

大黄素对海人酸致痫小鼠海马神经细胞保护作用机制的研究

欧阳龙强¹, 夏文燕¹, 杨少春¹, 姜建云¹, 邹连生¹, 高志强¹, 刘德华¹, 欧阳奕安¹, 刘明¹, 李有洵²

1. 赣南医学院第一附属医院神经外科, 江西 赣州 341000

2. 宁都县人民医院神经外科, 江西 赣州 342800

摘要:目的 研究大黄素对小鼠癫痫持续状态后 Toll 样受体 4 (TLR4)-髓样分化因子 88 (MyD88)-核因子 κ B (NF- κ B) 炎性信号通路表达的影响, 探讨大黄素对海人酸致痫小鼠海马神经细胞保护作用的机制。方法 54 只 ICR 雄性小鼠随机分为对照组、癫痫持续状态 (SE) 组、大黄素治疗组 (200 mg/kg), 每组 18 只。采用腹腔内注入海人酸建立小鼠癫痫持续状态模型。通过行为学观察小鼠癫痫发作后的行为学改变; 尼氏染色观察小鼠海马组织神经细胞的坏死情况; RT-PCR、Western blotting 检测 TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 和蛋白的表达量。结果 大黄素干预后小鼠癫痫的发作级别及发作次数降低; 海马组织神经细胞的坏死减轻 ($P < 0.05$); 同时海马组织中 TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 和蛋白的表达下调 ($P < 0.05$)。结论 小鼠癫痫持续状态后可激活 TLR4-MyD88-NF- κ B 炎性信号通路, 通过大黄素干预后, TLR4-MyD88-NF- κ B 炎性信号通路的 mRNA 和蛋白表达下调。大黄素对海人酸致痫小鼠海马神经细胞保护作用的机制可能与其抑制 TLR4-MyD88-NF- κ B 炎性信号通路表达有关。

关键词: 癫痫; 大黄素; TLR4; 核因子 κ B; 信号通路; 小鼠

中图分类号: R742.1

DOI: 10.16636/j.cnki.jimm.2020.03.018

Mechanism of action of emodin in the protection of hippocampal neurons in mice with epilepsy induced by kainic acid

OU-YANG Long-Qiang¹, XIA Wen-Yan¹, YANG Shao-Chun¹, LOU Jian-Yun¹, ZOU Lian-Sheng¹, GAO Zhi-Qiang¹, LIU De-Hua¹, OU-YANG Yi-An¹, LIU Ming¹, LI You-Xun². 1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical College, Ganzhou 341000, Jiangxi, China; 2. Department of Neurosurgery, People's Hospital of Ningdu, Ganzhou 342800, Jiangxi, China
Corresponding author: XIA Wen-Yan, Email: 571526245@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effect of emodin on the expression of the Toll-like receptor 4 (TLR4)-myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-nuclear factor kappa-B (NF- κ B) inflammatory signaling pathway after status epilepticus (SE) in mice, as well as the mechanism of action of emodin in protecting hippocampal neurons in mice with epilepsy induced by kainic acid. **Methods** A total of 54 male ICR mice were randomly divided into control group, SE group, and emodin group (200 mg/kg), with 18 mice in each group. A mouse model of SE was established by intraperitoneal injection of kainic acid. The behavioral changes of mice after epileptic seizure were observed; Nissl staining was used to observe the necrosis of hippocampal neurons; RT-PCR and Western blotting were used to measure the mRNA and protein expression of TLR4, MyD88, and NF- κ B. **Results** Emodin intervention significantly reduced the severity and number of seizures, alleviated the necrosis of hippocampal neurons ($P < 0.05$), and downregulated the mRNA and protein expression of TLR4, MyD88, and NF- κ B in the hippocampus ($P < 0.05$). **Conclusions** The TLR4-MyD88-NF- κ B inflammatory signaling pathway is activated after SE in mice, and the mRNA and protein expression of the TLR4-MyD88-NF- κ B inflammatory signaling pathway is downregulated after emodin intervention. Emodin can exert a protective effect on hippocampal neurons in mice with epilepsy induced by kainic acid, possibly by inhibiting the expression of the TLR4-MyD88-NF- κ B inflammatory signaling pathway.

