

塞来昔布对慢性颞叶癫痫大鼠海马核因子- κ Bp65 和 P-糖蛋白表达的影响

张秀娜 武士京 陶华英 张丽娜

【摘要】 目的 探讨环氧合酶-2 抑制剂塞来昔布对慢性颞叶癫痫大鼠海马核因子- κ Bp65 和 P-糖蛋白表达的影响,以及核因子- κ Bp65 和 P-糖蛋白与颞叶癫痫发病机制的关系,以为环氧合酶-2 抑制剂用于抗癫痫药物辅助治疗提供实验依据。方法 采用大鼠海马 CA3 区微量注射海人酸的方法制备颞叶癫痫动物模型,免疫组织化学染色和 Western blotting 法观察塞来昔布治疗后大鼠海马核因子- κ Bp65 和 P-糖蛋白表达变化。结果 与对照组相比较,颞叶癫痫大鼠海马核因子- κ Bp65、P-糖蛋白表达水平,以及核因子- κ Bp65 核移位现象明显增加(均 $P < 0.05$);经塞来昔布治疗后,海马组织中核因子- κ Bp65、P-糖蛋白表达水平及核因子- κ Bp65 核移位现象显著改善,与模型组比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 核因子- κ Bp65 和 P-糖蛋白在颞叶癫痫慢性期表达上调、核因子- κ Bp65 核移位现象增加,有可能是难治性癫痫发生与发展的分子生物学机制之一。环氧合酶-2 抑制剂塞来昔布通过降低慢性颞叶癫痫大鼠海马 CA3 区核因子- κ Bp65 和 P-糖蛋白表达水平,抑制核因子- κ Bp65 核移位,最终降低炎症反应,逆转多药耐药而发挥抗癫痫作用。

【关键词】 癫痫,颞叶; 环氧合酶抑制剂; NF- κ B; P 糖蛋白类; 药物耐受性; 免疫组织化学; 疾病模型,动物

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2011.02.022

Effects of celecoxib on expression of NF- κ Bp65 and P-gp in hippocampus of chronic temporal lobe epileptic rats ZHANG Xiuna, WU Shijing, TAO Huaying, ZHANG Lina. Department of Neurology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: WU Shijing (Email: wsjkobe@yahoo.com)

【Abstract】 Objective To observe the effects of cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib on expression of nuclear factor- κ Bp65 (NF- κ Bp65) and P-glycoprotein (P-gp) in the hippocampus of rats with chronic temporal lobe epilepsy (TLE), to investigate the relationship between NF- κ Bp65, P-gp and the pathogenesis of TLE, and to explore the potential of cyclooxygenase-2 inhibitor as an adjunctive therapy of anti-epileptic drug. **Methods** Thirty male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into normal saline control group, TLE model group and celecoxib treatment group ($n = 10$ in each group). TLE model was induced by injection of kainic acid into the CA3 area of hippocampus using a stereotaxic apparatus. Eight weeks after status epilepticus, the rats in celecoxib treatment group received intraperitoneal injection of celecoxib (10 mg/kg) once daily for 10 d. The expression of NF- κ Bp65 and P-gp in hippocampus of rats was detected by immunohistochemical technique and Western blotting. **Results** Compared with normal saline control rats, the expression of NF- κ Bp65 and P-gp, and NF- κ Bp65 nuclear translocation in hippocampus of rats with TLE increased significantly ($P < 0.05$, for all). Celecoxib administration down-regulated the expression of NF- κ Bp65 and P-gp, and prevented NF- κ Bp65 translocation into nucleus in the hippocampus of TLE rats significantly ($P < 0.05$, for all). **Conclusion** These findings suggest that the pathogenesis of TLE is accompanied by an increase in NF- κ Bp65 and P-gp expression and NF- κ Bp65 nuclear translocation during chronic epilepsy period, and the administration of celecoxib may provide anti-epilepsy against inflammatory response and multi-drug resistance.

