

反复高热惊厥大鼠脑内脑源性 神经营养因子表达及神经元凋亡分析

闫秀梅 李光乾

(温州医学院附属育英儿童医院,浙江温州 325027)

[摘要] 目的 研究大鼠反复高热惊厥(FS)后脑源性神经营养因子(BDNF)的改变及神经细胞凋亡情况。**方法** 51只雄性SD大鼠按随机数字法随机分为正常对照组(NC组),高热对照组(HC组)和高热惊厥组(FS组),热水浴法建立FS模型。酶联免疫吸附试验(ELISA)测定海马匀浆中BDNF水平,免疫组化法检测BDNF在脑组织各区的表达,原位末端标记法(TUNEL)检测脑组织细胞凋亡,统计学处理采用SPSS13.0统计学软件处理。**结果** ELISA法测得的FS组海马BDNF水平(89.9 ± 12.5 ng/g)明显高于NC组(54.4 ± 18.9 ng/g)和HC组(64.1 ± 15.0 ng/g) ($P < 0.01$),FS组各脑区BDNF阳性神经元OD值亦明显高于NC组和HC组 ($P < 0.01$);FS组脑组织各区凋亡指数(AI)均明显高于NC组与HC组 ($P < 0.01$),且脑组织各区细胞凋亡程度与BDNF在脑组织各区的表达呈正相关($r = 0.332, P < 0.05$)。**结论** 反复FS后大鼠脑内BDNF表达明显增加,并且与神经细胞的凋亡相关。
[中国当代儿科杂志,2010,12(5):382-385]

[关键词] 高热惊厥;脑源性神经营养因子;凋亡;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)05-0382-04

Expression of brain-derived neurotrophic factor and apoptosis in the brain of rats with repeated febrile seizures

YAN Xiu-Mei, LI Guang-Qian. Department of Neurology, Yuying Children's Hospital Affiliated to Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325027, China (Li G-Q, Email: cnuzliao@sina.com)

Abstract: Objective To study the changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) following repeated febrile seizures in rats and its possible correlation with neurocyte apoptosis. **Methods** Fifty-one male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to three groups: normal control ($n = 14$), febrile seizure (FS, $n = 18$), hyperthermia alone ($n = 19$). Febrile seizures were induced by hot water bath. The level of BDNF in the hippocampal homogenate was measured using ELISA and the expression of BDNF in various brain regions was measured by immunohistochemistry. The neurocyte apoptosis of the brain was determined by TdT-mediated biotinylated-dUTP nick end labelling (TUNEL). **Results** The level of BDNF in the hippocampus in the FS group (89.9 ± 12.5 ng/g) was higher than that in the normal control group (54.4 ± 18.9 ng/g) and in the hyperthermia alone group (64.1 ± 15.0 ng/g) ($P < 0.01$). The OD value of BDNF positive neurons in various brain regions of the FS group was significantly higher than that of the normal control group ($P < 0.01$) and the hyperthermia alone group ($P < 0.01$). The FS group had significantly higher apoptotic index in various brain regions than the normal control and the hyperthermia alone groups ($P < 0.01$). There was a positive correlation between the expression of BDNF and the apoptotic index in various brain regions ($r = 0.332, P < 0.05$). **Conclusions** BDNF expression in the brain increases following repeated febrile seizures in rats, and the increased BDNF expression is correlated with neurocyte apoptosis.
[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (5):382-385]

Key words: Febrile seizure; Brain-derived neurotrophic factor; Apoptosis; Rats

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是神经营养因子(neurotrophic factor, NTF)家族成员,广泛存在于脑组织。研究发现,BDNF不仅对脑细胞的生长、发育、分化、成活和成熟起着至关重要的作用^[1],且在惊厥性脑损伤中

