

Akt1 在颞叶癫痫大鼠海马中的表达变化

林慧慧 刘艳青 刘森 李江丽 宋毅军

【摘要】 目的 研究颞叶癫痫模型海马区神经元 Akt1 表达变化,探讨其在癫痫发生发展中的作用。方法 采用氯化锂-匹罗卡品方法制备颞叶癫痫大鼠模型,Western blotting 检测海马区总蛋白、Quantity one 软件行灰度值分析;免疫组织化学染色观察海马各区 Akt1 蛋白表达变化,计数不同处理组阳性神经元数目。结果 Western blotting 检测结果显示,与正常对照组相比,癫痫模型组大鼠于癫痫持续状态发作即刻海马区 Akt1 蛋白表达升高($t = 2.445, P = 0.034$),并于第 30 天时达峰值水平($t = 1.214, P = 0.002$),发作后 24 h 表达水平迅速降低,并低于正常值范围($t = 4.294, P = 0.000$),其余各测量时间点表达无明显改变;与氯化锂组相比,癫痫模型组大鼠于癫痫持续状态后 1 h 海马区 Akt1 蛋白表达开始降低,24 h 降至最低水平($t = 4.134, P = 0.000$),至发作 48 h 后开始逐渐升高($t = 2.481, P = 0.002$),并于发作第 7 天时升至氯化锂组水平。免疫组织化学染色显示,癫痫持续状态发作后海马 CA3 区 Akt1 蛋白表达阳性神经元数目立即增加,12 h 达高峰($t = 16.586, P = 0.000$),48 h 减少并降至正常值水平($t = 0.357, P = 0.089$),发作后第 10 天再次增加($t = 3.123, P = 0.000$),于第 30 天时阳性神经元数目再次达峰值水平($t = 18.339, P = 0.000$),第 50 天开始恢复至正常值水平($t = 3.219, P = 0.000$);氯化锂组仅海马 CA3 区 Akt1 蛋白表达于实验初始(0 h)升高并高于正常对照组($P < 0.05$),海马 CA1 和 CA2 区 Akt1 蛋白表达变化组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 海马及海马 CA3 区 Akt1 蛋白表达均呈现癫痫持续状态后升高、降低、再升高的动态过程,提示可能存在神经元保护作用,对抗细胞凋亡、促进细胞存活。

【关键词】 蛋白激酶类; 海马; 癫痫; 免疫印迹法; 免疫组织化学; 疾病模型,动物

DOI: 10.3969/j.issn.1672-6731.2012.05.015

The expression of Akt1 in hippocampus of rat model of temporal lobe epilepsy at different time

LIN Hui-hui¹, LIU Yan-qing², LIU Miao¹, LI Jiang-li¹, SONG Yi-jun³

¹Grade 2006, 7-year Educational System, ²Grade 2007, Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

³Department of Neurology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: SONG Yi-jun (Email: songyijun2000@gmail.com)

【Abstract】 Objective To study the expression of Akt1 in hippocampal neurons in temporal lobe epilepsy, and explore its role in the development of epilepsy. **Methods** Two hundred and ten healthy adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal group ($n = 10$), lithium chloride (LiCl) group ($n = 10$) and epilepsy group ($n = 190$). LiCl-pilocarpine (PILO) was used for animal model of epilepsy. Total protein was extracted from hippocampus and rat brain slices were obtained at different time points (0 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 7 d, 10 d, 30 d, 50 d) after status epilepticus (SE) in normal group and LiCl group. Western blotting technique was used for detection of total protein in the hippocampus, and gray value was analyzed by Quantity one software. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of Akt1 protein in the hippocampus and microscopic counting method ($\times 200$) was used to quantify positive nerve cells in hippocampal region. **Results** Compared with the control group, the expression of Akt1 protein in the hippocampus in epilepsy group was significantly increased at the beginning of SE and achieved to the peak at 30 d after SE (0 h: $4.09 \pm 0.04, t = 2.445, P = 0.034$; 30 d: $0.52 \pm 0.03, t = 1.214, P = 0.002$). The expression level was quickly reduced and was lower than normal value at 24 h after SE ($0.27 \pm 0.06, t = 4.294, P = 0.000$), and no significant differences were seen at other time

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:91132722);
国家自然科学基金资助项目(项目编号:81071044);天津市自然
科学基金资助项目(项目编号:10JCYBJC13800);天津市高等学
校科技发展基金资助项目(项目编号:20090123);天津医科大学
新世纪人才支持计划项目

作者单位:300070 天津医科大学七年制 2006 级(林慧慧,刘森,
李江丽);300070 天津医科大学研究生院 2007 级(刘艳青);300052
天津医科大学总医院神经内科(宋毅军)

通讯作者:宋毅军(Email: songyijun2000@gmail.com)

points. In comparison with LiCl group, the Akt1 protein expression in hippocampus in epilepsy group began to decrease at 1 h after SE, and reached to the lowest level at 24 h after SE (0.27 ± 0.06 , $t = 4.134$, $P = 0.000$). At 48 h after SE the Akt1 expression began to increase and achieved to the level of LiCl group at 7 d after SE. In immunohistochemical staining: Akt1 protein positive cells in hippocampal CA3 area immediately increased after SE and achieved to the peak (46.70 ± 2.90) at 12 h after SE, but decreased to normal level (16.20 ± 2.50) at 48 h after SE. The positive neurons increased again (25.00 ± 2.30) at 10 d and reached to peak level (44.10 ± 1.80) again at 30 d after SE, but began to reduce to normal level (22.30 ± 2.60) at 50 d after SE. In LiCl group, Akt1 protein expression in CA3 area was higher than that in normal group at 0 h ($P < 0.05$). Akt1 protein positive cells in CA1 and CA2 areas showed no significant difference among different groups ($P > 0.05$, for all). **Conclusion** The dynamic process of Akt1 protein expression in hippocampus and the CA3 area of hippocampus after SE showed a higher, lower, and then higher presentation, suggests a possible cellular protective effect against apoptosis and promotion for cell survival.

