

· 论 著 ·

Munc-18 蛋白抗体在大鼠癫痫性脑病发病机制中的作用

王彦超, 于艳辉

赤峰学院附属医院神经内科, 内蒙古 赤峰 024000

摘要: **目的** 通过研究神经突触前膜胞内蛋白(Munc-18 蛋白)抗体对癫痫大鼠海马神经细胞的影响,探讨 Munc-18 蛋白抗体在癫痫性脑病发病机制中的作用。**方法** 选择 10 只 SD 大鼠,构建大鼠癫痫模型。造模成功后取脑,将海马皮质组织利用胰酶消化分离培养海马细胞,培养后的海马细胞分为 Munc-18 抗体干扰组和空白对照组, Munc-18 抗体干扰组均滴入不同浓度(稀释 $\times 200$, $\times 400$, $\times 1\ 000$)的 Munc-18 抗体与同容积的培养液,作用 20 h 或 40 h;空白对照组只加入同容积的培养液。采用酶标仪测定细胞存活率,采用乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒检测 LDH 释放量、采用脱氧核糖核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡并计算凋亡指数,以研究 Munc-18 抗体对海马神经细胞的损害情况。**结果** Munc-18 抗体干扰(20 h 或 40 h)组三个浓度间比较,LDH 释放量、凋亡指数、细胞存活率差异均有统计学意义(P 均 < 0.01);与空白对照组比较,Munc-18 抗体干扰组作用 20 h 及 40 h 的 LDH 释放量、凋亡指数增加,细胞存活率减低,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。**结论** Munc-18 抗体诱导神经细胞凋亡,损害神经元,可能是引发癫痫脑病的重要原因。

关键词: 癫痫性脑病; 神经突触前膜胞内蛋白; 海马神经细胞; 乳酸脱氢酶释放; 凋亡

中图分类号: R-33 R 742.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)09-1166-05

Role of Munc-18 protein antibody in pathogenesis of epileptic encephalopathy in rats

WANG Yan-chao, YU Yan-hui

Department of Neurology, Affiliated Hospital of Chifeng College, Chifeng, Inner Mongolia Autonomous Region 024000, China

Corresponding author: YU Yan-hui, E-mail: 13948680111@yeah.net

Abstract: Objective To investigate the effect of nervous presynaptic membrane protein(Munc-18) antibody (anti-Munc-18) on hippocampal neurons in SD rats to explore the role of anti-Munc-18 in the pathogenesis of epileptic encephalopathy.

Methods Ten SD rats were selected to construct the epilepsy mode. After successful modeling, hippocampus cortex tissues of rats were taken. The hippocampal cells were separated and cultured by trypsin digestion and were divided into anti-Munc-18 interference group and blank control group. Munc-18 antibodies of different concentrations (diluted $\times 200$, $\times 400$, $\times 1\ 000$) and the same volume of culture medium were added for acting time of 20 h or 40 h in anti-Munc-18 interference group, and the same volume of culture medium was added only in blank control group. To study the damage of anti-Munc-18 to hippocampal neurons, enzyme-labeled instrument was used to detect cell survival rate; lactate dehydrogenase (LDH) assay kit was used to detect LDH release quantity; TdT mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) was used to detect cell apoptosis and calculate apoptotic index (AI). **Results** There were significant differences in LDH release quantity, AI and cell survival rate for different concentrations of Munc-18 antibodies in anti-Munc-18 interference group (all $P < 0.01$). Compared with blank control group, LDH release quantity and AI increased, and cell survival rate decreased at 20 h and 40 h of acting in anti-Munc-18 interference group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Munc-18 antibody inducing neuronal apoptosis and damaging neurons may be an important cause of epileptic encephalopathy.

