

学校编码: 10384

分类号密级

学号: 24520141153550UDC

廈門大學

硕士学位论文

姜黄素对急性癫痫大鼠神经保护作用的实验研究

Mechanisms of neuroprotection by curcumin in acute epileptic rat

杨志荣

指导教师姓名: 郁毅刚副教授

专业名称: 神经外科

论文提交日期:

论文答辩时间:

2017年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

摘要

目的：通过腹腔注射大剂量戊四氮建立急性大鼠癫痫模型，运用姜黄素进行干预，观察姜黄素对癫痫大鼠行为的影响和神经元的保护作用及其机制研究。

方法：实验选用健康雄性 SD 大鼠 48 只，完全随机分为：姜黄素组、对照组、模型组、实验组，每组 12 只大鼠，造模前进行相应的预干预，然后通过腹腔注射戊四氮建立急性癫痫动物模型。观察造模后各组大鼠行为学表现；尼氏染色、HE 染色观察各组大脑病理变化；Tunnel 染色观察各组大脑皮质神经元的凋亡情况；免疫组织化学方法观察姜黄素对海马组织或皮质部分 LC3-II、Beclin1 表达的影响。

结果：相对于模型组，实验组腹腔注射姜黄素可明显延长发作潜伏期；病理学显示，实验组相对于模型组神经组织病理情况改善；但自噬相关蛋白 LC3-II、Beclin1 在各组表达并无显著差异 ($p>0.05$)。

结论：姜黄素明显抑制癫痫的发生发展，减轻了癫痫发生中神经元的损伤，具有抗癫痫作用。其作用机制可能与姜黄素抗炎、抗氧化、神经保护有关，并独立于自噬调节机制之外。

关键词：急性癫痫 姜黄素 自噬 神经保护

Abstract

Objective: To discuss the antiepileptic and neuroprotective effects of curcumin in epilepsy modeled by PTZ intraperitoneal injection.

Methods: The 48 SD male rats were randomly divided into four groups: curcumin group, control group, model group and curcumin intervention group, 12 rats in each group. To establish an acute animal model of epilepsy by PTZ intraperitoneal injection, we observed the behavior performance of each group. Observing pathological changes of each group by HE and Nissl staining, apoptosis by Tunnel staining. The expression of LC3-II and Beclin1 in hippocampus or cortex was investigated by immunohistochemical staining.

Results: Compared with epilepsy model group, the duration of the experimental group was obviously prolonged; In pathological changes, the experimental group has a significant improvement; But, the Autophagy-Related Proteins, LC3-II and Beclin1, were no significant difference in each group ($p > 0.05$).

Conclusions: Curcumin significantly inhibited the occurrence of epilepsy and alleviated neurons damage, playing a role in antiepileptic effect. Its mechanism may be related to the antioxidant, anti-inflammatory properties and neuroprotective effects by curcumin, independent of Autophagy-Related mechanism.

Keywords: acute epileptic; curcumin; autophagy; neural protection

目录

| | |
|-----------------------|-----|
| 中文摘要 | I |
| 英文摘要 | II |
| 中文目录 | III |
| 英文目录 | V |
| 前言 | 1 |
| 第一章材料和方法 | 5 |
| 1.1 实验材料 | 5 |
| 1.1.1 实验动物 | 5 |
| 1.1.2 主要实验试剂 | 5 |
| 1.1.3 实验器材 | 6 |
| 1.2 实验方法 | 6 |
| 1.2.1 动物分组方案 | 6 |
| 1.2.2 造模方法、干预措施 | 6 |
| 1.2.3 取材 | 7 |
| 1.3 观察指标 | 7 |
| 1.3.1 行为学评分 | 7 |
| 1.3.2 大脑病理组织学观察 | 8 |
| 1.4 统计学分析 | 11 |
| 第二章结果 | 12 |
| 2.1 行为学的观察 | 12 |
| 2.2 大脑病理组织学 | 12 |
| 第三章讨论 | 14 |

| | |
|---------------------------|----|
| 3.1 癫痫的机制研究..... | 14 |
| 3.2 姜黄素的药理作用机制 | 14 |
| 3.3 自噬在癫痫中的作用 | 15 |
| 3.4 自噬的病理生理过程及标志性蛋白 | 17 |
| 3.5 癫痫与氧化应激损伤 | 18 |
| 第四章结论..... | 21 |
| 参考文献 | 22 |
| 综述 | 26 |
| 附录 | 32 |
| 致谢 | 33 |
| 附图 | 34 |

