文章编号:1000-5404(2014)24-2445-06

论著

黑皮质素受体-4在癫痫模型大鼠脑组织中的表达及相关机制

陈雅岚,李 杰,徐 馨,米秀娟,王学峰 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经内科重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨黑皮质素受体-4(melanocortin-4 receptor,MC4R)在癫痫模型大鼠脑组织中的表达及可能的相关机制。**方法** 将52只雄性SD大鼠分为对照组,6、24、72 h、7、14、30、60 d 8个实验组,实验组建立氯化锂-匹罗卡品模型,采用Western blot、免疫组织化学、免疫组织荧光法检测MC4R在模型大鼠脑组织中的表达及分布。另外40只雄性SD大鼠,分成正常对照组、戊四氮组(pentylenetetrazol,PTZ)、PTZ+0.9% NaCl组和PTZ+HS014组(HS014为MC4R特异性抑制剂),建立PTZ慢性点燃模型,记录各组发作情况。建模28 d后将各组大鼠处死,Western blot检测各组大鼠Phspo-GluR1(Ser 845)的表达情况。**结果** 与对照组相比,MC4R在氯化锂-匹罗卡品模型大鼠脑组织中呈动态升高趋势,并于第14天达峰值($P<0.01$)。在PTZ慢性点燃过程中,与对照相比,经HS014干预大鼠的平均发作评分明显降低($P<0.05$),全身强直阵挛发作(generalized tonic-clonicseizure,GTCS)的潜伏期明显延长($P<0.05$)。29 d后Western blot检测结果显示HS014处理组大鼠脑组织中的Phspo-GluR1(ser845)表达量较PTZ组明显下降($P<0.05$)。**结论** MCR4可能通过调节GluR1的ser 845位点的磷酸化水平参与到了癫痫的发生、发展中。

[关键词] 癫痫;黑皮质素受体-4;氯化锂-匹罗卡品;戊四氮;GluR1
[中图法分类号] R322.81;R341;R742.1 [文献标志码] A

Altered expression of melanocortin-4 receptor in brain tissue of mouse epilepsy model

Chen Yalan, Li Jie, Xu Xin, Mi Xiujuan, Wang Xuefeng (Department of Neurology, Key Laboratory of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of melanocortin-4 receptor (MC4R) on the epileptogenesis and to discover the potential mechanism involved. **Methods** Fifty-two male SD rats were divided into a control group and 7 experimental groups (6, 24 and 72 h, 7, 14, 30 and 60 d). Western bloting, immunohistochemistry, and double-labelled immunofluorescence assay were then applied to detect the dynamic change of the expression pattern of MC4R in the brain tissue of the pilocarpine kindled rats. Forty male SD rats were then divided into the control, pentylenetetrazol (PTZ), PTZ+0.9% NaCl, and PTZ+0.9% NaCl+HS014 (a specific inhibitor to MC4R) groups. The sub-convulsion dosage of PTZ was applied every other day for 29 d to establish the chronically kindled models and observe the kindling scores, and the latency and duration of generalized tonic-clonic seizure (GTCS) of each group. All animals were sacrificed on the 28th day after the models were established, and the expression of phspo-GluR1 (Ser 845) in the brain tissue of the rats in each group was detected by Western blotting. **Results** The MC4R expression was significantly increased in the brain tissue of the pilocarpine kindled rats at each time point as compared with the control group ($P<0.05$), and the peak occurred on the 14th day ($P<0.01$). The MC4R inhibitor HS014 significantly decreased the kindling scores ($P<0.05$) and prolonged the onset latency ($P<0.05$) of GTCS in the rats during the PTZ chronic kindling process. The expression of phspo-GluR1 (Ser 845) of the HS014 treated group was decreased as compared with the PTZ group ($P<0.05$). **Conclusion** Over-expression of MC4R might participate in the process of epileptogenesis *via* facilitating the phosphorylation process of GluR1 (Ser 845).

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271445)
[通信作者] 王学峰,E-mail:wxf00123@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141107.0839.003.html(2014-11-06)

[**Key words**] epilepsy; melanocortin-4 receptor; lithium chloride-pilocarpine; pentylenetetrazol; GluR1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271445). Corresponding author: Wang Xuefeng, E-mail: wxf00123@163.com

