论著·实验研究

神经生长因子对难治性癫痫儿童脑海马痫性放电区神经细胞的影响

方琼[1] 陈燕惠[2]

(1. 福建医科大学省立临床医学院儿科,福建 福州 350001;
2. 福建医科大学附属协和医院儿科,福建 福州 350001)

[摘 要] **目的** 探讨神经生长因子(NGF)对难治性癫痫儿童海马痫性放电区星形胶质细胞和神经元的影响。**方法** 对术中取下的癫痫儿童脑海马痫性放电区组织块,采用解离细胞即刻培养技术,在空白对照组及 NGF 浓度分别为 12.5、50、100 ng/mL 的条件下进行培养,通过免疫荧光细胞化学法,以双苯酰亚胺(Bb)染核,联合细胞特异性标志蛋白 GFAP、MAP2 分别标记星形胶质细胞、神经元,在倒置荧光显微镜下计数神经细胞总数,并计算相应的阳性细胞比率。**结果** NGF 作用 4 h 后,海马区 GFAP 阳性的星型胶质细胞比率及 MAP2 阳性神经元细胞比率较空白对照组升高,并随着 NGF 浓度的增高而增加($P<0.05$)。**结论** NGF 对癫痫儿童损伤海马区的 $GFAP^+$ 星形胶质细胞和 $MAP2^+$ 神经元可能起到一定的保护作用。 [中国当代儿科杂志,2011,13(3):236-239]

[关 键 词] 癫痫; 神经生长因子; 神经细胞; 儿童
[中图分类号] R742.1 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)03-0236-04

Effects of nerve growth factor on neural cells in the epileptiform discharge region of the hippocampus in children with intractable epilepsy

FANG Qiong, CHEN Yan-Hui. Department of Pediatrics, Provincial Clinical Medical College Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, *China* (*Chen Y-H, Email: yanhui_0655@163.com*)

Abstract: Objective To study the effects of nerve growth factor (NGF) on the astrocytes and neurons in the epileptiform discharge region of the hippocampus in children with intractable epilepsy. **Methods** Acutely dissociated cells from the epileptiform discharge region of the hippocampus were exposed to blank control group and NGF treatment groups (NGF concentrations: 12.5, 50 and 100 ng/mL). Astrocytes and neurons were identified by bisbenzimide staining combined with the specific makers such as GFAP and MAP2. The total number of neural cells was counted under an inversion fluorescence microscope. The percentage of immunostaining positive cells was calculated. **Results** After 4 hrs of culture, the percentages of $GFAP^+$ astrocytes and $MAP2^+$ neurons in the NGF treatment groups were higher than those in the blank control group, and increased with increasing NGF concentration ($P<0.05$). **Conclusions** NGF may have protective effects on $GFAP^+$ astrocytes and $MAP2^+$ neurons in the injured hippocampus of children with epilepsy.
[**Chin J Contemp Pediatr**, **2011**, **13** (**3**):**236-239**]

Key words: Epilepsy; Nerve growth factor; Neural cell; Child

难治性癫痫是一种慢性脑部疾病,长期脑部神经元过度放电引起神经细胞损伤、凋亡。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是中枢神经系统中重要的神经营养因子,在促进中枢神经细胞再生,维持其存活,减少病理性死亡、抑制细胞凋亡过程中起重要作用[1-2]。本研究探讨应用外源性 NGF 对难治性癫痫儿童海马痫性放电区胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic portein,GFAP)阳性的星形胶质细胞及微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2,MAP2)阳性的神经元的影响,以期为 NGF 是否能应用在癫痫儿童中提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(FBS)(Hyclone 公司),牛血清白蛋白(BSA)(Promeg 公司),胰蛋白酶、透明质酸酶、L-多聚赖氨

[收稿日期]2010-05-27;[修回日期]2010-08-29
[作者简介]方琼,女,硕士,住院医师。
[通信作者]陈燕慧,教授。

酸、双苯酰亚胺(bisbenzimide, Bb)染液(Sigma 公司),NGF(厦门北大之路生物工程有限公司),抗 MAP2、GFAP 抗体(Zymed 公司),IgG-FITC、IgG-TRITC(SBA 公司)。

