临床研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0070-03

耐药性癫痫患者脑组织中Bcl-2蛋白的表达及临床意义

曾 艳[1],王学峰[1],林 涛[1],何 梅[1],李劲梅[2],袁 洁[1],王 亮[1],关立峰[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016;
2.四川大学华西医学院附属第一医院神经内科,四川 610041)

【摘 要】目的:研究耐药性癫痫患者脑组织中Bcl-2蛋白的表达,以探讨其在耐药性癫痫发生及发展中的作用。方法:收集153例耐药性癫痫患者术后脑组织标本,按随机化原则从中抽取20例作为本次研究的实验组,用免疫组织化学、免疫荧光,检测Bcl-2蛋白表达产物,按照配对设计原则与性别相同、年龄近似的对照组进行比较。结果:免疫组化及免疫荧光均可见Bcl-2蛋白在实验组中的表达量与对照组相同部位相比明显增加,t检验示实验组与对照组间的差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:耐药性癫痫患者脑组织中Bcl-2表达增高与在耐药性癫痫形成中起着重要作用的细胞凋亡有关,这种异常表达的蛋白质参与了耐药性癫痫的发生发展。

【关键词】Bcl-2蛋白;癫痫;细胞凋亡;免疫组织化学;免疫荧光
【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

The overexpression of the Bcl-2 protein in the brain of paitents with drug-refractory epilepsy

ZENG Yan, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the expression of Bcl-2 protein in the brain tissue of paitents with drug-refractory epilepsy and its clinical value. *Methods*: immunohistochemistry、immunofluorescence were used to detect the expression of Bcl-2 protein in the surgically removed brain tissue of patients with drug-refractory epilepsy from the brain bank of our department ($n=20$), and the results were compared with that of normal controls($n=20$). *Results*: Bcl-2 protein expression was significantly increased in temporal lobe cortex and hippocampus of patients with drug-refractory epilepsy compared with controls in the same regions, and there was significant difference between patient group and control group by t-test. *Conclusion*: The results indicate that the overexpression of Bcl-2 in the cortex of temporal lobe and hippocampus may be involved in the pathophysiology of drug-refractory epilepsy.

【Key words】 Bcl-2; Epilepsy; Apoptosis; Immunohistochemistry; Immunofluorescence

耐药性癫痫是临床上尚未解决的一个问题,其病理研究中最为重要的发现之一就是神经元凋亡或坏死[1-4]。细胞凋亡的发生是由基因控制的,凋亡通路中的Bcl-2家族成员发挥重要的调节作用[5],随着对凋亡相关蛋白的发现及功能研究,发现Bcl-2家族蛋白由抗凋亡和促凋亡成员组成。其中,Bcl-2为抗凋亡基因,研究表明Bcl-2可阻止许多刺激物诱发的细胞凋亡,它抑制的是细胞凋亡的共同通道[6]。为了探讨其与耐药性癫痫的关系,我们用免疫组化和免疫荧光方法分别检测了Bcl-2在耐药性癫痫患者颞叶、海马脑组织中的表达,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 实验组与对照组

实验组共20例,全部来自2005~2006年在第三军医大学新桥医院,重庆医科大学附属第一医院,湖北省脑科医院及广东三九脑科医院行手术治疗的患者。符合下列条件:(1)发作类型符合国际抗癫痫联盟1981年有关癫痫发作的分类。(2)规则服用两种或两种以上一线抗癫痫药物(如苯妥英钠 卡马西平、丙戊酸、苯巴比妥),发作与用药前比较没有明显好转;(3)头颅CT或MRI检查除外占位性病变以及其他神经系统疾病;(4)手术前1周放置硬膜下电极,术中用皮质电极进行检测,发现有明确和固定的癫痫放电部位,有手术适应症,且

作者介绍:曾 艳(1982-),女,硕士,研究方向:癫痫的发病机制。
通讯作者:王学峰,男,教授,E-mail:xfyp@163.com。

能进行手术者。(5)患者及家属术前签署知情同意书。其中男性12例,女性8例,年龄15~44岁,平均(22.23±9.13)岁;病程3~28年,平均(9.65±6.13)年。部分继发全身强直-阵挛性发作11例,复杂部分性发作3例,有多种发作类型者6例(强直性发作、单纯部分性、复杂部分性发作)。对照组20例,是按配对原则选择与实验组性别相同,年龄相似,在我院或第三军医大学新桥医院行手术减压或清创患者的颞叶脑组织,符合下列条件:(1)无癫痫病史和家族性遗传病史;(2)病理切片证实脑组织结构基本正常;(3)家属同意,并签署知情同意书。其中男11例,女9例,年龄16~44岁,平均(23.05±9.17)岁。

