

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2015) 04 - 0307 - 04

白藜芦醇对慢性癫痫大鼠脑组织中氨基酸类递质含量的影响

李 敏¹, 潘群皖¹, 王海华¹, 孔德虎², 王烈成²

(1. 皖南医学院 生理学教研室, 安徽 芜湖 241002; 2. 安徽医科大学 生理学教研室, 安徽 合肥 230032)

【摘要】目的: 测定慢性癫痫大鼠脑组织谷氨酸(Glu) 和 γ -氨基丁酸(GABA) 含量, 分析白藜芦醇抗癫痫作用机制。方法: 动物分为生理盐水组(NS 组)、癫痫组(KA 组)、低剂量白藜芦醇组(L-Res 组) 和高剂量白藜芦醇组(H-Res 组)。利用立体定位技术, 在大鼠右侧海马 CA3 中心区注射海人草酸, 建立癫痫大鼠模型, 以高、低剂量白藜芦醇干预 10 d, 利用高效液相色谱法测定慢性癫痫大鼠海马和皮层 Glu 和 GABA 含量。结果: 与 NS 组比较, KA 组大鼠海马和皮层 Glu 含量、Glu/GABA 比值均明显升高($P < 0.05$); 与 KA 组比较, L-Res 组大鼠海马 Glu 含量、Glu/GABA 比值均明显降低($P < 0.05$), 但皮层 Glu 含量、Glu/GABA 比值却明显高于 NS 组($P < 0.05$); H-Res 组大鼠海马和皮层 Glu 含量、Glu/GABA 比值均明显高于 NS 组($P < 0.05$)。结论: 白藜芦醇通过维持海马 Glu/GABA 平衡达到抗癫痫作用效果。

【关键词】高效液相色谱; 氨基酸; 癫痫; 白藜芦醇

【中图分类号】R285.5 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2015.04.001

Effects of resveratrol on the changes of amino acids level in brain tissues in chronic epilepsy rats

LI Min, PAN Qunwan, WANG Haihua, KONG Dehu, WANG Liecheng

Department of Physiology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the mechanisms of resveratrol in anti-epilepsy through determining the contents of glutamic acid (Glu) and γ -aminobutyric acid (GABA) in rats with chronic epilepsy. **Methods:** Animals were divided into saline group (NS group), epilepsy group (KA group), low-dose resveratrol group (L-Res group) and high-dose resveratrol group (H-Res group). Animal models of epilepsy were induced by injection of kainic acid (KA) into the center of the CA3 region of the right hippocampus with stereotaxic technology. Resveratrol was intragastrically administered immediately following the first onset of seizure, once a day, for consecutive 10 days. Hight performance liquid chromatography (HPLC) was performed to detect the contents of Glu and GABA in hippocampus and cortex of model rats. **Results:** Compared with NS group, the contents of Glu and the ratio of Glu/GABA in hippocampus and cortex were increased significantly in KA group ($P < 0.05$), whereas the contents of Glu and the ratio of Glu/GABA in hippocampus was decreased in rats treated with L-Res group compared to KA group ($P < 0.05$), and the rats treated with H-Res group had higher level of Glu and ratio of Glu/GABA in cortex and in hippocampus ($P < 0.05$). **Conclusion:** Resveratrol may produce anti-epileptic effects by reversing the imbalance between Glu and GABA in hippocampus in chronic epilepsy rats.

【Key words】 HPLC; amino acid; epilepsy; resveratrol

目前, 中枢神经系统内兴奋性和抑制性氨基酸含量的变化, 尤其是两者比例的失衡可能是导致癫痫发作的直接原因^[1]。药物干预是临床上癫痫治疗的主要手段, 然而常见的抗癫痫药物被指出导致记忆力减退、认知水平下降等副作用, 长期服用甚至会造成药物耐受和成瘾^[2]。白藜芦醇(resveratrol, Res) 广泛存在于葡萄、花生、决明子等大约 70 多种植物中, 对神经元有一定的营养、损伤修复作用。既往研究发现^[3] Res 可以保护颞叶癫痫大鼠 CA1 和 CA3a 区神经元活性, 抑制苔藓纤维发芽(mossy fi-

bres sprouting, MFS) 遏制癫痫自发发作。Res 作为一种神经保护因子, 能否维持中枢神经系统兴奋性-抑制性平衡达到抗癫痫作用效果至今未见报道。为此, 本研究建立慢性癫痫动物模型, 选择异硫氰酸苯酯(phenyl isothiocyanate, PITC) 结合高效液相色谱法检测氨基酸含量, 从中枢神经系统氨基酸递质水平角度对白藜芦醇抗癫痫效果作以下报道。

