

- 4 Lin W, Kim SS, Yeung E, et al. Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain [J]. J Virol, 2006, 80(18):9226–9235
- 5 de Lucas S, Bartolome J, Carreno V. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes [J]. J Infect Dis, 2005, 191(1):93–99
- 6 Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, et al. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin [J]. Hepatology, 2010, 52(2):421–429
- 7 Dansako H, Naka K, Ikeda M, et al. Hepatitis C virus proteins exhibit conflicting effects on the interferon system in human hepatocyte cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 336(2):458–468
- 8 Naganuma A, Nozaki A, Tanaka T, et al. Activation of the interferon-inducible 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene by hepatitis C virus core protein [J]. J Virol, 2000, 74(18):8744–8750
- 9 Dansako H, Naganuma A, Nakamura T, et al. Differential activation of interferon-inducible genes by hepatitis C virus core protein mediated by the interferon stimulated response element [J]. Virus Res, 2003, 97(1):17–30
- 10 Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, et al. Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular anti-viral response to interferon- $\alpha$  in vitro [J]. Liver Int, 2010, 30(9):1324–1331
- 11 Hiraga N, Abe H, Imamura M, et al. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus [J]. Hepatology, 2011, 54(3):764–771

(收稿日期:2014-01-15)

(修回日期:2014-01-28)

## 慢性癫痫与抑郁共病大鼠脑白质中髓鞘碱性蛋白 MBP 的表达变化

齐振波 王修楠 王斐 田衍平 刘淑丹 刘志 李红丽

**摘要 目的** 探讨脑白质髓鞘变化在慢性反复发作性癫痫(SRS)伴发抑郁共病发生中的作用。**方法** 本实验采用幼年期致癫痫发作后进入SRS的大鼠模型,运用行为学实验、髓鞘特异快蓝染色(LFB)和髓鞘碱性蛋白(MBP)免疫组化染色、分子生物学技术等技术,观察癫痫与抑郁共病的发生比率,以及共病鼠髓鞘发育变化的特征,明确二者间是否存在相关性。**结果** 进入SRS期大鼠中高架迷宫和强迫游泳两项行为学联合评估均表现出抑郁样行为特征的比率占25%。癫痫伴抑郁共病鼠脑在胼胝体(cc)、扣带回(cg)等脑白质区域中LFB和MBP免疫阳性信号染色均显示染色强度较正常对照显著减弱( $P < 0.01$ )。RT-PCR检测显示共病组脑白质中MBP mRNA的表达明显降低( $P < 0.01$ )。**结论** SRS伴抑郁共病大鼠脑白质中存在髓鞘脱失,可能与抑郁行为的发生密切相关。

**关键词** 癫痫 抑郁症 共病 髓鞘 行为学

[中图分类号] R742 [文献标识码] A

**Expression of Myelin Basic Protein in Cerebral white Matter of Chronic Epilepsy and Depression Co-morbid Rats.** Qi Zhenbo, Wang Xiuan, Wang Fei, et al. Student Brigade Team 5, College of Basic Medical Sciences Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**Abstract Objective** To investigate the expression changes of myelin basic protein (MBP) in cerebral white matter and its significance in the co-morbid rats of depression and chronic spontaneous recurrent epilepsy. **Methods** We established the spontaneous recurrent epileptic seizure (SRS) rats induced by youth status epilepticus as a model. Behavior evaluation, myelin specific fast blue (LFB) staining, immunohistochemical staining and molecular biology technology were used to observe the depression occurrence rate as well as analysis the relevance with the changes of MBP expression in SRS rats. **Results** The double positive rate of the depression-like behavioral index was about 25% in SRS rats after evaluation using elevated plus maze test and forced swimming test. The average optical density (OD) value of myelin specific fast blue staining and MBP positive signal was reduced significantly in the corpus callosum (cc) and cingulum