【Key words】 Epilepsy, temporal lobe; Cyclooxygenase inhibitors; NF - kappa B; P - glycoproteins; Drug tolerance; Immunohistochemistry; Disease models, animal

作者单位:300052 天津医科大学总医院神经内科(张秀娜、武士京),天津市神经病学研究所神经生理室(陶华英);河北医科大学第一医院神经内科(张丽娜)

通信作者:武士京(Email:wsjkobe@yahoo.com)

癫痫是中枢神经系统常见疾病,目前有大量关于癫痫药物治疗和发病机制的研究^[1]。颞叶癫痫(TLE)为临床常见难治性癫痫之一,其发病机制复杂,治疗效果欠佳。临床试验和动物实验结果均显示炎性反应和多药耐药参与其发生与发展过程。由炎性反应产生的细胞兴奋性毒性,可以诱发神经元死亡,破坏脑组织,形成海马硬化(HS)等病理改变,并使病程迁延反复;多药耐药则使癫痫患者对常规抗癫痫药物不敏感。且研究表明,核因子- κ B(NF- κ B)和P-糖蛋白(P-gp)在癫痫慢性期表达水平上调,前者为重要的核转录因子,可调控大量基因转录,并与炎性反应密切相关;后者是由多药耐药基因1(MDR1)编码的能量依赖性转运蛋白,经分解ATP获得能量,从而逆浓度梯度将抗癫痫药物转运出脑组织,降低药物疗效^[2]。环氧合酶-2(COX-2)亦参与了这一炎性反应过程,并可促进P-糖蛋白表达水平上调^[3]。为进一步证实核因子- κ B和P-糖蛋白、环氧合酶-2等炎性介质参与难治性癫痫发生与发展的分子生物学机制,在本实验中,我们采用海人酸(KA)建立颞叶癫痫大鼠模型,通过免疫组织化学和免疫印迹(Western blotting)法研究环氧合酶-2抑制药塞来昔布对颞叶癫痫大鼠海马组织中核因子- κ Bp65和P-糖蛋白表达的影响,以探讨二者与颞叶癫痫的可能关系,并为今后临床应用环氧合酶-2抑制药辅助治疗癫痫,提供实验基础和理论依据。

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物 清洁级健康雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠共 30 只,体质量(187.17 ± 15.84) g,鼠龄 11~13 周,由解放军军事医学科学院实验动物中心提供,饲养于天津市神经病学研究所动物室,分笼喂养,于室温、自然光环境下给予充足的食物和水,自然昼夜循环。

2. 试剂与药品 实验用海人酸购自美国 Sigma 公司。免疫试剂中 I 抗[含兔抗大鼠核因子- κ Bp65 多克隆抗体(1:100 或 1:1000)、兔抗大鼠 P-糖蛋白多克隆抗体(1:75 或 1:400)和小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(1:1000)]分别购自英国 Abcam 公司、武汉博士德生物工程有限公司和北京中杉金桥生物技术有限公司,即用型 PV-6001 二步法免疫组织化学检测试剂盒[含内源性过氧化物酶阻断剂、体积分数为 30%过氧化氢和辣根

过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG II 抗多聚体],以及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠 IgG II 抗(1:1000)均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供,二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒和苏木素染液分别由武汉博士德生物工程有限公司和北京中杉金桥生物技术有限公司生产,化学发光显色试剂盒由北京索来宝科技有限公司提供。塞来昔布胶囊(批号: BK081705,规格:0.20 g/粒)为美国辉瑞制药有限公司进口,国内分包装,应用时将 0.20 g 塞来昔布置于 100 ml 容量瓶中,生理盐水稀释至刻度,混匀,即可得到终浓度为 2 mg/ml 的塞来昔布溶液。

3. 实验仪器 用于本实验 Western blotting 检测的 Mini-PROTEAN[®] Tetra System 蛋白电泳槽,购自美国 Bio-Rad 公司。GBOX 高级化学发光荧光凝胶成像系统由英国 Syngene 公司提供。

二、实验方法

1. 实验分组 按照随机数字表法(大鼠按编号随机抽取),SD 大鼠被随机分为正常对照组(对照组)、颞叶癫痫模型组(模型组)和塞来昔布治疗组(治疗组),每组各 10 只动物。