【Key words】 Protein kinases; Hippocampus; Epilepsy; Immunoblotting; Immunohistochemistry; Disease models, animal

Fund Project: National Natural Science Foundation of China (No. 91132722); National Natural Science Foundation of China (No. 81071044); Natural Science Foundation Project of Tianjin Municipal (No. 10JCYBJC13800); Tianjin Municipal High School Science and Technology Development Fund Project (No. 20090123); Program for New Century Talents in Tianjin Medical University

颞叶癫痫是临床最为常见的难治性癫痫,其发病原因和发病机制十分复杂,长期以来一直是癫痫治疗的难点与热点问题。颞叶癫痫的典型病理改变为海马硬化,表现为海马神经元缺失和苔藓纤维芽生。经研究证实,匹罗卡品能够诱发海马门区神经元死亡及苔藓纤维芽生,类似人类颞叶癫痫的临床表现及病理学特征^[1-2],而氯化锂与匹罗卡品具有协同作用,可减少匹罗卡品的药物剂量,降低癫痫动物的死亡率。目前蛋白激酶B(Akt)在中枢神经系统疾病中的作用广泛受到关注,有研究显示在急性脑缺血、帕金森病(PD)、阿尔茨海默病(AD)等中枢神经系统疾病中蛋白激酶可通过对抗细胞凋亡机制而促进神经元存活^[3-4]。蛋白激酶的3种亚型及多样化底物是其发挥多种功能的结构基础,Akt3的异常突变与增加激酶活性和癫痫敏感性有关^[5],而Akt1在细胞生存、增殖和代谢中则发挥重要作用。在本研究中,我们对癫痫持续状态(SE)后颞叶癫痫大鼠海马组织中的Akt1蛋白表达变化进行动态观察,以期探讨该蛋白在癫痫发生与发展过程中的作用机制。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物及分组 共210只健康清洁级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,鼠龄3~4个月,体质量为280~320g,由北京维通利华动物实验技术有限公司提供。任意分为正常对照组(对照组,10只)、单

纯氯化锂组(氯化锂组,10只)和氯化锂-匹罗卡品癫痫模型组(癫痫模型组,190只)。实验期间笼养,于室温、自然光环境下予以充足的食物和水,自然昼夜循环。

2. 主要试剂 氯化锂($\text{LiCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$)相对分子质量 60.41×10^3 ,含量500g(纯度 $> 97\%$,批号:980814),购自北京化工厂。地西洋(规格:2ml:10mg,批号:1003101)和硫酸阿托品(规格:1ml:0.50mg,批号:1106211)均为天津金耀氨基酸有限公司产品。免疫试剂中I抗为Akt1兔抗大鼠单克隆抗体(1:100),购自美国Cell Signaling公司(编号:2983S),通用型SP-9000免疫组织化学检测试剂盒[含辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉菌卵白素山羊抗兔、山羊抗小鼠IgG II抗和小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体,工作浓度均为1:1000]购自北京中杉金桥生物技术有限公司,二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒、放射免疫沉淀分析(RIPA)细胞裂解液和苯甲基磺酰氟(PMSF)蛋白酶抑制剂均为北京索来宝科技有限公司产品。苏木素染液购自武汉博士德生物工程有限公司。

3. 主要实验仪器 DYCZ-40D型电泳仪(规格:150mm×100mm×140mm)由北京六一仪器厂生产。贺利氏Primo-R型台式高速冷冻离心机(离心半径5cm、转速300~15000r/min)购自德国Heraeus公司。美国164-5050型伯乐基础电源电泳仪(电压:300V,电流:400mA,功率:75W)和200万像素科研级凝胶成像系统(GelDoc-It310 Imaging

System, 编号:002-000005, 分辨率:1600×1200)由美国 Bio-Rad 公司提供。ZG57-1 型电热恒温干燥箱(功率:6 kW, 温度:50~250℃)为天津争光真空仪器厂产品。精密天平 PB-S/A 系列(精确度:0.001 g)购自美国 Mettler Toledo 公司。85-2 型恒温磁力搅拌器(转速:100~2000 r/min, 控温精度:±1℃, 控温范围:室温~100℃)购自上海司乐仪器有限公司。ND1000 紫外分光光度计(波长范围:220~750 nm, 波长精度:1 nm, 分辨率:3 nm)购自美国 NanoDrop 科技有限责任公司。

二、实验方法

1. 癫痫持续状态模型的制备 (1)制备方法:按 3 mmol/kg 剂量腹腔注射氯化锂, 24 h 后腹腔注射匹罗卡品 20 mg/kg, 当大鼠癫痫发作达 Racine 分级标准^[6] V 级 1 h 后, 经腹腔注射硫酸阿托品 1 mg/kg 和地西洋 10 mg/kg 以终止发作。凡癫痫发作达 Racine 分级标准 V 级, 且经硫酸阿托品和地西洋治疗后症状控制良好者即为模型制备成功大鼠。正常对照组以同等体积的生理盐水取代氯化锂和匹罗卡品行腹腔注射。氯化锂组大鼠按 3 mmol/kg 剂量腹腔注射氯化锂, 24 h 后注射同等体积生理盐水替代匹罗卡品。(2)癫痫发作分级:根据 Racine 分级标准(1972 年)^[6], 大鼠癫痫发作状态分为 5 级。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 级相同状态, 反复发作呈持续状态或抽搐致死。癫痫持续状态即为持续出现 V 级者。