癫痫是一种以神经元反复自发的异常同步化放电为特征的慢性脑病。全世界范围大约有5千万患者[1]。由于癫痫具体的发病原因尚不明确,目前还没有根治癫痫和预防发作的有效治疗方法[2]。颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy,TLE)是成人癫痫中最常见类型,也是药物性难治性癫痫的重要病因[3]。关于癫痫发病机制的学说多种多样,现主流的学说认为,脑内兴奋性活动与抑制性活动比例失调,致使神经元兴奋阈值降低,形成异常高兴奋性神经网络,诱发神经元反复自发性的高同步化放电可能是癫痫形成的基本过程[4]。谷氨酸是突触环路中的主要兴奋性神经介质,α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(AMPARs)作为主要的离子型谷氨酸受体,主要介导快速性突触传递,AMPAR由GluR1-4四种亚基构成,CA1区的海马锥体细胞的兴奋性突触上80%的AMPAR是由GluR1/GluR2的二聚体形式构成[5]。有研究表明,GluR1 ser845位点的磷酸化增强后,可以促进AMPAR在突触膜上的转移和表达,增加AMPAR离子通道的通导,进而增强了神经元兴奋性[6]。黑皮质素受体4(melanocortin-4 receptor,MC4R)是一种G蛋白偶联受体,广泛表达于中枢神经系统中,介导一系列重要的分子级联反应。MC4R已在多种神经系统疾病如神经痛、药物成瘾、抑郁症中被广泛研究[7-9]。最新的研究表明,被激活的MC4R可以通过增强GluR1亚基ser845位点的磷酸化,进而上调AMPA受体GluA1亚基在突触后膜的表达,增加其兴奋性传递,提高神经元兴奋性并改变成熟树突棘形态[10]。因此,我们推测MC4R可能参与到了癫痫的发病过程,但目前尚少见关于MC4R在癫痫发生、发展中的研究,本课题初步探究MC4R在癫痫中可能的作用,旨在为癫痫的研究和药物治疗提供新的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

兔抗MC4R多克隆抗体(Abcam,ab24233,Cambridge),鼠抗微管相关蛋白2抗体(Anti-MAP2,武汉博士德生物),鼠抗胶质纤维酸性蛋白抗体(Anti-GFAP,武汉博士德生物),异硫氰酸荧光素标记的山羊抗兔IgG(FITC,北京中杉金桥生物),异硫氰酸四甲基罗丹明荧光素标记的山羊抗鼠IgG(TRITC,北京中杉金桥生物),鼠抗GAPDH抗体(碧云天生物),山羊抗P-GluR1(Ser845)多克隆抗体(Santa Cruz, sc-16314),兔抗GluR1抗体(YT1921,Immunoway),山羊抗兔辣根过氧化物酶(碧云天生物),山羊抗小鼠辣根过氧化物酶(碧云天生物),兔抗山羊辣根过氧化物酶(Abcam,ab6741, Cambridge),MC4R特异性抑制HS014(TOCRIS bioscience,CAS207678-81-7),氯化锂(LiCl, Sigma-Aldrich, MO, USA),匹罗卡品(Pilocarpine, Sigma-Aldrich, MO, USA),戊四氮(pentylenetetrazol, PTZ, Sigma-Aldrich,MO,USA),总蛋白提取试剂盒(碧云天生物),一抗二抗洗脱液(stripping buffer, 碧云天生物),BCA试剂盒测蛋白样本浓度(碧云天生物)。HS014用0.9% NaCl溶液稀释成1 μg/ μL浓度(TOCRIS bioscience, CAS207678-81-7),PTZ试剂也用0.9% NaCl溶液稀释成35 mg/kg浓度的阈下致痫剂量(PTZ, Sigma-Aldrich,MO, USA)。

1.2 氯化锂-匹罗卡品大鼠模型的建立

所有涉及动物的实验步骤经过重庆医科大学伦理委员会批准,并严格遵照指南进行。52只健康的雄性SD大鼠,体质量200~250 g,购自重庆医科大学实验动物中心,动物均饲养于正常昼夜环境中,可自由饮食。将大鼠分为2组:实验组和对照组。实验组大鼠(n=47)经腹腔注射氯化锂127 mg/kg(LiCl, Sigma-Aldrich, MO, USA),24 h后给予溴化阿托品(1 mg/kg,腹腔注射)以减轻匹罗卡品引起的严重外周胆碱能反应。30 min后按照45 mg/kg比例经腹腔注射新鲜配制的匹罗卡品溶液(pilocarpine,Sigma-Aldrich,MO,USA),对照组大鼠(n=5)经腹腔注射等剂量的生理盐水(9% NaCl)。观察大鼠发作情况,根据Racine分级标准评价大鼠发作等级,只有达到Ⅳ级及以上发作等级的大鼠才被用于后续研究。Ⅳ级及以上发作持续超过1 h者经腹腔注射地西泮10 mg/kg以终止,未达到发作等级的大鼠每隔30 min给予1次匹罗卡品(10 mg/kg,腹腔注射)直至达到等级,累计剂量不超过60 mg/kg。为了动态研究目的蛋白的表达情况,将点燃的实验组(n=43)分成6、24、72 h、7、14、30、60 d 7个时相点,并于点燃后相应时相点取脑组织。

