

丙戊酸钠对戊四氮致痫大鼠海马组织粘着斑激酶表达的影响

连霞¹ 林惠萍² 林小凤¹ 陈沫¹ 费燕¹ (解放军第 175 医院/厦门大学附属东南医院 1. 药学科; 2. 超声科 福建漳州 363000)

摘要 目的: 探讨抗癫痫药丙戊酸钠(VPA)对戊四氮(PTZ)致痫模型大鼠海马组织中粘着斑激酶(FAK)、FAK-pY397 表达水平的影响。方法: 将 75 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、VPA 低、中、高剂量组(150、300、600 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 5 组, 每组 15 只。造模大鼠连续腹腔注射戊四氮 32 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 4 周, 密切观察大鼠行为学变化。造模成功后, VPA 各组给予相应剂量 VPA 灌胃, 连续 2 周。苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠海马组织变化; 免疫组化及酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠外周血清及海马组织中 FAK、FAK-pY397 及整合素表达情况。结果: 与模型组比较, VPA 各组癫痫症状有明显缓解, 细胞凋亡情况有所改善; 免疫组化发现 VPA 组 FAK-pY397 的表达明显下降, 且随着 VPA 剂量的加大, FAK-pY397 的表达有下降趋势, ITGα3 表达组间无显著差异; VPA 低、中、高剂量组海马组织中 FAK、FAK-pY397 及整合素 ITGβ1 表达水平下降, 差异具有显著性($P < 0.05$); 外周血清中 FAK 及整合素 ITGβ1 蛋白表达水平显著下降($P < 0.05$), 但 FAK-pY397 表达无明显变化。结论: VPA 可能通过抑制癫痫大鼠海马组织中 FAK-pY397 及 ITGβ1 的表达, 参与或影响癫痫过程。

关键词 癫痫; 戊四氮; 粘着斑激酶; 整合素; 丙戊酸钠

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2018)10-1721-04

Effects of Sodium Valproate on the Expression of FAK in Hippocampus of Rats with Seizure Induced by Pentylentetrazole

Lian Xia¹, Lin Huiping², Lin Xiaofeng¹, Chen Shu¹, Fei Yan¹ (1. Department of Pharmacy; 2. Department of Ultrasonography, No. 175 Hospital of the PLA, Fujian Zhangzhou 363000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of sodium valproate (VPA) on the expression of FAK and FAK-pY397 in hippocampus of rats with seizure induced by pentylentetrazole (PTZ). **Methods:** A total of 75 rats were randomly divided into 5 groups: the normal control group, the epilepsy model group (PTZ group) and the VPA groups (150, 300 and 600 mg·kg⁻¹·d⁻¹) with 15 ones in each group. The model rats were continuously given PTZ (32 mg·kg⁻¹·d⁻¹) by intraperitoneal injection for 4 weeks and paid close attention to the behavioral changes, and then VPA was administrated orally for 2 weeks. The pathological changes of hippocampus tissue were observed by HE staining. The expressions and distributions of FAK, FAK-pY397 and integrin in serum and hippocampus were evaluated by immunohistochemical assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with the model group, the symptoms of epilepsy in VPA groups were significantly relieved and cell apoptosis was improved. Immunohistochemistry showed that the expression of FAK-pY397 decreased significantly in VPA groups with the increase of sodium valproate dose, and there was no significant difference in the expression of ITGα3. The VPA groups significantly reduced the expression of FAK, FAK-pY397 and ITGβ1 ($P < 0.05$), the expression of FAK and ITGβ1 protein in peripheral serum decreased significantly ($P < 0.05$), but the expression of FAK-pY397 did not change significantly. **Conclusion:** VPA can effectively participate in or affect the process of epilepsy by inhibiting the expressions of FAK-pY397 and ITGβ1 in hippocampal tissue of epileptic rats.