Table of Contents

| | |
|---|------------|
| ABSTRACT IN CHINESE | I |
| ABSTRACT IN ENGLISH | II |
| TABLE OF CONTENTS IN CHINESE | III |
| TABLE OF CONTENTS IN ENGLISH | v |
| INTRODUCTION | 5 |
| CHAPTER 1 MATERIALS AND METHODS | 5 |
| 1.1 Experimental materials | 5 |
| 1.1.1 experimental animal..... | 5 |
| 1.1.2 laboratory reagent | 5 |
| 1.1.3 experimental apparatus | 6 |
| 1.2 Experimental methods | 6 |
| 1.2.1 animal grouping project | 6 |
| 1.2.2 animal model and intervention protocol | 6 |
| 1.2.3 specimens | 7 |
| 1.3 Obvervational index | 7 |
| 1.3.1 neural behavioral score | 7 |
| 1.3.2 pathology and histopathology | 8 |
| 1.4 statistical analysis | 11 |
| CHAPTER 2 RESULTS | 12 |
| 2.1 neurobehavior score | 12 |
| 2.2 pathology and histopathology | 12 |
| CHAPTER 3 DICUSSION | 14 |
| 3.1 The pathogenesis study of epilepsy | 14 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 The pharmacological mechanism of curcumin | 14 |
| 3.3 The role of autophagy in epilepsy | 15 |
| 3.4 The pathological and physiological of Autophagy and its marker protein | 17 |
| 3.5 Epilepsy and oxidative stress injury | 18 |
| CHAPTER 4 CONCLUSION | 21 |
| REFERENCES | 22 |
| REVIEW | 26 |
| APPENDIX | 32 |
| ACKNOWLEDGE | 33 |
| GRAPH | 34 |

前言

癫痫是一种大脑神经元突然异常放电,导致短暂性大脑神经功能紊乱的慢性神经疾病,具有突发性、瞬时性、重复刻板性等神经系统功能失常特征。癫痫发作的特点各不相同,与其痫性放电的起源部位和传播途径有关。癫痫可能导致一些短暂性的症状:运动或感觉异常;意识或知觉丧失;情绪或其它认知功能方面的紊乱。据报道,目前全世界约有 5000 万癫痫患者。在我国癫痫患病率为 7%,其中活动性癫痫患病率为 4.6%,其中治疗缺口(Treatment Gap)达 63%,因此仍有约 400 万患者仍未得到合理有效的抗癫痫治疗^[1]。癫痫与其他慢性病相比,由于其发作的突然性和不可预知性,对患者生活质量、心理压力的影响更大。药物控制仍是目前癫痫的一线治疗方法,但仍有约 1/3 的患者最终发展为药物难治性癫痫,而且抗癫痫药物可并发多系统、多器官不良毒副作用,严重影响患者的生理功能和生活质量,同时也给社会和家庭带来沉重的压力。因此通过深入细致地研究癫痫发病相关机制,以此研发新型抗癫痫药物,提高抗癫痫有效率和减少药物不良反应是刻不容缓之事。

癫痫虽然是神经系统常见疾病,但其病理机制非常复杂,随着人们对癫痫的病理生理机制的不断研究探索,形成目前多种学说,涉及神经递质、离子通道、先天遗传、免疫影响等。关于自噬的研究,近年来大热,特别是对细胞自噬机制研究方面有突出贡献的日本科学家大隅良典(Yoshinori Ohsumi)摘得 2016 年度诺贝尔生理学或医学奖后,该领域更是成为最热门研究领域之一。细胞内物质降解主要通过两个途径:泛素蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome system, UPS),以降解消化短寿命蛋白质为主,调控着胞内大部分蛋白质的降解,该途径需 ATP 供能,高效且特异性;另一途径即自噬-溶酶体途径(autophagy-lysosome pathway,ALP),又称为自噬(autophagy),是真生物中高度保守的过程,无需能量供应,降解细胞内过多或异常蛋白质。自噬过程可简单分解为以下四步:①自噬前体的形成:细胞因内外环境的改变,触发自噬激活过程,由此形成自噬前体;②自噬体的形成:自噬前体以囊泡形式包裹胞内异常或损害的细胞器/蛋白质等物质,形成自噬体,呈球状;③自噬溶酶体复合物:自噬体在微管运动蛋白的介导下与溶酶体融合,自噬溶酶体复合物由此形成。④自噬降解与吸收过程:自噬

