



二苯乙烯苷对癫痫大鼠神经细胞增殖的影响 及其机制探讨

吴隽松¹, 成秀梅¹, 罗斌²

(1. 盐城卫生职业技术学院医学院, 盐城 江苏 224005; 2. 湖北医药学院基础医学院, 十堰 湖北 442000)

【摘要】 目的 观察二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)对癫痫(epilepsy, EP)大鼠神经细胞增殖的影响,并探讨其可能机制。方法 将SD大鼠随机分为假手术组、模型组、二苯乙烯苷干预组。应用立体定向脑室内微量注射的方法建立海人酸(kainic acid, KA)诱导的大鼠癫痫模型。造模前30 min腹腔注射给药,致病后6 h腹腔内注射TSG溶液(3 mg/kg)剂量,次日开始每日8时给予腹腔注射TSG溶液(3 mg/kg)剂量,每日1次,连续注射,共注射42 d,KA模型组动物及假手术组给予等量生理盐水腹腔内注射。用免疫组织化学技术观察TSG对大鼠海马齿状回颗粒细胞下层BrdU阳性细胞数目及海马齿状回区星形胶质细胞数目增殖的影响。结果 癫痫发生后各组海马齿状回区及皮层均存在GFAP免疫反应阳性细胞,经统计分析二苯乙烯苷干预组较模型组GFAP免疫反应阳性星形胶质细胞减少,差异有统计学意义($P < 0.01$);BrdU免疫组织化学染色研究显示二苯乙烯苷干预组较假手术组及模型组海马齿状回区细胞增殖数目增加($P < 0.01$),差异有显著统计学意义。结论 二苯乙烯苷存在抑制大鼠海马区星形胶质细胞增生,促进神经细胞增殖的作用。

【关键词】 癫痫;二苯乙烯苷;BrdU;GFAP;大鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014)10-0063-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.010.012

Effect and mechanisms of tetrahydroxystilbene glucoside on neuron proliferation in the hippocampus of epileptic rats

WU Juan-Song¹, CHENG Xiu-Mei¹, LUO Bin²,

(1. Medical College, Yancheng Institute of Health Science, Yancheng 224005, China;

2. Basic Medicine College, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the influence of tetrahydroxystilbene glucoside (TSG) on the neuron proliferation in epileptic rats and the related mechanisms. **Methods** 54 healthy SD male rats were randomly divided into three groups: sham-operated group, epilepsy group and epilepsy with TSG treatment group. The epilepsy group was established by stereotactic brain trace injection with kainic acid (KA). TSG solution (3 mg/kg) was injected intraperitoneally at 6 hours after the epilepsy group established, and then q. d. for consecutive 42 days. The sham-operated group and epilepsy group were injected with normal saline. The influence of TSG on cell proliferation of rat hippocampal dentate gyrus BrdU-positive granular cells was observed by immunohistochemistry. **Results** Compare with the epilepsy group, the amount of glial fibrillary acid protein (GFAP)-positive astrocytes was significantly reduced and dentate gyrus

[基金项目] 盐城市卫生局科技计划项目(编号:YK2012035)。

[作者简介] 吴隽松(1983-),男,研究方向:神经生理学。E-mail: 48370334@qq.com。

[通讯作者] 成秀梅(1976-),女,研究方向:胃腺癌的基础研究。Email: cxmyw@163.com。

BrdU-positive cells were significantly increased in the TSG group ($P < 0.01$). **Conclusions** Tetrahydroxystilbene glucoside (TSG) promotes neurogenesis of neural stem cells and neurons, and inhibits the growth of hippocampal dentate gyrus astrocytes in epilepsy rats.

