doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.10.003

左旋组氨酸对匹罗卡品致痫大鼠癫痫发作和海马区神经细胞凋亡的影响

翟 煜[1] 霍小林[2] 王永利[3△] 徐淑梅[1] 孙 兵[1]

（1 天津医科大学基础医学院生理教研室 天津 300070；2 中国科学院电工研究所 北京 100080；
3 天津医科大学总医院神经外科 天津 300052）

摘要 目的：观察左旋组氨酸(L-His)对匹罗卡品(PLO)致痫大鼠皮质脑电图及大鼠海马各区神经细胞凋亡的影响。**方法：**雄性 SD 大鼠 30 只，随机平均分为对照组(匹罗卡品组)、干预组(匹罗卡品＋左旋组氨酸组)。各组给予相关干预处理后腹腔注射匹罗卡品建立癫痫模型，行皮质脑电图观察及海马区细胞凋亡染色观察。**结果：**经皮质脑电图显示，干预组潜伏期延长、痫波频率及大发作次数较对照组明显降低，差异有统计学意义(P<0.05)。凋亡染色显示，对照组的海马各区细胞在各时间点的凋亡数明显高于干预组，差异具有统计学意义(P<0.05)。**结论：**左旋组氨酸可以延迟匹罗卡品致痫的形成并降低点燃后癫痫发作程度，降低海马各区细胞凋亡数值，提示左旋组氨酸具有抗痫作用。

关键词：左旋组氨酸；癫痫；海马；细胞凋亡

中图分类号：Q95-3；R742.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2015)10-1809-03

Influence of L-histidine on Epileptic Seizure and Hippocampus Nerve Cell Apoptosis of Pilocarpine-induced Models of Epilepsy Rats

ZHAI Yu[1], HUO Xiao-lin[2], WANG Yong-li[3△], XU Shu-mei[1], SUN Bing[1]

(1 Department of Physiology,Basic Medical Sciences College of Tianjin Medical University, Tianjin, 300070, China; 2 Institute of Electrical Engineering,Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, China;3 Department of Neurosurgery,Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin, 300052, China)

ABSTRACT Objective: To study the influence of l-histidine on epileptic seizure electrocorticogram and hippocampus nerve cell apoptosis of pilocarpine (PLO)-induced models of epilepsy rats. **Methods:** A total of 30 male SD rats were randomly divided into control group (PLO group, n=15) and intervention group (PLO+L-His group,n=15). After related intervention treatment, the rats of the two groups were given intraperitoneal injection of pilocarpine to establish the models of epilepsy rats, whose electrocorticogram and staining of the apoptosis of hippocampus cells were observed. **Results:** Cortical EEG showed that there was a prolongation of latency in the intervention group, in which, the epileptic wave frequency and the number of epileptic seizure were significantly decreased compared with that in the control group, and the difference was statistically significant (P<0.05). Apoptosis staining showed that the number of apoptosis of the hippocampal cells in each time point of control group was significantly higher than that of the intervention group, and the difference was statistically significant(P<0.05). **Conclusions:** L-His can prolong the formation of epilepsy induced by PLO and reduce the epileptic seizure extent after kindling, and decrease the apoptosis of the hippocampal cells, which indicates L-His has the function of anti-epilepsy.

Key words: L-histidine; Epileptic; Hippocampus; Cell apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R742.1 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2015)10-1809-03

前言

化学结构上，左旋组氨酸(L-histidine , L-His) 为杂环氨基酸，是组胺形成必需的前体物质。组胺作为一种神经递质，在调节多数中枢神经的活动中起到重要作用[1-3]。目前世界范围内研究发现，癫痫的发病与人类大脑内组胺的变化关联密切[4]。本实验以匹罗卡品(Pilocarpine,PLO)致痫大鼠模型为研究对象，观察左旋组氨酸对大鼠脑电及海马区神经细胞凋亡的影响，探讨癫痫的发病机制及有效治疗途径。

