

. 实验研究 .

蝎毒耐热蛋白对癫痫大鼠海马组织 BDNF 及 NPY 表达的影响

陈其钻 杨朋范 钟忠辉 林 巧 梅 珍 裴家生 王守森

【摘要】目的探讨蝎毒耐热蛋白(SVHRP)对癫痫大鼠海马组织脑源性神经营养因子(BDNF)和神经肽 Y(NPY)表达的影响。**方法**健康成年雄性 SD 大鼠 180 只,按随机区组法随机分为 3 组(SVHRP 组、模型组、正常组),每组 60 只动物。经颈部皮下注射 FeCl₂诱发癫痫急性发作,选取 4~5 级(Racine 的癫痫分级标准)癫痫发作的大鼠。HE 染色观察大鼠海马组织形态,免疫印迹法及荧光免疫组织化学染色检测大鼠海马组织 BDNF 和 NPY 的表达。**结果**HE 染色结果显示模型组大鼠海马组织形态结果破坏严重,而 SVHRP 组明显改善。模型组和 SVHRP 组大鼠海马神经 BDNF 及 NPY 表达水平均明显低于正常组($P<0.05$),但 SVHRP 组 BDNF 及 NPY 表达水平明显高于模型组($P<0.05$)。**结论**SVHRP 能够减轻癫痫大鼠海马组织病理损伤程度,上调海马组织 BDNF 及 NPY 表达。

【关键词】癫痫;蝎毒耐热蛋白;FeCl₂诱导癫痫模型;大鼠

【文章编号】1009-153X(2020)02-0098-03 **【文献标志码】**A **【中国图书资料分类号】**R 742.1; Q 786

Effects of scorpion venom heat-resistant protein on expressions of BDNF and NPY in hippocampal tissues in rats with epilepsy

CHEN Qi-zuan, YANG Peng-fan, ZHONG Zhong-hui, LIN Qiao, MEI Zhen, PEI Jia-shen, WANG Shou-sen. Department of Neurosurgery, No. 900 Hospital, Logistic Support, Command, PLA, Fuzhou 350025, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of scorpion venom heat-resistant protein (SVHRP) on the expressions of BDNF and NPY in hippocampal tissues in rats with epilepsy. **Methods** One hundred and eighty rats were randomly divided into 3 groups of 60 animals each, i.e. SVHRP treatment group, model group and normal group. The epileptic models were made by subcutaneous injection of FeCl₂. The expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neuropeptide Y (NPY) in the hippocampal tissues was detected by western blot and fluorescence immunohistochemical technique in all the animals. **Results** The levels of expressions of BDNF and NPY in hippocampal tissues were significantly higher in the normal group than those in the SVHRP treatment group ($P<0.05$), which were significantly higher than those in the model group ($P<0.05$). **Conclusions** SVHRP can increase the expressions of BDNF and NPY expressions in the hippocampal tissues in the rats with epilepsy.

【Key words】 Scorpion venom heat-resistant protein; FeCl₂; Epilepsy; Hippocampal neurons; BDNF; NPY; Rats

全蝎用于治疗癫痫、惊厥在中国已有几千年的历史。研究表明蝎尾中的蝎毒具有明显的抗癫痫、抗肿瘤、镇痛、促纤溶等作用^[1,2],其主要成分是蝎毒耐热蛋白(scorpion venom heatresistant protein, SVHRP)。癫痫急性发作期,常伴有海马组织脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)的表达上调,而通过抑制 BDNF 的酪氨酸激酶受体信号转导并增强 NPY 表达可能是癫痫潜在治疗方法,尤其是颞叶癫痫^[3]。本研究探讨 SVHRP 对癫痫大鼠海马组

