

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00042

大鼠癫痫持续状态后脑内 PPAR γ 的表达

于辛^{1*}, 邵晓光², 孙宏³, 崔连奇¹, 黄远桂⁴

1. 解放军 401 医院神经内科, 青岛 266071
2. 解放军 401 医院北院区内科二科, 青岛 266100
3. 西安交通大学第二附属医院神经内科, 西安 710004
4. 第四军医大学西京医院神经内科, 西安 710032

[摘要] **目的** 观察 PPAR γ 在癫痫持续状态后大鼠脑内的表达。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分为对照组和癫痫组 ($n=10$), 制备锂-匹罗卡品癫痫模型, 采用免疫组化及蛋白质印迹分析方法, 观察对照组和造模成功的癫痫大鼠脑内 PPAR γ 的表达分布和变化情况。采用免疫组化及蛋白质印迹分析方法, 观察锂-匹罗卡品模型大鼠脑内 PPAR γ 的表达分布和变化情况。**结果** 免疫组化显示 PPAR γ 在正常大鼠脑内呈弱阳性表达, 且主要表达在神经元上; 癫痫持续状态后在星形胶质细胞上呈强阳性表达, 神经元形态的细胞上亦有表达。蛋白质印迹分析显示癫痫持续状态后 PPAR γ 的表达明显增加。**结论** 大鼠癫痫持续状态后星形细胞上 PPAR γ 表达增加, 可能具有神经保护作用, 这为癫痫的神经保护治疗提供了一个新的研究方向。

[关键词] 癫痫; PPAR γ ; 癫痫持续状态; 脑; 星形细胞

[中图分类号] R 742.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)01-0042-04

Expression of PPAR γ in rat brain after status epilepticus

YU Xin^{1*}, SHAO Xiao-guang², SUN Hong³, CUI Lian-qi¹, HUANG Yuan-gui⁴

1. Department of Neurology, No. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, Shandong, China
2. Department of Internal Medicine II, The Northern Region of No. 401 Hospital, Qingdao 266100, Shandong, China
3. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China
4. Department of Neurology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression of PPAR γ in rat brain after status epilepticus. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group and a status epilepticus group ($n=10$). Lithium-pilocarpine model was used to prepare epileptic model. Immunohistochemical method and Western blotting analysis were used to examine the changes of PPAR γ distribution and expression in rat brain in the two groups. **Results** Immunohistochemical staining showed that the expression of PPAR γ was weak in the brain of normal rats, and the expression was mainly on the neurons. The expression was strong in astrocytes after status epilepticus, and the expression was also noticed on cells with neuron shape. Western blotting analysis showed that the expression of PPAR γ was greatly increased after status epilepticus. **Conclusion** The expression of PPAR γ is increased on astrocyte after status epilepticus in rats, which may have neuroprotective effect. This finding cast new lights on neuroprotective treatment for epilepsy.

[Key words] epilepsy; PPAR γ ; status epilepticus; brain; astrocytes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(1): 42-45]

过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR) 是核激素受体超家族的新成员, 包括 3 种亚型, 即 α 、 β/δ 和 γ , PPAR γ 是研究得最广泛的一种。它参与脂肪细胞的分化、脂质合成、糖代谢及免疫调节, 发挥重要的生理功能。PPAR γ 也在中枢神经系统中表达, 体外研究显示, 将皮质的神经元和胶质细胞进行混合培

养, PPAR γ 的配体能阻止脂多糖 (LPS) 诱发的神经元损害, 提示 PPAR γ 参与神经保护作用^[1]。体内研究也证实, PPAR γ 的配体对有炎症参与的神经系统疾患具有保护作用, 如缺血性中风^[2]、多发性硬化^[3]、阿尔茨海默病^[4]等。PPAR γ 在癫痫后的表达情况尚不清楚。

本研究观察了 PPAR γ 在癫痫持续状态后大鼠

[收稿日期] 2009-08-14 **[接受日期]** 2009-12-28

[作者简介] 于辛, 博士, 主治医师。

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0532-51870053, E-mail: yuxin401@yahoo.com.cn

