

· 基础研究 ·

姜黄素对癫痫持续状态致大鼠海马神经元
程序化死亡的影响*黄志凌¹ 肖波¹ 谭利明² 李蜀俞¹ 王康¹ 邹婷²

摘要 目的:探讨姜黄素对大鼠癫痫持续状态(SE)后海马神经元程序化死亡的影响。方法:SD 大鼠 90 只随机均分入癫痫组、姜黄素治疗组和对照组。建立氯化锂-匹罗卡品大鼠 SE 模型。应用 DNA 片段原位末端标记技术(TUNEL)观察 SE 后 2h、4h、6h、24h、72h 海马 CA1 区和 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数的动态变化。结果:对照组未见 TUNEL 阳性细胞。TUNEL 阳性细胞主要分布在 CA1 区和 CA3 区。SE 组 TUNEL 阳性细胞数在 SE 后 6h 开始增加($P<0.01$), 24h 达高峰, 72h 较 24h 下降, 姜黄素治疗组与 SE 组 TUNEL 阳性细胞数的动态变化趋势类似, 但姜黄素治疗组 SE 后 6h、24h、72h 的阳性细胞数显著减少($P<0.01$)。结论:姜黄素能防治 SE 后海马神经元程序化死亡。

关键词 癫痫持续状态;姜黄素;程序化细胞死亡;海马

中图分类号:R493.R742.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-07-0590-03

The influence of curcumin on the programme cell death in rat hippocampus after status epilepticus/HUANG Zhiling, XIAO Bo, TAN Liming, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(7):590—592

Abstract Objective:To investigate the influence of curcumin on the programme cell death in rat hippocampus after status epilepticus(SE). **Method:**90 Sprague-Dawley(SD) rats were randomly enrolled into the control group($n=30$), SE group ($n=30$) or curcumin treated group. The lithium-pilocarpine induced SE was used as the SE model. The programme death cells in CA1 and CA3 were detected dynamically by TUNEL. **Result:**No TUNEL positive cell was observed in the control group. The number of TUNEL positive cells, presenting mainly in CA1 and CA3, increased 6 hours after SE($P<0.01$) and reached a peak 24 hours after SE, then got a little degression($P<0.01$) for both SE group and curcumin treated group. However, the numbers of TUNEL positive cells in curcumin treated group were notably fewer than those in SE group at the time point of 6h, 24h, 72h after SE, respectively ($P<0.01$). **Conclusion:** The curcumin can prevent hippocampal neurons from programme cell death after SE.

Author's address Dept. of Neurology, Xiangya Hospital, Centralsouth University, Changsha, 410008

Key words status epilepticus; curcumin; programme cell death; hippocampus

癫痫持续状态(status epilepticus, SE)是神经科常见的急症之一,可造成海马等结构的神经元选择性死亡。大量研究表明,选择性神经元死亡既能促进癫痫的形成和进展^[1],又能导致智能和精神障碍^[2];程序化细胞死亡是神经元丢失的重要形式^[3]。因此,防治 SE 后神经元程序化细胞死亡具有重要意义。姜黄素(curcumin, $C_{21}H_{20}O_6$)是从姜黄中提取的一种酚类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡作用、增加内质网钙水平等多种作用,已广泛应用于保护肝肾功能、防癌抗癌等方面的研究^[4-7],但在癫痫防治研究中尚未见姜黄素的应用报道。本研究旨在建立氯化锂-匹罗卡品(LiCl-Pilo)大鼠 SE 模型,首次探讨了姜黄素对 SE 后海马神经元程序化死亡的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

清洁级健康雄性成年 Sprague-Dawley(SD)大鼠

由湘雅医学院动物学部提供,体重 250 ± 20 g,共 90 只,在室温 $18-25^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50%—60%、人工 12h 昼/夜循环照明环境中用全价营养饲养分笼饲养,大鼠能自由摄食及饮水。用随机数字表法将大鼠随机均分入癫痫组(SE 组)、姜黄素治疗组和对照组,每组 30 只。再随机均分为 5 个亚组:SE 后 2h、4h、6h、24h、72h,每亚组 6 只。姜黄素治疗组:动物腹腔注射(i.p.)LiCl(125mg/kg),18—20h 后予溴化甲基阿托品(1mg/kg, i.p.),30min 后予 Pilo(25mg/kg, i.p.)。进行行为学观察,痫性发作程度按 Racine 制订的标准进行分级^[8],达到 III—V 级、进入 SE 的动物,归于