【Key words】 Epilepsy; Tetrahydroxystilbene glucoside; BrdU; Glial fibrillary acid protein, GFAP; Rat

癫痫(epilepsy)为除脑卒中最为常见的神经变性疾病,是由多种病因引起的慢性脑功能障碍综合征,其典型症状为大脑神经元发作性异常放电导致临床反复痫性发作,严重影响患者生活质量。近年来癫痫发病机制研究受到广泛重视,在神经递质、离子通道、突出的可塑性、神经胶质细胞等与癫痫的相关性方面做了大量研究。研究二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)是何首乌中特有的水溶性生物活性成分,具有多种生物学功能,如提高学习记忆能力、改善神经细胞突触超微结构等^[1-2]。目前的研究发现,癫痫发作可能导致神经元凋亡、坏死,继而产生神经细胞增殖,同时在癫痫发病过程中,神经细胞增殖往往伴随着明显的星形胶质细胞数量、形态学及生化指标的改变,可能是出于神经细胞代偿性保护、修复作用。本研究通过海人酸(kainic acid, KA)致痫大鼠模型模型,初步探讨二苯乙烯苷(TSG)干预对海马细胞增殖的影响及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立及分组

SD 大鼠,SPF 级,(180~220)g,雄性,均由江苏省药物研究所提供。实验动物生产许可证号为:SCXK(苏)2005-0007,实验动物使用合格证号:SYXK(苏)2012-0042。动物分笼饲养于光照/黑暗为 12/12 h 的恒温环境,每笼 5 只,自由摄食和饮水,保持整洁,2 d 打扫一次鼠笼。取成年 SD 雄性大鼠 54 只,随机分成 3 组:假手术组 18 只、KA 模型组 18 只、TSG 干预组 18 只(通过预实验确定的剂量,给药剂量 3 mg/kg),造模前 30 min 腹腔注射给药,模型组、假手术组给予等剂量生理盐水。采用海人酸(KA)模型制备,SD 大鼠脑立体定向仪固定后,选择右侧侧脑室为靶点,注射坐标为(ML 2.0, AP-1.0, DV-4.0),将 KA 1 μ L(浓度为 0.5 μ g/ μ L)注射入侧脑室内,注射速度 1 μ L/min,留针 10 min。大鼠癫痫发作 2 h 后腹腔注射地西洋 10 mg/kg 终止发作。TSG 干预组致痫后 6 h 腹腔内注射 TSG 溶液(3 mg/kg)剂量,次日开始每日 8 时给与腹腔注射 TSG 溶液(3 mg/kg)剂量,每日 1 次,连续注

射,共注射 42 d,KA 模型组动物及假手术组给予等量生理盐水腹腔内注射。

1.2 药品与仪器

TSG 购自中国药品生物制品检定所,含量大于 98%,符合中国食品药品检定研究院制定的标准,HPLC 标准^[3];BrdU 及抗体购自美国 Sigma 公司;GFAP (glial fibrillary acid protein) 抗体购自武汉博士德公司;二步法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司;其他均为国产分析纯;冰冻切片机:Leica-CM1900;生物显微摄像系统:倒置荧光显微镜(Olympus CKX31)。

1.3 TSG 给药方法动物实验

参考国内外相关文献及实验动物学药剂换算方法^[4-5],确定剂量为(3 mg/kg)。实验中采用干粉剂量、溶与蒸馏水制成药液,4 $^{\circ}$ C 保存。致痫后 6 h 腹腔内注射给药,次日开始每日 8 时给与腹腔注射,每日 1 次,连续注射六周,共注射 42 d。模型组动物及假手术组给予等量生理盐水腹腔内注射。

1.4 BrdU 标记法

BrdU 溶生理盐水,10 mg/mL (50 mg/kg),每 2 h 注射 1 次,共 4 次。于各组大鼠于处死前 1 d 腹腔注射,最后 1 次注射结束 24 h 后处死动物。

1.5 GFAP 免疫组织化学染色

所有组别分别在手术或者假手术后第 42 天处死取脑。大鼠在 0.07 g/mL 水合氯醛麻醉下,分离暴露出心脏后经左心室插管至主动脉,先后灌注生理盐水 200 mL,4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 250 mL。灌毕取脑后置 40 g/L 多聚甲醛后固定 6 h,浸于 30% 蔗糖液内,4 $^{\circ}$ C 条件存放 24 h。取脑于恒冷箱切片机(Leica-CM1900)行冠状冰冻切片,片厚 25 μ m,每隔 5 片取 1 片,每只动物取 5 片,取一套切片行 SABC 免疫组织化学染色。以单克隆抗 GFAP 抗体(1:1000,武汉博士德)作为 I 抗,生物素标记的羊抗鼠 IgG (1:200,武汉博士德)为二抗,DAB 显色。显色之后,常规脱水、透明和封片。