1.2 方法

1.2.1 标本的收集及其保存 实验组和对照组患者脑组织在术中采集,标本取出后部分立即放入液氮中保存备用,部分置于4%多聚甲醛中固定48h(4℃),随后常规石蜡包埋切片,常温保存备用。每组随机抽取1张做HE染色,以确定解剖部位。

1.2.2 免疫组化染色 将选定的每份标本随机切片12张,片厚4μm,然后按随机化原则从每份标本抽取2张,组成新的待测标本。采用SABC法进行检测。抗体购置Santa Cruz Biotechnology公司,按试剂盒说明书进行染色,Bcl-2抗体滴度1:100,4℃过夜,加入生物素标记的二抗,DAB显色。图像数据分析在光镜下采用北航CM-200B型生物医学图像分析系统,分别对试验组和对照组切片进行图像分析,每张切片随机选取8个视野,检测每个视野阳性神经元的光密度值。

1.2.3 免疫荧光检测 组织切片脱蜡抗原修复后,滴加0.4% Triton X-100和1%牛血清白蛋白室温下放置1h,随后滴加山羊血清封闭液封闭5h,甩去封闭液,加一抗(1:100,Santa Cruz Biotechnology公司),4℃过夜,PBS洗去一抗,加绿色荧光标记的二抗(1:100,博士德公司),),室温下避光孵育1h,PBS冲洗后封片。应用Leica TCS-SP2共聚焦显微镜观察结果,每张切片随机选取8个视野,测定荧光强度。

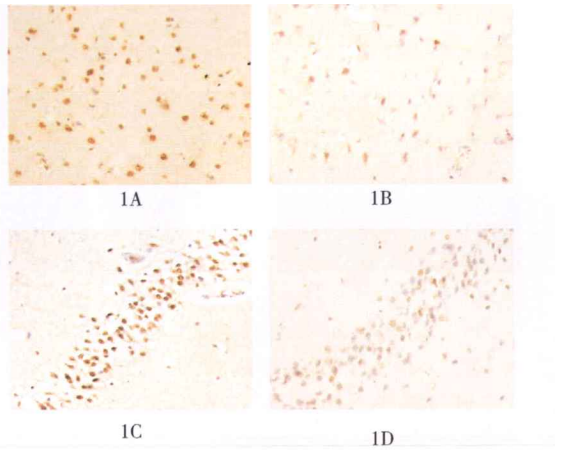
2 结 果

2.1 HE染色

实验组和对照组海马脑组织均能够发现明确的神经元条带,实验组颞叶及海马可见神经胶质细胞增生和神经元脱失,对照组颞叶及海马脑组织形态结构均正常。

2.2 免疫组化

实验组和对照组颞叶和海马神经元胞质中均可见棕黄色颗粒,说明均有Bcl-2表达(图1)。空白对照组中未见阳性染色。由图1可见Bcl-2蛋白表达量实验组(1A、1C)明显高于对照组(1B、1D)。实验组颞叶、对照组颞叶、实验组海马、对照组海马平均吸光度(A)分别为0.043±0.011、0.021±0.006、0.047±0.009、0.019±0.009。t检验表明两组颞叶之间Bcl-2的表达差异有统计学意义($P<0.05$),两组海马之间比较差异同样有统计学意义($P<0.05$)。



1A实验组颞叶;1B对照组颞叶;1C实验组海马;1D对照组海马;1A、1C可见较多神经细胞被染成棕黄色,1B、1D可见神经细胞胞质着色较浅,阳性神经细胞数目明显较少

图1 Bcl-2免疫组织化学染色(DAB×200)

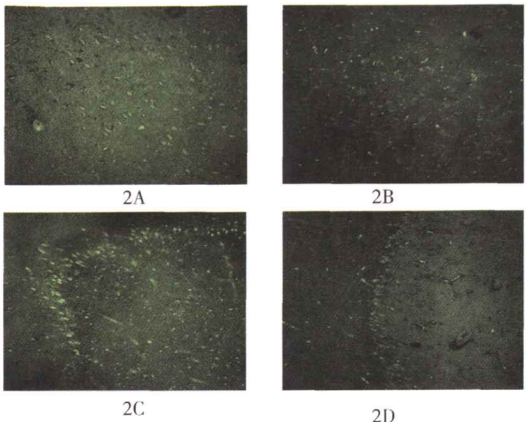
2.3 免疫荧光

实验组和对照组颞叶和海马神经元胞质中均发出绿色荧光,说明均有Bcl-2表达(图2)。由图2可见实验组(2A、2C)荧光强度明显高于对照组(2B、2D)。实验组颞叶、对照组颞叶、实验组海马、对照组海马荧光强度分别为17.5±2.9、10.8±3.1、23.1±3.5、11.1±2.1。t检验表明两组颞叶之间的表达差异有统计学意义($P<0.05$),两组海马之间比较差异同样有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