2. 免疫印迹法(Western blotting)检测海马区 Akt1 蛋白表达变化 正常对照组和氯化锂组各选择 5 只大鼠, 癫痫模型组随机选择 50 只大鼠并分为 10 个亚组, 每组 5 只。分别于癫痫持续状态发作后 0、1、6、12、24 和 48 h, 以及第 7、10、30 和 50 天时断头切取脑组织, 迅速分离双侧海马组织、手术刀切碎后置于冰上, 500 μl 细胞裂解液(RIPA 与 PMSF 含量为 1:100)充分混匀, 超声匀浆粉碎、静置 30 min; 4℃、离心半径 5 cm、13 000 r/min 高速离心 20 min, 弃沉淀物、取上清液约 400 μl 备用。取 2 μl 上清液进行蛋白定量分析。其余上清液与等体积 2×十二烷基磺酸钠(SDS)上样缓冲液混合后煮沸 15 min, 缓慢冷却后分装, 保存于-80℃冰箱备用。取等量蛋白质样品经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 80 V 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜

电压恒压转膜 80 min, 膜封闭液封闭 1 h(不洗), 滴加 Akt1 兔抗大鼠单克隆抗体(I 抗)4℃摇床过夜; 次日复温 30 min, 磷酸盐蛋白质缓冲液(PBST)洗膜 5 min(×3 次), 滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG II 抗, 室温孵育 1 h, PVDF 洗膜 5 min(×3 次)。PVDF 膜化学发光显色、洗脱, GAPDH 二次杂交、发光显色。以 Quantity one 4.6.2 分析软件(美国 Bio-Rad 公司)测定每一样品目标蛋白质电泳条带和相对应 GAPDH 电泳条带灰度值, 两数值的比值为相对灰度值。

3. 免疫组织化学染色观察 Akt1 蛋白表达变化 正常对照组和氯化锂组各选择 5 只大鼠, 癫痫模型组随机选择 50 只并分为 10 个亚组, 每组 5 只。分别于癫痫持续状态发作后 0、1、6、12、24 和 48 h, 以及第 7、10、30 和 50 天时断头切取脑组织, 置质量分数为 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h, 石蜡包埋, 制备层厚为 5~7 μm 的脑组织切片, 置 60℃烤箱烘烤 1 h; 二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、蒸馏水和磷酸盐缓冲液(PBS)浸泡, 92~98℃水浴加热 15 min 修复抗原, 以质量分数为 3%的过氧化氢室温处理 20 min 灭活内源性过氧化物酶, 滴加正常山羊血清封闭液 50 μl 封闭 40 min, 滴加 1:100 稀释的 Akt1 兔抗大鼠单克隆抗体(I 抗), 4℃过夜, 滴加生物素化山羊抗兔 IgG II 抗, 37℃湿盒孵育 40 min, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉菌卵白素, 37℃湿盒孵育 1 h。DAB 室温显色 4~5 min, 苏木素复染 1 min, 盐酸乙醇分化、氨水返蓝, 流水冲洗 2 min, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。每只大鼠均任意选择 5 张海马组织切片, 每一亚组共计 25 张脑组织切片。Akt1 蛋白主要表达于细胞质, 因此以细胞质染色呈棕黄色颗粒为阳性。采用日本 Nikon 公司生产的 E-200 光学显微镜分别计数海马 CA3、CA2 和 CA1 区阳性神经元数目。

三、图像分析及统计分析方法

实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行计算与分析。经 Kolmogorov-Smirnov 检验显示不同测量时间点相对灰度值及阳性神经元数目均呈正态分布, 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 Levene 法进行方差齐性检验($P=0.089$), 成组设计的多样本均数的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA 检验), 多个样本均数与同一组均数之间的多重比较进行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、动物模型的建立

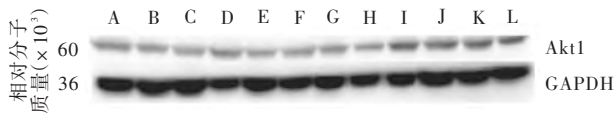
根据 Racine 分级标准(1972 年),癫痫模型组的 190 只大鼠经氯化锂-匹罗卡品腹腔注射后大多数达癫痫持续状态,诱发成功率约为 83.68%(159/190);经硫酸阿托品 1 mg/kg 和地西洋 10 mg/kg 治疗后,其中部分动物发作症状明显缓解,模型制备成功率达 72.63%(138/190)。本组实验动物制模过程中癫痫持续状态死亡率约为 23.16%(44/190)。

二、海马区 Akt1 蛋白表达变化

1. Western blotting 法 图 1,2 和表 1,2 显示,与正常对照组相比,癫痫模型组大鼠于癫痫持续状态初始阶段和发作后第 30 天时海马区 Akt1 蛋白表达

水平显著升高,并达峰值水平(0 h: $t = 2.445, P = 0.034$;30 d: $t = 1.214, P = 0.002$);发作后 24 h 表达迅速降至最低水平并低于正常值范围($t = 4.134, P = 0.000$);其余各测量时间点表达均无明显改变。与氯化锂组相比,癫痫模型组大鼠于癫痫持续状态后 1 h 海马区 Akt1 蛋白表达水平开始下降,至 24 h 降至最低水平($t = 4.294, P = 0.000$),48 h 再次升高($t = 2.481, P = 0.002$),并于癫痫持续状态后第 7 天时升至氯化锂组水平。

