基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1024-04

丙戊酸钠对大鼠海马神经元癫痫样放电后 P-CREB1 表达的影响

刘 华[1],徐祖才[2],陈阳美[2]

(1.重庆市第三人民医院神内科,重庆 400014;2.重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究丙戊酸钠对大鼠海马神经元癫痫样放电后磷酸化腺感苷反应元件结合蛋白 1(Phosphorylated cAMP responsive element binding protein1,P-CREB1)表达的影响。方法:wistar 新生鼠,迅速断头取脑,体外培养海马神经元,建立神经元癫痫样放电模型,将神经元分为空白组、模型组、丙戊酸钠低剂量(50 mg/L)组、丙戊酸钠高剂量(100 mg/L)组,运用免疫荧光技术观察 P-CREB1 在神经元癫痫样放电后在细胞内的表达部位,采用 wester blot 技术测定 P-CREB1 在不同分组中的表达强度。结果:通过免疫荧光技术,在各组中都可以看到 P-CREB1 在细胞核内表达,以模型组最明显;运用 Western blot,发现表达趋势与免疫荧光一致,并且,给予丙戊酸钠后,P-CREB1 表达减弱,且高剂量组与低剂量组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:海马神经元无镁处理后呈癫痫样放电,同时 P-CREB1 被过度激活,而有效浓度的丙戊酸钠可抑制此反应 P-CREB1 的磷酸化水平。

【关键词】丙戊酸钠;P-CREB1;神经元;癫痫样放电

【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-14

Effects of valproate sodium on phosphorylatted cAMP responsive element binding protein after hippocampal neuronal epileptiform discharge in rat

LIU Hua, et al

(*Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of valproate sodium on P-CREB1 after hippocampal neuronal epileptiform discharge in rat. *Methods*: The neonate wistar rats were decapitated quickly to obtain the hippocampal neuron, Which were cultured in vitro, After the epileptiform discharge model of neuron was established, neurons were divided into control group, model group, low valproate dose group (50mg/L) and high dose group (100mg/L). Expression positions of P-CREB1 after epileptiform discharge were examined by immunofluorescence technique, and Western blot was used to examine the expression intensity of P-CREB1 in different group. *Results*: Through immunofluorescence, P-CREB1 was observed in the nucleus of each group, and the most intensive expression was found in model group. Through western blot, the expression tendency was found to be the same as the former *Results*, Moreover, after added valproate sodium, the expression of P-CREB1 decreased, and there was statistical significance of the difference between low valproate dose and high dose ($P<0.05$). *Conclusion*: P-CREB1 could be persistently activated in the hippocampal neuron, which presents epileptiform discharge. Valproate sodium could decrease the phosphorylation of P-CREB1 in effective dose.

【Key words】Valproate sodium; P-CREB1; Neuron; Epileptiform discharge

癫痫是由于神经元异常放电引起的一类临床综合征,是神经系统常见的慢性发作性疾病,严重危害人类的身心健康。丙戊酸钠(Valproate sodium, VAP)作为一种广谱的抗癫痫药,能很好的控制各类型的癫痫发作。cAMP 反应元件蛋白(cAMP responsive element binding protein, CREB)是位于细胞外信号调节激酶 ERK1/2 下游的一种转录因子。磷酸化使 CREB 由非活性结构转化为活性结构,从而启动多种基因的转录,引起细胞内多种长期生物学效应,比如从多途径调节神经元的功能,包括神经元的兴奋性,发育和长时程突触的可塑性[1]。为了进一步明确 VAP 的抗癫痫作用机制,本研究采用无镁细胞外液建立大鼠海马神经元癫痫样放电模型,探讨

作者介绍:刘 华(1974-),女,主治医师,硕士,研究方向:癫痫的发病机制。

通讯作者:陈阳美,男,教授,E-mail:chenym@tom.com。

了 VAP 对神经元癫痫样放电后 P-CREB1 表达影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

