

癫痫持续状态大鼠内质网应激预适应对海马神经元保护作用的实验研究

张翼 谭利明 蒋校文 黄志凌

【摘要】 目的 探讨 2-脱氧葡萄糖诱导内质网应激预适应对癫痫持续状态大鼠海马神经元的保护作用及其可能机制。方法 采用 2-脱氧葡萄糖连续腹腔注射诱导内质网应激,并在此基础上制备氯化锂-匹罗卡品癫痫持续状态大鼠模型。Nissl 染色观察癫痫持续状态后海马神经元损伤情况、计数海马 CA1 和 CA3 区存活神经元数目;免疫组织化学检测海马 CA3 区内质网应激标志物葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 和 X 盒结合蛋白 1 (XBP-1) 表达变化。结果 与癫痫持续状态组相比,癫痫持续状态后第 7 天时内质网应激预适应组大鼠海马存活神经元数目增加,以 CA1 区显著($t=5.353, P=0.000$)。癫痫持续状态组大鼠发作后 6 h,海马 CA3 区 GRP78 和 XBP-1 表达水平升高且高于对照组(均 $P=0.000$),于发作第 2 天达峰值水平(均 $P=0.000$);内质网应激预适应组大鼠发作前海马 CA3 区 GRP78 和 XBP-1 表达即高于对照组(均 $P=0.000$),GRP78 在发作后 24 h 和 2 d 时维持在峰值水平(均 $P=0.000$),XBP-1 在发作后 24 h 达峰值水平($P=0.000$);内质网应激预适应组大鼠海马 CA3 区 GRP78 和 XBP-1 表达在癫痫持续状态前,以及癫痫持续状态后 6、12、24 h 均高于癫痫持续状态组(均 $P=0.000$),至第 2 和 7 天时与癫痫持续状态组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 经 2-脱氧葡萄糖诱导的内质网应激预适应对癫痫持续状态大鼠海马神经元具有保护作用,而 XBP-1-GRP78 信号转导通路的活化可能是其机制之一。

【关键词】 癫痫持续状态; 内质网; 海马; 疾病模型,动物

Protective effects of endoplasmic reticulum stress preconditioning on hippocampal neurons in rats with status epilepticus

ZHANG Yi¹, TAN Li-ming², JIANG Xiao-wen³, HUANG Zhi-ling²

¹Department of Neurology, ²Institute of Translational Medicine, Chenzhou No.1 People's Hospital, Chenzhou 423000, Hu'nan, China

²Department of Neurology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hu'nan, China

Corresponding author: HUANG Zhi-ling (Email: doctorhzl@126.com)

【Abstract】 Objective To evaluate the protective effects of endoplasmic reticulum stress preconditioning induced by 2-deoxyglucose (2-DG) on hippocampal neurons of rats with status epilepticus (SE) and the possible mechanism. **Methods** Ninety Sprague-Dawley (SD) rats were randomly enrolled into preconditioning group (N = 30), SE group (N = 30) and control group (N = 30). Each group was divided into 6 subsets (N = 5) according to six time points (before seizure, 6 h, 12 h, 1 d, 2 d and 7 d after seizure). The preconditioning group was administered 2-DG intraperitoneally with a dose of 150 mg/kg for 7 days, and the lithium-pilocarpine induced SE rat model was established on both preconditioning group and SE group. The rats were sacrificed at the above six time points, and the brains were removed to make paraffin sections. Nissl staining was performed by toluidine blue to evaluate the hippocampal neuronal damage after seizure, and the number of survival neurons in hippocampal CA1 and CA3 regions of the rats were counted. Immunohistochemical staining was performed to detect the expressions of glucose regulated protein 78 (GRP78) and X-box binding protein 1 (XBP-1) in hippocampal CA3 region of the rats. **Results** The number of survival neurons in preconditioning group was much more than that in SE group at 7 d after

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2014.12.008

作者单位: 423000 湖南省郴州市第一人民医院神经内科(张翼), 转化研究所(蒋校文); 410011 长沙, 中南大学湘雅二医院神经内科(谭利明, 黄志凌)

通讯作者: 黄志凌 (Email: doctorhzl@126.com)

seizure ($t = 5.353$, $P = 0.000$), and was more obvious in CA1 region. There was no significant hippocampal neuronal damage in control group. The expressions of GRP78 and XBP-1 in CA3 region of hippocampus in SE group at 6 h after seizure were significantly higher than that in control group ($P = 0.000$), and then kept increasing until reaching the peak at 2 d ($P = 0.000$, for all). The expressions of GRP78 and XBP-1 in hippocampal CA3 region in preconditioning group were significantly higher than that in control group before seizure ($P = 0.000$, for all). The level of GRP78 maintained the highest at 24 h and 2 d after seizure ($P = 0.000$, for all), while the XBP-1 level reached the peak at 24 h after seizure ($P = 0.000$). The expressions of GRP78 and XBP-1 in hippocampal CA3 region in preconditioning group were significantly higher than that in SE group at before seizure, 6, 12, 24 h after seizure ($P = 0.000$, for all), while there was no significant difference at 2, 7 d after seizure ($P > 0.05$). **Conclusions** Endoplasmic reticulum stress preconditioning could protect hippocampal neurons from damage in rats with status epilepticus, in which the XBP-1-GRP78 signal pathway may be an important mechanism.

