

## 黄芩苷对海人酸致病小鼠海马白细胞介素-1 $\beta$ 及肿瘤坏死因子- $\alpha$ 表达的影响

欧阳龙强<sup>1</sup>, 梁日生<sup>2</sup>, 杨卫忠<sup>2</sup>, 石松生<sup>2</sup>, 王春华<sup>2</sup>, 涂献坤<sup>2</sup>, 王立胜<sup>1</sup>

1. 福建医科大学协和临床医学院, 福建省福州市 350001

2. 福建医科大学附属协和医院神经外科, 福建省福州市 350001

**摘要:** **目的** 探讨黄芩苷对海人酸诱导的小鼠癫痫持续状态后海马组织白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 表达的影响。 **方法** 将 54 只 ICR 雄性小鼠随机分为对照组、癫痫持续状态 (SE) 组、黄芩苷治疗组, 每组 18 只。采用侧脑室注入海人酸建立小鼠癫痫持续状态模型。HE 染色观察黄芩苷对小鼠癫痫持续状态后海马神经细胞的形态学影响。通过 RT-PCR 和 Western blot 分别检测小鼠海马组织中 IL-1 $\beta$  mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 及 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白的表达量。 **结果** 黄芩苷明显改善了 SE 后小鼠海马组织的病理形态学, 并且可降低 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 黄芩苷可能通过降低癫痫鼠海马组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达发挥抗炎作用, 从而对脑组织进行保护。

**关键词:** 癫痫; 黄芩苷; 海人酸; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 小鼠

## Effects of baicalin on the expression of IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ in the hippocampus of kainate-induced epileptic mice

OUYANG Long-Qiang, LIANG Ri-Sheng, YANG Wei-Zhong, SHI Song-Sheng, WANG Chun-Hua, TU Xian-Kun, WANG Li-Sheng.  
Union Clinical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

**Abstract: Objective** To study the effects of baicalin on the expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the hippocampus of kainate-induced epileptic mice. **Methods** Fifty-four ICR male mice were randomly divided into three groups: control, status epilepticus (SE) and baicalin groups. To establish animal model of status epilepticus, 0.1  $\mu$ g/5  $\mu$ l kainic acid was injected into the intracerebroventricular of the mice. HE staining was used to observe the pathological changes in hippocampus CA1 and CA3 areas. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the expression of the mRNA and protein levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , respectively. **Results** Baicalin significantly relieved the hippocampal injury after SE in mice, and decreased the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Baicalin may decrease the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and thus provides a neuroprotective effect on the hippocampus after SE in mice.

**Key words:** epilepsy; baicalin; kainic acid; interleukin-1 $\beta$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; mice

癫痫诱发免疫炎症反应是造成脑组织损伤的重要途径之一, 癫痫发作后可激活神经细胞、神经胶质细胞释放大量的炎症介质, 包括白细胞介素类 (ILs)、干扰素类 (IFNs)、肿瘤坏死因子类 (TNFs) 等<sup>[1]</sup>, 其中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )

是两个重要的促炎细胞因子, 它们不仅参与癫痫所致的脑内异常免疫炎症反应, 还可调节神经元的兴奋性。高水平的促炎细胞因子表达可导致海马苔藓纤维发芽变及硬化, 从而加剧癫痫的发作。所以干预促炎细胞因子的表达就可能减轻癫痫发作所造成的神经损伤。为此, 我们采用海人酸建立小鼠

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2011J01175)

收稿日期: 2011-11-17; 修回日期: 2012-01-18

作者简介: 欧阳龙强 (1983-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事功能神经外科方面研究。

通讯作者: 梁日生 (1967-), 男, 教授, 主任医师, 博士, 硕士生导师, 主要从事功能神经外科方面研究及临床工作。

癫痫持续状态模型,研究黄芩苷对小鼠海马组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组

由上海斯莱克实验动物中心提供的 ICR 健康雄性小鼠 54 只(许可证号:SCXK(沪)2007-0005),体重 23~28 g。随机分对照组、癫痫持续状态(SE)组和黄芩苷治疗组,共 3 个组,每组 18 只。

