

· 论著 ·

黄芩苷对海人酸致痫小鼠海马 X 染色体 连锁凋亡抑制蛋白表达的影响

廖正俭¹ 梁日生² 石松生² 王春华² 杨卫忠²

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 X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)表达的影响。方法 将90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30只;采用侧脑室注入海人酸建立小鼠癫痫持续状态模型。通过苏木素-伊红(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改变;应用免疫组化和 Western blot 方法检测小鼠海马组织中 XIAP 的表达量。结果 黄芩苷明显改善 SE 后小鼠海马组织的病理形态学,海马 CA3 区 XIAP 在 SE 后 6 h 起逐渐增加,12 h 达高峰,24 h 有所下降;与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。黄芩苷治疗组海马 XIAP 蛋白表达在 6 h、12 h 和 24 h 均高于 SE 组($P < 0.05$)。结论 黄芩苷对小鼠癫痫持续状态后海马神经细胞的保护作用,可能与其促进 XIAP 的表达有关。

关键词: 癫痫; 黄芩苷; 染色体连锁凋亡抑制蛋白; 神经保护; 小鼠

Effect of baicalin on expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in hippocampus of mice after kainic acid-induced status epilepticus

LIAO Zheng-Jian, LIANG Ri-Sheng, SHI Song-Sheng, WANG Chun-Hua, YANG Wei-Zhong. Union Clinical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of baicalin on the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in the hippocampus of mice after kainic acid-induced status epilepticus (SE). **Methods** Ninety male ICR mice were randomly and equally divided into three groups: control, SE, and baicalin treatment groups. A mouse model of SE was established by injection of 0.1 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ kainic acid into the lateral ventricle. HE staining was used to observe the pathological changes in hippocampal CA1 and CA3 regions after SE; the expression of XIAP was measured by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Baicalin significantly reduced the pathological changes in the hippocampus of mice after SE. In the SE group, the expression of XIAP in hippocampal CA1 and CA3 regions increased gradually since 6 hrs after SE, reached the peak level at 12 hrs, and decreased at 24 hrs; the expression of XIAP was significantly higher in the SE group than in the control group at the three time points ($P < 0.01$); compared with the SE group, the baicalin treatment group had significantly higher expression of XIAP in hippocampal CA1 and CA3 regions at 6, 12, and 24 hrs ($P < 0.05$). **Conclusions** Baicalin has a protective effect on the hippocampal neurons in mice after SE, which might be associated with the up-regulated expression of XIAP.

Key words: Epilepsy; Baicalin; X-linked inhibitor of apoptosis protein; Neuroprotection; mice

癫痫持续状态(SE)导致大脑的海马神经元的损伤。越来越多的实验表明细胞凋亡在癫痫持续状态所致的脑损伤过程中发挥重要的作用。因此,抑制细胞凋亡的发生,对防治癫痫导致的脑组织损伤具有重要的临床意义。X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)是

基金项目:福建省自然科学基金(2011J01175)

收稿日期:2013-07-22;修回日期:2013-09-04

作者简介:廖正俭(1987年-),男,在读硕士,主要从事功能神经外科方面的研究。

通讯作者:梁日生(1967年-),男,博士,教授,主任医师,硕士生导师,主要从事功能神经外科和微创神经外科方面的研究。E-mail: doctorlr@163.com。

凋亡抑制蛋白家族中的一员,是迄今发现的最强的内源性凋亡抑制因子之一^[1]。但迄今为止,针对XIAP在SE后海马区的表达情况和抗凋亡机制研究还较少。

黄芩苷(baicalin)是从中药黄芩中提取的单体化合物,易通过血-脑屏障。黄芩苷具有镇静、清除自由基、抗氧化和抗炎等作用。有关它在癫痫发作后神经保护作用的研究报道尚少。本实验旨在动态观察SE后小鼠海马组织凋亡相关蛋白——XIAP的表达情况,探讨黄芩苷干预对SE导致的神经元损伤的影响及其可能的机制。

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90只(许可证号:SCXK沪2007-0005),体重23~28g。随机分为对照组、癫痫持续状态(SE)组和黄芩苷治疗组,每组30只。

1.2 主要药品、试剂和仪器

海人酸(购自美国BIOMOL公司);黄芩苷(购自美国sigma公司);兔抗鼠X染色体连锁凋亡抑制蛋白(购自北京中杉金桥生物技术有限公司);蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究);蛋白浓度测定试剂盒(购自碧云天生物技术研究)。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 按Laursen等^[2]的方法向侧脑室内注入海人酸,小鼠用氯胺酮(8mg/kg)+安定(2mg/kg)麻醉,固定于脑立体定位仪上,用10μl微量注射器于前囟位点刺入颅骨下2.4mm,注入0.1μg/5μl海人酸(溶于生理盐水),注射速度为0.5μl/min,对照组注入5μl生理盐水。按Racine分级标准^[3]评价癫痫行为:0级:正常行为;I级:面部肌肉痉挛,表现为咀嚼运动、眨眼、动须、湿犬样颤动等;II级:颈部肌肉痉挛,表现为点头运动;III级:一侧前肢阵挛;IV级:站立伴双前肢阵挛;V级:在IV级的基础上身体向后倒下失去平衡,四肢抽动。达到III级改变以上者定为癫痫发作,连续的痫性发作超过30min以上者为SE。制模成功后,黄芩苷治疗组立即以100mg/kg的剂量腹腔注射黄芩苷1次,SE组和对照组腹腔注入等量的生理盐水。在SE达1h时,予腹腔注射10%水合氯

