

### 【基础研究】

通信作者:刘红朝(1966-),男,湖北大悟人,博士,主任医师,硕士研究生导师,主要从事神经肿瘤与癫痫疾病的研究。

颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy, TLE)是临床上最常见的难治性癫痫,其发病机制迄今为止尚未完全阐明。作者前期通过大鼠杏仁核电点燃癫痫模型研究发现,c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路可能参与 TLE 形成,表现为 JNK 信号通路的激活,p-JNK 水平升高<sup>[1]</sup>。因此,干预 JNK 信号通路可能是控制 TLE 发作的有效途径之一。本研究旨在观察 JNK 抑制剂 SP600125 在大鼠杏仁核电刺激癫痫模型中对 CA1 区神经元的保护作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性 Wistar 大鼠 30 只,体质量 270 ~ 310 g,由湖北省实验动物研究中心提供,许可证号:SCXK(鄂)2003-0005。所有实验大鼠在避强光、24 h 昼夜循环、避噪音、单笼、自由饮食、温度 8 ~ 25 ℃、相对湿度 40% ~ 70% 条件下饲养。按抽签法随机分为 3 组:点燃组 10 只,安置电极和脑室留置套针,每天刺激,不加药;加药组 10 只,安置电极和脑室留置套针,每天刺激,脑室内加药 SP600125;加药对照组 10 只,安置电极和脑室留置套针,每天刺激,脑室内不加 SP600125,只加同等剂量的生理盐水和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)。

**1.2 仪器与试剂** 大鼠脑立体定位仪、脑室套针(深圳瑞沃德公司),微型磨钻(韩国 Saeshin 公司),BL-420F 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司),自制 5 芯电极、铸模粉(上海九龙化工公司),SP600125(美国 Sigma 公司),DMSO、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因(美国 Santa Cruz 公司),一抗应激活化蛋白激酶(stress activated protein kinase, SAPK)/JNK (56G8) Rabbit mAb、Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) Rabbit mAb(美国 Cell Signaling 公司),尼氏染色液、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)辣根过氧化物酶显色试剂盒、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(武汉博士德生物工程有限公司),磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(瑞士罗氏公司)。

**1.3 大鼠杏仁核电点燃模型建立** (1)大鼠麻醉:大鼠测质量后按 5 mL · kg<sup>-1</sup>腹腔注射体积分数 6% 水合氯醛。(2)颅骨钻孔:麻醉满意后固定于立体定位仪上,颅骨上钻 5 孔(1 孔为杏仁核电电极,2 孔为额叶皮层电极,1 孔为接地电极,1 孔为脑室套针)。(3)植入 5 芯电极:体积分数 75% 乙醇消毒术野,沿正中矢状线切开皮肤,充分暴露前后囟,按照

杏仁核定位数值(Wistar:前囟后 2.2 mm;旁开 4.8 mm;深 8.5 mm),缓慢将杏仁核双螺旋电极降至深 8.5 mm 处(下降速度 ≤ 1.0 mm · min<sup>-1</sup>)。记录与参考电极分别同定于左右前额和枕部。(4)植入脑室套针:确定左侧脑室位点:前囟后 1.0 mm,中线旁 1.5 mm,颅骨表面下 3.7 mm。(5)上述 5 芯电极与脑室套针用铸模粉固定,术毕大鼠单养,每天观察大鼠伤口、体质量与行为学变化。(6)电刺激点燃大鼠:点燃组、加药组与加药对照组术后恢复 1 周,予 0.8 mA 强度(细电流、串刺激、波宽 1 ms,延时 100 ms、频率 50 Hz,串长 50 个,方波)刺激,每只大鼠每天给予刺激 5 次,相邻 2 次的时间间隔为 1 min,直到有 10 次癫痫大发作,发作强度按 Racine 量表分级。(7)SP600125 治疗:SP600125 0.1 mg 溶于 10 mL DMSO 中,加药组在给予刺激前 30 min 通过左侧的脑室套管加入 10 μL SP600125,5 min 加药完毕;同样方法加药对照组注入生理盐水和质量分数 1% DMSO 10 μL。(8)有 10 次大发作的大鼠处死,各组将 5 只大鼠行 40 g · L<sup>-1</sup>多聚甲醛灌注、取脑,制成连续冠状位行蜡切片,厚 4 μm,另外 5 只取右侧海马组织进行 Western blot 分析<sup>[2]</sup>。

