

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.19.007

## 调控 RET 依赖性 GDNF 信号通路对大鼠癫痫模型的影响 \*

田沁涛 黑悦 伊西才 魏礼洲 刘卫平<sup>△</sup>

(第四军医大学附属西京医院神经外科 陕西 西安 710032)

**摘要 目的:**探究双侧海马 CA1 区立体定向注射 anti-GDNF 抗体对匹鲁卡品诱导的大鼠癫痫模型的影响。**方法:**选择成年雄性 SD 大鼠 60 只,并随机分为 3 组,即假手术组(sham 组,n=20)、癫痫模型组(model 组,n=20)和 GDNF 抑制剂组(anti-GDNF 组,n=20)。使用氯化锂-匹鲁卡品腹腔注射诱导癫痫模型,sham 组只给予氯化锂,anti-GDNF 组在造模前 2 h 给予大鼠双侧海马 CA1 区立体定向注射 anti-GDNF 抗体。在造模后 1、3、7 d 观察大鼠癫痫的发作频率,7 d 后采用脑电图监测(EEG)测定脑电波的变化情况,通过免疫组化方法测定海马 CA1 区域神经元数量变化 (NeuN 表达水平),造模后 1 d 时使用 western blot 方法测定海马 CA1 区 GDNF、RET 和 P53 蛋白的表达。**结果:**Model 组大鼠棘-慢波数量明显高于 Sham 组,anti-GDNF 组以上指标较 model 组显著减少( $P<0.05$ );Model 组海马 CA1 区神经元大量凋亡,但 anti-GDNF 组凋亡较 model 组显著减少( $P<0.05$ )。与 Sham 组比较,在癫痫发作后 1 d,model 组的 GDNF、RET 表达水平上调,P53 表达水平下降( $P<0.05$ ),而 anti-GDNF 组大鼠海马 CA1 区 GDNF、RET 表达较 model 组明显下调,P53 表达水平显著上升( $P<0.05$ )。**结论:**双侧海马 CA1 区立体定向注射 anti-GDNF 抗体能够减少癫痫发作,并对海马神经元起到保护作用,可能与其抑制 GDNF/RET/P53 信号通路有关。

**关键词:**癫痫;转染重排基因;神经胶质细胞源性的神经营养因子;神经元保护;脑电图

**中图分类号:**R-33;R742.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)19-3628-04

## The Effect of RET-dependent GDNF Signaling-regulation in a Rat Model of Epilepsy\*

TIAN Qin-tao, HEI Yue, YI Xi-cai, WEI Li-zhou, LIU Wei-ping<sup>△</sup>

(Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of bilateral stereotactic administration of anti-GDNF antibody in the hippocampal CA1 region of a rat model of pilocarpine-induced epilepsy. **Methods:** 60 adult male SD rats were randomly divided into the sham group (n=20), model group (n=20) and anti-GDNF group (n=20). Lithium chloride and pilocarpine were intraperitoneally injected to induce seizures. The sham group was given lithium chloride only and anti-GDNF group was given a stereotactic injection of anti-GDNF antibody into bilateral hippocampal CA1 region 2h before seizure induction. Then video monitoring of seizure incidence of the epileptic rats was done at 1, 3, 7d and EEG monitoring was performed at 7 d. Immunohistochemical staining was used to analyze the amount of neurons (NeuN expression) in the hippocampal CA1 region at 7 d, and western blot was carried out to explore the expression of protein levels of GDNF, RET and P53 in the hippocampal CA1 region at 1 d. **Results:** Model group tend to have more spike-slow waves than Sham group, and anti-GDNF group tend to have less than Model group in the parameters above ( $P<0.05$ ); the amount of apoptotic neurons in the hippocampal CA1 region of Model group were large, but apoptotic cells of the anti-GDNF group were comparatively less than Model group ( $P<0.05$ ); compared to Sham group, protein levels of GDNF and RET were up-regulated and P53 down-regulated in Model group 1 d after seizure induction ( $P<0.05$ ), however the protein levels of GDNF and RET were obviously down-regulated and P53 up-regulated in the anti-GDNF group compared to Model group ( $P<0.05$ ). **Conclusions:** Bilateral stereotactic administration of anti-GDNF antibody in the hippocampal CA1 region could reduce the incidence of seizure and have protective effects on the hippocampal neurons, which was probably related to suppression of GDNF/RET/P53 signaling.