基金项目:国家大学生创新创业训练计划项目(201390035011);重庆市自然科学基金面上项目(CSTC, 2010BB5031);第三军医大学回国人员启动基金资助项目(2011XHG01);第三军医大学基础部本科生“创新杯”奇思妙想项目(je2013018)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学学员旅5队(齐振波、王修楠、王斐),组织学与胚胎学教研室、发育生物学教研室(田衍平、刘淑丹、刘志、李红丽)

通讯作者:李红丽,电子信箱:lihlimm@163.com

lated gyrus (cg) area ( $P < 0.01$ ) in co-morbid rats of SRS and depression. There was no statistical significance in the OD value in the above areas in SRS rats without co-morbid depression compared with that in the normal group. MBP mRNA expression in white matter of co-morbid rats decreased obviously ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Myelin damage or demyelination occurring in white matter may play an important role on promoting depressive behaviors in SRS and depression co-morbid rats.

**Key words** Epilepsy; Depression; Co-morbid; Myelin; Behavior

既往对临床患者的流行病学调查研究发现精神性疾病中癫痫与抑郁共病的发生较为常见,且共病患者发生率是正常人群的5~10倍,其中慢性颞叶癫痫、难治性癫痫发生抑郁的比率更高<sup>[1]</sup>。Jacoby<sup>[2]</sup>观察到在168例反复癫痫发作的患者中有21%的患者并发抑郁症状。然而,目前癫痫与抑郁障碍共病的原因和具体机制尚不明确,存在诊断率低,治疗率低的现状。

关于癫痫与抑郁共病的发生机制目前存在多种解释,普遍认同的是与多种抗癫痫药物的使用有关。但随着神经磁共振影像学的发展,较多的证据显示癫痫和抑郁患者脑内存在相似的影像学改变区域,包括额叶前部、颞叶的海马、杏仁核等脑区<sup>[3]</sup>。对重症癫痫患者研究提示其脑内存在神经胶质细胞发育障碍及脱髓鞘的病理改变。同样,在对重度抑郁症患者采用实时定量PCR检测也证实髓鞘编码基因转录子的表达呈明显下调,可见癫痫和抑郁患者脑内均存在与髓鞘缺失相关的病理性改变<sup>[4~6]</sup>。由此笔者推测脑内髓鞘发育异常可能在癫痫和抑郁共病的发生中起到一定的促进作用。为证实这一假设,本实验采用幼年大鼠以氯化锂-匹罗卡品点燃癫痫持续状态模型,评定进入慢性反复发作癫痫(SRS)阶段后,采用高架迷宫和强迫游泳两项行为学联合检测,明确癫痫与抑郁共病的发生比例。进一步采用髓鞘特异快蓝染色、免疫组化染色和RT-PCR等技术,观察共病鼠脑白质区髓鞘碱性蛋白(MBP)的表达变化,为明确共病鼠髓鞘发育变化与抑郁发生之间是否存在相关性提供实验证据。

## 材料与方法

1. 实验动物:清洁级健康雄性3周龄SD大鼠50只,体质量 $70 \pm 5$ g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。所有动物在笼内饲养,保持在7:00am/7:00pm亮/暗周期,室温22~24℃,自由进食和饮水。按随机化原则将实验动物分为2组,其中生理盐水对照组8只,造模组42只。然后利用行为学观察筛选出进入慢性自发反复性癫痫发作阶段的大鼠为32只(死亡及造模失败为10只)。然后利用行为学检测(高架迷宫测试和强迫游泳实验)筛选抑郁组大鼠,将在两个实验中均表现抑郁阳性的大鼠(与正常组大鼠进行对

照)列为模型伴抑郁组(共8只),其余为模型组(共24只)。

2. 模型制备方法:实验模型组动物具体致痫步骤:  
①氯化锂(Sigma公司)溶于生理盐水腹腔注射,浓度为127mg/kg;  
②17h后腹腔注入硫酸阿托品1mg/kg,以拮抗外周胆碱能反应,  
30min后腹腔注射新鲜配制的匹罗卡品(Sigma公司)30mg/kg;  
③癫痫发作60min后,腹腔注射止痉剂3.5%水合氯醛(Fluka公司)3.5mg/kg终止发作;  
④正常对照组除以生理盐水代替匹鲁卡品外,其他处理措施同对照组。