1.3 PTZ慢性点燃模型的建立及药物干预

40只清洁级雄性SD大鼠,体质量220~240 g,分成正常对照组、PTZ组、PTZ+0.9% NaCl组和PTZ+HS014组,每组10只。除正常对照组外,其他3组大鼠均经侧脑室安置微量给药针,位置在前囟中点旁开1.2~1.5 mm,前后1 mm,深度3~3.5 mm,安置后休息1周。HS014用0.9% NaCl溶液稀释成1 μg/μL浓度(TOCRIS bioscience,CAS207678-81-7),PTZ试剂也用0.9% NaCl溶液稀释成35 mg/kg浓度的阈下致痫剂量(PTZ,Sigma-Aldrich,MO,USA),从第1天开始,每日上午8:00~11:00,下午16:00~20:00,经5 μL微量注射器连接注射针给予PTZ+HS014组大鼠经侧脑室注射5 μL新鲜配制的HS014试剂,PTZ+0.9% NaCl组大鼠经侧脑室注射相等剂量的0.9% NaCl,每日2次,连续28 d。从第1天起,在注射完干预药物后

30 min,给PTZ组、PTZ+0.9% NaCl组和PTZ +HS014组大鼠经腹腔注射35 mg/kg阈下致痫剂量的PTZ试剂,每隔48 h进行1次,每次注射PTZ后仔细观察大鼠发作情况60 min,详尽记录发作等级,全身强直阵挛发作(generalized tonic-clonic seizure,GTCS)发作潜伏期以及GTCS发作持续时间,这里的GTCS发作潜伏期定义为每次注射完PTZ之后到首次出现GTCS发作的时间,整个注射过程持续29d,连续3次4级以上发作者被认为是点燃成功,最后1次注射观察完毕后立即将4组大鼠处死。

1.4 组织处理与切片制备

氯化锂-匹罗卡品模型组动物在上述每个时相点从各组中取出3只,经10%水合氯醛深度麻醉后取海马及相邻颞叶皮质,迅速保存于液氮中,做Western blot检测分析。每组剩下的大鼠经10% NaCl及4%多聚甲醛相继灌注后取脑,脑组织用4%多聚甲醛浸泡48 h,后经石蜡包埋,取大鼠双侧海马旁皮质以及海马组织,分别切成5 μm的切片用作免疫组织化学分析,10 μm的切片做免疫荧光。药物干预实验大鼠经水合氯醛深度麻醉后,提取海马和海马旁颞叶皮质,分开存储于液氮中,做后续Western blot检测分析。

1.5 免疫组织化学方法

组织切片置于60 ℃恒温烤箱中烘干,浸泡于二甲苯溶液中10 min脱蜡,再经梯度酒精脱水,然后浸于3% H_2O_2溶液中15 min灭活内源性过氧化物酶。将切片浸入10 mmol/L的枸橼酸钠溶剂中(pH=6.0),置于95~98 ℃微波炉,10~15 min抗原修复。室温冷却,山羊血清封闭,后加入MC4R一抗(兔抗MC4R多克隆抗体,1∶200,货号:ab24233,Abcam,Cambridge)4 ℃孵育过夜。PBS清洗,5 min×3次,加入生物素化二抗(兔抗羊IgG),37 ℃水浴30 min,辣根酶标记霉卵白素(ABC,北京中杉金桥生物)室温孵育30 min,DAB染色2~5 min,苏木精复染。运用Olympus PM20 (Olympus,Osaka,Japan)自动显微镜和TCFY-2050病理学图像采集系统采集图像。应用Image Pro Plus6.0软件分析每张切片中免疫阳性细胞的光密度值进行半定量分析。

1.6 免疫荧光染色方法

冰冻切片经过脱蜡、水化,参照组化步骤。0.5% TritonX-100 37 ℃水浴15 min,微波炉95~98 ℃15 min抗原修复。5%山羊血清室温封闭60 min。滴加兔抗MC4R多克隆抗体(1∶100,货号:ab24233,Abcam,Cambridge,MA)与鼠抗微管相关蛋白2抗体(Anti-MAP2,武汉博士德生物)混合液,或加入滴加兔抗MC4R多克隆抗体与鼠抗胶质纤维酸性蛋白抗体(Anti-GFAP,武汉博士德生物)混合液,4 ℃过夜。次日经PBS冲洗后,避光条件下用异硫氰酸荧光素标记的山羊抗兔IgG(FITC,1∶200,北京中杉金桥生物)和异硫氰酸四甲基罗丹明荧光素标记的山羊抗鼠IgG(TRITC,1∶200,北京中杉金桥生物)37 ℃水浴90 min,PBS冲洗,封片。荧光显微镜及激光共聚焦下采集图像(Leica MicrosystemsHeidelberg GmbH,Germany)

