究,该剂量对大鼠体质量及组织器官等均无毒性影响^[8]。形态学检查结果发现,海人酸致痫后大鼠海马神经元减少,并表现出凋亡特征,这与Fugikawa DG^[9]报道的海人酸致痫大鼠海马神经元凋亡特征一致。而雷公藤内酯干预后,海马神经元数量和形态与对照组类似。提示雷公藤内酯可抵抗海人酸诱导的海马神经元凋亡。检测Bcl-2与Bax蛋白表达情况,发现海人酸致痫大鼠神经元Bcl-2蛋白表达显著减少,Bax蛋白表达显著增加,这与Zhang J等^[10]的研究报道基本一致。而雷公藤内酯干预后,Bcl-2蛋白表达增多,Bax蛋白表达减少。提示雷公藤内酯可上调Bcl-2,下调Bax,从而抵抗海人酸诱导的海马神经元凋亡。关于雷公藤内酯对Bcl-2蛋白家族其他成员的作用尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

[1] Sharma AK, Jordan WH, Reams RY, et al. Temporal pro-

file of clinical signs and histopathologic changes in an F-344 rat model of kainic acid-induced mesial temporal lobe epilepsy[J]. *Toxicol Pathol*, 2008, 36(7):932.

[2] 黄涛波,吕诚,胡小令,等.雷公藤内酯醇对AD模型大鼠海马神经细胞凋亡的影响[J].中国老年学杂志,2010,30(19):2766.

[3] Gao JP, Sun S, Li WW, et al. Triptolide protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats: implication for immunosuppressive therapy in Parkinson's disease[J]. *Neurosci Bull*, 2008, 24(3):133.

[4] 江华,翟所迪,王晓民.雷公藤内酯醇缓释微球的制备及体内外释放规律研究[J].中国药房,2009,20(3):176.

[5] Zhou HF, Liu XY, Niu DB, et al. Triptolide protects dopaminergic neurons from inflammation-mediated damage induced by lipopolysaccharide intranigral injection[J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 18(3):441.

[6] Borbely S, Dobo E, Czege D, et al. Modification of ionotropic glutamate receptor-mediated processes in the rat hippocampus following repeated, brief seizures[J]. *Neuroscience*, 2009, 159(1):358.

[7] Engel T, Hatazaki S, Tanaka K, et al. Deletion of Puma protects hippocampal neurons in a model of severe status epilepticus[J]. *Neuroscience*, 2010, 168(2):443.

[8] 徐元萍,章汉旺,肖风华,等.雷公藤内酯醇抗生育作用的有效性与安全性研究[J].医药导报,2007,26(6):594.

[9] Fugikawa DG. Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection[J]. *Epilepsy Behavior*, 2005, 7(Suppl 3):S3.

[10] Zhang J, Yan H, Wu YP, et al. Activation of GluR6-containing kainate receptors induces ubiquitin-dependent Bcl-2 degradation via denitrosylation in the rat hippocampus after kainate treatment[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(9):7669.

(收稿日期:2012-08-22 修回日期:2013-03-19)

中国药师组团参加美国卫生系统药师夏季会议

本刊讯 应美国卫生和公共服务部(HHS)、美国卫生系统药师协会(American Society of Health-System Pharmacists, ASHP)邀请,由国内著名医院药学专家孙春华、史丽敏、吴久鸿、陆进、王斌、叶丽卡、李宏建、张石革、刘丁、胡明洁等组团参加了2013年美国卫生系统药师夏季会议(The 2013 ASHP Summer Meeting)。会议于2013年6月1-6日在美国明尼阿波利斯市(Minneapolis)举行。

此次会议涉题广泛,包括官方政策和实施标准、药学服务与监护、用药安全、药品不良反应/事件、药学信息、健康教育等。会议期间,在主会场、分会场和小型论坛上,我方人员分

别听取了美国ASHP主席、美国专家与药师的学术报告,与全球同行分享了医学和药学的前沿信息,共同探讨了药学服务与临床实践的最新进展。

ASHP成立于1942年,是美国唯一的医院和卫生系统药师的国家级组织,在全球拥有35 000多名会员,代表在医院、卫生保健组织、长期监护部门、家庭保健和其他卫生系统工作的药师。ASHP的宗旨是:“药师的使命是提供药学保健,是提供直接的、负责的、与药物有关的任务”,目的是改善患者的生活质量。