

氯喹对戊四氮致痫大鼠皮质和海马谷氨酸和 NMDAR1 表达的影响

张树华 朱长庚* 刘庆莹 魏 瑛 王 伟¹

(华中科技大学同济医学院神经科学研究所, 武汉 430030;

¹华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科, 武汉 430030)

【摘要】 目的 观察氯喹对戊四氮致痫大鼠皮质和海马谷氨酸 (glutamate, Glu) 和 N-甲基-D-天冬氨酸受体 1 (NMDAR1, NR1) 表达的影响, 探讨氯喹在癫痫发生发展过程中对神经递质传导的作用。方法 48 只健康雄性 SD 大鼠随机分为对照组 (12 只)、戊四氮致痫组 (60mg/kg, i. p., 18 只) 和氯喹干预组 (0.61mg/kg, i. c. v., 18 只)。每组分 6 个时间点: 1h、2h、4h、8h、12h 和 24h。观察大鼠行为表现和脑电图改变, 用免疫组化检测大鼠皮质和海马 Glu 和 NR1 的变化。结果 对照组无痫样发作, 戊四氮致痫组有重型的痫样发作 (III-V 级), 氯喹干预组有轻型的痫样发作 (I-III 级) ($P < 0.05$); 戊四氮致痫组脑电记录呈频发高幅的痫样波, 氯喹干预组痫样波幅低且缓; Glu 和 NR1 在戊四氮致痫组表达强, 以海马为著, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 氯喹干预组与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 氯喹通过对戊四氮致痫大鼠皮质和海马神经递质 Glu 和 NR1 信号传导通路的抑制作用, 影响致痫大鼠痫样发作的发生和发展。

【关键词】 谷氨酸; N-甲基-D-天冬氨酸受体 1; 癫痫; 戊四氮; 氯喹; 大鼠

【中图分类号】 R322.81 **【文献标识码】** A

EFFECTS OF CHLOROQUINE ON EXPRESSIONS OF GLUTAMATE AND NMDAR1 IN HIPPOCAMPUS AND CEREBRAL CORTEX OF RATS WITH SEIZURES INDUCED BY PENTYLENETETRAZOLE

Zhang Shuhua, Zhu Changgeng*, Liu Qingying, Wei Ying¹, Wang Wei

(Neuroscience Research Institute, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; ¹Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of chloroquine on the expressions of glutamate (Glu) and N-methyl-D-aspartate receptor 1 (NMDAR1, NR1) in hippocampus and cerebral cortex of rats with seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ), and to explore the role of chloroquine in the epileptogenesis and development process. Methods Forty-eight male adult SD rats were randomly divided into the control group ($n=12$), PTZ group (60mg/kg, i. p., $n=18$) and chloroquine intervening group (0.61mg/kg, i. c. v., $n=18$). Each group was further classified into 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, and 24h subgroups. The behavior and EEG of rats were observed and recorded. The expressions of Glu and NR1 in hippocampus and cerebral cortex were demonstrated with immunohistochemistry. Results The control group showed no seizure activity. Severe seizure activity was observed in the PTZ group (IV-V class), but slight seizure activity (I-III class) appeared in the chloroquine intervening group ($P < 0.05$). EEG showed that there were high amplitudes with higher rates in the PTZ group, but slow oscillations in the chloroquine intervening group. The expressions of Glu and NR1 were stronger in the PTZ group than those of the control group, especially in the hippocampal area ($P < 0.05$). There were no differences in the expressions of Glu and NR1 between chloroquine intervening and control groups. Conclusion Chloroquine, by inhibiting the signal transduction of Glu and NR1 in hippocampus and cerebral cortex, can alleviate the seizure activities. These results suggest that chloroquine may be an ideal anticonvulsant in preventing and treating epilepsy.