2. 免疫组织化学染色 显示 Akt1 阳性神经细胞质呈黄染、胞核为淡蓝色(图 3)。由图 3 和表 3,4 可见,与正常对照组相比,氯化锂组和癫痫模型组大鼠海马 CA3 区阳性神经元数目于癫痫持续状态后 0、1、6、12 和 24 h,以及第 10、30 和 50 天时显著增多,且组间差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$);发作后 48 h 和第 7 天时,海马 CA3 区阳性神经元数目与正常对照组之间无明显差异(均 $P > 0.05$)。与氯化锂组比较,癫痫模型组大鼠在癫痫持续状态发作后 0、1、6、12、24 和 48 h,以及第 7、30 和 50 天时海马 CA3 区阳性神经元数目显著增多,且两组之间差异具有统计学意义($P < 0.01$);但发作第 10 天时,两组海马 CA3 区阳性神经元数目差异无统计学意义($P > 0.05$)。与正常对照组相比,氯化锂组和癫痫模型组大鼠海马 CA1 和 CA2 区阳性神经元数目差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。免疫组织化学染色显示,癫痫持续状态后大鼠海马 CA3 区 Akt1 蛋白表达水平即刻升高并且于发作后 12 h 达峰值水平($t = 16.586, P = 0.000$),48 h 降至正常值范围($t = 0.357, P = 0.089$),并分别于发作第 10($t = 3.123, P = 0.000$)和第 30 天时再次升高并达峰值水平($t = 18.339, P = 0.000$),至发作第 50 天时表达水平降低($t = 3.219, P = 0.000$)。与正常对照组和癫痫模型组相比,氯化锂组大鼠于癫痫持续状态发作即刻(0 h)海马 CA3 区 Akt1 蛋白表达水平升高,且组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。不同处理组大鼠海马 CA1 和 CA2 区 Akt1 蛋白表达变化,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。



A: 正常对照组(normal control group) B: 氯化锂组(LiCl group) C: 癫痫持续状态后 0 h(0 h after SE) D: 癫痫持续状态后 1 h(1 h after SE) E: 癫痫持续状态后 6 h(6 h after SE) F: 癫痫持续状态后 12 h(12 h after SE) G: 癫痫持续状态后 24 h(24 h after SE) H: 癫痫持续状态后 48 h(48 h after SE) I: 癫痫持续状态后第 7 天(7 d after SE) J: 癫痫持续状态后第 10 天(10 d after SE) K: 癫痫持续状态后第 30 天(30 d after SE) L: 癫痫持续状态后第 50 天(50 d after SE)。下图同(the same in Figure 2)

图 1 Western blotting 检测显示,癫痫模型组大鼠于癫痫持续状态后 24 h 海马区 Akt1 蛋白表达水平最低,于发作后第 30 天达峰值水平

Figure 1 Akt1 protein expression reaches to the lowest level at 24 h after SE, and achieves to the peak level at 30 d after SE (0 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 7 d, 10 d, 30 d, 50 d after SE)

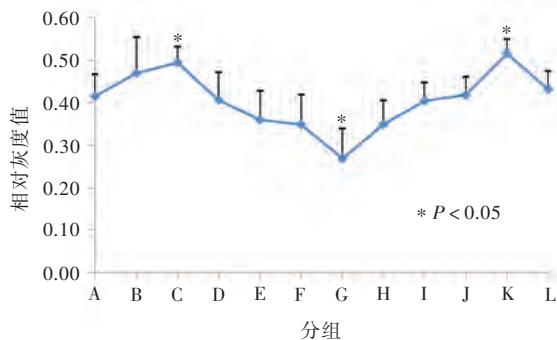


图 2 不同处理组大鼠各测量时间点海马区 Akt1 蛋白表达水平的比较

Figure 2 The comparison of the relative gray values of Akt1 protein expression in the hippocampus among different groups (0 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 7 d, 10 d, 30 d, 50 d after SE)

讨 论

对人类颞叶癫痫及各种癫痫持续状态动物模型的研究业已证实,癫痫持续状态后的神

表 1 不同处理组大鼠各测量时间点海马区 Akt1 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$, 相对灰度值)

Table 1. The relative gray values of Akt1 protein expression in the hippocampus in different groups ($\bar{x} \pm s$, relative gray value)

组别	样本例数	Akt1 蛋白	F 值	P 值
正常对照组(A)	10	0.42 ± 0.05		
氯化锂组(B)	10	0.47 ± 0.09		
癫痫模型组				
0 h(C)	5	0.49 ± 0.04		
1 h(D)	5	0.41 ± 0.07		
6 h(E)	5	0.36 ± 0.07		
12 h(F)	5	0.35 ± 0.07	5.472	0.007
24 h(G)	5	0.27 ± 0.06		
48 h(H)	5	0.35 ± 0.06		
7 d(I)	5	0.40 ± 0.05		
10 d(J)	5	0.42 ± 0.04		
30 d(K)	5	0.52 ± 0.03		
50 d(L)	5	0.43 ± 0.04		

表 2 不同处理组大鼠各测量时间点海马区 Akt1 蛋白表达水平的多重两两比较

Table 2. The paired comparison of the relative gray values of Akt1 protein expression in the hippocampus among different groups at each time point

