

· 基础研究 ·

低频重复经颅磁刺激预处理对氯化锂-匹鲁卡品致痫大鼠痫性发作及 B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2、自杀因子和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 蛋白表达的影响

柯莎 赵红宁 张军强 王晓明 赵晓琼 黄慧 胡建秀

【摘要】目的 探讨低频重复经颅磁刺激(rTMS)预处理的抗痫作用及其与抗海马细胞凋亡的相关性。**方法** 将健康成年 Wistar 大鼠 30 只分为 rTMS 预处理组、假刺激组及空白对照组,每组 10 只。rTMS 预处理组行低频 rTMS(0.5 Hz、75% 阈强度、20 次/串、5 串/d)预处理,假刺激组予以相同次数、声音相似的“假性”刺激,连续 7d 后,制作氯化锂-匹鲁卡品诱导癫痫持续状态模型。观察各组大鼠痫性发作潜伏期及痫性发作程度,以免疫组织化学法观察各组大鼠海马 CA1 区 B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2(Bcl-2)、自杀因子(Fas)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白的平均阳性反应细胞数及阳性反应细胞平均光密度。**结果** rTMS 预处理组与假刺激组相比,痫性发作潜伏期显著延长、发作程度减轻($P < 0.01$),各时点 Bcl-2 蛋白表达增加,Fas 及 Caspase-3 蛋白表达减少。**结论** 低频 rTMS 预处理具有抗痫作用,其机制可能与其调节海马区 Bcl-2、Fas 及 Caspase-3 蛋白表达水平,从而保护神经元有关。

【关键词】 低频重复经颅磁刺激; 癫痫; B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2 蛋白; 自杀因子蛋白; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 蛋白

The effect of low-frequency transcranial magnetic stimulation pretreatment on seizures, the expression of B cell lymphoma/leukemia gene-2, Fas protein and Caspase-3 protein in the hippocampal CA1 region in rats with epilepsy induced by lithium chloride-pilocarpin KE Sha*, ZHANG Hong-ning, ZHANG Jun-qiang, WANG Xiao-ming, ZHAO Xiao-qiong, HUANG Hui, HU Jian-xiu. * Department of Neurology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

Corresponding author: WANG Xiao-ming, Email: wangxm238@163.com

【Abstract】Objective To study the possible mechanisms by which repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) pretreatment antagonizes seizures induced by lithium chloride-pilocarpine and any correlation with anti-apoptosis in hippocampal CA1 neurons. **Methods** Thirty rats were randomly divided into a control group, a sham stimulation group and an rTMS pretreatment group. The rTMS pretreatment group was pretreated on 7 consecutive days with low-frequency rTMS (0.5 Hz, 75% of threshold intensity, 20 times/bundle, and 5 bundles/d), while the sham-stimulation group was sham-stimulated with a similar sound. Lithium chloride-pilocarpine (LPC) was used to induce a model epileptic state. Epileptic stroke latency and severity were recorded; neuronal morphology was observed using hematoxylin and eosin (HE) staining; mean positive-reactive cell number and mean optical density and absorbance of B cell lymphoma/leukemia gene-2 (Bcl-2) were recorded, and Fas and Caspase-3 protein in the hippocampal CA1 region were observed with immunohistochemistry. **Results** Compared with the sham stimulation group, epileptic latency in the rTMS pretreatment group was significantly longer. Seizures in the rTMS pretreatment group were less severe, and a number of degenerated neurons were observed to be apoptotic. Bcl-2 protein expression increased at each time point, but Fas and Caspase-3 protein expression decreased. **Conclusions** rTMS pretreatment has an anti-epilepsy effect. The possible neuronal protection might be produced by regulating the expression of Bcl-2, Fas and Caspase-3 protein in the hippocampus.