3. 行为学检测:(1)匹罗卡品点燃癫痫持续状态模型的评定:采用实验动物癫痫发作Racie分级评级<sup>[7]</sup>。  
1级:面部肌肉痉挛表现为咀嚼运动;  
2级:颈部肌肉痉挛表现为点头运动;  
3级:一侧前肢阵挛;  
4级:站立伴双前肢阵挛;  
5级:在4级基础上身体向后倒下。观察匹罗卡品注射后大鼠有4级以上发作时,即癫痫诱导成功。进入慢性SRS期的评定:将幼年期被点燃癫痫持续状态的模型大鼠饲养1周后,进行每天1h连续日常行为观察并记录。观察指标:大鼠有摔倒、短暂性抽搐发作、一侧前肢阵挛、站立伴双前肢阵挛、面部肌肉痉挛性咀嚼运动和颈部肌肉痉挛性点头运动等行为表现。如随机记录上述行为出现超过每周3次者,即评定为出现自发反复性癫痫发作,即进入慢性SRS期。(2)高架迷宫(EPM)测试:测试前将每只大鼠放入一个60cm×60cm×35cm塑料盒中,任其自由探究5min后迅速置于高价迷宫的中央平台处(BW-DEP 207,上海软隆),使其头部正对其中一个开放臂,释放后即开始记录下述指标:  
①进入开放臂次数(open arm entry, OE),以大鼠4个爪子均进入到臂内为准,中途一个爪子从该臂中完全退出则为该次进入活动结束;  
②进入开放臂时间(open arm time, OT)以秒为单位;  
③进入封闭臂次数(close arm entry, CE),以大鼠4个爪子均进入到臂内为准;  
④进入封闭臂时间(close arm time, CT)。(3)强迫游泳检测:将大鼠放入内径20cm、高60cm的圆形透明玻璃缸(BW-DFS 201,上海软隆)中,缸中加 $25 \pm 1$ ℃的温水,深约达缸高的2/3,使大鼠在水中不能以后爪支撑身体、前爪攀附于缸壁。首先进行适应性强迫游泳4min,然后记录后4min内的行为学表现,记录大鼠在水中停止挣扎、呈漂浮状态(大鼠的四肢不动为标准)的时间。每只大鼠进行1次实验/3天,连续测试3周。

4. 组织切片制作与染色:(1)组织切片制作:大鼠麻醉后4%多聚甲醛心脏灌注固定后取脑,后固定24h,再经20%~30%蔗糖梯度脱水,做冠状连续冷冻切片,切片厚度20μm。(2)卢卡斯快蓝(Luxol fast blue, LFB)染色:切片经氯仿/无水乙醇1:1室温浸泡过夜,回浸95%乙醇,LFB染色,56℃放置6~8h,降温后95%乙醇浸泡,蒸馏水浸泡,0.05%碳酸锂分色

1min 并保持分色一致, 蒸馏水浸泡, 95% 乙醇浸泡 5~30min, 100% 乙醇脱水, 二甲苯透明, 封片后观察。(3) 髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 免疫组织化学染色: 切片经 0.01mol/L PBS 充分洗涤后置于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5~10 min 以阻断内源性过氧化酶, 滴加一抗 (MBP, 1: 200, Santa 公司), 4℃ 过夜, PBS 漂洗 2min 3 次; 滴加二抗 (anti-goat-IgG-HRP, 1: 200, 武汉博士德公司), 室温孵育 20~30min, PBS 漂洗, 2min 3 次。DAB 显色, 梯度脱水, 封片。(4) RT-PCR 检测: 采用 RNA 提取试剂盒按一步法提取总 RNA, 用分光光度计检测, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳 70V, 1h 鉴定, 28s、18s 条带清晰可见, 无明显降解。首先反转录为 cDNA, 然后按 94℃ 30s, 54℃ 退火 30s, 72℃ 45s, 72℃ 延伸 5min, 共 30 个循环进行 PCR 反应。以 1.0% 的琼脂糖进行凝胶电泳, 80V 90min。以 Gel Doc1000 凝胶成像系统进行灰度扫描, 检测电泳条带光密度值, 以 β-actin 作内参校正, 结果以光密度强度比值 (ratio) = MBP mRNA/β-actin 计算 MBP mRNA 表达的相对量。引物设计长度为 20bp, 产物长度为 250bp。RT-PCR 引物为 MBP 上游: 5'-CTTCTTTAGCGGTGACAGGG-3'; 下游: 5'-TCTTGCCATGG-GAGATCCAG-3'。

