黄芩苷对惊厥持续状态幼年大鼠 海马 IL-1 β 、NF- κ B 表达的影响

李云芳 周朱璜 李光乾

【摘要】 目的 观察幼年大鼠惊厥持续状态(SC)后海马 CA1 区神经细胞凋亡以及 IL-1 β 和 NF- κ B 蛋白、MicroRNA 表达变化,并了解黄芩苷(BC)对其影响。方法 将 195 只 19 d 龄 SD 雄性大鼠随机分成生理盐水对照组(NS 组)、惊厥持续状态组(SC 组)和黄芩苷预处理组(BC 组),每组 65 只;各组按处死时间点随机分为 4、12、24、48 和 72 h 组。采用氯化锂-匹鲁卡品化学点燃法制备幼年大鼠 SC 模型;采用免疫组化法检测大鼠海马中 IL-1 β 、NF- κ B 蛋白表达,RT-PCR 法检测 NF- κ B MicroRNA 表达,TUNEL 法检测神经细胞凋亡数。结果 IL-1 β :与 NS 组(12、24、48 和 72 h 分别为 11.47 $\pm$ 2.51、12.49 $\pm$ 2.58、13.19 $\pm$ 2.39 和 12.79 $\pm$ 5.30)比较,SC 组(12、24、48 和 72 h 分别为 29.38 $\pm$ 5.18、40.09 $\pm$ 5.16、35.32 $\pm$ 6.59 和 27.98 $\pm$ 4.16)表达增强(均 $P<0.01$);与 SC 组比较,BC 组(12、24 和 48 h 组分别为 21.19 $\pm$ 4.54、29.78 $\pm$ 4.39 和 25.91 $\pm$ 5.64)表达降低(均 $P<0.05$)。NF- κ B:与 NS 组(4、12、24、48 和 72 h 组分别为 45.76 $\pm$ 15.41、41.26 $\pm$ 6.28、50.61 $\pm$ 12.54、51.72 $\pm$ 6.52 和 52.65 $\pm$ 7.65)比较,SC 组(4、12、24、48 和 72 h 组分别为 64.06 $\pm$ 6.18、71.16 $\pm$ 6.49、79.34 $\pm$ 11.76、67.07 $\pm$ 6.58 和 65.12 $\pm$ 9.66)表达增强(均 $P<0.05$);与 SC 组比较,BC 组(4、12 和 24 h 组分别为 52.65 $\pm$ 5.73、56.68 $\pm$ 5.37 和 67.01 $\pm$ 9.08)表达降低(均 $P<0.05$)。NF- κ B MicroRNA 表达与蛋白表达相似。SC 组在惊厥后 12 h 海马 CA1 区神经细胞凋亡数为(11.38 $\pm$ 2.35)个,高于 NS 组的(6.19 $\pm$ 1.48)个($P<0.01$),48 h 达到高峰(28.28 $\pm$ 5.17)个;BC 组在 12、24、48 和 72 h 时神经细胞凋亡数分别为(8.96 $\pm$ 2.21)、(13.07 $\pm$ 2.47)、(20.51 $\pm$ 4.39)和(17.36 $\pm$ 4.12)个,均低于 SC 组(均 $P<0.05$),但高于 NS 组(6.19 $\pm$ 1.48)、(6.59 $\pm$ 1.66)、(6.79 $\pm$ 1.15)和(6.31 $\pm$ 1.47)个(均 $P<0.05$)。结论 幼年大鼠 SC 后海马 CA1 区 IL-1 β 和 NF- κ B 表达增强,神经细胞凋亡增加;BC 预处理能抑制早期 IL-1 β 和 NF- κ B 蛋白、MicroRNA 表达,减少神经细胞凋亡,对幼年鼠 SC 后脑损伤具有一定的保护作用。

