

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.24.007

CCL27 CCL28 及 CCR10 在癫痫小鼠急性期表达增高*

钱希颖¹,金立德¹,曹霞^{2△}

(1. 云南省第一人民医院神经外科,昆明 530100;2. 昆明医科大学第二附属医院中心实验室,昆明 650101)

[摘要] 目的 探讨趋化因子 CCL27、CCL28 及其受体 CCR10 在小鼠癫痫急性期外周血中的表达变化。方法 取正常及癫痫小鼠急性期不同时间点(10 min、30 min、1 h、2 h)外周血利用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法检测毛果云香碱致癫痫发作小鼠急性期外周血中 CCL27、CCL28 mRNA 水平;同期取正常及癫痫急性期不同时间点(10 min、30 min、1 h、2 h)肝素抗凝外周血,提取淋巴细胞层后利用 FACSsort 型流式细胞仪检测外周血淋巴细胞 CCR10 蛋白水平的表达变化。结果 癫痫小鼠发作急性期外周血中 CCL27、CCL28 mRNA 水平、淋巴细胞中 CCR10 蛋白表达水平均在癫痫发作 2 h 高于对照组($P < 0.05$)。结论 癫痫发作早期已出现外周血免疫功能紊乱,该病理变化可能与癫痫发病过程中的炎症反应和神经细胞的凋亡相关。

[关键词] 癫痫;趋化因子类;趋化因子 CCL27;趋化因子 CCL28;CCR10**[中图分类号]** R392.11**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)24-3331-03

CCL27, CCL28 and CCR10 increased in the peripheral blood in the acute phase of pilocarpine-induced status epilepticus mice*

Qian Xiyang¹, Jin Lide¹, Cao Xia^{2△}

(1. Department of Neurosurgery, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan, 530100, China;

2. the Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Kunming

Medical University, Kunming, Yunnan, 650101, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of chemokine CCL27, CCL28 and their receptor CCR10 in mouse peripheral blood in the acute phase of epilepsy. **Methods** The peripheral blood of acute epileptic mice at different time points(10 min, 30 min, 1 h, 2 h) was collected, real-time PCR was used to detect the mRNA expression level of CCL27 and CCL28. The heparin anticoagulation peripheral blood at the same time points(10 min, 30 min, 1 h, 2 h) of normal and acute phase of epileptic mice were collected and flow cytometry was used to investigate the expression of CCR10 in peripheral blood lymphocyte. **Results** The mRNA expression level of CCL27, CCL28 in peripheral blood and the expression of CCR10 in lymphocytes were found significantly increased at 2 h in epileptic mice than those of normal($P < 0.01$). **Conclusion** The immune function disorder occurred in peripheral blood in early epileptic pathological process and might be associated with the subsequent inflammatory reaction and neuron apoptosis.

[Key words] epilepsy; chemokine factors; chemokine CCL27; chemokine CCL28; CCR10

近年来炎症反应在癫痫发病中的作用逐渐被人们所认识^[1]。趋化因子因其在炎症反应中发挥重要作用并参与癫痫发作及癫痫病理过程而受到人们关注^[2-3]。研究发现,趋化因子及其受体不仅广泛表达于中枢神经系统(central nervous system, CNS),而且参与多种 CNS 病变,如阿尔兹海默症、多发性硬化、艾滋病性痴呆等疾病^[4-7],临床和大量动物实验发现部分趋化因子及其受体参与了癫痫发病过程^[8-12],其中本文作者参与的课题研究在 2007 年报道过趋化因子受体 CCR10 在 Swiss 小鼠癫痫发病中的可能作用^[13],但目前暂无 CCR10 及其配体 CCL27、CCL28 在癫痫外周血中的表达变化的报道。本文通过研究 CCL27、CCL28 及 CCR10 在毛果云香碱致癫痫小鼠急性期外周血中的表达变化,探讨其在癫痫发病急性期可能的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 昆明 Swiss 小鼠由昆明医学院实验动物中

心提供,小鼠的年龄控制在 2 个月左右 $[(60 \pm 5) d]$,体质量 20~25 g,雌雄不拘。诱导前记录每只实验小鼠的年龄、性别和体质量,对小鼠编号并按照随机数字表法分组(分为 4 个不同时间处理组:癫痫发作 10 min、30 min、1 h 及 2 h,每组有 6 只老鼠建模成功,于每个时间点设立对照组)。按照分组,Swiss 小鼠分别在毛果云香碱诱导的癫痫持续状态中(during pilocarpine induced status epilepticus, DPISSE)或毛果云香碱诱导的癫痫持续状态后(after pilocarpine induced status epilepticus, APISSE)不同时间点处死。所有动物实验程序均严格遵守云南实验动物关怀和使用健康指南研究所的相关规定,在整个实验过程中,在操作上尽量避免对动物的伤害。