### 1.2 主要药品、试剂与仪器

海人酸(购自美国 BIOMOL 公司);黄芩苷(购自美国 sigma 公司);RT-PCR 试剂盒(购自美国 Promega 公司);兔抗鼠 TNF- $\alpha$  多克隆抗体(购自 santa Cruz 公司);兔抗鼠 IL-1 $\beta$  多克隆抗体(购自北京博森生物技术有限公司);蛋白浓度测定试剂盒(购自碧云天生物技术研究所以)。

PCR 扩增仪(德国 BIOMETRA 公司);酶标仪(美国 Thermo 公司);恒压电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);脑立体定位仪(深圳瑞沃德公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 制模与给药** 黄芩苷治疗组制在模前 30 min 给予黄芩苷 100 mg/kg(溶于生理盐水),海人酸模型组和对照组予以生理盐水<sup>[2]</sup>。按 Laursen 等<sup>[3]</sup>的方法在侧脑室注入海人酸:小鼠用氯胺酮(8 mg/kg)+安定(2 mg/kg)麻醉,固定于脑立体定位仪上,用 10  $\mu$ l 微量注射器于前囟位点刺入颅骨下 2.4 mm,注入 0.1  $\mu$ g/5  $\mu$ l 海人酸(溶于生理盐水),注射速度为 0.5  $\mu$ l/min。对照组注入等量生理盐水。

**1.3.2 标本制备** ICR 小鼠每组 6 只,10%水合氯醛腹腔麻醉后,用生理盐水与 4%多聚甲醛心脏灌注取脑,4%多聚甲醛浸泡过夜,前囟后 1.8~3.0 mm 处脑冠状切面行石蜡切片,用于 HE 染色。每组另取 12 只 ICR 小鼠,麻醉后断头取双侧海马,提取总蛋白与 RNA,分别用于 Western blot 与 RT-PCR。

**1.3.3 病理学检查** 石蜡切片行 HE 染色,观察海马 CA1 及 CA3 区神经细胞的病理形态学变化。

**1.3.4 RT-PCR 检测 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达** IL-1 $\beta$  引物序列(291bp):5'-GCT ACC TGT GTC TTT CCC GTG G-3'(上游),5'-TTG TCG TTG CTT GGT TCT CCT TG-3'(下游)。TNF- $\alpha$  引物序列(413bp):5'-'CCC CAA GTG ACA AGC CAG TA-3'(上游),5'-'CAA AGT CCA GAT TAG GCA GAT-3'(下游)。内参  $\beta$ -actin 引物序列(198bp):5'

ATC GTG CGT GAC ATC AAA GAGA3'(上游),5' TGC CAC AGG ATT CCA TAC CCAA3'(下游)。用 Trizol 提取海马组织总 RNA。逆转录合成 cDNA 第一链,取总 RNA 2  $\mu$ g 用于 cDNA 第一链的合成,操作步骤根据 RT-PCR 试剂盒说明进行。PCR 反应条件设置如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,退火(IL- $\beta$ :58 $^{\circ}$ C 40 s;TNF- $\alpha$ :55 $^{\circ}$ C 40 s),72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环。PCR 产物、 $\beta$ -actin 及 DNA Marker 在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,经凝胶成像系统摄影,扫描 PCR 产物强度,分析电泳带灰度值。以 IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  与  $\beta$ -actin 灰度比值表示 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  mRNA 相对含量。

**1.3.5 Western blot 检测 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白表达** 取各组小鼠双侧海马组织,匀浆后分别提取总蛋白以牛血清白蛋白作标准曲线,BCA 法测定蛋白浓度。常规电泳,转膜,封闭后分别加入 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  一抗抗体(1:800 用 TBST 稀释),4 $^{\circ}$ C 静置过夜,洗膜,加入辣根过氧化物酶标记二抗(1:2500 用 TBST 稀释),TBST 洗膜 3 次,吸取等量 SuperSignal-WestPico 超灵敏型检测试剂盒 A 液、B 液,均匀滴于 NC 膜上进行化学发光胶片显影,图像由 Bio-Rad 公司 Gel Doc XR 凝胶成像系统扫描,图像分析用 Quantity One(version 4.6)分析软件完成,计算 IL- $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的蛋白表达水平。