【Key words】 Glutamate; N-methyl-D-aspartate receptor 1; Epilepsy; Pentylenetetrazole; Chloroquine; Rat

【收稿日期】 2005-06-28 **【修回日期】** 2005-03-30

【基金项目】 国家自然科学基金重点项目资助 (No. 30230140)

【作者简介】 张树华, 男 (1961 年), 汉族, 博士研究生。

* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed)

癫痫是一种以局部神经元反复异常放电所引起的常见中枢神经系统疾病之一。研究证实^[1-11], 兴奋性氨基酸, 特别是谷氨酸 (glutamate, Glu) 的过度合成、释放以及 N-甲基-D-天冬氨酸受体

(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR) 活性增高与癫痫的发生发展和维持密切相关, 利用 NMDAR 阻断剂可以阻断多种实验动物癫痫的发生^[2,6], 提示谷氨酸、NMDAR 信号传导通路在癫痫的发生中发挥了关键作用。对在体和离体的动物实验研究和癫痫患者脑标本的研究中均发现 NMDAR 表达水平的增高^[2-8]。因此, 有效调控 Glu、NMDAR 信号传导通路对癫痫的防治具有重要意义。新近的研究发现, 作为传统抗疟疾药的氯喹具有广泛的药理作用^[12-13], 除具有抑制 DNA 复制的作用外, 还有抑制细胞蛋白质的合成和合成后的修饰及一些酶活性的作用, 并可与 CaM 结合抑制 Ca²⁺ 内流, 还有抑制 IL-1 β 和 TNF- α 的合成及分泌等作用。那末氯喹是否通过直接或间接作用抑制 Glu、NMDAR 信号传导通路而具有抗痫作用呢? 文献中尚未见报道, 本文旨在探讨氯喹对戊四氮致痫大鼠皮质和海马 Glu 和 NR1 表达的影响, 以期对癫痫的防治提供有价值的资料。

材料和方法

1. 实验动物及分组

成年健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (华中科技大学同济医学院实验动物中心提供) 48 只, 体重 180—240g, 实验室条件下饲养, 随机分为对照组 (12 只)、戊四氮致痫组 (18 只) 和氯喹干预组 (18 只), 每组分 6 个时间点: 1h、2h、4h、8h、12h 和 24h。对照组每个时间点 2 只, 实验组每个时间点 3 只。

2. 模型制备

大鼠用 0.4% 戊巴比妥钠 (40mg/kg) 腹腔注射麻醉, 然后固定于江湾 II 型立体定位仪上行右侧脑室注射, 注射点坐标为: 前囟后 0.8mm, 中线右旁开 1.5mm, 硬膜下 3.8mm。戊四氮致痫组经腹腔注射戊四氮 (60mg/kg, Sigma 公司) 致痫; 氯喹干预组预先在侧脑室注射氯喹 6 μ l (0.61mg/kg, i. c. v., 上海化学工业公司), 5min 内缓慢注完, 留针 5min 后缓慢起针, 2h 后腹腔注射戊四氮致痫; 对照组在侧脑室注射生理盐水 6 μ l, 方法同前。

3. 行为学观察和脑电记录

注射后观察并记录 3 组大鼠的行为表现, 参照 Smialowski 的评估标准分为 6 级^[14]: 0 级—无反

应; I 级—出现面部抽动、吸气声、点头和跑动; II 级—前肢阵挛; III 级—阵挛伴有站立; IV 级—全身性痉挛伴有站立或跌倒; V 级—痫样发作伴有跌倒和周期性强直痉挛。 \leq III 级为轻型发作, IV—V 级为重型发作。大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪, 电极植入点为海马: 前囟后 3.6mm, 中线旁开 2.0mm, 硬膜下 3.3mm; 皮层: 中线旁开 4.0mm, 硬膜下 0.5mm。全部电极采用牙托粉加 502 胶固定。脑电记录仪采用日本 San-EI 型 8 导脑电图机, 鼻尖作单极参考记录。定标: 2mm = 50 μ v, 纸速为 15mm/s。