脑内的表达变化,以期为癫痫的神经保护治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 盐酸匹罗卡品(Sigma公司),地西洋(批号:42020674,武汉滨湖双鹤药业有限公司)。兔抗PPAR γ 、Actin多克隆抗体、小鼠抗OX-42单克隆抗体(Chemicon公司),小鼠抗GFAP、NeuN单克隆抗体(Sigma公司),BCA蛋白分析试剂盒(Pierce公司)。

1.2 实验动物及分组 雄性SD大鼠20只,12周龄,体质量180~220 g,由第四军医大学实验动物中心提供。饲养于12 h:12 h光暗环境,给予标准饲料,自由摄食及饮水。随机分为对照组和癫痫组,每组10只。

1.3 锂-匹罗卡品癫痫模型制作 癫痫组大鼠腹腔注射新鲜配制的氯化锂127 mg/kg,18 h后注射东莨菪碱1 mg/kg,30 min后注射盐酸匹罗卡品30 mg/kg。癫痫发作依据Racine分级进行评定。癫痫持续状态(SE)开始的标准为出现持续的IV级及以上发作,发作间期无正常行为。间隔30 min后未出现癫痫

发作的大鼠重复给予匹罗卡品。SE后1 h注射地西洋(10 mg/kg)终止发作。正常对照组同法注射等量的氯化锂和东莨菪碱,并用生理盐水代替匹罗卡品。生理盐水注射1 h后也给予等剂量的地西洋。

1.4 免疫荧光染色检测PPAR γ 在背侧海马的定位 分别于SE后12 h、24 h和3 d,将每组大鼠以戊巴比妥深麻醉,先经升主动脉灌注冷生理盐水100 ml,随即4%冷多聚甲醛液(pH 7.4)先快速灌注200 ml后,再慢速灌注300 ml。取脑后,后固定过夜,30%蔗糖溶液中(4℃)使组织沉底。选择背侧海马部位(前囟后2.8~4.5 mm水平),应用恒冷冰冻切片机冠状位连续切片,厚10 μ m,-20℃保存。

取切片放入含0.3% H₂O₂的甲醇溶液20 min,漂洗后浸入含0.3% Triton X-100的0.01 mol/L PBS 30 min。分别加入小鼠抗OX-42抗体(1:500)和兔抗PPAR γ 抗体(1:50)、小鼠抗NeuN抗体(1:500)和兔抗PPAR γ 抗体(1:50)、小鼠抗GFAP抗体(1:1 500)和兔抗PPAR γ 抗体(1:50),4℃过夜,加入FITC标记的抗小鼠IgG(1:500)和Cy3标记的抗兔IgG(1:500),避光孵育2 h,荧光显微镜观察,绿色(FITC)激发/发射波长为488/522 nm,红色(Cy3)为550/570 nm。

1.5 蛋白质印迹分析检测PPAR γ 表达的变化 将大鼠处死后取脑,冰上分离海马,按80 mg/ml加入

30 mmol/L Tris-Cl,pH 7.5,加入裂解液PMSF,冰浴匀浆。离心取上清液,BCA蛋白分析试剂盒测定浓度,-20℃保存。12% SDS-PAGE电泳(先恒压60 V,20 min后增加到120 V)。然后电转移至PVDF膜上,恒压100 V,2 h。用含10%脱脂奶粉的TBST封闭2 h。加入一抗兔抗PPAR γ 多克隆抗体(1:500)和兔抗Actin多克隆抗体(1:200),4℃过夜;加入二抗羊抗兔HRP(1:5 000),37℃ 30 min。ECL试剂盒化学发光法显色,胶片曝光。Kodak Digital Science 1D数字分析软件定量分析。