**1.4 Western blot 分析** 检测海马组织 JNK 和 p-JNK 蛋白表达,提取海马组织蛋白,进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭后加一抗孵育,加二抗,DAB 显色。

**1.5 胶原纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)检测** 脱蜡、透明,用枸橼酸缓冲液行抗原修复,BSA 封闭 30 min,加一抗,入湿盒,室温过夜。PBS 漂洗后,加生物素标记二抗,37 ℃ 孵育 1 h。PBS 漂洗后,加 DAB,流水洗 20 min。苏木精复染,脱水、透明、封片。

**1.6 尼氏染色** 石蜡切片进行二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,水洗后,放入尼氏染色液中染色,在 400 倍光学显微镜下计数海马 CA1 区中段 100 单位长度内末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色阳性细胞数目。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS 12.0 统计学软件,数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Western blot 检测 3 组大鼠海马组织 JNK、p-JNK 蛋白表达情况** 结果见图 1。点燃组、加药对照组及加药组总 JNK/GAPDH 均值分别为 0.899 ±

0.059、0.916 ± 0.076 和 0.868 ± 0.043,两两比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ );点燃组、加药对照组及加药组 p-JNK/GAPDH 均值分别为 0.510 ± 0.039、0.476 ± 0.045 和 0.347 ± 0.033,加药组较点燃组和加药对照组 p-JNK 低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),点燃组与加药对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

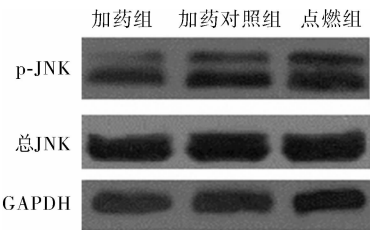


图 1 各组海马区 JNK 和 p-JNK 蛋白表达  
Fig. 1 Expression of JNK and p-JNK protein in hippocampus in each group

**2.2 GFAP 检测结果** 点燃组、加药对照组及加药组右侧 CA1 区 GFAP 染色阳性细胞计数分别为 68.82 ± 5.36、69.06 ± 4.63 和 42.27 ± 4.63,点燃组与加药对照组 GFAP 阳性细胞计数比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),而加药组显著少于点燃组和加药对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.3 尼氏染色结果** 点燃组、加药对照组及加药组右侧 CA1 区正常神经元计数 (每个视野) 分别为 19.87 ± 3.58、20.13 ± 5.37 和 37.82 ± 6.30,点燃组与加药对照组正常神经元计数比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),而加药组正常神经元计数明显多于点燃组和加药对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

3 讨论

本实验采用慢性电刺激点燃建立小鼠内侧 TLE 模型,前期研究经病理观察亦显示,CA3 和 CA1 区神经元明显丢失,存在有明显海马硬化现象<sup>[2]</sup>。进一步研究显示,JNK 通路反复激活与海马硬化发生过程相似,JNK 信号通路可能参与了 TLE 的形成,表现为 JNK 信号通路的激活,p-JNK 水平升高<sup>[1]</sup>,这有助于了解 TLE 发病的分子机制,并寻找有效控制 TLE 发作的途径。

JNK 家族是促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 超家族成员之一,属于进化上保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。有研究表明,JNK 信号通路是细胞生理和病理状态之间的重要调节靶点,参与神经退行性疾病的细胞凋

亡<sup>[3-4]</sup>。JNK 在转录因子活化、mRNA 稳定性、细胞凋亡进展和细胞增殖方面发挥重要作用<sup>[5]</sup>。

SP600125 是常用的 JNK 高选择性抑制剂和可逆的三磷酸腺苷环化酶竞争性抑制剂,对 JNK 各亚型能高选择性抑制,其相对分子质量为 220,通常在 50 倍的显微镜下可见 SP600125 为细小的针状沉淀物,难溶于水,其实验溶液常需使用 DMSO 制备<sup>[5]</sup>。本实验所用 SP600125 溶于 DMSO 中所获得,而且实验结果显示 DMSO 对 SP600125 实验结果无明显影响,表明 DMSO 是一种可靠的溶媒。