组间两两比	t 值	P 值	组间两两比	t 值	P 值
A : B	1.086	0.117	B : C	0.454	0.557
A : C	2.445	0.034	B : D	1.177	0.034
A : D	0.260	0.565	B : E	2.157	0.002
A : E	1.560	0.093	B : F	2.353	0.010
A : F	1.820	0.053	B : G	4.134	0.000
A : G	4.294	0.000	B : H	2.481	0.002
A : H	2.004	0.089	B : I	1.520	0.096
A : I	0.632	0.922	B : J	1.135	0.137
A : J	0.000	0.933	B : K	1.179	0.097
A : K	1.214	0.002	B : L	2.062	0.511
A : L	1.086	0.355			

经元死亡具有典型的细胞凋亡特征^[7]。有关癫痫细胞凋亡的分子机制及调控为近年基础研究所关注的焦点。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI₃K)/Akt 信号转导通路参与了细胞增殖、分化和凋亡过程,与人体多种生理功能有关^[8-9]。Akt 处于这一信号转导通路的中心环节,是一种保护性蛋白质,由其所介导的信号转导通路参与细胞存活、生长有关。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,相对分子质量约为 60 × 10³^[10],目前在哺乳动物中已发现至少 3 种 Akt 家族成员,即 PKB α /Akt1、PKB β /Akt2 和 PKB γ /Akt3,它们的氨基酸序列有 85% 的同源性,分别定位于 14q32.32、19q13.1-q13.2 和 1q44。活化型 Akt 可以通过磷酸化作用激活或抑制其下游参与细胞凋亡的一些靶蛋白,例如 Bad、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (caspase-9)、核因子- κ B(NF- κ B)等,介导多种生长因子而诱发细胞生长,经不同途径促进细胞存活,为重要的抗凋亡因子^[11]。

目前,有关 Akt 在癫痫发作时的表达及在发病机制中的作用研究结果表明,有多种物质可通过 Akt 实现神经元保护作用,从而减少癫痫发作时的神经元死亡^[12-15]。Goto 等^[13]利用 Western blotting 法检测氯化锂-匹罗卡品癫痫模型大鼠海马区整合素连接激酶(ILK)、神经肽(NPY)与磷酸化 Akt 之间的关系,发现癫痫持续状态第 5 天时磷酸化 Akt 表达水平显著升高,提示 Akt 表达水平的升高可能对癫痫

持续状态大鼠海马区神经元具有保护作用。本研究 Western blotting 检测结果显示,癫痫持续状态初始状态和癫痫持续状态第 30 天时大鼠海马区 Akt1 蛋白表达水平明显升高,而癫痫持续状态 24 h 时 Akt1 表达水平明显降低,表明癫痫持续状态发作后 Akt 蛋白在海马区的表达呈先升高后降低、发作后期再度升高的动态改变。此与以往的研究结果不尽一致,可能与 Goto 等^[13]未测量急性期各时间点 Akt1 蛋白表达变化有关,而且磷酸化蛋白质为活性蛋白,表达水平变化较快。免疫组织化学染色结果显示,Akt1 蛋白的表达部位主要位于海马 CA3 区锥体细胞胞质,CA1 和 CA2 区仅有少量表达。癫痫持续状态时海马 CA3 区 Akt1 蛋白表达水平升高并于发作后 12 h 达峰值水平,48 h 降至正常值范围;发作第 10 天时再度升高,第 30 天达峰值水平,第 50 天逐渐恢复至正常值水平,而 CA1 和 CA2 区 Akt1 蛋白表达则无明显变化。吴志国等^[16]通过氯化锂-匹罗卡品癫痫模型观察磷酸化 Akt 蛋白表达变化,其结果显示癫痫持续状态时海马 CA3 区和 CA1 区磷酸化 Akt 蛋白表达水平均上调,并于发作后 6 h 达峰值水平,第 3 天降至正常值水平。此结果亦与以往的研究不尽一致。首先,在本研究中,我们采用的是 Akt1 蛋白而非磷酸化的活性蛋白,因此其表达变化可能比较缓慢;此外,Akt 蛋白分为 Akt1、Akt2 和 Akt3 共 3 种亚型,其中 Akt1 蛋白广泛分布于各种组

