

·基础研究·

当归多糖减轻癫痫幼鼠海马组织炎症及凋亡的作用及机制

陈治江, 樊启红

作者单位
长江大学附属第一
医院儿科
湖北 荆州 434000
收稿日期
2020-12-16
通讯作者
樊启红
1187286305@qq.
com

摘要 **目的:**研究当归多糖(APS)减轻癫痫幼鼠海马组织炎症及凋亡的作用及机制。**方法:**3周龄的雄性SD幼鼠随机分为对照组、模型组、模型+APS组、模型+APS+脂多糖(LPS)组。采用戊四氮点燃的方法建立癫痫模型,给予APS或APS+LPS腹腔注射干预;采用脑电图检测脑电频率及波幅,采用TUNEL染色检测海马组织细胞凋亡率,采用Elisa法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、高迁移率族蛋白B1(HMGB1)的含量,采用Western Blot检测cleaved caspase-3、bax、bcl-2、TLR4、NF- κ B的表达水平。**结果:**与对照组比较,模型组脑电频率及海马组织中bcl-2的表达水平显著降低,脑电波幅、血清中TNF- α 、IL-1 β 、HMGB1的含量、海马组织的细胞凋亡率及TNF- α 、IL-1 β 、HMGB1的含量、cleaved caspase-3、bax、TLR4、NF- κ B的表达水平显著增加;与模型组比较,模型+APS组脑电频率及海马组织中bcl-2的表达水平显著增加,脑电波幅、血清中TNF- α 、IL-1 β 、HMGB1的含量、海马组织的细胞凋亡率及TNF- α 、IL-1 β 、HMGB1的含量、cleaved caspase-3、bax、TLR4、NF- κ B的表达水平显著降低;与模型+APS组比较,模型+APS+LPS组比较,脑电频率及海马组织中bcl-2的表达水平显著降低,脑电波幅、血清中TNF- α 、IL-1 β 、HMGB1含量、海马组织细胞凋亡率及TNF- α 、IL-1 β 、HMGB1含量、cleaved caspase-3、bax、TLR4、NF- κ B的表达水平显著增加。**结论:**APS能减轻癫痫幼鼠海马组织的炎症及凋亡,作用可能与抑制TLR4/NF- κ B信号通路有关。

关键词 癫痫;当归多糖;炎症反应;细胞凋亡;TLR4/NF- κ B信号通路

中图分类号 R741;R741.02;R742.1 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20201212

本文引用格式:陈治江, 樊启红. 当归多糖减轻癫痫幼鼠海马组织炎症及凋亡的作用及机制[J]. 神经损伤与功能重建, 2021, 16(4): 222-224.

癫痫是儿科常见的神经系统疾病,以脑部神经元高度同步化异常放电为特征,伴有学习记忆等神经功能损害。海马是调控学习记忆功能的重要脑区,癫痫发病过程中海马组织炎症反应的激活与学习记忆功能的损害密切相关^[1,2]。研究显示,Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)/核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路的激活与癫痫发病过程中海马组织炎症反应的激活密切相关,该通路激活后造成肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、高迁移率族蛋白B1(high mobility cluster protein B1, HMGB1)大量释放,引起海马组织炎症反应和细胞凋亡发生,造成海马神经元损伤^[3]。

当归多糖(angelica polysaccharides, APS)是中药材当归中的活性成分之一,有抗炎、抗凋亡、抗氧化作用。APS能够减轻糖尿病周围神经病变大鼠的周围神经损伤并抑制TLR4/NF- κ B通路的激活^[4,5]。但APS对癫痫是否有疗效及其可能的机制尚不清楚。本研究即以癫痫幼鼠为实验对象,探究APS对癫痫的治疗作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物 3周龄的雄性SD幼鼠购自北京维通利华实验动物技术公司,生产许可证号:SCXK(京)2018-0001。