4. 灌注取材

大鼠麻醉后仰卧固定, 开胸经升主动脉灌注。先用 150ml 37 $^{\circ}$ C 生理盐水快速灌注, 然后灌注 4% 多聚甲醛溶液 (0.1mol/L PB 配制, pH7.4) 400ml, 1h 灌注完毕后开颅取脑, 后固定于 4% 多聚甲醛溶液中 5—6h (4 $^{\circ}$ C), 再置于 20% 蔗糖溶液 (pH7.4) 中 4 $^{\circ}$ C 过夜, 待组织块沉底后用恒冷箱 (-20 $^{\circ}$ C) 切片作额状切片, 厚度为 30 μ m, 取含大脑皮质、梨状区和背侧海马最大断面的切片供做免疫组织化学染色, PBS 接片。

5. 免疫组织化学染色

切片经 0.01mol/L PBS 充分洗涤后置于 0.3% H₂O₂-甲醇中 20min 阻断内源性过氧化物酶, 然后在 1:40 牛血清中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 依次入兔抗 Glu 抗体 (1:1500, Santa Cruz 公司) 4 $^{\circ}$ C 48h, 生物素化羊抗兔 IgG (1:200, 北京中山公司) 和 SA/HRP (1:200, 北京中山公司) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; 鼠抗 NR1 单克隆抗体 (1:200, Santa Cruz 公司) 4 $^{\circ}$ C 48h, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:200, 北京中山公司) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。DAB 显色。其间用 0.01mol/L PBS 充分洗涤, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 光镜观察。

阴性对照实验用 PBS 代替一抗孵育切片, 结果为阴性。

6. 图像分析及统计处理

采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统进行图像分析。每只动物测 2 张切片, 每张测海马 CA1、CA3、齿状回 (DG) 和大脑皮质, 在 100 倍视野下获取各区的平均光密度 (OD) 值, 数据由分析系统自动计算。统计学检验: 痫样发作程度比较采用 χ^2 检验, Glu 和 NR1 OD 值差异检

验采用方差分析, q 检验, 以 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

结 果

1. 行为学观察和脑电图记录

对照组无痫样发作; 戊四氮致痫组在注射 1min 左右后即出现前后肢阵挛、全身性痉挛伴有站立或跌倒、或有跌倒和周期性强直痉挛, 持续 2—3 min, 间隔 1—2min 再次发作, 但程度递减, 发作间隔时间延长, 0.5—1h 后只在受到刺激 (如

声、光等) 时才出现 I—II 级的痫样发作; 氯喹干预组在注射戊四氮 2min 左右后大鼠出现痫样发作, 其程度较戊四氮组轻, 多表现为出现面部抽动、点头和跑动、前肢阵挛或阵挛伴有站立, 持续时间 1.5min 左右, 两组结果比较差异有显著性 ($P < 0.05$, 表 1)。脑电图记录显示对照组无痫样放电, 戊四氮致痫组呈现频发高幅的尖波、棘波、棘慢波或棘慢复合波, 氯喹干预组显示慢波和小棘波 (图 1a—c)。

