

神经科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000058

波形蛋白在癫痫大鼠心肌中的表达及意义

刘剑波¹, 赵 鹏², 刘明博¹, 王 徐¹, 赵敏珠¹, 朱 英¹, 李剑波¹

(1. 重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016;

2. 遵义医药高等专科学校临床医学系法医学教研室, 遵义 563002)

【摘要】目的:检测波形蛋白(vimentin, VIM)在癫痫大鼠心肌中的表达,探讨癫痫发作致心肌损伤的特点。**方法:**通过腹腔注射戊四氮建立癫痫模型,运用组织病理学、免疫组化及 Western blot 方法检测癫痫大鼠心肌 VIM 的表达。**结果:**癫痫各组心肌呈出血、缺血缺氧性改变;随癫痫的病程延长,发作次数增多、发作时间增加,心肌有不同程度的变性坏死,成纤维细胞增生,VIM 表达逐渐升高。**结论:**癫痫发作可引起心肌损伤,促进心肌中 VIM 表达。

【关键词】波形蛋白;癫痫;猝死;心肌**【中图分类号】**R89**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-01-05

Expression and significance of vimentin in myocardium of epileptic rats

Liu Jianbo¹, Zhao Peng², Liu Mingbo¹, Wang Xu¹, Zhao Minzhu¹, Zhu Ying¹, Li Jianbo¹

(1. Teaching and Research Section of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Teaching and Research Section of Forensic Medicine, School of Clinical Medicine, Zunyi Medical and Pharmaceutical College)

【Abstract】Objective: To detect the expression of vimentin(VIM) in myocardium and to explore the characteristics of myocardial injuries caused by epilepsy. **Methods:** Models of epileptic rats were established by intraperitoneal injection of pentylenetetrazol. Expression of VIM in myocardium of epileptic rats was examined by pathologic, immunohistochemistry, and Western blot methods. **Results:** Hemorrhagic and hypoxic ischemic changes were showed in myocardiums of epileptic groups. With the extended duration of epilepsy, and the increases of frequency and time of seizures, there was a trend of aggravation of myocardial necrosis, fibroblast proliferation, as well as a remarkable up-regulation of VIM. **Conclusion:** Epilepsy can cause myocardial injury and promote the expression of VIM in myocardium.

【Key words】vimentin; epilepsy; sudden death; myocardium

癫痫患者死亡案例中,多数为癫痫发作时意识丧失致高坠、溺水、误吸等意外死亡,但也有部分患者死于癫痫本身,即癫痫猝死(sudden unexpected death in epilepsy, SUDEP),其发病机制尚不清楚。波形蛋白(vimentin, VIM)属于中间纤维家族,是间质细胞中重要的中间纤维,存在于中胚层来源的细胞中,如成纤维细胞、内皮细胞、白细胞等,并与微管、微丝共同形成了一个细胞支架网络而维持细胞完整性。目前尚无 SUDEP 的心肌 VIM 表达规律的相

关性报道,本实验通过检测癫痫大鼠心肌损伤及 VIM 的表达规律,探讨癫痫发作致心肌损伤的特点。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

健康成年 SD 大鼠 30 只,雌雄不限,体质量 150~180 g (重庆医科大学实验动物中心提供)。随机分为癫痫 1、2、3、7 d 组、对照组,每组 6 只。

1.2 癫痫模型建立及取材

参考文献[1]并结合预实验,癫痫组每 48 h 腹腔注射 1% 戊四氮生理盐水溶液(60 mg/kg);对照组腹腔注射等量生理盐水,每次给药前根据体重调整给药量,每次给药后观察 1 h,并记录有无癫痫发作、潜伏期(给药后至癫痫发作的时间)、发作程度及发作间隔。分别在 1、2、3、7 d 观察记录后,采用脱

作者介绍:刘剑波, Email: 326407212@qq.com,

研究方向:法医病理学。

通信作者:李剑波, Email: ljb2032008@163.com。

基金项目:重庆市渝中区科学技术委员会资助项目(编号:20120218)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000058.html>