1.1.2 主要试剂 戊四氮购自上海翊圣生物科技有限公司;APS购自上海联硕宝为生物科技公司;TLR4/NF- κ B信号通路激动剂脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自Sigma公司;HE染色试剂盒、TUNEL凋亡检测试剂盒为上海碧云天公司;TNF- α 、IL-1 β 、HMGB1的酶联免疫吸附法(Elisa)检测试剂盒购自上海酶联公司;cleaved caspase-3、bax、bcl-2、TLR4、NF- κ B、 β -actin一抗购自Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药 SD幼鼠随机分为对照组、模型组、模型+APS组、模型+APS+LPS组,每组各8只。除对照组之外的3组均采用戊四氮点燃建立癫痫模型:单次腹腔注射戊四氮60 mg/kg,参照Racine分级标准,癫痫发作 $\geq$ 4级且持续30 min以上认为造模成功,对于发作时间超过120 min的幼鼠给予10%水合氯醛0.3 mL/kg腹腔注射以阻止癫痫发作;对照组给予等剂量生理盐水单次腹腔注射。造模成功后,模型+APS组给予200 mg/kg APS腹腔注射,1次/d,连续3 d,模型+APS+LPS组给予200 mg/kg APS及0.1 mg/kg LPS腹腔注射,1次/d,连续3 d;对照组、模型组给予等剂量生理盐水腹腔注射,1次/d,连续3 d。

1.2.2 脑电图检测 末次给药后24 h进行脑电图检测,采用RM6240型多通道生理信号采集处理系统记录脑电图波形并计算脑电频率及波幅。

1.2.3 血清及海马组织中细胞因子的检测 各组

完成脑电图检测后取4只幼鼠,经右心室取血,离心收集血清,采用Elisa试剂盒检测TNF- α 、IL-1 β 、HMGB-1的含量;而后处死幼鼠,分离右侧海马组织适量,加入生理盐水制成质量体积比为10%的匀浆液,采用Elisa试剂盒检测TNF- α 、IL-1 β 、HMGB-1的含量。

1.2.4 海马组织中蛋白表达的检测 各组完成脑电图检测后取4只幼鼠,取右侧海马组织适量,常规法行Western Blot检测cleaved caspase-3、bax、bcl-2、TLR4、NF- κ B的表达水平。

1.2.5 海马组织细胞凋亡率的检测 各组完成脑电图检测后取8只幼鼠,取左侧海马组织做冰冻切片,片厚10 μ m,采用TUNEL凋亡检测试剂盒检测凋亡细胞。细胞凋亡率%=TUNEL阳性染色细胞数/DAPI阳性染色细胞数 $\times$ 100%。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用方差分析;组间两两比较采用SNK-q检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组幼鼠脑电图参数的比较

与对照组比较,模型组幼鼠脑电频率显著降低($P<0.05$),波幅显著增加($P<0.05$);与模型组比较,模型+APS组幼鼠脑电频率显著增加($P<0.05$),波幅显著降低($P<0.05$);与模型+APS组比较,模型+APS+LPS组幼鼠脑电频率显著降低($P<0.05$),波幅显著升高($P<0.05$),见表1。

2.2 各组血清炎症细胞因子含量的比较

表1 各组幼鼠脑电频率及波幅的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	脑电频率/(次/s)	脑电波幅/mV
对照组	8	13.58 $\pm$ 2.62	60.89 $\pm$ 11.38
模型组	8	4.82 $\pm$ 0.89 ^①	414.58 $\pm$ 88.39 ^①
模型+APS组	8	10.47 $\pm$ 2.44 ^{①②}	104.57 $\pm$ 21.35 ^{①②}
模型+APS+LSP组	8	5.01 $\pm$ 0.94 ^{①③}	409.33 $\pm$ 91.37 ^{①③}

注:与对照组比较,^① $P<0.05$;与模型组比较,^② $P<0.05$;与模型+APS组比较,^③ $P<0.05$

与对照组比较,模型组血清TNF- α 、IL-1 β 和HMGB-1的含量显著增加($P<0.05$);与模型组比较,模型+APS组血清TNF- α 、IL-1 β 和HMGB-1的含量显著降低($P<0.05$);与模型+APS组比较,模型+APS+LPS组幼鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 和HMGB-1的含量显著升高($P<0.05$),见表2。