1.6 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用SPSS 1.00软件进行分析,组间比较用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PPAR γ 在正常及癫痫大鼠背侧海马的定位 对大鼠脑背侧海马层面进行免疫荧光染色,结果显示(图1),正常鼠的大脑皮质、海马、丘脑、杏仁核皮质均见PPAR γ 弱阳性表达,为神经元形态。核比胞质深染,齿状回门区的中间神经元表达较颗粒细胞和锥体细胞略强,几乎看不到胶质形态的阳性细胞。SE 12 h后,大鼠的皮质、梨状区可见少量胶质形态的阳性细胞,这样的细胞在内侧缰核表达更多。随着时间的延长,齿状回门区及内侧缰核的胶质形态的阳性细胞增多,同时海马的CA1和CA3区也能见到,CA3区较CA1区明显。

为了进一步明确PPAR γ 在癫痫大鼠脑内的表达情况,采用免疫荧光双标记的方法,分别用PPAR γ 和不同的特殊标记物在大鼠海马齿状回进行双标记(NeuN标记神经元、OX-42标记小胶质细胞、GFAP标记星形胶质细胞),结果显示(图2),GFAP阳性的胶质细胞(星形胶质细胞)PPAR γ 表达阳性,而OX-42阳性的胶质细胞(小胶质细胞)不表达PPAR γ ;NeuN阳性的神经元形态的细胞,包括海马的锥体细胞、齿状回颗粒细胞及中间神经元,PPAR γ 表达均为阳性。

2.2 SE后PPAR γ 表达的变化 蛋白质印迹分析检测到相对分子质量约52 000的特异性条带,应用凝胶成像分析系统测阳性条带的光密度值,用PPAR γ 条带与内参照 β -actin条带之间光密度的比值来表示PPAR γ 的表达量。结果表明(图3),SE后12 h,大鼠海马PPAR γ 蛋白的表达较正常对照略增高,但差异无统计学意义($P>0.05$);24 h达到高峰,与对照组比较有统计学差异($P<0.01$);72 h略下降,但仍高于对照组($P<0.05$)。

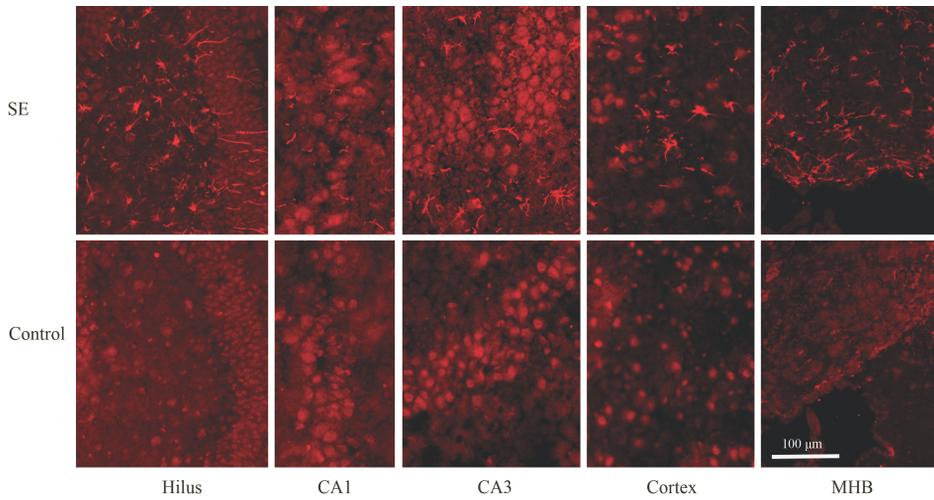


图 1 癫 后 PPAR γ 在海马门区、CA1、CA3、皮质和内侧缰核的表达

Fig 1 PPAR γ expression after status epilepticus in subfields of hippocampus(hilus region, CA1, CA3), cortex and MHB by immunofluorescent staining