KEY WORDS Epilepsy; Pentylentetrazole; Focal adhesion kinase; Integrin; Sodium valproate

癫痫(epilepsy)是中枢神经系统兴奋性突触传递引起电活动异常和不平衡而产生的一种神经系统疾病,目前尚不清楚这种失衡是这种疾病的原因还是结果^[1]。丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)是临床上用于治疗癫痫的广谱抗癫痫药。粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是对细胞迁移、侵袭和生长具有调节作用的黏附因子,其在神经系统疾病中的作用也日渐突出,在癫痫脑病中的研究也备受关注^[2]。FAK 第 397 位酪氨酸残基(Tyr397)发生自身磷酸化可显著提高 FAK 的活性。FAK 可能通

过细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, ERK1/2)/N-甲基-D-天冬氨酸(N-Methyl-D-Aspartate, NMDA)型谷氨酸受体途径参与突触传递^[3]。此外,FAK 上游信号分子整合素(integrin)也被认为参与该反应,整合素可通过激活下游信号分子 FAK 完成信号转导。整合素是负责细胞内外信号转导的异二聚体表面黏附受体,包括 α、β 两种亚基,其中 ITGβ1 备受关注^[4]。有关丙戊酸钠对癫痫模型大鼠海马组织 FAK 的影响鲜有报道。鉴于此,本研究拟通过大鼠腹腔注射抗癫痫

基金项目:漳州市自然科学基金课题(编号:ZZ2017J41)
通讯作者:费燕 Tel: (0596) 2975795 E-mail: feiyanfy@126.com

药 VPA,采用免疫组化、ELISA 等方法观察其对戊四氮(pentylenetetrazole, PTZ) 致病大鼠海马组织及外周血清中 FAK、FAK-pY397 及整合素 ITGβ1 及 ITGα3 亚基表达的影响。以期为临床上预防及治疗癫痫疾病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

戊四氮(美国 Sigma,批号:1001603974);丙戊酸钠片(山东仁和堂,批号:161209);单克隆兔抗 FAK 抗体、多克隆兔抗 FAK-pY397 抗体、多克隆兔抗整合素 α3(ITGα3) 抗体均购自上海一基实业有限公司;大鼠(Rat) 粘着斑激酶(FAK)、大鼠(Rat) 磷酸化粘着斑激酶(FAK-pY397)、大鼠(Rat) 整合素 β1(ITGβ1) ELISA 检测试剂盒,均购自上海一基实业有限公司。

1.2 实验动物

清洁级成年 SD 大鼠,雌雄各半,体质量约(200 ± 20) g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物质量合格证号:SCXK(沪)2012-0002。每 4 ~ 5 只大鼠饲养于干净宽敞鼠笼内,温度 20 ~ 25℃,相对湿度 40% ~ 70%,提供足够的水粮,并遵循实验动物使用的替代(replacement)、减少(reduction)、优化(refinement)的 3R 原则,以减少实验动物的痛苦,并给予人道关怀。

1.3 慢性癫痫模型的建立

75 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、VPA 低、中、高剂量组等 5 组,每组 15 只。除正常对照组外,其余各组大鼠连续 4 周腹腔注射 PTZ 32 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 制造慢性癫痫模型^[5],正常对照组腹腔注射等量生理盐水,操作在每天 8:00 ~ 10:00 完成,给药后 30 ~ 60 min 内密切观察大鼠行为学变化。癫痫发作采用 Racine 评分法^[6]:0 级,无抽搐;I 级,节律性嘴角、面部抽搐;II 级,前肢阵挛;III 级,前肢阵挛伴站立位;IV 级,强直-阵挛性发作;V 级,全身性强直性发作伴翻滚、跌倒。至少连续出现 3 次 IV ~ V 级以上痫样发作的大鼠确认为造模成功。如造模过程中出现大鼠死亡,则按照随机原则补齐各组大鼠。

1.4 灌胃给药

造模成功后,正常对照组及模型组灌胃生理盐水 5 ml · kg⁻¹,VPA 低、中、高剂量组分别给予 150, 300, 600 mg · kg⁻¹ · d⁻¹^[7,8] VPA 灌胃给药,1 次/d。各组均连续灌胃 2 周,观察大鼠行为学变化。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 免疫组化 各组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(0.35 ml/100 g) 进行深度麻醉,待麻醉成功后,