2. 颞叶癫痫模型制备 (1)制备方法:质量分数为 10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,生理盐水稀释海人酸至终浓度 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$,脑立体定位仪距前囟 - 5.60 mm、中线向右旁开 4.50 mm、颅骨下 7.00 mm 定位右侧海马 CA3 区,微量进样器缓慢注射海人酸 $0.20 \mu\text{l}$,10 min 匀速注药,停针 5 min 后缓慢退针即完成颞叶癫痫模型制备。治疗组大鼠于癫痫持续状态 8 周后腹腔注射塞来昔布 10 mg/kg,连续治疗 10 d;对照组和模型组大鼠腹腔注射等容积生理盐水,疗程相同。(2)结果判断:参考 Racine^[4]评分标准进行癫痫发作分级,颞叶癫痫慢性期判定标准为大鼠每周至少出现 1~2 次 IV 和(或) V 级发作。于模型制备后 8 周开始评价,0 级,无抽搐发作; I 级,面部抽搐和孤立性肌阵挛; II 级,全身性阵挛抽搐; III 级,全身性阵挛抽搐,伴站立; IV 级,全身性强直-阵挛抽搐,伴站立和跌倒; V 级,与 IV 级相同,反复发作呈癫痫持续状态或抽搐致死。

3. 免疫组织化学检测海马各区核因子- κ Bp65 和 P-糖蛋白表达水平 不同处理组大鼠于注射塞来昔布或生理盐水后 24 h,随机选择 5 只断头处死,即刻于冰盒内剥离颅骨、分离完整脑组织,切取右侧大脑半球,质量分数 4%多聚甲醛溶液固定 24 h;

石蜡包埋,连续冠状脑组织切片,层厚约为 5 μm ;置 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烘烤 30 min,常规脱蜡至水,水浴抗原修复法 95~98 $^{\circ}\text{C}$ 修复抗原 15 min,冷却至室温,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次);体积分数 30%过氧化氢室温处理 10 min,灭活内源性过氧化物酶,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次)。玻片滴加正常山羊血清封闭液,室温封闭 40 min,甩去多余液体,不洗。滴加 I 抗[兔抗大鼠核因子- $\kappa\text{Bp}65$ (1:100)或 P-糖蛋白(1:75)多克隆抗体],4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次);滴加 II 抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 多聚体),37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育 1 h,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次),DAB 室温显色,光学显微镜下控制反应时间;流水冲洗 DAB、苏木素复染 1 min,盐酸乙醇分化,流水冲洗 2 min;梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。以已知阳性图片作为阳性对照,磷酸盐缓冲液替代 I 抗作为阴性对照,其余检测步骤完全相同。免疫组织化学染色阳性细胞呈棕褐色,其中核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 阳性细胞被定义为核阳性细胞。每只大鼠选择 5 张脑组织切片,每组共 25 张切片,切片断面水平相似,进行免疫组织化学检测图像分析,于中倍镜($\times 200$)下计数海马各区核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 和 P-糖蛋白阳性细胞数目,取平均值,即为核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 和 P-糖蛋白阳性细胞数目。

4. Western blotting 检测海马各区核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 和 P-糖蛋白表达水平 不同处理组大鼠于注射塞来昔布或生理盐水后 24 h,随机选择 5 只断头处死、冰盒内剥离颅骨、分离完整脑组织,于 60 s 内分离获得右侧海马组织。切碎的组织置 500 μl 裂解液中,于冰上研钵充分研磨,静置 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 16 438 \times g 离心 20 min,取 5 μl 上清液,NanoDrop 紫外分光光度计测量总蛋白(测量 3 次取平均值)。剩余上清液按照蛋白样品体积与 4 \times 上样缓冲液体积为 3:1 的比例加入 4 \times 上样缓冲液,混合后煮沸 15 min,缓慢冷却后分装,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。将 40 μg 蛋白样品加入样品孔底部,于体积分数为 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)中分离,初始阶段维持电压 80 V,待溴酚蓝进入分离胶时电压调至 150 V,至溴酚蓝跑出分离胶时终止电泳。聚偏二氟乙烯(PVDF)膜转膜,80 V 电压共转膜 90 min。磷酸盐缓冲液冲洗 PVDF 膜 10 min($\times 3$ 次),膜封闭液室温下封闭 1 h;滴加 I 抗[兔抗大鼠核因子- $\kappa\text{Bp}65$ (1:1000)或 P-糖蛋白(1:400)多克隆抗体],于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PVDF 膜室温条件下结合辣根过氧化物酶标记的山羊抗