癫痫是由脑神经元高度同步化过度放电所导致的反复、发作性、短暂性中枢神经系统功能失常为特征的慢性脑病。癫痫发作可导致神经元损伤,其中有一部分是通过细胞凋亡途径实现的,神经元凋亡也是兴奋性突触环路形成的重要原因。许多资料显示在癫痫中凋亡相关基因的表达明显增加,这可引起神经元广泛性坏死,导致神经元间突触联系的重组,而神经网络及环路的重组是难治性癫痫形成的原因[7]。

动物模型和癫痫患者的神经影像及病理研究已证明癫痫发作可诱导脑细胞的凋亡[4]。细胞凋亡



2A实验组颞叶；2B对照组颞叶；2C实验组海马；2D对照组海马；2A、2C可见神经细胞细胞胞质发出较强的绿色荧光；2B、2D可见神经细胞胞质荧光强度较弱，发出荧光的神经细胞数目明显较少

图2　Bcl-2免疫图片(×200)

是指细胞在各种死亡信号刺激后发生的一系列瀑布式激活的主动性细胞死亡过程。细胞凋亡过程可分为3个阶段：死亡信号的传递；凋亡的调控与执行；凋亡的特征性改变。其中Bcl-2、Cyt C、和caspase为细胞凋亡所需的三个效应器。Bcl-2家族通过调控Cyt C的释放参与凋亡过程，是调节细胞凋亡的重要基因家族。根据Bcl-2家族对细胞凋亡的作用可将它们分为相对立的两大类：抗凋亡基因Bcl-1、Bcl-2、Bcl-x、Bcl-xl；促凋亡基因bax、bak、bad、bcl-Xs。两类分子的比例决定了细胞是否发生凋亡。Bcl-2 蛋白定位于线粒体外膜上，是促进细胞存活，抑制凋亡的基因，可阻止前凋亡因子Cyt C从线粒体释放，从而抑制细胞凋亡[8]。

本实验发现，耐药性癫痫患者脑组织中Bcl-2的表达水平较正常脑组织中明显增高($P<0.05$)，这表明Bcl-2表达水平的增高可能是神经细胞自我保护的机制，提示脑组织在反复多次的痫性发作后可通过Bcl-2这一细胞凋亡抑制基因的上调来对神经元损伤作出反应。Bcl-2水平的增高可抑制细胞凋亡，但这种自我保护机制是有限的，Bcl-2可通过凋亡的早期环节而发挥作用，可阻止或降低细胞皱缩、染色质浓缩和DNA裂解的发生等。

本实验结果提示Bcl-2参与了癫痫，特别是耐药性癫痫的发生及发展过程中神经细胞的抗损伤过程，了解其对凋亡的调控机制进而抑制癫痫发作引起的神经细胞凋亡对耐药性癫痫的治疗可能有一定的指导意义，调控Bcl-2的表达有可能成为新抗癫痫的治疗靶点。

参 考 文 献

[1] Covolan L,Smith RL,Mello LE. Ultrastructural identification of dentate granule cell death from pilocarpine-induced seizure[J]. Epilepsy Res,2000;41(1):9-21.

[2] Weihl C,Macdonald RL,Stoodley M,et al. Gene therapy for cerebrovascular disease[J]. Neurosurgery,1999;44(2):239-252.

[3] Sankar R,Shin DH,Liu H, et al. Patterns of Status epilepticus induced neuronal injury during development and long-term consequences[J]. J Neurosic,1998;18(20):8382-8393.

[4] David CH,Roger PS. Epilepsy and apoptosis pathways[J]. Journal of Cerebral Blood Flow & metabolish,2005;25:1557-1572.

[5] Gross A,McDonnell JM,Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis[J]. Genes Dev,1999;13(15):1899-1911.

[6] Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death[J]. J Cell Biol,1994;124(1-2):1-6.

[7] 王学峰. 难治性癫痫的发病机制[M].上海：上海科学技术出版社，2002.27-30.

[8] Adams JM,Cory S. The Bcl-2 protein family:arbiters of cell survival[J]. Science,1998;281(5381):1322-1326.

第九届全国神经生化会议将于
2009 年 5 月在湖南长沙举行，欢迎届时参加！