溶酶体通过酸性蛋白酶将体内待降解物质降解吸收，重新利用，发挥“废物回收站”功能。自噬作为细胞生长代谢的基本过程，维持着细胞的正常生理过程；而自噬的消长受多种因素的影响。在正常情况下，自噬在多数细胞内都处于低激活状态，可降解利用细胞内异常及受损的蛋白质或细胞器，维持细胞内的稳态，保持细胞正常生理功能。当细胞受到外界刺激，如：低氧、激素作用、饥饿；或内在环境变化，如：异常或损伤的细胞器或蛋白积聚时，自噬迅速被激活

($T_{1/2}=8\text{min}$)，通过降解胞质大分子和细胞器为细胞和机体提供能量，维持内环境稳定，应对外界的各种应激变化。同时自噬也是把“双刃剑”，过度激活的自噬反而引起细胞变性或死亡，称之为自噬性细胞死亡。目前在真核生物中发现 30 多个参与自噬过程的自噬相关基因 (Atg)，它们中大部分基因在哺乳动物中存在同源性基因，自噬相关基因表达产物组成复合物调节自噬体的形成^[1]。作为自噬的特异性基因之一的 Beclin1，是酵母自噬基因 6 在哺乳动物的同源物，也是自噬体形成的一个必须分子，它对自噬过程的激活发挥正调节作用，其催化 III 型 PI3K (磷酸酰肌醇-3-激酶) 形成复合体，募集 LC3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, 自噬蛋白 Atg8 在哺乳动物中的同源物) 和 APG 蛋白，调控自噬前体的定位，直接参与自噬关键步骤中自噬体的形成，在起始阶段发挥重要作用。Beclin1 的分子量为 60KD，由 450 个氨基酸所构成，包括四个特殊结构域：①Bcl-2 结合结构域；②螺旋结构域；③保守结构域；④核输出信号结构域^[2-4]。选择 Beclin1 作为自噬的定量指标，已经成为检测自噬发生的常用方法之一。自噬的信号调控机制主要有：1. 依赖 mTOR (mammalian target of rapamycin,mTOR) 通路；2. PI3K 通路；3. 其他蛋白通路^[5]。哺乳动物细胞内的自噬主要有 3 种类型：①巨自噬(macroautophagy), 目前研究最广泛的自噬类型，同时也是最被发现和研究的自噬类型，等同于狭义上的自噬，通常我们所指的自噬即该类型^[6, 7]，本文所研究自噬过程即巨自噬，具体机制过程如上所述。②小自噬: 又称微自噬(microautophagy)，通过溶酶体的膜直接内陷，降解所包裹的长寿蛋白^[8] ③分子伴侣介导的自噬(Chaperone-mediated autophagy,CMA): 分子伴侣所介导的自噬是特异性的蛋白质降解途径^[9, 10]，CMA 将含有 KFERQ 的包浆蛋白，经分子伴侣 HSC70 介导后被转运致溶酶体腔，由溶酶体酶消化降解。近年来，自噬与神经系统疾病的关系得到广泛的研究。目前在神经系统疾病中，神

神经退行性疾病(neurodegenerative diseases,ND)是被研究最为广泛的自噬相关疾病。神经退行性疾病中,神经组织病变区域常有大量错误折叠的异常蛋白质聚集,这也是引起神经退行性疾病的重要原因之一。激活自噬可对清除这些异常蛋白质聚合物发挥关键性的作用,提示诱导自噬可能是神经退行性疾病的治疗方法之一。但关于自噬与癫痫的相关性研究较少,目前有研究发现癫痫病灶的神经元细胞中存在着自噬过度激活的现象。激活的自噬有助于快速清除癫痫持续状态下产生的多种氧化应激产物,减少神经元的氧化应激损伤,发挥神经保护作用^[11]。我们将探讨自噬在癫痫急性发作时皮质和海马损伤中的作用及其机制,并进一步探讨姜黄素神经保护作用和对自噬的影响。