1.2 脑组织标本来源

选取 16 例手术切除的癫痫患儿海马痫性放电区组织。年龄 8~16 岁,平均年龄为12.1±2.4 岁,病程为 1~8 年,平均 4.2±2.1 年,每周发作次数 3~65 次,平均 17.1±4.4 次,持续数秒至数十分钟,其中男 9 例,女 7 例。病例入选标准:符合难治性癫痫诊断标准[3],并经正规内科治疗,癫痫控制效果不佳,影响学习和生活,每月发作 4 次以上,结合辅助检查如脑电图、磁共振(MRI)和/或正电子发射计算机断层扫描(PET)扫描定位、术中皮质脑电检测,确定痫性放电区,并根据影像学、病理结果排除有胶质瘤、灰质异位、海马硬化等器质性病变的标本。脑组织的获取与研究获得医学伦理委员会许可。

1.3 方法

1.3.1 脑组织快速解离和培养 方法[4]:将获取的新鲜脑组织,除去脑膜,快速充分机械解离,以含 1.3 mg/mL 胰蛋白酶-EDTA 和 0.67 mg/mL 透明质酸酶的消化液在 37°C 条件下温和摇育 1 h 后,反复吹打成细胞悬液,700 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 10 mg/mL BSA 的 DMEM,500 r/min 离心 10 min,弃上清,再以含 10% FCS 的 DMEM/F12 液悬浮。以台盼蓝染色法计算细胞成活率,细胞成活率=(活细胞数/总细胞数)×100%,调整细胞浓度为 1×10^5个/mL 接种于 6 孔培养板内,每孔内预置 L-多聚赖氨酸包被的无菌洁净盖玻片,以含 10% FBS 的 DMEM/F12 液为标准培养基,并设空白对照组(未添加 NGF)及 NGF 浓度分别为 12.5、50、100 ng/mL 的 3 个给药组,于 37°C、5% CO_2条件下培养 4 h 后,细胞贴壁,刮取贴壁的细胞备用。

1.3.2 免疫荧光细胞化学分析 细胞培养 4 h 后,用 4%的多聚甲醛固定细胞,0.01 mol/L PBS 液洗 10 min×3 遍,以封闭液(含 1% BSA,0.5% Triton 的 PBS 液,pH 7.4)室温下封闭 30 min,每张细胞爬片加 50 μL 一抗,4℃,湿盒内孵育 24~36 h;将细胞爬片以含 1% BSA 的 PBS 洗涤 3 次,每次 10 min;暗室内分别滴加与一抗相对应的耦联荧光素的二抗,室温避光孵育 30~40 min;PBS 洗涤 3 次,每次 10 min;每片滴加 1∶1000 的 Bb 染核 1 min;而后立即置于倒置荧光显微镜下,每张爬片随机选取 5 个视野摄像,取各视野的平均值作为各组的观测值。TRITC 激发波长 568 nm、发射波长 585 nm;FITC 激发波长 488 nm、发射波长 568 nm;Bb 激发波长 372 nm,发射波长 488 nm。寻找 FITC(或 TRITC)标记的绿色(或红色)的免疫染色阳性的细胞并计数、拍照;视野不变,转换为 372 nm 的激发光,拍摄同视野内被 Bb 染为蓝色的细胞核,同视野下的图片用 ImagePro 做图像重合。

1.3.3 细胞计数 随机计数 5 个视野内的荧光免疫染色阳性的细胞数和总细胞数;计算阳性细胞百分含量,免疫染色阳性的细胞百分率=(免疫染色阳性细胞数/细胞总数)×100%。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,免疫染色阳性的细胞百分比数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析及 q 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 存活的解离细胞数量

