

· 实验研究 ·

戊四氮诱导发育鼠癫痫持续状态后 海马神经发生及 MK-801 的影响

陈静, 袁宝强

(徐州医学院附属医院儿科, 江苏 徐州 221002)

[摘要] 目的 探讨戊四氮诱导发育期大鼠癫痫持续状态(SE)后对海马内齿状回颗粒细胞神经发生的影响以及 N-甲基 D-天冬氨酸受体(NMDAR)拮抗剂 MK-801 对此结果的抑制作用,从而研究癫痫发作后发育脑海马内神经发生及 NMDAR 在神经发生中的作用。方法 SD 大鼠 7, 14, 21, 28 d 4 个日龄组共 216 只, 每组均为 54 只, 每个日龄组大鼠随机分 SE 组、MK-801 组和正常对照组, 每组 18 只。采用 5-溴脱氧尿核苷(BrdU)标记新生细胞, 再以 β 微管蛋白 III(TuJ1)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)分别标记早期神经元和胶质细胞的单、双标免疫组织化学方法, 检测 PTZ 诱导癫痫持续状态后发育鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)神经发生, 并用 MK-801 治疗后观察对其的影响。结果 BrdU 注射后第 7 天和第 14 天, SE 组各日龄幼鼠齿状回 BrdU 阳性细胞数明显高于同日龄的正常对照组, 其中约有 80% 同时表达 TuJ1; MK-801 组 BrdU 阳性细胞数较 SE 组明显减少($P < 0.01$), 而在第 28 天三组之间 BrdU 阳性细胞数无明显差异($P > 0.05$)。结论 癫痫发作可增加幼鼠齿状回颗粒细胞的神经发生, 而 NMDAR 在癫痫后的神经发生中起着促进作用。 [中国当代儿科杂志, 2006, 8(5): 421-424]

[关键词] 癫痫持续状态; BrdU; 神经发生; MK-801; 齿状回; 大鼠

[中图分类号] R742.1; R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)05-0421-04

Neurogenesis of hippocampus following pentylenetetrazol-induced status epilepticus in developing rats and the effect of MK-801 on neurogenesis

CHEN Jing, YUAN Bao-Qiang. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Xuzhou College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China (Yuan B-Q, Email: yuanbaiang@hotmail.com)

Abstract: Objective This study aimed to determine whether pentylenetetrazol-induced status epilepticus (SE) can induce dentate granule cell neurogenesis in the developing rat and the effect of MK-801, a noncompetitive antagonism of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), on neurogenesis. **Methods** Two hundred and sixteen postnatal days 7, 14, 21 or 28 Sprague Dawley (SD) rats were involved in this study. Each age group consisted of 54 rats which were randomly assigned into a SE group, a SE + MK-801 group and a Normal control group ($n = 18$ each). SE was induced by intraperitoneal injection of PTZ (80 mg/kg). The SE + MK-801 group was injected intraperitoneally with MK-801 (1 mg/kg) at 1 hr after SE episode. All rats were given 5-bromodeoxyuridine (BrdU) intraperitoneally to label newborn cells at 6, 13 and 27 days after seizures and then were sacrificed 24 hrs after BrdU injection. The immunohistochemistry method was used to measure the expression of BrdU, TuJ1 (β III tubulin), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the dentate gyrus of hippocampus of rats. **Results** The number of the BrdU positive cells in the SE group was significantly higher than in the age-matched normal controls at 7 and 14 days after SE episode ($P < 0.05$ or 0.01). Approximately 82.5% and 80.3% of BrdU-labeled cells in the SE and the Control groups were co-expressed TuJ1 respectively. MK-801 treatment decreased the BrdU positive cells compared with the SE group at 7 and 14 days after SE seizures ($P < 0.01$). On the 28th day after SE episode there were no differences among the three groups for the BrdU positive cells. **Conclusions** PTZ-induced SE can increase the dentate granule cell neurogenesis in the developing rat. NMDAR plays an important role in neurogenesis following seizures. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(5): 421-424]