姜黄素(curcumin)是从姜科植物姜黄(*curcuma longa*)根茎中提取的一种多酚类物质。现在主要用于研究抗氧化能力、阿尔茨海默病、炎症、化学预防和化疗。近年来,许多学者和研究机构研究显示了姜黄素在癫痫动物模型中,发挥着抗癫痫、神经保护作用,目前姜黄素抗癫痫、神经保护的机制研究主要集中在以下几个方面:

1. 姜黄素作为天然抗氧化剂,姜黄素的抗氧化、清除自由基作用,减少神经元应激损伤。海人酸(Kainic Acid KA)诱导癫痫模型中,姜黄素组 SD 大鼠在潜伏期预防性使用姜黄素,相比于模型组减少了自发性癫痫发作的次数,减低癫痫大鼠海马脑组织中神经元凋亡数量,改善谷胱甘肽还原酶的受损水平,降低 MDA 的含量,因此在潜伏期预防性使用姜黄素能够改善癫痫发生发作状况。其机制原理可能与姜黄素有效地保护神经元,减少促炎因子的释放,降低星形细胞的激活,抑制苔状纤维发芽的异常增殖以及抗炎抗氧化有关。姜黄素还可通过提高维生素 C 和 E 水平,减少 DNA 受自由基和氧化应激的损害^[19],明显改善大鼠认知功能障碍,以及海马、纹状体区域的应激损伤状况,且呈剂量依赖性,保护氧化应激相关酶类免受 SE 状态损伤^[21],姜黄素的抗癫痫作用除了其抗氧化特性外,还可能与其修复钠钾 ATP 酶($\text{Na}^+,\text{K}^+\text{-ATPase}$)活性^[22],调节一氧化氮合成酶活性有关^[23]

2. 姜黄素具有抗炎特性 在 PTZ 诱导的癫痫模型中。姜黄素干预组相对于 PTZ 模型组,显著降低 IL-1 β , IL-6, TNF- α 等炎症指标,改善线粒体的紊乱和恢复还原型谷胱甘肽正常水平,显著降低 ROS、脂质过氧化物、蛋白羰基含量水平,保护神经元和改善 Wistar 大鼠的认知功能^[12],抑制胶质细胞的炎症激活^[13]。

姜黄素可直接通过抑制 IrBa 激酶和激活蛋白激酶，间接抑制 NF- κ B 的活性，降低炎症对神经细胞的损害，这可能是姜黄素的强大抗炎作用的主要原因之一^[14]。

3. 姜黄素可促进脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 信号通路的表达 Jyoti A 通过皮层注射 FeCl₃ 诱导出外伤性癫痫动物模型，使用高剂量姜黄素(1500 pp mw/w)食物添加治疗外伤性癫痫大鼠，显著抑制 III 级和 IV 级癫痫发作，低剂量组(500 ppm)虽无此特效，但也能抑制全面性强直发作，可能与以下机制有关：①姜黄素能够显著提高钠-钾 ATP 酶活性，从而减轻脂质过氧化反应；②姜黄素对铁离子的金属螯合作用；③抑制蛋白激酶活性，发挥抗氧化作用；④调节 BDNF 系统，以上结果在行为学、生物标志、超微层面均得到验证^[27]。然而姜黄素抗癫痫、神经保护的具体作用机制仍未知，我们推测可能与其激活自噬水平有关，为了验证该假说，我们采用 PTZ 造急性癫痫模型为切入点，研究急性癫痫的自噬水平变化及姜黄素抗癫痫、神经保护作用是否与自噬通路有关。

第一章 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 48 只，均为雄性，体重 220~250g，购自厦门大学实验动物中心。经厦门大学附属东南医院实验动物伦理委员会审查，按屏障环境设施要求进行饲养管理，24h 自由饮食，室温、湿度均适宜大鼠生长，购进动物后进行 1 周适应性饲养。

1.1.2 主要实验试剂

试剂名称

戊四氮 (PTZ)

Sigma 美国

姜黄素

山东西亚化学工业有限公司

兔抗大鼠 Beclin1 多克隆抗体

Sigma 美国

兔抗大鼠 LC3 多克隆抗体

Sigma 美国

10%水合氯醛

厦门大学附属东南医院制剂科

苏木精染液

上海鲁汶生物工程

伊红染液

上海鲁汶生物工程

细胞凋亡测试盒 (TUNEL 法)