兔 IgG II 抗(1:1000)1 h,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次)。采用化学发光检测系统将 PVDF 膜正面向上平铺于平皿内,化学发光底物加于膜上,ChemGenius 凝胶成像系统成像。磷酸盐缓冲液冲洗显影后的 PVDF 膜 5 min($\times 3$ 次),浸于 10 ml 洗脱缓冲液[含 62.50 mmol/L Tris-HCl(pH 值 6.80),体积分数为 2%十二烷基磺酸钠(SDS),100 mmol/L β -巯基乙醇],55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱孵育 35 min,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次),以 GAPDH 作为内参照物,检测步骤同上。Quantity One 凝胶图像分析软件进行灰度值分析,目的蛋白质灰度值与 GAPDH 灰度值进行对比。

三、统计分析方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较行 q 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

模型组大鼠于腹腔注射海人酸后 3 h 开始出现癫痫发作,表现为持续反复跌倒、四肢抽搐、竖尾、跳跃及尖叫,呈现癫痫持续状态;4 h 后癫痫发作程度逐渐减弱;至 8 h 后症状完全缓解;2 周后出现自发性复发性发作。

二、环氧合酶-2 抑制药对颞叶癫痫大鼠海马核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 和 P-糖蛋白表达的影响

1. 组织病理学观察 免疫组织化学染色结果显示,对照组大鼠海马区仅见少量或几无核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 阳性细胞;模型组大鼠海马区核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 阳性细胞数目显著增加,表达部位主要位于海马 CA3 区神经元胞核;治疗组大鼠海马区核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 阳性细胞数目显著减少且少于模型组(图 1),差异有统计学意义($P=0.000$;表 1,2)。对照组大鼠海马区神经元极少表达或不表达 P-糖蛋白;模型组大鼠海马区神经元高表达 P-糖蛋白,阳性细胞主要分布于海马 CA3 区神经元胞质;治疗组大鼠 P-糖蛋白表达水平降低且低于模型组(图 2),差异具有统计学意义($P=0.000$;表 3,4)。

2. 塞来昔布治疗前后海马各区核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 和 P-糖蛋白表达变化 Western blotting 检测显示,塞来昔布治疗后,大鼠海马各区核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 表达水平降低(图 3),与模型组比较差异有统计学意义

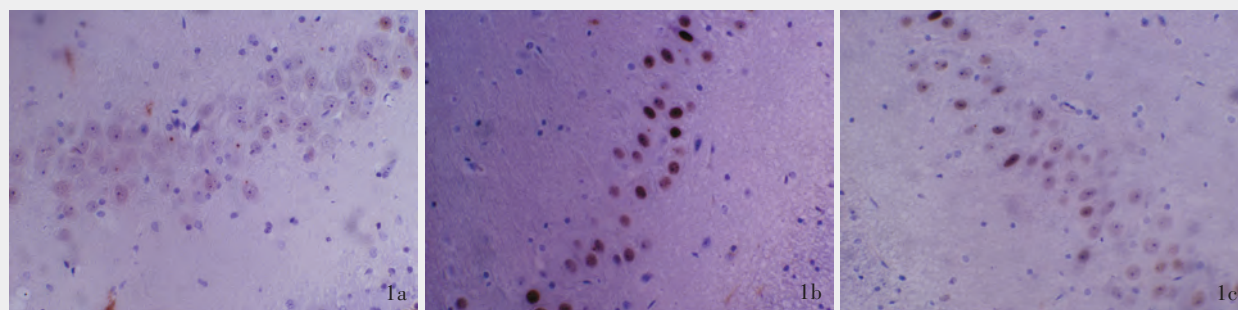


图1 光学显微镜观察所见 免疫组织化学染色(PV 二步法) ×200 1a 对照组大鼠海马区几无核因子-κBp65 阳性细胞 1b 模型组大鼠海马区可见大量核因子-κBp65 阳性细胞 1c 塞来昔布治疗组大鼠海马区核因子-κBp65 阳性细胞数目明显减少