【Key words】 Transcranial magnetic stimulation; Epilepsy; B cell lymphoma; B cell leukemia; Fas protein; Caspase-3

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.07.003

基金项目:四川省青年基金资助项目(04ZQ026-010)

作者单位:637000 南充,四川南充川北医学院附属医院神经内科(柯莎、赵红宁、张军强),神经疾病研究所(王晓明、赵晓琼、黄慧、胡建秀)

通信作者:王晓明,Email:wangxm238@163.com

20% ~ 30% 的癫痫(epilepsy, EP)患者经药物治疗无效,需进行外科手术、迷走神经刺激或脑深部刺激等治疗。探索安全有效、无创的抗痫手段,已成为近年来研究热点之一。磁刺激是一种通过脉冲磁场变化在

脑内诱发电场产生感应电流,在一定时间内持续影响刺激局部和功能相关的远隔皮质代谢及电生理活动的无创新技术。近年研究表明,低频重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)有潜在的抗痫作用^[1-3]。EP 发作可诱导脑内多种基因、神经递质及其调节因子、神经肽、酶和氨基酸等的表达变化,影响细胞跨膜信息的正常传递等而导致神经细胞损伤和凋亡^[4-5]。Bcl-2 蛋白是抗凋亡信号分子之一,其过度表达可抑制神经细胞凋亡^[6]。Fas 蛋白是一种跨膜受体,是促凋亡蛋白之一^[7]。有研究显示,原发性 EP 患者血浆可溶性 Fas 蛋白与发作程度正相关^[8]。Caspase 家族是直接导致凋亡细胞解体的蛋白酶系统,与凋亡的形态学特征密切相关^[9]。研究证实,EP 大鼠海马神经元凋亡与 Caspase-3 mRNA 的表达密切相关^[10],颞叶 EP 患者的颞叶标本中 Caspase-3 表达增高^[11]。

本研究采用低频 rTMS 对大鼠预处理,以氯化锂-匹罗卡品腹腔注射诱导癫痫发作,通过观测急性 EP 模型大鼠痫性发作潜伏期、痫性发作程度以证实 rTMS 预处理的抗痫作用。同时观测急性癫痫持续状态(status epilepticus, SE)后大鼠海马 CA1 区 Bcl-2、Fas 和 Caspase-3 蛋白表达变化,探讨 rTMS 预处理的抗痫作用是否与抗细胞凋亡有关。

材料与方法

一、主要试剂及仪器

主要实验试剂:兔抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体(C-2)、羊抗鼠 Fas 多克隆抗体(SC-516)兔抗鼠 Caspase-3 多克隆抗体(H-277),购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;匹罗卡品(053K13011)、东莨菪碱(051N14233),购于美国 Sigma 公司;SP 试剂盒、羊抗鼠 IgG 即用型抗体及 DAB 显色剂,购于福州迈新生物技术开发公司。主要仪器:Dantec Maglite-r25 磁刺激仪(最大输出磁场强度 2.3 T),购于武汉大学影像工程公司;鼠脑立体定位仪,购于安徽省淮北正华生物仪器设备有限公司。

二、实验动物及分组

健康成年雄性清洁级 Wistar 大鼠 30 只,体重 200 ~ 250 g,由四川大学动物实验中心提供。实验前在室温、自然光环境下笼养一周,给予充足的食物及水,自然昼夜循环,观察无自发性癫痫。按随机化原则分为空白对照组、假刺激组及 rTMS 预处理组,每组 10 只,见表 1。

三、动物模型制备

rTMS 预处理组和假刺激组大鼠脑部固定于脑立体定位仪上,用“8”字形线圈(9 × 5 cm)中心对准大鼠矢状缝中央点,使线圈平面平切于大鼠顶骨,分别给予相应的处理,见表 1。连续刺激 7 d 后, rTMS 预处理组和

假刺激组大鼠按 127 mg/kg 体重经腹腔注射 50 mg/ml 氯化锂,24 h 后按 1 mg/kg 体重腹腔注射 0.25 mg/ml 东莨菪碱,30 min 后按 40 mg/kg 体重腹腔注射 10 mg/ml 匹罗卡品,观察注射匹罗卡品后 70 min 内大鼠痫性发作行为表现。空白对照组不予任何处理。

表 1 实验大鼠分组及刺激参数

组 别	只数	刺激参数
空白对照组	10	不予任何刺激
假刺激组	10	每天予以相同次数、声音相似的“假性”刺激
rTMS 预处理组	10	0.5 Hz, 75% 阈刺激, 20 次/串, 串间隔 2 min, 5 串/d, 连续 7 d