通过抗凋亡作用起到内源性的保护作用^[2]。但BDNF在高热惊厥(febrile seizure, FS)中研究报道少见。本研究拟通过热水浴建立大鼠FS模型,利用酶联免疫吸附试验(ELISA)与免疫组化法检测大鼠脑内BDNF表达、TUNEL染色观察神经元凋亡,旨在

[收稿日期]2009-09-11; [修回日期]2009-12-02

[基金项目]温州市科技局科技发展计划项目(Y2004A012)。

[作者简介]闫秀梅,女,硕士,住院医师。

[通信作者]李光乾,教授。

了解反复 FS 后 BDNF 的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型建立

清洁级 21 日龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (上海斯莱克实验动物有限责任公司提供) 51 只, 体重 50 ~ 65 g。按随机数字法分为正常对照组 (NC 组, $n = 14$ 只)、高热对照组 (HC 组, $n = 19$ 只) 和高热惊厥组 (FS 组, $n = 18$ 只)。将 FS 组大鼠放置在 $(45 \pm 0.3)^\circ\text{C}$ 热水浴水槽 (30 cm \times 30 cm \times 50 cm) 内, 水深以大鼠沿水槽壁站立时仅露出头部为准。大鼠在热水中浸浴直至诱发出惊厥, 惊厥发生后, 立刻转移至观察台上, 即刻测量肛温, 同时记录大鼠惊厥潜伏期、惊厥持续时间及惊厥级别; 每天诱发惊厥 2 次, 共 10 次。大鼠惊厥程度分级按照文献 [3], 即 0 级: 无惊厥; I 级: 面部抽动; II 级: 点头; III 级: 前肢阵挛抽搐; IV 级: 全身强直; V 级: 全身强直阵挛。HC 组建立采用 $(45 \pm 0.3)^\circ\text{C}$ 温水定时 (3 min) 浸浴法, 2 次/d, 共 10 次, 出现惊厥者予剔除 HC 组; 记录大鼠出水时的肛温。NC 组不作任何处理。

1.2 标本制备及检测

1.2.1 标本制备 (1) 免疫组化脑标本的制备: 各组大鼠在 FS 组末次惊厥后 24 h 予 10% 水合氯醛 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉后, 在无菌条件下断头, 放入冰块内, 每组随机取 10 只, 剪开头皮, 剥去头顶骨, 用高温消毒的手术器械将整个脑组织拿出, 在冰盘上用滤纸吸去血液, 沿大脑矢状缝垂直切取左侧脑组织置 4% 多聚甲醛固定液 4 $^\circ\text{C}$ 过夜后, 转移至 75% 乙醇中待做常规石蜡包埋; 从视交叉处开始连续冠状切片。(2) 海马匀浆制备: 钝性分离右侧脑海马后, 立即冻存管中, -196°C 液氮保存, 然后转移至 -80°C 冰箱。待检测时做匀浆: 取每组 6 只海马按 1:10 (W/V) 加入 NS, 用玻璃匀浆器制成匀浆 4 $^\circ\text{C}$ 3 000 rpm 离心 20 min, 仔细收集上清液, 分装后保存在 -80°C 超低温冰箱中待测。

1.2.2 ELISA 测定海马匀浆中 BDNF 水平

BDNF ELISA 试剂盒由美国 Chemicon 公司提供。操作步骤: 提前 20 min 从冰箱内取出试剂盒, 以平衡到室温。用双蒸水稀释浓缩洗涤液。溶解标准品, 并按需要稀释。海马匀浆稀释 20 倍。从密封袋中取出板条, 除 (TA) 孔和空白孔外, 加样本和标准品 100 μL /孔。敲打边缘混匀后封板, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜。用抗体稀释液稀释生物素化 BDNF 单克隆抗体。洗板 4 次, 除 TA 孔和空白孔外, 加生物素化 BDNF 单克