1.6 免疫组化染色图像分析

根据使用说明书进行 BrdU 的免疫组化染色操作。步骤:采用 SP 法,以小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(Sigma)作为 I 抗,生物素标记的羊抗鼠 IgG (1:

200, Sigma) 为 II 抗, DAB 显色。核内棕黄色颗粒为阳性着色。

1.7 BrdU 标记细胞计数

应用 Olympus 倒置相差荧光显微镜观察免疫组化切片, Leica-CM1900 数字纤维照相机采集图像, 各组切片均在同一光强度下, 同一放大倍数 (400 ×) 下分析。每例动物取两张切片, 测 CA1 区域阳性细胞数目。随意取 5 个视野, 确认并记录每个视野内海马 GFAP、海马齿状回颗粒层 BrdU 阳性细胞数目, 各组取平均值。

1.8 统计学方法

利用 Image. Pro Plus5.0 版软件进行图像处理, 所有数据均采用 SPSS 16.0 版统计学软件包进行方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马星形胶质细胞的增生

假手术组、模型组、TSG 干预组每视野内星形胶质细胞计数分别为 (7.03 ± 2.81), (13.32 ± 1.85), (20.03 ± 2.32) 个, 方差分析差异显著 ($F = 133.66, P = 0.00$)。两两比较, 均差异有显著性 (图 1, 见文后彩插 2)。

2.2 各组大鼠脑组织 BrdU 免疫组织化学染色观察

假手术组、TSG 干预组、模型组每视野内星形胶质细胞计数分别为 (46.16 ± 2.48), (37.67 ± 1.21), (29.50 ± 1.52) 个, 方差分析差异显著 ($F = 377.58, P = 0.00$)。模型组大鼠与对照组比较, 海马齿状回区 BrdU 阳性细胞核明显增加 ($P < 0.01$), TSG 干预组与模型组相比, 海马齿状回区颗粒细胞明显减少 ($P < 0.01$), 均具有显著统计学意义 (图 2, 见文后彩插 2)。

3 讨论

近年来有学者提出神经网络假说, 该假说认为神经网络由神经元细胞和突起 (轴突、树突) 等组成, 在基因和内环境的共同作用下, 大脑神经元异常频繁放电可致大脑海马神经元广泛损伤甚至坏死、凋亡, 并可以促使神经胶质细胞增生^[6]。故癫痫病脑损伤既是癫痫发作的果, 又是癫痫频发的因。

GFAP 是星形胶质细胞的细胞骨架蛋白, 常被用来特异性标记星形胶质细胞。本研究发现癫痫发作后模型组在海马齿状回 GFAP 表达显著升高,

细胞明显呈现激活状态, 胞体增大且不规则, 突起数量增多、形态增粗变长。Katsumoto 等^[7]认为癫痫发作的急性期引起的星形胶质细胞的激活可能参与 K^+ 、神经递质的调节, 对于恢复脑神经元细胞外稳态有一定积极作用。在潜伏期, 一方面星形胶质细胞自身大量增生, 另一方面激活的星形胶质细胞通过释放一系列细胞因子引起小胶质细胞增生, 占据脑内空间且干扰甚至切断了神经元之间或者神经元与胶质细胞之间的正常联系, 故胶质细胞对神经元具有“双刃剑”的作用^[8]。

Scharfman 等^[9]在癫痫大鼠齿状回区发现大量新生颗粒细胞, 且这种异常的颗粒细胞可以无规律的结合、兴奋、爆发异常的兴奋性突触后电位 (EPSP)。BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物, 在 DNA 合成过程中嵌入 S 期细胞的细胞核中, 嵌入合成的强度显示其细胞增殖的能力强弱, 因此 BrdU 被认为是反映新生活性细胞的理想指标。本研究发现, 癫痫发生后, 观察大鼠海马齿状回区颗粒细胞下层存在 BrdU 阳性细胞异常增殖, 镜下呈圆形或者椭圆形结构。此结果与相关文献报到结果一致^[10]。