四、灌注与取材

参照 Racine 分级标准^[12],达 4 ~ 5 级且重复或持续发作达 30 min 以上为诱发急性 SE 成功,在 70 min 观察期结束后,取假刺激组和 rTMS 预处理组达 SE 状态大鼠,在相应 SE 后 12, 24, 72 h 时点以 10% 水合氯醛按 0.35 ml/100 g 体重腹腔注射麻醉,空白对照组于相应 24 h 时点行相同麻醉。暴露心脏,先用生理盐水(4℃)行快速心脏灌流,再持续灌注 4%、4℃多聚甲醛磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH = 7.4)至颈及四肢强直后断头取脑,剥离中脑至嗅脑间脑组织,置 4℃、4% (质量浓度)多聚甲醛中固定 2 h,移入 30% (质量浓度)蔗糖溶液,4℃ 24 h。常规石蜡包埋,冠状连续切片,切至出现海马组织,每片厚度 10 μm,分别行 HE 染色、免疫组化染色对海马 CA1 区行组织学观察。

五、HE 染色

严格按照染色步骤行 HE 染色,封片后光镜下观察。

六、免疫组化染色

采用 S-P 法,一抗为 Bcl-2 (稀释度为 1:200)、Fas (稀释度为 1:100)和兔抗鼠 Caspase-3 多克隆抗体 (稀释度为 1:50)三种一抗,二抗为生物素标记的羊抗鼠 IgG 即用型抗体。每只大鼠取两张切片,随意取 5 个视野,测定每个视野内 CA1 区 Bcl-2、Fas 和 Caspase-3 阳性细胞个数,测定窗为 15 620 μm²。分析指标:①平均阳性反应细胞数(N);②阳性反应细胞平均光密度(average optical density, AOD)。

七、统计学分析

所得资料用 SPSS 10.0 版统计软件分析,2 组间均数比较采用 Student-t 检验;组间两两比较使用 Student-Newman-Keuls (数据方差齐性并符合正态分布)或 Kruskal-Wallis 检验(数据方差不齐或/和不符合正态分布);P < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、行为学观察

观察指标包括痫性发作潜伏期和痫性发作程度。

1. 痫性发作潜伏期:空白对照组无痫性发作出现。其余 2 组以注射匹鲁卡品后首次出现须动或甩头、甩尾的时间长度作为痫性发作的潜伏期。rTMS 预处理组的潜伏期 $[(21.60 \pm 3.50) \text{ min}]$ 较假刺激组 $[(12.80 \pm 3.20) \text{ min}]$ 显著延长,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2. 痫性发作程度:按 Racine 标准以 I ~ III 级为轻型发作,IV ~ V 级为重型发作。rTMS 预处理组和假刺激组致病大鼠轻型发作分别为 8 只、4 只,重型发作分别为 2 只、6 只。2 组大鼠均无抽搐致死。

二、HE 染色结果

空白对照组大鼠海马神经元排列整齐紧密,边缘

清晰,胞浆透明,胞核呈圆形或椭圆形,染色质分布均匀,形态正常。假刺激组少部分切片可观察到 CA1 区神经元(主要为大锥体细胞和部分齿状回颗粒细胞)形态散乱,核固缩浓染,染色质凝集成块,边集,可见少量神经元变性坏死;rTMS 预处理组少数切片也可见 CA1 区有少量变性神经元坏死。各组切片定性观察差异不大。

三、免疫组化染色结果

1. 大鼠海马 CA1 区 Bcl-2 蛋白表达:空白对照组大鼠海马 CA1 区 Bcl-2 微量表达,主要为胞浆和核膜成均匀弥漫淡黄色染色。假刺激组大鼠 Bcl-2 未发生明显变化。rTMS 预处理组大鼠 Bcl-2 蛋白的 N 及 AOD 在 12 h 明显增强,24 h 达顶峰后减弱($P < 0.05$),见表 2、图 1。

表 2 3 组大鼠不同时间点海马 CA1 区 Bcl-2 蛋白的阳性表达($\bar{x} \pm s$)