上海博耀生物科技有限公司

尼氏染色液

上海碧云天生物技术有限公司

生理盐水

厦门大学附属东南医院制剂科

PBS 缓冲液

上海蕊试生物技术有限公司

乙醇

厦门大学附属东南医院制剂科

10%水合氯醛

AMEKO 美国

Tween-20

Sigma 美国

BCA 蛋白浓度测定试剂盒

上海生工

EDTA 抗原修复液

上海生工

1.1.3 主要实验器材

| | |
|------------------|------------------------|
| 切片机 | 德国 Leica 公司 |
| 电子分析天平 | 德国 Leica 公司 |
| 微波炉 | 美的 |
| 高压锅 | 苏泊尔 |
| 盖玻片 | 上海生工 |
| 防脱载玻片 | 上海生工 |
| 离心管 | 上海生工 |
| 医用注射器、手套、蜡块、切片盒等 | 厦门大学附属东南医院病理科、实验动物中心提供 |

1.2 实验方法

1.2.1. 分组

成年健康雄性 SD 大鼠 48 只，体重 220~250g，随机分为四组，每组 12 只：A 组：姜黄素组（姜黄素），B 组：对照组（氯化钠），C 组：模型组（氯化钠+PTZ 致病），D 组：实验组（姜黄素+PTZ 致病）。

| 药物干预及实验方法 | | | | |
|-----------|------|------|--------|----------------------|
| 组别 | 预干预 | 实验过程 | 取材部位 | 取材时间 |
| 姜黄素组 | 姜黄素 | 姜黄素 | 一侧大脑半球 | 模型组造模后 24h，余各组同该时间点。 |
| 对照组 | 生理盐水 | 生理盐水 | | |
| 模型组 | 生理盐水 | 戊四氮 | | |
| 实验组 | 姜黄素 | 戊四氮 | | |

1.2.2 癫痫模型的建立及干预措施

模型组及实验组大鼠腹腔注射 60mg/kg 戊四氮(溶于生理盐水,浓度为 2%)，造急性癫痫模型，诱导大鼠癫痫急性发作。对照组和姜黄素组不进行癫痫急性造模，仅注射与造模药物剂量相等的生理盐水或姜黄素，观察对比。造模后，观察大鼠急性癫痫发作情况，假如癫痫发作 30min 后仍处于癫痫持续状态者，给与腹腔注射 10%水合氯醛（300mg/kg）终止癫痫发作。模型制作成功的标志和入组

标准：大鼠癫痫发作症状参考 Racine 分级标准（见表 1）分为 5 级（I 级~V 级）连续出现 3 次 IV 级或 IV 级以上的痫性发作视为癫痫模型成功，因造模或其他原因死亡者，继续补充样本。干预措施：将姜黄素溶于乙醇，配制成 2% 的溶液，于造模前 2 周对实验组，予以姜黄素预干预。依参考文献，选取姜黄素抗癫痫作用最强的浓度：200mg/kg，每天同一时间，腹腔注射，1 次/日，进行预处理。模型组、对照组和姜黄素组给予同时、等量生理盐水或姜黄素腹腔注射。

1.2.3 取材

在大鼠造模成功后 24h，用 10% 水合氯醛深度麻醉动物。麻醉成功后，进行固定灌注取材 具体方法如下：将 SD 大鼠用 10% 的水合氯醛腹腔麻醉后，大鼠胸部去毛，切开胸部皮肤，去除部分胸肋骨，剖开胸腔暴露心脏，灌流针从心尖插入经左心室直至升主动脉（勿穿刺入右心室，以免影响灌注效果），打开输液开关，此时可见左心室膨隆，升主动脉胀开。用眼科剪在右心房右上方右心耳处剪一小口，可见大量血液溢出，持续快速注入生理盐水约 200 ml 灌注，当肝脏变白，右心耳流出清亮液体后，停止生理盐水灌注，换成缓慢注入 4% 中性甲醛约 600 ml，当大鼠后肢强直，即断头取脑，放入 4% 的中性甲醛后固定保存。切取视交叉后 4 mm 处即海马平面取脑组织，连续冠状切片，厚度为 3~5 μ m。

1.3 观察指标

1.3.1 行为学评分

以发作时的行为变化作为判断癫痫急性发作的主要依据，每次给药后行为学连续观察 30min，记录大鼠强直性惊厥潜伏期（即从注射 PTZ 开始至相当于 V 级发作的时间），并对大鼠发作程度进行 Racine 评分，评分标准如下。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库