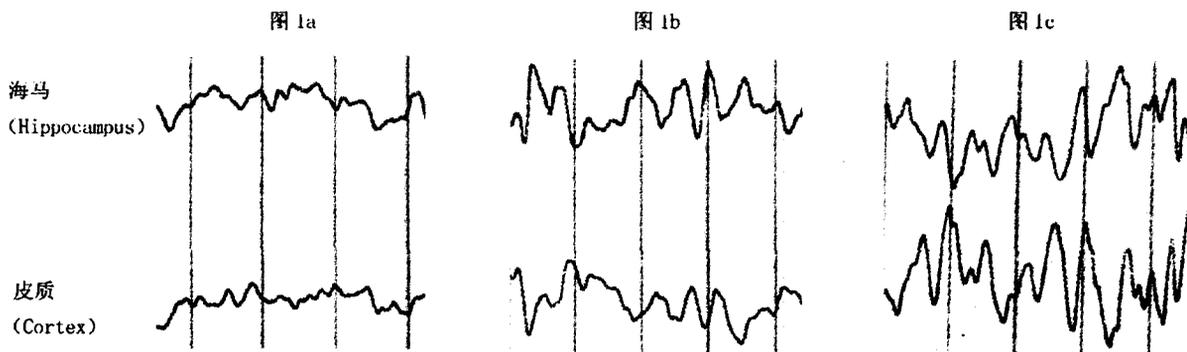


图 1 3 组大鼠 EEG 记录结果

Fig. 1 The results of EEG recording in 3 groups

a: 对照组皮质和海马脑电图; b: 氯喹干预组皮质和海马脑电图; c: 戊四氮致痫组皮质和海马脑电图
a: EEG of control group; b: EEG of chloroquine intervening group; c: EEG of PTZ group

表 1 3 组实验动物痫样发作程度、潜伏期和持续时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of seizure intensity, latent period and duration time among 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 (Group) | 例数 (n) | 发作程度 (Seizure intensity) | | | 潜伏期 (min) (Latent time)(min) | 持续时间 (min) (Lasting time)(min) |
|-------------------|-----------|--------------------------|---------------|---------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| | | 无 (No) | 轻 (Slight) | 重 (Severe) | | |
| 对照组 (Control) | 12 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 戊四氮组 (PTZ) | 18 | 0 | 3* | 15* | 2.78±0.39** | 1.70±0.58** |
| 氯喹组 (Chloroquine) | 18 | 0 | 12 | 6 | 1.29±0.31 | 2.44±0.29 |

与氯喹干预组比较 (compared with chloroquine intervening group) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2. Glu 和 NR1 免疫组化结果

Glu 呈胞浆表达 (图 2a—c), 其在戊四氮致痫组的海马 CA1 区、CA3 区、DG 和皮质的表达较氯喹干预组强, 以海马为著 ($P < 0.05$, 表 2), 氯喹干预组与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2)。NR1 主要表达于胞膜, 胞浆也呈不同程度

表达 (图 3a—c), 阳性细胞在皮质各层内弥散分布, 但以锥体细胞层表达强, 在海马 CA1、CA3 和 DG 的锥体细胞层和颗粒细胞层均有强的表达, 3 组作比较后发现, NR1 在戊四氮致痫组的皮质和海马表达较氯喹干预组和对照组强, 差异有显著性 ($P < 0.05$, 表 2)。