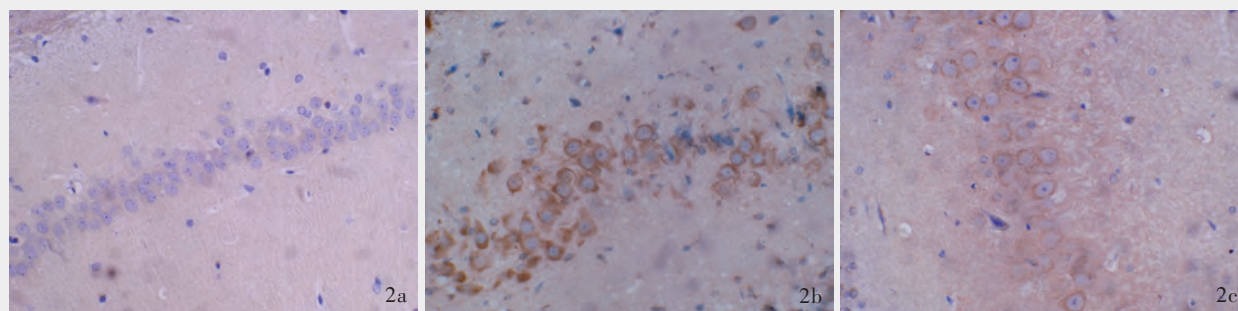


图2 光学显微镜观察所见 免疫组织化学染色(PV 二步法) ×200 2a 对照组大鼠海马区不表达P-糖蛋白 2b 模型组大鼠海马区高表达P-糖蛋白 2c 塞来昔布治疗组大鼠海马区P-糖蛋白表达水平明显降低

表1 不同处理组大鼠海马各区核因子-κBp65 阳性细胞数目的比较(̄x±s, 细胞数/中倍视野)

组别	样本例数	CA3区	CA2区	CA1区
对照组(1)	5	6.88 ± 5.04	1.36 ± 1.09	1.46 ± 1.23
模型组(2)	5	61.88 ± 10.90	1.88 ± 1.73	1.02 ± 0.92
治疗组(3)	5	23.76 ± 8.00	1.88 ± 1.29	1.24 ± 1.31
F 值		57.212	0.231	0.178
P 值		0.000	0.797	0.839

表3 不同处理组大鼠海马各区P-糖蛋白表达水平的比较(̄x±s, 细胞数/中倍视野)

组别	样本例数	CA3区	CA2区	CA1区
对照组(1)	5	3.56 ± 2.94	0.92 ± 0.82	0.36 ± 0.50
模型组(2)	5	134.32 ± 16.75	1.20 ± 1.32	0.68 ± 1.02
治疗组(3)	5	79.08 ± 13.44	1.12 ± 1.37	0.96 ± 1.03
F 值		137.565	0.073	0.576
P 值		0.000	0.930	0.577

表2 不同处理组大鼠海马各区核因子-κBp65 阳性细胞数目的两两比较

组间两两比	P 值		
	CA3区	CA2区	CA1区
(1) : (2)	0.000	0.567	0.562
(1) : (3)	0.008	0.567	0.771
(2) : (3)	0.000	1.000	0.771

表4 不同处理组大鼠海马各区P-糖蛋白表达水平的两两比较

组间两两比	P 值		
	CA3区	CA2区	CA1区
(1) : (2)	0.000	0.717	0.578
(1) : (3)	0.008	0.796	0.305
(2) : (3)	0.000	0.917	0.626

($P = 0.001$),但仍高于对照组($P = 0.001$;表5,6)。治疗组大鼠海马各区P-糖蛋白表达水平降低(图4),与模型组比较差异有统计学意义($P = 0.000$),但仍高于对照组($P = 0.000$;表5,6)。