1.7 蛋白免疫印迹方法

使用总蛋白提取试剂盒提取总蛋白(碧云天生物)。大鼠脑组织标本加入含有磷酸酶抑制剂及蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,在冰上匀浆(药物干预组标本需加入液氮后匀浆),混悬液经4 ℃离心机12 000 r/min离心15 min,提取上清液,用BCA试剂盒测蛋白样本浓度(碧云天生物)。上样(匹罗卡品模型大鼠标本:每泳道50 μg蛋白样本;药物干预大鼠标本:每泳道100 μg蛋白样本),SDS-PAGE电泳(5%浓缩胶,60 V,50 min;10%分离胶,80~100 V,60 min)直至蛋白分离,切胶,将含有目的蛋白的胶转移至PVDF膜,250 mA电转120 min。5%脱脂奶粉封闭90 min(磷酸化蛋白用5% BSA溶液封闭),滴加兔抗MC4R多克隆抗体(1∶450,ab 24233,Abcam,Cambridge),鼠抗GAPDH抗体(1∶1 000,碧云天生物)或山羊抗P-GluR1(Ser845)多克隆抗体(1∶150,Santa Cruz, sc-16314)4 ℃孵育过夜。TBST轻摇清洗3次,每次10 min(磷酸化蛋白5 min×3次),滴加山羊抗兔辣根过氧化物酶(1∶4 000,碧云天生物),山羊抗小鼠辣根过氧化物酶(1∶2 000,碧云天生物)或兔抗山羊辣根过氧化物酶(1∶5 000,ab6741,Abcam,Cambridge)37 ℃恒温孵育90 min,TBST轻摇清洗3次如上述。避光条件下滴加化学发光底物,凝胶成像仪显色。磷酸化蛋白显影后用stripping buffer(碧云天生物)常温下轻摇3 min,TBST清洗后,用5% BSA封闭60 min,滴加兔抗GluR1抗体(1∶500,YT1921,Immunoway)4 ℃过夜,轻摇清洗后滴加二抗,余过程同上述。用Quantity One分析软件(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)分析每条条带的光密度值,并用相对光密度值进行统计学分析。

1.8 统计学分析

所有数据以$\bar{x} \pm s$表示,两组组间比较用Student's t检验,3组及以上比较运用单因素方差分析和Tukey's HSD检验。采用SPSS 19.0统计软件,Image Pro Plus 6.0软件用以分析免疫组织化学结果。

2 结果

2.1 氯化锂-匹罗卡品模型建立结果

52只雄性SD大鼠,5只作为对照组,余下47只作为实验组经腹腔注射匹罗卡品,注射后10~45 min开始大鼠开始有痫样发作,根据Racine分级,达到Ⅳ级及以上者认为是点燃,持续性发作超过60 min者给予地西泮终止发作。其中有4只大鼠经多次注射匹罗卡品达到累计限定剂量后仍未发作,认为是未点燃,从实验组剔除,余下实验组的43只大鼠分配到7个时相点,最终对照组剩余5只大鼠,6、24 h组分别剩余4只,72 h、7 d、30 d组分别剩余5只大鼠,14、60 d组分别剩余6只。通过行为学观察,实验组大鼠均有自发性发作,发作频率1次/7 d到1~7次/d。分组设置中6 h、24 h、72 h、7 d代表急性期,14、30 d代表潜伏期,60 d代表慢性期,模拟自发性癫痫形成过程。

2.2 MC4R在癫痫模型大鼠脑组织中的表达

2.2.1 免疫组织化学结果

用免疫组织化学法对于MC4R在癫痫模型大鼠脑组织中的表达进行检测,可见MC4R在海马和皮质神经元内均有表达,主要分布在神经元细胞膜上,实验组中MC4R阳性细胞数明显多于对照组大鼠,染色强度也更强(表1,图1)

2.2.2 免疫荧光结果

在实验组60 d大鼠皮质及海马中,可见

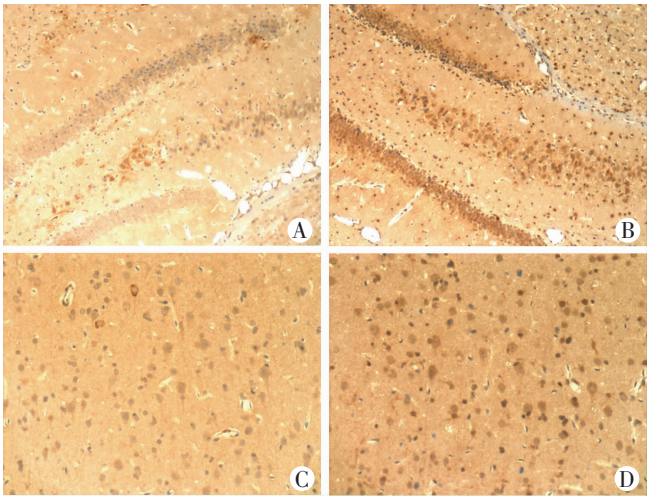
MC4R 强阳性表达细胞(绿色荧光),其能够与 MAP2 标记细胞(红色荧光)在神经元完全重合(黄色荧光),但不与 GFAP 标记的(红色荧光)胶质细胞重合,说明 MC4R 在神经元有选择性表达(图 2)。

表 1　正常对照组和实验组 MC4R 平均光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	海马	皮质
正常对照组	0.183 5 ±0.013 6	0.178 7 ±0.030 5
实验组		
6 h	0.292 5 ±0.042 6[a]	0.200 7 ±0.038 0
24 h	0.328 2 ±0.017 8[a]	0.216 8 ±0.036 6[a]
72 h	0.308 4 ±0.090 2[a]	0.289 0 ±0.027 0[a]
7 d	0.386 6 ±0.059 7[a]	0.321 8 ±0.049 2[a]
14 d	0.452 5 ±0.153 8[a]	0.427 3 ±0.059 1[a]
30 d	0.370 8 ±0.027 2[a]	0.312 7 ±0.038 3[a]
60 d	0.271 6 ±0.011 5[a]	0.294 2 ±0.034 2[a]