1 材料与方法

1.1 试剂 谷氨酸(glutamic acid, Glu), γ -氨基丁

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81071075); 安徽省教育厅自然科学基金重点项目(KJ2007A028)

收稿日期: 2015-03-11

作者简介: 李 敏(1985-), 女, 助教, 硕士, (电话) 18855301525, (电子信箱) limin851022@163.com;

王烈成, 男, 教授, 博士生导师, (电子信箱) wangliecheng@ahmu.edu.cn, 通讯作者。

酸 (gamma-aminobutyric acid ,GABA) ,海人草酸 (kainic acid KA) ,PITC 均购自 Sigma 公司; 白藜芦醇(纯度≥98%) 购自西安中鑫生物技术有限公司。

1.2 仪器 用卡 SN-2 型鼠类脑立体定位仪 ,日本 Narishige 科学仪器公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪、Venusil-AA 氨基酸分析专用柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm) 美国 Agilent 公司。

1.3 动物分组及癫痫模型建立 SPF Wistar 雄性大鼠(250 ± 20) g ,南京医科大学实验动物中心提供 [SCXK(苏) 2002-0031] ,分为生理盐水组(NS 组 n = 3) ,癫痫组(KA 组 n = 4) ,低剂量白藜芦醇组 [L-Res 组 ,15 mg/(kg · d) n = 3] ,高剂量白藜芦醇组 [H-Res 组 30 mg/(kg · d) n = 4]。

大鼠经水合氯醛(350 mg/kg) 腹腔麻醉后 ,固定于立体定位仪上 ,暴露颅骨 ,右侧海马 CA3 中心区参照大鼠脑立体定位图谱^[4] :前囟后 4.0 mm ,矢状缝旁开 4.4 mm ,硬脑膜下 3.8 mm。将 2.5 μL KA(0.4 g/ L) 注射入海马 CA3 区 ,术后缝合头皮; 对照组同法在 CA3 区注射生理盐水。依据 Racine 分级标准^[5] ,I 级: 咀嚼、眨眼、立须等面部肌肉抽搐; II 级: 以点头运动为主的颈部肌肉抽搐; III 级: 单侧前肢阵挛、抽搐; IV 级: 双侧前肢阵挛、抽搐伴身体立起; V 级: 双侧后肢强直 ,身体背曲强直 跌倒伴全身阵挛。观察 1 ~ 6 h 癫痫急性发作程度达 IV 级以上者为成功模型大鼠。L-Res 组和 H-Res 组在癫痫首次大发作后即通过灌胃给药 ,每天 1 次 ,持续 10 d; NS 组和 KA 组同时灌胃生理盐水。

1.4 脑组织样品处理 大鼠断头取脑 ,分离海马和颞叶皮层 称质量; 加生理盐水 ,电动匀浆 10 s(25 000 r/min) ,匀浆液经 4 °C 离心 20 min(12 000 r/min) ,取上清 ,加 3 倍体积乙腈混匀 4 °C 离心 10 min(12 000 r/min) ,取上清 ,经冷冻干燥后 ,流动相 A 溶解 4 °C 离心 10 min(12 000 r/min) 取上清 ,流动相 A 稀释 4 °C 保存。

1.5 色谱条件 流动相 A: 50 mmol/L 乙酸钠(pH 5.5 ,含 5% 甲醇) ,流动相 B: 100% 乙腈; 进样量: 50 μL; 流速: 1 mL/min; 柱温: 40 °C; 紫外检测波长: 254 nm; 梯度洗脱程序(表 1) 。

1.6 衍生化反应 混合氨基酸标准溶液或稀释样品 200 μL 置于 1 mL 离心管中 ,加入三乙胺乙腈溶液 100 μL ,PITC 乙腈溶液 100 μL ,混匀 ,室温放置 1 h ,加入正己烷 400 μL ,振摇后放置 10 min 将上层正己烷去除 ,再加 400 μL 正己烷 ,振摇后放置 10 min ,取下层溶液 0.45 μm 滤膜过滤 ,收集在进样管中。