### 1.4 统计学处理

数据统计采用 SPSS 17.0 软件,实验结果以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析进行组间差异的显著性检验,再用 Bonferroni 法进行两两比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 黄芩苷对癫痫小鼠海马 CA1、CA3 区细胞形态学的影响

HE 染色结果显示,对照组海马组织结构正常,锥体细胞排列整齐,形态正常,细胞着色均匀,胞浆呈淡红色,胞核呈蓝色且较清亮(见图 1A、图 1D)。SE 组海马 CA1、CA3 区结构明显异常,细胞排列紊乱,深染成紫兰色,有的胞浆有空泡形成,有的神经元肿胀、呈梭形或三角形、分布不均、细胞周围间隙增宽,有的细胞体积缩小、细胞深染与皱缩、细胞与周围分界不清,核固缩深染、核仁消失、细胞排列稀疏,有的细胞呈现细胞核完全消失的神经元坏死改变(见图 1B、图 1E)。黄芩苷治疗组可见少量细胞深染与皱缩,核固缩深染,较 SE 组有显著改善(图 1C、图 1F)。

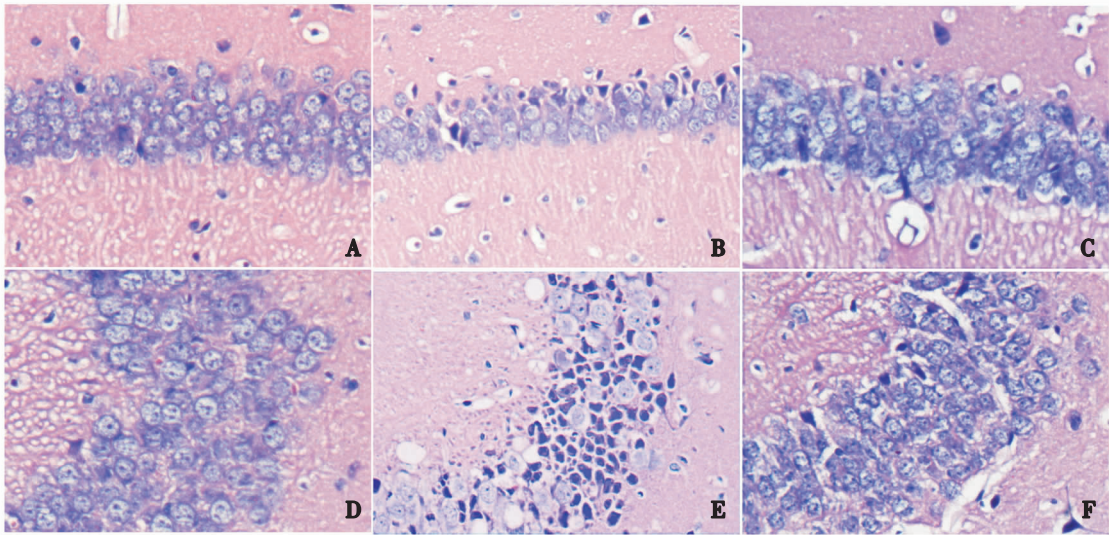


图1 小鼠癫痫持续状态后海马 CA1、CA3 区神经细胞的病理形态学变化(HE 染色 200 ×)。A ~ C 为 CA1 区;D ~ F 为 CA3 区。A、D 为对照组;B、E 为 SE 组;C、F 为黄芩苷治疗组。

2.2 黄芩苷对癫痫小鼠海马 IL-1β mRNA 和 TNF-α mRNA 表达的影响

自小鼠海马组织提取的总 RNA 经逆转录及 PCR 扩增后,均出现了背景清晰但亮度不同的条带,表示各组均有 IL-1β mRNA 和 TNF-α mRNA 的表达(见图 2),对各组条带进行光密度分析,可见对照组仅有少量的 IL-1β mRNA、TNF-α mRNA 表达,SE 组 IL-1β mRNA、TNF-α mRNA 表达明显增多( $P < 0.01$ ),与 SE 组比较,黄芩苷治疗组 IL-1β mRNA、TNF-α mRNA 的表达降低明显( $P < 0.05$ )(见图 2、表 1)。