前期研究结果提示慢性电刺激点燃建立小鼠内侧 TLE 模型点燃后 Wistar 大鼠海马 CA1 区正常神经元的数目减少,海马神经元凋亡增加,CA1 区胶质细胞增生明显,p-JNK 水平明显升高<sup>[1-2]</sup>。本研究结果提示 JNK 抑制剂 SP600125 降低了点燃 Wistar 大鼠海马组织中 p-JNK 水平,减少了 CA1 区胶质细胞增生,增加了正常神经元数目,减少了海马神经元凋亡,起到了保护神经元的作用。这些结果与既往的文献报道基本一致<sup>[6-7]</sup>。

转录因子 c-Jun 是 JNK 激酶的底物,SP600125 可能是通过作用于 c-Jun 氨基末端活性区特异磷酸化位点 Ser63 与 Ser73 来抑制 c-Jun 的表达与激活,从而促进了细胞的凋亡。有研究结果显示,SP600125 通过抑制 JNK 激活,降低磷酸化 c-Jun 的表达水平,并阻止其进入核内,进一步抑制 bcl-2 的激活,从而抑制凋亡程序的启动,使神经元免于损伤,SP600125 可降低 p-JNK 水平,并可抑制神经元的凋亡<sup>[8-10]</sup>。SP600125 具有 JNK 小分子抑制剂的特点,同时 SP600125 显著地表现出酶和细胞分析选择性,细胞内 SP600125 水平达到抑制 c-Jun 磷酸化时,其也能抑制环氧化酶-2 (cyclo oxygen ase-2, COX-2),白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2),干扰素-γ (interferon-γ, IFN-γ),肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α),IL-10 和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 基因表达<sup>[5]</sup>,但是 SP600125 抑制 JNK 激活、降低磷酸化 c-Jun 水平的具体机制有待进一步研究。

本研究结果表明,JNK 的特异性抑制剂 SP600125 减少了电点燃癫痫模型大鼠杏仁核 CA1 区胶质细胞增生,增加了正常神经元的数目,减少了海马神经元凋亡,抑制 JNK 信号通路,可能对致病后海马神经元具有保护作用。因此,通过 SP600125 抑制 JNK 的活性可能是治疗 TLE 的一种新的策略。

(下转第 895 页)

验用不同浓度的 LMWH 作用于 HepG<sub>2</sub> 细胞株,结果显示,随着 LMWH 浓度的增加及作用时间的延长,HepG<sub>2</sub> 细胞的迁移率和黏附率都有所下降。证明了 LMWH 确实可以抑制肝癌细胞的迁移及黏附能力。

综上所述,LMWH 在抑制肿瘤转移中起到非常重要的作用。本研究给人们的启示是,能否从 LMWH 中提炼出抑制肝癌转移的核心成分,从而在抑制肿瘤转移的同时尽可能地减少大量应用 LMWH 所出现的不良反应。同时,本实验有利于更深入地认识肿瘤的生物行为,以此为依据开发新药物,为肿瘤的临床治疗奠定基础。

参考文献:

[1] Richard S F,Jordi B. A journal for all stakeholders in liver cancer management[J]. *Hepatic Oncol*,2014,1(1):1-5.

[2] Satou S,Ishizawa T,Masuda K,et al. Indocyanine green fluorescent imaging for detecting extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol*,2013,48(10):1136-1143.

[3] 刘志磊,孙薇,贺福初,等. 肝细胞癌的微环境研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2012,39(5):416-422.

[4] Wang R A,Li Z S,Yan Q G,et al. Resistance to apoptosis should not be taken as a hallmark of cancer[J]. *Chin J Cancer*,2014,33(2):47-50.

[5] Shayan R,Inder R,Kamezis T,et al. Tumor location and nature of lymphatic vessels are key determinants of cancer metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*,2013,30(3):345-356.

[6] 董淳强,杨体泉,董昆,等. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 、促血管生成素-2 在小儿肾母细胞瘤中的表达[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(15):1191-1194.

[7] 王军保. 低分子肝素在中老年人腹部肿瘤围手术期的应用研究[J]. 中国现代药物应用,2013,7(18):119-120.

[8] 张洁,邸立军,宋国红,等. 低分子肝素治疗恶性肿瘤并发深静脉血栓剂量及疗效的初步研究[J]. 实用肿瘤杂志,2012,27(3):267-270.