隆抗体工作液 100 μL /孔, 敲打边缘混匀后封板, 水平微量振荡器上室温 3 h。洗板 4 次, 除 TA 孔和空白孔外, 加辣根过氧化物酶-酶联交合物工作液 100 μL /孔, 敲打边缘混匀后封板, 水平微量振荡器上室温 1 h。洗板 4 次, 加 100 μL 四甲基联苯胺至各孔, 避光, 室温 15 min, 向各孔加 100 μL 终止液混匀后即刻用酶标仪测量 OD450 值, 得到相应的浓度 \times 20 即为标本的浓度值。

1.2.3 BDNF 免疫组化检测 按常规 SP 法进行, 切片脱腊至水; 以 3% H_2O_2 室温封闭内源性过氧化物酶; 高压修复; 滴加抗 BDNF 抗体 (美国 Chemicon 公司) 浓度为 1:2 000, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜; 滴加二抗; DAB 显色。正常山羊血清代替一抗作阴性对照。每张切片分别在海马齿状回 (dentate gyrus, DG)、CA3 区、CA1 区及颞叶皮层 (cortex of temporal lobe, CTL) 随机观察 5 个不连续视野 ($\times 400$), 使用 Olympus 自动图像采集系统进行图像采集, 用 Image pro plus 5.01 版本的专业图像分析软件进行图像分析取其光密度 (optical density, OD) 值。

1.2.4 原位末端标记法 (TUNEL) 检测细胞凋亡

按试剂盒说明书进行操作, 试剂盒由 Roche 公司提供。主要过程包括: H_2O_2 室温孵育; 蛋白酶 K 消化; 末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 反应液 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 90 min; 二氨基联苯胺 (DAB) 显色。实验设立不加 TdT 的阴性对照。以胞核出现棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片各选阳性细胞最集中的 5 个高倍视野 ($\times 400$), 每个高倍视野阳性细胞数除以每个视野的所有细胞数, 取其平均数计算出凋亡指数 (AI)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件处理, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组样本均数比较采用 t 检验; 多组样本均数比较采用单因素方差分析, 均数的两两比较采用 LSD。两变量的相关分析采用直线相关分析。

2 实验结果

2.1 热水浴诱导大鼠惊厥模型

在实验中 FS 组共有 4 只死亡: 第 3 次、第 6 次惊厥发作各死亡 1 只, 第 8 次惊厥发作死亡 2 只; HC 组有 4 只出现惊厥发作: 2 只发生在第 1 次水浴, 第 4 次、第 7 次水浴各惊厥 1 只; NC 组无 1 只发生意外。最后 FS 组剩余 14 只, HC 组剩余 15 只, NC 组 14 只。FS 组诱发不同程度的惊厥共 140 次, 其中 II 级 4 次 (2.9%), III 级 47 次 (33.6%), IV 级 45 次 (32.2%), V 级 44 次 (31.4%)。平均惊厥潜

伏期为 190.9 ± 38.2 s; 平均惊厥持续时间为 96.8 ± 39.1 s; 惊厥时平均肛温为 $(42.3 \pm 0.7)^\circ\text{C}$ 。大鼠死亡率为 22% (4/18)。HC 组发生惊厥的几率为 21% (4/19), 其出水时的平均肛温为 $(42.3 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 与 FS 组大鼠惊厥时的肛温相比差异无统计学意义 ($t=0.432, P>0.05$)。

2.2 ELISA 检测海马 BDNF 水平的结果

3 组大鼠组间比较海马 BDNF 水平差异有统计学意义 ($F=9.628, P<0.05$)。其中 FS 组 (89.9 ± 12.5 ng/g) 明显高于 NC 组 (54.4 ± 18.9 ng/g) 和 HC 组 (64.1 ± 15.0 ng/g) (均 $P<0.01$), HC 组与 NC 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 BDNF 免疫组化结果

