

神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.02.011

海马神经元无镁致病性损伤对 CREB 磷酸化水平的影响

周 艳¹, 徐 平², 张 骏², 雷显泽², 徐祖才¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016; 2. 遵义医学院附属医院神经内科, 遵义 563003)

【摘要】目的:观察原代培养的海马神经元经无镁人工脑脊液诱发癫痫样放电后, cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response-element binding protein, CREB)磷酸化表达水平的变化。**方法:**将所培养的神经元随机分成癫痫组和对照组, 癫痫组中的神经元培养至第 10 天时, 经无镁人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)处理 3 h 建立癫痫样放电模型, 对照组中的神经元培养至第 10 天时, 使用正常人工脑脊液处理 3 h。使用 Western blot 检测 p-CREB 和 β -actin 的表达, 免疫荧光双重标记磷酸化 CREB(p-CREB)和神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)的表达。**结果:**Western blot 显示 p-CREB 水平在癫痫样放电后 2 h 即较对照组增强且在 6 h 达到高峰, 在 12 h 和 24 h 都维持在增强水平, 差异皆有统计学意义($P<0.01$)。取癫痫样放电后 6 h 的神经元行免疫荧光检测, 其荧光强度绝对值较对照组明显增强, 差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论:**p-CREB 水平在海马神经元无镁致病性损伤后增强, 可能在癫痫样放电中起到重要作用。

【关键词】癫痫; 海马神经元; 磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白

【中图分类号】R742.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-05-31

Effects of magnesium-free epileptiform damage on the CREB phosphorylation in hippocampal neurons

Zhou Yan¹, Xu Ping², Zhang Jun², Lei Xianze², Xu Zucui¹

(1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College)

【Abstract】Objective: To observe the expression of phosphorylated cAMP response-element binding protein(p-CREB) after epileptiform discharge of hippocampal neurons. **Methods:** All cultured neurons were divided into two groups: epilepsy group; on the 10th d after the incubation, maintenance medium was replaced with magnesium-free artificial cerebrospinal fluid for 3 h; control group; on the 10th d after the incubation, maintenance medium was replaced with normal artificial cerebrospinal fluid for 3 h. Changes in expressions of p-CREB and β -actin were observed by Western blot. Changes in p-CREB and neuronal nuclei(NeuN) expression was investigated by double labeled immunofluorescence. **Results:** Results of Western blot demonstrated that p-CREB expression was increased at 2 h after epileptiform discharges in epilepsy group than in control group, peaked at 6 h and maintained increased at 12 h and 24 h. Compared with that in control group, expression of p-CREB was significantly increased in epilepsy group at each time point ($P<0.01$). Immunofluorescence intensity of p-CREB was also increased significantly in epilepsy group than in control group($P<0.01$). **Conclusions:** p-CREB expression in epileptiform damage neurons is significantly enhanced, which probably closely relate with epileptiform discharge.

【Key words】epilepsy; hippocampal neuron; phosphorylated cAMP response-element binding protein

癫痫是一组可由多种不同因素引起, 脑部神经元高度同步化异常放电的临床综合征。有研究表明^[1-2], 无镁诱发的神经元反复自发的动作电位与癫痫发作时电生理活动类似, 并且抗癫痫药物可以阻止这类动作电位, 然而, 神经元经无镁致病性损伤的

细胞内信号分子机制尚不清楚。cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response-element binding protein, CREB)是一种重要的核内转录因子, 也是神经元内诱导基因表达的重要调节因子, 过度、持久的 CREB 磷酸化(p-CREB)与神经元的一些病理变化及神经元的功能改变密切相关。本文针对 CREB 在原代培养海马神经元的致病性损伤后磷酸化表达特点进行了初步研究, 探讨 CREB 在神经元癫痫样放电过