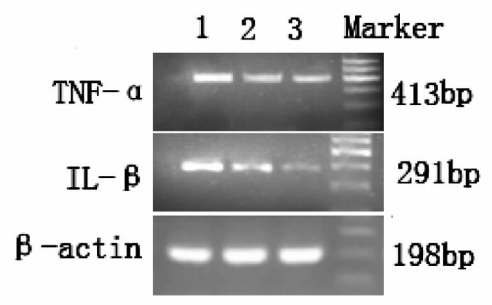


图2 RT-PCR 检测小鼠海马组织中 IL-1β mRNA 和 TNF-α mRNA 的表达。1 为 SE 组;2 为黄芩苷治疗组;3 为对照组。

表 1 IL-1β mRNA 和 TNF-α mRNA 在不同组中的表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-1β/β-actin mRNA	TNF-α/β-actin mRNA
SE 组	2.371 ± 0.072 <sup>#</sup>	2.314 ± 0.078 <sup>#</sup>
黄芩苷治疗组	1.743 ± 0.230 <sup>*</sup>	1.595 ± 0.316 <sup>*</sup>
对照组	0.780 ± 0.184	0.878 ± 0.278

注: # 为与对照组比较,  $P < 0.01$ ; \* 为与 SE 组比较,  $P < 0.05$ 。

2.3 黄芩苷对癫痫小鼠海马内 IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,对照组 IL-1β 和 TNF-α 蛋白的表达量均较少,癫痫发作后 IL-1β 和 TNF-α 蛋白量显著增加,二者之间的差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。与 SE 组相比,黄芩苷治疗组 IL-1β、TNF-α 蛋白的表达量显著降低( $P < 0.05$ )(见图 3、表 2)。

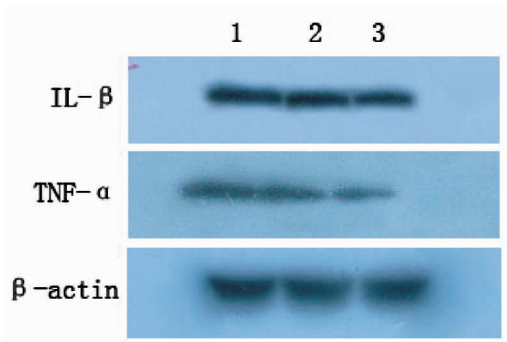


图3 Western blot 检测小鼠海马组织中 IL-1β 和 TNF-α 蛋白的表达。1 为 SE 组;2 为黄芩苷治疗组;3 为对照组。

表 2 IL-1β 和 TNF-α 蛋白在不同组别的表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-1β/β-actin 蛋白相对值	TNF-α/β-actin 蛋白相对值
SE 组	1.242 ± 0.047 <sup>#</sup>	1.364 ± 0.076 <sup>#</sup>
黄芩苷治疗组	0.950 ± 0.032 <sup>*</sup>	1.014 ± 0.053 <sup>*</sup>
对照组	0.812 ± 0.027	0.630 ± 0.080

注: #为与对照组比较,  $P < 0.01$ ; \* 为与 SE 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