【Key words】 Status epilepticus; Endoplasmic reticulum; Hippocampus; Disease models, animal

癫痫持续状态(SE)可导致海马神经元凋亡和坏死^[1-2],海马神经元缺失是兴奋性致痫环路重建、反复癫痫发作的重要因素之一^[3],因此探讨癫痫持续状态后神经元保护措施具有重要意义。内质网作为一种重要细胞器具有多项生理功能,受到内外环境变化的影响时发生功能紊乱并产生相应反应,称为内质网应激(ERS)。内质网应激可诱导神经元凋亡,程度较轻时具有与缺血预适应^[4]和化学预适应^[5]相似的脑保护作用,可作为一种新的预适应模式。葡萄糖调节蛋白78(GRP78)是内质网中最具代表性的伴侣分子^[6],与其上游的转录活化因子X盒结合蛋白1(XBP-1)不仅是内质网应激的重要标志物,而且是其中的助细胞存活分子。已有研究证实,癫痫持续状态后也存在内质网应激,且与神经元凋亡有关^[7-8],但这种预适应变化能否保护神经元免受痫样发作的损害,是目前癫痫持续状态基础研究的焦点。鉴于此,我们采用2-脱氧葡萄糖(2-DG)诱导Sprague-Dawley(SD)大鼠发生内质网应激,并于预适应后建立氯化锂-匹罗卡品癫痫持续状态模型,观察内质网应激预适应对海马神经元的保护作用,以初步探讨其机制。

材料与方法

一、实验材料

1. 试剂与药品 2-脱氧葡萄糖粉剂(PC-纯度 > 99%)购自美国Instrumentation Laboratory公司,用时以双蒸水配制成浓度为50 mg/ml的溶液。匹罗卡品粉剂(纯度 > 98%)购自美国Boehringer Ingelheim公司。氯化锂粉剂(纯度 > 99%)由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。免疫组织化学试剂中I抗[为兔抗鼠GRP78(1:1000)和兔抗鼠XBP-1(1:

50)多克隆抗体]分别购自美国Stressgen Bioreagents和Santa Cruz公司,通用型SP-9001免疫组织化学检测试剂盒[含生物素标记的山羊抗兔IgG II抗(1:200)和辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉菌卵白素工作液(1:200)]和二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2. 主要仪器与设备 GH4500隔水式培养箱(功率:600 W)和WG-136鼓风干燥箱(功率:2300 W)均为天津泰斯特仪器有限公司产品。CH-12光学显微镜为日本Olympus公司产品。

3. 实验动物 健康清洁级成年雄性SD大鼠共90只,体重(200 ± 20) g,由中南大学湘雅二医院动物实验中心提供。所有实验动物均于室温(23 ± 2) °C、相对湿度50% ~ 70%、12 h昼-12 h夜循环照明环境中分笼饲养,自由进食、饮水。采用随机数字表法分为内质网应激预适应组(预适应组)、癫痫持续状态组(SE组)和正常对照组(对照组),每组各30只大鼠;再据癫痫持续状态发作时间随机分为癫痫持续状态前,以及癫痫持续状态后6 h、12 h、24 h、2 d和7 d共6个亚组,每亚组各5只大鼠。

二、实验方法

1. 动物模型制备 (1)内质网应激预适应动物模型制备:预适应组大鼠按照150 mg/kg剂量腹腔注射2-脱氧葡萄糖(1次/d),连续给药7 d^[9]。SE组和对照组则以等体积生理盐水替代2-脱氧葡萄糖。(2)癫痫持续状态动物模型制备:预适应组与SE组大鼠均于最后一次给药后8 h经腹腔注射氯化锂(125 mg/kg),16 ~ 18 h后腹腔注射质量分数为10%匹罗卡品(30 mg/kg);注射匹罗卡品前30 min腹腔注射阿托品(1 mg/kg),以拮抗外周胆碱能反应。上述两组大鼠癫痫持续状态发作1 h后,以质量分数为

10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射终止发作;对照组大鼠以等体积生理盐水替代。若因模型制备不成功或死亡等因素造成各亚组样本量不足时,仍按随机原则补充即另取一批大鼠按照随机数字表编号,奇数进入SE组,偶数进入预适应组(SE组补充2只、预适应组补充3只)。(3)行为学评价:参照Racine标准,癫痫发作达IV或V级并持续1h者为癫痫持续状态^[7,10],纳入本研究。记录每亚组发生癫痫持续状态的动物数。

2. 组织形态学观察 (1)脑组织标本制备:分别于不同观察时间点以质量分数为10%水合氯醛溶液经腹腔注射麻醉大鼠,自枕骨大孔处迅速断头取脑,质量分数为4%多聚甲醛溶液固定、常规石蜡包埋,自上丘至视交叉节段向枕部方向制备层厚5 μm的海马组织连续冠状切片。(2)Nissl染色:脑组织切片脱蜡复水,质量分数为1%的甲苯胺蓝溶液染色20 min、95%乙醇迅速分化,光学显微镜下控制时间,直至Nissl小体呈深蓝色、背景透明为止;常规脱水、透明、封片。参考以往实验结果^[11],由于癫痫持续状态第7天时神经元损伤最为明显,故选择该时间点的海马组织切片计数,每只大鼠任选4张脑组织切片进行分析。CH-12光学显微镜下观察海马CA1和CA3区神经元组织形态学改变,并于双侧海马CA1和CA3区由左至右随机选择3个互不重叠高倍视野(×400,共6个视野),计数存活神经元数目。