5. 图像分析和统计学方法: 采用 Image2 Pro plus 5.0 图像分析系统对切片进行图像分析。对照大鼠脑立体定位图

谱, 取前囟后 2.8~3.8mm 的切片 3 张, 每张切片按照胼胝体 (cc)、扣带回 (cg) 等白质区分别随机选取 2 个 10×10 倍视野, 检测光密度强度值。各组数据用均数 ± 方差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。数据处理采用 SPSS 15.0 统计软件分析处理。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. SRS 鼠伴发抑郁共病的发生率检测: 为了确定 SRS 大鼠发生抑郁行为的共病鼠比例, 本实验采用高架迷宫和强迫游泳 2 项行为学联合评估。在高架迷宫实验中 47% 的 SRS 鼠 ( $n = 15$ ) 显示进臂总次数明显减少 ( $P < 0.01$ ), 开臂进入次数、开臂滞留时间的比例也较对照组显著减少 ( $P < 0.01$ , 图 1)。强迫游泳实验记录到有 50% SRS 鼠 ( $n = 16$ ) 的不动时间较对照组明显延长 ( $P < 0.01$ , 图 2A、B), 提示这部分 SRS 鼠具有抑郁样行为表现。其余 SRS 模型组鼠的进臂总次数、强迫游泳不动时间则显示与正常对照组相比差异无统计学意义。综合上述两项检测结果进一步分析显示, 行为学实验均呈阳性的 SRS 鼠的比率约为 25% (图 2C)。