讨 论

研究发现,癫痫动物模型和癫痫患者的脑组织中均存在炎症反应,癫痫发作可能启动炎症信号转

导通路^[5-6]。另外,在手术切除的难治性癫痫患者海马组织中可检测到多种炎症因子^[7],而炎症反应可产生细胞兴奋性毒性,诱发神经元死亡,形成海马硬化等病理改变,使病程迁延反复。核因子-κB在炎症反应过程中起关键性作用,其主要化学形式是由p50和p65组成的异源二聚体,其中p65为其主要活性成分,核因子-κBp65表达水平可间接代表核因子-κB的活化水平,后者多与其抑制蛋白(IκB)相结

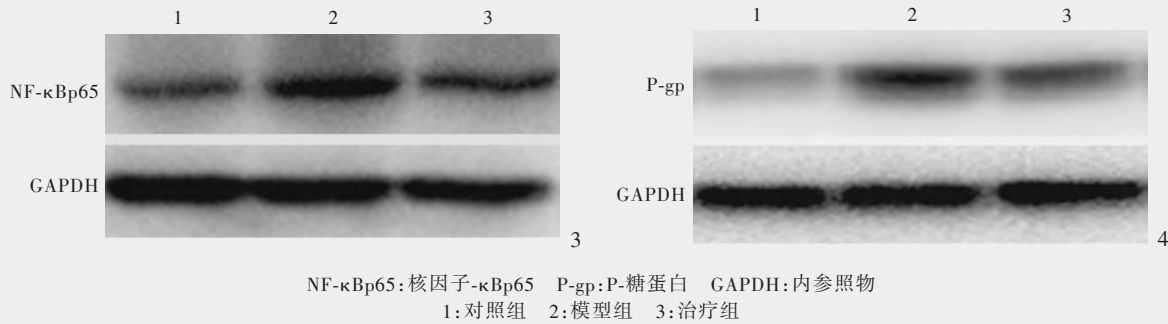


图3 SDS-PAGE电泳条带分析显示,模型组大鼠海马CA3区核因子-κBp65表达水平明显升高;治疗组大鼠海马CA3区核因子-κBp65表达水平低于模型组,仍高于对照组 图4 SDS-PAGE电泳条带分析显示,模型组大鼠海马CA3区P-糖蛋白表达水平显著升高;治疗组大鼠海马CA3区P-糖蛋白表达水平低于模型组,仍高于对照组

表5 塞来昔布治疗前后不同处理组大鼠海马各区核因子-κBp65和P-糖蛋白表达水平的比较(̄x ± s, 灰度值)

组别	样本例数	NF-κBp65	P-糖蛋白
对照组(1)	5	0.24 ± 0.04	0.07 ± 0.01
模型组(2)	5	0.50 ± 0.06	0.21 ± 0.03
治疗组(3)	5	0.37 ± 0.04	0.14 ± 0.01
F 值		37.677	63.455
P 值		0.000	0.000

表6 塞来昔布治疗前后不同处理组大鼠海马各区核因子-κBp65和P-糖蛋白表达水平的两两比较

组间两两比	P 值	
	NF-κBp65	P-糖蛋白
(1) : (2)	0.000	0.000
(1) : (3)	0.001	0.000
(2) : (3)	0.001	0.000

合,以无活性的复合物形式存在于细胞质中;当细胞受到某些外界刺激时,IκB 磷酸化致降解是核因子-κB 激活信号转导通路的关键。在 IκB 激酶的作用下,IκB 磷酸化致降解,使核因子-κB 迅速从复合物中游离,移位至细胞核,与相应位点结合,激活靶基因,调控靶基因转录^[8]。中枢神经系统血管内皮细胞、神经元和神经胶质细胞均含核因子-κB 靶基因,这些基因表达的产物可进一步参与炎症反应过程^[9]。Lerner-Natoli 等^[10]研究发现,癫痫模型动物长时间癫痫发作后,核因子-κB 在神经元和星形胶质细胞中呈高表达;Crespel 等^[11]在手术切除的海马硬化组织标本中亦发现神经胶质细胞核因子-κB 过度表达。表明,在典型的海马硬化病灶内,炎症反应活跃,此机制可能参与了癫痫的慢性复发过程。