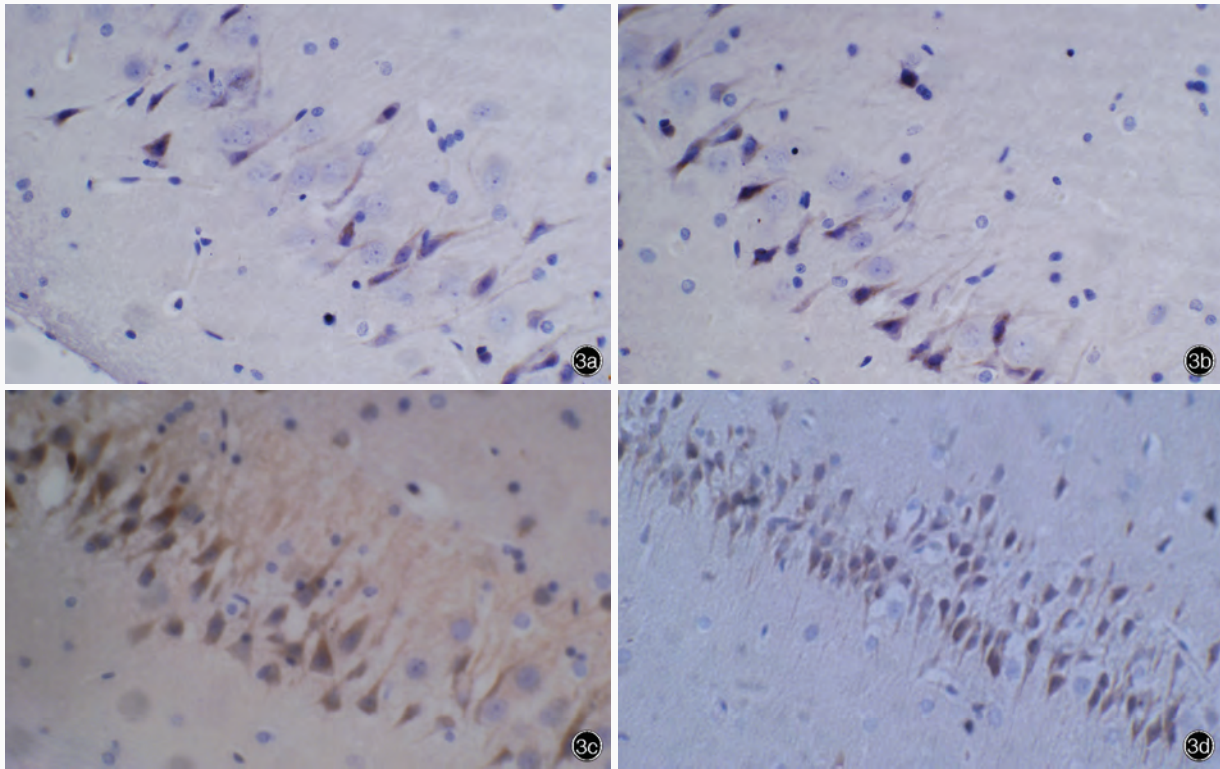


图3 光学显微镜观察显示,不同处理组大鼠各测量时间点海马CA3区Akt1蛋白表达阳性。免疫组织化学染色(SP二步法) × 200。3a 正常对照组大鼠海马CA3区仅少量表达Akt1蛋白。3b 氯化锂组大鼠海马CA3区仅少量表达Akt1蛋白。3c 癫痫持续状态后1h大鼠海马CA3区Akt1蛋白表达升高。3d 至癫痫持续状态后12h大鼠海马CA3区Akt1蛋白表达水平最高。

Figure 3 The expression levels of Akt1 protein in CA3 area in hippocampus detected in control group, LiCl group and epilepsy group under light microscope. Immunohistochemical staining (SP two-step method) × 200. Expression of Akt1 protein in CA3 area in hippocampus of control group (Panel 3a). Expression of Akt1 protein in CA3 area in hippocampus of LiCl group (Panel 3b). Higher expression of Akt1 protein in CA3 area in hippocampus at 1 h after SE (Panel 3c). The highest expression of Akt1 protein in CA3 area in hippocampus at 12 h after SE (Panel 3d).

组织中,可受多种激活剂的调节;Akt2蛋白也广泛分布于各脏器组织中,但在卵巢组织和胰腺细胞中呈密集分布;Akt3蛋白则主要存在于大脑和睾丸组织中,在细胞代谢过程中发挥不同作用。其中,Akt1蛋白主要调控细胞生长^[17-18],例如Akt基因敲除(Akt1^{-/-})小鼠表现为躯体生长缺陷^[17],酵母中的Akt同源基因S突变可延长酵母寿命^[19],鉴于此,我们选择Akt1作为检测蛋白质。在本研究中,正常对照组、氯化锂组和癫痫模型组大鼠海马CA1区仅少量表达Akt1蛋白,且3组之间差异无统计学意义,这一结果也与此前的研究不尽一致。推测可能与癫痫信号存在3条转导通路有关,即兴奋传导自海马CA3区到达CA1区时已经逐渐减弱,对海马CA1区神经元未造成损害。在病理情况下,锂盐对脑缺血、颅脑创伤、癫痫导致的神经元损伤具有一定的保护作用,可促进神经营养因子如脑源性神经营养因子(BDNF)和神经保护蛋白Bcl-2表达水平上调,

抑制糖原合成酶激酶3β(GSK-3β)活性,抑制N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)、激活Akt蛋白等^[20],其中PI3K/Akt信号转导通路是调节细胞存活的重要通路,亦是各条信号转导通路的枢纽。本研究结果显示,氯化锂组大鼠Akt1蛋白阳性神经元数目明显高于正常对照组,其神经元未受损害可能与氯化锂组大鼠于腹腔注射氯化锂之后24h方才取出脑组织有关,此时氯化锂已激活PI3K/Akt信号转导通路,导致Akt1蛋白表达水平显著升高;氯化锂组大鼠较癫痫模型组处死即刻(0h)Akt1蛋白表达水平升高,亦与癫痫发作时神经元死亡有关,故而导致Akt1蛋白表达水平降低。

在本研究中,Western blotting检测与免疫组织化学染色所得结果不尽一致。免疫组织化学染色显示,癫痫持续状态12h后海马CA3区Akt1蛋白达峰值水平,而Western blotting检测则提示Akt1蛋白于癫痫持续状态后即刻达峰值水平,这可能与免疫

表 3 不同处理组大鼠各测量时间点海马区 Akt1 蛋白阳性神经元数目的比较($\bar{x} \pm s$, 细胞计数)

Table 3. The comparison of number of Akt1 positive cells in the hippocampus among different groups ($\bar{x} \pm s$, cells)

