

· 论 著 ·

## 致癫痫大鼠海马中 JNK/p38 信号转导通路的激活及其作用

夏杰<sup>1</sup>, 郑铮<sup>1</sup>, 彭玉<sup>1</sup>, 张其梅<sup>1△</sup>, 陈阳美<sup>2</sup>

(1. 三峡大学第一临床医学院神经内科, 湖北宜昌 443002; 2. 重庆医科大学附属第二医院神经内科 400010)

**摘要:**目的 探讨 c-Jun 氨基末端激酶通路(JNK)和 p38 通路在癫痫持续状态(SE)大鼠海马中的活性变化规律及其意义。  
**方法** 建立氯化锂-匹罗卡品癫痫持续状态模型,在不同时间点用免疫组化法检测海马结构 JNK 和 p38 磷酸化状态,并观察组织病理学改变。  
**结果** 对照组 P-JNK 极少活化而 p38 在海马各结构广泛活化。SE 30 min 后 JNK 和 p38 在海马神经元强烈激活,2 h 时达到高峰,6 h 后各区均明显减少,12 h 后降至基础水平,在所有时间点,JNK 和 p38 在齿状回的活化程度均显著高于 CA1 和 CA3 区。海马结构各区可见到许多神经元发生变性和坏死。  
**结论** JNK 和 p38 信号转导通路在氯化锂-匹罗卡品致痫过程中被激活,并可能在发作后参与海马神经元损伤的病理生理过程。

**关键词:** p38 丝裂原活化蛋白激酶类; 癫痫; 海马; c-Jun 氨基末端激酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.28.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)28-2817-03

## Activation of JNK/p38 signal transduction pathway in hippocampus of epileptic rat and it's significance

Xia Jie<sup>1</sup>, Zheng Zheng<sup>1</sup>, Peng Yu<sup>1</sup>, Zhang Qimei<sup>1△</sup>, Chen Yangmei<sup>2</sup>

(1. Department of Internal Neurology, the First Clinical Medical Institute of China Three Gorges University Yichang, Hubei 443002, China; 2. Department of Internal Neurology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract: Objective** To investigate the variations of activities of the c-Jun amino terminal kinase pathway and the p38 pathway in rat hippocampus during status epilepticus(SE) and its significance. **Methods** The lithium-pilocarpine-induced epileptic model was established to evaluate the phosphorylation forms of JNK and p38 by immunohistochemistry and observe histopathology changes at different times after pilocarpine injection. **Results** The JNK was scarcely activated and phospho-p38 immunoreactivity was observed widely in saline-treated rats hippocampal formation. In pilocarpine-treated rats, the hippocampal neurons showed a strong immunoreactivity of phospho-JNK and phospho-p38 at 30min which peaked at 2h after pilocarpine injection, while decreased markedly at 6h and returned to basal level at 12h. At all time points, activation states of JNK and p38 in the dentate gyrus were significantly higher than the CA1 and CA3 areas. Many injured neurons were found in hippocampus of SE rats. **Conclusion** JNK and p38 signal transduction pathway could be activated in lithium-pilocarpine-induced epileptic model, and may participate in the pathophysiology of hippocampal neurons damage.

**Key words:** p38 mitogen-activated protein kinases; epilepsy; hippocampus; c-Jun amino terminal kinase

癫痫是困扰人类多年的神经系统顽症之一,其发病机制极为复杂,至今难以完全了解,已证明海马神经元损伤与临床常见发作类型如复杂部分性发作、癫痫持续状态的形成和发展密切相关。信号转导与人类健康和疾病有着重要关系,细胞的增殖、分化、生长、死亡都离不开信号转导通路。丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)是目前发现的最重要的信号转导蛋白之一,本研究以氯化锂-匹罗卡品致大鼠癫痫模型为基础,通过观察海马神经元中 MAPK 家族成员 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun amino-terminal kinase, JNK)、p38 的活化规律,及其与痫性神经元损伤的关系,从信号转导的角度来探索癫痫的形成和发展。

## 1 材料与方

**1.1 实验动物分组和建立大鼠癫痫模型** 清洁级雄性 Wistar 大鼠 35 只,体质量 200~250 g,随机分为致痫组 29 只,对照组 6 只,由三峡大学医学动物实验中心提供。在清醒状态下,腹腔注射氯化锂(美国 Alexis 公司)3 meq/kg,18 h 后再腹腔注射盐酸匹罗卡品(美国 Alexis 公司)50 mg/kg,对照组注入等

量生理盐水。按照经典的 Racine 癫痫发作行为标准进行行为观察记录:0 级,无任何反应,正常行为状态;I 级,面部阵挛,包括眨眼、动须、节奏性咀嚼等;II 级, I 级加节律性点头;III 级, II 级加前肢痉挛;IV 级, III 级加后肢站立;V 级, IV 级加摔倒<sup>[1]</sup>。动物发作级别均达到 IV 级以上。从出现 IV 级发作开始计时,分别在 30 min 及 2、6、12 h 开始标本制备。

