

免疫荧光和免疫组化联合检测难治性癫痫患者脑组织中 类淀粉蛋白的表达

The Expression of β -amyloid Precursor Protein in Brain Tissue of Pharmacoresistant Epilepsy Patients by Immunofluorescence Examination

蒋世杰¹, 杨小芳¹, 李劲梅²

JIANG Shi-jie¹, YANG Xiao-fang¹, LI Jing-mei²

(1. 四川遂宁市人民医院神经内科, 四川遂宁 629000; 2. 四川大学华西医院神经内科, 四川成都 610041)

(1. Department of Neurology, Suining People's Hospital, Suining Sichuan, 629000;

2. Department of Neurology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 640041, China)

摘要:目的: 淀粉样蛋白(β -amyloid precursor protein, β -APP)是已知的参与阿尔茨海默病机制的关键因子。 β -APP是否参与难治性癫痫中的病理机制并不清楚。这项研究在于了解 β -APP的蛋白在难治性癫痫患者术后颞叶皮质和海马组织中的表达是否异常。方法: 免疫荧光法半定量测定难治性癫痫患者术后颞叶皮质和海马组织中的 β -APP阳性蛋白的荧光值, 并应用统计软件对实验数据进行单因素方差分析。结果: 免疫荧光强度值分析结果显示 β -APP在耐药性癫痫脑组织中表达较对照组明显增高且有统计学意义。结论: β -APP在难治性癫痫脑组织中异常增高, 增高的 β -APP可能参与了难治性癫痫的病理机制。

关键词: 难治性癫痫; 蛋白表达; 免疫荧光

[中图分类号] R742.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1002-0179(2009)01-0032-03

Abstract: Objective: β -Amyloid precursor protein (β -APP) is known as the key role played in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). It is now becoming likely that β -APP expression may be associated with refractory epilepsy although the mechanism may not be clear. This study investigated the expression of β -APP protein level in epileptic temporal lobe and hippocampal tissue compared with human control. Methods: We used immunofluorescence to examine the expression of β -APP protein levels in the temporal lobes and hippocampus of patients with chronic pharmacoresistant epilepsy. Results: Fluorescence intensity of β -APP protein was shown to be increased significantly in the temporal cortex and hippocampus of the epilepsy group of patients. Conclusions: Over expression of β -APP may contribute to the pathogenetic mechanisms of refractory epilepsy.

Key words: pharmacoresistant epilepsy; protein expression; immunofluorescence

类淀粉蛋白(β -APP)是淀粉样蛋白的代谢产物,最近有研究显示 β -APP过度表达可促进轴突延伸并促使其多向生长^[1],而轴突异常生长是耐药性癫痫芽生形成和神经网络异常重组的重要分子基础,因此,研究 β -APP在耐药性癫痫中的表达及其作用对于揭示耐药癫痫芽生的机制有重要意义。我们联合应用免疫组化和免疫荧光法检测 β -APP在耐药性癫痫患者颞叶和海马组织中的表达,并探讨其在耐药性癫痫芽生形成和神经网络重建中的作用,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 实验组和对照组实验组病例的选择:实验组37例患者来自2004年12月~2006年7月在广东省三九脑科医院,第三军医大学新桥医院和重庆医科大学附属第一医院神外科进行手术治疗的耐药性颞叶癫痫

患者。为了排除年龄老化因素对实验结果的影响,实验组的患者均为中青年且与对照组与其年龄匹配。其中男性20例,女性16例,年龄14~56岁,平均 30.5 ± 12.98 岁;病程3~46年,平均 18.73 ± 13.45 年;其中复杂部分性发作7例,简单部分性发作合并复杂部分性发作2例,复杂部分继发全身强直-阵挛性发作例21,强直性发作2例、多种类型的发作4例(强直-阵挛性、强直性、阵挛性、复杂部分性)。共收集颞叶标本34例,海马标本7例。对照组15例系在我院因意外死亡的患者,所有对照组患者符合下列条件:无癫痫病史和家族史;无颅内肿瘤、外伤或神经系统进行性疾病;病理切片证实脑组织结构正常;家属同意,并签署知情同意书;收集脑组织标本时间在患者死亡后16小时内。其中男7例,女8例,年龄19~53岁,平均 38.13 ± 10.86 岁,共获颞叶15例,海马5例。