Key words: epilepsy; emodin; Toll-like receptor 4; nuclear factor kappa B; signaling pathway; Mice

基金项目: 江西省卫生健康委科技计划项目 (20204478)

收稿日期: 2020-01-15; 修回日期: 2020-04-05

作者简介: 欧阳龙强 (1983-), 男, 主治医师, 硕士研究生, 主要从事脑血管病、颅脑外伤及功能神经外科方面研究。

通信作者: 夏文燕 (1985-), 女, 主治医师, 硕士研究生, 主要从事内分泌代谢疾病方面研究。Email: 571526245@qq.com。

癫痫是一种由多种病因所致的脑神经元异常同步放电的发作性疾病,具有发作性、短暂性、重复性等特点,其病因复杂,发病机制尚未完全阐明。目前公认的与癫痫发病机制有关的因素有:神经系统炎症反应、缺氧、脑内的兴奋性及抑制性神经递质失衡等,其中炎症反应是癫痫的重要损伤机制之一^[1]。我们前期的研究工作证实^[2],癫痫发作后激活了大量的氧自由基和炎症因子的释放,通过大黄素的干预后,可减轻癫痫所致的大脑神经细胞的损伤,但其具体作用机制尚不清楚。本研究旨在前期研究工作的基础上,进一步探讨大黄素对海人酸致痫小鼠海马神经细胞保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物来源 健康 ICR 雄性小鼠 54 只,体重 23~28 g,由上海斯莱克实验动物中心提供,许可证号:SCXK(沪)2007-0005。饲养条件:常温,湿度(55±5)%,亮暗周期 12/12 h,自由饮水和进食标准饲料。

1.1.2 主要试剂与药品 兔抗鼠 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4)、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 和核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 多克隆抗体购自 santa Cruz 公司;蛋白浓度试剂盒由上海依科赛生物制品有限公司提供;RT-PCR 试剂盒来购自美国 Promega 公司;尼氏染色液购自碧云天生物公司;大黄素、海人酸均购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 动物模型及分组 将 54 只 ICR 小鼠采用随机数字表法分为 3 组:癫痫持续状态(SE)组、大黄素治疗组、对照组,每组 18 只。采用腹腔注射海人酸(12 mg/kg)建立小鼠癫痫持续状态模型。制模过程中因持续癫痫发作死亡 4 只,将制模不成功者予以剔除,不足预定数额者按随机抽样原则补齐动物并重新制备模型。制模成功后,大黄素治疗组以 200 mg/kg 的剂量(溶于生理盐水)腹腔注射大黄素(根据前期的研究结果,大黄素 200 mg/kg 为最佳治疗药物浓度^[2])。对照组、SE 组在相同时间注射等量的生理盐水。

1.1.4 标本采集 制模成功后 24 h,每组各取 6 只 ICR 小鼠,腹腔注射水合利醛麻醉后,心脏灌注 40% 甲醛取脑,浸泡 24 h,石蜡包埋切片,用于尼氏染色。每组另取 ICR 小鼠 12 只,麻醉后立即在冰上断头取海马,其中 6 只提取总蛋白用于 West-

ern blotting 的检测,其余 6 只提取 RNA 用于 RT-PCR 检测。

1.2 方法

1.2.1 行为学观察 对各组癫痫小鼠的发作级别、持续时间及发作次数进行观察,分级评价标准采用 Racines 分级标准^[3]。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、湿狗样颤动等。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 30 min 以上者为癫痫持续状态。

1.2.2 尼氏染色 石蜡切片厚度为 4 μ m,常规脱蜡,然后用双蒸水冲洗 3 min,尼氏染色液染色 10 min,双蒸水冲洗,然后通过梯度酒精脱水,经过二甲苯浸泡 3 min 后,最后中性树脂封片。显微镜下观察计数小鼠海马 CA3 区尼氏小体的数量。

1.2.3 RT-PCR 检测 TLR4、MyD88 和 NF- κ B mRNA 的表达 用 Trizol 提取总 RNA,反转录得到 cDNA。TLR4 引物序列(469 bp):5'-TGTATCTTTGAATATGAGATTGCTCAG-3'(上游),5'-CTTAATCATAACCTGATACACATGG-3'(下游)。NF- κ B 引物序列(381 bp):5'-CCT ATC CAC GAC AAC CTT-3'(上游),5'-CAT AGA TGC TGC TGA CCC AAC-3'(下游)。 β -actin 引物序列(198 bp):5' ATC GTG CGT GAC ATC AAA GAGA3'(上游),5' TGC CAC AGG ATT CCA TAC CCAA3'(下游)。MyD88 引物序列(375 bp):5'-GCATGGAACCACTGGCTGTGAG-3'(上游),5'-GAGGAAGTGAATGGGCGGTGT-3'(下游)。热循环条件:94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 40 s,退火(TLR4:57℃ 40 s; MyD88:53℃ 40 s; NF- κ B:55℃ 40 s),72℃ 延伸 1 min,32 个循环。经凝胶成像系统摄影,扫描并分析电泳带灰度值。分别以 TLR4、MyD88、NF- κ B 与 β -actin 灰度比值表示 mRNA 相对含量。