**1.2 标本制备** 在相应时间点,两组大鼠用 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉,经 4% 冷多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌流固定后,根据 Paxinos 立体定位图谱,取含海马结构的两块相邻组织(冠面),每块厚约 2 mm,石蜡包埋后作连续冠状切片,片厚 5 μm,生理盐水组按同样方法制作标本。

**1.3 免疫组化染色** 采用链霉菌卵白素-过氧化物酶法(SP 法)。兔抗大鼠 Phospho-JNK 多克隆抗体(1:100 μL,美国 Cell Signaling Technology 公司)、兔抗大鼠 Phospho-p38 MAPK 多克隆抗体(1:25 μL,美国 Cell Signaling Technology 公司),SP 试剂盒(美国 Zymed 公司,生物素化羊抗兔抗体 1:50),DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),具

△ 通讯作者, E-mail: liu\_aihua@ctgpc.com.cn.

体步骤按试剂说明书进行。阴性对照以 PBS 代替一抗孵育,余同。

**1.4 组织病理学观察** 将标本常规制成石蜡切片,HE 染色,光学显微镜下观察癫痫持续不同时间海马 CA1 区、CA3 区、齿状回颗粒细胞组织病理学变化。

**1.5 统计学处理** 在 400 倍的光镜视野下,分别取海马 CA1 区、CA3 区和齿状回颗粒细胞的连续 5 个不重复视野,计数 Phospho-JNK 和 Phospho-p38 胞体免疫反应阳性细胞,每只鼠各取 3 张切片,全部数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,结果应用 SPSS13.0 统计软件,行单因素方差分析,不同时间点,不同脑区间比较采用  $q$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 行为学观察** 匹罗卡品注射后出现 20~30 min 的潜伏期,表现为竖毛、流涎、排便等外周 M 型胆碱能反应和一些刻板行为如凝视、咀嚼、吸鼻、探索反复头颈上仰等,随后咀嚼、吸鼻加强并伴面肌痉挛、点头,最后发展为肢体阵挛伴站立、跌倒或翻转,之后进入 SE,以点头为主,伴阵发性阵挛发作、站立,持续 6~12 h。达到 IV 级发作的成功率为 83%(24/29),3 只发作为 III 级以下,2 只死亡,对照组未出现癫痫发作。

**2.2 Phospho-JNK 免疫组化检测** 对照组中,海马各区少见 JNK 的激活,SE 30 min 后,phospho-JNK 在 CA1 区、CA3 区锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层的胞体表达增多,与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),2 h 时达到高峰,见插 II 图 1,

以齿状回尤为显著( $P < 0.01$ ),见插 II 图 2;6 h 后,p-JNK 的表达水平降至基础水平,在所有时间点,齿状回免疫标记神经元均显著高于另两个脑区,表达差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 1。

**2.3 Phospho-p38 免疫组化检测** 对照组中,phospho-p38 免疫标记神经元广泛存在于海马各区,SE 30 min 后,phospho-p38 在 CA1 区、CA3 区锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层的胞体表达较对照组明显增多,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),2 h 时达到高峰,呈密集颗粒状分布,6 h 后,上述部位的免疫标记神经元表达减少,与 2 h 相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),12 h 后,各区均接近对照组。在所有时间点,齿状回免疫标记神经元均显著高于另两个脑区,表达差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 1 海马结构各区 p-JNK 胞体免疫反应阳性神经元数量的动态变化( $\bar{x} \pm s$ )

海马结构区	对照组	致痫组		
		30 min	2 h	6 h
CA1 区	1.39±1.29	43.50±5.64*	48.44±5.75 <sup>△</sup>	4.28±2.11*
CA3 区	3.72±2.30	31.89±5.01*	37.11±5.20 <sup>△</sup>	6.34±2.52*
齿状回	6.22±1.99	72.67±7.42*	128.38±12.08*	13.71±2.42*

\*: $P < 0.01$ ;<sup>△</sup>: $P < 0.05$ ,与同一脑区的前一时间点比较。

表 2 海马结构各区 p-p38 胞体免疫反应阳性神经元数量的动态变化( $\bar{x} \pm s$ )

海马结构区	对照组	致痫组			
		30 min	2 h	6 h	12 h
CA1 区	22.44±2.36	56.94±5.81*	64.06±6.31*	32.33±3.35*	21.12±2.05*
CA3 区	16.53±1.62	38.06±3.87*	40.06±4.05 <sup>△</sup>	22.89±2.24*	17.23±1.71 <sup>△</sup>
齿状回	42.17±5.29	96.89±10.52*	125.17±12.33*	55.83±5.61*	40.06±4.31*