组 别	N			AOD		
	12 h	24 h	72 h	12 h	24 h	72 h
空白对照组	18.32 ± 2.91	18.32 ± 2.91	18.32 ± 2.91	0.37 ± 0.15	0.37 ± 0.15	0.37 ± 0.15
假刺激组	18.49 ± 2.06	28.10 ± 2.44	22.04 ± 2.29	0.38 ± 0.09	0.59 ± 0.09	0.48 ± 0.12
rTMS 预处理组	23.19 ± 2.32^{ab}	32.02 ± 2.46^{ab}	24.03 ± 2.58	0.49 ± 0.09^{ab}	0.71 ± 0.12^{ab}	0.58 ± 0.12

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与假刺激组比较,^b $P < 0.05$

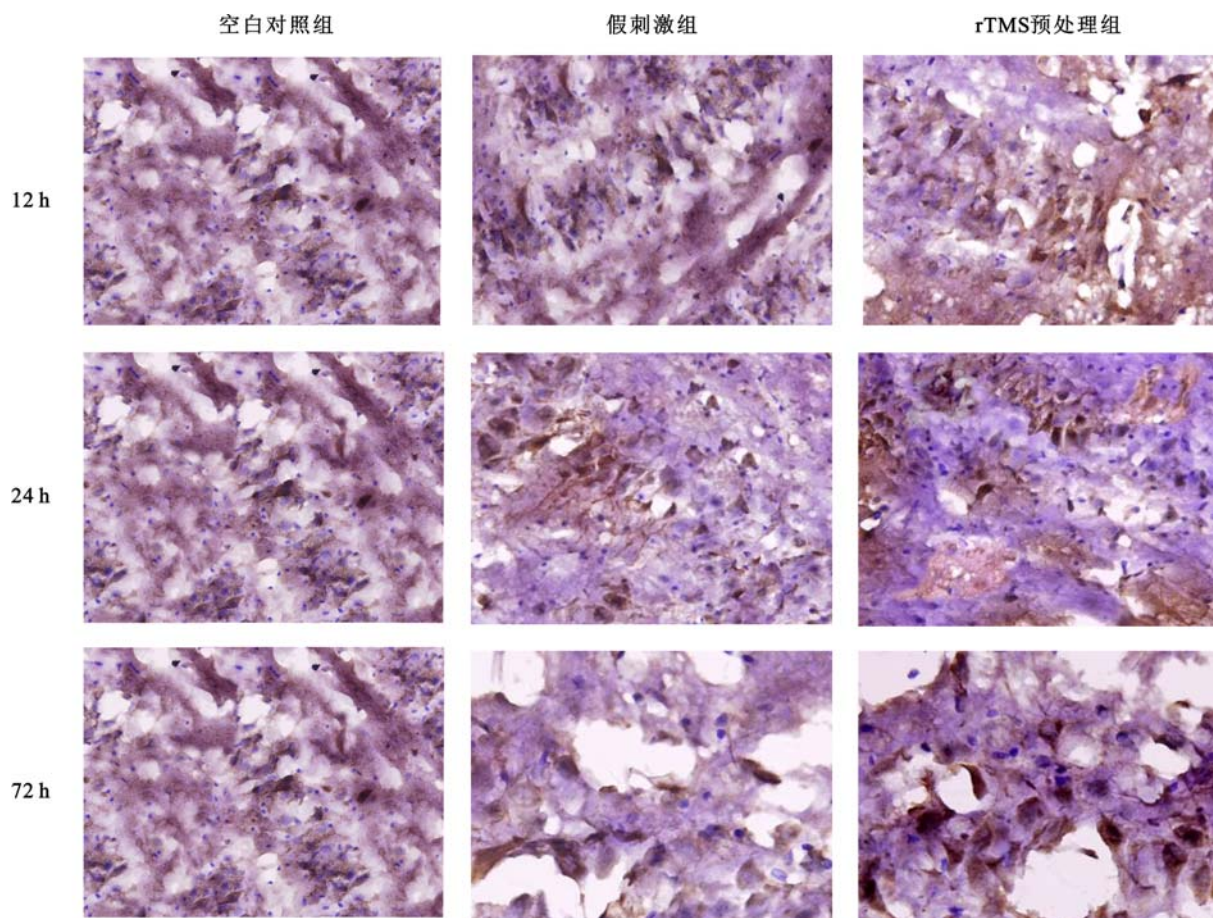


图 1 3 组大鼠不同时间点海马 CA1 区 Bcl-2(蛋白免疫组化染色, $\times 400$)