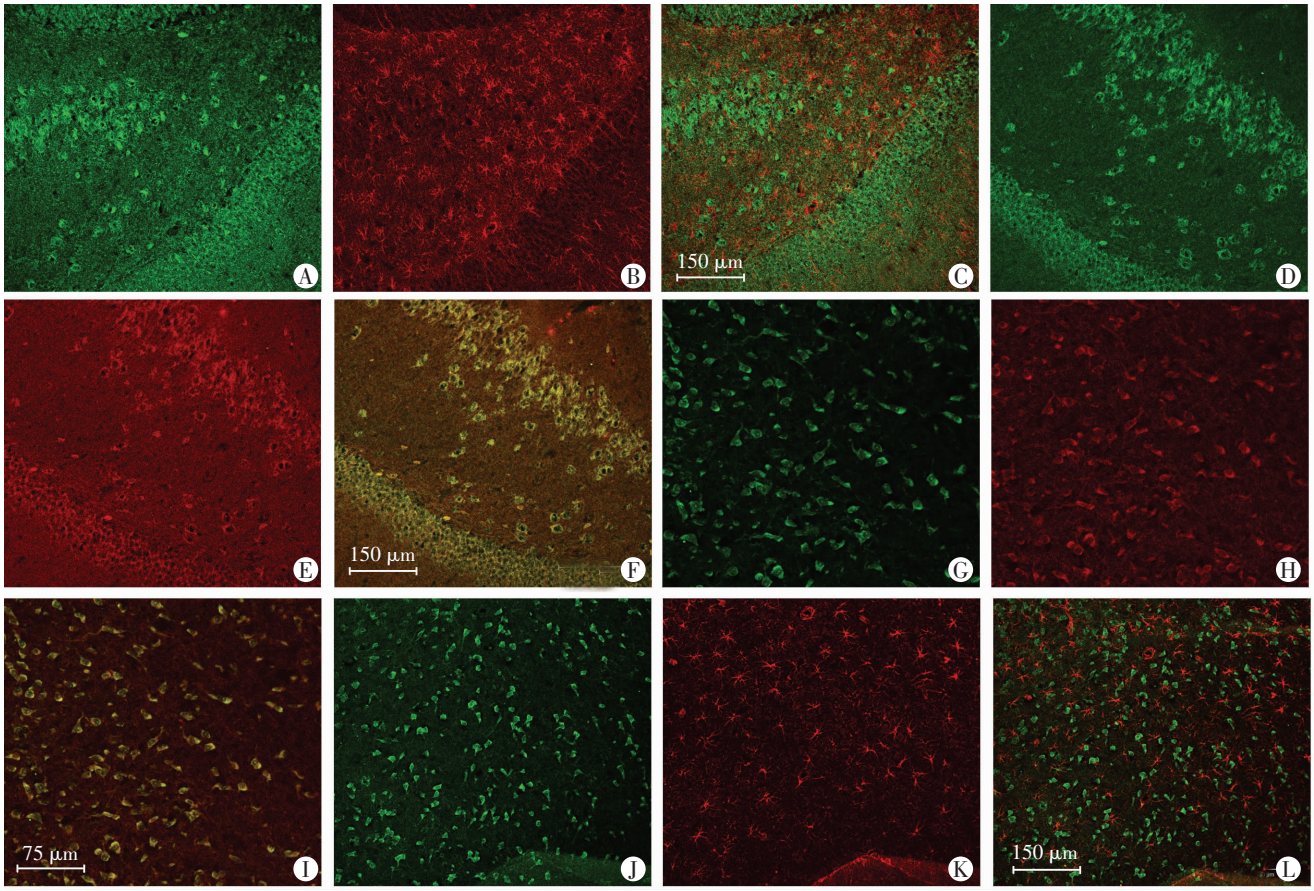
a:$P<0.05$,与正常对照组比较

2.2.3　Western blot 检测结果为了阐述 MC4R 在癫痫形成过程中的各个过程的动态变化,我们设置了 7 个时相点,与对照组相比,模型大鼠海马组织中的 MC4R 在造模后的各个时相点(6 h、24 h、72 h、7 d、14 d、30 d、60 d)表达均较高($P<0.05$),高峰在 14 d,30 d 以后开始下降,但仍高于对照组(图 3A、B)。大鼠颞叶皮质中 MC4R 的表达规律与海马基本一致,表达高峰在 14 d(潜伏期)($P<0.01$,图 3C、D)。