所有患者均符合以下条件:符合吴逊、沈鼎烈难

作者简介:蒋世杰(1972-),男,四川遂宁人,主治医师,医学学士。

治性癫痫定义^[2],经正规服用过三种或三种以上一线抗癫痫药(苯妥英钠、卡马西平、丙戊酸、苯巴比妥),发作频率没有明显减少;无明显病因可寻,神经系统体格检查没有局灶性神经系统体征或虽有体征但与癫痫发作无关;头颅CT或核磁共振检查除海马硬化外,没有其他异常;患者的发作类型符合国际抗癫痫联盟1981年有关癫痫发作类型分类的规定;术前定位及术中皮质电极监测发现有明确和固定的癫痫放电部位,有手术适应症,且能进行手术者;患者及其家属术前签注知情书。

1.2 实验方法

1.2.1 样本收集:实验组和对照组标本获取后,置于4%多聚甲醛固定48小时,随后常规石蜡包埋切片,常温保存备用。术后标本同时送常规的病理检查。

表1. -APP 免疫荧光强度值统计分析

	实验组荧光强度值	对照组荧光强度值	t 值或 t' 值	P 值
-APP 颞叶组织	29.25 ±1.71	9.74 ±1.36	36.92	<0.05
-APP 海马组织	32.79 ±2.68	13.87 ±1.66	17	<0.05

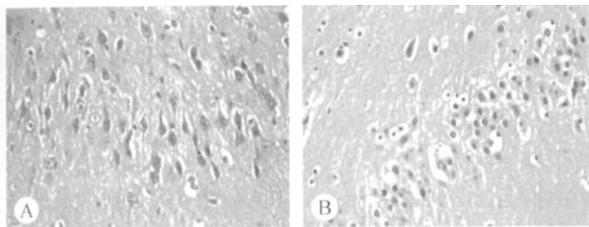


图1. HE染色:耐药性癫痫患者与正常对照组海马组织神经元丢失、变性、轴突排列紊乱情况对比(A为耐药性癫痫患者海马组织,B为正常对照组;标识线为100 μm)

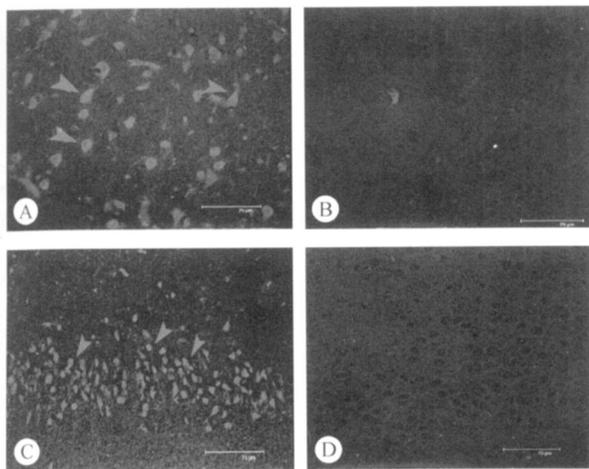


图2. 免疫荧光结果现实,β-APP在神经元胞浆和轴突积聚(A为耐药性癫痫患者颞叶组织;B为对照组颞叶组织的弱阳性表达;C为耐药性癫痫患者海马组织颗粒细胞层阳性细胞;D为对照组海马组织颗粒细胞层。箭头为阳性细胞,标识线为75 μm)

1.3 统计学分析:采用SPSS11.0统计软件对实验数据进行单因素方差分析(One Way ANOV),数据用平均数 ±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据比较时若方差齐