1.1.2 实验器材及实验药品 低温冷冻切片机(HM505E, Microm, Germany);分光光度计(NanoDrop, USA);LightCycler 2.0 Instrument(Roche, Germany);mRNA 的微量提取试剂盒及一步法 PCR 试剂盒购自 Qiagen 公司(Valencia, CA, USA);核酸分子量标准 DL-2000 购自大连宝生物公司;毛果

云香碱和硝酸甲基东莨菪碱购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 癫痫小鼠模型的建立

毛果云香碱诱发癫痫小鼠模型的建立:48 只小鼠依照文献[14-16]方法所述操作进行毛果云香碱诱发癫痫处理。具体操作步骤为:诱导前 30 min,每只小鼠腹部皮下注射硝酸甲基东莨菪碱 1 mg/kg。实验组小鼠腹腔注射毛果云香碱 300 mg/kg,对照组给予腹腔注射 0.9% NaCl 溶液 0.1 mL,将小鼠 1 只/笼分开,并放置在安静、光线较暗的实验间以避免相互激惹和声音刺激。仔细观察和记录动物的反应并计时。

1.2.2 实时定量荧光 PCR(Real-time PCR)半定量检测

取小鼠正常及癫痫急性期不同时间点(10 min、30 min、1 h、2 h)外周血,每组 12 只,共 48 只,按照 mRNA 的微量提取试剂盒及一步法 PCR 试剂盒说明书提取外周全血 mRNA,置于 -80 °C 备用;SYBR Green I 双链 DNA 结合染料用于 Real-time PCR 检测,以突触素作为参照基因,检测 CCL27、CCK28 mRNA 表达量(引物序列见表 1)。所有反应重复 3 次。反应总体积为 20 μ L,包括 5 μ L 的 cDNA,2 μ L 引物混合物(每种引物浓度为 10 μ mol/L),4 μ L SYBR Green I,9 μ L SYBR Green 水,混和后,在 LightCycler 中进行反应。反应条件为:95 °C 10 min;94 °C 1 s,60 °C 6 s,72 °C 10 s,45 个循环;最后冷却至 4 °C。热启动 PCR 方法用于防止不完整的 DNA 变性,扩增后的实时 PCR 产物从毛细反应管甩下后,5 μ L PCR 产物经 1.8% 琼脂糖凝胶上分离电泳,溴化乙锭染色后在紫外光下观察。用 CCL27、CCL28 基因表达量与突触素的表达量比值表示 CCL27、CCL28 的相对表达量。

表 1 目的基因引物序列

目的基因	引物序列(3'-5')	引物长度 (bp)	产物大小 (bp)
CCL27	正向:TCCTTGCTGCGAATGTGGTG	21	146
	反向:TGCGACAGAGGAGACCACGAC	22	
CCL28	正向:TGCTGTCATCCTTCATGTTAAT	21	118
	反向:AACATACGTTTTCTCTGCCATT	21	
突触素	正向:AGTGCCCTCAACATCGAAGTC	21	123
	反向:CGAGGAGGAGTAGTACCAAC	22	

1.2.3 流式细胞术

取正常及癫痫急性期不同时间点(10 min、30 min、1 h、2 h)肝素抗凝外周血(实验组:每组 3 只,共 12 只;对照组:每组 3 只,共 12 只。总计 24 只),加淋巴细胞分离液 2 mL,1 500 r/min 离心 5 min,提取淋巴细胞层,再以磷酸盐缓冲液(PBS)2 mL 漂洗后离心 3 次,去除上清液后用 70%乙醇固定 30 min。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的人抗鼠单克隆抗体 CCR10 及阴性对照羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG)FITC(法国国际免疫公司)标记后的淋巴细胞分离液,用 FAC-Scort 型流式细胞仪(美国 BD 公司)检测。测试结果用 Cell Qwest Plot(美国 BD 公司)分析点图及组方图,以荧光强度的几何均数表示外周血淋巴细胞中 CCR10 的表达水平。

1.3 统计学处理

采用 Graphpad Prism 4.0 统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癫痫动物模型的建立