作者介绍: 周 艳, Email: 524488645@qq.com,

研究方向: 癫痫。

通信作者: 徐祖才, Email: docxzc@126.com。

程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

24 h 内新生 Wistar 大鼠($n=5$)由重庆医科大学实验动物中心提供。Neurobasal(NB)培养基、B-27、L-谷氨酰胺及特级胎牛血清均购自美国 Gibco 公司,D-Hanks 和多聚-L-赖氨酸购于美国 Sigma 公司,胰蛋白酶购自上海佰奥生物科技有限公司提供,小鼠抗大鼠神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)一抗购自美国 Millipore 公司,兔抗大鼠 p-CREB 和小鼠抗大鼠 β -actin 购自 Sigma 公司、兔抗小鼠 FITC 和山羊抗兔 TRITC 二抗由北京中杉公司分装。SW-CJ-2FD 型超净工作台购自苏净集团安泰公司,细胞培养箱购自美国 Thermo Fonna 公司,细胞培养板购自美国 Costar 公司,倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司;离心机(多管架自动平衡型)购自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购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 神经元原代培养及模型建立 在 24 孔细胞培养板内,放有经 0.1%多聚-L-赖氨酸处理的盖玻片,消毒后备用。取 24 h 新生 Wistar 大鼠,速断头取脑,在 0 °C D-Hanks 液中取双侧海马,剪碎,加 5 倍于脑组织体积的 0.125%胰蛋白酶在 37 °C 细胞培养箱内消化 20~30 min,后加入相同体积的种植液(NB 培养基、2%B-27、0.5 μ mol/L L-谷氨酰胺及 10%胎牛血清)维持 5 min 以终止消化。1 000 r/min $\times$ 5 min 离心,弃上清,加入种植液,使用抛光冷却后的巴氏管轻柔吹打,制成细胞悬液,200 目筛网过滤,计数,以种植液稀释成 5×10^5 个/ml 的细胞悬液,24 孔细胞培养板的每孔按 1 ml 悬液进行接种,置入 5%CO₂、37 °C 细胞培养箱内培养 24 h 即全液更换维持液培养(NB 培养基、2% B-27 和 0.5 μ mol/L L-谷氨酰胺),后每隔 3 d 换一半培养液,致第 10 天时,将神经元全液换成无镁人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)处理 3 h,建立神经元癫痫样放电模型^[3-4],正常组的神经元全液换成正常的 ACSF 处理 3 h,ACSF 的组成及其浓度(mmol/L): NaCl 124, KCl 3, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, NaH₂PO₄ 1.23, NaHCO₃ 26 和葡萄糖 10。

1.2.2 Western blot 随机选择 6 孔板的神经元,分为对照组和癫痫组,分别在相应处理后 2、6、12 h 和 24 h 抽提蛋白,考马斯亮蓝法定量蛋白。加入等体积 2 $\times$ SDS,煮沸 10 min,10 000 r/min 离心 5 min。取样本 50 μ g 进行 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,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,加入兔抗大鼠 p-CREB 抗体(1:1 000)室温反应 1 h,注意摇匀。PBS 洗 15 min $\times$ 1 次,5 min $\times$ 4 次。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。检测过 p-CREB 的 PVDF 膜

放入 30 ml 抗体洗脱液中 37 °C 维持 20 min,后 PBS 洗 15 min $\times$ 1 次,5 min $\times$ 4 次。ECL 试剂检测确定无信号后,进行 β -actin 的杂交,过程同 1.2.2。

1.2.3 免疫荧光双重标记 随机选择 24 孔板所培养的神经元进行分组处理(分组同 Western blot),NeuN 是神经元胞核中的一种特异性蛋白质,被认为是成熟神经元的特异性标记物^[5]。神经元培养至第 10 天,行细胞爬片,置载玻片,4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,10%山羊血清封闭液室温处理 30 min,倾去血清,加小鼠抗大鼠 NeuN 抗体及兔抗大鼠 p-CREB(最终稀释度 1:100),4 °C 冰箱过夜。次日,室温放置 2 h,PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,避光加标记绿色荧光的山羊抗小鼠 FITC 及标记红色荧光的山羊抗兔 TRITC(最终稀释度 1:50)的混合液,室温 2 h 后,PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,50% 甘油封片备用,在激光共聚焦扫描显微镜下摄影。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。其中 Western blot 结果分析采用单因素方差分析;癫痫组内各组结果分别与对照组相比,癫痫组各组间不做比较;免疫荧光强度分析采用两独立样本 t 检验分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Western blot 检测 p-CREB 的表达