**Key words:** Epileptic model; RET; GDNF; Neuroprotection; EEG

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R742.1 **Document Code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2017)19-3628-04

### 前言

既往研究表明神经胶质细胞源性的神经营养因子(glia

cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 对癫痫发作后海马区域神经元具有保护作用<sup>[1,2]</sup>。但持续性 GDNF 高表达可能激活 RET(rearranged during transfection)依赖性 GDNF 神经元凋亡

\* 基金项目:陕西省科技统筹基金资助项目(2013KTCL03-08)

作者简介:田沁涛,硕士研究生,主要研究方向:颅底手术以及癫痫治疗方法,E-mail: heiyue1990@yeah.net

<sup>△</sup> 通讯作者:刘卫平,电话:(029)84774339,E-mail: liuwp@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-01-05 接受日期:2017-01-29)

通路,即 GDNF-RET-Pit1-P53,最终使 P53 表达下调,进而诱导神经元凋亡<sup>[3,4]</sup>,既往相关研究集中于垂体腺瘤以及先天性巨结肠等<sup>[5,6]</sup>,此观点并未在癫痫模型中得以证实。本研究拟采用匹鲁卡品诱导癫痫模型,造模后 2h 立体定向注射 anti-GDNF 抗体,而后 1、3、7 d 录像监测大鼠癫痫发作频率、EEG 测定脑电变化情况,1d 时使用 western blot 方法测定 GDNF、RET 和 P53 表达水平的变化,14 d 后用免疫组化方法测定海马 CA1 区域神经元数量变化 (NeuN 表达水平),旨在探究 RET 依赖性 GDNF 信号通路在癫痫发病中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

60 只 Sprague Dawley (SD) 大鼠(雄性,210-250 g)皆由第四军医大学动物中心提供,所有大鼠随机分为 Sham 组(n=20)、Model 组(n=20)和 anti-GDNF 组(n=20),其中 EEG 监测、NeuN 免疫组化染色和 Western blot 检测各组均为 6 只 SD 大鼠,过程中若有死亡则另行补足。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠癫痫模型的建立** 腹腔注射氯化锂(127 mg/kg),20 h 后给予匹鲁卡品(350 mg/kg 30 min 后),严密观察并及时记录癫痫的发作等级。采用 Racine 标准判定癫痫发作等级<sup>[7]</sup>。当其出现全身肢体阵挛达到 1 h 以上快速终止癫痫发作,注射水合氯醛(300 mg/kg)。sham 组只给予氯化锂(127 mg/kg),并不给予水合氯醛。所有动物 1 h 后安放于立体定向仪待用。

**1.2.2 立体定向注射 anti-GDNF 抗体** 造模前 2 h 取 10% 水合氯醛(3 mg/kg)腹腔麻醉后的所有动物(60 只,包括 sham 组, model 组和 anti-GDNF 组),给予 anti-GDNF 抗体 500 nL(500 μg/ml)(MAB212, R&D, UK) 注射于双侧海马 CA1 区(AP=-1.8 mm; ML=± 1.6 mm; DV=-2.0 mm), sham 组和 model 组给予等量的生理盐水。

**1.2.3 电极置入和脑电(EEG)监测** 在脑电监测之前,于造模后 1、3、7d 进行癫痫发作频率监测(每日从 AM 8:00-PM 8:00)。首先确定硬膜下的电极位置(中线旁 =3 mm,前囟后 =3 mm),用 2 对电极(4 个 Ag/AgCl 电极,直径:100~200 μm)置入中线两侧,再将一个无关电极置入鼻侧;链接脑电图记录仪等待基线稳定后记 60 min。癫痫波数量统计为每分钟所看到的棘波和棘-慢波总和<sup>[8]</sup>。

**1.2.4 NeuN 免疫组化染色** 造模后 7 d 处死 sham、model 和 anti-GDNF 组各 5 只,灌注后切片酒精脱蜡,使用 0.01 M 柠檬酸修复液(pH=6.4),然后在高压锅中煮沸,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭后,加血清孵育 1 h,给予兔抗大鼠 NeuN 单克隆抗体(1:500, Abcam, USA),之后放于湿盒中 4℃ 过夜。第二日滴加二抗,孵育 30 min 后,给予链霉菌抗生物素-过氧化物酶复合物,最后 DAB 显色,拍照。