昆明 Swiss 小鼠在毛果云香碱诱导后(25.8 \pm 15.6)min 后进入癫痫持续状态(凝视逐渐频繁,间或出现咀嚼运动,有大量唾液从口腔流出,逐渐出现点头运动,由前肢剧烈抽搐发展到后退、向后跌倒和身体旋转,甚至角弓反张),对照组未见癫痫发作。维持时间为(6.8 \pm 1.8)h,病死率 18.2%。在造模中,将约 1% 小鼠未能成功诱导并剔除。

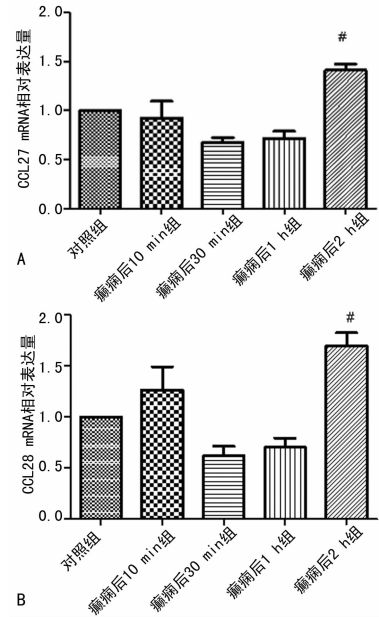


图 1 癫痫小鼠外周血 CCL27、CCL28 mRNA 表达水平。#: $P < 0.05$,与对照组比较。

图 1 癫痫小鼠外周血 CCL27、CCL28 mRNA 表达

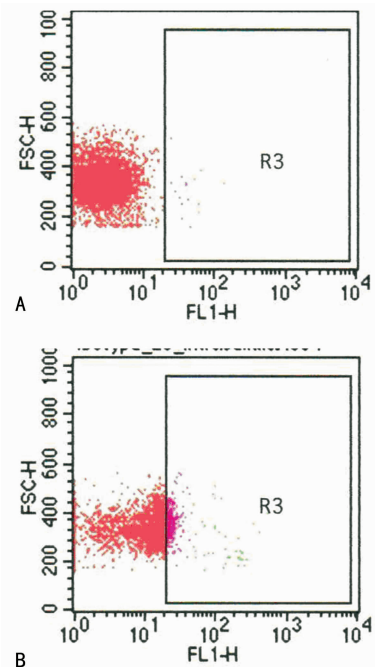


图 2 癫痫小鼠外周血淋巴细胞 CCR10 的表达

2.2 CCL27、CCL28 mRNA 水平在癫痫小鼠急性期外周血中的表达检测

提取昆明 Swiss 小鼠外周血 mRNA,行 CCL27、CCL28 Real-time PCR 检测,结果显示 CCL27、CCL28 mRNA 表达水平在癫痫小鼠发作 2 h 明显高于对照组($P < 0.05$),见

图 1。

2.3 CCR10 蛋白在癫痫小鼠外周血淋巴细胞中的表达检测
用制备好的外周血淋巴细胞悬液行流式细胞检测,结果显示 CCR10 在急性癫痫小鼠发作 2 h 的外周淋巴细胞中表达水平 1.67 ± 0.65 明显高于对照组 20.86 ± 3.25 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

3 讨 论

炎性细胞趋化因子是一类相对分子质量为 8 000~14 000 的小分子家族,根据其基因组成和 N-端 2 个高度保守半胱氨酸残基位置不同,可分为 C、CC、CXC、CX3C 4 种亚型,它们能够趋化不同的炎性细胞参与急、慢性炎症反应以及先天性或获得性炎症反应。趋化因子及其受体介导的免疫炎症反应在癫痫发作中的作用正逐渐被人们所认识,其在癫痫发病过程中表达的异常增高被认为是激活和促进炎性细胞向癫痫受损区聚集的机制之一。目前 CC/CCR、CXC/CXCR、CX3C/CX3CR 家族成员均被发现与癫痫发病过程相关^[8-12],趋化因子及其受体在癫痫发病过程中异常表达也被证实与神经细胞的凋亡密切相关^[15]。本课题组在前期研究中首次在正常 Swiss 小鼠海马组织中检测到 CCR10 的表达,发现在诱发癫痫持续状态过程中及发作后 CCR10 表达异常^[13],提示 CCR10 及其配体 CCL27、CCL28 在癫痫发作中可能发挥了一定的作用,但它们是否在癫痫发作急性期外周血中也出现异常表达变化?目前尚不清楚。本研究利用 Real-time PCR 方法检测了毛果云香碱致癫痫小鼠外周血急性期(10 min、30 min、1 h、2 h)CCL27、CCL28 mRNA 的表达水平,利用流式细胞术检测了外周血淋巴细胞 CCR10 的表达变化,结果显示 CCL27、CCL28 mRNA 在毛果云香碱致癫痫小鼠发作 2 h 外周血中出现明显表达上升 ($P < 0.05$),CCR10 在外周淋巴细胞上的表达也在 2 h 出现表达的上调,本研究结果进一步证实了癫痫发作早期存在一系列免疫因子表达的变化,CCR10 及其配体 CCL27、CCL28 的异常表达也可能与癫痫发病过程相关。随着对趋化因子及其受体在癫痫病理过程中作用的逐步了解,终将阐明免疫炎症与癫痫的关系,为癫痫尤其是难治性癫痫的治疗提供新的靶点。