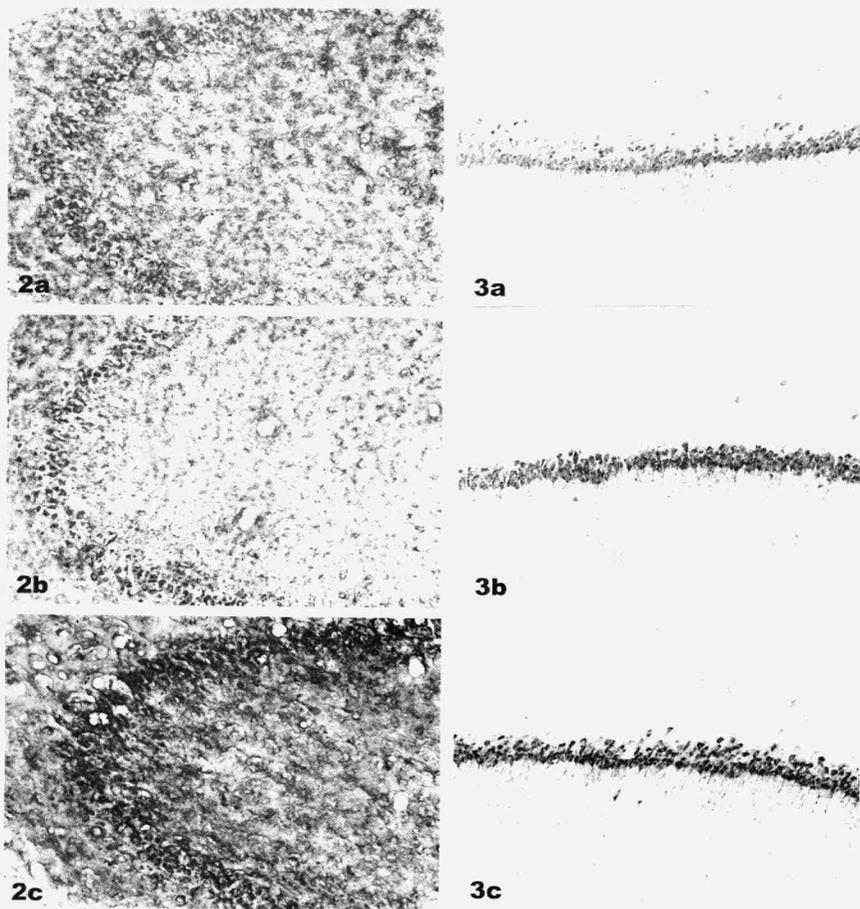


图 2a 对照组海马 CA3 Glu 免疫组化染色。×160

图 2b 氯喹干预组海马 CA3 Glu 免疫组化染色。×160

图 2c 戊四氮致痫组海马 CA3 Glu 免疫组化染色。×160

图 3a 对照组海马 CA1 NR1 免疫组化染色。×100

图 3b 氯喹干预组海马 CA1 NR1 免疫组化染色。×100

图 3c 戊四氮致痫组海马 CA1 NR1 免疫组化染色。×100

Fig. 2a Showing Glu immunostaining of hippocampal CA3 in control group. ×160

Fig. 2b Showing Glu immunostaining of hippocampal CA3 in chloroquine intervening group. ×160

Fig. 2c Showing Glu immunostaining of hippocampal CA3 in PTZ-induced group. ×160

Fig. 3a Showing NR1 immunostaining of hippocampal CA1 in control group. ×100

Fig. 3b Showing NR1 immunostaining of hippocampal CA1 in chloroquine intervening group. ×100

Fig. 3c Showing NR1 immunostaining of hippocampal CA1 in PTZ-induced group. ×100

表 2 Glu 和 NR1 在大鼠海马 CA1、CA3、DG 和皮质区平均光密度 (OD) 的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of Glu and NR1 average OD values of hippocampus and cerebral cortex among 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 (Group) | 例数 (n) | Glu OD value | | | | NR1 OD value | | | |
|-------------------|-----------|------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | CA1 | CA3 | DG | Cerebral cortex | CA1 | CA3 | DG | Cerebral cortex |
| 对照组 (Control) | 12 | 0.255 ± 0.023 | 0.259 ± 0.0222 | 0.265 ± 0.024 | 0.274 ± 0.025 | 0.239 ± 0.021 | 0.246 ± 0.019 | 0.246 ± 0.020 | 0.250 ± 0.022 |
| 戊四氮组 (PTZ) | 18 | 0.285 $\pm 0.022^*$ | 0.286 $\pm 0.023^{**}$ | 0.298 $\pm 0.025^{**}$ | 0.292 $\pm 0.026^*$ | 0.259 $\pm 0.019^*$ | 0.261 $\pm 0.018^*$ | 0.278 $\pm 0.022^{**}$ | 0.275 $\pm 0.023^{**}$ |
| 氯喹组 (Chloroquine) | 18 | 0.256 ± 0.025 | 0.262 ± 0.025 | 0.273 ± 0.036 | 0.268 ± 0.037 | 0.241 ± 0.019 | 0.249 ± 0.021 | 0.251 ± 0.021 | 0.247 ± 0.025 |