1.2.4 Western blotting 检测 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 蛋白的表达 匀浆后提取总蛋白,采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。每个样本中取出等量的蛋白用样品缓冲液溶解,沸水浴 5 min,凝胶电泳、转膜、5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭 1 h、洗膜。封闭后分别加入 TLR4、MyD88 和 NF- κ B mRNA 一抗抗体,4℃ 静置过夜,TBST 液洗膜 3 次,每次 10 min,室温下加入辣根过氧化酶标记的二抗孵育 1 h,再洗膜

3次,暗室压片、显影。凝胶成像图像分析系统对蛋白条带进行分析处理。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0 统计分析软件进行分析。各组数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析和 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

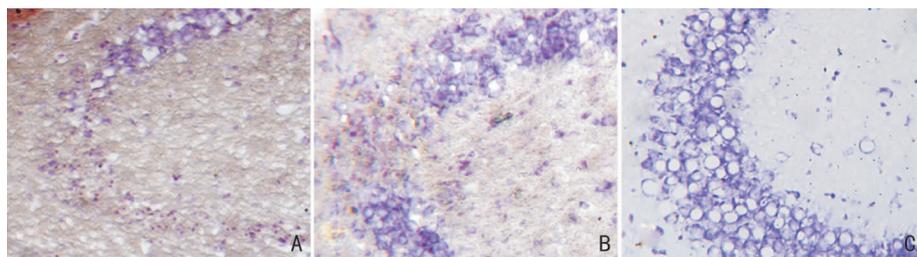
2.1 行为学观察

对照组注射等量的生理盐水,无癫痫发作。SE组起初为 Racine I ~ II 级,表现为须动、咀嚼、反复洗脸等动作;0.5 ~ 3 h 后出现头面部肌肉抽搐、点头运动、凝视、前肢阵挛、奔跑跳跃、尾巴强直、转

圈、尖叫、四肢及全身强直;最后出现跌倒无法爬起,反射消失等 IV ~ V 级发作。6 ~ 12 h 后发作级别和发作次数逐渐减轻,12 ~ 24 h 仍有部分小鼠出现癫痫发作。SE 组小鼠癫痫发作级别多达到 IV ~ V 级,且发作时间较长,发作次数频繁。大黄素治疗组发作级别多为 III 级以下,且发作频率减少。

2.2 尼氏染色

对照组小鼠海马 CA3 区尼氏颗粒细胞致密、整齐,存活数量多。与对照组相比,SE 组 CA3 区尼氏染色颗粒细胞稀疏、缺如 ($P < 0.01$)。而大黄素治疗组 CA3 区颗粒细胞呈点状、小片状坏死,与 SE 组相比,尼氏颗粒细胞数明显增多,二者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1、表 1。



注:A:对照组; B:SE 组; C:大黄素治疗组

图 1 尼氏染色观察小鼠海马 CA3 区尼氏颗粒细胞排列与分布情况(200 ×)

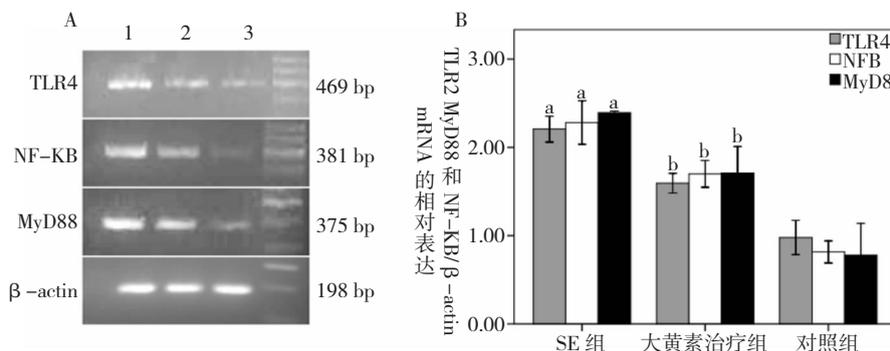
表 1 3 组小鼠海马 CA3 区尼氏染色颗粒细胞数量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	尼氏颗粒细胞数
对照组	6	133.66 ± 15.56
SE 组	6	65.33 ± 6.50 ^a
大黄素治疗组	6	109.66 ± 12.58 ^b
F 值		24.416
P 值		0.001