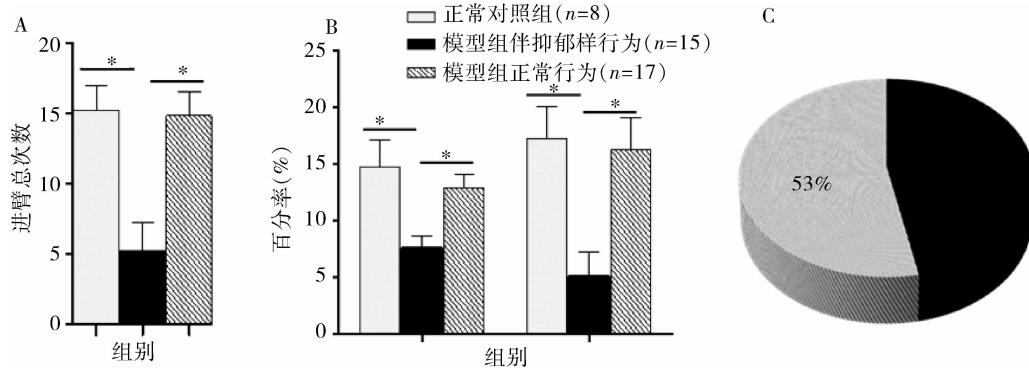


图 1 高架迷宫评定抑郁发生

A. 检测进臂总次数; B. 检测进臂次数百分率和开闭滞留时间百分率; C. 模型组中出现抑郁样行为的阳性率

与模型组伴抑郁大鼠比较, \*  $P < 0.01$

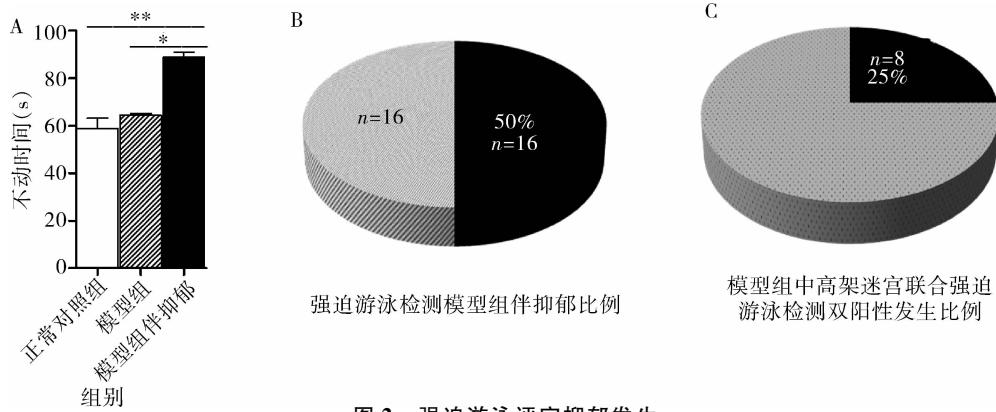


图 2 强迫游泳评定抑郁发生

A. 3 组不动时间统计结果; B. 模型组中出现抑郁样行为的比率; C. 两项行为学评定抑郁结果

与模型组伴抑郁大鼠比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

2. SRS 伴发抑郁行为鼠脑内髓鞘的变化:LFB 是特异性显示髓鞘的组化染色技术,本实验观察到共病组大鼠脑胼胝体(cc)、扣带回(cg)和海马区等染色变浅,平均光密度(A)值显示明显低于正常对照组( $P < 0.01$ ),非共病组与正常对照组相比无差异性变化(图3、图4)。

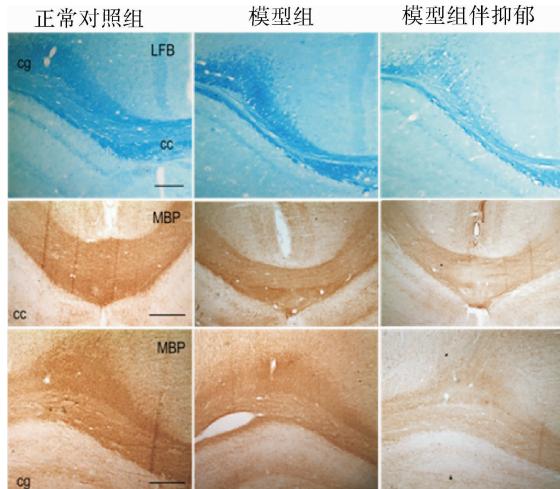


图3 胼胝体(cc)扣带回(cg)区域 MBP 免疫染色和髓鞘快蓝(LFB)染色结果

图内标尺为  $20\mu\text{m}$

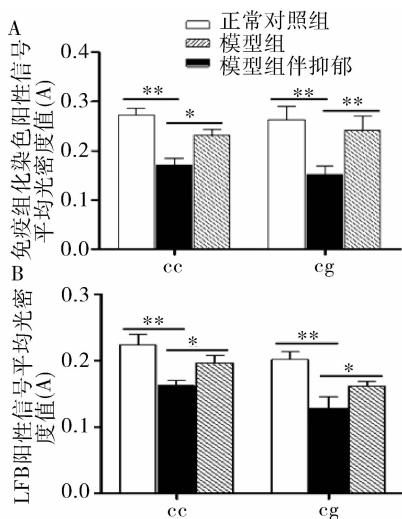


图4 阳性信号平均光密度统计分析图

A. 免疫组化染色; B. LFB。与模型组伴抑郁大鼠比较,

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

免疫组织化学染色观察到在上述脑白质区域中的髓鞘碱性蛋白 MBP 阳性信号面积减小、变浅,平均光密度(A)与正常对照组相比显著降低( $P < 0.01$ )。非共病组与正常对照组相比未见统计学差异(图3、图4)。