BDNF 主要表达于神经元的突起和胞浆边缘。NC 组大鼠海马 DG 区、CA3、CA1 区及 CTL 仅少量

细胞有 BDNF 阳性表达; FS 组各脑区 BDNF 阳性神经元明显增多, BDNF 阳性神经元 OD 值亦明显高于 NC 组和 HC 组 ($P<0.01$), 且 DG 区、CA3 区 OD 值明显高于 CA1 区和 CTL, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$)。而 HC 组与 NC 组 BDNF 阳性神经元 OD 值经比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 各组大鼠脑组织各区 BDNF 阳性细胞 OD 值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	DG	CA3	CA1	CTL
NC 组	10	0.25 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.02
HC 组	10	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.01
FS 组	10	$0.35 \pm 0.02^{a,b}$	$0.34 \pm 0.02^{a,b}$	$0.31 \pm 0.01^{a,b}$	$0.31 \pm 0.02^{a,b}$
F 值		76.13	287.12	162.79	174.23
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与 NC 组比较, $P<0.01$; b: 与 HC 组比较, $P<0.01$ 。

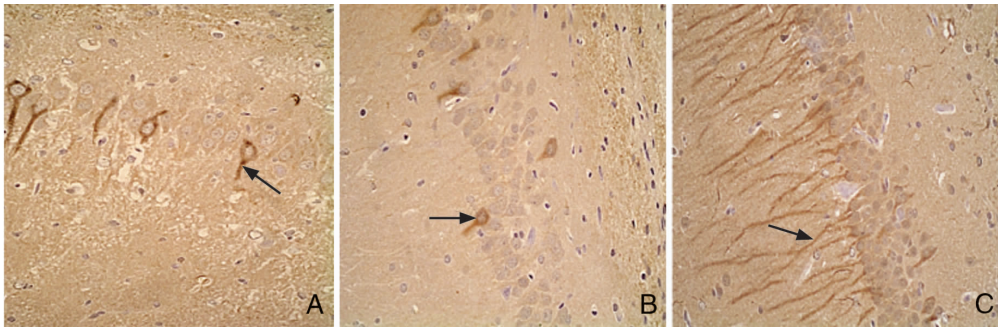


图 1 3 组大鼠海马 CA1 区 BDNF 表达 (免疫组化, DAB $\times 200$) A: NC 组; B: HC 组; C: FS 组。NC 组与 HC 组少量细胞有 BDNF 表达, 而 FS 组 BDNF 阳性神经元明显增多。

2.4 TUNEL 检测结果

NC 组与 HC 组仅见 1 至数个阳性细胞出现, 而 FS 组海马 DG 区、CA3、CA1 区与 CTL 均出现大量的凋亡阳性细胞, 各区 AI 从高到低依次为 DG 区、CA3 区、CA1 区、CTL, 经比较差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。FS 组各区 AI 均明显高于 NC 组与 HC 组 ($P<0.01$), 但 HC 组与 NC 组各区 AI 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2, 图 2。

表 2 各组大鼠脑组织各区 AI 的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	鼠数	DG	CA3	CA1	CTL
NC 组	10	7.9 ± 0.8	7.7 ± 1.0	7.6 ± 0.5	7.7 ± 0.6
HC 组	10	8.9 ± 1.9	7.7 ± 0.9	7.9 ± 0.9	8.0 ± 1.2
FS 组	10	$32.6 \pm 2.1^{a,b}$	$29.0 \pm 1.2^{a,b}$	$24.3 \pm 0.9^{a,b}$	$22.2 \pm 1.1^{a,b}$
F 值		387.24	703.17	731.31	341.00
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与 NC 组比较, $P<0.01$; b: 与 HC 组比较, $P<0.01$ 。