细胞培养箱(Thenno Fonna,USA);TE2000-U 倒置相差显微镜(Nikon,Japan);TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);TCS-SP2 型激光共聚焦扫描显微镜(Leica,Ge many);膜片钳(Nanion Technologies,Germany);DU-600 紫外分光光度计(Beckman,美国);电泳仪及电泳槽(BioRad,美国);可见光/紫外凝胶扫描分析系统(U-VP,美国);扫描分析软件系统(LabworksTM Analysis Software,美国)。

1.2 动物与试剂

新生 Wistar 乳鼠(重庆医科大学实验动物中心提供);NB 培养基、B-27、L- 谷胺酰胺(Gibco,USA);特级胎牛血清(杭州四季青),D-Hanks 液、多聚 -L- 赖氨酸(Sigma,USA);小鼠抗 p-CREB1 单克隆抗体、FITC 标记的羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)、胰蛋白酶(上海佰奥生物科技有限公司)。

1.3 海马神经元培养及模型建立和分组

采用 24 h 内新生 Wistar 大鼠,断头取脑,置入 0℃ D-Hanks 液中,在解剖显微镜下取出双侧海马,剔除脑膜后剪碎。加入 5 倍于脑组织的 0.125% 胰蛋白酶。置 37℃、5% CO_2 细胞培养箱内消化 30 min,加等体积种植液(Neurobasal 培养基、2% B-27、0.5 μmol/L- 谷胺酰胺、0.5% FBS)终止消化 5 min。离心机 1 000 r/min 转离心 5 min 后,弃上清,加种植液,巴氏滴管(经抛光冷却后)吹打后,经 200 目筛网过滤,取少量滤液计数,以种植液稀释成 50 万 / ml 的细胞悬液,24 孔板(孔内放有经 0.1% 多聚赖氨酸处理过的盖玻片)的每孔移入 1 ml 悬液接种,而 6 孔板的每孔移入 2 ml,置 37℃、5% CO_2 细胞培养箱内培养 24 h 后,更换维持液(Neurobasal 培养基、2% B-27、0.5 μmol/L- 谷胺酰胺)培养,每 3 d 更换一半培养液。将体外培养至第 9 d 的海马神经元换液,改无镁细胞外液培养 3 h 后,恢复维持液培养,同时,采用 EPC-10 膜片钳系统进行全细胞模式的电压钳记录神经元癫痫样放电,确认模型建立成功。实验分为空白组:所培养神经元不经任何处理;模型组;丙戊酸钠组:低剂量组为在加无镁细胞外液的同时加入 50 mg/L 的丙戊酸钠;高剂量组为在加无镁细胞外液的同时加入 100 mg/L 的丙戊酸钠。

1.4 免疫荧光技术定位检测 P-CREB1

将体外培养至第 9 d 的海马神经元爬片,放在载玻片上,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,10% 山羊血清封闭液室温 30 min 倾去血清,加入小鼠抗 P-CREB1 单克隆抗体(最终稀释度 1:100),放 4℃冰箱过夜。过夜后,室温放置 2 h,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,避光加山羊抗小鼠 FITC(最终稀释度 1:50),室温 2 h 后,PBS 清洗 3 次,每次 5min,50% 甘油封片,在激光共聚焦扫描显微镜下拍照。

1.5 Western blot 方法量化 P-CREB1 的表达强度

随机选取 6 孔板培养的细胞,抽提蛋白,考马斯亮蓝法定量蛋白。加入等体积 2×SDS,煮沸 10 min,10 000 r/min 离心 5 min。取样本 50μg 进行 10% SDS-PAGE 电泳,转移到 PVDF 膜,丽春红染色观察转移效果,根据标准分子量蛋白确定待测蛋白的条带位置。含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 液封闭 2 h,加入小鼠抗 P-CREB1 单克隆抗体(1:2 000)室温反应 1 h。注意摇匀。PBS 洗 15 min×1,5 min×4。加入抗鼠 HRP-IgG(1:2 500),室温反应 1 h。洗涤后用 ECL 试剂暗室内胶片曝光。用 Gelwork 4.0 图像分析系统测定目的条带的吸光度值。将检测过 P-CREB1 的 PVDF 膜放入 30 ml 抗体洗脱液中 37℃,洗脱 20 min。PBS 先洗 15 min,再洗 4 次,每次 5 min。ECL 试剂检测确定无信号后,进行 β-actin 的杂交,过程同前。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 版统计软件进行分析,分别采用两独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 海马神经元癫痫样放电的记录