3. 免疫组织化学检测内质网应激标志物GRP78和XBP-1表达变化 (1)检测方法:采用SP二步法进行检测。脑组织切片常规脱蜡至水,以体积分数为3%过氧化氢(H₂O₂)去离子水室温下孵育10 min,0.10 mol/L枸橼酸抗原修复液(pH值=6)微波(约96℃)修复10 min;滴加正常山羊血清封闭液室温下孵育15 min,滴加稀释的I抗工作液,37℃温箱孵育30 min后置4℃冰箱过夜;依次滴加II抗和辣根过氧化物酶标记的链霉菌卵白素、DAB显色,磷酸盐缓冲液代替I抗作为阴性对照,其余步骤相同。(2)阳性结果判断:GRP78阳性表达部位主要位于胞质,呈棕黄色,胞核经苏木素复染后呈蓝色,鲜见阳性。XBP-1阳性细胞为胞质和胞核均表达阳性,呈棕黄色。每只大鼠任意选取4张切片,每张切片双侧海马CA1和CA3区随机选择3个互不重叠高倍视野(×400,共6个视野),计数阳性细胞比例。

三、统计分析方法

采用SPSS 12.0统计软件进行数据处理与分

析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较行LSD-*t*检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、行为学观察

预适应组和SE组大鼠注射氯化锂后未见明显行为学改变。SE组大鼠经腹腔注射匹罗卡品(20±5) min后即出现流涎、搔抓、点头、单肢阵挛和湿狗样抖动等体征,并进一步进展至全面性强直-阵挛发作伴站立跌倒,呈癫痫持续状态,诱发成功率达100%,其中2只24 h后死于全身脏器衰竭;预适应组有3只大鼠未达癫痫持续状态,诱发成功率为88%。上述两组大鼠癫痫持续状态后1 h以水合氯醛终止发作,对照组大鼠未见特殊行为学改变。

二、内质网应激预适应对海马神经元的影响

1. 内质网应激预适应对神经元损伤的影响 光学显微镜下观察,对照组大鼠海马神经元排列整齐,形态完整,胞质Nissl小体丰富呈深蓝色,胞核圆形、核染色质为淡蓝色,细胞轮廓清楚(图1a)。SE组大鼠海马大体形态无明显变化,但部分细胞形态不完整,细胞肿胀、破裂,轮廓模糊,界限不清,排列紊乱,胞质Nissl小体溶解、消失,存活神经元数目显著减少,尤以海马CA1区最为明显(图1b)。预适应组大鼠海马神经元也出现类似变化,但与SE组相比,神经元损伤程度明显减轻(CA1区: $t = 5.353, P = 0.000$; CA3区: $t = 3.359, P = 0.006$;图1c;表1,2)。SE组与预适应组大鼠海马CA1区存活神经元数目之比为51/79.03、CA3区为26.18/38。

2. 内质网应激预适应对GRP78和XBP-1表达的影响 预适应组和SE组大鼠海马神经元GRP78和XBP-1均表达阳性,胞质呈棕黄色。GRP78阳性表达部位主要位于胞质(图2),XBP-1在胞核和胞质均有表达(图3)。SE组大鼠发作前海马神经元GRP78和XBP-1阳性表达率接近正常水平(均 $P > 0.05$);癫痫持续状态后6 h二者表达水平即升高(均 $P = 0.000$),至12和24 h表达进一步升高且于第2天达峰值水平(均 $P = 0.000$),至第7天时GRP78表达水平略高于对照组($P = 0.000$),而XBP-1表达水平降至正常值范围($P > 0.05$,表3~8)。预适应组大鼠海马神经元GRP78和XBP-1阳性表达率于癫痫持续状态前即升高且高于对照组(均 $P = 0.000$),癫痫持续状态后6和12 h进一步升高(均 $P = 0.000$);