织 BDNF 及 NPY 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及其分组 健康成年雄性 SD 大鼠 180 只,按随机区组法随机分为 3 组(SVHRP 组、模型组、正常组),每组 60 只动物。①SVHRP 组:制作癫痫模型后,每天同一时间腹腔注射一次 SVHRP,连续 10 d。②模型组:癫痫模型制作后,每天同一时间腹腔注射与治疗组等体积的生理盐水,连续 10 d。③正常组:不制作癫痫模型,连续 10 d,每天同一时间腹腔注射与治疗组等体积的生理盐水。

1.2 癫痫模型的制作 暴露颈部皮肤,经颈部皮下注射 FeCl₂诱发癫痫急性发作,选取 4~5 级(Racine 的癫痫分级标准)癫痫发作的大鼠。

1.3 HE 染色观察海马组织形态学 乙醚麻醉后,冰

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.02.012

基金项目:全军后勤科研计划面上项目(CNJ14J008)

作者单位:350025 福州,中国人民解放军联勤保障部队第 900 医院神经外科(陈其钻、杨朋范、钟忠辉、林 巧、梅 珍、裴家生、王守森)

通讯作者:杨朋范, E-mail:neurosurg.yang@163.com

上断头处死大鼠,分离双侧海马组织,吸水纸吸去表面血渍,4%多聚甲醛浸泡、固定 24 h,经脱水、透明、浸蜡、包埋等操作后,制备 5.0 μm 厚度的海马组织石蜡切片,行常规 HE 染色。

1.4 免疫印迹法检测海马组织 BDNF、NPY 蛋白的表达 在裂解缓冲液添加苯甲基磺酰氟用于提取大鼠海马组织总蛋白,并测定蛋白浓度。取等量蛋白行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,然后转移至聚偏氟乙烯膜上;冲洗 3 次后,置于含 5%脱脂牛奶的含吐温-20 磷酸盐缓冲液室温封闭 2 h;按 1:1 000 比例加入兔抗小鼠 BDNF 抗体、兔抗小鼠 NPY 抗体、兔抗小鼠 β -肌动蛋白抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;磷酸盐缓冲液洗膜 3 次,加入 1:5 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,室温孵育 2 h;含吐温-20 磷酸盐缓冲液洗膜,化学发光法成像分析免疫条带,凝胶电泳图分析软件分析目的条带与内参条带的灰度值,两者之比则可表示目的蛋白相对表达量。

1.5 荧光免疫组织化学染色检测海马组织 BDNF 及 NPY 的表达 多聚甲醛固定 24 h,经脱水、透明、包埋等过程,制备 5.0 μm 厚度的海马组织石蜡切片,兔抗小鼠 BDNF 抗体、兔抗小鼠 NPY 抗体、兔抗小鼠 β -action 抗体进行免疫荧光一抗孵育,使用 Cy3 标记的羊抗兔二抗来为 β -action 抗原显色,异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔二抗来为 BDNF、NPY 显色,荧光显微镜下观察切片组织形态,采用 Image J 软件进行定量分析。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 20.0 软件进行分析;计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析、LSD- t 检验、Dunnett- t 检验;计数资料采用 Fisher 精确概率法检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 海马组织病理形态学改变 正常组大鼠海马神经元排列整齐,胞浆淡染,轮廓完整,无周围组织细胞水肿(图 1A);模型组大鼠海马神经元排列紊乱,间隙增宽、数量减少,胞体变形、缩小,胞浆浓缩深染,出现核固缩、碎裂、溶解(图 1B);SVHRP 组大鼠海马组织神经元细胞损害情况有明显好转,虽细胞排列依旧紊乱,间隙相对较大,细胞数量减少、细胞深染等,但变形、深染细胞数量及细胞碎片明显减少,可观察到正常细胞形态结构(图 1C)。

2.2 SVHRP 对海马组织 BDNF、NPY 表达的影响 免疫印迹法检测可见模型组和 SVHRP 组大鼠海马组织 BDNF 及 NPY 表达水平均明显低于正常组($P<$

0.05,图 2),而 SVHRP 组 BDNF 及 NPY 表达水平明显高于模型组($P<0.05$,图 2)。免疫荧光定量分析结果显示,模型组和 SVHRP 组荧光强度较对照组明显减弱($P<0.05$,图 3、表 1),而 SVHRP 组大鼠海马组织荧光强度较模型组明显增高($P<0.05$,图 3、表 1)。