Key words: Status epilepticus; BrdU; Neurogenesis; MK-801; Dentate gyrus; Rats

癫痫(epilepsy)作为一种发作性疾患,是小儿神经系统常见疾病。其中癫痫持续状态(status epilep-

ticus, SE)为一严重的癫痫发作形式,常可引起各种病理生理变化及酶、神经递质、氨基酸等的变化,从

[收稿日期] 2006-01-30; [修回日期] 2006-04-17

[作者简介] 陈静,女,主治医师,在读硕士研究生。主攻方向:小儿癫痫病。

[通讯作者] 袁宝强,副主任医师。徐州医学院附属医院儿科,邮编:221002。

而损害神经元,甚至神经元死亡^[1]。研究发现,痫性发作导致的脑损伤可在成熟啮齿类动物齿状回诱导各种形式的神经可塑性,包括轴索重组、星形胶质细胞活化、树突重组和颗粒细胞的神经发生。神经发生(neurogenesis)是指包括人在内的大多数哺乳类动物均存在的神经系统产生新神经元的过程^[2]。出生后,这种神经发生在大部分脑区仅持续很短的时间,海马齿状回的颗粒下层却具有不同寻常的神经发生能力,可一直持续到成年乃至终生^[3]。新近我们对若干幼年大鼠癫痫持续状态动物模型的研究已发现,癫痫发作可使海马结构内突触明显增生,那么是否同时还存在神经细胞的再生呢?为此,我们进行了动物试验,意图建立不同年龄组幼鼠戊四氮(pentylenetetrazol, PTZ) SE模型,观察发作后不同时间点海马齿状回神经发生的情况,并且用N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)非竞争性拮抗剂MK-801腹腔注射治疗后,同时研究对其的影响,以探讨NMDAR在发作后神经发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康SD大鼠7, 14, 21, 28 d 4个日龄组,雌雄不限,各组均为54只,总共216只,由徐州医学院实验动物中心提供。将各个日龄组大鼠随机分为癫痫持续状态组(SE组)、MK-801治疗组(MK-801组)和正常对照组(NS组),每组18只。

1.2 方法

1.2.1 癫痫持续状态模型的建立和治疗 各组日龄中SE组和MK-801组大鼠腹腔内注射PTZ(Sigma公司), 80 mg/kg, 用双蒸水稀释成10 mg/mL,腹腔注射,发作开始时表现按Lado幼鼠癫痫发作分级标准^[4]。癫痫组均达到3.5~7级发作,呈癫痫持续状态,无发作与死亡者均被剔除。发作1 h各组均给予安定腹腔内注射(10 mg/kg,)以终止发作。NS组用等体积的生理盐水腹腔内注射,注射后1 h亦给予同剂量的安定腹腔注射。MK-801组于癫痫持续状态发作1 h后同时腹腔内注射MK-801(Sigma公司),剂量为1 mg/kg(用生理盐水稀释成0.5 mg/mL)。

所有大鼠均在同一实验室和动物中心操作和喂养,以保持喂养、光照、噪音等条件相同,减少外界造成的差异。

1.2.2 BrdU注射 BrdU(Sigma公司)溶于生理

盐水,浓度10 mg/mL。注射PTZ或生理盐水后第6, 13, 27 d各组经腹腔注射BrdU,剂量为50 mg/kg,每2 h 1次,连续注射4次。

1.2.3 组织切片的制备 4个日龄组分别于注射BrdU后24 h(每一时间点各组均为6只)腹腔内注射10%水合氯醛(0.35 mL/kg)麻醉,以4%多聚甲醛灌注,取脑后选择海马部位做冠状冰冻连续切片,切片厚30 μ m,每隔2张取1张切片,组成1套,每套切片不少于8张,共3套,分别行BrdU单标免疫组织化学染色、BrdU + β 微管蛋白III(TuJ1)、BrdU + 胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)双标免疫组织化学染色。