注:a 为与对照组比较, $P < 0.01$; b 为与 SE 组比较, $P < 0.05$

2.3 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 的表达

RT-PCR 结果显示,对照组仅有少量的 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 的表达。与对照组相比,SE 组 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 的表达均显著增多 ($P < 0.01$)。经大黄素干预后,TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 的表达有所下调,与 SE 组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

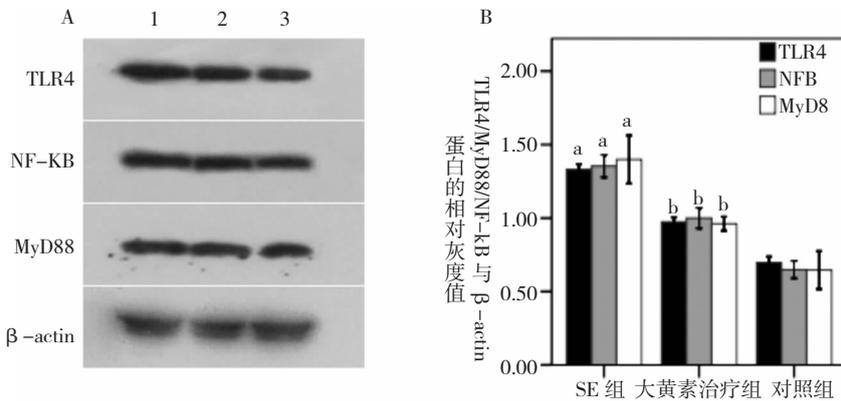


注:A:各组条带表达情况,1 为 SE 组; 2 为 大黄素治疗组; 3 为 对照组。B:为统计分析图,a 表示与对照组比较, $P < 0.01$; b 表示与 SE 组比较, $P < 0.05$ 。3 组间 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 的表达比较,TLR4 $F = 47.156, P < 0.001$; MyD88 $F = 29.939, P = 0.001$; NF-κB $F = 49.325, P < 0.001$

图 2 RT-PCR 检测小鼠海马组织中 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 的表达情况

2.4 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 蛋白的表达

Western blotting 检测结果显示, 各组均出现了不同程度的蛋白表达。对照组仅有少量的 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 蛋白表达。与对照组相比, SE 组



注:A:各组条带表达情况,1 为 SE 组;2 为 大黄素治疗组;3 为 对照组。B:统计分析图,a 表示与对照组比较, $P < 0.01$; b 表示与 SE 组比较, $P < 0.05$ 。3 组间 TLR4、MyD88 和 NF- κ B mRNA 的表达比较,TLR4 $F = 229.432$, $P < 0.001$; MyD88 $F = 28.240$, $P = 0.001$; NF- κ B $F = 79.379$, $P < 0.001$

图3 Western blotting 检测小鼠海马组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 蛋白的表达情况

3 讨论

近年来,大量的实验研究表明,炎症反应在癫痫发病中扮演着非常重要的角色。癫痫发作后可激活神经细胞、神经胶质细胞以及大量炎症介质的释放,包括白细胞介素类、干扰素类、肿瘤坏死因子类等^[4]。炎症反应同时也可诱导癫痫发作,促进海马发生病理性改变,如神经元损伤丢失、胶质细胞再生、苔鲜纤维发芽等^[5]。炎症反应不仅是癫痫的一个结果,还可能是癫痫发作的原因之一^[6]。

Toll 样受体是一类跨膜受体,现已在人和小鼠体内发现 13 种 TLR,分别命名为 TLR1 ~ TLR13,TLR4 只是 Toll 样受体家族成员之一。研究显示 TLR4 是一个重要的天然免疫受体,它不仅能介导脂多糖等外源性配体引起炎症反应,还能介导受损或应激产生的内源性配体引发炎症反应^[4]。此外,TLR4 根据是否与 MyD88 接头蛋白结合,分为:TLR4 介导的 MyD88 依赖信号通路与 TLR4 介导的 MyD88 非依赖信号通路两条信号转导通路。本研究只针对 TLR4 介导的 MyD88 依赖信号通路进行了研究,具有一定的局限性。

TLR4 是小胶质细胞、星型胶质细胞和神经元的重要炎性受体^[7]。TLR4 介导的 MyD88 依赖信号通路(TLR4-MyD88-NF- κ B)是通过 TLR4 受体与外源性或内源性配体结合,再与 MyD88 相结合形