与对照组比较 (compared with control group) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

癫痫发生时, 由于 Glu 过度释放和突触前膜的再摄取障碍^[1-3], 致使 Glu 在癫痫发生灶中浓度升高, 同时 NMDARs 激活造成特定脑区神经元兴奋, 导致同步异常放电产生惊厥。因此, Glu、NMDARs 信号传导通路的激活对癫痫的发生、发展和维持方面起重要作用。在体和离体的癫痫动物模型均显示^[1-7], 癫痫发作时, NR1 在皮质和海马的表达增强, 同时显示 Glu 不仅参与癫痫的产生, 而且引起神经元损伤, 这种损伤又可以成为癫痫的致病原因。在颞叶癫痫患者的脑标本也显示 NR1 表达的增加^[4]。研究证明, Glu 信号传导通路的激活实是一个十分复杂的过程^[1-3]: 释出的 Glu 首先激活非 NMDA 受体 (如 AMPA 受体), Ca^{2+} 内流引起靶细胞去极化, 使 NMDA 受体离子通道中的 Mg^{2+} 解离, Glu 进一步激活 NMDA 受体, 使 Ca^{2+} 进一步内流; 胞内 Ca^{2+} 升高除进一步引起一系列 Glu 的兴奋效应外, 还可进一步激活 PKC (蛋白激酶 C) 引起一系列的级联反应, 致使多种底物蛋白磷酸化, 如持续激活 PKA (依赖 cAMP 的蛋白激酶) 后其活性亚基可进入细胞核, 激活基因转录促使新蛋白合成和新突触形成, 建立新的突触联系, 为癫痫的进一步发展和扩散创造结构基础。对 NMDAR 的克隆研究发现其由两个亚基构成^[8], 即 NR1 和 NR2A-2D, 其中 NR1 为功能亚基。因此, NMDA 受体的激活、 Ca^{2+} 的细胞内内流以及一系列酶的激活, 在癫痫的发病中具有重要意义。

实验结果显示, 在行为表现方面, 预先注射氯喹后再注射戊四氮大鼠的痫样发作程度较单纯注射

戊四氮致痫大鼠的轻, 持续时间短, 说明氯喹具有降低大鼠的痫样发作程度、延迟痫样发作时间和延长发作间隔时间的作用; 脑电记录结果显示, 单纯注射戊四氮致痫的大鼠呈典型的痫样放电, EEG 为高幅的尖波、棘波、棘慢综合波, 预先给予氯喹后再注射戊四氮致痫的大鼠, EEG 显示为慢波和小幅的尖波, 表明痫样放电受到明显抑制。免疫组织化学结果显示, Glu 和 NR1 在单纯注射戊四氮致痫的大鼠表达明显增强, 以海马区为著, 与文献报告相符^[2-7]。在预先注射氯喹后再注射戊四氮的大鼠, Glu 和 NR1 的表达则无明显增强的趋势, 表明氯喹对 Glu 和 NR1 的表达有抑制作用。

关于氯喹的上述作用机制, 可通过其以下药理作用来解释: ①多种癫痫样模型均显示 NMDA 受体数量增加^[2-8], 而氯喹能使一些细胞器内的 pH 升高^[10], 影响 Fe^{2+} 从转铁蛋白的解离, 降低了细胞内铁的浓度, 干扰细胞内铁的代谢, 影响进入 DNA 复制途径和基因表达途径中的几种酶的活性, 从而影响 DNA 的复制和基因的转录, 抑制蛋白质的合成和新突触的形成; ②能使核内体 (endosome)、高尔基器和溶酶体内 pH 升高, 由此影响一些酶的活性, 包括酸性水解酶、蛋白质修饰酶等^[12], 干扰了蛋白质的合成和/或蛋白质合成后的修饰, 而使蛋白质合成降低或不具有活性, 同时影响 Glu 的合成和释放; ③Glu 和 NR1 信号传导通路激活的一个重要环节是细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 氯喹具有与 CaM 结合、抑制细胞 Ca^{2+} 内流的作用^[12], 由此影响 Glu、NR1 信号传导通路的传递效率, 或在某种程度上起阻断作用; ④新近的研究结果显示^[8], IL-1 β 和 NMDARs 之间存在功能上的相互作用: IL-1 β 能够提高 NMDA 受体功能,