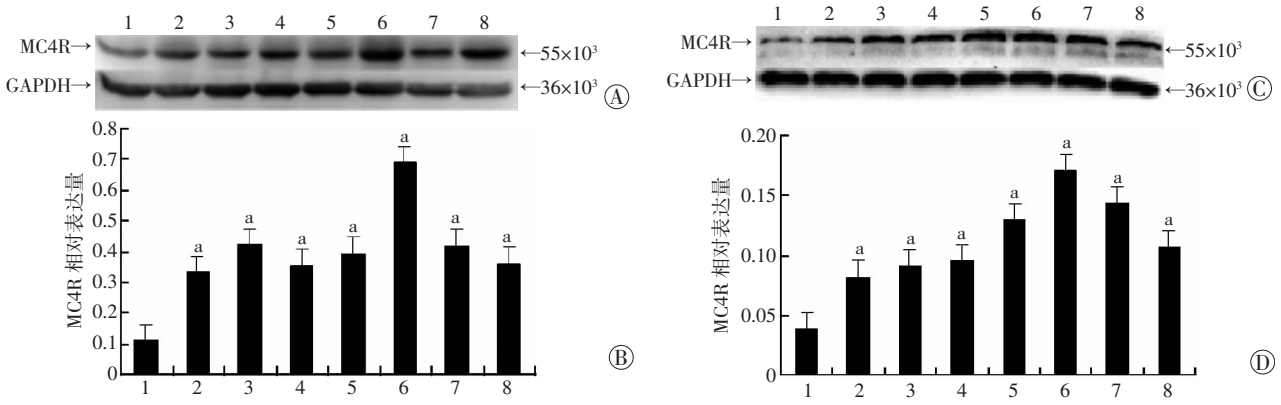
A:正常大鼠海马;B:实验组 30 d 大鼠海马;C:正常大鼠皮质;D:实验组 14 d 组大鼠皮质

图 1　免疫组织化学方法检测 MC4R 在癫痫模型大鼠脑组织中的表达



A、D、G、J:MC4R 阳性细胞;B、K:星状胶质细胞;E、H:神经元;C、F、I、L:重合后图像;A ~ F:海马;G ~ L:皮质;A ~ C、J ~ L:GFAP 标记;D ~ F、G ~ I:MAP2 标记

图 2　免疫荧光双标检测 MC4R 在 60 d 组模型大鼠脑组织中的表达



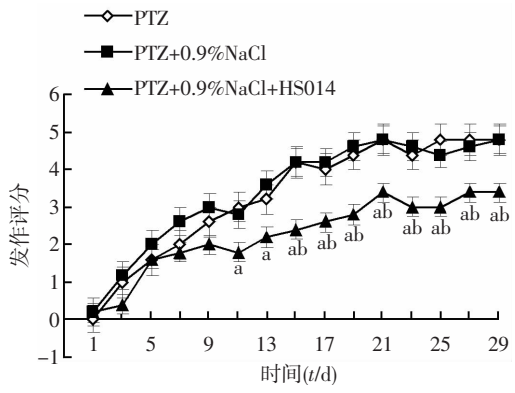
1:正常对照组;2: 6 h; 3: 24 h; 4: 72 h; 5: 7 d; 6: 14 d; 7: 30 d; 8: 60 d

A、C:Western blot 检测结果;B、D:半定量分析结果;A、B:海马;C、D:皮质;a:$P<0.05$,与正常对照组比较

图 3 Western blot 检测 MC4R 在点燃模型大鼠脑组织中的表达

2.3 MC4R 特异性拮抗剂 HS014 对动物行为学的影响

与 PTZ + 0.9% NaCl 组相比,PTZ + HS014 组在慢性点燃过程中的第 11、13、15、17、19、21、23、25、27、29 天平均发作评分明显降低($P<0.05$),与 PTZ 组相比,在点燃的第 15、17、19、21、23、25、27、29 天,PTZ + HS014 组的发作评分也有明显下降($P<0.05$,图 4),PTZ 组与 PTZ + 0.9% NaCl 组之间的差异没有统计学意义($P>0.05$)。与 PTZ 组(194.10 ± 64.55)s 及 PTZ + 0.9% NaCl 组(200.63 ± 90.42)s 相比,PTZ + HS014 组的 GTCS 发作平均发作潜伏期明显延长(294.80 ± 78.99)s($P<0.05$),PTZ 组与 PTZ + 0.9% NaCl 组之间没有统计学差异($P>0.05$)。在 GTCS 平均发作持续时间上,3 组间没有统计学差异($P>0.05$)。以上结果进一步说明抑制 MC4R 功能后减轻了模型大鼠的发作严重程度。