自 20 世纪 70 年代 P-糖蛋白作为肿瘤药物化疗多药耐药相关蛋白(MRP)被广泛研究以来,其与癫痫多药耐药的的关系亦逐渐受到重视^[12]。P-糖蛋白为 MDR1 基因产物,其表达水平升高与难治性癫痫密切相关。对难治性癫痫患者手术切除的脑组织标本进行检测显示,癫痫病灶中的 P-糖蛋白免疫组织化学染色较正常对照组显著增强^[13]。

Lazarowski 等^[14]对难治性癫痫患者手术切除的脑组织标本进行研究后提出,P-糖蛋白在难治性癫痫早期主要表达于血-脑脊液屏障,至疾病晚期则会在神经元和部分神经胶质细胞中;而表达 P-糖蛋白的神经元较正常神经元具有更低的膜电位,故对刺激更敏感、更易产生兴奋。血-脑脊液屏障表达 P-糖蛋白可非特异性地、高效地将抗癫痫药物转运出细胞,且神经元及神经胶质细胞均表达 P-糖蛋白,进一步限制了抗癫痫药物进入神经元,使癫痫病灶内的药物浓度降低,故而难以发挥抗癫痫作用。

环氧合酶-2 为前列腺素合成限速酶,在大多数组织中呈静息状态不表达,当受到外界刺激时可迅速表达。环氧合酶-2 活化可引起氧化应激反应和前列腺素生成,从而引起损伤效应,与各类炎症性疾病有着密切关系。动物实验结果显示,脑组织内注射海人酸能够引起严重的癫痫发作和海马神经元缺失,以及环氧合酶-2 过度表达;而经环氧合酶-2 抑制药 NS398 处理或 COX-2 基因敲除的小鼠则具有对抗海人酸引起的海马神经元死亡的作用^[15]。上述研究提示:高效、安全的环氧合酶-2 抑制药有可能达到神经保护和抑制癫痫发作的目的。

长期以来,如何提高难治性癫痫的控制率一直是癫痫研究的热点。本实验对海人酸诱导的慢性颞叶癫痫大鼠模型进行研究,在环氧合酶-2 抑制药塞来昔布治疗前,不同处理组动物癫痫发作强度和发作时程基本相同,具有可比性。我们采用免疫组织化学染色和免疫印迹(Western blotting)法,从组织形态学和蛋白质定量检测两个方面对模型组和治疗组大鼠海马核因子- κ Bp65 和 P-糖蛋白表达水平进行分析,结果表明,颞叶癫痫大鼠经塞来昔布治疗后海马核因子- κ Bp65 和 P-糖蛋白表达水平显著降低,核因子- κ Bp65 核移位明显减少。提示:环氧合酶-2 抑制药塞来昔布具有抑制炎症反应过程、逆转多药耐药之功效,进一步验证了以往的实验结果^[16-17]。我们推测,癫痫发作后海马核因子- κ Bp65 和环氧合酶-2 表达水平上调,使核因子- κ Bp65 核移位增加,同时导致 P-糖蛋白表达水平上调,而环氧合酶-2 抑制药塞来昔布阻断了这一过程。核因子- κ Bp65 为重要的核转录因子,可调控多种基因表达,COX-2 和 P-gp 均为其下游基因^[18-19]。塞来昔布可抑制核因子- κ Bp65 的表达和过度活化,从而降低其下游 COX-2 和 MDR1 基因的转录,与此同时,还可直接抑制环氧合酶-2 的活性。关于塞来昔布调控核因子- κ Bp65、环氧合酶-2 和 P-糖蛋白表达的详细分子学机制和复杂靶效应,以及核因子- κ Bp65 和 P-糖蛋白与慢性颞叶癫痫发病机制的确切关系,有待今后的实验研究结果证实。