本实验结果提示二苯乙烯苷能降低 GFAP 的过度表达, 抑制星形胶质瘢痕形成, 促进颗粒细胞增殖。近年来神经干细胞的增殖、分化、迁移成为神经系统疾病研究的新热点。有学者提出运用神经干细胞进行移植是修复和替代缺失神经元的有效方法, 可部分重建神经网络, 但这种内源性的再生修复因只有不到 50% 的神经元能够分化成熟并且迁移到受损部位成功建立突触联系, 或者偏向不理想方向发展 (如形成瘢痕)^[11]。这使得干细胞移植成为可能, 但中枢神经系统损伤后需借助干预条件动员神经干细胞, 诱导其迁移、分化修复损伤, 严格控制其神经再生作用。总之, 神经干细胞在中枢神经系统创伤修复方面具有独特的优势, 为神经移植与脑损伤修复指明了新的道路^[12]。

参考文献:

- [1] Zhang L, Yu S, Zhang R, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside antagonizes age-related α -synuclein overexpression in the hippocampus of APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. Restor Neurol Neurosci, 2013, 31(1):41-52.
- [2] 贾新, 陈建宗. 二苯乙烯苷神经保护作用及其机制的研究进展 [J]. 国际中医中药杂志, 2007, 29(6):347-348.
- [3] 班翊, 刘其礼, 金悠, 等. 二苯乙烯苷的含量测定及其稳定性研究 [J]. 中草药, 2004, 35(1):1235-1237.

- [4] 王齐,陈晓宇,刘梅梅,等. 二苯乙烯苷对沙鼠脑缺血/再灌注引发海马损伤的保护作用 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2013, 31(2):180-183.
- [5] 徐勇民,周美鸿,郑艳萍,等. 二苯乙烯苷预适应对脑缺血-再灌注损伤大鼠细胞凋亡的保护作用 [J]. 南昌大学学报(医学版), 2013, 53(5):13-16.
- [6] Spencer SS. Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment [J]. 2002,43(3):219-227.
- [7] Katsumato E, Ozaki T, Yototano N, et al. The expression of glial fibrillary acid protein (GFAP)mRNA in EL mouse brain [J]. Epilepsia, 1997, 38(16):61.
- [8] Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs [J]. Science, 1977, 197(4308):1092-1094.
- [9] Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis [J]. J Neurosci, 2000, 20: 6144-6158.
- [10] 张义伟,肖培伦,吕玥,等. 癫痫发作后成鼠及幼鼠海马神经发生的改变 [J]. 神经解剖学杂志, 2013, 29(6):681-685.
- [11] Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits [J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(3):179-193.
- [12] Santos T, Maia J, Agasse F, et al. Nanomedicine boosts neurogenesis: new strategies for brain repair [J]. Integr Biol (Camb), 2012, 4(9):973-981.

[修回日期]2014-07-21

(上接第 47 页)

- [13] Allain CC, Poon LS, Chan CS, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol [J]. Clin Chem,1974, 20:470-475.
- [14] Roeschlau P, Bernt E, Gruber W. Enzymatic determination of total cholesterol in serum [J]. Z Klin Chem Klin Biochem, 1974, 12(9):403-407.
- [15] Xu C, He X, Xu S. Mapping quantitative trait loci underlying triploid endosperm traits [J]. Heredity, 2003, 90(3):228-235.
- [16] Lyons MA, Wittenburg H, Li R, et al. Quantitative trait loci that determine lipoprotein cholesterol levels in DBA/2J and CAST/Ei inbred mice [J]. J Lipid Res,2003, 44(5):953-967.
- [17] Lyons MA, Wittenburg H, Li R, et al. Lith6: a new QTL for cholesterol gallstones from an intercross of CAST/Ei and DBA/2J inbred mouse strains [J]. J Lipid Res, 2003, 44(9):1763-1771.
- [18] Li R, Lyons MA, Wittenburg H, et al. Combining data from multiple inbred line crosses improves the power and resolution of quantitative trait loci mapping [J]. Genetics,2005, 169(3):1699-1709.

[修回日期]2014-07-23

(上接第 53 页)

- [22] Zhang JT. New progress in the study of ginsenoside Rg1 and Rb1 [C]. The 14th Symposium on Natural Products Research, 1999: 1-4.
- [23] Tinsley MR, Quinn JJ, Fanselow MS. The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing Pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance [J]. Learn Mem, 2004, 11(1):35-42.
- [24] 黎阳,张铁军,刘素香,等. 人参化学成分和药理研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(1):164,附1,附2.

[修回日期]2014-08-24