Key words: Epileptic encephalopathy; Presynaptic membrane protein; Hippocampal neuron; Lactate dehydrogenase release; Apoptosis

近年来相关研究表明,神经突触前膜胞内蛋白 (Munc-18)在神经递质中起一定的作用,且有研究表

明利用血浆置换方式降低患者体内 Munc-18 抗体浓度后,患者癫痫发作次数较之前明显减少^[1-2]。但 Munc-18 抗体对神经元细胞凋亡的影响作用尚未见相关研究报道^[3-5],本研究通过获取大鼠癫痫模型神经元细胞,探讨 Munc-18 抗体对大鼠神经元细胞凋亡的作用,探讨癫痫性脑病的发病机制。报告如下。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂 选择 10 只 SD 大鼠为研究对象,体重 400 ~ 480 (450.4 ± 30.2) g。仪器设备:包括恒温培养箱、自动干热消毒柜、显微镜、细胞培养瓶、外科手术器材等。主要试剂: Munc-18 抗体(批号: M5567, 厂家: 美国 Sigma-aldrich 公司)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂[批号: 浙食药监械(准)字 2009 第 2400170 号, 厂家: 深圳仙诺制药有限公司]、二甲亚砜(厂家: 杭州欣兰恩科技有限公司, 批号: 11XF0803_D)、匹罗卡品(PILO, 厂家: 美国 Sigma 公司)等。严格按照仪器设备及试剂使用说明书操作。

1.2 方法 (1)造模: 10 只 SD 鼠均在腹腔注射东莨菪碱(1 mg/kg) 30 min 后,再次腹腔注射 10% 匹罗卡品(350 mg/kg),致痫处理后按照七级评分法^[6]为标准评判癫痫造模是否成功。(2)原代海马神经细胞培养: 将造模成功的 10 只 SD 鼠用酒精(浓度 75%)浸泡 2 ~ 3 min 消毒后取脑,无菌操作。利用外科手术器材把海马皮质有效分离后将其放置到解剖液中,显微镜下将大血管、脑膜去掉,将剩余的剪成 0.5 mm³的小块,随后利用胰酶(浓度 0.125%, 温度 27 °C)消化 25 min 左右,接着用 DMEM 种植液(含有 20% 小牛血清)终止消化。经相应处理后利用不锈钢滤网将其制作成细胞悬液,然后再次利用 DMEM 种植液将其浓度调整为 1 × 10⁶/ml,并将其接种到之前准备的 96 孔培养板(上面涂有 0.1 mg/ml 的多聚左旋赖氨酸)上,每孔 100 μl,接着将培养板放在培养箱中培养(温度 37 °C、二氧化碳浓度 5%), 24 h 后利用 Neurobasal/B27 培养基代替 DMEM 培养基,共培养 1 个星期。(3)将培养后的海马细胞抽签分为两

组,分别为 Munc-18 抗体干扰组(依据作用时间不同又分为干扰 A 组和 B 组)和空白对照组, Munc-18 抗体干扰组均滴入不同浓度(稀释 × 200, × 400, × 1 000)的 Munc-18 抗体与同容积的培养液,空白对照组只加入同容积的培养液, A 组 Munc-18 抗体作用 20 h, B 组 Munc-18 抗体作用 40 h。各组均行细胞存活率、LDH 释放量、脱氧核糖核苷酸介导的缺口末端标记法(TUNEL)染色等测定。①细胞存活率: Munc-18 抗体作用后,停止培养前 4 h 在 96 孔培养板中加入 MTT 磷酸缓冲液(10 μl, 浓度为 0.5 mg/ml), 让其在培养箱中继续培养。4 h 后将上清液去掉,放入二甲亚砜(200 μl)停止反应。利用酶标仪测定出光密度,波长 570 nm。细胞存活率为孔中光密度与对照组光密度比值。②TUNEL 染色: 将培养后的细胞悬液连接到 12 孔培养板中,每个孔中加入 500 μl 的培养液,方法同海马神经细胞培养过程。Munc-18 抗体作用后进行染色,根据试剂盒使用说明书执行。随后用显微镜观察细胞是否凋亡: 神经元核呈现棕褐色,核周染色质为月牙状或块状,提示细胞凋亡^[7]。选取 5 个阳性细胞(细胞核中有棕黄色颗粒)数最多的高倍视野(×400)计算 500 个海马神经细胞中阳性细胞所占的百分比,计算凋亡指数。③采用 LDH 检测试剂盒测定 LDH 释放量。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计学软件对上述数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两因素析因设计资料的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 Munc-18 抗体作用 20 h、40 h 对神经细胞的损害情况 Munc-18 抗体干扰(20 h 及 40 h)组三个浓度间比较 LDH 释放量、凋亡指数、细胞存活率差异均有统计学意义(P 均 < 0.01); 与对照组比较, LDH 释放量、凋亡指数增加, 细胞存活率降低, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 1、表 2。