2. 大鼠海马 CA1 区 Fas 蛋白:Fas 阳性表达为棕黄色或浅黄色染色,主要定位于胞膜及胞浆内。其在空白对照组大鼠海马 CA1 区仅微量表达。假刺激组大鼠海马 CA1 区 Fas 蛋白含量明显增加,至 24 h 达到顶峰后下降($P<0.01$),72 h 仍高于空白对照组大鼠($P<0.05$)。rTMS 预处理组大鼠海马 CA1 区 Fas 蛋白含量明显增加,至 24 h 达到顶峰后下降($P<0.01$),72 h 恢复正常,见表 3、图 2。

3. 大鼠海马 CA1 区 Caspase-3 蛋白:Caspase-3 蛋白阳性表达为棕色染色,主要定位于细胞浆内,个别标本在细胞核中可见阳性表达。其在空白对照组仅微量表达;假刺激组大鼠 Caspase-3 蛋白明显增加,至 24 h 达到顶峰后下降($P<0.01$),72 h 仍高于空白对照组大鼠($P<0.05$)。rTMS 预处理大鼠海马 CA1 区 Fas 蛋白含量低于假刺激大鼠,致病后 72 h 基本恢复正常,见表 4、图 3。

表 3 3 组大鼠不同时间点海马 CA1 区 Fas 蛋白的阳性表达($\bar{x} \pm s$)

组 别	N			AOD		
	12 h	24 h	72 h	12 h	24 h	72 h
空白对照组	12.92 ± 1.56	12.92 ± 1.56	12.92 ± 1.56	0.28 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.28 ± 0.04
假刺激组	24.60 ± 6.71 ^a	43.50 ± 4.57 ^a	27.04 ± 5.34 ^b	0.36 ± 0.03 ^a	0.79 ± 0.09 ^a	0.45 ± 0.12 ^b
rTMS 预处理组	21.19 ± 2.32 ^{ac}	34.82 ± 8.08 ^{ac}	19.03 ± 2.58	0.31 ± 0.09 ^{ac}	0.72 ± 0.05 ^{ac}	0.41 ± 0.13

注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与假刺激组比较,^c $P<0.05$

表 4 3 组大鼠不同时间点海马 CA1 区 Caspase-3 蛋白阳性表达($\bar{x} \pm s$)

组 别	N			AOD		
	12 h	24 h	72 h	12 h	24 h	72 h
空白对照组	0.75 ± 0.34	0.75 ± 0.34	0.75 ± 0.34	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.05
假刺激组	17.21 ± 0.34 ^a	28.21 ± 0.51 ^b	18.71 ± 0.37 ^a	0.34 ± 0.07 ^a	0.48 ± 0.07 ^b	0.34 ± 0.07 ^a
rTMS 预处理组	14.14 ± 0.31	25.85 ± 0.42 ^c	14.06 ± 0.35	0.22 ± 0.06	0.31 ± 0.09 ^c	0.20 ± 0.05