癫痫持续状态是癫痫病人最严重的癫痫发作形式, 具有很高的发病率和致残率。海马是中枢神经系统内对癫痫最敏感的脑区之一, 癫痫发作易引起海马特定区域(如 CA1、CA3)神经细胞凋亡或坏死<sup>[4]</sup>。众所周知, 癫痫发作引起神经元损伤并没因其发作停止而终止, 反复痫性发作可造成脑组织缺血、缺氧, 产生大量活性氧自由基和炎症因子。癫痫继发的炎症级联反应在脑组织损伤中起重要作用。TNF-α 和 IL-1β 是两个重要的促炎细胞因子, 在癫痫的过程中也起重要作用。文献报道 IL-1β 受体在啮齿类动物海马内密度极高, 在海马内注射 IL-1β 增加了癫痫活动<sup>[5]</sup>。Shandra 等<sup>[6]</sup>在杏仁核点燃癫痫小鼠模型中发现, 经腹腔给予外源性 TNF-α 可导致癫痫放电延长。说明 IL-1β 和 TNF-α 作为一种兴奋性神经递质参与了癫痫的发病机制。此外, 孙威等<sup>[7]</sup>报道 IL-1β 和 TNF-α 在癫痫发作后表达增加, 12 h 达高峰, 之后逐渐下降。由此可见, 癫痫发作可导致 IL-1β、TNF-α 的合成和释放增加, 而 IL-1β、TNF-α 又进一步促进癫痫的发生和发展。本实验通过检测 IL-1β mRNA、TNF-α mRNA 及其蛋白的表达量发现, 小鼠癫痫发作后海马 IL-1β、TNF-α 的表达明显增多, 与文献报道一致。

黄芩苷是中药黄芩中提取的单体化合物, 属葡萄糖醛酸苷类, 易通过血-脑屏障, 具有抗氧化、抗炎、抗凋亡、抗肿瘤等功能<sup>[8]</sup>。最近有文献报道黄芩苷具有神经保护功能, 并已广泛运用于脑缺血再灌注损伤、脊髓缺血损伤等方面的研究。Tu 等<sup>[9]</sup>在脑缺血的模型中发现, 黄芩苷能减少大鼠脑缺血诱导的 IL-1β、TNF-α 的产生, 从而发挥抗炎作用。Cao 等<sup>[10]</sup>在脊髓缺血模型中报道, 黄芩苷能显著减少大鼠脊髓缺血诱导的 IL-1β、TNF-α 的产生。本课题组采用 KA 诱导小鼠癫痫持续状态模型, 探讨黄芩苷对小鼠癫痫持续状态海马神经细胞的保护

作用。我们的前期研究发现, 黄芩苷可明显减少 KA 诱导的海马组织丙二醛(MDA)的含量, 增加超氧化物歧化酶(SOD)活力和谷胱甘肽(GSH)含量, 可能通过抗氧化作用对癫痫引起的神经损伤进行神经保护<sup>[2]</sup>。本研究在前期工作的基础上进一步研究发现, 与 SE 组相比, 黄芩苷治疗组能显著减少小鼠癫痫持续状态后海马组织中 IL-1β、TNF-α 的表达, 黄芩苷可能还通过抗炎作用对海马神经细胞进行保护, 其具体作用途径与详尽机制有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Vezzani A, French J, Bartfai T, et al. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(1): 31-40.
- [2] 文帅, 梁日生, 杨卫忠, 等. 黄芩苷通过抗氧化作用减少海人酸诱导的海马神经细胞死亡. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(6): 483-486.
- [3] Laursen SE, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods*, 1986, 16: 355-357.
- [4] Sutula TP, Hagen J, Pitkanen A. Do epileptic seizures damage the brain? *Curr Opin Neurol*, 2003, 16(2): 189-195.
- [5] De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, et al. Inflammatory cytokines and related and related genes are induced in the rat hippocampus by status epilepticus. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(17): 2623-2633.
- [6] Shandra AA, Godlevsky, Vastyanov RS, et al. The role of TNF-alpha in amygdale kindled rats. *Neurosci Res*, 2002, 42: 147-153.
- [7] 孙威, 王维治. 海人酸致痫大鼠海马 IL-1β、TNF-α 的表达. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2007, 14(5): 289-292.
- [8] Xue X, Qu XJ, Yang Y, et al. Baicalin attenuates focal cerebral ischemic reperfusion injury through inhibition of nuclear factor kappaB p65 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 403(3-4): 398-404.
- [9] Tu XK, Yang WZ, Shi SS, et al. Neuroprotective effect of baicalin in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. *Neurochem Res*, 2009, 34(9): 1626-1634.
- [10] Cao Y, Li G, Wang YF, et al. Neuroprotective effect of baicalin on compression spinal cord injury in rats. *Brain Res*, 2010, 1357: 115-123.