**1.2.5 Western blot 检测大鼠海马 CA1 区域 GDNF、RET、P53 表达** 各组大鼠(sham 组、model 组和 anti-GDNF 组,各 5 只)麻醉状态中给予 0.01 mol/L PBS 持续灌注至液体清亮之后冰上断头分离双侧海马 CA1 组织。加入组织裂解液 1.2 mL 提取蛋白并定量(碧云天,上海)。十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis,

SDS-PAGE)为 10% 浓度,总蛋白上样量为 60 μg,跑胶电压为 100V,1× 洗涤缓冲液 (Tris Buffered Saline With Tween, TBST) 洗涤后 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,而后 1× TBST 洗 4 次 10 min。而后使用 GDNF (1:1000, Abcam, USA)、RET(1:800, Abcam, USA)、P53(1:800, Life Technology, USA)抗体在 4℃ 冰箱中孵育过夜,加入二抗,室温孵育 1.5 h 辣根过氧化物酶底物显色,计算机扫描后 Image J 软件作统计分析。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行统计分析,使用 GraphPad Prism 6.0 作图。所有计量数据均以均数± 标准误 (Mean± SEM)表示,多组间比较采用单因素方差(ANOVA)分析,采用双因素方差分析(two-way ANOVA)分析各组大鼠在 1、3 和 7 d 的癫痫发作频率改变,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠 EEG 监测结果和癫痫发作频率的比较

造模后 7 d 进行 EEG 监测以及 1、3、7 d 进行癫痫发作频率监测,结果如图 1 所示。EEG 结果显示 Sham 组几乎没有棘-慢波,而 Model 组的棘-慢波数量比 anti-GDNF 组明显增高(P<0.05)。Sham 几乎没有癫痫发作,而 Model 和 anti-GDNF 组 1 d 时癫痫发作次数比较差异无统计学意义(P>0.05),但两组 3 d 和 7 d 比较差异具有明显统计学意义,anti-GDNF 组癫痫发作次数明显低于 Model 组(P<0.05)。

### 2.2 各组大鼠海马 CA1 区神经元 NeuN 染色

造模后 7 d,采用 NeuN 免疫组化染色方法观察海马 CA1 区域神经元数量的变化情况。Sham 组 CA1 区 NeuN 阳性细胞数量稳定在 (45± 3.5),Model 组 NeuN 阳性细胞数量明显减少(P<0.05),anti-GDNF 组阳性细胞数量相比 Model 组 NeuN 有所回升(P<0.05)。

### 2.3 各组大鼠海马 CA1 区 GDNF、RET 和 P53 表达比较

为了进一步观察 GDNF、RET 和 P53 蛋白表达情况,验证 anti-GDNF 对该通路的调控作用,于造模后 1 d 通过 western blot 检测其表达情况。结果显示:与 Sham 组比较,Model 组 GDNF 和 RET 蛋白表达水平显著上调,而 P53 表达下降(P<0.05),anti-GDNF 组 GDNF 和 RET 表达相比 Model 组明显下调(P<0.05),且 P53 表达水平回升(P<0.05)。

## 3 讨论

癫痫为常见、难治性疾病,目前针对临床、基础研究众多但治疗鲜有突破<sup>[9,10]</sup>。RET 依赖性 GDNF 信号通路在垂体瘤、先天性巨结肠中有着十分重要的作用<sup>[11-13]</sup>,但该通路介导的细胞凋亡作用在癫痫模型中是否相同,通过调控 GDNF-RET 能否对癫痫发病发展产生积极影响尚未可知<sup>[14]</sup>。GDNF-RET-P53 信号通路是目前被广为认知的一种能够诱导神经元凋亡作用的信号通路<sup>[15]</sup>。在 GDNF 高表达的情况下,定位于细胞膜的酶受体 RET 表达被激活,使得下游 RET/Pit1/p14ARF/p53 分子表达,最终导致 P53 表达水平下降,从而介导神经元凋亡。研究显示 GDNF、GDNF 受体 α(GDNFα)以及 RET 的表达在大鼠癫痫模型造模后 8-10h 显著上调,并于 2 d 后下降至正常水平<sup>[16]</sup>。本研究建立在前期的研究结果之上,考虑到 RET 和 GDNF 的表达