【关键词】 海马 惊厥持续状态 惊厥性脑损伤 黄芩苷 白细胞介素-1 β NF- κ B 凋亡

Effects of baicalin pretreatment on expression of IL-1 β , NF- κ B and neuron apoptosis in hippocampus of immature rats with status convulsion LI Yunfang, ZHOU Zhuying, LI Guangqian. Department of Neurology, Hangzhou Children's Hospital, Hangzhou 310014, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of baicalin (BC) pretreatment on expression of interleukin-1 β (IL-1 β), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and neuron apoptosis in hippocampal CA1 region in immature rats with status convulsion(SC). **Methods** One hundred and ninety-five juvenile male Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into normal control group (NS group, $n=65$), status convulsive group (SC group, $n=65$) and baicalin pre-treatment group (BC group, $n=65$). The rats in SC and BC groups were kindled into SC by lithium-pilocarpine chemical method. Expressions of IL-1 β and NF- κ B proteins were detected with immunohistochemistry, expression of NF- κ B p65 MicroRNA was detected with reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR), the neuron apoptosis was observed by TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) method. **Results** Immunohistochemistry showed that the IOD values of IL-1 β at 12, 24, 48, 72h after SC were 29.38 $\pm$ 5.18, 40.09 $\pm$ 5.16, 35.32 $\pm$ 6.59 and 27.98 $\pm$ 4.16, respectively in SC group, which were higher than those in NS group (11.47 $\pm$ 2.51, 12.49 $\pm$ 2.58, 13.19 $\pm$ 2.39 and 12.79 $\pm$ 5.30, $P<0.01$), the IOD values of IL-1 β (21.19 $\pm$ 4.54, 29.78 $\pm$ 4.39, 25.91 $\pm$ 5.64 at 12, 24 and 48 h) in BC group were decreased, as compared with those in SC group($P<0.05$). Immunohistochemistry showed that the IOD values of NF- κ B(64.06 $\pm$ 6.18, 71.16 $\pm$ 6.49, 79.34 $\pm$ 11.76, 67.07 $\pm$ 6.58 and 65.12 $\pm$ 9.66, respectively at 4, 12, 24, 48 and 72h) in SC group were significant higher than those in NS group (45.76 $\pm$ 15.41, 41.26 $\pm$ 6.28, 50.61 $\pm$ 12.54, 51.72 $\pm$ 6.52 and 52.65 $\pm$ 7.65, respectively, $P<0.05$), the IOD values of NF- κ B in BC intervention group (52.65 $\pm$ 5.73, 56.68 $\pm$ 5.37 and 67.01 $\pm$ 9.08, respectively at 4, 12 and 24h) were

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2010ZA105)

作者单位:310014 杭州市儿童医院神经内科

通信作者:李光乾,E-mail:lgqwz@aliyun.com

decreased as compared with those in SC group ($P < 0.05$). The expression of NF- κ B mRNA as measured by RT-PCR presented a similar trends as NF- κ B protein expression. The number TUNEL positive cells in hippocampus CA1 of SC group (11.38 ± 2.35) was higher than that of NS group 12 h after the SC (6.19 ± 1.48 , $P < 0.01$), reached its highest level at 48 h (28.28 ± 5.17). After the intervention with BCTUNEL positive cells showed a significant drop in SC group (8.96 ± 2.21 , 13.07 ± 2.47 , 20.51 ± 4.39 and 17.36 ± 4.12 , respectively, 12, 24, 48 and 72 h, $P < 0.05$), but still significantly higher than those of NS group (6.19 ± 1.48 , 6.59 ± 1.66 , 6.79 ± 1.15 and 6.31 ± 1.47 , respectively, $P < 0.05$). **Conclusion** The expression of IL-1 β , NF- κ B and neuron apoptosis increase in hippocampus of juvenile rats with status convulsion, and baicalin can inhibit the expression of IL-1 β and NF- κ B in hippocampus and attenuate the neuron apoptosis.

【Key words】 Hippocampus Status convulsion Convulsion-induced brain injury Baicalin Interleukin-1 β NF- κ B Apoptosis

惊厥持续状态(SC)可导致脑内选择性的海马神经元坏死、凋亡^[1-2]。近年来研究表明免疫系统也参与这一复杂的病理过程^[1-2]。IL-1 β 是参与神经调节的重要细胞因子,具有触发转录因子如NF- κ B的能力^[3],进而在不同水平诱导活化Caspase-3,促发神经细胞凋亡,引起脑损伤^[4]。黄芩苷(BC)是从中药黄芩中提取的一种黄酮类化合物,实验证明在大鼠脑缺血、缺氧再灌注损伤时具有脑保护作用^[5]。本研究建立SC大鼠模型,观察大鼠SC后海马神经细胞凋亡和IL-1 β 、NF- κ B表达的变化,并应用BC进行干预,旨在探讨IL-1 β 和NF- κ B在惊厥性脑损伤中的作用及BC对其表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级19d龄雄性SD大鼠195只,体重60~70g,由中国科学院上海分院试验动物中心提供。先置实验动物中心层流实验室饲养2d,自由摄食、水,室温25 $^{\circ}$ C,相对湿度70%,人工12/12h昼夜循环照明。