将大鼠四肢固定,打开大鼠胸腔并暴露出主动脉,剪破右心耳的同时心脏迅速插管,灌注含有肝素钠的生理盐水至右心耳流出液体无色时,换用 4% 多聚甲醛心脏灌注 20 min,待小鼠四肢以及尾部僵硬后停止灌注,取出脑组织并分离出海马组织,置于 4℃ 4% 多聚甲醛溶液中固定 4 h。再放入 35% 蔗糖多聚甲醛溶液中脱水,直到海马组织完全沉底,用冰冻切片机将海马组织切成 30 μm 薄片,免疫荧光染色,显微镜下进行观察拍片。

1.5.2 ELISA 检测 大鼠断头取血及海马组织,匀浆离心(3 773 × g, 10 min),取上清液检测,按照说明书规范操作,混匀孵育规定时间后,酶标仪测定 FAK、FAK-pY397 及 ITGβ1,绘制相应标准曲线,计算各指标含量。

1.5.3 HE 染色 海马组织经 4% 多聚甲醛固定后,石蜡包埋,苏木精-伊红染色,制备 5 μm 切片,用生物显微镜观察海马组织病理学形态变化。

1.6 统计学方法

用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学处理,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用 *t* 检验进行比较,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学观察

造模过程观察大鼠行为发现:正常对照组大鼠无抽搐痉挛等行为。腹腔注射 PTZ 的 60 只大鼠,第 1 周后,13 只大鼠出现 III 级以上发作,前肢阵挛伴站立位,并有 1 只死亡;第 2 周后出现 18 只大鼠强直-阵挛性发作或全身性强直性发作伴翻滚、跌倒等现象。第 3 周出现 39 只大鼠 IV ~ V 级发作,第 4 周出现 47 只大鼠 IV ~ V 级发作,3 只 V 级发作并死亡。结果见表 1。

表 1 PTZ 致癫痫大鼠模型行为学观察(*n*)

时间(周)	行为学变化						死亡
	0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级	V 级	
1	14	20	12	6	3	4	1
2	8	5	15	11	14	4	2
3	2	2	3	9	13	26	2
4	0	0	2	3	9	38	3

造模成功后,各组大鼠分别灌胃给药,连续 2 周,观察大鼠行为发现:正常对照组及模型组大鼠行为学无明显变化;VPA 各剂量组症状较模型组有明显缓解,且以 VPA 高剂量组最为明显。结果见表 2。

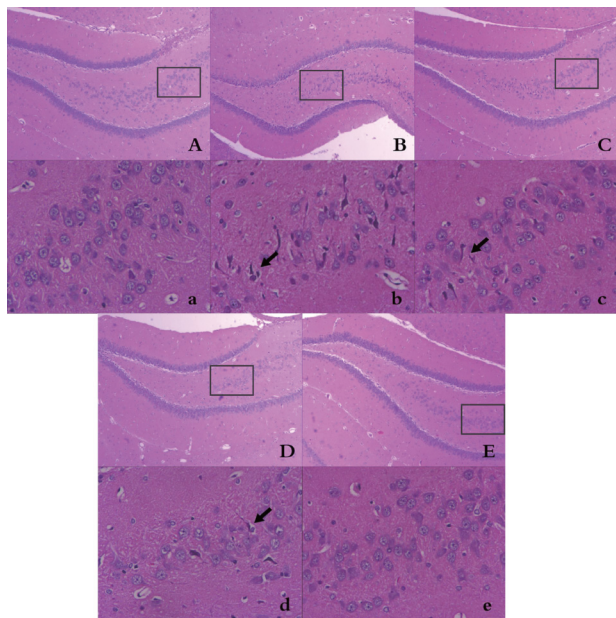
2.2 HE 病理染色形态学观察

病理切片染色结果:可观察到正常对照组大鼠海马神经元细胞呈条带状分布,排列规则整齐,细胞核大、质少,呈圆形或椭圆形,无神经元坏死表现,边缘清晰。癫痫组海马结构明显受损,可见神经元细