3 讨论

癫痫的病因及症状复杂多变,治疗仍以控制癫痫急性发作为主。由于癫痫长期反复发作,为控制癫痫反复发作,需长期服用大量的抗癫痫药物,不仅给病人家庭带来极大的经济负担,而且对自身身心及意志都是极大的摧残。有研究证实,蝎尾中提取的 SHRPV 不仅能够降低癫痫反复发作敏感性,而且对癫痫反复发作也有明显治疗功效。但是,由于

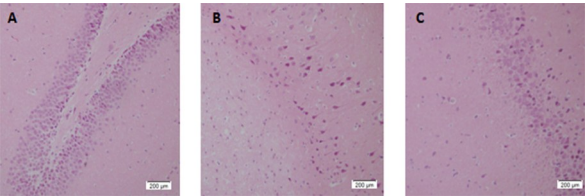


图 1 SVHRP 对癫痫大鼠海马组织病理形态的影响 (HE, $\times 40$)

A. 正常组;B. 模型组;C. SVHRP 组;SVHRP. 蝎毒耐热蛋白

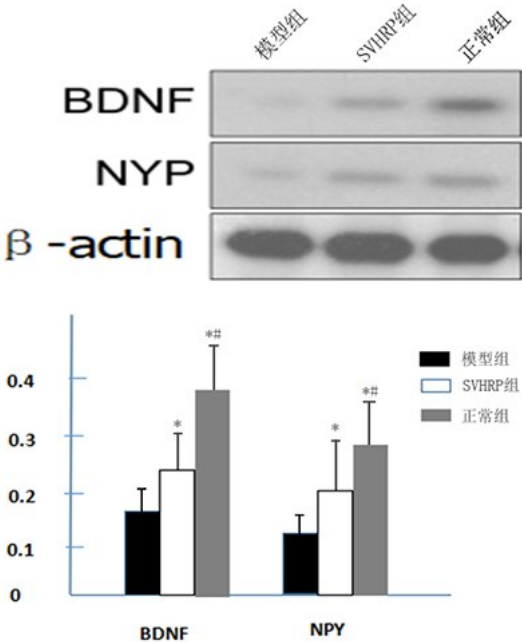
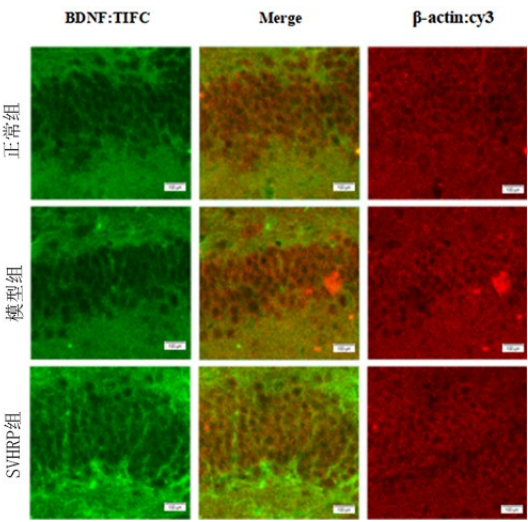


图 2 SVHRP 对癫痫大鼠海马组织 BDNF 和 NPY 蛋白表达的影响

与模型组相应值比,* $P<0.05$;与组相应值比,# $P<0.05$;SVHRP. 蝎毒耐热蛋白;BDNF. 脑源性神经营养因子 NPY. 神经肽 Y



【参考文献】

图3 SVHRP对癫痫大鼠海马组织BDNF和NPY蛋白表达的免疫荧光染色(×400)
SVHRP. 蝎毒耐热蛋白

表1 SVHRP对癫痫大鼠海马组织BDNF和NPY蛋白表达的免疫荧光染色定量结果

组别	BDNF	NPY
模型组	48.73±9.94	55.35±7.38
正常组	138.56±28.74 [#]	164.39±31.47 [#]
SVHRP组	101.24±19.87 ^{##}	119.43±28.92 ^{##}