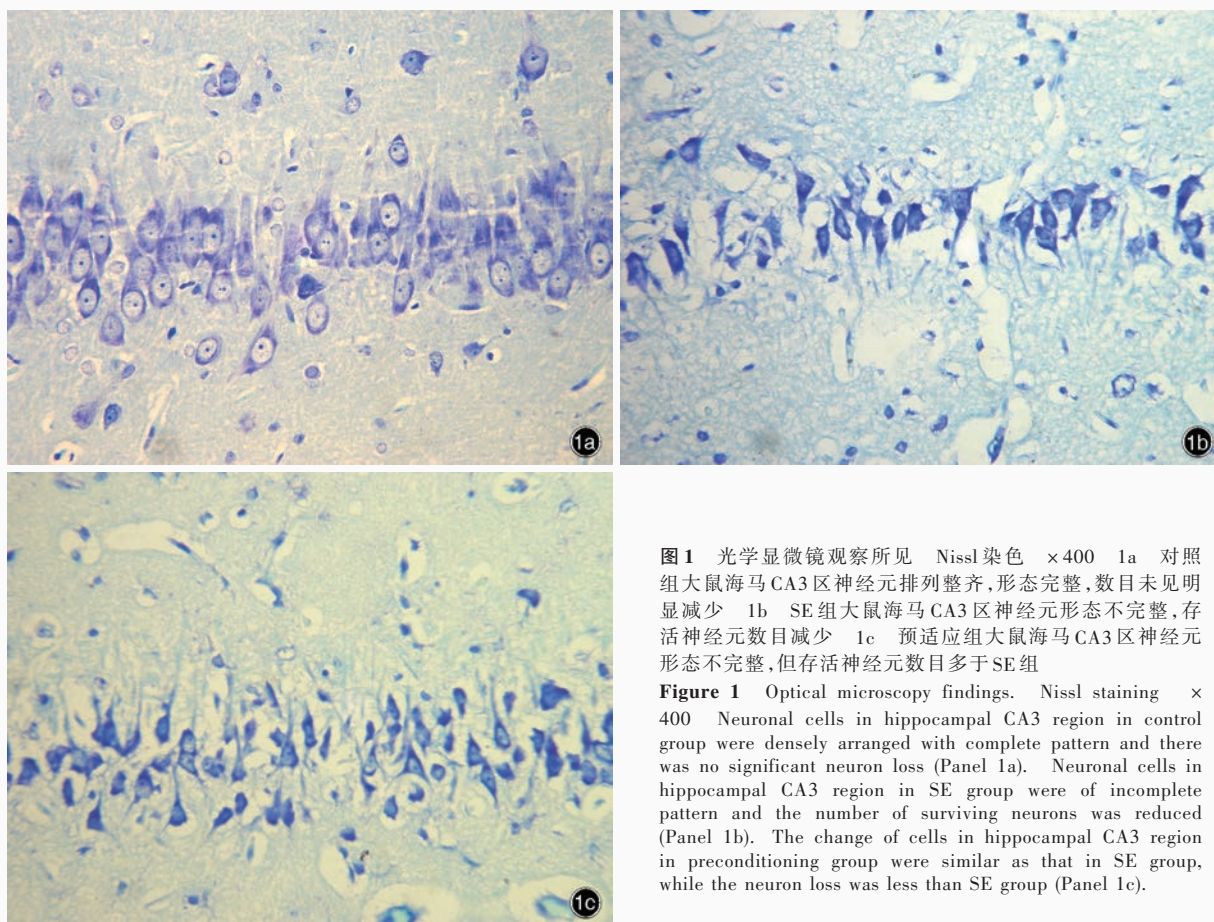


图1 光学显微镜观察所见 Nissl 染色 ×400 1a 对照组大鼠海马 CA3 区神经元排列整齐,形态完整,数目未见明显减少 1b SE 组大鼠海马 CA3 区神经元形态不完整,存活神经元数目减少 1c 预适应组大鼠海马 CA3 区神经元形态不完整,但存活神经元数目多于 SE 组

Figure 1 Optical microscopy findings. Nissl staining × 400 Neuronal cells in hippocampal CA3 region in control group were densely arranged with complete pattern and there was no significant neuron loss (Panel 1a). Neuronal cells in hippocampal CA3 region in SE group were of incomplete pattern and the number of surviving neurons was reduced (Panel 1b). The change of cells in hippocampal CA3 region in preconditioning group were similar as that in SE group, while the neuron loss was less than SE group (Panel 1c).

表1 癫痫持续状态第7天时不同处理组大鼠海马存活神经元数目的比较(̄x ± s, 个/高倍视野)

Table 1. Comparison of number of surviving neurons in hippocampus among 3 groups at 7 d after seizure (̄x ± s, number/HP)

Group	N	CA1	CA3
Control (a)	5	103.43 ± 7.89	47.38 ± 5.73
SE (b)	5	51.00 ± 10.81	26.18 ± 4.32
Preconditioning (c)	5	79.03 ± 5.15	38.00 ± 6.43
F value		3.707	1.473
P value		0.001	0.009

SE, status epilepticus, 癫痫持续状态

表2 癫痫持续状态第7天时不同处理组大鼠海马存活神经元数目的两两比较

Table 2. Paired comparison of the number of surviving neurons in hippocampus among 3 groups at 7 d after seizure

Paired comparison	P value	
	CA1	CA3
(a) : (b)	0.000	0.000
(a) : (c)	0.001	0.021
(b) : (c)	0.000	0.006

GRP78 在发作后 24 h 和 2 d 时维持在峰值水平(均 $P = 0.000$), XBP-1 在发作后 24 h 达到峰值水平($P = 0.000$), 至第 7 天时 GRP78 和 XBP-1 表达水平均降至正常值范围($P > 0.05$, 表 3 ~ 8)。与 SE 组相比, 预适应组大鼠海马神经元 GRP78 和 XBP-1 阳性表达率在癫痫持续状态前, 以及癫痫持续状态后 6、12 和 24 h 均明显升高($P = 0.000$), 但至发作后第 2 和 7 天时, 组间差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 3 ~ 8)。对

照组大鼠海马 CA3 区可见 GRP78 和 XBP-1 阳性细胞, 但其阳性表达率低于 SE 组和预适应组(均 $P = 0.000$), 且不同观察时间点差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 3 ~ 8)。