2.3 各组海马组织中炎症细胞因子含量的比较

与对照组比较,模型组幼鼠海马组织中TNF- α 、IL-1 β 和HMGB-1的含量显著增加($P<0.05$);与模型组比较,模型+APS组幼鼠海马组织中TNF- α 、IL-1 β 和HMGB-1的含量显著降低($P<0.05$);与模型+APS组比较,模型+APS+LPS组幼鼠海马组织中TNF- α 、IL-1 β 和HMGB-1的含量显著升高($P<0.05$),见表3。

2.4 各组海马组织细胞凋亡率的比较

与对照组比较,模型组海马组织细胞凋亡率显著增加($P<0.05$);与模型组比较,模型+APS组幼鼠海马组织的细胞凋亡率显著降低($P<0.05$);与模型+APS组比较,模型+APS+LPS组幼

鼠海马组织的细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),见表4。

2.5 各组海马组织中凋亡基因及信号通路蛋白表达的比较

与对照组比较,模型组海马组织的Cleaved caspase-3、Bax、TLR4和NF- κ B的表达水平显著增加,Bcl-2的表达水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,模型+APS组幼鼠海马组织中Cleaved caspase-3、Bax、TLR4和NF- κ B的表达水平显著降低,Bcl-2的表达水平显著增加($P<0.05$);与模型+APS组比较,模型+APS+LPS组幼鼠海马组织中Cleaved caspase-3、Bax、TLR4和NF- κ B的表达水平显著升高,Bcl-2的表达水平显著降低($P<0.05$),见表5。

表2 各组血清TNF- α 、IL-1 β 和HMGB-1含量比较(ng/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	TNF- α
对照组	4	32.58 $\pm$ 8.79
模型组	4	114.72 $\pm$ 21.34 ^①
模型+APS组	4	45.47 $\pm$ 9.34 ^{①②}
模型+APS+LPS组	4	124.58 $\pm$ 24.29 ^{①③}

组别	IL-1 β	HMGB-1
对照组	3.11 $\pm$ 0.75	13.48 $\pm$ 2.95
模型组	22.75 $\pm$ 5.62 ^①	85.69 $\pm$ 14.86 ^①
模型+APS组	4.48 $\pm$ 0.94 ^{①②}	22.67 $\pm$ 4.55 ^{①②}
模型+APS+LPS组	24.11 $\pm$ 6.21 ^{①③}	101.57 $\pm$ 21.57 ^{①③}

注:与对照组比较,^① $P<0.05$;与模型组比较,^② $P<0.05$;与模型+APS组比较,^③ $P<0.05$

表3 各组幼鼠海马组织中TNF- α 、IL-1 β 、HMGB-1含量的比较(ng/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	TNF- α
对照组	4	83.48 $\pm$ 16.68
模型组	4	276.63 $\pm$ 51.34 ^①
模型+APS组	4	115.62 $\pm$ 22.69 ^{①②}
模型+APS+LPS组	4	294.76 $\pm$ 62.38 ^{①③}

组别	IL-1 β	HMGB-1
对照组	30.58 $\pm$ 8.78	47.68 $\pm$ 9.24
模型组	145.37 $\pm$ 26.52 ^①	189.49 $\pm$ 31.45 ^①
模型+APS组	45.56 $\pm$ 9.14 ^{①②}	62.47 $\pm$ 10.49 ^{①②}
模型+APS+LPS组	160.49 $\pm$ 31.44 ^{①③}	203.47 $\pm$ 37.68 ^{①③}

注:与对照组比较,^① $P<0.05$;与模型组比较,^② $P<0.05$;与模型+APS组比较,^③ $P<0.05$

表4 各组海马组织细胞凋亡率的比较(% , $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	细胞凋亡率
对照组	8	0
模型组	8	26.59 $\pm$ 5.48 ^①
模型+APS组	8	5.48 $\pm$ 0.95 ^{①②}
模型+APS+LPS组	8	28.17 $\pm$ 7.67 ^{①③}