1.7 统计学分析 实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示 ,采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析 ,组间资料采用单因素方差分析进行比较 ,组内差异在单因素方差分析后利用 LSD 法进行比较。P < 0.05 具有统计学意义。

表 1 洗脱梯度表

Tab 1 List of gradient elution

Time(min)	A(%)	B(%)
0	100	0
20	90	10
30	82	18
40	70	30
40.01	0	100
50.00	0	100
50.01	100	0

A: 50 mmol/L sodium acetate ,B: 100% acetonitrile

2 结果

2.1 HPLC 色谱检测 空白试剂除杂质峰外 ,无其他色谱峰(图 1A) ;氨基酸混合标准溶液中 Glu 的保留时间为 16.58 min ,GABA 的保留时间为 29.70 min(图 1B) ;癫痫大鼠海马样品杂质峰、试剂峰与氨基酸峰分离良好(图 1C) 。

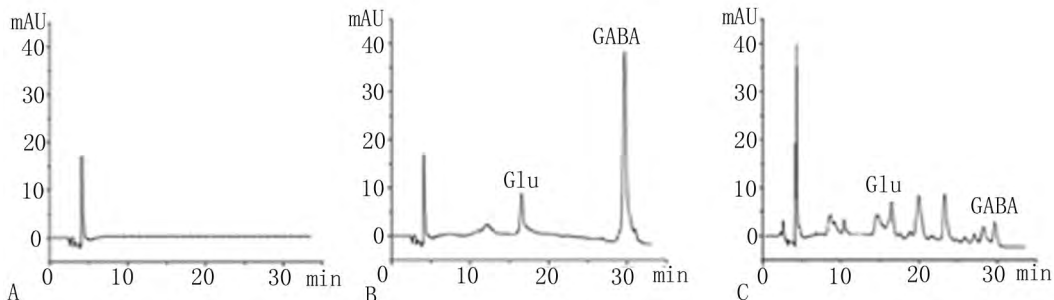


图 1 空白试剂 ,氨基酸标准溶液和海马样品的色谱结果

Fig 1 HPLC findings by blank reagents ,standard amino acids and hippocampus samples

2.2 慢性癫痫大鼠海马和皮层氨基酸递质含量
KA 注射 2 周后,大鼠进入癫痫慢性发作期,相继出现不同形式的自发性发作,主要表现为:活动时突然停止、身体不平衡经常性跌倒、四肢强直伴抽搐,在笼内狂奔等,持续 10~40 s 不等。测得癫痫慢性发作期大鼠海马和皮层 Glu、GABA 含量及 Glu/GABA 比值如下:与 NS 组比较,KA 组大鼠海马和皮层 Glu

含量、Glu/GABA 比值均明显升高($P < 0.05$);与 KA 组比较,L-Res 组大鼠海马 Glu 含量、Glu/GABA 比值均明显降低($P < 0.05$),但皮层 Glu 含量、Glu/GABA 比值均明显高于 NS 组($P < 0.05$);H-Res 组大鼠海马和皮层 Glu 含量、Glu/GABA 比值均明显高于 NS 组($P < 0.05$),见表 2。

表 2 慢性癫痫大鼠海马和皮层 Glu、GABA 含量及 Glu/GABA 比值($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The ratio of Glu/GABA and contents of Glu、GABA in hippocampus and cortex in chronic epilepsy rats($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Hippocampus			Cortex		
		Glu	GABA	Glu/GABA	Glu	GABA	Glu/GABA
NS	3	0.28 ± 0.24	0.03 ± 0.01	8.90 ± 6.28	0.12 ± 0.11	0.02 ± 0.01	7.19 ± 4.24
KA	4	1.19 ± 0.69*	0.07 ± 0.03	18.24 ± 6.49*	1.11 ± 0.38*	0.07 ± 0.01	15.48 ± 3.45*
L-Res	3	0.39 ± 0.07#	0.04 ± 0.01	9.44 ± 4.32#	1.04 ± 0.35*	0.05 ± 0.01	18.82 ± 3.08*
H-Res	4	1.24 ± 0.29*	0.06 ± 0.03	19.62 ± 3.27*	0.98 ± 0.30*	0.07 ± 0.00	14.48 ± 3.00*
F		4.638	2.916	5.124	7.003	3.007	6.170
P		0.028	0.087	0.021	0.008	0.076	0.012