经无镁细胞外液处理 3 h 后(图 1),神经元($n=8$)阵发性出现连续的稳定的 10~35 mV 动作电位,放电频率 5~17 Hz,从而确认神经元癫痫样放电模型建立成功。

2.2 P-CREB1 在细胞内的表达部位

运用免疫荧光技术可以观察到各组神经元细胞核内都可看到 P-CREB1 的表达,其中模型组中表达最强(图 2A),加药物干扰后的两组表达减弱(图 2B、C),空白组的表达最弱(图 2D)。

2.3 P-CREB1 在各组的表达强度

运用 Western blot 方法来量化 P-CREB1 在各组的表达强度。其表达趋势同免疫荧光一致(图 3),并且,各组之间相比较,差异皆有统计学意义($n=3$)。其中,模型组与其他各组相比较 $P<0.01$,高剂量组与低剂量组之间相比 $P<0.05$(图 4)。

3 讨 论

癫痫的发病机制异常复杂,至今尚不明确。近年随着对各种信号传导通路研究的深入,人们对癫痫的认识进入了新领域。在动物标本中,通过多种癫痫模型的实验研究已证实 ERK1/2 参与了癫痫的

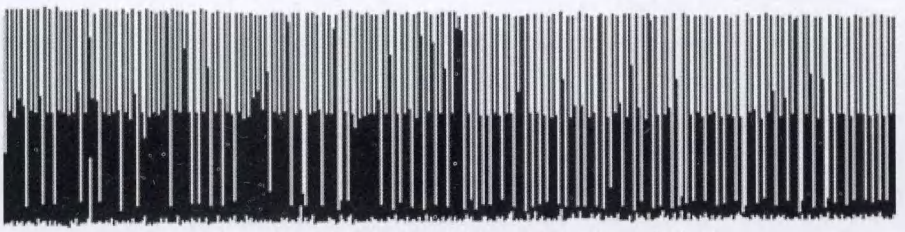
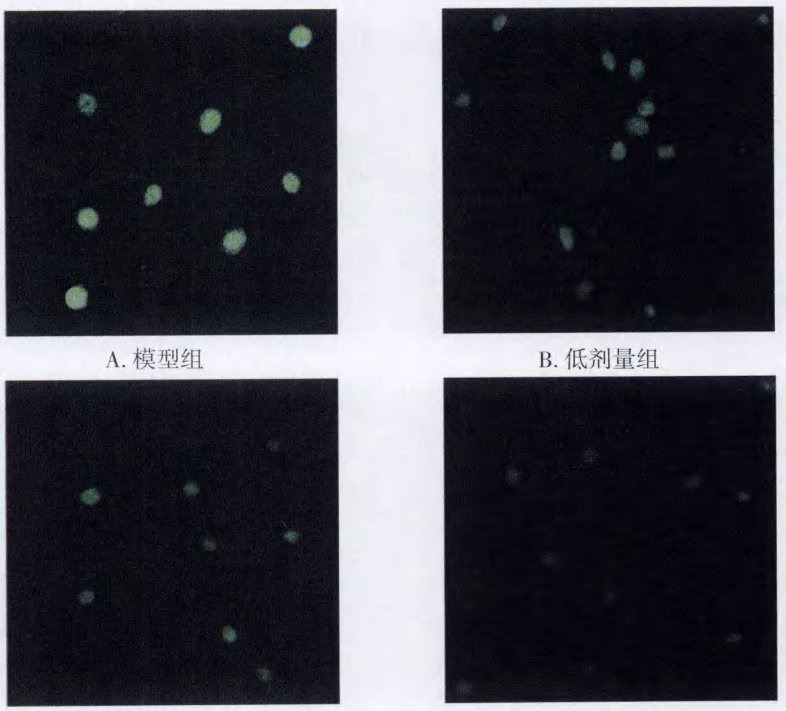