注:与对照组比较,^① $P<0.05$;与模型组比较,^② $P<0.05$;与模型+APS组比较,^③ $P<0.05$

3 讨论

癫痫发作时,大脑神经元同步异常放电,造成神经元损

表5 各组海马组织中凋亡基因及信号通路蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	Bcl-2	Bax	Cleaved caspase-3	TLR4	NF-κB
对照组	4	0.72±0.15	0.16±0.03	0.14±0.03	0.34±0.09	0.32±0.08
模型组	4	0.35±0.07 ^①	0.89±0.17 ^①	0.84±0.18 ^①	0.94±0.18 ^①	0.91±0.20 ^①
模型+APS组	4	0.75±0.17 ^{①②}	0.39±0.08 ^{①②}	0.33±0.09 ^{①②}	0.20±0.06 ^{①②}	0.23±0.07 ^{①②}
模型+APS+LPS组	4	0.21±0.07 ^{①③}	0.94±0.18 ^{①③}	0.95±0.19 ^{①③}	0.88±0.17 ^{①③}	0.81±0.19 ^{①③}

注:与对照组比较,^① $P<0.05$;与模型组比较,^② $P<0.05$;与模型+APS组比较,^③ $P<0.05$

害。海马是受损的主要部位之一,表现为海马组织炎症反应、细胞凋亡异常激活、海马神经元丢失,进而造成学习记忆功能下降等神经功能损害的临床表现^[6,7]。减轻海马炎症及神经元凋亡在小儿癫痫的治疗中具有重要意义。

APS是中药材当归中提取得到的活性成分,有抗炎、抗凋亡、抗氧化作用,对脑缺血再灌注损伤、阿尔茨海默病等,有一定的辅助治疗效果^[8-10]。本研究创新性地将APS用于癫痫治疗,以SD幼鼠为实验对象、通过戊四氮点燃的方法^[11,12]建立癫痫模型后观察到脑电频率显著降低、波幅显著增加,表明癫痫造模成功;癫痫造模后给予APS腹腔注射干预,脑电频率显著增加、波幅显著降低,表明APS缓解了癫痫幼鼠的脑部异常放电。

海马组织炎症反应及细胞凋亡的过度激活是小儿癫痫的重要特征,APS的神经保护作用与其抗炎和抗凋亡作用有关。在海马组织炎症反应的激活中,TNF-α、IL-1β、HMGB-1是起重要作用的细胞因子,能够介导炎症反应级联放大^[13,14];在海马组织细胞凋亡的激活中,线粒体途径凋亡起重要作用,该途径的bcl-2具有抗凋亡作用,bax具有促凋亡作用,最终通过调控cleaved caspase-3的表达来影响细胞凋亡^[15,16]。本研究在癫痫模型幼鼠的海马组织中观察到TNF-α、IL-1β、HMGB-1的含量及细胞凋亡率、bax及cleaved caspase-3的表达水平增加,bcl-2的表达水平降低,表明癫痫幼鼠出现了海马组织的炎症反应及细胞凋亡过度激活。在癫痫造模后给予APS干预,海马组织中TNF-α、IL-1β、HMGB-1的含量及细胞凋亡率、bax及cleaved caspase-3的表达水平降低,bcl-2的表达水平增加,表明APS对癫痫幼鼠海马组织的炎症反应和细胞凋亡具有抑制作用,与APS改善癫痫幼鼠脑部异常放电、减轻癫痫幼鼠海马组织病理改变的作用吻合。

多项研究证实癫痫发病过程中海马组织中TLR4/NF-κB信号通路过度激活^[3,17]。本研究在使用APS治疗癫痫幼鼠后观察到海马组织中TLR4、NF-κB的表达水平降低,提示APS对癫痫发病过程中海马组织TLR4/NF-κB通路的激活具有抑制作用。加用了该信号通路的激动剂LPS(联合使用APS和LPS)后,海马的炎症反应及细胞凋亡均加重,提示TLR4/NF-κB通路可能参与了APS对癫痫幼鼠海马组织炎症反应及细胞凋亡的改善作用。