* $P < 0.05$ compared with NS group # $P < 0.05$ compared with KA group

3 讨论

3.1 氨基酸递质和癫痫 Glu 及其类似物大剂量作用于哺乳动物可引起细胞的变性死亡,称为 Glu 兴奋性毒性作用^[6]。Glu 的清除依赖于谷氨酸转运体摄取,是维持细胞外 Glu 处于较低浓度,保护神经元免受毒性损伤的主要途径。Ueda 指出^[7]:癫痫大鼠海马谷氨酸转运体 mRNA 的表达在 KA 注射后 4 h 明显降低,5 d 后降低更明显。Eid^[8]指出星形胶质细胞中谷氨酸转运体合成酶缺陷是细胞外 Glu 聚集的分子基础。本研究中慢性癫痫大鼠海马和皮层 Glu 浓度增加可能是由于 Glu 特异性转运体功能障碍所致。

既往研究显示^[3],海人草酸诱导的慢性癫痫大鼠海马 CA1、CA3 区和 DG 门区神经元大量死亡,颗粒细胞内分子层和 CA3 区锥体细胞分子层可观察到大量苔藓纤维发芽,并伴有海马 KA 受体表达显著增加。推测 Glu 可能是通过 KA 受体介导兴奋性毒性作用,诱发海马 CA3 区神经元死亡,造成苔藓纤维突触后膜空位,导致苔藓纤维与自身或颗粒细胞层的其他颗粒细胞形成过度的兴奋性通路,增强谷氨酸能兴奋性突触传递,提高了海马神经元同步化放电的几率,进而引发癫痫的发作。

Glu 在谷氨酸脱羧酶作用下脱羧生成 GABA,后者是脑内重要的抑制性递质。本研究中,GABA 含量变化并不明显,但海马 Glu/GABA 比值却明显增高,皮层 Glu/GABA 比值亦表现严重失衡,推测在癫

痫发展到慢性期,由于长期 Glu 兴奋性毒性作用已经波及并造成更大的脑边缘系统损伤(即癫痫病灶扩大化)。对颞叶癫痫伴海马硬化的患者研究显示^[9]在神经元变性死亡的 CA1 区、CA3 区和 DG 门区,谷氨酸转运体蛋白表达减少,谷氨酸脱羧酶表达亦减少。这样细胞外大量积聚的 Glu,逐渐流向谷氨酸转运蛋白缺乏区,使得邻近神经元同步化放电频率增加,从而引起慢性癫痫的自发作。

3.2 Res 对慢性癫痫大鼠脑组织 Glu/GABA 平衡的维持 Res 作为一种外源性生物活性物质,通过抗氧化、清除自由基,对神经元起到营养、损伤修复作用。既往研究^[3]证实 Res 对 CA1 和 CA3a 区神经元的保护尤其是对 CA3a 区神经元的保护,使苔藓纤维的突触没有形成完全的空位,存活的 CA3a 区的锥体神经元通过代偿性作用抑制苔状纤维发芽,但 Res 对 DG 门区和 CA3b 和 CA3c 区神经元没有明显的保护作用。本研究中,低剂量 Res 对慢性癫痫大鼠海马 Glu/GABA 比值失衡具有明显保护作用,但对皮层 Glu/GABA 比值失衡没有明显保护作用。推测 Res 对海马神经元的保护可能是通过遏制 Glu 兴奋性毒性作用产生的自由基、活性氧对其神经元的伤害,继而维持兴奋性-抑制性的平衡,但对更大范围的皮层几乎无保护作用。另外,本研究中,高剂量 Res 对海马和皮层 Glu/GABA 比值失衡均没有保护作用。有研究甚至指出当给予高剂量 Res

(下转第 313 页)

否一致尚需进一步实验研究。

【参考文献】

[1] Chiang YC ,Hung TW ,Lee CW ,et al. Enhancement of tolerance development to morphine in rats prenatally exposed to morphine , methadone and buprenorphine[J]. J Biomed Sci 2010 ,17: 46.

[2] Timár J ,Sobor M ,Király KP ,et al. Peri ,pre and postnatal morphine exposure: exposure-induced effects and sex differences in the behavioural consequences in rat offspring [J]. Behav Pharmacol , 2010 21(1) : 58 – 68.

[3] Malanga CJ ,Kosofsky BE. Does drug abuse beget drug abuse? Behavioral analysis of addiction liability in animal models of prenatal drug exposure[J]. Brain Res Dev 2003 ,147: 47 – 57.