苔盼蓝染色计数细胞存活率为(96.2±0.2)%,细胞胞体呈圆形,提示解离的海马区组织块取材、转运过程组织细胞保存良好。

2.2 体外培养 4 h 细胞形态

相差显微镜下观察体外培养 4 h 细胞形态:细胞胞体呈圆形,大小不一,无突起,细胞贴壁良好,折光性强。

2.3 NGF 对神经细胞的影响

在空白对照组及 12.5、50、100 ng/mL 3 个不同浓度的 NGF 给药组中,$GFAP^+$的星形胶质细胞占神经细胞百分率,差异有统计学意义($P<0.01$),而且 $GFAP^+$星形胶质细胞占神经细胞百分比,随着 NGF 浓度的升高而升高。

同样在上述 4 个分组中,$MAP2^+$的神经元占神经细胞百分率差异有统计学意义($P<0.01$),随着 NGF 浓度的升高,$MPA2^+$神经元占神经细胞百分比升高(表 1,图 1)。

表 1 NGF 对 $GFAP^+$星形胶质细胞及 $MAP2^+$神经元比率的影响 ($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	$GFAP^+$星形胶质细胞	$MAP2^+$神经元
空白对照	16	34.1±4.1	13.4±3.6
NGF 12.5 ng/mL	16	37.5±3.8[a]	18.0±2.3[a]
NGF 50 ng/mL	16	42.4±4.8[a,b]	21.6±1.9[a,b]
NGF 100 ng/mL	16	47.1±3.9[a,b,c]	25.5±2.1[a,b,c]
F 值		25.89	56.73
P 值		<0.01	<0.01

a:与对照组比较,$P<0.05$;b:与 NGF 12.5 ng/mL 组比较,$P<0.05$;c:与 NGF 50 ng/mL 组比较,$P<0.05$

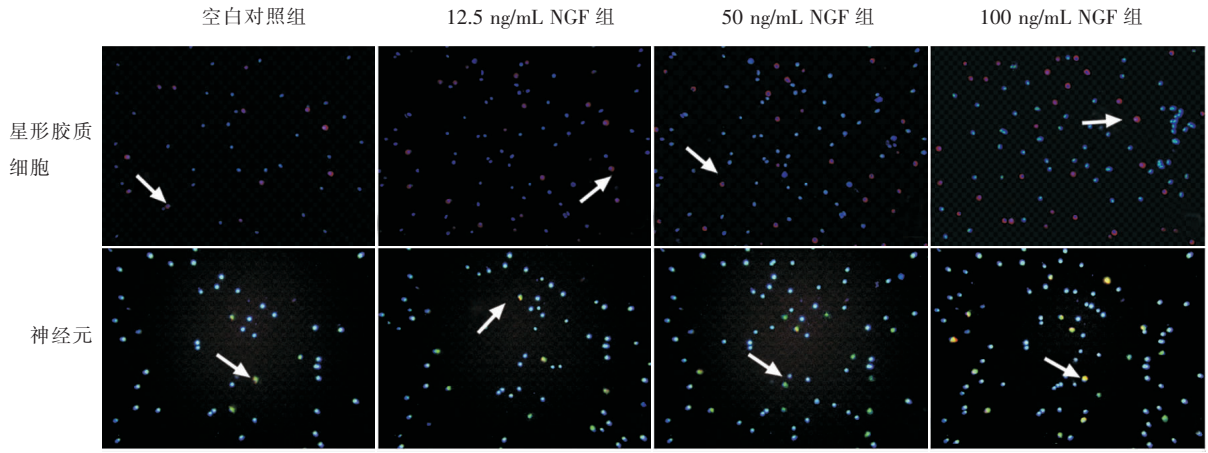

图 1　NGF 对星形胶质细胞和神经元的影响(免疫荧光,×200)　细胞浆红色的为 $GFAP^+$ 星形胶质细胞,绿色的为 $MAP2^+$ 神经元,蓝色为 Bb 染的细胞核,箭头所指为染色阳性细胞。NGF 组细胞存活的比率高于空白对照组,且随着 NGF 浓度的升高而增加。