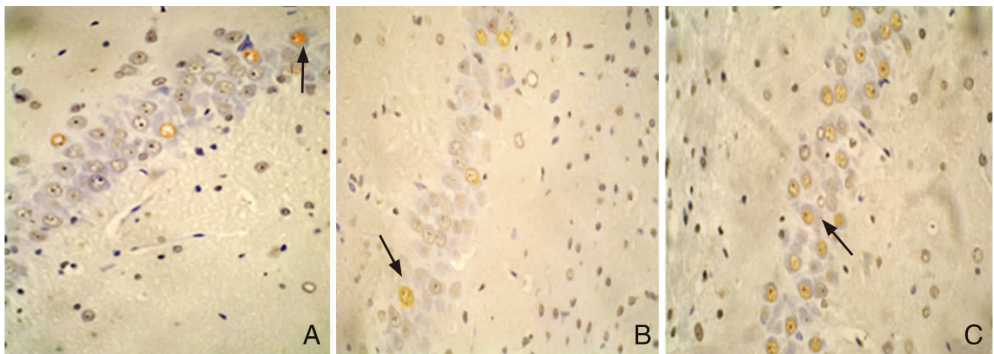


图 2 3 组大鼠海马 CA1 区 TUNEL 染色 (DAB, $\times 200$) A: NC 组; B: HC 组; C: FS 组。NC 组与 HC 组仅见 1 至数个阳性细胞出现, 而 FS 组海马 CA1 区出现大量的凋亡阳性细胞。

2.5 BDNF 的表达与细胞凋亡的关系

BDNF 在脑组织各区的表达特点与 TUNEL 标记的脑组织各区细胞凋亡程度相一致,呈正相关关系($r=0.332, P<0.05$)。

3 讨论

近年来的研究发现 FS 可造成脑损伤,并且可能发展为颞叶癫痫和海马硬化。本课题组既往的动物实验研究也证实了 FS 可以导致脑损伤^[4]。本研究 TUNEL 染色结果表明,FS 组海马各区和 CTL 均出现大量的凋亡阳性细胞,进一步证明反复 FS 发作可导致脑神经细胞凋亡。

FS 频繁发作后,在神经元发生凋亡和坏死的同时机体必然会启动一系列内源性的保护机制。目前已经发现了一些生物因子参与了惊厥性脑损伤的防御作用,如抗氧化防御系统中的超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、金属离子转运结合蛋白等^[5-6]。最近研究证实,一些 NTF 可以通过抑制凋亡起到保护作用。NTF 家族成员之一的 BDNF 主要分布在与惊厥敏感性密切相关的海马、杏仁核和皮质。在神经元内 BDNF 主要定位于胞体和轴突^[7]。因此有研究认为 BDNF 是在惊厥性脑损伤中起内源性保护作用的主要成份,并得到许多研究的证实^[8-9]。Hagihara 等^[10]用匹罗卡品诱发大鼠癫痫发作 4 h 后即出现海马 BDNF mRNA 的高表达,且其高表达有促进新生神经细胞增殖的作用。王虔等^[11]采用体外培养大鼠皮质神经元并建立低剂量短时程谷氨酸损伤模型,以重组腺病毒分别于损伤前、后转导外源性 BDNF;用 Western blot 检测 BDNF 和 Bcl-2 的表达情况;用 TUNEL 法检测神经元凋亡的情况,结果发现重组腺病毒于损伤前、后转导 BDNF 可分别使 BDNF 的表达量上升,Bcl-2 的表达量上升,而细胞凋亡率下降,提示腺病毒转导的外源性 BDNF 可保护谷氨酸损伤神经元免于凋亡,诱导 Bcl-2 表达增高。上述研究结果表明 BDNF 对惊厥脑损伤具有保护作用。但有关 BDNF 在 FS 方面的研究,目前国内外尚少见报道。本研究发现,FS 组大鼠血清和海马的 BDNF 水平明显增高,与 Kim 等^[12]的研究结果相仿;免疫组化定位发现,FS 发作后,BDNF 以 DG 区和 CA3 区为最多,与脑组织各区细胞 AI 从高到低依次为 DG 区、CA3 区、CA1 区、颞叶皮层呈正相关。因此,推测由于 DG 区和 CA3 区在海马结构中损伤最严重,所以启动大量的内源性 BDNF 来对抗这种损伤,BDNF 的升高可能是脑损伤启动的内源性保护机制的结果。有关 BDNF 对惊厥脑损伤的保护作用机制目前有人推测可能为:通过调节凋亡前蛋白