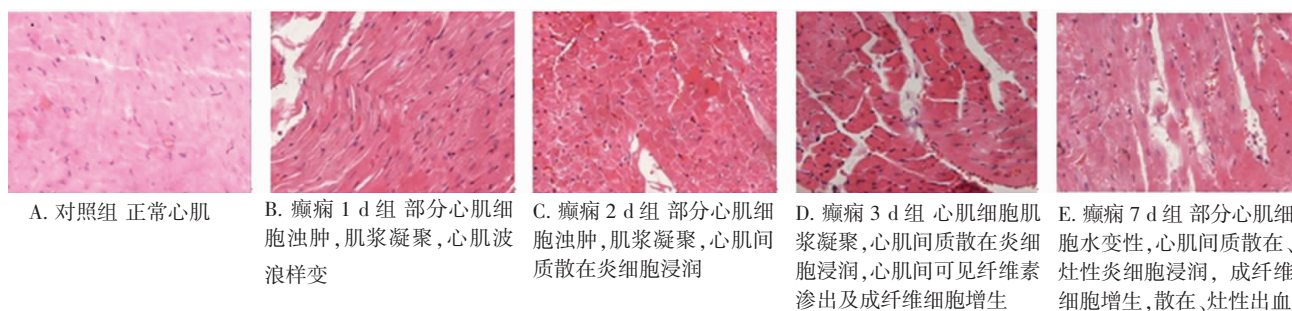


图 1 对照组及癫痫各组心肌形态学变化 (HE, 400 ×)

Fig.1 Morphological changes of myocardium in control group and epileptic groups (HE, 400 ×)

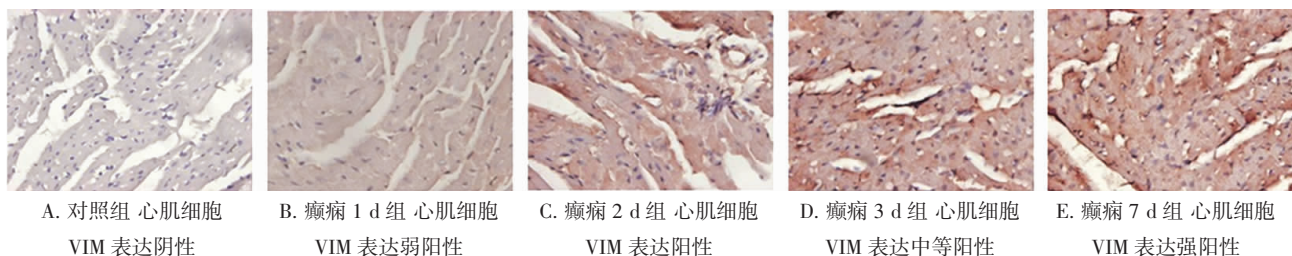


图 2 对照组及癫痫各组 VIM 的表达情况 (IHC, 400 ×)

Fig.2 Expression of VIM in control group and epileptic groups (IHC, 400 ×)

颈处死大鼠,提取所有大鼠的心脏组织,将提取的心脏组织分为 2 部分:一部分用 10%福尔马林液固定,另一部分放入液氮中速冻,随后将液氮中的标本存放于超低温冰箱(-80℃)。

1.3 主要试剂及仪器

戊四氮(瑞士 Adamas 公司),兔抗鼠 VIM 抗体(北京Bioss 公司),SP-9000 免疫组化试剂盒(美国 ZYMED 公司),电泳凝胶成像分析系统[美国 Bio-Rad(伯乐)公司]。

1.4 病理形态学观察

将固定好的心脏组织常规脱水、透明、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色,显微镜观察并记录。