[4] Riley MA ,Vathy I. Mid-to late gestational morphine exposure does not alter the rewarding properties of morphine in adult male rats [J]. Neuropharmacology 2006 ,51(2) : 295 – 304.

[5] Bardo MT ,Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward [J]? Psychopharmacology (Berl) 2000 ,153(1) : 31 – 43.

[6] Everitt BJ ,Wolf ME. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective[J]. J Neurosci 2002 22(9) : 3312 – 3320.

[7] Chen Zhenyan ,Li Jing ,Huang Guangying. Effect of Bushen Yiqi Huoxue recipe on placental vasculature in pregnant rats with fetal

growth restriction induced by passive smoking[J]. Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2013 33(2) : 293 – 302.

[8] Watanabe T ,Nakagawa T ,Yamamoto R ,et al. Involvement of noradrenergic system within the central nucleus of the amygdala in naloxone-precipitated morphine withdrawal induced conditioned place aversion in rats [J]. Psychopharmacology (Berl) 2003 ,170: 80 – 88.

[9] Shoaib R ,Spanagel R ,Stohr T ,et al. Strain differences in the rewarding and dopamine-releasing effects of morphine in rats [J]. Psychopharmacology ,1995 ,117: 240 – 247.

[10] Derauf C ,Kekatpure M ,Neyzi N ,et al. Neuroimaging of children following prenatal drug exposure [J]. Semin Cell Dev Biol 2009 , 20(4) : 441 – 454.

[11] 黄晓科 ,银晓勇 ,黄艳秋 等. 大鼠海马毁损与学习记忆研究进展[J]. 中国老年学杂志 2012 32(10) : 2199 – 2201.

[12] Rocha BA ,Mead AN ,Kosofsky BE. Increased vulnerability to self-administer cocaine in mice prenatally exposed to cocaine [J]. Psychopharmacology 2002 ,163: 221 – 229.

[13] Buka SL ,Shenassa ED ,Niaura R. Elevated risk of tobacco dependence among offspring of mothers who smoked during pregnancy: a 30-year prospective study [J]. Am J Psychiatry 2003 ,160: 1978 – 1984.

(上接第 309 页)

时 经灌胃给药 10 d 的颞叶癫痫大鼠全部死亡^[10] , 这提示高剂量 Res 对机体可能产生一定的毒性作用。

通过本研究 ,我们推测白藜芦醇抗癫痫效果的作用机制可能是通过保护海马神经元、维持神经元 Glu/GABA 平衡实现的。

【参考文献】

[1] Albrecht J ,Sidoryk-werzynowicz M ,Zielinska M ,et al. Roles of glutamine in neurotransmission [J]. Neuron Glia Biol , 2010 , 6 (4) : 263 – 276.

[2] De Rubels DA ,Young GB. Continuous EEG monitoring in a patient with massive carbamazepine overdose [J]. J Clin Neurophysiol , 2001 , 18(2) : 166 – 168.

[3] Wu Z , Xu Q , Zhang L , et al. Protective effect of Resveratrol against Kainate-Induced Temporal Lobe Epilepsy in Rats [J]. Neurochem Res , 2009 , 34(8) : 1393 – 1400.

[4] Watson C , Paxinos G. The Rat Brain in stereotaxic coordinates [M]. Imprint: Academic press , 2007: 145 – 146.

[5] Racine R , Okujava V , Chipashvili S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol , 1972 , 32(3) : 295 – 299.

[6] Parathath SR , Parathath S , Tsirka SE. Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice [J]. J Cell Sci , 2006 , 119(Pt 2) : 339 – 349.

[7] Ueda Y , Doi T , Tokumaru T. Collapse of extracellular Glu regulation during epileptogenesis: down-regulation and functional failure of GluTs function in rats with chronic seizure induced by kainic acid [J]. J Neurochem , 2001 , 76 (3) : 892 – 900.

[8] Eid T , Thomas MJ , Spencer DD , et al. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus : possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy [J]. Lancet , 2004 , 363(9402) : 28 – 37.

[9] Sepkuty JP , Cohen AS , Eccles C , et al. A neuronal GluTs contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy [J]. J Neurosci , 2002 , 22(15) : 6372 – 6379.

[10] Crowell JA , Korytko PJ , Morrissey RL , et al. Resveratrol-associated renal toxicity [J]. Toxicol Sci , 2004 , 82(2) : 614 – 619.