作者简介：翟煜(1970-)，女，硕士，主管技师，从事神经电生理方面的研究，E-mail：825818942@qq.com

△通讯作者：王永利(1969-)，男，博士，副主任医师，从事神经血管介入方面的研究

(收稿日期：2014-10-29 接受日期：2014-11-25)

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

健康纯系雄性 SD 大鼠 30 只(Ⅱ级，北京军事医学科学院实验动物中心，合格证编号：0052938)，体重(250± 10)g。常规饲养，照明、饮水、进食自由。将动物随机分为两组，匹罗卡品组(对照组)15 只；匹罗卡品联合左旋组氨酸组(干预组)15 只。两组动物均予匹罗卡品 350 mg/kg 体重剂量腹腔注射诱导颞叶癫痫模型(以 Racine 为参考标准，据动物行为特征将癫痫分为 5 个级别：Ⅰ级：咀嚼、头部阵挛为代表的节律性的嘴部和面部

运动;Ⅱ级:点头;Ⅲ级:前肢阵挛现象;Ⅳ级:身体上举现象;Ⅴ级:身体上举伴随跌倒现象)。将Ⅲ级以上发设定为癫痫模型成功诱导标准,剔除未达标准大鼠,另行补充。

1.2 药品与试剂

药品:左旋组氨酸(L-His);匹罗卡品(PLO);多聚甲醛(Sigma 公司);试剂:磷酸盐缓冲液(广州市鸿洲实验器材有限公司);原位细胞凋亡检测试剂盒(德国宝灵曼公司);水合氯醛(AGAC)及分析纯(天津市化学试剂厂)。

1.3 皮质脑电图检测

大鼠模型均腹腔注射水合氯醛麻醉(300 mg/kg),安置脑电记录电极。固定后,将大鼠颅骨双侧额叶皮质、顶叶皮质相对应部位打开直径为 1 mm 的骨孔,分别插入银、氯化银球形记录电极。将参考电极按置于大鼠前囟后 2 mm。手术后休养 5d,手术 5 d 后开始皮质脑电图检测。连接记录装置,检查脑电图记录是否正确可靠。对照组以 350 mg/kg 匹罗卡品腹腔注射建模,然后连续记录 2 h 皮质脑电图。干预组以 300 mg/kg 左旋组氨酸腹腔注射,1 h 后以 350mg/kg 匹罗卡品腹腔注射建动物模型。连续记录 2 h 内皮质脑电图变化数据。

1.4 皮质脑电图分析指标

潜伏期:腹腔注射匹罗卡品到痫波(包括慢波、多棘慢波、棘(尖)、(尖)波)首次出现的时间段。

痫波频率:每间隔 12 min,计数一次时程为 1 min 的脑电图中尖波 / 棘波的数值;2 h 共采集 10 个数值,该组数据平均数为每分钟痫波频率。

大发作频率:连续痫波时间超过 10 s 作为一次大发作。记录数据,计算出每组数据平均值及标准差。

1.5 病理组织取材方法

于动物模型建模成功后的 24、48、72 hr 为时间点,每组中分别抽取建模大鼠 5 只,腹腔注射水合氯醛试液 (350 mg/kg)麻醉,开胸行升主动脉灌流 250 mL 4%多聚甲醛、250 mL 生理盐水(4℃)。将脑取出,于 4%多聚甲醛溶液中固定。取出海马,切开最大剖面冠状,制备石蜡切片(厚度为 6 μm),行细胞凋亡染色。凋亡细胞染色按凋亡检测试剂盒设计程序进行。方法从略。

1.6 凋亡染色分析

凋亡染色后,凋亡细胞的细胞核呈棕褐色或棕色,光学显微镜下观察, CA1 区、CA3 区、齿状回,在高倍视野(10× 20)下,以 130 μm× 130 μm 网格随机取 6 个面积各为 0.0169 m^2 的区域,将染色凋亡的阳性细胞计数,用图像分析系统检测阳性反应密度比值,计算每组数据均平均值与标准差值。