高峰在 1 d 左右, 所以选用造模后 1 d 蛋白水平表达变化做对比, 发现 RET 和 GDNF 于造模之后立即升高, 与现有研究结果

相同; 另一方面, GDNF 以及 RET 的升高, 使得 P53 表达水平下降, 可能进一步促成海马 CA1 区神经元凋亡。

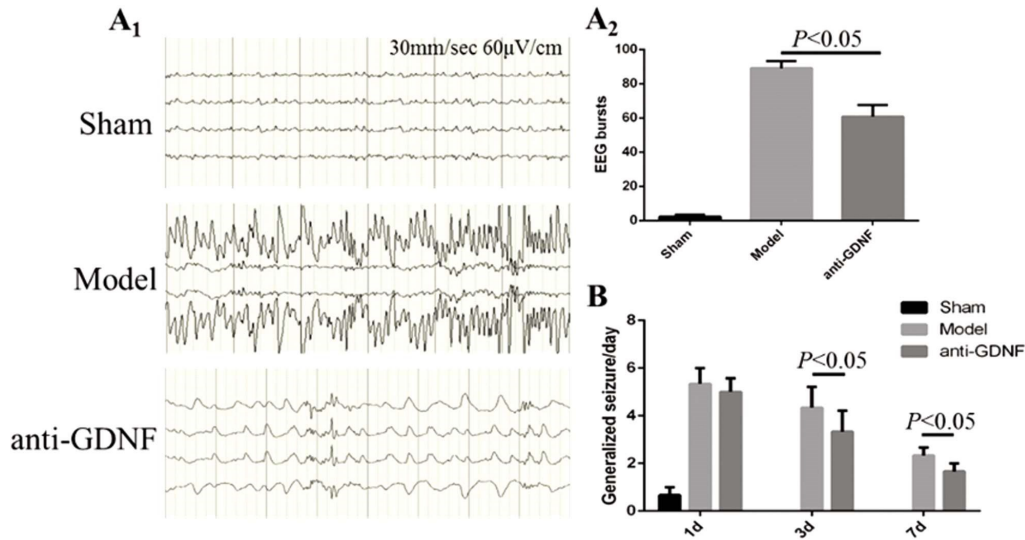


图 1 各组大鼠 EEG 监测结果以及 1、3、7d 癫痫发作频率比较

Fig.1 Comparison of the EEG monitoring (A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>) and incidence of seizure (B) at 1, 3, 7d among three groups

