文章编号:1000-5404(2012)13-1269-04

论著

外源性硫化氢改善癫痫大鼠脑认知功能障碍

韩晓伟[1],段茂海[2],陈远寿[1],罗孝美[1],秦 伟[1],田 虹[1],潘贵书[1],刘晓红[1] (563003 贵州 遵义,遵义医学院基础医学院生理学教研室[1];257091 山东 东营,东营市第二人民医院儿科[2])

[摘要] **目的** 探讨外源性硫化氢对癫痫(epilepsy,EP)所致大鼠脑认知功能障碍的保护作用及机制。**方法** 利用氯化锂-匹罗卡品腹腔注射复制雄性SD大鼠96只,6周龄,体质量180~220 g。癫痫模型,大鼠分为正常对照组(NC组)、癫痫模型组(EP组)、癫痫+硫氢化钠组(NaHS组);采用Morris水迷宫检测大鼠的空间学习记忆能力;实时荧光定量PCR检测海马中的胱硫醚-β-合酶(CBS)mRNA和CREB mRNA表达变化。**结果** EP组的空间辨别学习记忆能力与NC组比较明显减退:Morris水迷宫定位航行实验中逃避潜伏期明显延长($P<0.01$),第3象限探索有效时间显著缩短($P<0.05$)、第3象限游泳距离占总距离的百分比以及穿越平台次数明显减少($P<0.01$);NaHS可提高癫痫大鼠的学习记忆能力,与EP组比较,空间学习记忆能力各项检测指标均有显著差异($P<0.05$,$P<0.01$)。7、30 d时EP组大鼠海马CBS mRNA表达水平明显低于NC组($P<0.05$),而NaHS组CBS mRNA表达水平明显高于EP组($P<0.05$);EP组海马CREB mRNA表达在7、30 d时均明显低于NC组($P<0.05$),而NaHS组CREB mRNA在24 h、7、30 d时表达显著高于EP组($P<0.05$),与NC组相比,7、30 d时均无差异($P>0.05$)。**结论** 外源性H_2S可能通过上调癫痫大鼠其海马CBS、CREB mRNA表达来改善癫痫大鼠的学习记忆能力。

[关键词] 硫化氢;癫痫;学习记忆;环磷酸腺苷反应元件结合蛋白
[中图法分类号] R338.6; R749.17; R914.3 [文献标志码] A

Exogenous hydrogen sulfide improves epilepsy-induced cognitive dysfunction in rats

Han Xiaowei[1], Duan Maohai[2], Chen Yuanshou[1], Luo Xiaomei[1], Qin Wei[1], Tian Hong[1], Pan Guishu[1], Liu Xiaohong[1] ([1]Department of Physiology, School of Basic Medical Science, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563003; [2]Department of Paediatrics, Second People's Hospital of Dongying, Dongying, Shandong Province, 257091, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the neuroprotective effect of exogenous hydrogen sulfide (H_2S) on cognitive deficits induced by epilepsy in rats. **Methods** The epilepsy rat model was induced by intraperitoneally administration of LI-PILO. Male SD rats were divided into 3 groups, normal control group (NC group), epilepsy group (EP group), EP + NaHS group (NaHS group, intraperitoneally injection of 14 μmol/kg NaHS in 25 min before PILO administration). The ability of spacial learning and memory of epilepsy rats was tested by Morris water maze. The expression of cystathionine-β-synthase (CBS) and cAMP response element binding protein (CREB) in the hippocampus was observed by real-time PCR in 2 and 24 h, and 7 and 30 d after model establishment. **Results** Morris water maze test showed that the spatial learning and memory ability of EP rats were decreased when compared with NC group. In EP rats, the escape latency to find the platform was significantly prolonged or extended compared with NC group ($P<0.01$). The times of passing platform, mean exploring time and percentage of swimming distance in original platform quadrant were decreased significantly compared with NC group ($P<0.01$). NaHS improved the ability of learning and memory, with all indices of spatial learning and memory had significant differences when compared with EP group ($P<0.05$, 0.01). Compared with NC group, the expression of CBS mRNA in the hippocampus of EP rats were down-regulated

[基金项目] 贵州省科技厅社会发展攻关项目(20093090)
[通信作者] 陈远寿,电话:(0852)8609442,E-mail:jcbshengli@163.com

($P<0.05$) in 7 and 30 d. While, the expression of CBS mRNA in NaHS group was higher than EP ($P<0.05$). Compared with NC group, the expression of CREB mRNA of EP rats were down-regulated in chronic period (7 and 30 d, $P<0.05$). The expression of CREB mRNA in NaHS group was higher than EP group at 24 h, and 7 and 30 d ($P<0.05$), but had no statistical significance at 7 d and 30 d when compared with NC group ($P>0.05$). **Conclusion** Exogenous H_2S exerts neuroprotection effects and improves cognitive deficits in epileptic rats, which may be through upregulating the expression of CBS and CREB mRNA.