2.2 Munc-18 抗体诱导神经细胞凋亡过程 图 1a ~ c

表 1 不同浓度 Munc-18 抗体作用 20 h(A 组)对神经细胞的损害情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

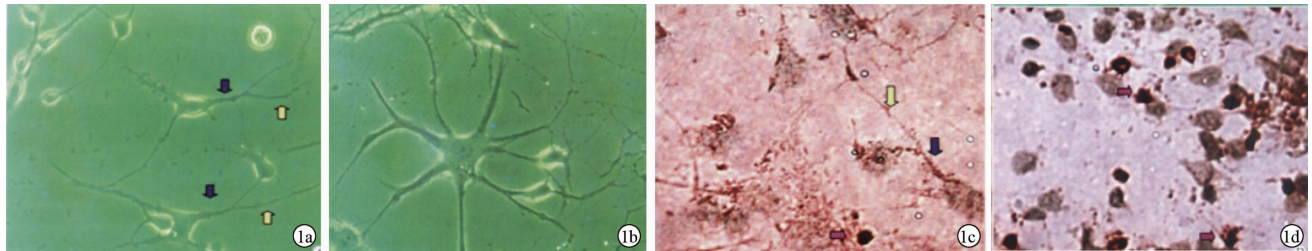
指标		×200	×400	×1 000	F 值	P 值
细胞存活率(%)	A 组	86.00 ± 8.08 [#]	78.11 ± 2.22 [#]	76.12 ± 4.46 [#]	8.142	0.000
	对照组	90.12 ± 7.21	89.96 ± 6.85	90.02 ± 6.99	3.244	0.650
LDH 释放量(U/L)	A 组	28.71 ± 7.02 [#]	32.71 ± 7.47 [#]	38.69 ± 2.51 [#]	7.514	0.000
	对照组	20.21 ± 3.72	20.14 ± 3.56	20.06 ± 3.52	3.142	0.069
凋亡指数(%)	A 组	22.52 ± 3.19 [#]	32.71 ± 7.50 [#]	38.71 ± 7.08 [#]	9.241	0.000
	对照组	3.33 ± 0.78	3.23 ± 0.69	3.26 ± 0.57	2.984	0.740

注:与对照组比较,[#] $P < 0.05$ 。

表 2 不同浓度 Munc-18 抗体作用 40 h(B 组)对神经细胞的损害情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标		×200	×400	×1000	F 值	P 值
细胞存活率 (%)	B 组	84.55 ± 1.28 [#]	78.11 ± 2.22 [#]	62.68 ± 2.55 [#]	8.547	0.000
	对照组	88.78 ± 7.72	87.89 ± 8.52	89.12 ± 11.00	2.150	0.840
LDH 释放量 (U/L)	B 组	50.78 ± 7.72 [#]	59.89 ± 8.52 [#]	62.12 ± 11.00 [#]	7.215	0.000
	对照组	34.91 ± 5.79	25.71 ± 7.50	34.71 ± 1.22	3.121	0.720
凋亡指数 (%)	B 组	28.52 ± 6.18 [#]	42.71 ± 7.50 [#]	48.71 ± 1.22 [#]	8.120	0.000
	对照组	3.82 ± 0.20	3.76 ± 0.22	3.68 ± 0.55	2.840	0.800