并通过 NMDA 受体增加或促进谷氨酸的作用。另有实验资料显示, TNF- α 与 Glu 的代谢和星形胶质细胞的功能有关^[9-11], 如将胚胎脑细胞与 TNF- α 共同孵育^[10], 发现星形胶质细胞对 Glu 的摄取功能受到抑制, 间接影响 Glu 代谢, 导致神经元兴奋性增强。氯喹通过抑制胶质细胞 IL-1 β 和 TNF- α 合成和分泌, 从而抑制 Glu、NR1 信号传导通路的激活。

综上所述, 氯喹通过不同途径、多个环节对 Glu、NR1 信号传导通路激活的干预, 从而影响癫痫的发生和发展。氯喹的这一作用可能在防治癫痫的发生发展和复发方面具有重要意义, 但氯喹的具体作用机制尚需进一步深入探讨。

参 考 文 献

- [1] 朱长庚. 神经-内分泌-免疫与癫痫发病的关系. 解剖学报, 2002, 33 (3): 321-324
- [2] Dingleline R, McBain CJ, McNamara JO. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. Trends Pharmacol, 1990, 11 (2): 333-338
- [3] McNamara JO. The neurobiological basis of epilepsy. Trends Neurosci, 1992, 15 (3): 357-359
- [4] 单巍松, 张国荣, 梁英武, 等. 听源性惊厥上调惊厥易感大鼠脑内 NR1 基因的表达, 神经解剖学杂志, 1997; 13 (1): 19-24
- [5] Mathern GM, Pretorius JK, Mendoza D, et al. Increased hippocampal AMPA and NMDA receptor subunit immunoreactivity in temporal lobe epilepsy patients. J Neuropathol Exp Neurol, 1998, 57 (6): 615-634
- [6] Sutula T, Koch J, Golarai G, et al. NMDA receptor dependence of kindling and mossy fiber sprouting: evidence that the NMDA receptor regulates patterning of hippocampal circuits in the adult brain. J Neurosci, 1996, 16 (31): 7398-7406
- [7] Zhu LT, Chen Z, Zhang LS, et al. Spatiotemporal changes of the N-methyl-aspartate receptor subunit levels in rats with pentylentetrazole induced seizures. Neurosci Lett, 1004; 356 (1): 53-56
- [8] Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, et al. Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the src family of kinases. J Neurosci, 2003, 23 (25): 5692-5700
- [9] Fine SM, Angei RA, Perry SW, et al. Tumor necrosis factor- α inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. J Biol Chem, 1996, 271 (26): 15303
- [10] Nofech-Mozes Y, Yuhay Y, Kaminsky E, et al. Induction of mRNA for tumor necrosis factor- α and interleukin-1 beta in mice brain, spleen and liver in an animal model of Shigella-related seizures. Isr Med Assoc J, 2000, 2 (2): 86-90
- [11] Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α ; amplification by microglia triggers neurotoxicity. Nat neurosci, 2001, 4 (7): 702-712
- [12] Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, et al. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? Lancet Infectious Diseases, 2003, 3 (11): 722-727
- [13] 李晓升, 宋关鸿. 评述氯喹的作用机制假说. 中国人兽共患疾病杂志, 1999, 15 (4): 101-103
- [14] Diehl RG, Smialowski A, Gotwo T. Development and persistence of kindled seizures after repeated injection of pentylentetrazole in rats and Guinea pigs. Epilepsia, 1984, 25 (4): 506-510