* 基金项目:教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划(2001-182);博士点基金(20030533042)

1 中南大学湘雅医院神经内科,长沙,410008

现工作单位:中南大学湘雅二医院神经内科

2 中南大学湘雅二医院神经内科

作者简介:黄志凌,男,博士,主治医师

收稿日期:2005-10-24

SE 模型成功组, SE 达 15min 时予二甲基亚砜(DMSO)溶解的姜黄素(300mg/kg, i.p. Chayman 公司产品)。SE 组: SE 达 15min 时予相同体积 DMSO 替代姜黄素溶液行腹腔注射, 其他处理同姜黄素治疗组。对照组: 用生理盐水替代 Pilo, 其他处理同 SE 组。除对照组动物外, 未进入 SE 和 SE 持续时间不到 1h 的不纳入本研究。SE 持续 1h 时予 10% 水合氯醛(3ml/kg, i.p.) 终止发作, 观察 6h 确保痫性发作彻底终止。每天观察动物行为活动, 观察时间为 8AM—8PM。分别于 SE 后各时间点, 用 10% 水合氯醛(3ml/kg, i.p.) 麻醉后迅速断头取脑、-70℃ 冰箱保存备用。

1.2 TUNEL 染色

细胞程序化死亡(凋亡)过程中总伴随着内源性核酸内切酶激活, 介导染色质断裂。TdT 介导的 dUTP 末端标记(TUNEL)技术是在光镜下检测程序化死亡细胞的重要方法, 其原理如下: TdT 是一种 DNA 修饰酶, 可催化 DNA 片段的 3'-OH 末端合成多核苷酸聚合物, 在 DNA 片段上加尾。在此过程中, 带有地高辛、生物素或荧光素等标记物的单核苷酸, 可被掺入到加尾聚合物中, 实现对 DNA 断裂缺口的标记。TUNEL 方法的特异性和灵敏度很高, 在细胞程序化死亡的早期阶段, 用此法可原位显示程序化死亡细胞及其分布。本研究应用的原位凋亡检测试剂盒 TA4625(TdT in situ apoptosis detection kit-DAB)为 R&D systems 产品, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。简要步骤如下: ①于各分析时点(SE 发作后 2h, 4h, 6h, 24h 和 72h 共 5 个时点), 麻醉大鼠后迅速断头取脑, 液氮冻存。用冰冻切片机经前联合处冠状切片(-18℃), 片厚 15μm, 贴于多聚赖氨酸处理过的洁净载玻片上, 30℃ 干燥 2h。每鼠取相邻切片 3—4 张作为 TUNEL 标记。②固定: 入新鲜配置 3.7% 甲醛中室温 10min, 0.01M PBS 洗 5min×2 次。③透化样本: 蛋白酶 K 孵育, 37℃, 15min, 双蒸水(dH₂O)洗 2min×2 次。④灭活内源性过氧化物酶: 浸入 3% H₂O₂ 甲醇溶液 2min, 迅速放入 0.01M PBS 中 1min, 再浸泡在 1×TdT 标记缓冲液中孵育 5min。⑤TdT 标记 Biotin-dNTP(含 Mn²⁺): 37℃ 孵育 75min。⑥终止标记反应: 1×TdT 终止液室温孵育 5min, 0.01M PBS 洗 2min×2 次。⑦Streptavidin-HRP 溶液, 室温孵育 10min, 0.01M PBS 洗 5min×2 次。⑧DAB 显色