1.5 免疫组化检测心肌 VIM 表达

按说明书进行操作。不加 I 抗的切片作为阴性对照;已知的成纤维细胞胞质中染上棕褐色为阳性表达,故以此染色标本切片作为阳性的对照。

1.6 Western blot 检测心肌中 VIM 表达

将提取的心肌组织在匀浆器中剪碎,加入裂解液后匀浆,重复多次,使组织尽量碾碎;裂解 30 min 后,将裂解液移至 1.5 ml EP 管中;于 4℃离心 12 000 r/min 离心 5 min;提取约 80%无色上清液转移至另一 EP 管中,取 20 μl 检测其浓度。根据蛋白浓度计算上样量进行蛋白质电泳。用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质。聚偏氟乙烯膜转膜后 TBST 洗膜 1 次,摇床 2 h 后加入一抗(兔抗鼠,1:500)孵育;根据一抗加二抗(羊抗兔,1:1 000),摇床摇 2 h;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;化学发光,保存图片。

2 结 果

2.1 癫痫发作情况

给药后 40 s 左右时开始出现小发作,如点头、凝视、阵挛

及上肢抬起等,1~3 min 出现大发作,随着给药次数增加,发作潜伏期明显缩短,发作持续时间延长。

2.2 心肌形态学改变

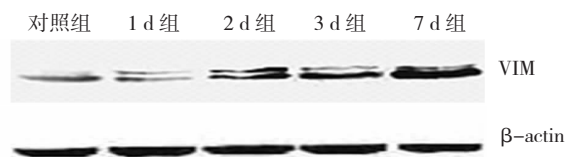
形态学观察显示,对照组心脏结构层次和细胞形态基本正常;而癫痫各组心肌细胞水肿,肌浆凝聚,部分心肌细胞嗜伊红性增强,心肌间质散在、灶性炎细胞浸润,心肌间可见纤维素渗出及成纤维细胞增生,心肌波浪样变,部分心肌纤维断裂、溶解,部分心肌细胞水变性,血管扩张、淤血,散在灶性出血;癫痫 1、2、3、7 d 组心肌细胞变性、坏死程度逐渐增加(图 1)。

2.3 免疫组化检测对照组及癫痫各组心肌 VIM 的表达

免疫组化结果显示在对照组心肌细胞中,VIM 表达阴性;在癫痫各组心肌细胞中,随着时间的延长 VIM 表达逐渐增强(图 2)。

2.4 Western blot 检测对照组与癫痫各组心肌 VIM 表达

对提取的 VIM 进行 SDS-PAGE 电泳,以 β-actin 作为内参,对照组、癫痫 1、2、3、7 d 组心肌均有 VIM 表达,且癫痫各组 VIM 表达量均较对照组高,尤以 7 d 组表达最明显(图 3)。



对照组及癫痫各组心肌均有 VIM 表达且随时间增加,癫痫各组 VIM 表达量逐渐增加

图 3 Western blot 检测对照组及癫痫各组 VIM 表达量

Fig.3 Expression of VIM in control group and epileptic groups detected by Western blot

3 讨 论

本实验采用戊四氮腹腔注射建立 SD 大鼠急性癫痫发作模型,给药后先出现小发作,随后出现全身强直阵挛等大发作,其发作程度符合 Racine 分级标准^[2],以上表明 SD 大鼠急性癫痫发作模型建立成功。

癫痫大鼠心肌早期为缺血性改变及散在、灶性出血。随着癫痫的病程延长,发作次数增多、发作时间增加,心肌有不同程度的变性坏死,间质浆液渗出,散在、灶性炎细胞浸润,成纤维细胞增生,说明癫痫发作后存在心肌损伤证据,且损伤程度逐渐加重。

VIM 属于中间丝蛋白,中间丝是细胞内一种相对稳定的成分,构成的结构蛋白在细胞内有其特异性;VIM 生物学功能主要与维持细胞形态、创伤愈合以及促进炎性细胞黏附和移行等有关;VIM 作为间质组织纤维化的主要标志物,广泛应用于检测损伤修复过程中的纤维化,通常在损伤后 VIM 表达越高,表明纤维化情况越重;Gharbi 等^[3]发现前列腺素 A1 可与 VIM 相结合而产生抗炎作用;VIM 表达水平与细胞增生分化的活跃程度密切相关^[4]。本实验发现癫痫各组心肌中成纤维细胞、血管内皮细胞 VIM 表达;随着癫痫病程延长,发作次数增多、发作时间增加,除成纤维细胞等 VIM 表达增强外,心肌细胞 VIM 表达也明显增强,尤以 7 d 组表达最明显;癫痫发作后引起心肌细胞中 VIM 表达上调,说明心肌存在损伤,并出现纤维化,心肌细胞结构被破坏。