MHB: Medial habenular nucleus

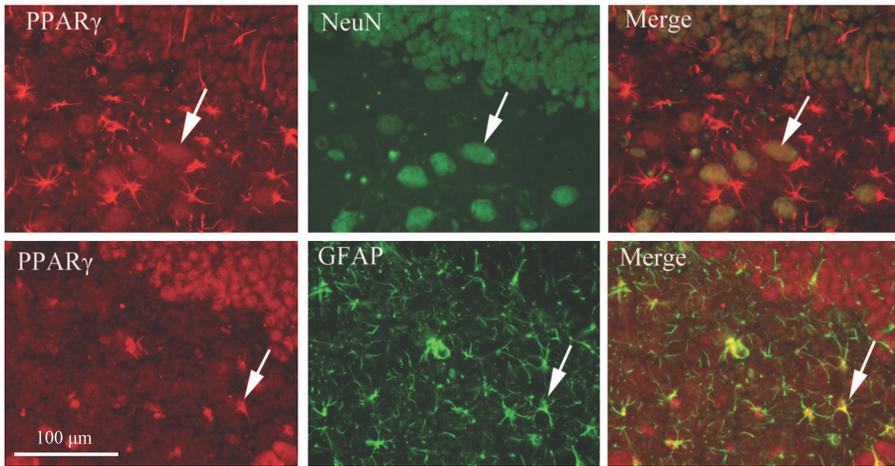


图 2 免疫荧光双标记显示癫 持续状态后 24 h PPAR γ 在齿状回的定位

Fig 2 Cellular localization of PPAR γ by double immunofluorescent staining in dentate gyrus 24 h after status epilepticus

Arrows indicate positive expression

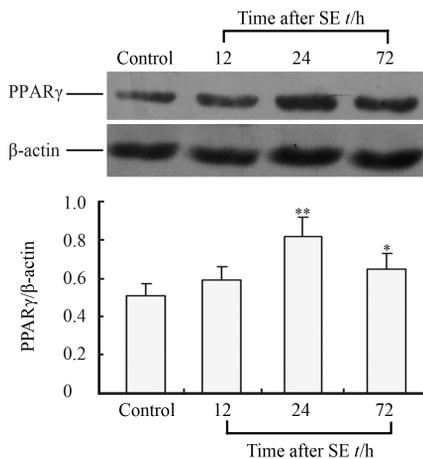


图 3 PPAR γ 在癫 (SE)后的表达

Fig 3 Expression of PPAR γ at

indicated time points after status epilepticus(SE)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

癫 是中枢神经系统常见的发作性疾病,海马神经元损害是颞叶癫 典型的病理改变之一,并与致 密切相关。炎症、氧化反应与癫 的病理变化及癫 后的脑损伤密切相关,在一定程度上决定着癫 的发生、发展。在初始损害之初或之后给予抗炎、抗氧化治疗,可起到保护神经元、阻止癫 再次发作的作用^[5]。

近来研究显示,PPAR γ 参与人体多种代谢和疾病的生理病理过程。在中枢神经系统中,PPAR γ 的激活被证实能够减轻急性神经损伤的炎症反应,抑制炎症因子、趋化因子的表达,阻止损伤的中枢神经系统致炎转录因子的激活,并具有明确的抗炎、抗氧化作用,成为极具潜力的神经保护治疗途径^[6],为

神经系统变性病、炎性疾病、中风等疾病的治疗的提供了一个新的方向。PPAR γ 可以在多种神经细胞上表达。但其在不同细胞上的作用研究非常有限。体外实验显示,使用人工合成配体促进神经元上 PPAR γ 的表达后,能明显抑制活性氧簇(ROS)导致的环氧化酶(COX-2)过表达引起的神经元损害,该作用能被 PPAR γ 拮抗剂 GW9662 完全拮抗。说明神经元上表达的 PPAR γ 具有神经保护作用^[7]。体外培养的小胶质细胞也能表达 PPAR γ ,其在小胶质细胞上的表达是受严格调节的,并与小胶质细胞的功能状态有关^[8]。

本研究观察了锂-匹罗卡品癫痫模型大鼠脑内 PPAR γ 的表达和变化情况,结果显示,PPAR γ 在正常大鼠脑内呈弱阳性表达,主要表达在神经元上;SE 后表达增加,并于 24 h 达到最高峰,主要在星形胶质细胞上表达。