\*: $P < 0.01$ ;<sup>△</sup>: $P < 0.05$ ,与同一脑区前一时间点比较。

**2.4 组织病理学观察** 对照组海马各区神经元排列整齐,形态完整,核圆形,染色质分布均匀。SE 后 30 min 至 2 h 内与对照组相比各区细胞无明显变化。6 h 时,CA1 区和 CA3 区神经元失去正常结构,胞体呈三角形或圆形,胞质浓缩深染,核固缩,核仁不明显,齿状回颗粒细胞形态基本完整,见插 II 图 3、4。12 h 时,CA1 和 CA3 区病变加重,可见细胞脱失,齿状回神经元开始出现核固缩,胞浆空泡变性等变化。

## 3 讨论

癫痫的发病机制至今尚未明确,研究表明,海马病变和癫痫的发生及形成之间存在密切关系,海马结构的病理变化包括神经元损伤、苔藓纤维发芽(mossy fiber sprouting, MFS)、胶质细胞增生,它们既是癫痫发生的结果,也是癫痫继续发展造成频发和难治的原因<sup>[2]</sup>。研究发现,海马结构神经元损伤和丢失是诱发 MFS 的关键因素<sup>[3]</sup>,癫痫时海马神经元的脱失和微环境的改变可激活星形胶质细胞的功能,出现增生肥大以及慢性期的胶质瘢痕质细胞发生病理变化<sup>[4]</sup>,因此,对癫痫后海马病理变化的研究具有重要意义和临床价值。

MAPKs 信号转导通路主要有 3 条,即细胞外信号调节酶(extracellular-signal regulated protein kinase, ERK)通路、JNK 通路、p38 通路,活化时呈磷酸化形式(p-MAPKs),广泛参与细

胞的增殖和分化、细胞周期的调控及细胞凋亡、坏死的调节<sup>[5]</sup>。近来研究常常将 p38 通路和 JNK 通路放在一块研究,二者主要都被细胞应激信号激活,通过调节核转录因子 c-Jun、ATF-2 等的表达发挥诱导神经元凋亡的作用<sup>[6]</sup>,当 p38/JNK 信号通路激活后,其底物 ATF-2、c-Jun 磷酸化,活化的 ATF-2 结合到 c-Jun 启动子,进而提高 c-Jun 的转录活性,大量活化的 c-Jun 进一步调节环氧酶-2(COX-2)的表达,产生神经元损伤效应<sup>[7]</sup>。

海马结构具有特殊的血供解剖特点,其前下部分由脉络膜前动脉和大脑中动脉双重供血,而 CA1 区和 CA3 区仅由脉络膜前动脉供血,且经过长的分支和扭转才能到达 CA1 区,因此,CA1 区 CA3 区神经元对缺氧及神经毒素损伤更为敏感。通过研究也证实了在实验性大鼠颞叶癫痫持续状态,海马神经元的损伤易感区依次为 CA1 区、CA3 区、齿状回、CA2 区<sup>[8]</sup>。本实验观察到癫痫持续 6 h 时,CA1 和 CA3 区有明显的神经元坏死,齿状回颗粒细胞形态基本完整,很少有变性神经元,12 h 后齿状回颗粒细胞病变也较 CA1 区和 CA3 区轻,与血供解剖原理相符。但有研究表明,海马 CA1 区神经元对缺血的选择易损性并不能完全由血供解剖因素来解释,其中胶质细胞病理变化及信号转导也起重要作用<sup>[9]</sup>。

在研究中观察到 p-p38 在 CA1、CA3 区表达持续性升高, SE 6 h 后仍高于对照组, 直到 12 h 后才接近正常水平, 同时在组织病理学可观察到 SE6 h CA1、CA3 区神经元明显坏死, 推测 p38 通路的激活诱导了这两个亚区的神经元损伤, 参与癫痫后 CA1、CA3 区神经元高易损性的形成。P38 信号通路的促癫痫机制不仅在于诱导神经元凋亡作用, 还可能与参与发作后胶质增生有关。研究发现 p38 在海人酸致痫鼠胶质细胞有迟发性表达, 并主要位于易损区 CA1、CA3 区的反应性星形胶质细胞核内, 提示 p38 信号通路参与诱导海人酸致痫后迟发性细胞损伤和反应性胶质增生<sup>[10]</sup>。Kim 等<sup>[11]</sup>用 p38 特异性激活抑制剂 SB203580 后, 证实在海人酸致痫海马中反应性星形胶质细胞增生受到抑制, CA1、CA3 区的神经元脱失也明显减少。此外, 本研究发现 p-p38 在正常神经元有中等程度的表达, 可能与 p38 参与有丝分裂同期的调控有关, 实验证实, p38 抑制剂能显著加速有丝分裂周期, 表明 p38 的活化是有丝分裂周期的关键调节因素<sup>[5,12]</sup>。