心肌损伤的可能原因:癫痫发作可造成缺氧或呼吸暂停,引起缺血再灌注损伤,从而诱发心肌细胞坏死和间质性纤维化^[5]。Leestma 等^[6]发现 7 例 SUDEP 患者中有 4 例存在心肌缺血的变化。癫痫发作可引起机体的应急反应,刺激交感神经-肾上腺髓质系统,使之活动增强,使心脏自主神经的皮质和皮质下结构受到影响,导致自主神经功能出现严重紊乱,尤其是使心脏交感神经处于过度兴奋状态,导致过多儿茶酚胺释放到心肌间,引起心肌细胞的散在、灶性变性坏死;同时,儿茶酚胺还可引起心

肌小血管收缩或痉挛,使心肌缺血、缺氧^[7-9]。实验表明癫痫患者和动物模型都存在交感神经系统的激活,导致以心肌细胞损伤和室性心律失常为特征的心脏收缩功能障碍^[10]。部分合并冠心病的癫痫患者在癫痫发作时出现心电图改变,提示存在心肌缺血^[11-12]。以上研究表明癫痫发作可以引起心肌损伤、促进心肌中 VIM 表达。

参 考 文 献

- [1] 付 林,傅峻峰,陈启雄.实验性癫痫动物模型的研究进展[J].重庆医学,2008,37(19):2237-2239.
- [2] Racine RJ.Modification of seizure activity by electrical stimulation. II .motor seizure[J].Electroencephalogr Clin Neurophysiol,1972,32(3):281-294.
- [3] Gharbi S,Garzon B,Gayarre J,et al.Study of protein targets for co-valent modification by the antitumoral and anti-inflammatory prostaglandin PGA1: focus on vimentin[J].J Mass Spectrom,2007,42(11):1474-1484.
- [4] Zhu QS,Rosenblatt K,Huang KL,et al.Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion[J].Oncogene,2011,30(4):457-470.
- [5] Bell GS,Gaitatzis A,Johnson AL,et al.Predictive value of death certification in the case ascertainment of epilepsy[J].J Neurol Neurosurg Psychiatry,2004,75(12):1756-1758.
- [6] Leestma JE,Walczak T,Hughes JR,et al.A prospective study on sudden unexpected death in epilepsy[J].Ann Neurol,1989,26(2):195-203.
- [7] Ulrich J,Maxeiner H.Tongue bite injuries—a diagnostic criterium for death in epileptic seizure?[J].Arch Kriminol,2003,212(1-2):19-29.
- [8] Pedley TA,Hauser WA.Sudden death in epilepsy:a wake-up call for management[J].Lancet,2002,359(9320):1790-1791.
- [9] Dasheiff RM.Sudden unexpected death in epilepsy:a series from an epilepsy surgery program and speculation on the relationship to sudden cardiac death[J].J Clin Neurophysiol,1991,8(2):216-222.
- [10] Chen F,Cao YG,Qi HP,et al.Involvement of cardiomyocyte apoptosis in myocardial injury of hereditary epileptic rats[J].Can J Physiol Pharmacol,2013,91(10):804-811.
- [11] Opherk C,Hirsch LJ.Ictal heart rate differentiates epileptic from non-epileptic seizures[J].Neurology,2002,58(4):636-638.
- [12] Nashef L,Walker F,Allen P,et al.Apnoea and bradycardia during epileptic seizures:relation to sudden death in epilepsy[J].J Neurol Neurosurg Psychiatry,1996,60(3):297-300.

(责任编辑:关蕴良)