注:与模型组相应值比, # $P<0.05$;与正常组相应值比, * $P<0.05$;SVHRP. 蝎毒耐热蛋白;BDNF. 脑源性神经营养因子 NPY. 神经肽 Y

SVHRP 富含神经毒素,成分较为复杂,药用成分分离、纯化困难,限制了其在抗癫痫中的应用。

BDNF增加可以相应地诱导NPY高表达,后者能对抗BDNF在癫痫发生、发展中的负面作用^[7]。在匹罗卡品所致海马脑片的癫痫模型中,癫痫放电后即出现BDNF的增高,且随之出现NPY的增加,二者保持了时间上的一致性^[8]。NPY基因过度表达能在遗传性全面性失神发作的癫痫大鼠模型中产生持续的抗癫痫作用,NPY基因治疗可能是治疗遗传性全面性癫痫的一种新方法^[9]。在大鼠颈部皮下注射NPY,发现癫痫大鼠癫痫发作症状的频率、持续时间、发放幅度均有不同程度缓解^[10],进一步证实NPY具有显著的抗癫痫作用。

总之,本文结果表明SVHRP干预可明显上调FeCl₂诱导的癫痫大鼠癫痫海马组织BDNF、NPY蛋白表达。然而,是否可以通过外源性给予BDNF或NPY,改善癫痫症状,有待后续进一步研究。

[1] 史磊,张天锡,杜聪颖,等. 中药全蝎活性成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2015, 17(4):89-91.

[2] 马向梅,王均宁. 有毒中药全蝎增效减毒配伍方法探讨[J]. 中华中医药杂志,2018,33(8):3659-3661.

[3] Lughetti L, Lucaccioni L, Fugetto F, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review [J]. *Neuropeptides*, 2018, 72: 23-29.

[4] 卓俊哲,黄婷,雷梓妍,等. 蝎毒对Hela细胞的体外药理学研究[J]. 经济动物学报,2019,22(1):1-5.

[5] Wang XG, Zhu DD, li N, *et al.* Scorpion venom heat-resistant peptide is neuroprotective against cerebral ischemia-reperfusion injury in association with the NMDA- MAPK pathway [J]. *Neurosci Bull*, 2019, 9(9): 1673-7067.

[6] Wang T, Wang SW, Zhang Y, *et al.* Scorpion venom heat-resistant peptide (SVHRP) enhances neurogenesis and neurite outgrowth of immature neurons in adult mice by up-regulating brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):84-94.

[7] Husum H, Bolwig T G, Sanchez C, *et al.* Levetiracetam prevents changes in levels of brain-derived neurotrophic factor and neuropeptide Y mRNA and of Y1- and Y5-like receptors in the hippocampus of rats undergoing amygdala kindling: implications for antiepileptogenic and mood-stabilizing properties [J]. *Epilepsy Behav*, 2004, 5(2): 204-215.

[8] Poulsen FR, Jahnsen H, Blaabjerg M, *et al.* Pilocarpine-induced seizure-like activity with increased BDNF and neuropeptide Y expression in organotypic hippocampal slice cultures [J]. *Brain Res*, 2002, 950(1-2): 103-118.

[9] Powell KL, Fitzqerald X, Shallue C, *et al.* Gene therapy mediated seizure suppression in genetic generalised epilepsy: neuropeptide Y overexpression in a rat model [J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 113: 23-32.

[10] Howell OW, Doyle K, Goodman JH, *et al.* Neuropeptide Y stimulates neuronal precursor proliferation in the post-natal and adult dentate gyrus [J]. *J Neurochem*, 2005, 93(3): 560-570.

(2019-07-09收稿,2019-12-09修回)