讨 论

内质网是细胞内的一种重要细胞器, 是新合成的蛋白质进行折叠、组装、翻译后修饰和钙离子存

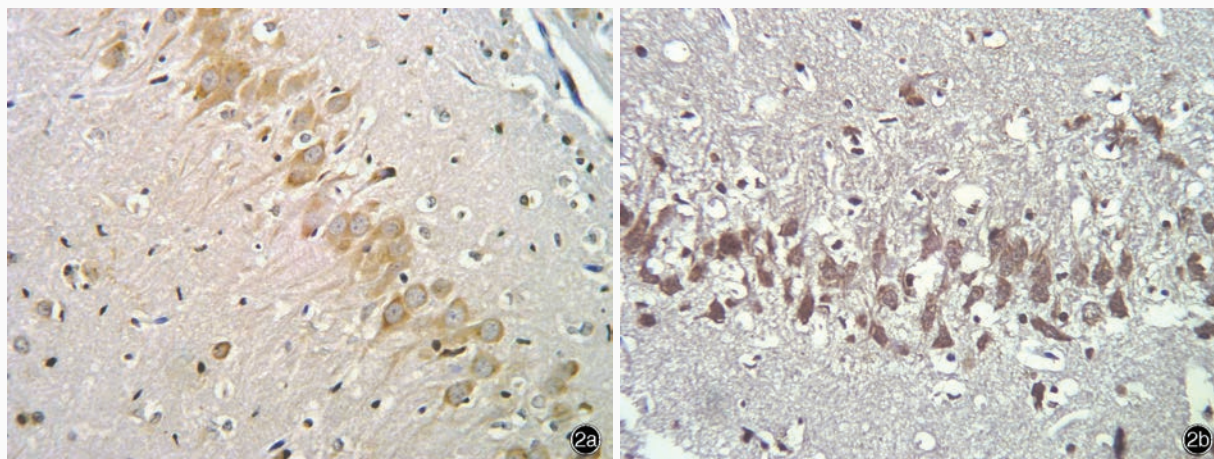


图 2 癫痫持续状态第 2 天时,光学显微镜观察所见 免疫组织化学染色(SP 二步法) × 400 2a SE 组大鼠海马 CA3 区可见 GRP78 阳性细胞 2b 预适应组大鼠海马 CA3 区 GRP78 阳性细胞数目明显多于 SE 组

Figure 2 Optical microscopy findings 2 d after SE. Immunohistochemical staining (SP) × 400 GRP78-positive cells could be seen in hippocampal CA3 region in SE group (Panel 2a). The number of GRP78-positive cells in preconditioning group was obviously higher than that in SE group (Panel 2b).

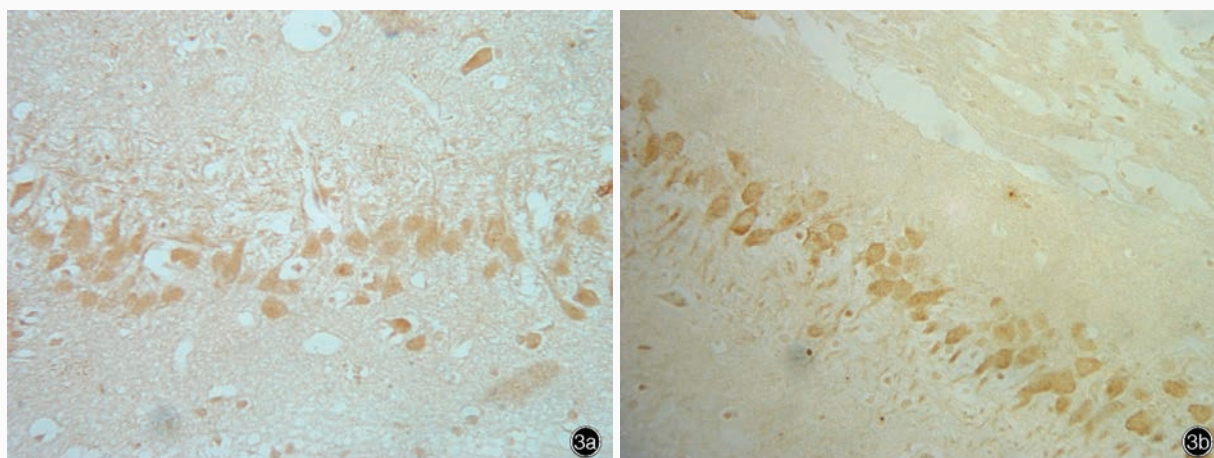


图 3 癫痫持续状态第 2 天时,光学显微镜观察所见 免疫组织化学染色(SP 二步法) × 400 3a SE 组大鼠海马 CA3 区可见 XBP-1 阳性细胞 3b 预适应组大鼠海马 CA3 区 XBP-1 阳性细胞数目明显多于 SE 组

Figure 3 Optical microscopy findings 2 d after SE. Immunohistochemical staining (SP) × 400 XBP-1-positive cells could be seen in hippocampal CA3 region in SE group (Panel 3a). The number of XBP-1-positive cells in preconditioning group was obviously higher than that in SE group (Panel 3b).