1.7 统计学分析

采用 SPSS11.0 统计软件分析数据,实验数据以($\bar{x}$± s)表示,按单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行方差分析,以 P< 0.05 为标准。

2 分析结果

2.1 未达检的样本数值

匹罗卡品组(对照组)建模大鼠 23 只,剔除 5 只,成功率为 78%(18/23);匹罗卡品联合左旋组氨酸组(干预组)建模大鼠 22 只,剔除 5 只,成功率为 77%(17/22),组间无统计学差异(P>0.05)。

2.2 皮质脑电图指标

干预组的痫波放电出现的潜伏期显著延长,痫波频率及大发作次数相对于对照组显著减少,统计结果差异具有统计学意义(P<0.05)。见表 1。

表 1 两组潜伏期、痫波频率和大发作次数比较

Table 1 Comparison of prolonged latency, epileptic wave frequency and big attack times between the two groups

组别 Groups	数量 n	潜伏期 (s) Prolonged latency(s)	痫波频率(min^{-1}) Epileptic wave frequency(min^{-1})	大发作次数 Big attack times
对照组 Control group	15	117.6± 37.13	386.68± 60.38	94.2± 23.2
干预组 Intervention group	15	475± 112.5[a]	136.7± 24.6[a]	21.8± 3.56[a]

注:与对照组比较,P^a<0.05。

Note: Compared with control group, P^a<0.05.

2.3 海马各区凋亡细胞数值的比较

数据显示,对照组凋亡的染色阳性细胞分布于海马各区,包括 CA1、CA2、CA3 区及齿状回,致痫后 24 h 达到高峰,以 CA1 及 CA3 区最为显著,随着存活时间的延长,染色阳性细胞的数值逐渐下降,显著高于干预组,差异具有统计学意义(P<0.05)。干预组海马各区阳性细胞数值较低,随时间延长数值稍有下降,见表 2, 图 1。

表 2 两组各时间点海马各区凋亡染色阳性细胞计数(个)

Table 2 The number of apoptosis staining positive cell in the hippocampal cells in each time point of the two groups

组别 Groups		不同时间点凋亡染色阳性细胞计数 The number of apoptosis staining positive cell in each time point		
		24 h	48 h	72 h
对照组(n=15) Control group	CA1 区 CA1 district	44.2± 1.30	36.8± 0.84	40.5± 2.12
	CA3 区 CA3 district	47.4± 2.30	28.2± 3.42	37± 7.07
	齿状回 Dentate gyrus	33.4± 2.07	29.6± 1.14	32± 1.41
干预组(n=15) Intervention group	CA1 区 CA1 district	23.30± 6.83	19.46± 4.93	15.74± 6.92
	CA3 区 CA3 district	24.56± 5.41	21.66± 7.43	20.13± 5.20
	齿状回 Dentate gyrus	21.83± 4.05	17.37± 4.95	16.47± 5.57