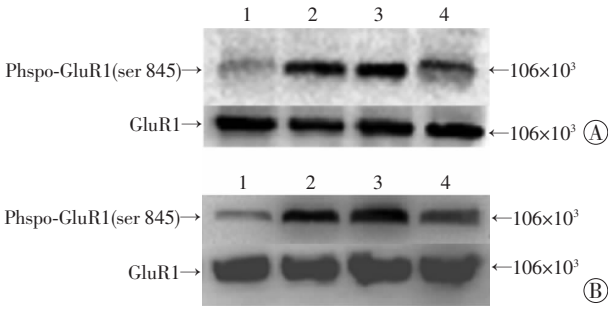


a:$P<0.05$,与 PTZ + 0.9% NaCl 组比较;b:$P<0.05$;与 PTZ 组比较

图 4 MC4R 特异性抑制剂 HS014 对动物行为学的影响

2.4 Western blot 检测 HS014 干预后大鼠脑组织中 Phspo-GluR1(Ser845)的表达

正常大鼠脑组织中仅有少量 Phspo-GluR1(Ser845)表达,PTZ 反复注射诱发 GTCS 发作,增强其磷酸化过程,与正常对照组相比,PTZ 组大鼠的海马及皮质组织中的 Phspo-GluR1(Ser845)表达量明显升高($P<0.05$),MC4R 特异性抑制剂 HS014 可以在一定程度上降低致痫剂 PTZ 引起的 Ser845 位点的磷酸化($P<0.05$),而 0.9% NaCl 并不能降低 PTZ 引起的磷酸化的升高。各组间总 GluR1 的表达没有明显差异,PTZ 组和 PTZ + 0.9% NaCl 组的 Phspo-GluR1(Ser845)表达水平没有统计学差异($P>0.05$,图 5,表 2)。



1:正常对照组;2:PTZ 组;3:PTZ + 0.9% NaCl 组;4:PTZ + HS014 组; A:海马;B:皮质

图 5 各组大鼠脑组织中 GluR1 Ser845 位点的磷酸化水平的改变

表 2 各组大鼠脑组织中 Phspo-GluR1(Ser845)蛋白灰度值比值 ($\bar{x}\pm s$)

组别	海马	皮质
正常对照组	0.345 5 ± 0.112 6	0.154 4 ± 0.030 1
PTZ 组	0.971 8 ± 0.131 8[a]	0.417 3 ± 0.023 6[a]
PTZ + 0.9% NaCl 组	1.076 7 ± 0.202 1[a]	0.479 5 ± 0.112 6[a]
PTZ + HS014 组	0.584 7 ± 0.078 2[bc]	0.210 1 ± 0.026 4[bc]

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与 PTZ 组比较;c:$P<0.05$,与 PTZ + 0.9% NaCl 组比较

3 讨论

MC4R 是一种 A 型 G 蛋白偶联受体,其主要的配体为 α-MSH[11],近年来,MC4R 在神经痛、药物成瘾反应及神经退行性疾病等神经系统疾病中的作用成为研究热点,但其在癫痫中的作用却尚少见报道。匹罗卡品诱使大鼠产生类似人类癫痫持续状态的发作(status epilepsy,SE),作为初始损伤因素引起海马神经元凋亡,经过潜伏期的突触重组,产生与人类 TLE 极其相似的病理生理改变[12]。本实验设置了不同的时相点以模拟人类 TLE 的动态发展过程。通过 Western blot 定量分析我们发现,与对照组相比,MC4R 在模型大鼠海马及颞叶皮质中均有异常升高,并且其表达于第 14 天达到表达高峰,并在 60 d 时仍维持高表达。研究表明,注射匹罗卡品引起 SE 发生后的 14 ~ 25 d,大鼠海

马齿状回、扁桃核、颞叶新皮质的神经元受损凋亡,重组形成异常高兴奋性神经环路,易化自发性痫性发作的发生,进而发展为慢性癫痫[13],我们推测 MC4R 在潜伏期的高表达可能在癫痫形成的过程中有重要作用。根据免疫荧光双标定位,我们发现 MC4R 主要表达在模型大鼠的神经元中。这说明 MC4R 可能更大程度上是通过改变神经元的功能和(或)形态来参与癫痫形成过程。

研究表明 MC4R 参与了海马神经元突触形态及兴奋性的调节过程:被激活后的 MC4R 可以进一步激活下游的 CAMP/PKA 信号通路,继而增强 AMPAR 的 GluR1 亚基的 Ser845 位点磷酸化,最终表现为突触后膜上的 AMPAR 表达上调,从突触形态上表现为突触后膜上未成熟树突棘增多,这些形态学及结构上的改变最终提高了神经元突触后膜的兴奋性,使其对兴奋性神经递质谷氨酸的敏感性增加,神经元兴奋性增高[10]。Rakhade 等[14]的研究表明,在新生大鼠癫痫模型首次惊厥发作后 48h 内经腹腔注射抑制剂抑制 AMPAR 亚基磷酸化过程后,可显著降低大鼠日后的发作易感性,并减轻其海马神经元的损伤程度。在 PTZ 急性癫痫模型小鼠的皮质和海马中也同样发现了 GluR1 的 Ser845 位点的过度磷酸化[15]。因此,AMPAR 的 GluR1 亚基的过度磷酸化很可能是癫痫形成的一个始动因素,而作为这一过程的上游因子,MC4R 可能成为潜在的抗癫痫形成作用靶点。