醛3.5ml/kg终止痫性发作。

1.3.2 取材 分别于制模成功后6h、12h和24h每组各取4只小鼠用水合氯醛麻醉,生理盐水+4%多聚甲醛经心脏灌注,取脑并用4%多聚甲醛浸泡过夜,常规脱水、透明、浸蜡、包埋后,冠状面行石蜡切片用于苏木素-伊红(HE)染色、免疫组化;每组分别于制模成功后6h、12h和24h另取6只ICR小鼠,麻醉后断头取双侧海马,提取总蛋白用于Western blot检测。

1.3.3 HE染色 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 免疫组化检测XIAP 采用SABC法行免疫组化,染色步骤按试剂盒说明书进行,显微镜下胞浆或胞核有棕色颗粒者为阳性细胞,每只动物随机取3张切片,每张切片在200倍视野下随机选取不重叠的5个视野,图像输入计算机,采用彩色图像分析系统,计数XIAP染色阳性细胞数,取均数。

1.3.5 Western blot检测XIAP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XIAP一抗抗体(1:400用TBST稀释),4℃静置过夜,洗膜3次,加入辣根过氧化物酶标记二抗(1:2000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GelDoc 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XIAP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±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;SE组海马CA1、CA3区结构明显异常,细胞排列紊乱,深染成紫蓝色,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;黄

芩芩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。见图1。

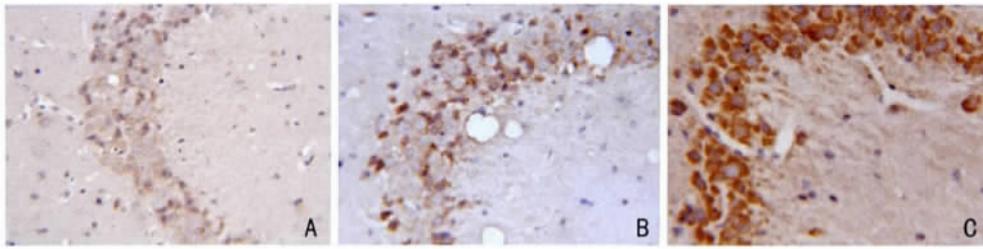


图1 海马CA3区XIAP蛋白免疫组化结果(免疫组化染色,箭头标示阳性细胞,×200)。A:对照组;B:SE组;C:黄芩芩治疗组。

2.2 XIAP 免疫组化染色结果

正常对照组小鼠海马CA1、CA3区可见少许XIAP阳性细胞的基础表达。与对照组比较,SE组CA1、CA3区XIAP蛋白表达在6h开始逐渐增多,12h达高峰($P < 0.01$),24h下降。与SE组比较,黄芩芩治疗组CA1、CA3区XIAP表达在6h、12h和24h均增加($P < 0.05$),存在明显的时效性。见表1。

表1 XIAP蛋白在不同组别、不同时间点的阳性表达细胞数($\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
对照组	5.24 ± 3.07	6.87 ± 2.27	5.73 ± 2.64
SE组	14.18 ± 4.35 [#]	23.92 ± 8.36 [#]	14.42 ± 5.43 [#]
黄芩芩治疗组	22.76 ± 6.26 [*]	38.54 ± 9.63 [*]	20.87 ± 7.18 [*]

注:[#]为与对照组比较, $P < 0.01$;^{*}为与SE组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 黄芩芩对癫痫小鼠海马内XIAP表达的影响

Western blot 检测结果显示,癫痫发作后6h、12h和24h各时间点均有XIAP蛋白的表达,对各组条带进行分析,可见对照组仅有较微弱的XIAP蛋白表达,各时间点的表达量差异无统计学意义;与对照组比较,SE组XIAP表达量则显著增加,两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。与SE组比较,黄芩芩组可显著增加XIAP的表达量,两者差异有统计学意义($P < 0.05$),这与免疫组化表达的变化趋势相一致。见图2、表2。

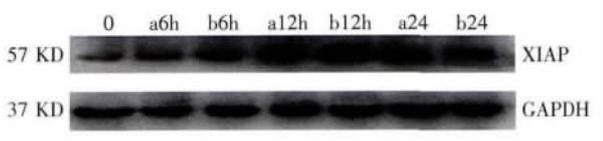


图2 Western blot 检测小鼠海马组织中不同时间点XIAP蛋白的表达。0:对照组12h;a:SE组;b:黄芩芩治疗组。

表2 XIAP在不同组别、不同时间点的表达量变化($\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
对照组		0.326 ± 0.047	
SE组	0.402 ± 0.054 [#]	0.527 ± 0.036 [#]	0.473 ± 0.027 [#]
黄芩芩治疗组	0.523 ± 0.080 [*]	0.652 ± 0.035 [*]	0.562 ± 0.018 [*]