1.1.2 主要试剂 匹罗卡品(K80477,美国Sigma公司),氯化锂(K73036,美国Fluka公司),硫酸阿托品针购自浙江瑞新药业股份公司;EDTA抗原修复缓冲液(ZLI-9066)、柠檬酸缓冲液(ZLI-9065)和TUNEL试剂盒(ZK-8005)均由北京中衫金桥生物公司生产;浓缩型DAB试剂盒(L hK612,上海晶美生物工程有限公司生产)。兔抗IL-1 β 抗体(sc-7884)由Santeruz公司提供,兔抗NF- κ B抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;浓缩型SABC-兔IgG试剂盒(L hK612)由上海晶美生物工程有限公司提供。BC注射液(06060721)由河北神威药业有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 采用随机数字表法将实验动物分为生理盐水对照组(NS组)、惊厥持续状态组(SC组)和黄芩苷组(BC组),每组再按时间点随机分为4、12、24、48

和72h组各13只。

1.2.2 SC大鼠模型制备 参照李光乾等^[2]实验方法制备SC大鼠模型:SC组按127mg/kg剂量腹腔注射氯化锂,18h后按1mg/kg剂量腹腔注射硫酸阿托品以拮抗匹罗卡品外周胆碱能反应,30min后按100mg/kg剂量腹腔注射匹罗卡品。观察SC组大鼠出现惊厥发作的行为学表现(主要观察大鼠惊厥潜伏期和惊厥级别)。大鼠惊厥按Racine分级法分为0级(无任何发作迹象)、1级(凝视、咀嚼和须动)、2级(点头、湿狗样抖动或搔抓)、3级(前肢阵挛抽搐)、4级(伴后肢站立的全身强直性发作)和5级(伴有站立并摔倒的全身强直-阵挛性发作)。惊厥发作达4~5级,持续时间达30min以上,惊厥缓解后状态良好的大鼠为合格的SC大鼠模型。当惊厥发作达30min时,给予10%水合氯醛400mg/kg、阿托品1mg/kg腹腔注射;若惊厥未缓解,可重复给予水合氯醛1~2次,直至惊厥停止。BC组于惊厥前3d予以BC(用生理盐水溶解调节至pH值7.0、浓度0.16%^[6])16mg/kg腹腔注射,每天1次,连续3d,其他处理同SC组。NS组用生理盐水代替氯化锂和匹罗卡品,其他处理同SC组。

1.2.3 标本采集 水合氯醛400mg/kg麻醉动物,断头处死。迅速剥离颅骨,取出完整脑组织,置于冰盘上,采用高温(180 $^{\circ}$ C)灭RNA酶的刀片和镊子沿矢状裂将脑组织切分;右侧脑组织快速分离出海马,放入去RNA酶的EP管中,迅速置于-80 $^{\circ}$ C液氮中保存。将其左半球在距额极2mm和距尾极1mm处各切一刀,取中间段置于4%多聚甲醛溶液中,4 $^{\circ}$ C固定24h,脱水、石蜡包埋后,用振荡切片机从视交叉处作冠状连续切片,厚5 μ m。

1.2.4 海马NF- κ B p65 MicroRNA含量检测 采用RT-PCR法。每组随机取8只大鼠的海马,称取50~100mg,采用Trizol试剂提取总RNA,逆转录合成cDNA第一链,PCR反应用 β 肌动蛋白(β -actin)作为内参照,NF- κ B和 β -actin引物由上海基康生物工程有限公司设计合成,序列如下。(1)NF- κ B:上游5'-GGCAT-

GCGTTTCCGTTACA-3', 下游 5'-GATCTGCCGAG-TAAACCGGAA-3', 产物长度 515 bp; (2) β -actin: 上游 5'-GGTATGGAATCCTG TGGCAYAT-3', 下游 5'-GTCCGCCTAGAAGCAYTT-3', 产物长度 345bp。采用 RevertAid™ First Strand Cdna Synt hesis Kit 和 InsTA-clone PCR Cloning Kit(均购自美国 Fermentas 公司), 反应体系为 RNase Free d H₂O 11.5 μ l, 5 $\times$ PCR buffer 2.0 μ l, 10mmol/L dNTP Mixture 0.5 μ l, 25mmol/L MgCl₂ 1.2 μ l, Taq DNA 酶 0.2 μ l, 上、下游特异性 PCR 引物各 0.8 μ l, cDNA 模板 3.0 μ l, 在 DNA 循环合成仪上进行 PCR 扩增, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8min。取 5 μ l PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中跑电泳。应用凝胶成像分析系统对条带扫描分析, 测定 NF- κ B p65 PCR 产物 DNA 条带与内参照 β -actin 条带的吸光度比值作为 NF- κ B p65 MicroRNA 的相对含量。