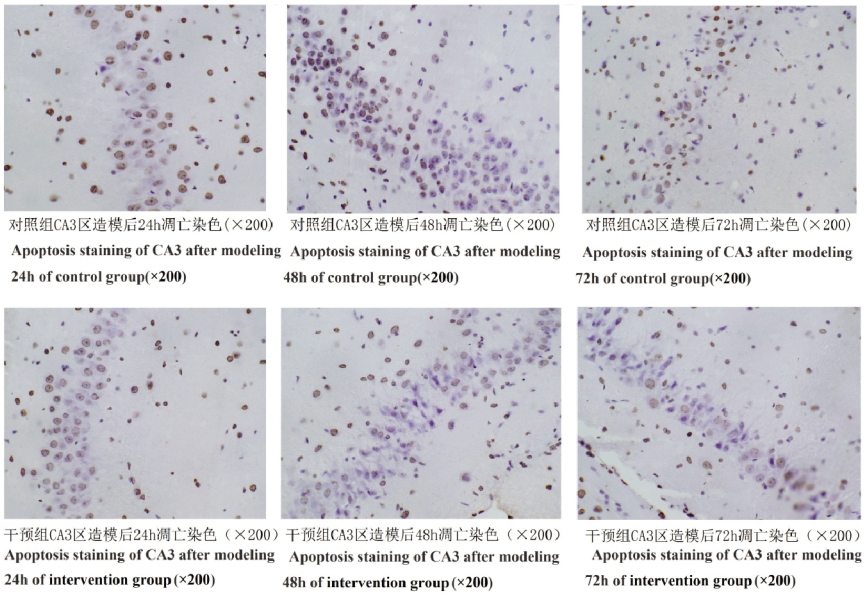

图 1 两组各时间点 CA3 区凋亡染色

Fig. 1 Apoptosis staining in Zone CA3 of the two groups in each time point

3 讨论

癫痫疾病的发生与海马功能障碍密切相关。癫痫疾病形成在过程中，海马神经细胞被激活，形成病理性的神经信号传导，产生电信号并扩展向边缘，诱发癫痫症状发生[5-7]。目前公认，采用匹罗卡品腹腔注射建立的大鼠癫痫模型为颞叶癫痫动物典型的模型，该种模型的病理特征表现有与人类颞叶癫痫十分类似。L-His 为一杂环氨基酸，是组胺的前体物质。L-His 进入中枢神经后在组氨酸脱羧酶(HDC)的催化作用下，脱羧基转变为组胺，进而发挥其调节中枢的效应。Haas H 研究组胺及左旋组氨酸发现，L-His 只有进入中枢并且在 HDC 的作用下转变为组胺后，才能发挥其相应的效应（抑制进食）[8]。Suzuki R 的研究显示，外周注射 L-His 后，可显著提高组胺在大脑皮层、纹状体、丘脑及下丘脑等处的含量[9]。目前，关于 L-His 与癫痫的研究取得了较大进展，Mobarakeh JI 等发现大鼠杏仁核点后脑内组胺含量显著降低，并且遗传性癫痫易感大鼠的脑内组胺含量相对于正常野生型大鼠显著降低[10]，提示癫痫发作与脑内组胺水平密切相关。本研究发现经组氨酸干预之后的各项脑电指标与对照组比较有明显差异，免疫组化的研究结果显示，NPY 表达经组氨酸干预后明显降低，从而显示 L-His 具有显著的抗痫作用。

组胺的抗癫痫药理作用被认为主要是通过其受体发挥作用。大鼠 PTZ 诱导的化学性点燃癫痫实验结果显示，苯海拉明（H1 受体拮抗剂）能促进癫痫点燃形成过程，内源性组胺对癫痫具有抑制作用，其抑制作用是通过中枢组胺 H1 受体发挥的[11-13]。实验证明，H3 受体拮抗剂同样可以增加内源性组胺的释放，Clobenpropit（选择性最强的 H3 受体阻断剂）通过阻断 H3 受体，能够增加脑内组胺的合成与释放[14]，提示癫痫可通过脑内组胺经 H3 受体的作用延缓形成[15]。Clobenpropit 可明显地减缓大鼠戊四唑诱发慢性癫痫的形成，但存在剂量依赖性。并且其作用可被选择性的组胺 H3 受体激动剂 immepip 抑制。目前，细胞凋亡的研究已引起科学界广泛关注，癫痫导致的脑损伤既有急性脑细胞死亡，也有迟发性神经元死亡（神经细胞经过 2～3 d 后出现的死亡）[16]。以往的研究显示[17]，细胞凋亡发生一方面与基因表达有关（p53、bc1-2、c-jun、早期 c-fos 等）；另一方面自由基、兴奋性氨基酸、Ca^{2+} 等在细胞凋亡过程中也具有一定影响。研究表明[18,19]，在人类癫痫与大鼠匹罗卡品模型均有一个共同的特征，即神经元的减少、损伤和凋亡[20]。

本研究对海马区神经元细胞凋亡进行动态观察，发现细胞凋亡在癫痫发作 24 h 后达到高峰，以 CA3、CA1 区明显。经左旋组氨酸干预后，细胞凋亡数值明显降低，证实左旋组氨酸可有效减轻癫痫发作程度及神经细胞病理损伤。现有的国内外文献对 L-His 及其与癫痫的相关研究较少，希望本研究能为癫痫的发病机制及新药研发提供新的思路和策略。