储的重要场所^[12]。许多因素均可导致内质网功能紊乱继而诱发内质网应激,发生轻度内质网应激的细胞可诱导未折叠蛋白质反应,例如暂停蛋白质合成、选择性提高折叠酶和伴侣分子表达水平,以及加强内质网蛋白质降解系统活性,从而保护受累的神经细胞。GRP78 是内质网中最具代表性的伴侣分子^[6],而 XBP-1 是在内质网应激中活化的转录因子,可以结合未折叠蛋白质的反应元件,上调相关靶基因如 *GRP78* 的表达^[13],二者均为内质网应激的重要标志物^[6]。

2-脱氧葡萄糖为葡萄糖衍生物,可迅速进入脑

组织,通过己糖激酶途径并以较稳定的 6-磷酸-2-脱氧葡萄糖的形式积累,后者抑制神经细胞之糖氧化过程^[14];与此同时,6-磷酸-2-脱氧葡萄糖很难被代谢,可以持续性抑制葡萄糖代谢,干扰蛋白质糖基化^[15]。糖基化为内质网新蛋白质合成和分泌的关键步骤,其反应过程受阻可导致未折叠和错误折叠蛋白质在内质网内聚集,触发内质网应激。有研究显示,经 2-脱氧葡萄糖预处理并于体外培养的大鼠心肌细胞可成功诱导内质网应激的发生,主要表现为 GRP78 表达上调^[16]。在本研究中,我们采用 2-脱氧葡萄糖预处理 SD 大鼠 7 天,癫痫持续状态发作前

表 3 不同处理组大鼠各观察时间点海马 CA3 区 GRP78 阳性表达率的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 3. Comparison of GRP78 positive rate in hippocampal CA3 region among 3 groups at different time points ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	N	Before SE (1)	After SE					F value	P value
			6 h (2)	12 h (3)	24 h (4)	2 d (5)	7 d (6)		
Control (a)	5	28.32 ± 1.79	31.45 ± 2.04	30.61 ± 1.25	29.82 ± 2.70	30.68 ± 3.13	28.97 ± 1.44	1.466	0.238
SE (b)	5	29.88 ± 3.74	40.13 ± 2.97	50.70 ± 1.81	55.87 ± 1.46	66.03 ± 2.38	33.03 ± 2.48	147.552	0.000
Preconditioning (c)	5	40.53 ± 2.69	50.77 ± 0.87	57.83 ± 1.72	66.93 ± 1.46	65.03 ± 1.11	30.77 ± 2.73	278.875	0.000
F value		27.128	102.289	385.052	472.020	363.633	3.967		
P value		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.048		

SE, status epilepticus, 癫痫持续状态。The same as tables below

表 4 同一组大鼠不同观察时间点海马 CA3 区 GRP78 阳性表达率的两两比较

Table 4. Paired comparison of GRP78 positive rate in hippocampal CA3 region among different time points in each group

Paired comparison	P value		Paired comparison	P value		Paired comparison	P value	
	SE	Preconditioning		SE	Preconditioning		SE	Preconditioning
(1) : (2)	0.000	0.000	(2) : (3)	0.000	0.000	(3) : (5)	0.000	0.000
(1) : (3)	0.000	0.000	(2) : (4)	0.000	0.000	(3) : (6)	0.000	0.000
(1) : (4)	0.000	0.000	(2) : (5)	0.000	0.000	(4) : (5)	0.000	0.129
(1) : (5)	0.000	0.000	(2) : (6)	0.000	0.000	(4) : (6)	0.000	0.000
(1) : (6)	0.066	0.000	(3) : (4)	0.004	0.000	(5) : (6)	0.000	0.000

表 5 不同处理组大鼠同一观察时间点海马 CA3 区 GRP78 阳性表达率的两两比较

Table 5. Paired comparison of GRP78 positive rate in hippocampal CA3 region among different groups at each time point

Paired comparison	P value					
	Before SE	6 h after SE	12 h after SE	24 h after SE	2 d after SE	7 d after SE
(a) : (b)	0.404	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016
(a) : (c)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.236
(b) : (c)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.519	0.144

其脑组织 GRP78 和 XBP-1 表达水平即明显升高,与以往文献报道结果一致^[9],表明经 2-脱氧葡萄糖预处理可以成功诱导 SD 大鼠发生内质网应激。以往的研究证实,通过衣霉素和二硫苏糖醇诱导内质网应激预适应可以在培养的人胚肾细胞 293 (HEK293) 中显著降低顺铂、庆大霉素等引起的肾脏毒性^[17],提示适度内质网应激具有神经细胞保护作用。本研究结果显示,癫痫持续状态组大鼠海马神经元损伤明显,超过 50%,而内质网应激预适应组大鼠神经元损伤程度较轻,低于 30%。提示内质网应激预适应对癫痫持续状态造成的神经损害具有一定抵御能力,对海马神经元具有保护作用。本研究还发现,内质网应激预适应组大鼠海马神经元损伤明显轻于癫痫持续状态组,其 GRP78 和 XBP-1 表达水平在癫痫持续状态前后大部分观察时间点显著高于癫痫持续状态组且峰值提前。提示 GRP78 和

XBP-1 表达水平上调与神经元损伤减轻有关,因此我们认为,内质网应激预适应对海马神经元保护作用的机制可能与肌醇需求酶 1 (IRE1)/XBP-1-GRP78 信号转导通路有关。

内质网应激反应为一完整的可调节的信号网络,其中 IRE1/XBP-1 信号转导通路是重要组成部分,同时也是上调 GRP78 和 XBP-1 表达的主要信号转导通路^[18]。IRE1 是一种 I 型穿膜内质网驻留蛋白,为内质网应激的感受器和换能器,可通过激活转录活化因子 XBP-1 上调包括 GRP78 在内的多种蛋白质的表达水平,而 GRP78 具有神经细胞保护作用^[19]。缺血预适应诱导的 GRP78 表达上调可减轻严重缺血导致的神经元死亡^[20],利用反义核苷酸降低经体外培养的大鼠海马神经元 GRP78 蛋白表达水平,则会加剧氧化应激诱发的神经元死亡^[21]。GRP78 对神经元的保护作用可能是通过以下机制