3　讨论

难治性癫痫也称顽固性癫痫,是指临床经过迁延、对抗癫痫药物治疗反应很差的癫痫,患病率可达 20% ~25%,其中以颞叶癫痫,特别是海马痫性放电所致较为常见[5]。由于海马在学习记忆等认知功能方面起着重要作用,该区神经元长期过度放电必然导致神经细胞损伤、凋亡,从而影响学习记忆[6-8]。

NGF 作为中枢神经系统中重要的多功能的神经营养因子,在 10^{-15} ~ 10^{-9} mol/L 浓度范围内即可发挥有效的神经营养和神经保护效应,可刺激胞体和树突的发育及影响神经纤维支配靶区的密度,在早期神经细胞发育分化起着重要的作用[9-10]。在病理情况下,NGF 具有抗细胞凋亡,减少兴奋性氨基酸对损伤神经元毒性的作用[11-12],可有效延缓由于脑损伤引起的神经元立即死亡,脑损伤后可维持一定数量的神经元存活,在合适的微环境中与神经细胞粘附分子、延伸因子等共同作用下促进神经环路的重建,最终达到生理功能的重建[13]。有研究发现,NGF 可延缓新生大鼠缺氧缺血脑损伤后脑水肿的发生,减轻脑水肿的程度;并增加突触素阳性产物,提示 NGF 具有促进受损神经细胞再生和修复的作用[14-15]。在癫痫的动物模型中,发现与未加 NGF 组相比,NGF 组海马 CA_1 区在各相应时间点病理改变较轻,锥体细胞存活数量也较多,各相应时间点海马 CA_1 凋亡的神经细胞显著减少[16-17]。

在临床上有进行过抗癫痫药物加用 NGF 的研究,发现实验组较对照组除可以有效减少发作频度外,对行为、语言表达能力及生活能力等都具有明显的改善,而且可以减轻癫痫及抗癫痫药物对儿童认知功能不利影响的报道[18],但是关于 NGF 作用于难治性癫痫儿童脑损伤神经细胞的研究,目前尚未见报道。

本研究选取了难治性癫痫儿童损伤海马区脑标本,设立 12.5、50、100 ng/mL 3 个浓度梯度及空白对照组,观察应用 NGF 后对癫痫儿童海马区神经细胞的影响,发现在 NGF 浓度为 12.5 ~100 ng/mL 范围内,培养的海马区神经细胞数随着 NGF 浓度的增加而增加,星形胶质细胞及神经元占神经细胞总数均随着 NGF 浓度的增高而增加,与 NGF 浓度呈正的量效关系,从而提示了 NGF 对癫痫儿童损伤海马区的神经细胞可能起到一定的保护作用。

在癫痫动物模型中,观察到癫痫发作可引起海马区神经元、神经胶质细胞的损伤,而其变性坏死,可能在诱导癫痫的反复发作中起着重要的作用[19]。梁建民等[20]在观察颞叶癫痫大鼠海马区超微结构变化时发现,该区神经元功能下降,突触活性降低;星形胶质细胞出现代谢紊乱和功能异常表现,可引起营养传递功能减低而促进神经元变性坏死[21],也因其调节递质功能降低而诱发癫痫发作。因此,保护海马区受损神经元及神经胶质细胞,维持细胞外微环境的电解质平衡,在抑制癫痫发作方面,可能起到积极的作用。

因此,上述研究提示 NGF 可能对癫痫后损伤的神经元及星形胶质细胞起到一定的保护作用,对维持正常神经网络功能,减轻反复发作对儿童认知功能的损害具有一定的参考价值。

[参 考 文 献]

[1] Thippeswamy T, McKay JS, Quinn J, Morris R. Either nitric oxide or nerve growth factor is required for dorsal root ganglion neurons to survive during embryonic and neonatal development[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2005, 154(2): 153-164.

[2] Ozdinler PH, Ulupinar E, Erzurumlu RS. Dose and age-dependent axonal responses of embryonic trigeminal neurons to localized NGF via p75NTR receptor[J]. J Neurobiol, 2005, 62(2): 189-206.