本研究也发现 p-JNK 在发作后短暂升高很快便又降至基础水平, SE6 h p-JNK 在海马各区几乎无表达, 这可能与 JNK 通路仅参与神经元损伤有关, 当发作进行到一定程度后, 被其它信号如 JNK 抑制蛋白-1 (JNK interacting protein-1, JIP-1) 所抑制<sup>[13]</sup>。研究发现, 分别对 FVB/N 小鼠(一种神经元对兴奋性毒素损伤敏感的鼠系)和 C57BL/6 小鼠(神经元对兴奋性毒素损伤耐受的鼠系)海人酸致痫后, 仅在前者海马神经元检测到 JNK 免疫反应活性增高, 且分存于 CA1、CA3 区、齿状回门区及颗粒细胞, CA2 区几乎无变化, 表明 JNK 通路可能是癫痫后诱导神经元损伤的关键<sup>[14]</sup>。JNK 通路的激活不仅启动神经元核内的凋亡程序, 也能促进损伤神经元的轴突外向生长<sup>[15]</sup>, 提示 JNK 信号通路也可参与癫痫海马的 MFS, 从而促进癫痫的形成与发展。此外, 胶质细胞增生也参与并可能促进 JNK 通路的神经元的损伤作用<sup>[16]</sup>。

总之, 本研究证实 JNK 和 p38 信号转导通路在氯化锂-匹罗卡品致病过程中被激活, 并可能在发作后参与海马神经元损伤的病理生理过程, 而海马神经元的损伤与保护是一个复杂的病理生理过程, 其机制由多种相互平行和交叉的信号转导途径来共同调节, 具体的调控机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 付林, 傅峻峰, 陈启雄. 实验性癫痫动物模型的研究进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(19): 2237-2239.

[2] Sharma AK, Jordan WH, Reams RY, et al. Temporal profile of clinical signs and histopathologic changes in an F-344 rat model of kainic acid-induced mesial temporal lobe epilepsy[J]. Toxicol Pathol, 2008, 36(7): 932-943.

[3] Shibley H, Smith BN. Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice[J]. Epilepsy Res, 2002, 49(2): 109-120.

[4] 陈刚, 邓艳春, 王小木, 等. 癫痫大鼠海马神经元和星形胶

质细胞的病理演变[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2007, 6(3): 229-232.

[5] Mac Corkle RA, Tan TH. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control[J]. Cell Biochem Biophys, 2005, 43(3): 451-461.

[6] Liu AL, Wang XW, Liu AH, et al. JNK and p38 were involved in hypoxia and reoxygenation-induced apoptosis of cultured rat cerebellar granule neurons[J]. Exp Toxicol Pathol, 2009, 61(2): 137-143.

[7] Yang Y, Zhu X, Chen Y, et al. p38 and JNK MAPK, but not ERK1/2 MAPK, play important role in colchicine-induced cortical neurons apoptosis[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 576(1/3): 26-33.

[8] 叶静, 张文波, 祁吉, 等. 实验性癫痫大鼠颞叶及海马损害的病理学观察[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2000, 26(3): 168-169.

[9] 贾栋, 高国栋, 赵振伟. 海马 CA1 区神经元选择易损性组织结构机制的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(4): 330-331.

[10] Che Y, Yu YM, Han PL, et al. Delayed induction of p38 MAPKs in reactive astrocytes in the brain of mice after KA-induced seizure[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 94(1/2): 157-165.

[11] Kim SW, Yu YM, Piao CS, et al. Inhibition of delayed induction of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates kainic acid-induced neuronal loss in the hippocampus[J]. Brain Res, 2004, 1007(1/2): 188-191.

[12] Cha H, Wang X, Li H, et al. A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress[J]. J Biol Chem, 2007, 282(31): 22984-22992.

[13] Dajas-Bailador F, Jones EV, Whitmarsh AJ. The JIP1 scaffold protein regulates axonal development in cortical neurons[J]. Curr Biol, 2008, 18(3): 221-226.

[14] Schauwecker PE. Seizure-induced neuronal death is associated with induction of c-Jun N-terminal kinase and is dependent on genetic background[J]. Brain Res, 2000, 884(1/2): 116-128.

[15] Eminel S, Roemer L, Waetzig V, et al. c-Jun N-terminal kinases trigger both degeneration and neurite outgrowth in primary hippocampal and cortical neurons[J]. J Neurochem, 2008, 104(4): 957-969.

[16] Cole-Edwards KK, Musto AE, Bazan NG. c-Jun N-terminal kinase activation responses induced by hippocampal kindling are mediated by reactive astrocytes[J]. J Neurosci, 2006, 26(32): 8295-8304.