注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与假刺激组比较,^c $P<0.05$

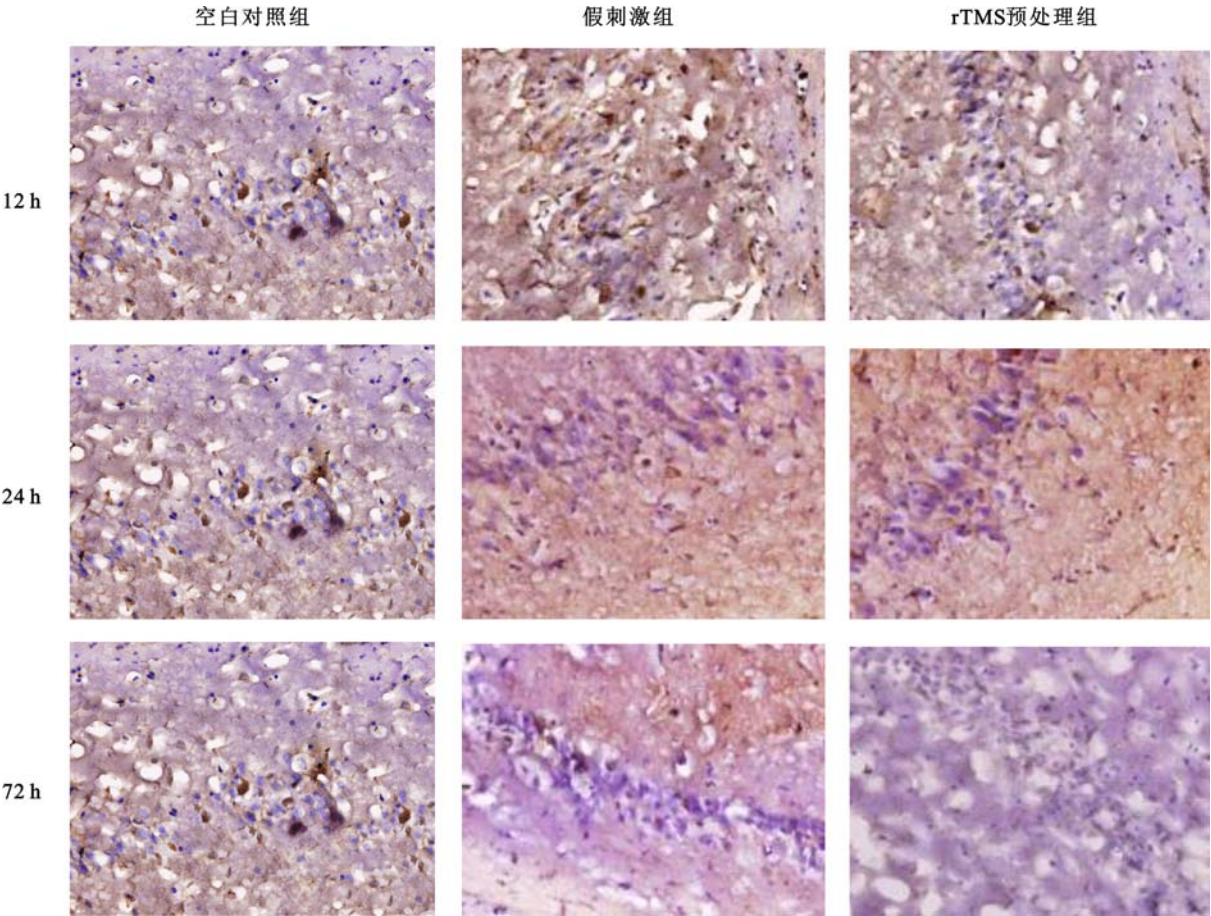


图 2 3 组大鼠不同时间点海马 CA1 区 Fas 蛋白(免疫组化染色, ×400)