参考文献

[1] Vezzani A, R uegg S. The pivotal role of immunity and inflammatory processes in epilepsy is increasingly recognized: introduction[J]. *Epilepsia*, 2011, 52 Suppl 3: 1-4.
[2] Sharma A. Genome-wide expression analysis in epilepsy: a synthetic review[J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(9): 1008-1032.
[3] Fabene PF, Bramanti P, Constantin G. The emerging role for chemokines in epilepsy[J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 224(1/2): 22-27.
[4] Anne Jaerve, M uller HW. Chemokines in CNS injury and repair[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(1): 229-248.
[5] Yeo SI, Kim JE, Ryu HJ, et al. The roles of fractalkine/

CX3CR1 system in neuronal death following pilocarpine-induced status epilepticus[J]. *J Neuroimmunol*, 2011, 234(1/2): 93-102.

- [6] Louboutin JP, Chekmasova A, Marusich E, et al. Role of CCR5 and its ligands in the control of vascular inflammation and leukocyte recruitment required for acute excitotoxic seizure induction and neural damage[J]. *FASEB J*, 2011, 25(2): 737-753.
[7] Fabene PF, Bramanti P, Constantin G. The emerging role for chemokines in epilepsy[J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 224(1/2): 22-27.
[8] Kan AA, van der Hel WS, Kolk SE, et al. Prolonged increase in rat hippocampal chemokine signaling after status epilepticus[J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 245(1/2): 15-22.
[9] Guzik-Kornacka A, Sliwa A, Plucinska G, et al. Status epilepticus evokes prolonged increase in the expression of CCL3 and CCL4 mRNA and protein in the rat brain[J]. *Acta Neurobiol Exp(Wars)*, 2011, 71(2): 193-207.
[10] Louboutin JP, Chekmasova A, Marusich E, et al. Role of CCR5 and its ligands in the control of vascular inflammation and leukocyte recruitment required for acute excitotoxic seizure induction and neural damage[J]. *FASEB J*, 2011, 25(2): 737-753.
[11] Yeo SI, Kim JE, Ryu HJ, et al. The roles of fractalkine/CX3CR1 system in neuronal death following pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *J Neuroimmunol*, 2011, 234: 93-102.
[12] Xu Y, Zeng K, Han Y, et al. Altered expression of CX3CL1 in patients with epilepsy and in a rat model[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(1/2): 1950-1962.
[13] Liu JX, Cao X, Tang YC, et al. CCR7, CCR8, CCR9 and CCR10 in the mouse hippocampal CA1 area and the dentate gyrus during and after pilocarpine-induced status epilepticus[J]. *J Neurochem*, 2007, 100(4): 1072-1088.
[14] Kawamura Y, Yamazaki Y, Ohashi M, et al. Cytokine and chemokine responses in the blood and cerebrospinal fluid of patients with human herpesvirus 6B-associated acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion[J]. *J Med Virol*, 2014, 86(3): 512-518.
[15] He X, Li Y, Liu Z, et al. The association between CCL2 polymorphisms and drug-resistant epilepsy in Chinese children[J]. *Epileptic Disord*, 2013, 15(3): 272-277.
[16] Xu Y, Zeng K, Han Y, et al. Altered expression of CX3CL1 in patients with epilepsy and in a rat model[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(5): 1950-1962.

(收稿日期: 2015-02-01 修回日期: 2015-08-10)