1.2.4 免疫组织化学染色 切片依次按以下步骤处理(SP免疫组化试剂盒):新配制的1% H_2O_2 溶液中室温下孵育30 min以灭活内源性过氧化物酶;入2N HCl溶液中,37℃浸泡60 min使DNA变性,再用0.1M硼酸缓冲液(pH 8.5)室温下浸泡10 min用以中和盐酸;然后以鼠抗BrdU单克隆抗体(1:100,武汉博士德生物工程有限公司)作为一抗,采用SP法行BrdU免疫组织化学染色,用DAB和 H_2O_2 呈色,自来水冲洗,贴片、脱水、透明、封片。阳性着色为棕黄色。BrdU + TuJ1(兔抗TuJ1, Santa Cruz公司), BrdU + GFAP(兔抗GFAP, Santa Cruz公司)双标免疫组织化学染色按文献^[5]进行,其中BrdU用碱性磷酸酶-BCIP/NBT显色系统呈蓝色, TuJ1或GFAP用辣根过氧化物酶-AEC显色系统呈红色。阴性对照试验以PBS代替一抗,其余染色步骤相同。

1.2.5 结果分析和统计学处理 400倍光镜下观察大鼠齿状回颗粒细胞全层(GCL)、颗粒下层增生带(SGZ)、GCL边缘与门区之间约2个细胞体厚的区域^[6] Brdu阳性细胞数,每只大鼠随机选取8个非连续的脑片进行计数,得出每张切片的平均值。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS软件包行方差分析。

2 结果

2.1 行为学观察

SE组和MK-801组大鼠注射PTZ后1~2 min进入潜伏期,由自由活动状态逐渐转为安静、呼吸加快,很快出现癫痫发作,渐次出现连续点头、前肢阵挛、后退、摔倒;达到7~8级发作的大鼠则表现为狂奔嘶叫、全身强直-阵挛性发作,同时伴有全身青紫。NS组大鼠无行为学改变。

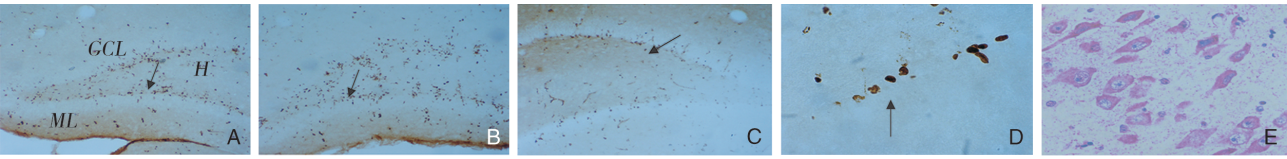


图1 海马齿状回 BrdU 免疫反应产物 A:SE 发作后第7天,大部分 BrdU 阳性细胞分布于颗粒下层,箭头所示为颗粒下层 BrdU 阳性细胞,GCL:granule cell layer 颗粒细胞层,H:hilus 门区,ML: molecular layer 分子层(×400);B:发作后第14天,新生细胞在SE和MK-801组幼鼠除主要分布于颗粒细胞层外,另有一部分位于门区和内分子层,箭头所示为颗粒细胞层 BrdU 阳性细胞(×400);C:发作后第14天,NS组幼鼠的 BrdU 阳性细胞主要分布于整个颗粒细胞层(×400);D:颗粒细胞层 BrdU 阳性细胞胞核变大,形状更接近圆形或卵圆形(×400);E:颗粒细胞层 BrdU/TuJ1 或 BrdU/GFAP 双标阳性免疫组化染色(×400)。

2.2 BrdU 免疫反应产物

SE 发作后第7天和14天,SE组各日龄组幼鼠齿状回 BrdU 阳性细胞数明显高于各自的NS组,MK-801组较SE组明显减少($P < 0.05$),但在第28天3组之间差异无显著性($P > 0.05$)(见表1);SE 发作后第7天,3组幼鼠的大部分 BrdU 阳性细胞分布于颗粒下层(见图1A);发作后第14天,新生细胞在SE组和MK-801组幼鼠除主要分布于颗粒细胞层外,另有一部分位于门区和内分子层(图1B),而在NS组幼鼠的 BrdU 阳性细胞主要分布于整个颗粒细胞层(见图1C),新生细胞在由颗粒下层向颗粒细胞层迁移的过程中,胞核变大,形状更接近圆形或卵圆形(见图1D)。阴性对照试验切片无特征性免疫反应产物。