参 考 文 献（References）

[1] Chivers PT, Benanti EL, Heil-Chapdelaine V, et al. Identification of Ni-(L-His)$_2$ as a substrate for NikABCDE-dependent nickel uptake in Escherichia coli[J]. Metallomics, 2012, 4(10): 1043-1050

[2] Rajput SK, Siddiqui MA, Kumar V, et al. Protective effects of L-pGlu-(2-propyl)-L-His-L-ProNH2, a newer thyrotropin releasing hormone analog in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia [J]. Peptides, 2011, 32(6): 1225-1231

[3] Rychlewska U, Warzajtis B, Glisi BD, et al. Monocationic gold(III) Gly-L-His and L-Ala-L-His dipeptide complexes: crystal structures arising from solvent free and solvent-containing crystal formation and structural modifications tuned by counter-anions [J]. Dalton Trans, 2010, 39(38): 8906-8913

[4] Rlepokura K, Petrus R.Nucleotide-amino acid interactions in the L-His-IMP.MeOH.H (2)O complex [J]. Acta Crystallogr C, 2010, 66 (6): o265-269

（下转第 1824 页）

regulation of preproghrelin in the brain and gut of Schizothorax prenanti[J]. Gastroenterology, 2013, 10(186): 18-25

[10] Kim HH, Jeon TY, Park do Y, et al. Differential expression of ghrelin mRNA according to anatomical portions of human stom ach [J]. Hepatogastroenterology, 2012, 59(119): 2217-2221

[11] Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of NUCB2/nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus [J]. Nature, 2006,443(7112):709-712

[12] Szkudelski T, Zywert A, Szkudelska K, et al. Metabolic disturbances and defects in insulin secretion in rats with streptozotocin-nicotin amide-induced diabetes [J]. Physiol Res, 2013, 62(6):663-670

[13] Wang L, Duan G, Lu Y, et al. The effect of simvastatin on glucose homeostasis in streptozotocin induced type 2 diabetic rats [J].J Diabetes Res, 2013, 20(13): 274-286

[14] Bang AS, Soule SG, Yandle TG, et al. Characterisation of proghrelin peptides in mammalian tissue and plasma [J]. J Endocrinol, 2007, 192 (2): 313-323

[15] Prudom C, LIU J, Patrie J, et al. Comparison of competitive radioimmunoassays and two-site sandwich assays for the measurement and interpretation of plasma ghrelin levels [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(5): 2351-2358

[16] Inoue H, Sakamoto Y, Kangawa N, et al. Analysis of expression and structure of the rat GH-secretagogue/ghrelin receptor (Ghsr) gene: roles of epigenetic modifications in transcriptional regulation [J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 345(12): 1-15

[17] Kasacka I, Arciszewski M, Lebkowski W, et al. Extraordinary level of hormone and number of ghrelin cells in the stomach and duodenum of an obese woman [J]. Acta Histochem, 2014, 116(1): 230-234

[18] Teive MB, Russi RF, Vieira DS, et al. Quantitative immuno-histochemical analysis of duodenal ghrelin cells after sleeve gastrectomy in Wistar rats [J]. Acta Cir Bras, 2012, 27(9): 595-599

[19] Andreas S, Yvette T. Yin and Yang-the Gastric X/A-like cell as possible dual regulator of food intake [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2012, 18(2): 2087-2093

[20] Arellanes-Licea Edel C, Bá ez-Ruiz A, Carranza ME, et al. Daily patterns and adaptation of the ghrelin, growth hormone and insulin-like growth factor-1 system under daytime food synchronisation in rats[J]. J Neuroendocrinol, 2014, 26(5): 282-295

(上接第 1811 页)