[**Key words**] hydrogen sulfide; epilepsy; learning and memory; cAMP response element binding protein

Supported by the Tackling Project of Social Development of Guizhou Department of Science and Technology (20093090). Corresponding author: Chen Yuan-shou, Tel: 86-852-8609442, E-mail: jcbshengli@163.com

癫痫(epilepsy, EP)是神经元同步异常放电,可导致大脑短暂性功能障碍和相应的神经生物学、认知、心理学以及社会学等后果的一种慢性疾病。动物实验和临床研究均表明,癫痫可导致动物或人注意力分散、学习记忆能力减退等认知功能受损的表现[1-2]。但癫痫所致脑损伤的具体机制尚未明确,临床上也缺乏有效治疗手段,癫痫导致的认知功能障碍极大地影响了患者的生活质量,也是目前癫痫防治的重点之一。有研究表明,内源性硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)与多种疾病的脑认知功能障碍有关,并发现 H_2S 可提高诱导海马 CAl 区长时程增强(LTP),提示 H_2S 可能与学习记忆有着密切关系[3]。但 H_2S 是否参与了癫痫导致的脑认知功能障碍,目前尚不清楚。为此,本实验利用氯化锂-匹罗卡品(Li-PILO)复制大鼠癫痫模型,观察外源性的 H_2S 供体 NaHS 干预后癫痫大鼠学习记忆能力、海马光硫醚-β-合酶(cystathionine-β-synthase, CBS)和环磷腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB) mRNA 表达变化,以探讨 H_2S 的神经保护作用和改善癫痫大鼠认知功能障碍的机制。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

成年雄性 SD 大鼠,体质量 180~220g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供;氯化锂、盐酸匹罗卡品、硫氢化钠均由美国 Sigma 公司提供。

1.2 动物分组

雄性 SD 大鼠 96 只,分成 3 组,分别为对照组(NC 组)、癫痫模型组(EP 组)、癫痫模型+硫氢化钠组(NaHS 组),每组 32 只。每组又分为 2、24 h、7 d 和 30 d 4 个时间点,其中 2、24 h 各时相点 6 只,7、30 d 各时间点 10 只。

1.3 大鼠癫痫模型的制作

氯化锂-匹罗卡品复制大鼠癫痫模型,氯化锂 3 mmol/kg 腹腔注射,18~24 h 后首剂腹腔注射匹罗卡品 30 mg/kg,30 min 后如无Ⅳ级以上发作,再每隔 15 min 注射 10 mg/kg 追加剂量,直至出现Ⅳ级以上无明显间歇的癫痫持续状态(status epilepticus, SE)。SE 后 1 h,注射地西泮 10 mg/kg 终止 SE,如效果不佳可于 30 min 后再注射 1 次。NaHS 组于每次注射匹罗卡品前 25 min 分别给予大鼠腹腔注射 H_2S 外源性供体 NaHS(14 μmol/kg),NC 组及 EP 组腹腔注射相同体积的生理盐水。

1.4 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力

Morris 水迷宫装置和实验方法参照文献[4],分别检测各组大鼠定位航行逃避潜伏期、空间探索原平台象限的有效时间、原平台象限游泳距离占总距离的百分比以及穿越平台次数。