组别	样本例数	CA3 区阳性神经元数目	CA2 区阳性神经元数目	CA1 区阳性神经元数目
正常对照组(A)	10	16.80 ± 2.80	0.20 ± 0.50	2.60 ± 0.90
氯化锂组(B)	10	24.80 ± 2.50	0.20 ± 0.50	2.20 ± 1.00
癫痫模型组				
0 h(C)	5	19.30 ± 2.60	0.20 ± 0.40	2.40 ± 1.00
1 h(D)	5	29.60 ± 2.30	0.20 ± 0.40	2.50 ± 0.90
6 h(E)	5	39.90 ± 3.10	0.20 ± 0.40	2.20 ± 1.00
12 h(F)	5	46.70 ± 2.90	0.20 ± 0.40	2.40 ± 0.90
24 h(G)	5	33.70 ± 2.10	0.20 ± 0.50	2.20 ± 1.00
48 h(H)	5	16.20 ± 2.50	0.20 ± 0.40	2.10 ± 1.00
7 d(I)	5	15.50 ± 2.30	0.20 ± 0.50	2.20 ± 1.10
10 d(J)	5	25.00 ± 2.30	0.20 ± 0.40	2.30 ± 1.00
30 d(K)	5	44.10 ± 1.80	0.20 ± 0.50	2.30 ± 1.10
50 d(L)	5	22.30 ± 2.60	0.20 ± 0.40	2.20 ± 0.90
F 值		15.564	0.083	0.647
P 值		0.005	0.986	0.904

表 4 不同处理组各测量时间点海马 CA3 区 Akt1 蛋白阳性神经元数目的多重两两比较

Table 4. The paired comparison of positive Akt1 protein expression in the hippocampus at different time in different groups

组间两两比	t 值	P 值	组间两两比	t 值	P 值
A : B	4.766	0.000	B : C	3.410	0.000
A : C	1.463	0.000	B : D	3.160	0.000
A : D	7.899	0.000	B : E	8.478	0.000
A : E	12.365	0.000	B : F	12.790	0.000
A : F	16.586	0.000	B : G	1.219	0.000
A : G	10.797	0.000	B : H	5.439	0.000
A : H	0.357	0.089	B : I	6.122	0.000
A : I	0.802	0.064	B : J	0.132	0.822
A : J	3.123	0.000	B : K	14.009	0.000
A : K	18.339	0.000	B : L	1.550	0.000
A : L	3.219	0.000			

组织化学染色结果未计入齿状回区有关。且癫痫的信号转导存在 3 条突触转导通路,可能信号首先传到齿状回,故齿状回 Akt1 蛋白变化较为显著,因此导致 Western blotting 检测出现癫痫模型组大鼠在处死即刻 Akt1 蛋白即达峰值水平;然后神经元死亡,发作 24 h 后降至最低水平。表明癫痫持续状态 24 h,神经元凋亡达高峰,然后于发作第 30 天时再次达峰值水平,与免疫组织化学染色结果相近,提

示可能存在神经网络重建。

本研究结果显示,癫痫持续状态时 Akt1 蛋白表达呈高峰状态,并于发作后期再次出现表达高峰,提示急性期 Akt1 蛋白表达水平升高可能具有抑制神经元凋亡、加强神经元保护的作用;发作后期 Akt1 蛋白表达呈代偿性升高,可能存在神经网络重建、促进神经再生机制。然而,目前对 Akt1 蛋白保护神经元的具体机制仍未阐明,随着对该蛋白作用机制和癫痫发病机制的进一步认识,可为颞叶癫痫的治疗提供新的方法^[21]。

参 考 文 献

- [1] Krsek P, Mikulecká A, Druga R, et al. An animal model of nonconvulsive status epilepticus: a contribution to clinical controversies. *Epilepsia*, 2001, 42:171-180.
- [2] Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol*, 2004, 73:1-60.
- [3] Abe E, Fujiki M, Nagai Y, et al. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates geranylgeranylacetone - induced neuroprotection against cerebral infarction in rats. *Brain Res*, 2010, 1330:151-157.
- [4] Wang HY, Wang GL, Yu YH, et al. The role of phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway in propofol-induced postconditioning against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Brain Res*, 2009, 1297:177-184.
- [5] Tokuda S, Mahaffey CL, Monks B, et al. A novel Akt3 mutation associated with enhanced kinase activity and seizure susceptibility in mice. *Hum Mol Genet*, 2011, 20:988-999.
- [6] Glien M, Brandt C, Potschka H, et al. Repeated low - dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Res*, 2001, 46: 111-119.
- [7] Sankar R, Shin DH, Liu H, et al. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long - term consequences. *J Neurosci*, 1998, 18:8382-8393.
- [8] Xue Y, Xie N, Lin Y, et al. Role of PI3K/Akt in diazoxide preconditioning against rat hippocampal neuronal death in pilocarpine-induced seizures. *Brain Res*, 2011, 1383:135-140.
- [9] Fujiki M, Abe E, Nagai Y, et al. Electroconvulsive seizure - induced VEGF is correlated with neuroprotective effects against cerebral infarction: involvement of the phosphatidylinositol - 3 kinase/Akt pathway. *Exp Neurol*, 2010, 225:377-383.
- [10] Martelli AM, Faenza I, Billi AM, et al. Intracellular 3' - phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? *Cell Signal*, 2006, 18:1101-1107.
- [11] Sale EM, Hodgkinson CP, Jones NP, et al. A new strategy for studying protein kinase B and its three isoforms: role of protein kinase B in phosphorylating glycogen synthase kinase - 3, tuberlin, WNK1, and ATP citrate lyase. *Biochemistry*, 2006, 45: 213-223.
- [12] Lopes MW, Soares FM, de Mello N, et al. Time - dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Res*, 2012, 37:1868-1878.
- [13] Goto EM, Silva Mde P, Perosa SR, et al. Akt pathway activation and increased neuropeptide Y mRNA expression in the rat

hippocampus: implications for seizure blockade. *Neuropeptides*, 2010, 44:169-176.