1.2.5 IL-1 β 、NF- κ B 免疫组化染色 每组随机取 8 只大鼠的石蜡切片, 常规二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 加入 0.3% H₂O₂ 处理 10 min, 高压修复(IL-1 β 5min、NF- κ B 10min), 加入兔抗 IL-1 β 、NF- κ B 抗体孵育 24h(4 $^{\circ}$ C), 生物素化羊抗兔 IgG、SABC 复合物各孵育 10min; 步骤间用 0.01mol/L PBS 充分漂洗。用 DAB/H₂O₂ 溶液显色 5~10min, 苏木素复染 1min, 漂洗, 常规脱水, 透明, 封片。以细胞质中出现棕黄色颗粒细胞为 IL-1 β 阳性细胞, 胞核中出现棕黄色颗粒细胞为 NF- κ B 阳性细胞, 使用 Olympus 自动图像采集系统, 应用 image pro plus5.0 软件对各组海马 CA1 区随机抽取的 5 个不相重叠的高倍视野测量累积光密度值(IOD)作图像分析。

1.2.6 海马神经凋亡细胞检测 采用 TUNEL 法。按照试剂盒操作说明书进行: (1) 石蜡切片常规脱蜡、水化; (2) 用蛋白酶 K(20 μ g/ml) 消化孵育, 37 $^{\circ}$ C, 15min; (3) 标记: PBS 冲洗 3 次 $\times$ 5min 后, 擦干样品周围水分, 滴加 50 μ l TUNEL 反应混合物 (1:19), 在湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min; (4) 信号转化和分析: PBS 冲洗 3 次 $\times$ 5min 后, 擦干样品周围水分, 加入 50 μ l 转化剂 POD, 在湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; (5) PBS 冲洗 3 次 $\times$ 5min 后, 加入 50 μ l 新鲜配制的 DAB 底物溶液, 室温 (20 $^{\circ}$ C) 孵育 10min, PBS 洗 5min $\times$ 3 次。自来水冲洗适时中止显色; 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明中性树胶封片; (6) 阴性对照: 以标记溶液(含有核苷酸混合液的反应液)代替 TUNEL 反应混合物, 其余步骤同上; (7) 结果判定: 细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡细胞。在光镜下, 每张各选 CA1 区阳性细胞最集中的 5 个高倍视野,

计算出每个高倍视野的阳性细胞数, 取其平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件, 所有数据进行正态性检验, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较若满足方差齐性采用 LSD- t 检验, 方差不齐则用 Dunnet's T₃ 检验; 组内不同阶段比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点海马 NF- κ B p65 MicroRNA 表达 NS 组大鼠海马 NF- κ B p65 MicroRNA 表达在各时间点差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); SC 组大鼠海马 NF- κ B p65 MicroRNA 表达升高, 24h 达到峰值, 48h 开始下降, 72h 降至基线水平。SC 组 4、12、24 和 48h 的大鼠海马 NF- κ B p65 MicroRNA 表达均明显高于 NS 组 (均 $P < 0.05$)。BC 组 4、12 和 24h 的大鼠海马 NF- κ B p65 MicroRNA 表达明显低于 SC 组 (均 $P < 0.05$), 见表 1 和图 1(封三)。