[3] 吴立文. 难治性癫痫的诊断和治疗[J]. 中华神经科杂志, 2002,35(1):55-57.

[4] 陈燕惠,张燕舞,吕敏. 妊娠 20~24 周人脑脑室管膜下区神经细胞组成[J]. 解剖学杂志,2007,30(5):572-575.

[5] Tassic L, Colombo N, Garbelli R, Francione S, Lo Russo G, Mai R. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome[J]. Brain, 2002, 125(8): 1719-1732.

[6] Takaya S, Hanakawa T, Hashikawa K, Ikeda A, Sawamoto N, Nagamine T, et al. Prefrontal hypofunction in patients with intractable mesial temporal lobe epilepsy[J]. Neurology, 2006, 67(9): 1674-1676.

[7] Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Skórzewska A, Maciejak P, Wallkowiak J, et al. Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test and amino acid concent rations in brain structures[J]. Pharmacol Rep, 2006, 58(1):75-82.

[8] Kotloski R, Lynch M, Lauersdorf S, Sutula T. Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits[J]. Prog Brain Res, 2002, 135: 95-110.

[9] Yu LM, Miller FD, Schoichet MS. The use of immobillized neurotrophins to support neuron survival and guide nerve fiber growth in compartmentalized chambers[J]. Biomaterials, 2010, 31(27): 6987-6999.

[10] Davis-Lopez de Carrizosa MA, Morado-Diaz CJ, Morcuende S, de la Cruz RR, Pastor AM. Nerve growth factor regulates the firing patterns and synaptic composition of motoneurons[J]. J Neurosci, 2010, 30(24): 8308-8319.

[11] 丛树艳,刘冰,柳忠兰. NGF 对癫癎大鼠海马神经细胞 wtp53 表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志,2000,14(4):181-183.

[12] Hasegawa D, Matsuki N, Fujita M, Ono K, Orima H. Kinetics of glutamate and gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid in a canine model of complex partial status epilepticus induced by kainic acid[J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(12):1555-1559.

[13] Pettigrew DB, Li YQ, Kuntz C, Crutcher KA. Global expression of NGF promotes sympathetic axonal growth in CNS white matter but does not alter its parallel orientation[J]. Exp Neurol, 2007, 203(1): 95-109.

[14] 胡勇,邬建荣,孔元原,俞海国,汤云珍. 神经生长因子对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2001,3(2):170-172.

[15] 严超英,周文莉,徐乃军,武辉. 外周应用神经生长因子对新生大鼠缺氧缺血脑损伤的保护作用[J]. 中国新生儿科杂志, 2007,22(2):93-94.

[16] 刘冰,柳忠兰,何桂芹. 神经生长因子对红藻氨酸诱导癫癎发作大鼠海马神经细胞凋亡的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2000,7(1):15-19.

[17] 黄艳,孔庆宪,金淑静, 柳忠兰. 神经生长因子对大鼠癫癎脑损伤的保护作用[J]. 徐州医学院学报,2000, 20(3): 192-196.

[18] 李广宪,易晓燕,吕受卿,张湘玲,祁岩超. 神经生长因子治疗小儿癫癎[J]. 实用儿科临床杂志. 1994,9(9): 94-96.

[19] David Y, Cacheaux LP, Lvens S, Lapilover E, Heinemann U, Kaufer D, et al. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis[J]. J Neurosci, 2009, 29(34): 10588-10599.

[20] 梁建民,崔新明,李秀杰,张淑琴. 颞叶癫癎大鼠海马 CA1 区超微结构[J]. 吉林大学学报(医学版),2005,31(5):720-723.

[21] Du Y, Chen CP, Tseng CY, Eisenberg Y, Firestein BL. Astroglia-mediated effects of uric acid to protect spinal cord neurons from glutamate toxicity[J]. Glia, 2007, 55(5): 463-472.

(本文编辑:王 霞)