综上所述,环氧合酶-2 抑制药塞来昔布可抑制颞叶癫痫大鼠海马区炎症反应,逆转多药耐药。该药对难治性癫痫的治疗具有辅助作用,有可能达到理想的治疗效果,是一种潜在的治疗癫痫的新型药物疗法,值得进一步关注。

参 考 文 献

- [1] 王学峰,王琳媛,彭希. 癫痫药物治疗及发病机制研究:十年进展及展望. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10:64-70.
- [2] Luna - Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P - glycoprotein. Neuropharmacology, 2008, 55:1364-1375.
- [3] Bauer B, Hartz AM, Pekcec A, et al. Seizure - induced up - regulation of P - glycoprotein at the blood - brain barrier through glutamate and cyclooxygenase - 2 signaling. Mol Pharmacol, 2008, 73:1444-1453.
- [4] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II: motor seizures. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32:281-294.
- [5] Choi J, Koh S. Role of brain inflammation in epileptogenesis. Yonsei Med J, 2008, 49:1-18.
- [6] Voutsinos - Porche B, Koning E, Kaplan H, et al. Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium - pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis, 2004, 17:385-402.
- [7] van Gassen KL, de Wit M, Koerkamp MJ, et al. Possible role of the innate immunity in temporal lobe epilepsy. Epilepsia, 2008, 49:1055-1065.
- [8] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF - kappaB signaling. Cell, 2008, 132:344-362.
- [9] Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. The antioxidant effect exerted by TGF - 1beta - stimulated hyaluronan production reduced NF - kappaB activation and apoptosis in human fibroblasts exposed to FeSO₄ plus ascorbate. Mol Cell Biochem, 2008, 311 (1/2):167-177.
- [10] Lerner - Natoli M, Montpied P, Rousset MC, et al. Sequential expression of surface antigens and transcription factor NFkappaB by hippocampal cells in excitotoxicity and experimental epilepsy. Epilepsy Res, 2000, 41:141-154.
- [11] Crespel A, Coubes P, Rousset MC, et al. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. Brain Res, 2002, 952:159-169.
- [12] 宋小燕, 赵永波. 多药耐药相关蛋白与难治性癫痫. 中国现代神经疾病杂志, 2007, 7:183-185.
- [13] Tishler DM, Weinberg KI, Hinton DR, et al. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. Epilepsia, 1995, 36:1-6.
- [14] Lazarowski A, Czornyj L, Lubienieki F, et al. ABC transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epilepsy. Epilepsia, 2007, 48 Suppl 5: 140-149.
- [15] Takemiya T, Maehara M, Matsumura K, et al. Prostaglandin E2 produced by late induced COX - 2 stimulates hippocampal neuron loss after seizure in the CA3 region. Neurosci Res, 2006, 56:103-110.
- [16] van Vliet EA, Zibell G, Pekcec A, et al. COX - 2 inhibition controls P - glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. Neuropharmacology, 2010, 58:404-412.
- [17] Zibell G, Unkrüer B, Pekcec A, et al. Prevention of seizure - induced up - regulation of endothelial P - glycoprotein by COX - 2 inhibition. Neuropharmacology, 2009, 56:849-855.
- [18] Bentires - Alj M, Barbu V, Fillet M, et al. NF - kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. Oncogene, 2003, 22:90-97.
- [19] Kaltschmidt B, Linker RA, Deng J, et al. Cyclooxygenase-2 is a neuronal target gene of NF-kappaB. BMC Mol Biol, 2002, 3:16.

(收稿日期:2011-01-10)

《中国现代神经疾病杂志》投稿须知

为方便广大作者投稿,避免纸质稿件在退修及修回过程中遗失,本刊现改用电子邮件投稿形式,作者在发送电子稿件的同时请一并注明 Email 地址、联系电话以及详细联系地址备用。本刊 Email 地址: xdsjbbzz@263.net.cn。单位介绍信请注明对稿件的评审意见,以及无一稿两投、不涉及保密、署名无争议等内容,通过邮局寄到编辑部。来稿需付稿件处理费 30 元,经邮电局汇款。本刊采用 Email 发送修改稿,并及时提供稿件的处理情况,请各位作者注意查询。