表 1 各组大鼠不同时间点海马 NF- κ B p65 MicroRNA 表达水平比较

组别	<i>n</i>	4h	12h	24h	48h	72h
NS 组	8	0.54 $\pm$ 0.05	0.53 $\pm$ 0.07	0.53 $\pm$ 0.08	0.54 $\pm$ 0.07	0.54 $\pm$ 0.06
SC 组	8	0.63 $\pm$ 0.07	0.66 $\pm$ 0.04	0.73 $\pm$ 0.05	0.61 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.06
BC 组	8	0.55 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.08	0.58 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.07
<i>F</i> 值		4.137	9.527	15.190	3.635	2.007
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 NF- κ B 免疫组化结果 NS 组各时间点大鼠海马 CA1 区可见少量 NF- κ B 阳性细胞; SC 组大鼠海马 CA1 区 NF- κ B 阳性细胞在 4 h 时明显增多, 24 h 达到峰值。5 个时间点 SC 组海马区 NF- κ B 免疫反应累积 IOD 值均高于 NS 组 (均 $P < 0.05$); BC 组海马区 NF- κ B 免疫反应累积 IOD 值均低于 SC 组, 以 4、12 和 24 h 时最明显 (均 $P < 0.05$); 除 4 h 外其他 4 个时间点的 IOD 值, 均为 BC 组高于 NS 组 (均 $P < 0.05$), 见表 2 和图 2(封三)。

表 2 各组大鼠不同时间点海马区 NF- κ B 免疫反应累积 IOD 值比较

组别	<i>n</i>	4h	12h	24h	48h	72h
NS 组	8	45.76 $\pm$ 15.41	41.26 $\pm$ 6.28	50.61 $\pm$ 12.54	51.72 $\pm$ 6.52	52.65 $\pm$ 7.65
SC 组	8	64.06 $\pm$ 6.18	71.16 $\pm$ 6.49	79.34 $\pm$ 11.76	67.07 $\pm$ 6.58	65.12 $\pm$ 9.66
BC 组	8	52.65 $\pm$ 5.73	56.68 $\pm$ 5.37	67.01 $\pm$ 9.08	61.87 $\pm$ 7.65	61.43 $\pm$ 6.55
<i>F</i> 值		6.348	30.286	13.189	12.669	5.365
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 IL-1 β 免疫组化结果 NS 组各时间点大鼠海马 CA1 区可见少量 IL-1 β 阳性细胞; SC 组大鼠海马 CA1

区 IL-1 β 阳性细胞在 12h 时明显增多, 24h 达到峰值, 48h 开始减少。SC 组 12、24、48 和 72h 时间点免疫反应累积 IOD 值均高于 NS 组(均 $P < 0.01$); BC 组 12、24 和 48h 时间点免疫反应累积 IOD 值均低于 SC 组(均 $P < 0.05$); 除 4h 外其他 4 个时间点的 IOD 值, 均为 BC 组高于 NS 组(均 $P < 0.05$), 见表 3 和图 3(封三)。

表 3 各组大鼠不同时间点海马区 IL-1 β 免疫反应累积 IOD 值比较

组别	n	4h	12h	24h	48h	72h
NS 组	8	11.89 $\pm$ 4.11	11.47 $\pm$ 2.51	12.49 $\pm$ 2.58	13.19 $\pm$ 2.39	12.79 $\pm$ 5.30
SC 组	8	16.91 $\pm$ 5.77	29.38 $\pm$ 5.18	40.09 $\pm$ 5.16	35.32 $\pm$ 6.59	27.98 $\pm$ 4.16
BC 组	8	15.59 $\pm$ 5.31	21.19 $\pm$ 4.54	29.78 $\pm$ 4.39	25.91 $\pm$ 5.64	22.98 $\pm$ 4.32
F 值		2.219	54.293	79.129	38.763	20.962
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.4 各组大鼠海马 CA1 区 TUNEL 检测结果 NS 组各时间点大鼠海马 CA1 区均可见少量 TUNEL 阳性细胞; SC 组海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞在 12h 时明显增多, 48h 达到峰值。SC 组 12、24、48 和 72h 时间点海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞均多于 NS 组(均 $P < 0.01$); BC 组 12、24 和 48h 时间点 TUNEL 阳性细胞均少于 SC 组(均 $P < 0.05$); 除 4 h 外其他 4 个时间点的 TUNEL 阳性细胞数, 均为 BC 组高于 NS 组(均 $P < 0.05$), 见表 4 和图 4(封三)。

表 4 各组大鼠不同时间点海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞数比较

组别	n	4h	12h	24h	48h	72h
NS 组	8	6.21 $\pm$ 1.51	6.19 $\pm$ 1.48	6.59 $\pm$ 1.66	6.79 $\pm$ 1.15	6.31 $\pm$ 1.47
SC 组	8	6.59 $\pm$ 1.72	11.38 $\pm$ 2.35	19.58 $\pm$ 2.93	28.28 $\pm$ 5.17	25.41 $\pm$ 2.21
BC 组	8	5.77 $\pm$ 1.47	8.96 $\pm$ 2.21	13.07 $\pm$ 2.47	20.51 $\pm$ 4.39	17.36 $\pm$ 4.12
F 值		0.561	10.382	77.719	75.815	37.118
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

