

Netrin1 在颞叶癫痫大鼠再认记忆中的作用及机制

刘文萍, 刘丽丹, 徐佳骏, 李达丽, 彭颜晖

摘要 目的:探讨 Netrin1 在颞叶癫痫大鼠再认记忆中的作用及机制。方法:雄性 SD 大鼠 48 只随机分为对照组和模型组,每组 24 只。模型组用氯化锂-匹罗卡品建立颞叶癫痫大鼠模型,对照组给予等剂量的生理盐水腹腔注射。致痫成功后 1、7、15 d,采用 Morris 水迷宫实验评估大鼠空间学习记忆功能,记录每只大鼠的逃避潜伏期;取各组大鼠的海马组织,荧光定量 PCR 检测 Netrin1 mRNA 转录水平,Western blot 检测 Netrin1 蛋白表达水平。结果:造模后 1、7、15 d,模型组每个时间点逃避潜伏期均长于对照组(均 $P<0.05$),但组内差别无统计学意义(均 $P>0.05$)。造模后 1、7、15 d,模型组海马 Netrin1 mRNA 转录水平和蛋白表达水平均高于对照组(均 $P<0.05$)。结论:氯化锂-匹罗卡品可成功建立大鼠癫痫模型,可导致大鼠出现再认记忆障碍,也伴随有海马组织的 Netrin1 mRNA 转录水平和蛋白表达水平增高。

关键词 Netrin1; 颞叶癫痫; 再认记忆; 水迷宫实验; 细胞凋亡

中图分类号 R741; R741.02; R742.1 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20190686

本文引用格式:刘文萍, 刘丽丹, 徐佳骏, 李达丽, 彭颜晖. Netrin1 在颞叶癫痫大鼠再认记忆中的作用及机制[J]. 神经损伤与功能重建, 2021, 16(10): 609-610.

癫痫是大脑神经元反复、异常、同步放电所致的神经系统疾病^[1],其病程较长,部分患者会产生耐药而发展为难治性癫痫^[2]。癫痫发生机制复杂,免疫异常、中枢神经系统感染、离子通道异常、遗传、颅脑损伤、先天及围产期异常、肿瘤、脑血管病、寄生虫病等都是可能致病因素^[3,4]。颞叶癫痫是最常见的难治性癫痫,常伴发再认记忆障碍,以及焦虑、抑郁等精神症状^[5]。再认记忆是指对既往发生过的人物、事件的再回想与记忆的认知过程。Netrin 家族是最早发现的可溶性轴突导向分子,由一类结构上高度保守且与层粘连蛋白相关的可分泌蛋白组成^[6]。以 Netrin1 为代表的 Netrin 家族通过 DCC 受体家族与 UNC-5 受体家族结合,具有传递化学吸引、排斥作用,在神经传导通路构建及神经细胞迁移过程中产生导向作用^[7]。本研究探讨 Netrin1 在颞叶癫痫大鼠再认记忆中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只,体质量 180~200 g,由新疆医科大学实验动物中心提供;动物饲养于标准动物房,自由饮食水,规律光照。氯化锂购自成都曼思特科技有限公司;Netrin1 单克隆抗体购于 Abcam 公司;qPCR 试剂盒购于湖南诺科生物有限公司;Netrin1 探针合成由大连 TAKARA 公司完成。实验步骤经新疆医科大学大学伦理委员会同意,且遵守动物实验的相关国际公约。

1.2 方法

1.2.1 造模 大鼠随机分为对照组与模型组,每组 24 只。模型组:腹腔注射氯化锂生理盐水(125 mg/kg),18 h 后腹腔注射硫酸阿托品(1 mg/kg)降低毒副作用,再腹腔注射匹罗卡品(20 mg/kg)。将发作程度达

Racine 评分 IV~V 级、癫痫状态持续 >30 min 者纳入后续研究。经 4~7 d 静止期后出现自发性反复癫痫发作者判定为致痫成功。未成功致痫的大鼠剔除,补足入组大鼠至 24 只。对照组注射给予等剂量的生理盐水,余处理同模型组大鼠。癫痫分级标准(Racine 评分):无任何反应为 0 级;面部阵挛,包括眨眼、动须、节奏性咀嚼等为 I 级;I 级加节律性点头为 II 级;II 级加前肢肌阵挛,但无后肢直立为 III 级;III 级加后肢直立为 IV 级;全面性强直-阵挛发作,并失去体位控制为 V 级。

1.2.2 观察指标 ①空间学习记忆功能评估:致痫成功后 1、7、15 d,采用 Morris 水迷宫实验进行评估,记录每只大鼠的逃避潜伏期(大鼠自入水至找到水下救生平台所用的时间);②致痫成功后 1、7、15 d,取各组大鼠的海马组织,每个时间点取 8 只大鼠,荧光定量 PCR 检测 Netrin1 mRNA 转录水平,Western blot 检测 Netrin1 蛋白表达水平(每种取 4 只大鼠)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,t 检验或方差分析;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水迷宫逃避潜伏期比较

造模后 1、7、15 d,模型组水迷宫逃避潜伏期均长于对照组(均 $P<0.05$),但组内差别无统计学意义(均 $P>0.05$),见表 1。

2.2 Netrin1 mRNA 转录水平和蛋白表达水平比较

造模后 1、7、15 d,模型组海马 Netrin1 mRNA 转录水平和蛋白表达水平均高于对照组(均 $P<0.05$),见表 2。

作者单位

新疆医科大学第六附属医院神经内科

乌鲁木齐 830000

基金项目

新疆维吾尔自治区自然科学基金(No. 2018D01C316)