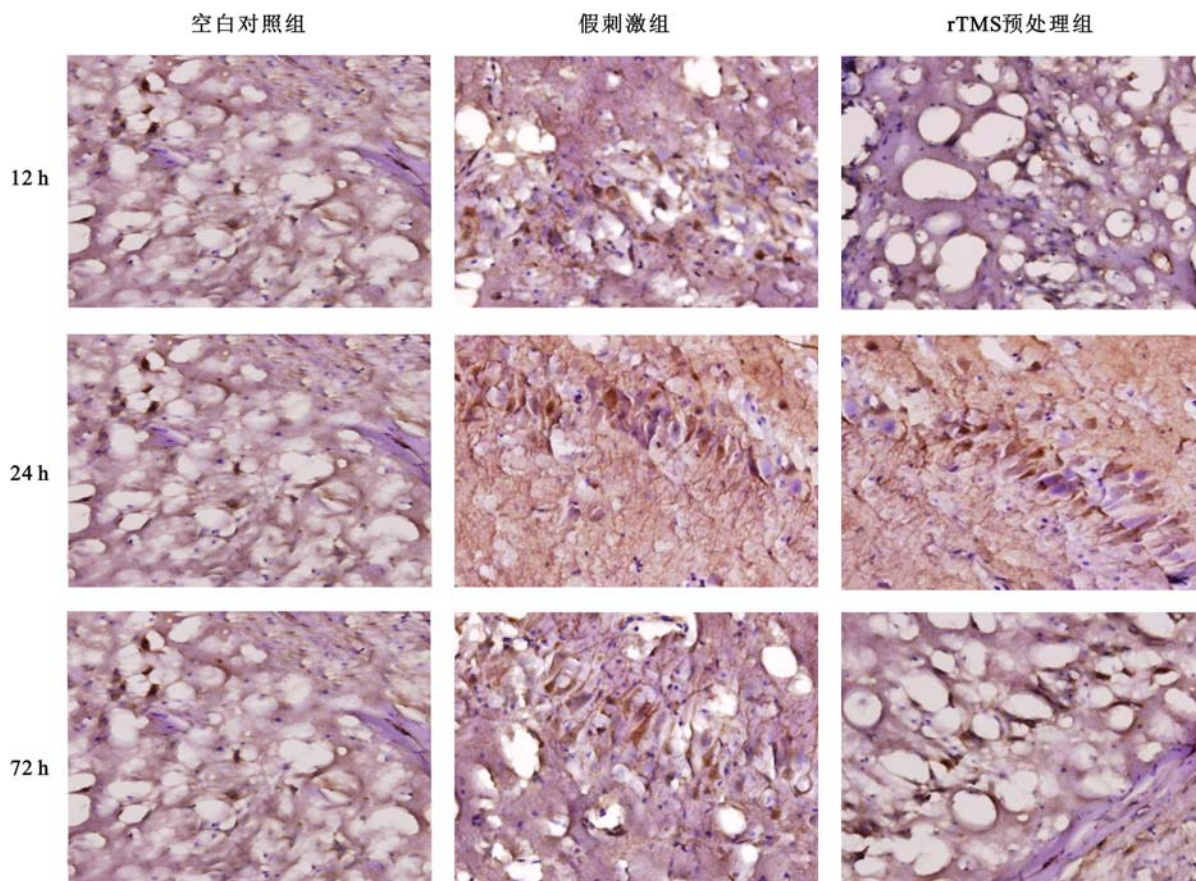


图3 3组大鼠不同时间点海马CA1区Caspase-3蛋白阳性反应细胞平均光密度

讨 论

氯化锂-匹鲁卡品为最常用的诱导急性SE模型^[13]的制剂。匹鲁卡品为一种毒蕈碱能兴奋剂,通过激活脑内兴奋性氨基酸通路诱发病性发作,导致海马的兴奋毒性损害^[14],而氯化锂对匹鲁卡品的致病过程具有协同作用,可降低其诱发病性发作的阈值,减少其用量及毒副作用^[15]。该模型致病过程清晰,有效致病剂量与致死剂量间的跨度大,安全性好^[16]。发作性EP持续时间较长,分子生物学特征与人类EP相似,是目前惟一与人类边缘系统痫性发作的主要特征相吻合的致病模型^[17]。

虽尚无研究表明rTMS能够促进Bcl-2蛋白表达增加,但有研究显示,rTMS可通过影响神经递质及基因表达水平等多种途径保护神经元^[18];亦有研究提示,rTMS预处理能增强海马缺血耐受,减轻后继的海马缺血性损伤^[19]。本实验显示,经低频rTMS预处理后大鼠痫性发作潜伏期较假刺激大鼠明显延长,痫性发作程度减轻。rTMS预处理大鼠海马CA1区Bcl-2蛋白在致病后24h表达明显增强,而促细胞凋亡蛋白Fas及凋亡酶Caspase-3表达较假刺激组减弱,这种变化可能是神经元自我保护机制之一,以此来防止

和减少细胞凋亡的发生。

研究显示,rTMS预处理有抗痫作用,同时能够下调EP大鼠海马区N-甲基-D-天门冬氨酸受体表达(N-methyl-D-aspartate,NMDA)^[20],而NMDA能抑制Bcl-2 mRNA表达^[21],因此,rTMS可能通过抑制NMDA受体表达而调节Bcl-2水平,从而保护神经元以抗癫痫。但其确切机制有待进一步探讨。另外,本研究只选择了0.5 Hz,75% MT刺激参数,有一定局限性,今后可以选择更多的刺激参数以确立更佳的刺激参数。

综上所述,本实验提示rTMS预处理有抗痫作用,而此作用可能是通过调节Bcl-2、Fas和Caspase-3蛋白的表达以抑制匹鲁卡品致病大鼠海马神经元凋亡而实现。

参 考 文 献

- [1] Wang XM, Yang DB, Wang SX, et al. Effects of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on electroencephalogram and seizure frequency in 15 patients with temporal lobe epilepsy following dipole source localization. *Neural Regen Res*, 2008, 3:1257-1260.
- [2] Rotenberg A, Muller P, Birnbaum D, et al. Seizure suppression by EEG-guided repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat. *Clin Neurophysiol*, 2008, 119:2697-2702.