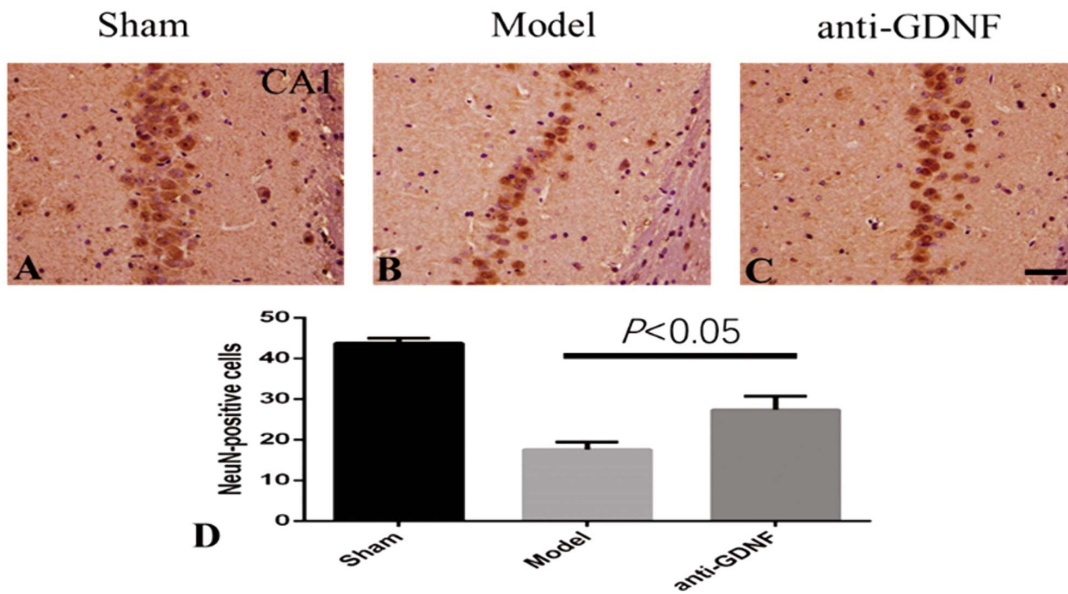


图 2 各组大鼠海马 CA1 区 NeuN 免疫组化染色和统计结果

Fig.2 The Immunohistochemical staining of NeuN in the hippocampal CA1 region of a rat model of epilepsy among three groups. Horizontal bar=20 μm.

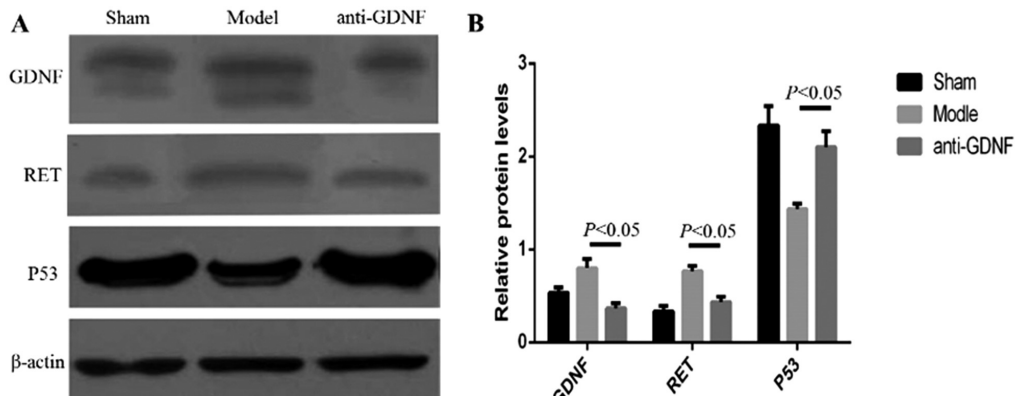


图 3 三组海马 CA1 区 GDNF, RET 和 P53 蛋白表达的比较

Fig.3 Comparison of the protein levels of GDNF, RET and P53 in the hippocampal CA1 region among three groups

由于 GDNF 本身为癫痫发病后神经元为自身保护所旁分泌的一种营养因子,其可能在癫痫疾病初期对神经元起到保护作用。但进一步研究显示 GDNF 持续高表达对动物模型中神经元凋亡有着联系<sup>[17,18]</sup>。目前的研究仅表明 GDNF 的升高和海马区域神经元的凋亡,但调控该通路后对癫痫病情发展以及神经元保护的作用尚不明确。本研究结果显示在造模前使用 anti-GDNF 中和抗体干预 GDNF-RET 信号通路可对癫痫产生抑制作用,保护海马区域神经元。

本研究通过探究 RET 依赖性 GDNF 信号通路在癫痫发病后的表达变化,发现 GDNF-RET-P53 通路在造模后被激活,GDNF、RET 表达水平上调,P53 水平下降,可能参与了癫痫发病过程;进一步通过对海马 CA1 区定向注射 anti-GDNF 抗体的方式观察到抑制该通路能起到降低癫痫发作频率和 EEG 异常波形,上调海马区域神经元数量的作用。至于以上信号通路的变化是否只发生在双侧海马的神经元内,是否对海马区胶质细胞等起作用将有待于进一步探究。