在癫痫组中 p-CREB 水平在神经元受无镁致痫性损伤后 2 h 即较对照组增强,6 h 时达到高峰且在损伤后 12 h 和 24 h 的水平均增强(图 1A)。将癫痫组和对照组 p-CREB 的灰度值与对应 β -actin 的灰度值相除,所得的比值即平均吸光度值进行统计学分析,其中 $F=1\ 838.354$,癫痫组中 2、6、12 h 及 24 h 组分别与对照组相比,SPSS 17.0 统计软件显示 P 值分别为 0.000、0.000、0.000、0.000,结果均有统计学意义(图 1B)。

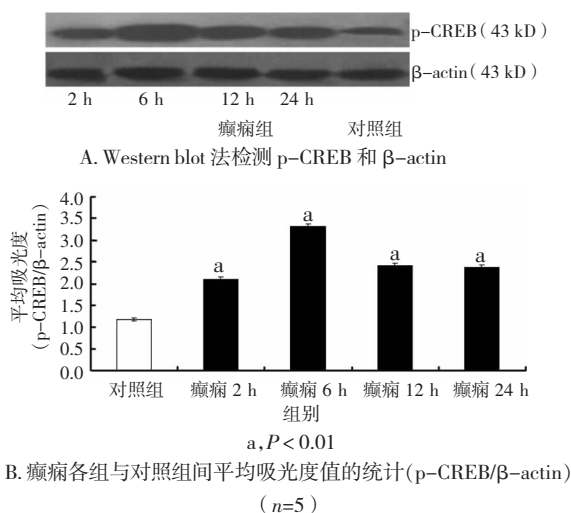
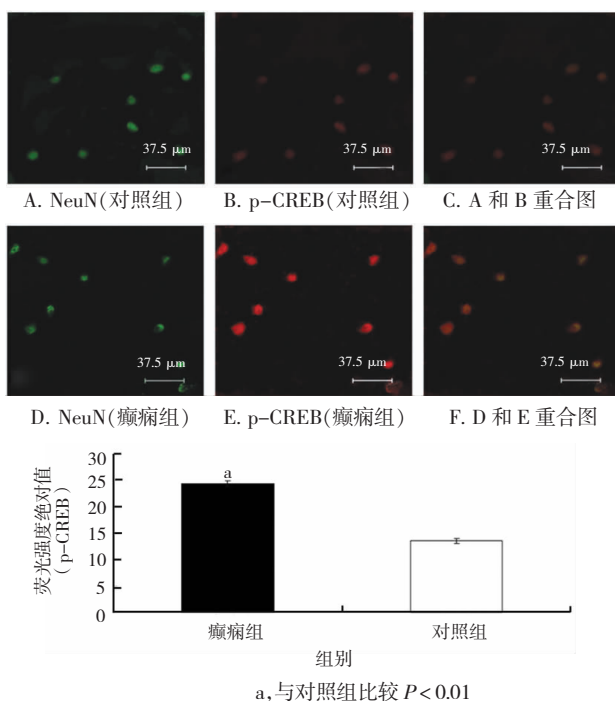


图 1 Western blot 法检测 p-CREB 及 β -actin 的表达
Fig.1 Expression of p-CREB and β -actin detected by Western blot

2.2 免疫荧光双重标记 p-CREB 及 NeuN 的表达

选择癫痫组中 6 h 时间点的神经元进行实验,图 2 中的 A 和 D 是 NeuN 对 2 组组神经元的核标记;B 指对照组中 p-CREB 即有表达;E 指癫痫组中 p-CREB 表达明显增强;C、A 和 B 的重合图;F、D 和 E 的重合;G 指随机选择 B 和 E 中的 20 个神经元 (4×5 个视野)的荧光强度绝对值进行统计学分析(图 2G),结果癫痫组与对照组相比较:癫痫组为 24.58 ± 1.19 ,对照组为 13.55 ± 0.45 ,差异有统计学意义 ($t=38.754$, $P=0.000$)。