5min, dH₂O 洗 5s。⑨甲基绿溶液室温复染 2min。⑩脱水, 透明, 中性树脂封片。TUNEL 阳性细胞即程序化死亡细胞, 于 TUNEL 染色后细胞核呈棕色或棕褐色。同时依据试剂盒说明做 TUNEL 染色对照试验: 阴性对照采用的 TdT 标记反应混合物中不加 TdT(即 DNA 修饰酶), 应无阳性细胞; 阳性对照在灭活内源性过氧化物酶前用可使 DNA 断裂的 TACS-Nuclease 处理切片, 应全为阳性细胞。阳性细胞评定及计数遵循双盲原则。光镜下观察脑切片 TUNEL 染色情况, 并计数连续 3 张脑切片整个 CA3 和 CA1 区 TUNEL 阳性细胞, 取其平均数。

1.3 统计学分析

数据以均数±标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验, 组内多个样本均数比较用单因素方差分析, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。用 SPSS10.0 软件对所有数据进行统计分析。

2 结果

2.1 动物模型

动物腹腔注射 LiCl 后, 其行为活动无改变; 予以 Pilo 25mg/kg 腹腔注射后 28.4±10.1min 后可引起 SE。致病动物达到 Racine III—V 级均迅速进入 SE, 4 只达 Racine I—II 级不发展为 SE, 1—2h 后活动基本恢复正常, SE 诱发成功率为 93.3%。姜黄素治疗组有 4 只 SE 持续时间未达到 1h。SE 1h 后, 用水合氯醛均能终止发作。SE 组有 2 只动物 24h 后行为活动迟钝, 不能主动进食进水, 衰竭死亡。LiCl-Pilo 致病动物模型的总死亡率为 3.3%。生理盐水对照组未出现痫性发作及 SE。若因模型不成功、死亡等原因造成各亚组样本量不足 6 只的, 按随机原则补足。

2.2 TUNEL 法染色

TUNEL 法染色的对照试验结果良好, 保证了本实验染色结果的可靠性。对照组: 未见 TUNEL 阳性细胞。实验组阳性细胞主要分布在 CA1 区和 CA3 区。SE 组 TUNEL 阳性细胞数在 SE 后 6h 开始增加($P<0.01$), 24h 达高峰, 72h 较 24h 下降, 姜黄素治疗组与 SE 组阳性细胞数的动态变化趋势类似, 但 SE 后 6h、24h、72h 姜黄素治疗组的阳性细胞数显著减少($P<0.01$)(表 1)。

表 1 大鼠 SE 后不同时间海马 CA1 区及 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数目比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CA1 区					CA3 区				
		2h	4h	6h	24h	72h	2h	4h	6h	24h	72h
癫痫组	6	0±0	6±2	25±4	80±6	56±5	0±0	8±2	25±4	76±6	60±6
姜黄素治疗组	6	0±0	4±2	8±3 ^①	20±4 ^①	16±3 ^①	0±0	2±2	15±3 ^①	38±4 ^①	22±4 ^①

①与癫痫组比较 $P<0.01$ 。

3 讨论

姜黄素是从姜黄中提取出的一种植物多酚。虽然毒性很低, 耐受性良好, 但生物利用度不高, 血药浓度低。Pan 等^[9]报道, 小鼠腹腔注射 100mg/kg 姜黄素, 1h 时后脑中仅有极少量(0.41 μ g/g)。Thiyagarajan 等^[7]运用大鼠脑局部缺血模型, 发现姜黄素对中枢神经系统的作用具有浓度依赖性, 200—300mg/kg(i.p.) 才能在脑内发挥抗氧化和神经元保护作用。当血脑屏障破坏后, 姜黄素在相应部位的分布将会增多。