图 1　经无镁细胞外液处理 3 h 后神经元放电情况



A. 模型组　　B. 低剂量组

C. 低剂量组　　D. 对照组

图 2　免疫荧光技术各组中 P-CREB1 在细胞核内的表达

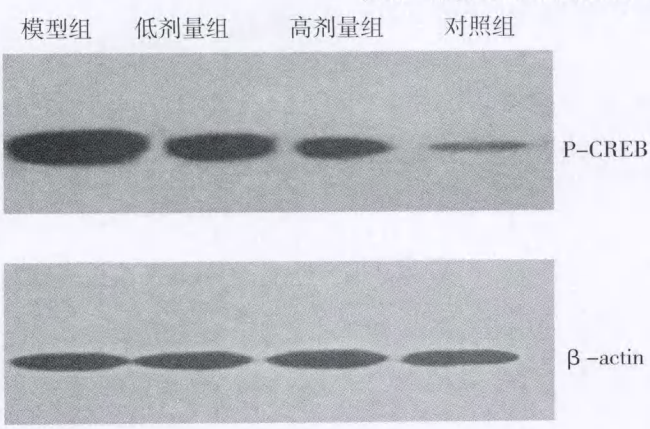


图 3　Western blot 技术各组中 P-CREB1 与相应 β-actin 的表达

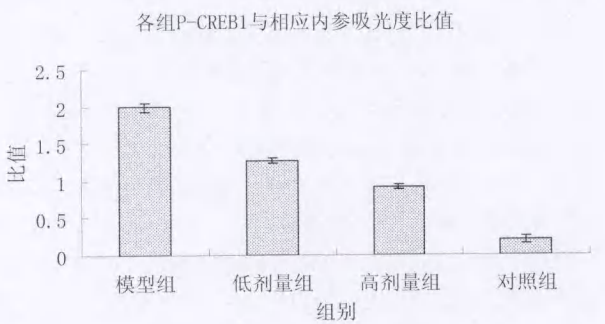


图 4　Western blot 技术各组中 P-CREB1 与相应 β-actin 条带吸光度值之比

发生、发展[2-4]；在耐药性癫痫患者的颞叶和海马中也观察到 ERK1/2 的明显磷酸化。CREB 作为ERK1/2 下游的一种重要核转录因子，ERK1/2 能够催化 CREB 在 ser-133 的磷酸化而激活 CREB。国外已有研究证明 P-CREB 与癫痫密切相关，Chang 等[5]用大鼠热性癫痫模型研究发现，长期反复的痫性发作后有神经元的丢失，苔藓纤维出芽以及P-CREB 的明显增加。Chen 等认为刺激大鼠脑内 NMDA 受体引起大量的钙内流，这些动物不仅呈现癫痫敏感性大大增加，并且 P-CREB 大量表达，钙的内流启动了包括

ERK1/2,PKC 在内的多激酶的活化,活化后共同聚焦于 CREB, 而 P-CREB 则通过对多基因转录的调整引起神经元兴奋性,突触可塑性,甚至最后神经元网络的改变[7]。而 Park 在对癫痫病人脑组织研究中发现增生的星形胶质细胞中同时有 P-ERK1/2 和 P-CREB 的表达[8],因此 ERK1/2 被激活后,可能进入细胞核,进一步激活其下游的 CREB 调控基因的表达来实现胶质细胞增生和分化。

丙戊酸钠在临床被广泛用于各种类型的癫痫发作,如失神发作,肌阵挛,全身性强直阵挛发作,同样对癫痫持续状态效果也很好。药理作用主要为抑制 r-氨基丁酸酶和琥珀酸半醛脱氢酶增加 GABA 在脑内的浓度;抑制 NMDA 介导的神经元去极化从而抑制谷氨酸盐的兴奋性;抑制 Ca^{2+}内流从而激活 K^+传导,减少钠通道的正调节等多方面抗癫痫发作[9,10]。但其潜在的,多重的机制仍未完全揭开,而丙戊酸钠与 P-CREB 之间的关系逐渐受到关注。