G. 2 组间 p-CREB 荧光强度绝对值的统计分析
($n=4 \times 5$ 视野)

图 2 免疫荧光双重标记法检测 p-CREB 及 NeuN 的表达
Fig.2 Expression of p-CREB and NeuN detected by immunofluorescence double labeling

3 讨论

一直以来,动物模型在癫痫各研究领域的运用方兴未艾,且普遍认为癫痫病灶中神经元丢失是癫痫的主要机制^[6]。然而,癫痫者的病内不仅有神经元的缺失,还存在大量的异常放电的神经元,并且,最近“细胞离子通道功能异常导致癫痫发作”,即“癫痫神经元”学说又引起了大家的关注^[7-8]。此外, Mg^{2+} 在维持中枢神经系统神经元正常电活动时起着重要作用,海马是神经元高度集中的部位,且在癫痫的发病中具有重要的地位,近年来海马神经元原代培养在癫痫研究中越来越受到重视,经无镁损伤是

指:经无镁人工脑脊液培养的神经元其兴奋性会增强,出现癫痫样放电,是癫痫模型创建的一种方式。故对正常神经元而言是一种损伤模型。后所致的癫痫样放电与人类颞叶癫痫十分相似,已被视为癫痫的细胞模型而用于癫痫发病机制研究^[9-11]。

细胞内信号分子激活后,可使神经元胞膜离子通道或受体蛋白磷酸化,改变其兴奋性,此外,还可激活核内转录因子,调节信号转导所引起的靶基因表达,从而介导胞外刺激引起的相应变化^[12]。CREB 是真核生物细胞核内 cAMP 变化的转录转导因子,调节基因的转录和蛋白质的合成,是细胞内多种信号通路的关键成分之一,其以活化形式 p-CREB 调节即刻早基因等多种下游基因的转录,是调控突触可塑性所需的一种关键的信号分子^[13-14]。

在正常情况下,细胞外的 Mg^{2+} 对神经元胞膜上的 N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体有阻断作用,当神经元在无镁 ACSF 处理 3 h 的过程中,整个神经元处在无 Mg^{2+} 的环境中,使得 Mg^{2+} 对 NMDA 受体的阻断功能得到解除,从而使得神经元的兴奋性增强,出现癫痫样放电^[15]。本实验的结果显示,原代培养的海马神经元癫痫样放电后 2 h, p-CREB 的水平就明显增强,这种趋势在致病性损伤后 6 h 达到高峰且一直可以维持到 24 h。换言之,在无镁环境中, NMDA 受体功能发生改变的同时, CREB 的磷酸化水平明显增强,这与 Huang 等^[16]的研究结果不谋而合。然而,本实验因未进行功能研究, p-CREB 在癫痫样放电过程中是促进还是抑制癫痫样放电,尚需实验进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Sombati S, DeLorenzo RJ. Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture[J]. J Neurophysiol, 1995, 73(4): 1706-1711.
- [2] DeLorenzo RJ, Sombati S, Coulter DA. Effects of topiramate on sustained repetitive firing and spontaneous recurrent seizure discharges in cultured hippocampal neurons[J]. Epilepsia, 2000, 41(s1): 40-44.
- [3] Xu ZC, Chen YM, Xu P, et al. Epileptiform discharge upregulates p-ERK1/2, growth-associated protein 43 and synaptophysin in cultured rat hippocampal neurons[J]. Seizure, 2009, 18(10): 680-685.
- [4] 徐祖才, 刘 华, 李雨芹, 等. 新生大鼠海马神经元癫痫样放电模型的初步研究[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(6): 696-699.
- [5] 张雨平, 黄其林, 赵聪敏, 等. 大鼠不同发育期脑神经元核抗原的表达研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(21): 2901-2903.
- [6] Heinemann U. Basic mechanisms of partial epilepsies[J]. Curr Opin