1.2.2 病理学形态检查:两组石蜡标本用石蜡切片机行连续冠状切片,片厚4~6 μm,每个标本分别制备10张切片,排序,完成后,每个标本随机抽取2张,行伊红染色观察耐药癫痫脑组织的病理形态变化。

1.2.3 免疫荧光检测:石蜡切片常规脱水,抗原热修复20 min后0.3%催酮混合1%牛血清蛋白穿透1h,山羊血清封闭5h,加入一抗-APP兔抗人抗体(Santa Cruz,USA),滴度1:100,室温孵育16h,洗去一抗,加FITC标记的山羊抗兔抗体(北京中杉生物公司),室温下孵育3h,洗去二抗,甘油混合PBS封片。激光共聚焦显微镜(Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Germany)行激光扫描图像采集。实验组及对照组每张切片上选取5个视野,测平均荧光强度值。

用t检验,方差不齐用t'检验,P<0.05为有显著性差异。

2 结果

2.1 病理形态检查结果:HE染色显示耐药性癫痫脑组织和海马中有不同程度的神经元丢失,变性,胶质细胞增生和轴突走向紊乱(图1)。

2.2 免疫荧光结果:激光共聚焦扫描结果显示耐药性癫痫颞叶和海马组织内均可见大量绿色荧光着色的-APP阳性细胞,在胞浆和轴突均有沉积,而对照组极少见阳性细胞(图2)。免疫荧光强度值分析结果显示-APP在耐药性癫痫脑组织中表达较对照组明显增高且有统计学意义(表1)。

3 讨论

尽管引起难治性癫痫的病因非常复杂,但苔藓纤维芽生和神经网络重组仍然是难治性癫痫最为明显的病理特征,神经网络重组可能通过改变痫样放电的传播方向和路径,避开抗癫痫药物作用的一些重要靶点,导致难治性癫痫的形成^[3]。但由于芽生形成和神经网络重组机制不清楚,无法对耐药性癫痫作出早期诊断和进行有效治疗,因此,研究与芽生机制密切相关的基因表达有利于揭示耐药性癫痫形成机制,并为寻找新的治疗途径提供重要线索。

-APP是APP加工的正常产物,主要在中枢神经系统表达,正常成熟脑中仅有少量的-APP表达。-APP与细胞骨架蛋白之间存在着紧密的内在联系,正常的-APP对于神经系统发育中轴突的生长是必须

的,细胞学实验已经证实 β -APP 基因敲除后的海马神经元显示活力减少和神经轴突发育迟滞^[4]。但 β -APP 的表达异常增多却可能导致轴突和神经网络结构和功能改变,AD 最具有特征性的病理改变即是 β -APP 常积聚引起的突触结构破坏和神经元纤维缠结。而在脑损伤的患者中, β -APP 的积聚和免疫阳性常作为一种标记物来判断病人是否有轴突损伤^[5,6]。在动物实验发现,NMDA 注入海马 CA1 区后,其兴奋性毒性诱导 CA1 区和少部分皮层 β -APP 蛋白质表达和神经微丝的异常积聚是同时出现的^[7],进一步提示 β -APP 与突触功能改变存在某种内在联系。

为了排除年龄老化因素对实验结果的影响,实验组的患者均为中青年且对照组与其年龄匹配。我们的实验发现在耐药性颞叶癫痫患者的颞叶组织和海马组织中, β -APP 表达较对照组明显上调。呈强阳性表达的 β -APP 不仅分布于神经细胞的胞浆,在轴索也可见大量 β -APP 阳性分布,提示 β -APP 可能通过发挥对轴索异常增生的作用参与耐药性癫痫芽生和神经网络重组。

β -APP 的作用机制很可能是通过影响 tau 蛋白等微管相关蛋白发挥其调节轴突生长作用的。我们的前期研究中发现磷酸化的 tau 蛋白在耐药性癫痫患者脑组织中明显增高^[8],而动物实验也发现急性癫痫模型中磷酸化 Tau 蛋白水平明显增高,且其表达增高的时间和部位与苔藓纤维出现的时间和部位一致^[9,10],提示 Tau 蛋白参与了苔藓纤维异常发芽的病理过程,在难治性癫痫的形成中起着重要作用,而 β -APP 是促进 tau 蛋白磷酸化的重要上游因子^[11,12]。 β -APP25-35) 通过激活 Tau 蛋白激酶 1/3 糖原合成激酶 (GSK-3),至少使 tau 的 5 个磷酸化位点激活^[13]。