SE 导致细胞死亡包括坏死, 凋亡和不易区分的混合形态 3 种类型, 其中以坏死形态为主, 即使是 TUNEL 阳性细胞也常表现为此形态, 具有典型凋亡形态的细胞仅 10% 左右, 因此有学者主张, SE 后带有凋亡标志的细胞不宜统称为凋亡细胞, 称为程序性死亡细胞更为合适^[10]。本研究初步发现, 姜黄素(300mg/kgi.p.) 能有效防治 SE 后海马神经元程序化死亡, 但其具体机制有待进一步研究, 我们推测可能与姜黄素的多种药理作用有关。①姜黄素及其代谢产物均具有抗氧化活性^[4]。在脑缺血再灌注损伤的研究中观察到, 姜黄素可以降低黄嘌呤活性和丙二醛水平, 减少超氧阴离子数量, 显著减少脑梗死体积, 具有很好的神经元保护活性^[7]。鉴于氧应激是痫性发作损害神经元、致神经元凋亡的重要机制^[11], 这可能是姜黄素抗 SE 后神经元程序化死亡的重要途径。②姜黄素可以抑制内质网 InsP3 受体介导的钙释放, 增加内质网钙摄取和贮备^[5-6]。已有证据表明, 癫痫动物模型和海马神经元培养癫痫模型中都存在内质网钙摄取抑制和钙释放增强, 内质网钙储备减少。且内质网钙丢失与模型中神经元程序性死亡有关^[12-14], 故可推测姜黄素可能通过增加内质网钙贮备而减少细胞程序性死亡。③c-Jun 氨基端激酶/活化蛋白-1(JNK/AP-1)是介导凋亡的途径之一, 参与了癫痫所致神经元丢失^[3]。姜黄素能抑制 c-Jun 氨基端激酶/活化蛋白-1(JNK/AP-1)途经活化^[15], 这可能是姜黄素抗神经元程序性死亡的又一途径。

参考文献

- [1] Sutula TP, Hagen J, Pitkanen A. Do epileptic seizures damage the brain[J]? Curr Opin Neurol, 2003, 16: 189—195.
- [2] Hesdorffer DC, Logroscino G, Cascino G, et al. Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status

- epilepticus [J]. Ann Neurol, 1998, 44: 908—912.
- [3] Liou AK, Clark RS, Henshall DC, et al. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways [J]. Prog Neurobiol, 2003, 69: 103—142.
- [4] Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. Biological properties of curcumin—cellular and molecular mechanisms of action [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2004, 44: 97—111.
- [5] Bilmen JG, Khan SZ, Javed MH, et al. Inhibition of the SERCA Ca^{2+} pumps by curcumin. Curcumin putatively stabilizes the interaction between the nucleotide-binding and phosphorylation domains in the absence of ATP [J]. Eur J Biochem, 2001, 268: 6318—6327.
- [6] Dyer JL, Khan SZ, Bilmen JG, et al. Curcumin: a new cell-permeant inhibitor of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor [J]. Cell Calcium, 2002, 31: 45—52.
- [7] Thiyagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats [J]. Life Sci, 2004, 74: 969—985.
- [8] Racine RJ, Steingart M, McIntyre DC. Development of kindling prone and kindling resistant rats: selective breeding and electrophysiological studies [J]. Epilepsy Res, 1999, 35: 183.
- [9] Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice [J]. Drug Metab Dispos, 1999, 27: 486—494.
- [10] Mikati MA, Bi-Habib RJ, El Sabban ME, et al. Hippocampal programmed cell death after status epilepticus: evidence for NMDA-receptor and ceramide-mediated mechanisms [J]. Epilepsia, 2003, 44: 282—291.
- [11] Patel MN. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and epilepsy [J]. Free Radic Res, 2002, 36: 1139—1146.
- [12] Parsons JT, Churn SB, DeLorenzo RJ. Chronic inhibition of cortex microsomal $Mg(2+)/Ca(2+)$ ATPase-mediated $Ca(2+)$ uptake in the rat pilocarpine model following epileptogenesis [J]. J Neurochem, 2001, 79: 319—327.
- [13] Pal S, Sun D, Limbrick D, et al. Epileptogenesis induces long-term alterations in intracellular calcium release and sequestration mechanisms in the hippocampal neuronal culture model of epilepsy [J]. Cell Calcium, 2001, 30: 285—296.
- [14] Pelletier MR, Wadia JS, Mills LR, et al. Seizure-induced cell death produced by repeated tetanic stimulation in vitro: possible role of endoplasmic reticulum calcium stores [J]. J Neurophysiol, 1999, 81: 3054—3064.
- [15] Cho JW, Park K, Kweon GR, et al. Curcumin inhibits the expression of COX-2 in UVB-irradiated human keratinocytes (HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets [J]. Exp Mol Med, 2005, 37 (3): 186—192.