成信号转导复合物,从而进一步激活 NF- κ B,活化的 NF- κ B 可诱发下游的炎症靶基因(如 iNOS、COX-2、TNF- α 、IL-1 等)的表达^[8-9]。研究表明,TLR4 介导的信号通路在癫痫的产生和发展中发挥了重要作用,在某种程度上干预 TLR4 信号通路等免疫反应能成功预防癫痫发作^[10]。TLR4 缺陷的 C3H/HJ 型小鼠或 TLR4 拮抗剂能对抗海人藻酸所致的痫性发作^[11]。本研究也证实,癫痫发作后可上调小鼠海马组织中 TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 和蛋白的表达,从而激活 TLR4-MyD88-NF- κ B 炎性信号通路,引发炎症反应。

大黄素是从中药大黄的根茎中提取的主要有效活性单体成分,具有抗氧化、抗炎、清除自由基、抑菌、免疫调节、利尿消肿、改善微循环等诸多药理学作用^[12-13]。近期有文献报道,大黄素对中枢神经系统具有保护作用,可有效降低脑缺血再灌注损伤、颅脑爆震伤所引发的二次损伤^[14-15]。我们前期的研究结果显示^[2],大黄素可减轻癫痫所致的大脑神经细胞的损伤、凋亡,提高 GSH、SOD 的活性,降低 MDA 的含量,并抑制 IL-1 β 、TNF- α 等炎症介质的表达。基于前期的研究基础,本研究进一步探讨大黄素对海人酸致痫小鼠海马神经细胞保护作用的机制。通过 RT-PCR、Western blotting 等实验方法证实,大黄素可降低癫痫发作后小鼠海马组织中

TLR4、MyD88、NF-κB mRNA 和蛋白的表达。

综上所述,大黄素可减轻海人酸诱导的小鼠持续癫痫状态后所致的海马神经细胞的损伤,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等神经保护作用,其机制可能与抑制 TLR4-MyD88-NF-κB 炎性信号通路的活化,从而减少氧自由基和炎症介质的释放有关,但其具体作用机制有待深入研究。

参 考 文 献

[1] Paudel YN, Shaikh MF, Shah S, et al. Role of inflammation in epilepsy and neurobehavioral comorbidities: Implication for therapy [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 837: 145-155.

[2] 欧阳龙强,夏文燕,杨少春,等. 大黄素对海人酸致痫小鼠海马神经细胞的保护作用 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2018, 45(5): 475-480.

[3] Racine RJ, Steingart M, McIntyre DC. Development of kindling-prone and kindling resistant rats: selective breeding and electrophysiological studies [J]. *Epilepsy Res*, 1999, 35: 183-195.

[4] Vezzani A, French J, Bartfai T, et al. The role of inflammation in epilepsy [J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(1): 31-40.

[5] SHEN Y, QIN H, CHEN J, et al. Postnatal activation of TLR4 in astrocytes promotes excitatory synaptogenesis in hippocampal neurons [J]. *J Cell Biology*, 2016, 215(5): 719-734.

[6] Rana A, Musto AE. The role of inflammation in the development of epilepsy [J]. *J Neuroinflamm*, 2018, 15(1): 144.

[7] Zeng MY, Tong QY. Anti-inflammation Effects of Sinomenine

on Macrophages through Suppressing Activated TLR4/NF-κB Signaling Pathway [J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(1): 130-137.

[8] HANG Z, LIU Q, MING L, et al. Upregulation of HMGB1-TLR4 inflammatory pathway in focal cortical dysplasia type II [J]. *J Neuroinflamm*, 2018, 15(1): 27.

[9] WEN X, HAN XR, WANG YJ, et al. MicroRNA-421 suppresses the apoptosis and autophagy of hippocampal neurons in epilepsy mice model by inhibition of the TLR/MYD88 pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 7022-7034.

[10] Vezzani A, Robert S, Fujinami H, et al. Infections, inflammation and epilepsy [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(2): 211-234.

[11] Kleen JK, Holmes GL. Taming TLR4 may ease seizures [J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 369-370.

[12] Hou X, Wei W, Fan Y, et al. Study on synthesis and bioactivity of biotinylated emodin [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101: 5259-5266.

[13] ZHAO JY, WANG JQ, WU L, et al. Emodin attenuates cell injury and inflammation in pancreatic acinar AR42J cells [J]. *J Asian Nat Products Res*, 2019, 21(2): 186-195.

[14] Ahn SM, Kim HN, KIM YR, et al. Emodin from *Polygonum multiflorum* ameliorates oxidative toxicity in HT22 cells and deficits in photothrombotic ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 188: 13-20.

[15] Ma Y, Xia X, Cheng JM, et al. Emodin inhibits inducible nitric oxide synthase in a rat model of craniocerebral explosive injury [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(9): 1809-1816.