综上所述,APS能够减轻癫痫幼鼠海马组织的炎症反应,减少海马细胞凋亡,这一作用可能与TLR4/NF-κB信号通路有关。

参考文献

[1] Serratto GM, Pizzi E, Murru L, et al. The Epilepsy-Related Protein PCDH19 Regulates Tonic Inhibition, GABA(A)R Kinetics, and the

Intrinsic Excitability of Hippocampal Neurons[J]. Mol Neurobiol, 2020, 57: 5336-5351.
[2] Kloc ML, Velasquez F, Niedecker RW, et al. Disruption of hippocampal rhythms via optogenetic stimulation during the critical period for memory development impairs spatial cognition[J]. Brain Stimul, 2020, 13: 1535-1547.
[3] Korgaonkar AA, Li Y, Sekhar D, et al. Toll-like Receptor 4 Signaling in Neurons Enhances Calcium-Permeable α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptor Currents and Drives Post-Traumatic Epileptogenesis[J]. Ann Neurol, 2020, 87: 497-515.
[4] 周夏慧, 王庆来, 朱雪梅, 等. 当归多糖对DPN大鼠TLR4/MyD88/NF-κB通路抑制影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 23: 1340-1347.
[5] Ding RR, Chen W, Guo CY, et al. Dangguishaoyao-San attenuates LPS-induced neuroinflammation via the TLRs/NF-κB signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 105: 187-194.
[6] Roy A, Millen KJ, Kapur RP. Hippocampal granule cell dispersion: a non-specific finding in pediatric patients with no history of seizures[J]. Acta Neuropathol Commun, 2020, 8: 54.
[7] Joshi S, Roden WH, Kapur J, et al. Reduced neurosteroid potentiation of GABA(A) receptors in epilepsy and depolarized hippocampal neurons[J]. Ann Clin Transl Neurol, 2020, 7: 527-542.
[8] Lei T, Li H, Fang Z, et al. Polysaccharides from Angelica sinensis alleviate neuronal cell injury caused by oxidative stress[J]. Neural Regen Res, 2014, 9: 260-267.
[9] Du Q, Zhu X, Si J. Angelica polysaccharide ameliorates memory impairment in Alzheimer's disease rat through activating BDNF/TrkB/CREB pathway[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020, 245: 1-10.
[10] Cheng X, Yao H, Xiang Y, et al. Effect of Angelica polysaccharide on brain senescence of Nestin-GFP mice induced by D-galactose[J]. Neurochem Int, 2019, 122: 149-156.
[11] Zheng Q, Zhu T, Hu H, et al. TRPM2 ion channel is involved in the aggravation of cognitive impairment and down regulation of epilepsy threshold in pentylenetetrazole-induced kindling mice[J]. Brain Res Bull, 2020, 155: 48-60.
[12] 金绍静, 马巍, 张淑红, 等. miR34 a在戊四氮致癫痫大鼠中通过下调Bcl-2导致神经元凋亡[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35: 617-621.
[13] Ebrahimi F, Sadr SS, Roghani M, et al. Assessment of the protective effect of KN-93 drug in systemic epilepsy disorders induced by pilocarpine in male rat[J]. J Cell Biochem, 2019, 120: 15906-15914.
[14] Ying C, Ying L, Yanxia L, et al. High mobility group box 1 antibody represses autophagy and alleviates hippocampus damage in pilocarpine-induced mouse epilepsy model[J]. Acta Histochem, 2020, 122: 151485.
[15] Yu J, Shi Z, Su X, et al. Expression of Bcl-2 and Bad in hippocampus of status epileptic rats and molecular mechanism of intervened recombinant human erythropoietin[J]. Exp Ther Med, 2018, 16: 847-855.
[16] Song Y, Zhong M, Cai FC. Oxcarbazepine causes neurocyte apoptosis and developing brain damage by triggering Bax/Bcl-2 signaling pathway mediated caspase 3 activation in neonatal rats[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22: 250-261.
[17] Iori V, Iyer AM, Ravizza T, et al. Blockade of the IL-1R1/TLR4 pathway mediates disease-modification therapeutic effects in a model of acquired epilepsy[J]. Neurobiol Dis, 2017, 99: 12-23.

(本文编辑:唐颖馨)