本研究采用新生大鼠细胞神经元培养,利用无镁脑脊液模拟癫痫外环境诱导海马神经元癫痫样放电检测到 P-CREB1 明显增加,而经丙戊酸钠处理的药物组 P-CREB1 较对照组明显减少。这表明丙戊酸钠可能通过减少 P-CREB1 而发挥抗癫痫作用。而目前丙戊酸钠对 P-CREB1 的负向调节机制不详,推测它可能通过干扰细胞外信号调节激酶等多激酶与 P-CREB1 共同组成的信号级联瀑布,继而影响苔藓纤维出芽,胶质细胞增生等癫痫病理生理过程。

总之,丙戊酸钠与各种信号调节通路及其转录分子之间的关系是多重的,与 P-CREB1 的关系仅为其中之一,从信号转导的角度去揭开丙戊酸钠抗癫痫的复杂机制,为临床科研开发有效抗癫痫药开辟了新的方向。

参 考 文 献

[1] Walton M R,Dragunow M.Is CREB a key to neuronal survival[J]? Trends Neurosci,2000,239(7):48-53.

[2] Berkeley J L,Decker M J,Levey A L. The role of muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of extracelluar signal-regulated kinase1/2 in pilocarpine-induced seizures[J]. Neurochem,2002,82(5):192-201.

[3] Merlo D,Cifelli P,Cicconi S,et al.4-Aminopyridine-induced epilepsy togenesis depends on activation of mitogen-activated protein kinase ERK [J]. Neurochem,2004,89(3):654-659.

[4] Chuang S X,Zhaon W R,Bauchwitz R,et al.Prolonged epileptiform discharge induced by altered group Ⅰ metabotroptic glutamate receptor-mediated synaptic responses in hippocampal slices of a fragile X mouse model[J]. Neurosci,2005,25(35):8048-8055.

[5] 席志芹,王学峰,吴 源,等.细胞外信号调节激酶在耐药性颞叶癫痫患者中的表达[J]. 中华神经科杂志,2006,39(10):691-696.

[6] Chang Y C,Huang Y M,Kuo Y M,et al.Febrile seizure impair memory and cAMP response-element binding protein activation[J]. Ann Neurol,2003,54(6):706-718.

[7] Chen W F,Chang H,Huang L T,et al.Alterations in long-term seizure susceptibility and the complex of PSD-95 with NMDA receptor from animals previously exposed to perinatal hypoxia[J]. Epilepsia,2006,47(2):288-296.

[8] Park S A,Kim T S,Choi K S,et al.Chronic activation of CREB and p90RSK in human epileptic hippocampus[J]. Exp and Mol Med,2003,35(5):365-370.

[9] Cecilie U,Svein I.Valproate:Past,present,and future[J]. CNS Drug Reviews,2003,9(2):199-216.

[10] 宋 葳,姜 舟,吴 惧,等.丙戊酸钠个体化治疗对癫痫患儿血清甘油三酯影响的研究[J].重庆医学,2008,37(18):2133.

(责任编辑:冉明会)

读者·编者·作者

关于论文写作中的作者致谢

我国著作权法公布以来,已得到社会各界的广泛重视,作为医学科技期刊必须不折不扣的执行著作版权法。为此将本刊对作者致谢的有关要求重申如下。在文后致谢是表示感谢并记录在案的意思。对给予实质性帮助而又不能列为作者的单位或个人应在文后给予致谢,但必须征得被致谢人的书面同意。致谢应避免以下倾向:(1)对确实给予了帮助的单位和个人,甚至用了他人的方法、思路、资料,为了抢先发表,而不公开致谢和说明。(2)出于某种考虑,将应被致谢人放在作者的位置上,混淆了作者和被致谢者的权利和义务。(3)以知名人士、知名专家包装自己的论文,抬高论文的身份,将未曾参与工作的,也未阅读过该论文的知名专家写在被致谢者中。被致谢者包括:(1)对研究提供资助的单位和个人、合作单位。(2)协助完成研究工作和提供便利条件的组织和个人。(3)协助诊断和提出重要建议的人。(4)给予转载和引用权的资料、图片、文献、研究思想和设想的所有者。(5)作出贡献又不能成为作者的人,如提供技术帮助和给予财力、物力支持的人,在致谢中应阐明其支援的性质。(6)其他需致谢者。

本刊编辑部