神经疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.2014.02.012

跑台训练对脑缺血大鼠脑组织 Reelin、PI3KCA 及突触素表达的影响

杨 婉,李光勤,蓝晓芳,曾 倩,刘 可

(重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

【摘要】目的:观察脑缺血大鼠跑台运动训练后神经功能恢复情况及磷脂酰肌醇-3-激酶 α 亚单位(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α isoform, PI3KCA)、Reelin 及突触素表达的变化。**方法:**选取健康雄性 SD 大鼠 54 只,随机分为假手术组、缺血对照组及运动训练组。采用线栓法大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)方法造成局灶性脑缺血模型。运动训练组于造模后第 3 天进行 16 d 的跑台训练(15 m/min, 每日 30 min)。运用改良神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)对 3 组动物进行神经功能评分。采用 HE 染色观察各组海马神经细胞形态;运用免疫组化方法检测各组 Reelin 及 PI3KCA 阳性细胞数;Western blot 检测各组缺血皮质 Reelin 及突触素蛋白水平。**结果:**MCAO 术后 19 d,运动训练组 mNSS 评分较缺血对照组明显降低($P<0.05$)。HE 染色显示,假手术组海马神经细胞结构完整;缺血对照组海马神经细胞出现异常变化,细胞体积缩小,核不规则,细胞排列散乱,大量变性;运动训练组海马神经细胞结构基本正常,细胞排列尚整齐。免疫组化显示,运动训练组大鼠缺血侧脑组织 Reelin 及 PI3KCA 阳性细胞数均高于缺血对照组,差异有统计学意义(18.27 ± 4.03 vs. 7.53 ± 2.03 , $P<0.01$; 10.27 ± 1.62 vs. 5.40 ± 1.84 , $P<0.01$)。Western blot 检测运动训练组 Reelin 及突触素蛋白表达明显高于缺血组和假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$);而缺血组较假手术组 Reelin 及突触素蛋白的表达水平虽增加,但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**跑台运动训练可改善局灶性脑缺血大鼠神经功能评分,上调脑组织 Reelin、PI3KCA 及突触素的表达,促进脑缺血后的神经功能恢复。

【关键词】脑缺血;跑台训练;Reelin;磷脂酰肌醇-3-激酶 α 亚单位;突触素

【中图分类号】R743.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-08-27

作者介绍:杨 婉,Email:365218410@qq.com,

研究方向:脑血管病。

通信作者:李光勤,Email:liguangqin@tom.com。

基金项目:重庆市教委资助项目(编号:KJ130306)。

Neurol, 2004, 17(2):155-159.

[7] Bernard C, Anderson A, Becker A, et al. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy[J]. Science, 2004, 305(5683):532-535.

[8] Dudek FE, Rogawski MA. The epileptic neuron redux[J]. Epilepsy Curr, 2002, 2(5):151-152.

[9] Solger J, Heinemann U, Behr J. Electrical and chemical long-term depression do not attenuate low- Mg^{2+} -induced epileptiform activity in the entorhinal cortex[J]. Epilepsia, 2005, 46(4):509-516.

[10] Blair RE, Sombati S, Lawrence DC, et al. Epileptogenesis causes acute and chronic increases in GABAA receptor endocytosis that contributes to the induction and maintenance of seizures in the hippocampal culture model of acquired epilepsy[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 310(3):871-880.

[11] 徐祖才, 刘 华, 陈阳美. 海马神经元癫痫样放电后 ERK1/2 信号通路与 C-fos 的相关性[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(23):1639-1642.

[12] 娄 燕, 王维平, 李 攀, 等. CREB 和 NMDA 受体在致痫大鼠学习记忆功能改变中的变化及意义[J]. 四川大学学报(医学版), 2007,

38(6):949-953.

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

[14] Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, et al. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus dependent spatial memory[J]. Neuron, 2002, 34(3):447-462.

[15] DeLorenzo RJ, Pal S, Sombati S. Prolonged activation of the N-methyl-D-aspartate receptor- Ca^{2+} transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(24):14482-14487.

[16] Huang YH, Lin Y, Brown TE, et al. CREB modulates the functional output of nucleus accumbens neurons: a critical role of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor(NMDAR) receptors[J]. J Biol Chem, 2008, 283(5):2751-2760.

(责任编辑:关蕴良)