胞核呈深蓝色,TuJ1/GFAP 阳性的细胞胞浆呈红色(图1E)。所有日龄组SE发作后第7天,SE组与NS组齿状回的 BrdU 阳性细胞同时表达 TuJ1 分别为82.5%和80.3%($P > 0.05$),发作后第14天SE组与NS组分别为73.6%和70.1%($P > 0.05$),两组约4%~5%左右为GFAP阳性,无明显差异。另外,有部分 BrdU 阳性细胞并不同时表达神经元或神经胶质的抗原,无法确定其细胞类型。阴性对照切片均无特征性免疫反应产物的表达。

3 讨论

本试验中对发育鼠年龄的选择是基于人脑和大鼠脑发育程度的对应关系。虽然大鼠脑发育与人脑发育的年龄对应关系目前还不十分清楚,但普遍接受的观点认为,生后5~7d大鼠的脑发育程度与足月新生儿的脑发育程度相当,15d大鼠的脑发育程度与1岁儿童相当,28~30d大鼠的脑发育程度与2岁儿童相当^[7]。由于儿童癫痫发病率比成人高,出生后2岁内发病率最高,因此本研究中选择大鼠的年龄段与人类癫痫的好发年龄相当。

本试验中采用 BrdU 来标记新生细胞是基于以下理论:BrdU 是一种胸腺嘧啶核苷的类似物,可在细胞处于DNA合成期时掺入到新合成的DNA中,并通过免疫组织化学方法检测到,因而是反映细胞增殖的理想指标。

过去研究认为,哺乳类中枢神经系统的神经发生主要限于胚胎期,出生后将不再存在神经发生现象。但近来研究发现,脊椎动物中枢神经系统很多区域包括海马齿状回直到成年期仍然保持着神经发生的能力,而且在某些生理刺激和病理状态下,这些部位的神经发生表现出明显增强趋势^[8]。

在本试验中,发育鼠在PTZ导致癫痫持续状态后海马齿状回颗粒下层的神经发生较生理盐水组明显增加,其增生的高峰在发作后14d左右,在28d

表1 不同日龄幼鼠不同组齿状回 BrdU 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

日龄	发作后 (d)	NS	SE	MK-801
P7	7	151.07 ± 5.87	181.27 ± 13.53 ^b	140.83 ± 16.84 ^c
	14	135.45 ± 6.78	190.15 ± 8.03 ^b	135.58 ± 4.74 ^c
	28	110.37 ± 10.81	111.05 ± 7.44	104.52 ± 7.95
P14	7	135.28 ± 7.77	149.58 ± 11.17 ^a	131.32 ± 8.41 ^c
	14	127.28 ± 3.77	150.83 ± 6.27 ^b	121.17 ± 3.19 ^c
	28	96.85 ± 8.42	108.58 ± 18.40	104.73 ± 13.96
P21	7	127.47 ± 9.03	140.12 ± 8.16 ^a	123.90 ± 5.97 ^c
	14	108.35 ± 8.75	155.58 ± 17.60 ^b	120.53 ± 8.92 ^c
	28	86.90 ± 12.80	80.90 ± 11.58	79.45 ± 19.87
P28	7	109.93 ± 9.24	122.27 ± 7.21 ^a	104.23 ± 8.49 ^c
	14	99.07 ± 9.12	128.68 ± 6.07 ^b	98.95 ± 3.96 ^c
	28	75.93 ± 13.77	75.68 ± 14.86	67.45 ± 12.20

a 与 NS 组比较 $P < 0.05$, b $P < 0.01$; c 与 SE 组比较 $P < 0.01$

2.3 BrdU 免疫组织化学双标记

通过 BrdU + TuJ1 与 BrdU + GFAP 双标记染色,可鉴别出 BrdU 阳性细胞的细胞类型:BrdU 和 TuJ1 双阳性的细胞为新生神经元,BrdU 和 GFAP 双阳性的细胞为新生神经胶质细胞。BrdU 阳性的细