#### 参考文献(References)

- [1] Bender T S, Migliore M M, Campbell R B, et al. Intranasal administration of glial-derived neurotrophic factor (GDNF) rapidly and significantly increases whole-brain GDNF level in rats [J]. Neuroscience, 2015, 303: 569-576
- [2] Yoo Y M, Lee C J, Lee U, et al. Neuroprotection of adenoviral-vector-mediated GDNF expression against kainic-acid-induced excitotoxicity in the rat hippocampus[J]. Exp Neurol, 2006, 200(2): 407-417
- [3] Duveau V, Fritschy J. PSA-NCAM-dependent GDNF signaling limits neurodegeneration and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy[J]. European Journal of Neuroscience, 2010, 32(1): 89-98
- [4] Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles A R, Ibanez-Costa A, et al. Somatotropinomas, but not nonfunctioning pituitary adenomas, maintain a functional apoptotic RET/Pit1/ARF/p53 pathway that is blocked by excess GDNF[J]. Endocrinology, 2014, 155(11): 4329-4340
- [5] 田沁涛, 黑悦, 伊西才, 等. RET 的表达与生长激素型垂体腺瘤患者生长激素水平的相关性分析 [J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2016, 2(4): 198-201  
Tian Qin-tao, Hei Yue, Yi Xi-cai, et al. Analysis of the correlation of RET expression with growth hormone level of patients with growth hormone-secreting pituitary adenoma [J]. Chin J Neurotrauma Surg (Electronic Edition, 2016, 2(4): 198-201
- [6] 张辉, 詹江华. GDNF、GFR $\alpha$ 1 和 RET 在先天性直肠肛门畸形中的表达及意义[J]. 天津医药, 2014, (06): 591-594  
Zhang Hui, Zhan Yan-hua. Clinical Significance of GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET Expression in Distal Rectum with Congenital Anorectal Malformation[J]. Tianjin Med J, 2014, (06): 591-594
- [7] Phelan K D, Shwe U T, Williams D K, et al. Pilocarpine-induced status epilepticus in mice: A comparison of spectral analysis of electroencephalogram and behavioral grading using the Racine scale[J]. Epilepsy Res, 2015, 117: 90-96
- [8] Abreu R, Leite M, Leal A, et al. Objective selection of epilepsy-related independent components from EEG data [J]. J Neurosci Methods, 2016, 258: 67-78
- [9] Jaerve A, Muller H W. Chemokines in CNS injury and repair [J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(1): 229-248
- [10] Berg A T. Epilepsy: clinical implications of recent advances [J]. Lancet Neurol, 2013, 12(1): 8-10
- [11] Wang X. Structural studies of GDNF family ligands with their receptors-Insights into ligand recognition and activation of receptor tyrosine kinase RET[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2013, 1834(10): 2205-2212
- [12] Murakumo Y, Jijiwa M, Asai N, et al. RET and neuroendocrine tumors[J]. Pituitary, 2006, 9(3): 179-192
- [13] Garcia-Lavandeira M, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles M E, et al. Functional role of the RET dependence receptor, GFR $\alpha$  co-receptors and ligands in the pituitary [J]. Front Horm Res, 2010, 38: 127-138
- [14] Canibano C, Rodriguez N L, Saez C, et al. The dependence receptor Ret induces apoptosis in somatotrophs through a Pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth[J]. EMBO J, 2007, 26(8): 2015-2028
- [15] Takada N, Isogai E, Kawamoto T, et al. Retinoic acid-induced apoptosis of the CHP134 neuroblastoma cell line is associated with nuclear accumulation of p53 and is rescued by the GDNF/Ret signal [J]. Med Pediatr Oncol, 2001, 36(1): 122-126
- [16] 高旭光, 王军, 魏晰. 毛果芸香碱致痫大鼠脑内胶质细胞源性神经营养因子及其受体  $\alpha$  和 RET 蛋白的表达[J]. 北京大学学报(医学版), 2003, 35(3): 296-298  
Gao Xu-guang, Wang Jun, Wei Xin. Expressions of GDNF, GDNF $\alpha$  and RET proteins in the brain of rats with seizures induced by pilocarpine[J]. Journal of Peking University (Health Sciences), 2003, 35(3): 296-298
- [17] Wang L, Deng Q Q, Wu X H, et al. Upregulation of glutamate-aspartate transporter by glial cell line-derived neurotrophic factor ameliorates cell apoptosis in neural retina in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. CNS Neurosci Ther, 2013, 19(12): 945-953
- [18] Liu G, Wang X, Shao G, et al. Genetically modified Schwann cells producing glial cell line-derived neurotrophic factor inhibit neuronal apoptosis in rat spinal cord injury [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4): 1305-1312