1.5 Real-time PCR 检测海马组织 CBS 和 CREB mRNA 的表达

在 2、24 h、7、30 d 时间点,大鼠迅速断头取脑,在冰盘取海马,按试剂盒操作说明提取总 RNA,取收集的 RNA 母液 20 μl 加 DEPC 水 980 μl 稀释(×50)后,采用 Tu-1810 紫外分光光度仪检测 RNA 纯度和浓度,重复 3 次,$D(260)/D(280)$ 比值在 1.6~2.0 范围内表示 RNA 纯度较理想,并根据 $D(260)$ 值计算出 RNA 样品母液浓度[RNA 浓度 = $D(260)\times40$ μg/ml ×稀释倍数],配制 50 ng/μl 的 RNA 样品液体。从基因 GenBank 检索设计出引物序列,由 TaKaRa 生物工程公司合成。CBS 上游引物:5′-TCATCCTGCCCGACTCTGTG-3′,下游引物:5′- GGTGCAGATAGGCTCAGCTCTTG-3′,扩增产物长度为 338 bp;CREB 上游引物:5′- GCACTAAGGTTACAGTGGGAGCAGA-3′,下游引物:5′- ACAGTTCAAGCCCAGCCACAG-3′,扩增产物长度为 391 bp;β-actin 上游引物:5′-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3′,下游引物:5′-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3′,扩增产物长度为 227 bp;逆转录反应:取 50 ng/μl RNA,以 Oligo(dT)为引物进行反转录及 cDNA 合成。荧光定量 PCR 反应,反应前模板稀释 6.5 倍,反应体系:cDNA 2 μl;上游引物(10 μmol/L) 0.25 μl;下游引物(10 μmol/L) 0.25 μl;SYBR superMix Ⅱ荧光混合物 12.5 μl,模板混合液(上游、下游引物) 0.5 μl;DEPC 水 9.5 μl;cDNA 2 μl;同时每对引物设一阴性对照。反应条件:第 1 步:预变性 95 ℃×8 min,1 个循环;第 2 步:PCR 反应 95 ℃×

15 s,60 ℃ ×1 min,40 个循环;第 3 步:融解曲线分析,95 ℃ × 30 s;55 ℃ ×15 s;95 ℃ ×30 s ,80 个循环,建立 Real-time PCR 融解曲线证实扩增的特异性并分析结果,读取 Ct 值,以管家基因 β-actin 为内参,用 CBS、CREB 基因表达/β-actin 基因表达的比值进行相对定量分析。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 18.0 统计软件对所得各组数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 外源性 H_2S 对癫痫大鼠学习记忆能力的影响

2.1.1 Morris 水迷宫定位航行实验 定位航行实验历时 5 d,随着训练次数的增多,各组大鼠逃避潜伏期均有不同程度的缩短,与 NC 组比较,EP 组逃避潜伏期明显延长($P<0.01$),NaHS 组较 EP 组逃避潜伏期明显缩短 ($P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠定位航行实验逃避潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
NC 组	24.8 ±12.4[a]	16.5 ±10.2[a]	8.9 ±8.4[a]	7.1 ±6.1[a]	6.9 ±3.8[a]
EP 组	50.8 ±16.9	33.8 ±10.8	30.8 ±9.6	12.8 ±8.2	11.5 ±6.9
NaHS 组	26.4 ±10.5[a]	19.7 ±8.8[a]	9.9 ±4.8[a]	8.8 ±3.7[a]	7.9 ±3.2[a]

a: $P<0.01$,与 EP 组比较

2.1.2 Morris 水迷宫空间探索实验 与 NC 组比较,EP 组和 NaHS 组第 3 象限探索有效时间均显著缩短 ($P<0.05$),EP 组在第 3 象限游泳距离占总距离的百分比以及穿越平台次数均较 NC 组明显减少($P<0.01$);与 EP 组比较,NaHS 组第 3 象限探索有效时间明显延长、第 3 象限游泳距离占总距离的百分比显著增大、穿越平台次数明显增多($P<0.05$, $P<0.01$)。从搜索策略来看,NC 组和 NaHS 组大鼠的游泳轨迹主要集中在平台及其周围,EP 组大鼠的游泳轨迹则主要集中在水池边缘,没有明显的各象限区别(表 2)。

表 2 各组大鼠原平台象限探索有效时间、游泳距离占总距离百分比及穿越平台次数($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	探索有效时间 (s)	游泳距离/总距离(%)	穿越平台次数(次)
NC 组	6.98 ±1.36	40.23 ±6.36	6.61 ±1.14
EP 组	5.63 ±4.82[a]	27.36 ±8.46[b]	2.71 ±1.00[b]
NaHS 组	6.40 ±1.43[ac]	36.11 ±5.00[ac]	5.63 ±1.16[ad]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 NC 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 EP 组比较