后这种神经发生的增加不明显,进一步研究发现这些新生细胞可由颗粒下层迁移到颗粒细胞层,并可异常迁移到门区和分子层。上述结果提示癫痫发作后,颗粒细胞通过改变其数量、位置使海马结构中神经网络发生可塑性变化,Dudek^[9]也认为这些异位的门区颗粒细胞在内分子层没有树突,而是接受其他兴奋性神经元的传入(如:颗粒细胞、苔藓纤维和或CA3区的锥形细胞)形成了新的反复的兴奋环路,从而导致癫痫阈值降低,容易引起癫痫的发作。

然而,PTZ诱导癫痫持续状态后引起的海马齿状回神经发生显著增加的精确机制还不十分清楚,目前认为可能与谷氨酸的过度释放、各种来源的NO和神经营养因子的合成增加、基因和神经递质的蛋白表达的改变以及细胞转导通路的激活有关^[10]。本试验中应用NMDA受体拮抗剂MK-801后明显抑制了齿状回颗粒细胞的神经发生,因此从本研究中至少可以证明NMDA受体参与了痫性发作后神经发生,并结合其他研究我们推测脑源性神经营养因子对癫痫发作后幼鼠的神经发生可能有更强的促进作用。

总之,发育中的中枢神经系统在特殊情况下能够对损伤或变性发生反应性的重建^[11],本试验提示神经发生可能参与了癫痫后海马结构的可塑性重建。

[参 考 文 献]

- [1] J. J Clin Neurophysiol, 1995, 12(4): 326-342.
- [2] Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(8): 4710-4715.
- [3] Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation[J]. J Neurosci, 1996, 16(6): 2027-2033.
- [4] Lado FA, Sperber EF, Moshe SL. Anticonvulsant efficacy of gabapentin on kindling in the immature brain[J]. Epilepsia, 2001, 42(4): 458-463.
- [5] Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus[J]. Nat Med, 1998, 4(11): 1313-1317.
- [6] Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Shimada M, McGeer PL, et al. Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy[J]. Epilepsia, 2000, 41(1): 10-18.
- [7] Jiang W, Duong TM, de Lanerolle NC. The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat[J]. Epilepsia, 1999, 40(1): 5-19.
- [8] Dash PK, Mach SA, Moore AN. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury[J]. J Neurosci Res, 2001, 63(4): 313-319.
- [9] Dudek FE. Seizure-induced neurogenesis and epilepsy: involvement of ectopic granule cells? [J]. Epilepsy Curr, 2004, 4(3): 103-104.
- [10] Cole AJ. Is epilepsy a progressive disease? The neurobiological consequences of epilepsy[J]. Epilepsia, 2000, 41 (Suppl 2): S13-22.
- [11] Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system[J]. Nature, 2000, 407(6807): 964-970.

(本文编辑:吉耕中)

[1] Fountain NB, Lothman EW. Pathophysiology of status epilepticus

· 消息 ·

欢迎订阅 2007 年《儿科药学杂志》

《儿科药学杂志》由中国药学会医院药学科药学专业组与重庆医科大学儿童医院联合主办。1995年创刊,2000年8月国内外公开发行人。是目前我国儿科药学领域唯一的专业学术刊物。中国标准刊号:ISSN 1672-108X, CN 50-1156/R。是儿科学类核心期刊,《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》等来源期刊。

本刊报道的主要内容有:儿科药理学、儿科中西药制剂、儿科中西医临床用药、药物分析、儿科临床药学、药事管理、新药评价、儿科安全用药与不良反应、儿科药学基础知识与理论、最新研究成果、先进技术介绍等。是儿科学、儿医学工作者的良师益友,必备的科技刊物。

本刊为双月刊,64页,双月10日出版。每册定价6.00元,全年36.00元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号:78-133,未及时订阅者,可直接向编辑部订购。本刊尚有2001-2006年全套期刊,欢迎补购。编辑部地址:重庆市渝中区中山二路136号重庆医科大学儿童医院内《儿科药学杂志》编辑部,邮编:400014,电话:(023)63626877(传真),(023)63632756-3653,E-mail: ymj2003@163.com。