RT-PCR 的结果显示,SRS 与抑郁共病组大鼠脑内胼胝体(cc)、扣带回(cg)和海马区 MBP mRNA 表达的下降( $P < 0.01$ ,图5、图6)。在未共病的 SRS 鼠和正常对照组相比差异无统计学意义。结果与免疫组织化学染色结果一致。

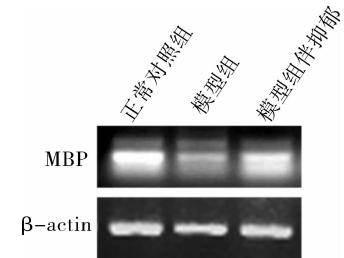


图5 PCR 检测结果

1. 正常对照组; 2. 模型组伴抑郁; 3. 模型组

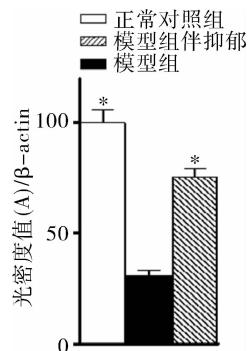


图6 统计分析 MBP mRNA 表达结果

与模型组伴抑郁大鼠比较, \*  $P < 0.01$

## 讨 论

既往研究表明严重的慢性癫痫患者常常伴发抑郁/焦虑的共病现象。O'Donoghue<sup>[8]</sup>调查了一组 155 例癫痫患者中 33% 有反复癫痫发作,其中癫痫并发抑郁比例达到了 20%。对临床控制良好的癫痫患者统计后显示抑郁的发生率为 10% ~ 20%,而控制不良患者抑郁的发生率为 20% ~ 60%。本实验中通过高架十字迷宫和强迫游泳两项不同方式的精神行为学检测评估后获得呈显著阳性(即出现抑郁样行为)的动物的比例是 25%,所得结果与先前的临床研究报道结果基本相近。

高架十字迷宫和强迫游泳试验是国际公认的经典的测试抑郁、焦虑反应的方法<sup>[9]</sup>。本实验采用高架十字迷宫测试进入 SRS 期的大鼠中有 47% ( $n = 15$ ) 显示他们对周围陌生环境缺乏好奇心,表现出抑郁样行为。强迫游泳进行测试记录到有 50% ( $n = 16$ ) 的 SRS 大鼠出现寻求逃避,活力削弱等绝望的抑

郁状态行为。然而,利用动物模型模拟人类的情感障碍实际上是十分困难的,无法通过语言获得动物的主观感受。仅仅单一的方法并不能完全判断动物的行为状态。最终为了排除可能干扰因素,本实验通过上述两种行为学的合理组合,分别从不同角度反应一只动物的能力状态,提高结果的可靠性和准确性。

目前,部分临床研究者认为癫痫与抑郁共病的发生机制可能与患者长期使用抗癫痫类药物控制病情的同时导致抑郁的发生有关<sup>[10]</sup>。但本实验中并未使用任何抗惊厥性药物,仍然获得相近的发生比率,暗示可能存在另外的发病机制和原因。既往有文献报道采用电镜观察颞叶癫痫患者脑皮质活检组织后发现髓鞘厚薄不均,呈局灶性脱失,提示癫痫发作可造成 CNS 髓鞘病变<sup>[11]</sup>。Frank 等应用影像学提供了抑郁症患者脑白质受损的证据,即前额叶扣带回皮质、豆状核和尾状核头部的 Cho/ml 比值、Cho/Cr 比值及 ml/Cr 比值均增高,以及额叶白质、胼胝体膝部和体部的 ADC 值增高和 FA 值降低<sup>[12]</sup>。本实验数据表明,在抑郁共病组脑白质区髓鞘碱性蛋白 MBP 阳性信号的表达明显下降。提示癫痫发作造成的脱髓鞘病变在引起抑郁共病上起到重要作用。抑郁发生的神经环路学说也支持我们的结果,认为脑白质病变在抑郁症发病的早期即已发生,白质的损伤可能构成其发病的神经生物学基础,破坏了心境调节相关的神经环路。对抑郁患者自杀后的尸检病理检测证实前额皮质等体积缩小区域存在神经元、胶质细胞数量的大幅减少,其中少突胶质细胞显示明显变性脱失。