2.2 外源性对癫痫大鼠海马 CBS 和 CREB mRNA 表达的影响

EP 组大鼠海马 CBS mRNA 表达在 2、24 h 时高于 NC 组($P<0.05$),在 7、30 d 时低于 NC 组($P<0.05$); NaHS 组海马 CBS mRNA 表达在 7、30 d 时均高于 EP 组($P<0.05$)。与 NC 组比较,EP 组大鼠海马组织 CREB mRNA 表达在 2、24 h 时显著升高($P<0.05$),而 7、30 d 时显著下降($P<0.05$);NaHS 组在 24 h、7 d 和 30 d 时 CREB mRNA 表达量明显高于 EP 组($P<0.05$);与 NC 组比较,NaHS 组在 7、30 d 时 CREB mRNA 表达量无明显差异($P>0.05$)。见表 3。

3 讨论

大鼠在注射匹罗卡品后,可出现起源于边缘系统的类似人类颞叶癫痫的痫性发作,并可以发展为 SE,表明匹罗卡品诱发的癫痫大鼠模型具有与人类颞叶癫痫相似特征。癫痫发生后,患者或动物常伴有学习记忆力减退等认知功能受损的表现[1-2]。本研究结果也显示,癫痫大鼠空间学习记忆能力明显下降,并用外源性 H_2S 供体 NaHS 干预后可显著改善癫痫大鼠空间学习记忆能力,提示癫痫大鼠脑认知功能障碍可能与脑内的 H_2S 有关。

H_2S 是近年来发现的第 3 类新型气体信号分子,可作为细胞内和细胞间的信号传导分子,在心血管系统和神经系统中有重要的生理作用[5]。脑内 H_2S 合成的主要酶是 CBS, 小鼠的 CBS 基因敲除后脑内几乎测不到 H_2S,改变 CBS 的活性可以调节 H_2S 的生成[6], CBS 主要分布在脑组织中,尤其在海马中高度表达[7-8]。在体内的 H_2S 1/3 以气体形式存在,2/3 以 NaHS 形式存在,体内的 H_2S 与 NaHS 之间存在动态平衡关系,有利于内环境的稳定[7]。Han 等[9-10]研究发现,H_2S 外源性供体 NaHS 可明显减轻反复热性惊厥所致的幼年大鼠海马神经元的损伤,而 CBS 抑制剂 HA 则可明显的加重其海马神经元的损伤;H_2S 还可通过上调内源性抗氧化系统活性,增加抗氧化剂谷胱甘肽水平,对抗氧化应激对细胞的伤害作用[11]。本研究发现, 癫痫发生后, 大鼠海马 CBS mRNA 表达呈现早

表 3 各组大鼠海马组织 CBS 和 CREB mRNA 表达比较(CBS 、CREB mRNA /β-actin mRNA, $\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	CBS mRNA				CREB mRNA			
	2 h	24 h	7 d	30 d	2 h	24 h	7 d	30 d
NC 组	125 ±10	120 ±16	132 ±29	108 ±26	124 ±10	107 ±67	107 ±29	154 ±26
EP 组	132 ±11[a]	148 ±24[a]	95 ±4[a]	98 ±8[a]	186 ±11[a]	165 ±82[a]	100 ±4[a]	132 ±8[a]
NaHS 组	134 ±9[a]	130 ±26[ab]	159 ±4[ab]	106 ±30[b]	193 ±9[a]	183 ±26[ab]	107 ±4[b]	153 ±98[b]

a:$P<0.05$,与 NC 组比较;b:$P<0.05$,与 EP 组比较

期(2、24 h)上调,晚期(7、30 d)下调的变化,提示 H_2S 可能参与了癫痫的发生、发展过程。同时,本实验发现 NaHS 干预后可显著上调癫痫大鼠海马 CBS mRNA 表达,从而可使癫痫大鼠海马 H_2S 生成增加,以发挥其神经保护作用。并已有研究表明,H_2S 可通过激活 cAMP 途径,增强 NMDA 受体介导的反应,诱发 NMDA 受体依赖型的海马 CA1 LTP[6],而海马 LTP 是学习记忆的神经学生理学基础,这可能是 NaHS 干预后可改善癫痫大鼠空间学习记忆能力的机制之一。