表 2 丙戊酸钠对 PTZ 致癫痫大鼠模型作用行为学观察(只)

时间(周)	行为学变化						死亡
	0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级	V 级	
对照组	15	0	0	0	0	0	0
模型组	0	0	1	5	6	1	0
VPA 低剂量组	2	3	5	3	0	0	0
VPA 中剂量组	3	4	4	2	0	0	0
VPA 高剂量组	5	4	3	1	0	0	0

胞形态改变 胞体呈三角形,浓缩深染,出现神经元坏死,界限不清等情况。给药组细胞结构较模型组有所改善。见图 1 所示。



注: A 和 a. 正常对照组 B 和 b. 模型组 C 和 c. VPA 低剂量组 D 和 d. VPA 中剂量组 E 和 e. VPA 高剂量组

图 1 各组不同放大倍数大鼠海马组织病理切片 (×40, ×200)

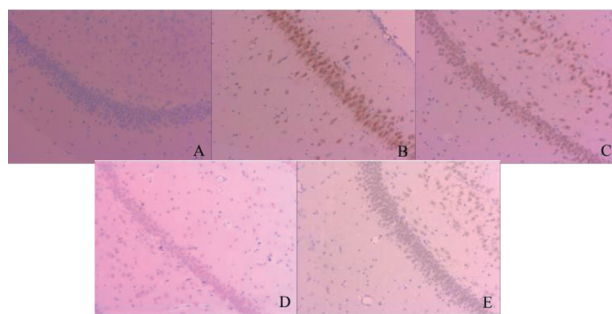
2.3 免疫组化观察大鼠海马组织 FAK-pY397 及整合素 ITGα3 的表达

光镜下观察大鼠海马组织发现 癫痫大鼠 FAK-pY397 呈胞浆表达 阳性细胞胞浆呈棕黄色,与正常对照组比较,模型组 FAK-pY397 的表达明显增加;与模型组相比,VPA 低、中、高浓度组的表达明显下降,且随着 VPA 剂量的加大,FAK-pY397 的表达有下降趋势。如图 2 所示。

光镜下观察大鼠海马组织发现正常对照组大鼠整合素 ITGα3 呈胞浆表达,胞浆呈棕黄色,模型组及 VPA 高、中、低剂量组海马组织中均有表达,组间无明显差异。如图 3 所示。

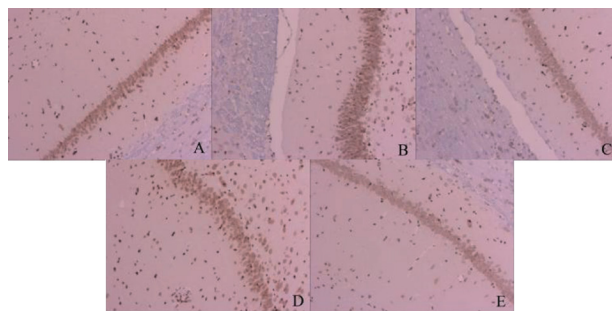
2.4 ELISA 检测大鼠外周血清及海马组织匀浆中 FAK、FAK-pY397 及整合素 ITGβ1 蛋白表达水平

各组大鼠外周血清中 FAK、FAK-pY397、ITGβ1 蛋白表达量的比较见表 3。与正常对照组相比,模



A. 正常对照组 B. 模型组 C. 丙戊酸低剂量组 D. 丙戊酸中剂量组 E. 丙戊酸高剂量组

图 2 各组大鼠海马组织 FAK-pY397 蛋白表达水平比较(×100)



A. 正常对照组 B. 模型组 C. VPA 低剂量组 D. VPA 中剂量组 E. VPA 高剂量组

图 3 各组大鼠海马组织 ITGα3 蛋白表达水平比较(×100)

型组大鼠外周血清中 FAK、ITGβ1 蛋白表达显著升高($P < 0.05$),FAK-pY397 表达增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组相比,VPA 低、中、高剂量组 FAK-pY397 蛋白表达无明显变化,FAK、ITGβ1 蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。VPA 各剂量组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠外周血清中 FAK、FAK-pY397、ITGβ1 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$ $n = 15$)