- [3] Godlevsky LS, Kobolev EV, Coenen AM, et al. Influence of transcranial magnetic stimulation on spike-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy. *Indian J Exp Biol*, 2006, 44: 949-954.
- [4] Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia*, 2000, 41: S9-S13.
- [5] Sankar R, Shin D, Liu H, Katsumori H, et al. Granule cell neurogenesis after status epilepticus in the immature rat brain. *Epilepsia*, 2000, 41: S53-S56.
- [6] Feng HL, Yan L, Guan YZ, et al. Effects of transcranial magnetic stimulation on motor cortical excitability and neurofunction after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Chin Med Sci J*, 2005, 20: 226-230.
- [7] Stellet H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 1995, 267: 1445-1449.
- [8] El-Hodhod MA, Tomoum HY, Abd Al-Aziz MM, et al. Serum Fas and Bcl-2 in patients with epilepsy. *Acta Neurol Scand*, 2006, 113: 315-321.
- [9] Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 2000, 256: 27-33.
- [10] 李文, 包仕尧. 癫痫发作大鼠海马神经元凋亡与 caspase-3 mRNA 表达的研究. *中国临床神经科学*, 2004, 12: 41-43.
- [11] Heneshall DC, Clark RS, Adelson PD, et al. Alterations in Bcl-2 and Caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 2000, 55: 250-257.
- [12] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32: 281-294.
- [13] Hattiangady B, Shetty AK. Implications of decreased hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2008, 49 Suppl 5: 26-41.
- [14] Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*, 1991, 32: 778-782.
- [15] Hort J, Brojek G, Mares P, et al. Cognitive functions after pilocarpine-induced status epilepticus: changes during silent period precede appearance of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*, 1999, 40: 1177-1183.
- [16] Cavalheiro EA, Santos NF, Priel MR. The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia*, 1996, 37: 1015-1019.
- [17] 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.
- [18] Tergau F, Naumann U, Paulus W, et al. Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves intractable epilepsy. *Lancet*, 1999, 353: 2209.
- [19] Akcali KC, Sahiner M, Sahiner T. The role of bcl-2 family of genes during kindling. *Epilepsia*, 2005, 46: 217-223.
- [20] 张军强, 余巨明, 王晓明等. 低频重复经颅磁刺激预处理对毛果芸香碱致痫大鼠海马 GAD65、NMDAR1 表达的影响. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2008, 15: 430-433.
- [21] Ogiue-Ikeda M, Kawato S, Ueno S. Acquisition of ischemic tolerance by repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat hippocampus. *Brain Res*, 2005, 1037: 7-11.

(修回日期: 2011-03-17)

(本文编辑: 松 明)

· 消息 ·

中国康复医学会康复治疗专业委员会康复辅助器具学组成立暨全国康复辅助器具学术研讨会通知

为了认真研讨我国康复医学领域康复辅助器具工作的健康发展, 了解国内外康复辅助器具的新技术、新信息, 推动该项技术的临床应用和发展, 促进本专业教学工作, 借助卫生部关于《综合医院康复医学科建设与管理指南》发布的有利时机, 中国康复医学会康复治疗专业委员会经多方协商, 定于 2011 年 9 月 13 至 15 日在重庆召开“中国康复医学会康复治疗专业委员会康复辅助器具学组成立暨全国康复辅助器具学术研讨会”。会议期间, 将进行康复辅助器具专题学术讲座和学术交流。热诚欢迎各位专家同仁参加! 有意者请与重庆西南医院康复医学科武继祥教授或邹丹秘书联系。

电话: 13883404918 (武继祥) 13668021772 (邹丹)

Email: wjxiang99@ yahoo. com. cn; zoudan_cq@ 163. com