本研究发现,外源性 H_2S 供体 NaHS 还可显著提高癫痫大鼠海马 CREB mRNA 的表达。CREB 作为记忆功能分子在 1987 年被 Montminy 发现并命名,CREB 可调节位于其下游的大量基因的转录,参与神经元存活、分化、生长重要作用[12-13]。CREB 在学习记忆过程中的重要作用已得到充分的肯定,被确定为影响记忆存储的关键蛋白,且与 LTP 和突触可塑性相关[14]。提高 CREB 活性或功能有望成为改善学习记忆功能的新途径,甚至可能改善正常衰老相关的学习记忆功能下降[14-15]。本研究结果显示,癫痫大鼠早期 CREB mRNA 表达并未下调,这可能是对癫痫脑损伤做出的一种内源性保护性效应,但在持续反复癫痫发作过程中 CREB mRNA 表达水平下降;用外源性 H_2S 供体 NaHS 干预后,癫痫大鼠海马 CBS mRNA 表达上调,从而可使癫痫大鼠海马 H_2S 生成增加,使癫痫大鼠海马 CREB mRNA 表达上调,认知功能得到明显改善。提示 H_2S 刺激癫痫大鼠海马 CREB 的表达可能是其发挥神经保护及其促进学习记忆作用的机制之一。

本研究结果表明,NaHS 可显著改善癫痫大鼠认知功能缺陷,提高癫痫学习记忆能力,其机制可能与上调海马 CBS 和 CREB 的表达有关。这为探讨 H_2S 提高学习记忆能力的分子机制补充了新内容,为临床上防治癫痫脑认知功能缺陷提供了新的思路。

参考文献:

[1] 张笋, 王维平, 王佩, 等. 不同剂量盐酸多奈哌齐对慢性癫痫大鼠空间学习记忆功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(24): 2307-2310.

[2] Canovas R, Leon I, Serrano P, *et al*. Spatial navigation impairment in patients with refractory temporal lobe epilepsy: evidence from a new virtual reality-based task[J]. Epilepsy Behav, 2011, 22(2): 364-369.

[3] Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator[J]. J Neurosci, 1996, 16(3): 1066-1071.

[4] Vorhees C V, Williams M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 848-858.

[5] Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H_2S) - the third gas of interest for pharmacologists[J]. Pharmacol Rep, 2007, 59(1): 4-24.

[6] Eto K, Ogasawara M, Umemura K, *et al*. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation[J]. J Neurosci, 2002, 22(9): 3386-3391.

[7] Kimura H. Hydrogen sulfide as a physiological mediator: its function and therapeutic applications[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2010, 136(6): 335-339.

[8] 罗孝美, 陈远寿, 潘贵书, 等. 海洛因成瘾大鼠硫化氢/胱硫醚β-合酶体系的变化[J]. 第三军医大学报, 2011, 33(20): 2177-2179.

[9] Han Y, Qin J, Chang X, *et al*. Hydrogen sulfide may improve the hippocampal damage induced by recurrent febrile seizures in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(2): 431-436.

[10] Han Y, Qin J, Chang X, *et al*. Hydrogen sulfide and carbon monoxide are in synergy with each other in the pathogenesis of recurrent febrile seizures[J]. Cell Mol Neurobiol, 2006, 26(1): 101-107.

[11] Mauna J C, Miyamae T, Pulli B, *et al*. Protein phosphatases 1 and 2A are both required for long-term depression and associated dephosphorylation of cAMP response element binding protein in hippocampal area CA1 *in vivo*[J]. Hippocampus, 2011, 21(10): 1093-1104.

[12] Lee B, Cao R, Choi Y S, *et al*. The CREB/CRE transcriptional pathway: protection against oxidative stress-mediated neuronal cell death[J]. J Neurochem, 2009, 108(5): 1251-1265.

[13] Lonze B E, Ginty D D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system[J]. Neuron, 2002, 35(4): 605-623.

[14] Han J H, Kushner S A, Yiu A P, *et al*. Neuronal competition and selection during memory formation[J]. Science, 2007, 316(5823): 457-460.

[15] Sekeres M J, Neve R L, Frankland P W, *et al*. Dorsal hippocampal CREB is both necessary and sufficient for spatial memory[J]. Learn Mem, 2010, 17(6): 280-283.

(**收稿**:2011-11-21;**修回**:2011-12-12)

(编辑 王小寒)