(Bax) 及抗凋亡蛋白 (Bcl-2) 的表达抑制细胞凋亡^[13];对抗兴奋性氨基酸毒性损伤^[14];惊厥发生后,脑组织 BDNF 高表达可能导致核因子 κ B 活化^[15],而后者在脑损伤后神经元存活信号传导中起关键作用,该推测有待进一步研究证实。

[参 考 文 献]

- [1] Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, Inukai T, Horiuchi Y, Yayama T, et al. Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene [J]. *Neurotrauma*, 2007, 24(4):703-712.
- [2] Murashima YL, Suzuki J, Yoshii M. Developmental program of epileptogenesis in the brain of EL mice [J]. *Epilepsia*, 2005, 46(5):10-16.
- [3] 周骞平,王帆,李瑞林,黄绍平,郭亚乐. 热性惊厥大鼠海马区 c-Fos 蛋白表达及苔藓纤维发芽特征 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2006, 21(2):101-103.
- [4] 郑飞霞,李光乾. 反复热性惊厥大鼠体内皮质醇水平变化 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2006, 21(18):1250-1253.
- [5] Tejada S, Roca C, Sureda A, Rial RV, Gamundi A, Esteban S. Antioxidant response analysis in the brain after pilocarpine treatments [J]. *Brain Res Bull*, 2006, 6(9):587-592.
- [6] Kawakami Y, Monobe M, Kuwabara K, Fujita T, Maeda M, Fujino O, et al. A comparative study of nitric oxide, glutathione, and glutathione peroxidase activities in cerebrospinal fluid from children with convulsive diseases/children with aseptic meningitis [J]. *Brain Dev*, 2006, 2(8):243-246.
- [7] Tongiorgi E, Domenici L, Simonato M. What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development [J]. *Mol Neurobiol*, 2006, 33(1):17-32.
- [8] Shetty AK, Zaman V, Shetty GA. Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting [J]. *Neurochem*, 2003, 87(1):147-159.
- [9] Hattiangady B, Rao MS, Zaman V, Shetty AK. Incorporation of embryonic CA3 cell grafts into the adult hippocampus at 4-months after injury: effects of combined neurotrophic supplementation and caspase inhibition [J]. *Neuroscience*, 2006, 139(4):1369-1383.
- [10] Hagihara H, Hara M, Tsunekawa K, Nakagawa Y, Sawada M, Nakano K. Tonic-clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine treated mice [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 139(2):258-263.
- [11] 王虔,程焱,吴伟,梁浩,张瑞珠. 脑源性神经营养因子对谷氨酸损伤神经元保护作用的研究 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2006, 8(1):57-60.
- [12] Kim YH, Rhyu IJ, Park KW, Eun BL, Kim YI, Rha HK, et al. The induction of BDNF and c-fos mRNA in the hippocampal formation after febrile seizures [J]. *Neuroreport*, 2001, 12(15):3243-3246.
- [13] Wang CX, Song JH, Song DK, Yong VW, Shuaib A, Hao C. Cyclin-dependent kinase-5 prevents neuronal apoptosis through ERK-mediated upregulation of Bcl-2 [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(7):1203-1212.
- [14] Rose CR, Blum R, Kafitz KW, Kovalchuk Y, Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels [J]. *Bioessays*, 2004, 26(11):1185-1194.
- [15] D'Intino G, Vaccari F, Siviglia S, Scagliarini A, Gandini G, Giardino L, et al. A molecular study of hippocampus in dogs with convulsion during canine distemper virus encephalitis [J]. *Brain Res*, 2006, 1098(1):186-195.

(本文编辑:黄 榕)