注:与对照比较,[#] $P < 0.05$ 。



注:1a:后轴突发育成树突(Ⅲ~Ⅳ期);1b:网络基本形成(Ⅳ~Ⅴ期);1c:细胞核、树突、轴突结构完整;1d:Munc-18 抗体诱导凋亡细胞众多。

图 1 神经细胞培养及 Munc-18 抗体诱导凋亡图

所示,培养的神经元细胞核、轴突、树突结构完整,生长正常;在 Munc-18 抗体干扰下,神经元细胞核出现棕褐色,核周染色质为月牙状或块状,如图 1d。

3 讨论

癫痫性脑病具有发病率高、预后差等特点,主要表现为阵挛、精神运动障碍(语言障碍、肢体偏瘫等),严重影响人的正常发育^[8]。目前临床上癫痫性脑病发病机制尚不明确,但很多学者认为与癫痫家族史、孕妇妊娠严重中毒、神经递质、免疫系统异常等有关。相关研究表明长时间癫痫发作可能破坏血脑屏障,导致中枢神经系统中的部分组织成为异种抗原,通过免疫反应产生自身抗体。由于神经细胞损伤主要由坏死或凋亡引起,有研究表明癫痫大鼠海马中 CA3 等部位存在神经元凋亡现象,表明癫痫发作和神经细胞凋亡相关^[9]。Munc-18 蛋白作为仅存在于中枢神经系统的 Secl 蛋白家族的一员,包括 594 个氨基酸,在神经突触囊泡分泌释放神经递质中起十分重要的作用,Munc-18 蛋白的表达在很大程度上影响神经递质的释放,若 Munc-18 蛋白发生异常,则会导致神经递质分泌失常,致使小鼠胚胎神经细胞凋亡^[10]。

有研究称一些 Rasmussen 脑炎患者血清中含有谷氨酸受体抗体,且经由谷氨酸受体 3(GluR3),免疫兔重组实验发现兔呈现痫样发作,且其病理变化和脑炎疾病基本一致;同时其 Munc18 抗体基本一致:把 GluR3 抗体滴度降低后,患者发作次数较之前明显减少^[11-16]。本研究中将不同浓度(×200、×400) Munc-18 抗体作用于提取的神经元细胞 20 h、40 h 后

LDH 释放量、凋亡指数均明显高于正常对照组,另外 ×1 000 浓度 Munc-18 抗体作用 20、40 h 后凋亡指数明显高于正常对照组。提示 Munc-18 抗体对神经细胞具有一定的损害作用,推测其可能通过激活天冬氨酸、GluR3 等受体导致机体钙离子、钠离子内流,钾离子外流,进而产生神经兴奋性毒性,导致神经元损害,最终引发癫痫疾病。另外 Munc-18 蛋白抗体自身的细胞毒性作用可能导致神经元凋亡。本研究尚未完善神经元膜片钳实验,尚不能观察 Munc-18 蛋白对模型神经元细胞电生理的影响。且介导癫痫脑病的病理过程的具体神经元损伤分子机制尚待进一步研究阐明。

综上所述,Munc-18 抗体能损害神经元,可能是引发癫痫脑病的一个重要原因之一,临床如果能研制抑制 Munc-18 抗体功能的药物,可能成为治疗癫痫病的一个有效途径。

参考文献

- [1] 陈功,江澄川,杨茹. Munc18 抗体致病机制的体外实验研究:诱导海马神经细胞的损伤[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2007,6(6):491-495.
- [2] 王翠翠,陈英辉,肖霞,等. Pannexin1 在癫(痫)发病机制中的作用研究进展[J]. 中国临床神经科学,2011,19(6):652-656.
- [3] 何绘敏,路晴,孙香梅,等. 不同抗癫痫药物对幼年癫痫大鼠海马胶质原纤维酸性蛋白的影响[J]. 大连医科大学学报,2014,36(2):120-123.
- [4] 胡琳,张华丹,陈亚天,等. 不同药物诱导的小鼠癫痫模型的差异性研究[J]. 浙江大学学报医学版,2013,42(6):609-614.
- [5] Striebel J F, Race B, Pathmajeyan M, et al. Lack of influence of prion protein gene expression on kainate-induced seizures in mice: Studies using congenic, coisogenic and transgenic strains[J]. Neuro-

science, 2013, 238: 11 - 18.

- [6] 徐国龙, 杨帆, 章复清, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对 PTZ 点燃型癫痫大鼠脑内氨基酸含量的影响 [J]. 中国医药学报, 2002, 17 (3): 165 - 167.
- [7] 万萍. 神经元内 Munc-18 蛋白的漏出及其在神经元表面的分布 [D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [8] 张彦平. 癫痫对海马内 Munc-18 蛋白分布和表达的影响 [D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [9] Smeyne M, Sladen P, Jiao Y, et al. HIF1 α is necessary for exercise - induced neuroprotection while HIF2 α is needed for dopaminergic neuron survival in the substantia nigra pars compacta [J]. Neuroscience, 2015, 295: 23 - 38.
- [10] 李炳. Munc18 蛋白的自身免疫与癫痫发作的相关研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2006.
- [11] Yang R, Puranam RS, Butler LS, et al. Autoimmunity to munc-18 in

Rasmussen's encephalitis [J]. Neuron, 2000, 28 (2): 375 - 383.