星形胶质细胞作为脑内一种重要的神经细胞有很多功能,如从突触中摄取谷氨酸、缓冲神经元激活后导致的 $[K^+]$ 增加、维持细胞外的低 pH、调节渗透压等,这些对于保持中枢神经系统兴奋性的最佳水平至关重要。因此,星形胶质细胞的功能异常与神经元的兴奋性增加而导致的癫痫有关^[9]。星形胶质细胞还是脑内的抗氧化屏障,其在氧化损伤中起到重要的保护作用。一方面因为星形细胞含有高浓度的抗氧化物,金属硫蛋白 I 和 II 只存在于星形胶质细胞;另一方面,星形细胞合成谷胱甘肽(GSH),并参与维生素 C 再循环,发挥抗氧化及防护神经元的作用。本研究结果显示,SE 后 PPAR γ 在星形细胞上表达显著增加,推测癫痫后星形细胞上 PPAR γ 表达的增加可能具有神经保护作用,这为癫痫的神经保护治疗提供了一个新的研究方向。

Zhao 等^[7]研究显示,脑缺血后数小时脑梗死区周围 PPAR γ 的表达即增多,主要表达于小胶质细胞,在神经元的表达略少;随后 PPAR γ 阳性细胞迅速下降,在缺血损伤后 2 d 达最低,此时炎症已很明显,梗死区周围有巨噬细胞浸润和小胶质细胞激活。这一现象说明,小胶质细胞的激活抑制了 PPAR γ 的表达。随着炎症的进一步发展,PPAR γ 的表达被激活的小胶质细胞及其炎性介质进一步下调。这与本研究在癫痫模型中观察到的结果有较大差异。本研究结果显示在 SE 后,强阳性 PPAR γ 的表达主要

在齿状回、门区及缰核星形胶质细胞中,反应也并非十分迅速,而是 SE 后 24 h 才达到高峰,机制不明。炎性介质对 SE 后对小胶质细胞上 PPAR γ 表达的影响,本实验尚不能确定。这种观察结果的差异,可能与模型选择和观察的时间点有关,我们将进一步研究予以证实。

[参考文献]

- [1] Loane D J, Deighan B F, Clarke R M, Griffin R J, Lynch A M, Lynch M A. Interleukin-4 mediates the neuroprotective effects of rosiglitazone in the aged brain[J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30:920-931.
- [2] Zhao X, Strong R, Zhang J, Sun G, Tsien J Z, Cui Z, et al. Neuronal PPAR γ deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia[J]. *J Neurosci*, 2009, 29:6186-6195.
- [3] Paintlia A S, Paintlia M K, Singh I, Singh A K. IL-4-induced peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation inhibits NF-kappaB trans activation in central nervous system (CNS) glial cells and protects oligodendrocyte progenitors under neuroinflammatory disease conditions; implication for CNS-demyelinating diseases[J]. *J Immunol*, 2006, 176:4385-4398.
- [4] Tsukuda K, Mogi M, Iwanami J, Min L J, Sakata A, Jing F, et al. Cognitive deficit in amyloid-beta-injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan partly because of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation[J]. *Hypertension*, 2009, 54:782-787.
- [5] Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence[J]. *Epilepsia*, 2006, 46:1724-1743.
- [6] Bordet R, Gel P, Duriez P, Fruchart J C. PPARs: a new target for neuroprotection[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006, 77:285-287.
- [7] Zhao Y, Patzer A, Herdegen T, Gohlke P, Culman J. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats[J]. *FASEB J*, 2006, 20:1162-1175.
- [8] Bernardo A, Levi G, Minghetti L. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) and its natural ligand 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in the regulation of microglial functions[J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12:2215-2223.
- [9] D'Ambrosio R. The role of glial membrane ion channels in seizures and epileptogenesis[J]. *Pharmacol Ther*, 2004, 103:95-108.

[本文编辑] 孙岩