PTZ 是一种 GABAA 拮抗剂,PTZ 慢性点燃模型是一种经典的化学点燃模型,通过反复给予亚惊厥剂量的 PTZ 试剂,最终使点燃大鼠产生稳定而持久的类似于人类癫痫患者的惊厥敏感性改变,因此 PTZ 慢性点燃模型常常用于进行抗癫痫药物筛查[16]。我们设置了正常对照组、PTZ 组、PTZ + 0.9% NaCl 组和 PTZ + HS014 组(HS014 为 MC4R 特异性抑制剂)4 个组别,与对照组相比,HS014 有效地减轻了模型大鼠的惊厥发作严重程度,并且延长了实验大鼠 GTCS 的潜伏期,说明 MC4R 功能抑制具有一定抗惊厥作用。通过对 4 组大鼠脑组织的 Western blot 检测,我们发现 PTZ 的反复致痫过程引起了大鼠脑组织中 GluR1 Ser 845 位点的过度磷酸化,而 HS014 组大鼠的 GluR1 ser845 磷酸化水平明显较 PTZ 组减轻,进一步验证了 MC4R 可能通过激活 GluR1 ser845 的磷酸化过程而参与到了癫痫的发生、发展过程中。

综上所述,MC4R 在氯化锂-匹罗卡品癫痫模型大鼠脑组织中异常表达升高,其特异性抑制剂 HS014 有效缓解了 PTZ 慢性点燃模型大鼠的发作严重程度,并部分减轻了 PTZ 对 AMPA 受体 GluR1 Ser 845 位点的过度磷酸化过程,说明 MC4R 可能是通过改变 GluR1 Ser 845 位点的磷酸化程度,进而影响神经元兴奋性而参与到癫痫的发生、发展过程中的。这为癫痫形成机制的研究提供了新的理论基础,也为癫痫的药物防治提供了新的药物作用靶点。

参考文献:

[1] Al-Khateeb J M, Al-Khateeb A J. Research on psychosocial aspects of epilepsy in Arab countries: a review of literature[J]. Epilepsy Behav, 2014, 31: 256 - 262.

[2] Bakker J, Basedow F J, Dekker A D, *et al*. Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors: the trigger of epileptogenesis? [J]. J Neurosci, 2013, 33(14): 5879 - 5880.

[3] Engel J Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? [J]. Neuroscientist, 2001, 7(4): 340 - 352.

[4] Badawy R A, Freestone D R, Lai A, *et al*. Epilepsy: Ever-changing states of cortical excitability[J]. Neuroscience, 2012, 222: 89 - 99.

[5] Lu W, Shi Y, Jackson A C, *et al*. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach[J]. Neuron, 2009, 62(2): 254 - 268.

[6] Rajasekaran K, Joshi S, Kozhemyakin M, *et al*. Receptor trafficking hypothesis revisited: plasticity of AMPA receptors during established status epilepticus[J]. Epilepsia, 2013, 54(Suppl 6): 14 - 16.

[7] Serova L I, Laukova M, Alaluf L G, *et al*. Intranasal infusion of melanocortin receptor four (MC4R) antagonist to rats ameliorates development of depression and anxiety related symptoms induced by single prolonged stress[J]. Behav Brain Res, 2013, 250: 139 - 147.

[8] Alvaro J D, Tatro J B, Quillan J M, *et al*. Morphine down-regulates melanocortin-4 receptor expression in brain regions that mediate opiate addiction[J]. Mol Pharmacol, 1996, 50(3): 583 - 591.

[9] Mansour A R, Farmer M A, Baliki M N, *et al*. Chronic pain: the role of learning and brain plasticity[J]. Restor Neurol Neurosci, 2014, 32(1): 129 - 139.

[10] Shen Y, Fu W Y, Cheng E Y, *et al*. Melanocortin-4 receptor regulates hippocampal synaptic plasticity through a protein kinase A-dependent mechanism[J]. J Neurosci, 2013, 33(2): 464 - 472.

[11] Ye Z Y, Li D P. Activation of the melanocortin-4 receptor causes enhanced excitation in presympathetic paraventricular neurons in obese Zucker rats[J]. Regul Pept, 2011, 166(1/3): 112 - 120.

[12] de-Araujo M A, Marques T E, Taniele-Silva J, *et al*. Identification of endogenous reference genes for the analysis of microRNA expression in the hippocampus of the pilocarpine-induced model of mesial temporal lobe epilepsy[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e100529.

[13] Andre V, Dube C, Francois J, *et al*. Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model[J]. Epilepsia, 2007, 48(Suppl 5): 41 - 47.

[14] Rakhade S N, Zhou C, Aujla P K, *et al*. Early alterations of AMPA receptors mediate synaptic potentiation induced by neonatal seizures [J]. J Neurosci, 2008, 28(32): 7979 - 7990.

[15] Rakhade S N, Fitzgerald E F, Klein P M, *et al*. Glutamate receptor 1 phosphorylation at serine 831 and 845 modulates seizure susceptibility and hippocampal hyperexcitability after early life seizures[J]. J Neurosci, 2012, 32(49): 17800 - 17812.

[16] Dhir A. Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy[J]. Curr Protoc Neurosci, 2012, Chapter 9: Unit9.37.

(**收稿**:2014-07-26;**修回**:2014-09-22)

(编辑 王小寒)