[5] 冯丹妮, 陶虹, 德向研, 等. 癫痫致大鼠岛叶皮层及海马 GABA 能神经元亚型变化的形态学观察 [J]. 宁夏医科大学学报, 2013, 35(8): 841-844, 849, 封 3

Feng Dan-ni, Tao Hong, De Xiang-yan, et al. Morphological Changes of GABA Neuron Subtypes in Insular Cortex and Hippocampal induced by Epilepsy in Rats [J]. Journal of Ningxia Medical University, 2013, 35(8): 841-844, 849, e3

[6] Horton JR, Sawada K, Nishibori M. Structural basis for inhibition of histamine N-methyltransferase by diverse drug [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, (2): 334-344

[7] Šapina L, Vuleti V, Lojen G, et al. Head trauma and posttraumatic epilepsy in Slavonski Brod, East Croatia, 1988-2008 [J]. Coll Antropol, 2014, 38(3): 1077-1079

[8] Haas H, Panula P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2003, (2): 121-130

[9] Suzuki R, Dickenson AH. Differential pharmacological modulation of the spontaneous stimulus-independent activity in the rat spinal cord following peripheral nerve injury [J]. Experimental Neurology, 2006, (1): 72-80

[10] Mobarakeh JI, Takahashi K, Sakurada S. Enhanced antinociceptive effects of morphine in histamine H2 receptor gene knockout mice[J]. Neuropharmacology, 2006, (3): 612-622

[11] 黄亮, 足立尚登, 長格巧. 神经病理性疼痛大鼠纹状体组胺水平的变化及脑室内注射组胺的效果 [J]. 中华麻醉学杂志, 2006, (6): 542-546

Huang Liang, Zu Li-shang deng, Chang Ge-qiao. Changes in histamine level in striatum in rats with neuropathic pain and the effects of intracerebralventricular histamine on neuropathic pain [J]. Chinese Journal of Anesthesiology, 2006, (6): 542-546

[12] Rajput SK, Singh JN, Ingole S, et al. Neuropharmacological profile of L-pGlu-(1-benzyl)-L-His-L-ProNH2, a newer thyrotropin-releasing hormone analog: effects on seizure models, sodium current, cerebral blood flow and behavioral parameters [J]. Epilepsy Res, 2009, 87 (2-3): 223-233

[13] Rajput SK, Krishnamoorthy S, Pawar C, et al. Antiepileptic potential and behavioral profile of L-pGlu- (2-propyl)-L-His-L-ProNH2, a newer thyrotropin-releasing hormone analog [J]. Epilepsy Behav, 2009, 14(1): 48-53

[14] 成祥林, 赵成三, 汪华. 丙戊酸钠对戊四氮致痫大鼠海马 Bax 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2004, (04): 351-353

Cheng Xiang-lin, Zhao Cheng-san, Wang Hua. Influence of the expresssion of Bax and Bcl-2 in hippocampus of sodium valproate on rat epileptic induced by E four nitrogen [J]. Journal of Clinical Neurology, 2004, (04): 351-353

[15] Qu H, Eloqayli H, Sonnewald U. Pentylenetetrazole affects metabolism of astrocytes in culture [J]. Journal of Neuroscience Research, 2005, (1/2): 48-54

[16] Shin S, Sung BJ, Cho YS. An anti-apoptotic protein human Survivin is a direct inhibltor of caspase-3 and caspase-7 [J]. Biochemistry, 2005, (04): 1117-1123

[17] Rodrí guez de la Vega RC, SchwartzZ EF, Possani LD.Mining on scorpion venom biodiversity[J]. Toxicology, 2010, (07): 1155-1161

[18] Chippaux JP. Emerging options for the management of scorpion stings[J]. Drug Des Devel Ther, 2012: 165-173

[19] Zhu J, Wang J, Cheng MS. Dinucleotides docking to scorpion polypeptide toxins:a molecular modeling method for protein functional site recognition[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, (02): 157-161

[20] Jung S, Dingley AJ, Augustin R. Hydramacin-1,structure and antibacterial activity of a protein from the basal metazoan Hydra[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, (03): 1896-1905