表 6 不同处理组大鼠各观察时间点海马 CA3 区 XBP-1 阳性表达率的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 6. Comparison of XBP-1 positive rate in hippocampal CA3 region among 3 groups at different time points ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	N	Before SE (1)	After SE					F value	P value
			6 h (2)	12 h (3)	24 h (4)	2 d (5)	7 d (6)		
Control (a)	5	17.39 ± 2.87	16.95 ± 3.27	19.26 ± 2.48	19.71 ± 1.32	18.16 ± 1.93	20.08 ± 2.12	1.411	0.256
SE (b)	5	18.40 ± 3.08	25.40 ± 1.51	37.63 ± 1.40	45.87 ± 1.40	51.33 ± 1.51	17.60 ± 1.76	293.353	0.000
Preconditioning (c)	5	32.17 ± 1.89	39.40 ± 1.14	47.50 ± 1.81	54.07 ± 3.45	50.43 ± 2.27	20.17 ± 2.40	158.156	0.000
F value		47.901	135.121	270.884	309.563	480.184	2.392		
P value		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.134		

表 7 同一处理组大鼠各观察时间点海马 CA3 区 XBP-1 阳性表达率的两两比较

Table 7. Paired comparison of XBP-1 positive rate in hippocampal CA3 region at different time points in each group

Paired comparison	P value		Paired comparison	P value		Paired comparison	P value	
	SE	Preconditioning		SE	Preconditioning		SE	Preconditioning
(1) : (2)	0.000	0.000	(2) : (3)	0.000	0.000	(3) : (5)	0.000	0.053
(1) : (3)	0.000	0.000	(2) : (4)	0.000	0.000	(3) : (6)	0.000	0.018
(1) : (4)	0.000	0.000	(2) : (5)	0.000	0.000	(4) : (5)	0.000	0.000
(1) : (5)	0.000	0.000	(2) : (6)	0.000	0.000	(4) : (6)	0.000	0.000
(1) : (6)	0.505	0.000	(3) : (4)	0.000	0.000	(5) : (6)	0.000	0.000

表 8 不同处理组大鼠同一观察时间点海马 CA3 区 XBP-1 阳性表达率的两两比较

Table 8. Paired comparison of XBP-1 positive rate in hippocampal CA3 region among 3 groups at each time point

Paired comparison	P value					
	Before SE	6 h after SE	12 h after SE	24 h after SE	2 d after SE	7 d after SE
(a) : (b)	0.559	0.000	0.000	0.000	0.000	0.088
(a) : (c)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.947
(b) : (c)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.475	0.078

实现的:首先,癫痫持续状态诱导的兴奋性毒性级联反应可导致神经元死亡,该过程依赖众多激酶、磷脂酶、蛋白酶的活化。GRP78 可通过结合激酶、磷脂酶、蛋白酶和神经递质受体而降低其活性,弱化由上述蛋白酶介导的神经损伤作用^[22];其次,GRP78 可通过抑制氧自由基聚集和稳定线粒体功能,从而抵抗氧化应激和兴奋性毒性对海马神经元的损伤^[21];再次,GRP78 具有抗细胞凋亡作用,有研究显示,经体外培养的海马神经元 GRP78 表达上调可减弱十字孢碱或神经营养因子撤退诱导的细胞凋亡^[21]。GRP78 的抗氧化应激、抗兴奋性毒性和抗凋亡作用在内质网应激预适应的神经细胞保护过程中可能发挥重要作用。

综上所述,本研究证实 2-脱氧葡萄糖可以诱导内质网应激预适应,保护海马神经元耐受癫痫持续状态损害,而 IRE1/XBP-1 信号转导通路的活化和保护性分子 GRP78、XBP-1 表达水平的升高可能是

其保护机制之一。可以预见,内质网应激预适应可能成为一种新的神经细胞保护策略,也为癫痫持续状态的预防和治疗提供新的途径。

参 考 文 献

- [1] Rossetti AO, Perrig S, Landis T, Despland PA, Seeck M. Status epilepticus and neuronal degeneration: of circuitries and vicious circles. Rev Med Suisse, 2006, 2:1185-1186.
- [2] Han YB, Wang XF. Hot topic and new problems in the study of status epilepticus. Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi, 2009, 9:319-322. [韩雁冰, 王雪峰. 癫痫持续状态研究热点与新问题. 中国现代神经疾病杂志, 2009, 9:319-322.]
- [3] Lopez - Meraz ML, Niquet J, Wasterlain CG. Distinct caspase pathways mediate necrosis and apoptosis in subpopulations of hippocampal neurons after status epilepticus. Epilepsia, 2010, 51:56-60.
- [4] Thompson JW, Dave KR, Young JI, Perez-Pinzon MA. Ischemic preconditioning alters the epigenetic profile of the brain from ischemic intolerance to ischemic tolerance. Neurotherapeutics, 2013, 10:789-797.
- [5] Kitano H, Kirsch JR, Hurn PD, Murphy SJ. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning

- agents in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27: 1108-1128.
- [6] Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*, 2013, 32:805-818.
- [7] Torres-Peraza JF, Engel T, Martín-Ibáñez R, Sanz-Rodríguez A, Fernández-Fernández MR, Esgleas M, Canals JM, Henshall DC, Lucas JJ. Protective neuronal induction of ATF5 in endoplasmic reticulum stress induced by status epilepticus. *Brain*, 2013, 136: 1161-1176.
- [8] Huang ZL, Xiao B, Wang R, Zhang H. Effects of curcumin on the expression levels of endoplasmic reticulum stress associated molecules in the hippocampus after status epilepticus. *Zhongguo Shen Jing Mian Yi Xue He Shen Jing Bing Xue Za Zhi*, 2007, 14:141-145. [黄志凌, 肖波, 王蓉, 张贺, 姜黄素对癫痫持续状态后海马内质网应激相关分子表达的影响. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2007, 14:141-145.]
- [9] Lee J, Bruce-Keller AJ, Kruman Y, Chan SL, Mattson MP. 2-Deoxy - D - glucose protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative injury: evidence for the involvement of stress proteins. *J Neurosci Res*, 1999, 57:48-61.
- [10] Song YJ, Tian X. A lithium - pilocarpine chronic model of epilepsy. *Tianjin Yi Yao*, 2004, 32:415-417. [宋毅军, 田心. 小剂量反复注射匹罗卡品制备颞叶癫痫大鼠模型. *天津医药*, 2004, 32:415-417.]
- [11] Li GL, Xiao B, Xie GJ, Zhang B, Yang XS, Chen LL. Temporal lobe epilepsy model induced by pilocarpine in rats. *Hu'nan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2003, 28:29-32. [李国良, 肖波, 谢光洁, 章蓓, 杨晓苏, 陈丽丽. 匹罗卡品颞叶癫痫大鼠模型. *湖南医科大学学报*, 2003, 28:29-32.]
- [12] Chevet E, Cameron PH, Pelletier MF, Thomas DY, Bergeron JJ. The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11:120-124.
- [13] Shajahan AN, Riggins RB, Clarke R. The role of X-box binding protein-1 in tumorigenicity. *Drug News Perspect*, 2009, 22:241-246.
- [14] Rejdak K, Rejdak R, Sieklucka-Dziuba M, Stelmasiak Z, Grieb P. 2 - deoxyglucose enhances epileptic tolerance evoked by transient incomplete brain ischemia in mice. *Epilepsy Res*, 2001, 43:271-278.
- [15] Yu SM, Kim SJ. Protein phosphorylation on tyrosine restores expression and glycosylation of cyclooxygenase-2 by 2-deoxy-D-glucose-caused endoplasmic reticulum stress in rabbit articular chondrocyte. *BMB Rep*, 2012, 45:317-322.
- [16] Leung HJ, Duran EM, Kurtoglu M, Andreansky S, Lampidis TJ, Mesri EA. Activation of the unfolded protein response by 2 - deoxy - D - glucose inhibits Kaposi's sarcoma - associated herpesvirus replication and gene expression. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56:5794-5803.
- [17] Peyrou M, Cribb AE. Effect of endoplasmic reticulum stress preconditioning on cytotoxicity of clinically relevant nephrotoxins in renal cell lines. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21:878-886.
- [18] Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . *Physiol Rev*, 2011, 91:1219-1243.
- [19] Chen JC, Wu ML, Huang KC, Lin WW. HMG-CoA reductase inhibitors activate the unfolded protein response and induce cytoprotective GRP78 expression. *Cardiovasc Res*, 2008, 80:138-150.
- [20] Wu X, Zhao H, Min L, Liu P, Luo Y. Effects of 2-deoxyglucose on ischemic brain injuries in rats. *Int J Neurosci*, 2013, 124:666-672.
- [21] Yu Z, Luo H, Fu W, Mattson MP. The endoplasmic reticulum stress - responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp Neurol*, 1999, 155:302-314.
- [22] Rejdak R, Rejdak K, Sieklucka-Dziuba M, Stelmasiak Z, Grieb P. Brain tolerance and preconditioning. *Pol J Pharmacol*, 2001, 53:73-79.

(收稿日期:2014-09-10)

· 小词典 ·

中英文对照名词词汇(五)

N5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶

N5, 10-methylene tetrahydrofolate reductase(MTHFR)

乙琥胺 ethosuximide(ESM)

异常子宫出血 abnormal uterine bleeding(AUB)

异柠檬酸脱氢酶 1 isocitrate dehydrogenase 1(IDH1)

英国 Rivermead 康复中心设计的行为记忆测验第 2 版
Rivermead Behavioural Memory Test Second Edition
(RBMT- II)

婴儿期严重肌阵挛癫痫

severe myoclonic epilepsy in infancy(SMEI)

荧光原位杂交 fluorescence in situ hybridization(FISH)

早发型良性儿童期枕叶癫痫

early-onset benign childhood occipital seizure(EBOS)

中国抗癫痫协会

China Association Against Epilepsy(CAAE)

中国知识基础设施工程

China National Knowledge Infrastructure(CNKI)

周期蛋白依赖性激酶抑制剂

cyclin-dependent kinase inhibitor(CDKI)

周期性单侧痫样放电

periodic lateralized epileptiform discharges(PLEDs)

转化生长因子 transforming growth factor(TGF)

椎基底动脉扩张延长症

vertebrobasilar dolichoectasia(VBD)

组蛋白甲基转移酶 histone methyltransferase(HMT)

组蛋白乙酰转移酶 histone acetyltransferase(HAT)

左乙拉西坦 levetiracetam(LVT)

唑尼沙胺 zonisamide(ZNS)