组别	FAK ($U \cdot L^{-1}$)	FAK-pY397 ($U \cdot L^{-1}$)	ITGβ1 ($\mu g \cdot ml^{-1}$)
正常对照组	101.82 ± 15.74	5.63 ± 0.66	87.70 ± 21.24
模型组	123.95 ± 19.48 ^a	6.84 ± 1.00	105.75 ± 11.31 ^a
VPA 低剂量组	98.54 ± 19.71 ^b	6.66 ± 1.93	70.07 ± 29.00 ^b
VPA 中剂量组	102.33 ± 20.02 ^b	6.03 ± 1.59	74.88 ± 23.99 ^b
VPA 高剂量组	93.51 ± 18.26 ^b	6.31 ± 0.56	77.92 ± 24.90 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

海马组织匀浆上清液中 FAK、FAK-pY397、ITGβ1 蛋白表达量的比较见表 4。与正常对照组相比,模型组大鼠海马组织中 FAK、FAK-pY397 及 ITGβ1 蛋白表达均显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,VPA 低、中、高剂量组 FAK, FAK-pY397 及 ITGβ1 蛋白的表达显著降低($P < 0.05$),但各剂量组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表4 各组大鼠海马组织 FAK、FAK-pY397、ITGβ1 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	FAK ($U \cdot L^{-1}$)	FAK-pY397 ($U \cdot L^{-1}$)	ITGβ1 ($\mu g \cdot ml^{-1}$)
正常对照组	96.09 ± 22.77	4.88 ± 1.35	73.48 ± 26.49
模型组	121.14 ± 18.76 ^a	7.55 ± 1.57 ^a	95.33 ± 11.79 ^a
VPA 低剂量组	89.88 ± 21.69 ^b	5.41 ± 0.62 ^b	72.32 ± 26.24 ^b
VPA 中剂量组	101.71 ± 16.80 ^b	5.73 ± 0.58 ^b	79.91 ± 28.52 ^b
VPA 高剂量组	108.33 ± 19.52 ^b	5.58 ± 1.77 ^b	66.22 ± 27.89 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

FAK 是在神经细胞中高度表达的非受体型蛋白酪氨酸激酶,能够整合多种跨膜受体的信号转导,在细胞凋亡过程中发挥重要作用,而癫痫大鼠海马神经元的损伤也包括神经细胞凋亡过程^[9]。本实验发现,癫痫大鼠海马组织 FAK、FAK-pY397 及 ITGβ1 阳性细胞表达显著增加。生理条件下,海马组织 FAK 可能处于低活状态,表现为 FAK-Tyr397 位点的磷酸化水平很低。然而,癫痫发生时,FAK-Tyr397 的磷酸化水平会急剧升高。癫痫大鼠海马组织中整合素 ITGβ1 阳性细胞表达增加,其活性增强,可富集其下游 FAK 等信号分子,使 FAK 第 397 位酪氨酸磷酸化水平提高,可能通过激活下游 ERK/MNDA 信号通路介导癫痫过程。黄霞^[10]研究证实,FAK-pY397 蛋白在癫痫大鼠海马 CA3 区表达显著增多。同时还发现 FAK-pY397 的表达使细胞内信号转导受到影响,引起细胞骨架生长重组,诱导轴突导向及生长异常,促进苔藓纤维出芽进而诱发癫痫发作。另外,Bernard-Trifilo 等^[11]研究认为,FAK 上游信号分子整合素通过激活神经系统中兴奋性谷氨酸能受体 NMDAR 和触发钙离子电流引起神经兴奋,可能是癫痫发作的诱因。实验结果提示 FAK、FAK-pY397 及 ITGβ1 与癫痫发生发展关系密切。