β -APP 还通过激活细胞周期蛋白依赖性激酶 5 (CDK5),丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK),促进细胞骨架蛋白磷酸化^[14,15]而这些神经细胞骨架蛋白异常与突触重塑和神经网络重建均有重要关联,进一步提示 β -APP 可能是芽生和神经网络重建的关键环节。

β -APP 参与耐药性癫痫芽生和网络重组的具体分子机制尚需进一步的研究,我们的实验结果表明 β -APP 的异常高表达很可能在芽生和神经网络重组中发挥重要作用,监测存在于脑脊液和血液中的 β -APP 的含量和阻断脑组织中 β -APP 的作用环节,可能为耐药性癫痫的早期分子诊断和早期治疗开辟新的途径。

4 参考文献:

- [1] Salinero O, Moreno-Flores MT, Wandosell F. Increasing neurite outgrowth capacity of β -amyloid precursor protein proteoglycan in Alzheimer's disease[J]. J Neurosci Res, 2000, 60(1): 87-97.
- [2] 吴逊,沈鼎烈. 难治性癫痫[J]. 中华神经科杂志, 1998, 31: 4.
- [3] 王学峰,肖波,孙红斌. 难治性癫痫[M]. 上海科学技术出版社, 2001: 5-11.
- [4] Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LH, et al. The β -amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity [J]. J Neurosci, 1997, 17 (24): 9407-9414.
- [5] Niess C, Grauel U, Toennes SW, et al. Incidence of axonal injury in human brain tissue [J]. Acta Neuropathol (Berl), 2002, 104 (1): 79-84.
- [6] Smith DH, Chen XH, Iwata A, et al. Amyloid accumulation in axons after traumatic brain injury in humans[J]. J Neurosurg, 2003, 98 (5): 1072-1077.
- [7] Gordon-Krajcer W, Gajkowska B. Excitotoxicity-induced expression of amyloid precursor protein (β -APP) in the hippocampus and cortex of rat brain. An electron-microscopy and biochemical study[J]. Folia Neuropathol, 2001, 39(3): 163-173.
- [8] 汪建华,王学峰,龚云,等. 耐药性癫痫患者术后脑组织中 Tau 蛋白的表达[J]. 中华神经科杂志, 2005, 38(9): 543-546.
- [9] Tomizawa K, Cai XH, Moriwaki A, et al. Involvement of cyclin-dependent kinase 5/p35 (nck5a) in the synaptic reorganization of rat hippocampus during kindling progression[J]. Jpn J Physiol, 2000, 50 (5): 525-532.
- [10] Pollard H, Khrestchatsky M, Moreau J, et al. Correlation between reactive sprouting and microtubule protein expression in epileptic hippocampus[J]. Neuroscience, 1994, 63(2): 627.
- [11] Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, et al. Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase / glycogen synthase kinase-3 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(11): 6370-6375.
- [12] Han P, Dou F, Li F, et al. Suppression of cyclin-dependent kinase 5 activation by amyloid precursor protein: a novel excitoprotective mechanism involving modulation of tau phosphorylation[J]. J Neurosci, 2005, 25(50): 11542-11552.
- [13] Takashima A, Honda T, Yasutake K, et al. Activation of tau protein kinase / glycogen synthase kinase-3 by amyloid peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons[J]. Neurosci Res, 1998, 31(4): 317-323.
- [14] Lee MS, Kwon YT, Li M, et al. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain[J]. Nature, 2000, 405(6784): 360-364.
- [15] Greenberg SM, Koo EH, Selkoe DJ, et al. Secreted β -amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(15): 7104-7108.

(收稿日期: 2008-09-10)