小儿惊厥易发生 SC, 且易继发癫痫等后遗症。在惊厥性脑损伤发生过程中, 多种因素导致神经元坏死和细胞凋亡是脑损伤的基本原因。有研究报道促炎因子如 IL-1 β 的激活在病性发生中可能起重要作用^[7]。IL-1 β 主要由脑内的胶质细胞、血脑屏障的内皮细胞、神经元和淋巴细胞通过自分泌和旁分泌途径产生^[8]。SC 激活损伤区内的炎性细胞, 特别是小胶质细胞, 分泌关键性细胞因子 IL-1 β 而触发炎症反应^[9], 从而导致脑损害。NF- κ B 最初在 B 淋巴细胞中检测到, 且能与免疫球蛋白 κ 轻链基因增强子上一段 10bp 核苷酸序列特异性结合的核

因子, 后来发现其广泛存在于真核细胞内, 激活后能进入细胞核内并与 DNA 结合, 从而促进多种靶基因的转录^[10]。Gan 等^[11]研究大鼠氯化锂-匹鲁卡品诱导的颞叶癫痫模型中, IL-1 β 和 NF- κ B 在癫痫后 12h 开始升高, 3d 后下降。Miller 等^[12]研究发现在惊厥模型中, NF- κ B 介导了海马神经元的凋亡。研究表明, IL-1 β 在早期活化后, 以 IL-1 β 启动因子特异的方式导致 NF- κ B 持续活化, 从而进一步激活其下游信号, 产生免疫炎症反应, 加重惊厥后脑损伤^[13]。

本研究发现, 发育期大鼠海马凋亡细胞数在 SC 后 12h 明显升高, 48h 达到峰值, 与相关报道相似^[14]; 提示海马神经元发生病理损害, 且以 SC 后 48h 改变最明显。同时, 大鼠 SC 后 12h 海马 IL-1 β 蛋白表达明显增加, 24h 达到峰值后逐渐下降; 而 NF- κ B 于 SC 后 4h 开始升高, 24h 达峰值, 72h 基本降至正常; 且 IL-1 β 与 NF- κ B 表达明显增高开始时间先于大鼠脑组织海马凋亡细胞升高时间, 提示 IL-1 β 和 NF- κ B 参与了惊厥后脑损伤的发生、发展过程, 这或许是早期惊厥性脑损伤及神经元病理损害的原因之一。本实验表明 NF- κ B 先于 IL-1 β 升高, 提示除 IL-1 β 激活 NF- κ B 引起神经元凋亡过程外, SC 后可能还存在其他途径激活 NF- κ B。NF- κ B 的活化可促使多种炎症介质的释放和激活, 并形成一复杂网络, 通过相互作用扩大炎症反应, 加重脑损伤^[15]。一方面, 活化后的 NF- κ B 迅速转入细胞核, 与数种目的基因特定 DNA 序列结合, 从而启动该基因转录, 一些表达产物如 ICAM-1、IL-1 β 等炎症细胞因子参与炎症反应^[16]。另一方面, IL-1 β 释放增加又促进 I κ B 的磷酸化, 使 NF- κ B 激活, 延续炎症反应的复杂环路调节, 导致最初的炎症信号不断放大。有研究表明神经元应激后存在可以激活 NF- κ B 的一系列因子, 包括 TNF、兴奋性神经递质谷氨酸、神经生长因子、淀粉样前蛋白分泌形式和细胞黏附因子等^[17], 但 SC 后是否存在这些因子对 NF- κ B 的激活, 有待进一步研究。

BC 是中药黄芩的主要有效成分之一, 具有抗炎、降脂、解热、清除超氧阴离子、镇静等作用。最近研究表明 BC 通过降低缺血再灌注大鼠脑组织 MDA 含量, 并增加 SOD 活性, 抑制自由基导致的脂质过氧化作用, 减轻自由基对脑组织的损伤^[18]; 从而对大鼠脑缺血、缺氧再灌注损伤具有脑保护作用^[5-6]。实验研究表明, SC 时脑组织会发生缺血缺氧, 神经元会产生大量氧自由基, NF- κ B 的靶基因 FasL 在氧自由基作用下表达量上调, 增强了激活凋亡的灵敏度。本实验发现 BC 组大鼠海马

(下转第 174 页)