- [12] Santos TC, Wierda K, Broeke JH, et al. Early Golgi abnormalities and neurodegeneration upon loss of presynaptic proteins Munc18-1, Syntaxin-1, or SNAP-25 [J]. J Neurosci, 2017, 37 (17): 4525 - 4539.
- [13] Deshpande M, Rodal AA. Beyond the SNARE: Munc18-1 chaperones α -synuclein [J]. J Cell Biol, 2016, 214 (6): 641 - 643.
- [14] Chai YJ, Sierecki E, Tomatis VM, et al. Munc18-1 is a molecular chaperone for α -synuclein, controlling its self-replicating aggregation [J]. J Cell Biol, 2016, 214 (6): 705 - 718.
- [15] Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBPI (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy [J]. Nat Genet, 2008, 40 (6): 782 - 788.
- [16] Böhm B, Schade B, Bauer B, et al. Tick-borne encephalitis in a naturally infected sheep [J]. BMC Vet Res, 2017, 13 (1): 267.

收稿日期: 2017 - 04 - 20 编辑: 周永彬

(上接第 1164 页)

- [3] Fulop V, Colitti CV, Genest D, et al. DOC-2/hDab2, a candidate tumor suppressor gene involved in the development of gestational trophoblastic diseases [J]. Oncogene, 1998, 17 (4): 419 - 424.
- [4] Dote H, Toyooka S, Tsukuda K, et al. Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in gastrointestinal tumour [J]. Br J Cancer, 2005, 92 (6): 1117 - 1125.
- [5] Virmani AK, Rathi A, Zöchbauer-Müller S, et al. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92 (16): 1303 - 1307.
- [6] Chaube A, Tewari M, Garbhal RS, et al. Preliminary study of p53 and c-erbB-2 expression in gallbladder cancer in Indian patients manuscript id: 8962091628764582 [J]. BMC Cancer, 2006, 6: 126.
- [7] Gruenberger B, Schueller J, Heubrandtner U, et al. Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study [J]. Lancet Oncol, 2010, 11 (12): 1142 - 1148.
- [8] Lee J, Park SH, Chang HM, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study [J]. Lancet Oncol, 2012, 13 (2): 181 - 188.
- [9] Min J, Zaslavsky A, Fedele G, et al. An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating

Ras and nuclear factor-kappaB [J]. Nat Med, 2010, 16 (3): 286 - 294.

- [10] 周彦明, 李玉民, 曹农, 等. 慢性胆囊炎和胆囊癌组织中 EGF、EGFR 的表达及其意义 [J]. 癌症, 2003, 22 (3): 262 - 265.
- [11] 黄湖, 吕夕明, 黄品同, 等. 超声造影在胆囊占位性病变中的应用价值 [J]. 医学研究杂志, 2013, 42 (1): 166 - 169.
- [12] Smits M, van Rijn S, Hulleman E, et al. EZH2-regulated DAB2IP is a medulloblastoma tumor suppressor and a positive marker for survival [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18 (15): 4048 - 4058.
- [13] 王向阳, 冯启苗, 李小兰, 等. 抑癌基因 DAB2IP 在结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. 实用医学杂志, 2012, 28 (19): 3222 - 3224.
- [14] Xie D, Gore C, Liu J, et al. Role of DAB2IP in modulating epithelial-to-mesenchymal transition and prostate cancer metastasis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107 (6): 2485 - 2490.
- [15] Leal P, Garcia P, Sandoval A, et al. AKT/mTOR substrate P70S6K is frequently phosphorylated in gallbladder cancer tissue and cell lines [J]. Onco Targets Ther, 2013, 6: 1373 - 1384.
- [16] Zhang X, Li N, Li X, et al. Low expression of DAB2IP contributes to malignant development and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27 (6): 1117 - 1125.

收稿日期: 2017 - 04 - 10 编辑: 王国品