VPA 为广谱抗癫痫药,其进行多种癫痫动物模型试验,发现其治疗癫痫的作用不能用单一的机制阐述,VPA 可能通过抑制催化 GABA 的酶或阻断 GABA 再吸收增加脑部 GABA 浓度有关,也可以通过抑制钠离子电压通道来防止神经元细胞反复激活而发挥作用^[12,13],但具体机制有待研究。

结合本实验中 VPA 能够逆转癫痫大鼠海马组织中 FAK、FAK-pY397 及 ITGβ1 阳性细胞表达增加的结果推测,VPA 发挥作用的机制可能与抑制 FAK、FAK-pY397 及 ITGβ1 的表达相关。临床上应用丙戊酸钠治疗癫痫疾病,可能通过抑制谷氨酸的

活性及释放,维持正常的生理结构及生理功能,从而产生神经保护作用。本研究大胆猜想可以通过抑制 FAK 上游信号分子整合素或直接抑制 FAK 活性从而降低神经元 ERK1/2 的磷酸化水平,抑制 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体活性,继而影响神经细胞膜上的电压门控通道,进而抑制神经元兴奋性增高及过度异常放电,最终影响癫痫的发生发展,尚需后续实验进一步证实。本实验为 FAK 在癫痫脑病的研究提供新的思路。

参 考 文 献

- 1 Jarero-Basulto JJ, Gasca-Martínez Y, Rivera-Cervantes MC, et al. Interactions Between Epilepsy and Plasticity [J]. *Pharmaceuticals*, 2018, 11(1): 17
- 2 连霞, 林小凤, 郑丽群, 等. 粘着斑激酶在神经系统疾病中的作用研究进展 [J]. *中国药师*, 2017, 20(10): 1846-1849
- 3 Lian X, Wang XT, Wang WT, et al. Peripheral inflammation activated focal adhesion kinase signaling in spinal dorsal horn of mice [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2015, 93(6): 873-881
- 4 Zhao XK, Cheng Y, Cheng ML, et al. Focal Adhesion Kinase Regulates Fibroblast Migration via Integrin beta-1 and Plays a Central Role in Fibrosis [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19276
- 5 王艺, 李智平, 施忆赞. 戊四氮点燃大鼠慢性癫痫模型的建立及评价 [J]. *复旦大学学报医学版*, 2006, 33(2): 206-208
- 6 Zeng Y, Yang Z, Long X, et al. Hippocampal and cortical expression of gamma-aminobutyric acid transporter 1 and glial fibrillary acidic protein in pentylenetetrazol-induced chronic epileptic rats [J]. *Neural Regeneration Research*, 2009, 4(3): 194-199
- 7 张伟, 周勇, 牛俊婕, 等. 抗癫痫药丙戊酸钠对大鼠正常脑组织的放射保护作用 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2015, 53(10): 11-15
- 8 祁晓君, 张洁, 冯炜, 等. 丙戊酸钠在大鼠视神经损伤再生中的作用研究 [J]. *中华眼外伤职业眼病杂志*, 2014, 36(9): 641-646
- 9 Hu Y, Lu Y, Yu W, et al. Long-term retention rate of topiramate as initial monotherapy in Chinese patients with newly diagnosed epilepsy: a prospective observational study [J]. *Epilepsy Res* 2010, 90(3): 278-284
- 10 黄霞. PTZ 点燃大鼠海马 FAKpY397 动态表达其与苔藓纤维出芽关系 [D]. 长沙: 中南大学硕士学位论文, 2014
- 11 Bernard-Trifilo JA, Kramar EA, Torp R, et al. Integrin signaling cascades are operational in adult hippocampal synapses and modulate NMDA receptor physiology [J]. *J Neurochem*, 2005, 93(4): 834-849
- 12 Gunderson V. Valproate causes reduction of the excitatory amino acid aspartate in nerve terminals. [J]. *Neuroscience Letters*, 2012, 527(2): 100-104
- 13 El HM, Baverel G, Martin G. Effects of valproate on glutamate metabolism in rat brain slices: a (13)C NMR study. [J]. *Epilepsy Research*, 2012, 99(1-2): 94-100

(2018-04-28 收稿 2018-07-17 修回)