综上所述,本实验结果进一步证实脑内髓鞘发育缺陷存在可能会加速慢性癫痫病程中抑郁发生。脑白质作为重要影响因素参与癫痫抑郁共病的发生,对揭示补充癫痫抑郁共病的发生机制提供了新的实验证据。

(上接第 11 页)

- 13 Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, et al. Chronic high - fat diet in father programs beta - cell dysfunction in female rat offspring [J]. Nature, 2010, 467(7318):963 - 966
- 14 Carone BR, Fauquier L, Habib N, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals [J]. Cell, 2010, 143(7):1084 - 1096
- 15 Ntanasis - Stathopoulos J, Tzanninis JG, Philippou, et al. Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2013, 13(2):133 - 146
- 16 Sanchis - Gomar F, Garcia - Gimenez JL, Perez - Quilis C, et al. Physical exercise as an epigenetic modulator: Eustress, the "positive stress as an effector of gene expression [J]. J Strength Cond Res,

## 参考文献

- 1 Wiegartz P. Co - morbid psychiatric disorder in chronic epilepsy: recognition and etiology of depression [J]. Neurology, 1999, 53(5 Suppl 2):S3 - S8
- 2 Jacoby A. The clinical course of epilepsy and its psychosocial correlates: findings from a U. K. Community study [J]. Epilepsia, 1996, 37(2):148 - 161
- 3 Theodore WH. Epilepsy and depression: imaging potential common factors [J]. Clin EEG Neurosci, 2004, 35(1):38 - 45
- 4 Concha L. Diffusion tensor imaging of time - dependent axonal and myelin degradation after corpus callosotomy in epilepsy patients [J]. Neuroimage, 2006, 32(3):1090 - 1099
- 5 Merkler D. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content [J]. Ann Neurol, 2009, 66(3):355 - 365
- 6 Valente KD, Filho GB. Depression and temporal lobe epilepsy represent an epiphenomenon sharing similar neural networks: clinical and brain structural evidences [J]. Arq Neuropsiquiatr, 2013, 71(3):183 - 190
- 7 Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: cortical areas [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1975, 38(1):1 - 12
- 8 O'Donoghue MF. Assessing the psychosocial consequences of epilepsy: a community - based study [J]. Br J Gen Pract, 1999, 49(440):211 - 214
- 9 Rogoz Z, Kabzinski M. Enhancement of the anti - immobility action of antidepressants by risperidone in the forced swimming test in mice [J]. Pharmacol Rep, 2011, 63(6):1533 - 1538
- 10 Bosak M, Dudek D, Siwek M. Depression in patients with epilepsy [J]. Psychiatr Pol, 2012, 46(5):891 - 902
- 11 Sirvanci S. Glutamate and GABA immunocytochemical electron microscopy in the hippocampal dentate gyrus of normal and genetic absence epilepsy rats [J]. Brain Res, 2005, 1053(1 - 2):108 - 115
- 12 Volpe U. Cerebral connectivity and psychotic personality traits. A diffusion tensor imaging study [J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2008, 258(5):292 - 299

(收稿日期:2014-01-30)

(修回日期:2014-02-17)

2012, 26(12):3469 - 3472

- 17 Pareja - Galeano H, Sanchis - Gomar F, Garcia - Gimenez JL. Physical exercise and epigenetic modulation: elucidating intricate mechanisms [J]. Sport Med, 2014, [Epub ahead of Print]
- 18 Ronn T, Volkov P, Davegarth C, et al. A six months exercise intervention influences the genome - wide DNA methylation pattern in human adipose tissue [J]. PLoS Genet, 2013, 9(6):e1003572
- 19 Fu L, Liu X, Niu Y, et al. Effects of high - fat diet and regular aerobic exercise on global gene expression in skeletal muscle of C57BL/6 mice [J]. Metabolism, 2012, 61(2):146 - 152

(收稿日期:2014-01-21)

(修回日期:2014-02-24)