注:[#]为与对照组12h比较, $P < 0.01$;^{*}为与SE组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

癫痫持续状态(SE)可引起急性和持久性中枢神经系统损害,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。在凋亡过程中,半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族的级联反应发挥了重要作用。而在凋亡通路中许多因子参与了对caspase的调控。XIAP属于凋亡抑制蛋白家族IAPs(inhibition of apoptosis proteins)中的一员,是细胞凋亡过程的重要调节者,能够直接与caspase-3、caspases-7、caspases-9结合而抑制它们的活性发挥抗凋亡作用。XIAP是否参与了癫痫发作引起海马神经细胞凋亡,则少有报道^[4]。

本研究发现,海人酸诱导小鼠SE后6h海马区XIAP表达增加,于12h达高峰,之后逐渐下降,发现其随时间推移呈“山峰样”改变,这与Li等^[5]在杏仁核注射KA诱导大鼠边缘叶癫痫发作模型中的研究结论类似。我们同时观察到,在不同时间段内,海人酸诱导的小鼠SE后凋亡抑制蛋白(XIAP)的表达变化与海马区损伤程度间的关系,表明XIAP可能参与SE后脑神经元的凋亡的调控过程。这种早期表达变化可能是SE发作后的一种神经自我保护作用,抵抗SE后神经损伤,这可能与XIAP直接抑制或通过泛素化作用降解caspase-3有关。

黄芩苷是中药黄芩的主要药用成分,易通过血-脑屏障,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等作用。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^[6]在脑缺血的模型中发现,黄芩苷能减少大鼠脑缺血后神经细胞凋亡。我们前期的研究发现,黄芩苷能通过抗氧化作用抑制SE后的海马神经元凋亡,具有明显的神经保护作用^[7]。本研究在前期工作的基础上进一步研究发现,与SE组相比,黄芩苷治疗能显著增加小鼠癫痫持续状态后海马组织中凋亡抑制蛋白XIAP的表达,并呈时间依赖性,同时我们前期研究发现caspase-3在小鼠SE后6h出现微量表达,24h达高峰相符,之后下降;经黄芩苷(100 mg/kg)治疗后各时间点caspase-3表达量与SE组相比又显著下降^[8]。我们有理由相信,黄芩苷能够促进癫痫持续状态(SE)凋亡抑制蛋白XIAP的生成而抑制caspase-3的蛋白活性来抵抗细胞凋亡,从而保护神经元。

参 考 文 献

- [1] West T, Stump M, Lodygensky G, et al. Lack of X-linked inhibitor of apoptosis protein leads to increased apoptosis and tissue loss following neonatal brain injury. *Asn Neuro*, 2009, 1(1): 43-52.
- [2] Laursen SE, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods*, 1986, 16(4): 355-357.
- [3] Racine RJ, Steingart M, McIntyre DC. Development of kindling-prone and kindling-resistant rats: selective breeding and electrophysiological studies. *Epilepsy Res*, 1999, 35(3): 183-195.
- [4] Rami A, Kim M, Niquet J. Translocation of the serine protease *omi/HtrA2* from mitochondria into the cytosol upon seizure-induced hippocampal injury in the neonatal rat brain. *Neurochem Res*, 2010, 35(12): 2199-2207.
- [5] Li TF, Luo YM, Lu CZ. The expression of Smac and XIAP in rat hippocampus following limbic Seizure induced by kainic acid injection into amygdaloid nucleus. *Sheng Li Xue Bao*, 2004, 56(2): 172-177.
- [6] 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.
- [7] 文帅,梁日生,杨卫忠,等.黄芩苷减少海人酸诱导的小鼠海马神经细胞死亡. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(6): 483-486.
- [8] 欧阳龙强,梁日生,杨卫忠,等.黄芩苷对小鼠癫痫持续状态后海马神经细胞的保护作用. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(9): 1697-1699.

《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于1974年,由教育部主管,中南大学主办,中南大学湘雅医院承办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个相联学科的专业学术期刊。本刊被收录为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”。

促进国内外学术的双向交流,为中国神经科学走向世界搭建新的平台。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿,通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为CN 43-1456/R,ISSN 1673-2642,邮发代号42-11,全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊,每期定价13元,全年定价78元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

为更好地筹集办刊资金,保证刊物的健康发展,本刊将竭诚为药品厂商、医疗器械厂商和广告公司提供优质服务,并长期向各级医疗单位征集协办单位,具体事宜请与本刊编辑部联系。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号(中南大学湘雅医院内)《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部,邮编:410008,电话/传真:0731-84327401,E-mail地址:jinn@vip.163.com,网址:http://www.jinn.org.cn/。