(上接第 891 页)

参考文献:

[1] 刘平,刘红朝,李学慧,等. c-Jun 氨基末端激酶信号通路在大鼠杏仁核电点燃癫痫模型的发病机制中的作用[J]. 医药论坛杂志,2014,35(5):7-9.

[2] 刘平,刘红朝,舒凯,等. 大鼠杏仁核电点燃癫痫模型的建立及海马病理变化的初步研究[J]. 中医学报,2011,26(4):445-447.

[3] Sabapathy K. Role of the JNK pathway in human diseases[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*,2012,106(2):145-169.

[4] Weston C R,Davis R J. The JNK signal transduction pathway[J]. *Curr Opin Cell Biol*,2007,19(2):142-149.

[5] Bennett B L,Sasaki D T,Murray B W. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001,98(24):13681-13686.

[6] Chen X,Wu J,Hua D,et al. The c-Jun N-terminal kinase inhibitor

[9] 罗文婷,孙大卫. 角膜、结膜、脉络膜及视网膜淋巴管和新生淋巴管的研究进展[J]. 眼科新进展,2013,33(6):584-587,596.

[10] Park K,Kim Y S,Lee G Y,et al. Antiangiogenic effect of bile acid acylated heparin derivative[J]. *Pharm Res*,2007,24(1):176-185.

[11] Maraveyas A,Johnson M J,Xiao Y P,et al. Malignant melanoma as a target malignancy for the study of the anti-metastatic properties of the heparins[J]. *Cancer Metastasis Rev*,2010,29(4):777-784.

[12] Lee D Y,Park K,Kim S K,et al. Antimetastatic effect of an orally active heparin derivative on experimentally induced metastasis[J]. *Clin Cancer Res*,2008,14(9):2841-2849.

[13] Napier S L,Healy Z R,Schnaar R L,et al. Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*,2007,282(6):3433-3441.

[14] Casu B,Vlodavsky I,Sanderson R D. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer[J]. *Pathophysiol Haemost Thromb*,2008,36(3/4):195-203.

[15] Gaven Betal S,Setty B N. Phosphatidylserine-positive erythrocytes bind to immobilized and soluble thrombospondin-1 via its heparin binding domain[J]. *Transl Res*,2008,152(4):165-177.

[16] Gritters M,Borgdorff P,Grooteman M P,et al. Platelet activation in clinical haemodialysis;LMWH as a major contributor to bio-incompatibility[J]. *Nephrol Dial Transplant*,2008,23(9):2911-2917.

[17] 刘金花,徐吟亚,付波,等. 低分子肝素钙对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者血栓前状态的影响[J]. 新乡医学院学报,2012,29(9):680-682.

[18] 刘开祥,李浩,俸军林,等. 低分子肝素对鼠脑缺血再灌注损伤 P-选择素和 L-选择素表达的影响[J]. 广东医学,2008,29(10):1628-1630.

[19] Evani S J,Prabhu R G,Gnanaruban V,et al. Monocytes mediate metastatic breast tumor cell adhesion to endothelium under flow[J]. *FASEB J*,2013,27(8):3017-3029.

( 本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月 )

SP600125 is neuroprotective in amygdala kindled rats[J]. *Brain Res*,2010,1357(21):104-114.

[7] 吴俊,陈旭,舒凯,等. c-Jun 氨基末端激酶信号通路及其抑制剂 SP600125 在大鼠杏仁核电刺激癫痫模型中的作用[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(7):1352-1354.

[8] Anand S S,Maruthi M,Babu P P. The specific, reversible JNK inhibitor SP600125 improves survivability and attenuates neuronal cell death in experimental cerebral malaria( ECM ) [J]. *Parasitol Res*,2013,112(5):1959-1966.

[9] Rahman M,Zhang Z,Mody A A,et al. Intraperitoneal injection of JNK-specific inhibitor SP600125 inhibits the expression of presenilin-1 and Notch signaling in mouse brain without induction of apoptosis[J]. *Brain Res*,2012,1448:117-128.

[10] Kang M K,Kang N J,Jang Y J,et al. Gallic acid induces neuronal cell death through activation of c-Jun N-terminal kinase and downregulation of Bcl-2[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2009,1171(8):514-520.

( 本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月 )