收稿日期

2020-09-21

通讯作者

彭颜晖

xjpengyanhui@

sina.cn

表1 2组水迷宫逃避潜伏期比较(s, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	1 d	7 d	15 d
对照组	4	17.2±4.8	16.8±3.8	17.1±4.1
模型组	4	55.3±4.8 ^①	54.0±8.3 ^①	53.9±4.6 ^①

注:与对照组比较,^①*P*<0.05

表2 2组Netrin1 mRNA转录水平和蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	Netrin1 mRNA 转录水平		
		1 d	7 d	15 d
对照组	4	0.67±0.13	0.56±0.05	0.62±0.11
模型组	4	2.31±0.05 ^①	2.09±0.10 ^①	2.23±0.21 ^①

组别	Netrin1 蛋白表达水平		
	1 d	7 d	15 d
对照组	0.63±0.08	0.58±0.04	0.63±0.10
模型组	2.14±0.010 ^①	2.00±0.11 ^①	2.26±0.09 ^①

注:与对照组比较,^①*P*<0.05

3 讨论

再认记忆是记忆过程中的典型模式,再认记忆的形成结构基础包括视觉传导路、颞叶内侧结构、额叶和顶叶皮质。再认记忆的形成是脑网络不断激活的产物。Morris水迷宫是用来检测海马依赖的空间学习记忆能力的经典方法^[8]。本研究显示模型组致痫后1、7、15 d的水迷宫实验逃避潜伏期都显著高于对照组,表明癫痫可伴随有再认记忆障碍。

血脑屏障的破坏可能是癫痫发生再认记忆障碍的机制之一。血脑屏障破坏后,大鼠癫痫发作阈降低;而血脑屏障内皮细胞中的Netrin1可能与血脑屏障的渗透性有关。Netrin1不仅是轴突导向分子,它还能调节细胞迁移,影响细胞与细胞之间、细胞与基质之间的粘附^[9]。Netrin1也能够促进内皮细胞增殖,血管的分支过程和血管密度的增加,改善缺血状况的病理学症状^[10]。在体外实验中,人脑源性的内皮细胞用Netrin1处理或与星形胶质细胞共培养,脂筏膜微区里的连接蛋白表达增加。连接蛋白相互作用,形成维持屏障完整性的功能簇。在体内,Netrin1基因敲除鼠也出现了紧密连接蛋白表达的紊乱

和血脑屏障的破坏。因此,Netrin1是一个重要的血脑屏障维持因子^[11]。本研究显示模型组海马Netrin1 mRNA转录水平和蛋白表达水平都显著高于对照组。推测Netrin1 mRNA在致病大鼠海马的高表达,可能是机体的自我修复反应,也有可能与癫痫导致的炎症反应有关^[12]。

综上所述,氯化锂-匹罗卡品可成功建立大鼠癫痫模型,癫痫大鼠出现再认记忆障碍,同时其海马组织的Netrin1 mRNA转录水平和蛋白表达水平增高,其具体机制尚需进一步研究。

参考文献

[1] 陈姝璇,康杨婷,石海燕,等. 耐药性颞叶癫痫大鼠海马组织γ-氨基丁酸A、B受体表达观察[J]. 山东医药, 2019, 59: 6-10.

[2] Barsi-Rhyne BJ, Miller KM, Vargas CT, et al. Kinesin-1 acts with netrin and DCC to maintain sensory neuron position in *Caenorhabditis elegans*[J]. Genetics, 2013, 194: 175-87.

[3] Hasegawa D, Ohnishi Y, Koyama E, et al. Deleted in colorectal cancer (netrin-1 receptor) antibodies and limbic encephalitis in a cat with hippocampal necrosis[J]. J Vet Intern Med, 2019, 33: 1440-1445.

[4] Koyama R, Ikegaya Y. The Molecular and Cellular Mechanisms of Axon Guidance in Mossy Fiber Sprouting[J]. Front Neurol, 2018, 9: 382.

[5] 王玉娇,陈烨,师忠芳,等. 大鼠海人酸点燃海马与杏仁核颞叶癫痫模型发作特点及海马病理学改变的研究[J]. 中华神经外科杂志, 2019, 35: 305-311.

[6] 卢军,曾其昌,王琴,等. 颞叶内侧癫痫伴精神障碍患者海马组织GFAP、MT-1/II以及AQP4的表达研究[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2019, 16: 75-79.

[7] Long Y, Zhuang K, Ji Z, et al. 2-Deoxy-D-Glucose Exhibits Anti-seizure Effects by Mediating the Netrin-G1-KATP Signaling Pathway in Epilepsy[J]. Neurochem Res, 2019, 44: 994-1004.

[8] Bohm T, Joseph K, Kirsch M, et al. Quantitative synchrotron X-ray tomography of the material-tissue interface in rat cortex implanted with neural probes[J]. Sci Rep, 2019, 9: 7646.

[9] Frolov NS, Grubov VV, Maksimenko VA, et al. Statistical Properties and Predictability of Extreme Epileptic Events[J]. Sci Rep, 2019, 9: 7243.

[10] 温跃桃,吴昆仑,谢锐,等. RCAN1/CaNA在颞叶癫痫患者及戊四氮动物模型中的表达变化[J]. 基础医学与临床, 2018, 38: 350-354.

[11] Hong S, Jiancheng H, Jiawen W, et al. Losartan inhibits development of spontaneous recurrent seizures by preventing astrocyte activation and attenuating blood-brain barrier permeability following pilocarpine-induced status epileptics[J]. Brain Res Bull, 2019, 149: 251-259.

[12] 董媛媛,褚旭,崔帅,等. 磷酸鞘氨醇受体2在颞叶癫痫大鼠海马中的表达变化[J]. 中华医学杂志, 2019, 99: 223-226.