[14] Piermartiri TC, Vandresen-Filho S, de Araújo Herculano B, et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res*, 2009, 16: 106-115.

[15] Wine RN, McPherson CA, Harry GJ. IGF-1 and pAKT signaling promote hippocampal CA1 neuronal survival following injury to dentate granule cells. *Neurotox Res*, 2009, 16:280-292.

[16] Wu ZG, Bi FF, Huang ZL, et al. Study of the expression of Akt-protein in hippocampus of rats with temporal lobe epilepsy. *Zhongguo Yi Xue Gong Cheng*, 2007, 15:338-340.[吴志国, 毕方方, 黄志凌, 等. 颞叶癫痫大鼠海马 Akt 蛋白表达变化的研究. *中国医学工程*, 2007, 15:338-340.]

[17] Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, et al. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*, 2001, 276:38349-38352.

[18] Bae SS, Cho H, Mu J, et al. Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *J Biol Chem*, 2003, 278:49530-49536.

[19] Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, et al. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 2001, 292:288-290.

[20] Mei L, Qian YN. Research progress in neuroprotective effects of chronic lithium on cerebral ischemia. *Guo Wai Yi Xue Ma Zui Xue Yu Fu Su Fen Ce*, 2005, 26:25-29.[梅莉, 钱燕宁. 锂对脑缺血损伤后神经细胞保护的研究进展. *国外医学·麻醉学与复苏分册*, 2005, 26:25-29.]

[21] Zhang LN, Wu SJ, Tao HY, et al. The effects of low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on the rat model of refractory epilepsy and expression of brain-derived neurotrophic factor and neuropeptide Y. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2011, 11:428-433.[张丽娜, 武士京, 陶华英, 等. 低频重复经颅磁刺激治疗难治性癫痫大鼠模型及对脑源性神经营养因子和神经肽 Y 表达的影响. *中国现代神经疾病杂志*, 2011, 11:428-433.]

(收稿日期:2012-09-07)

· 临床医学图像 ·

促纤维增生性婴儿星形细胞瘤/神经节胶质细胞瘤

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.05.027

Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma

YAN Xiao-ling

Department of Pathology, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China (Email: ll934065@126.com)

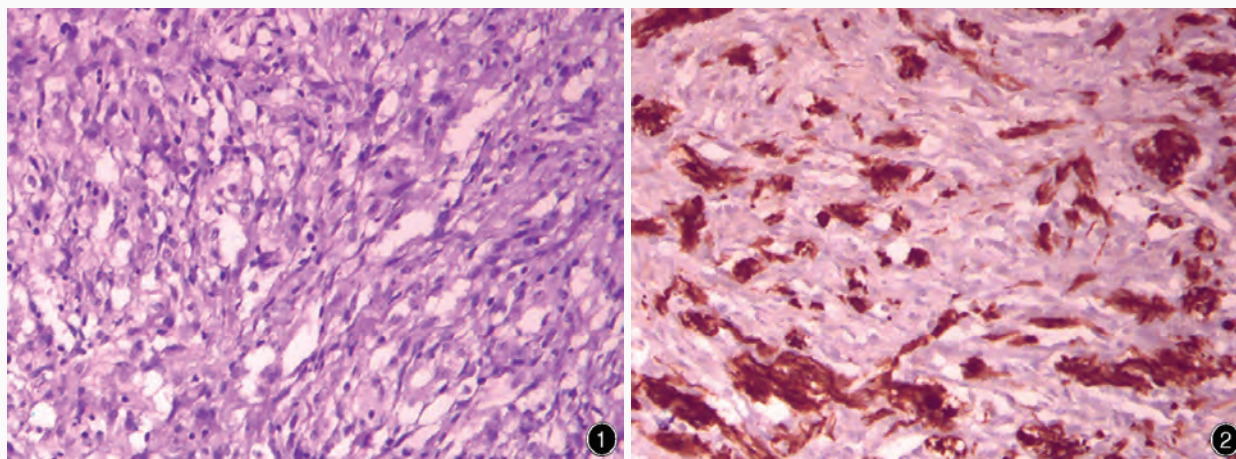


图1 光学显微镜观察,梭形的肿瘤细胞排列呈疏松的束状或席纹状 HE 染色 低倍放大 图2 光学显微镜观察肿瘤组织的促纤维增生区域可见丰富的胶质纤维酸性蛋白表达阳性的星形胶质细胞 免疫组织化学染色(EnVision 二步法) 低倍放大

Figure 1 Light microscopy findings. Spindled cells arrayed in loose fascicular or storiform HE staining low power magnified
Figure 2 Desmoplastic region of tumor tissue is rich in elongate GFAP-positive glial cells Immunohistochemical staining (EnVision) low power magnified

促纤维增生性婴儿星形细胞瘤/神经节胶质细胞瘤(DIA/DIG)为临床罕见的低级别神经上皮来源肿瘤(WHO I级),好发于幕上,大多于2岁前发病。其组织病理学特征表现为:光学显微镜下可见软脑膜纤维组织增生,以及分化较差的神经上皮成分和皮质成分;大多数病例肿瘤组织中以富含胶原和网织纤维的纤维增生区为主要成分,梭形细胞排列呈疏松的束状和(或)席纹状(图1),这些梭形细胞中有一大部分为胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组织化学染色阳性的星形胶质细胞(图2)。

(天津市环湖医院病理科阎晓玲供稿)