文章编号:1000-5404(2007)02-0125-04

论著

慢性颞叶癫痫模型鼠海马结构形态学的变化

李国强,刘仕勇,周 政,陈军花 (第三军医大学新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 在建立红藻氨酸(KA)慢性颞叶癫痫动物模型的基础上,观察其发展过程中海马结构形态学的变化,探讨该模型的病理机制和致痫机制。**方法** 应用立体定向技术,侧脑室内微量注射KA于SD大鼠制作慢性颞叶癫痫动物模型,通过动态监测该模型的行为学进行分期,在不同时期取海马结构的标本,行HE染色、Timm's染色、TUNEL染色和NSE标记,观察模型发展各阶段海马结构形态学的改变。**结果** 该模型组织学改变为神经元的减少和胶质细胞的增生;细胞计数可见海马结构神经元死亡主要发生于急性期,以海马CA3、CA4区最为显著,海马其他各区较轻,齿状回无明显神经元缺失;TUNEL染色显示海马结构的细胞死亡存在凋亡机制;Timm's染色显示从静止期开始出现MF发芽并进行性增加;NSE和BrdU双标发现齿状回区新生的神经元明显增加。**结论** 红藻氨酸所至慢性颞叶癫痫模型鼠海马结构形态学的变化主要是海马CA3、CA4区的神经元丢失、胶质细胞的增生及凋亡细胞增多,齿状回区新生神经元的增加和苔藓状纤维的发芽。

关键词: 颞叶;红藻氨酸;苔藓状纤维发芽
中图法分类号: R-332;R338.26;R749.17 **文献标识码:** A

Morphologic changes of hippocampal formation in rat of kainate-induced temporal lobe epilepsy

LI Guo-qiang, LIU Shi-yong, ZHOU Zheng, CHEN Jun-hua (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the pathologic changes of hippocampus during the model development and explore the mechanism of epileptogenesis by observing the morphologic changes of hippocampal formation in rat of kainate-induced chronic temporal lobe epilepsy (TLE). **Methods** Thirty Wistar rats were injected of Kainic acid at dose of 2 μg/20 μl into the lateral cerebral ventricle under the guidence of stereotactic technique to make a epileptic focus, and subgrouped under acute phase, silent period and chronic phase. Another 10 rats received normal saline as controls. The rats were killed at 1 day, 15 day and 6 months after epileptic model establishment, and the hippocampus was taken out for HE staining, TUNEL staining, Timm's staining, NSE staining. **Results** By cell counting, the neuron loss mainly occurred in acute phase, worst in CA3 and CA4, moderate in CA1 and CA2, and no loss in the dentate gyrus. The cell apoptosis in hippocampal structure was detected by TUNEL staining. Timm's staining showed that mossy fiber began sprouting in silent period and increased continuously. **Conclusion** The morphologic changes of hippocampal formation in rat of kainate-induced TLE is mainly the neuron loss and the glia hyperplasy.

Key words: temporal lobe; kainic acid; mossy fiber sprouting

癫痫是神经系统常见的慢性疾病,世界人口总的患病率为(24~53)/10万,我国的患病率为(25~35)/10万,其中大部分患者可以通过服用抗癫痫药物得到控制。但是有1/4以上的患者药物治疗不能有效控制其发作,称为难治性癫痫(intractable epilepsy)[1],其中约70%的患者为颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy, TLE)[2],其发病机制和致痫机制是现代研究的热点。

本研究从动物实验着手,在红藻氨酸致慢性颞叶癫痫鼠的基础上,通过观察癫痫发展过程中海马结构

基金项目:第三军医大学科研基金(2003),重庆市科委基金项目(2003C054)
Supported by the Research Funds of Third Military Medical University (2003) and the Sci & Tech Research Project of Chongqing Scientific Committee(2003 C054)
作者简介:李国强(1976-),男,河南省扶沟县人,硕士,主治医师,讲师。电话:(023) 65200215
通讯作者:刘仕勇,电话:(023)68774610
收稿日期:2005-07-04;修回日期:2005-12-10

形态学变化，初步探讨颞叶癫痫的致痫机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

成年清洁级健康 SD 大鼠 40 只（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），体质量 230～270 g，雌雄各半，在保持性别比例对等的前提下按随机数字表随机分为模型组（30 只）和对照组（10 只），模型组侧脑室内注射2 μg/20 μl KA 溶液 15～25 μl，对照组注射相同剂量的生理盐水。按照行为学分期模型组再分为 3 组：急性期组、静止期组和慢性期组。

1.2 慢性颞叶癫痫动物模型的制备及取材

采用侧脑室内微量注射红藻氨酸法制作慢性颞叶癫痫动物模型，具体见参考文献[3]。对照组侧脑室内注射相同体积的生理盐水。

取 1 d、15 d 和 6 个月模型大鼠海马，经常规固定脱水以及石蜡包埋后，按吻尾侧法连续常规石蜡切片，片厚 5 μm 及 20 μm两种。常规脱蜡脱水。

1.3 NSE 免疫单标

随即挑选 5 张不同位置的片子（片厚 5 μm）应用 S-P 9001 抗兔试剂盒进行 NSE 免疫单标染色（严格按试剂盒说明进行），光镜下，分别计数双侧 CA3 和 CA4 及齿状回神经元细胞数。对照组大鼠取相同部位的片子。

1.4 细胞凋亡的测定

取片厚 5 μm 的大鼠海马切片，应用 Rose 公司的 TUNEL 试剂盒进行测定，严格按试剂盒说明进行。

1.5 Timm's 染色

取片厚 20 μm 的大鼠海马切片。染色前，在暗室内将 0.5 ml 的 17% 硝酸银溶液加入配制好的 Timm's 混合液中，充分混匀，倒入已经放好脑切片的染缸中，染色 40～60 min。自来水冲洗 10 min 以上，吹干、脱水、透明、封固。

1.6 Nestin 荧光单标

取片厚 5 μm 的大鼠海马切片，常规脱蜡脱水。按 SABC-Cy3 法免疫荧光[4]单标 Nestin。

1.7 BrdU 和 NSE 的荧光双标

给予成功建立的实验模型按 50 mg/kg 腹腔注射 50 mg/4 ml BrdU 溶液，2 次/d，间隔 12 h，连续注射 7 d。取第 8 天的实验模型鼠的海马，固定脱水后常规石蜡切片，片厚 5 μm。常规脱蜡脱水。按免疫组化双标的方法进行 BrdU 和 NSE 的双标检测（严格按试剂盒说明进行），50% 甘油封片，立即荧光显微镜显色照相。每只大鼠海马的连续切片中，随即挑选 5 张不同位置的片子进行细胞计数（进行对照比较的每组大鼠所取片子的部位相同）；应用图像分析软件 MIG2000 综合图像分析系统进行半定量分析，对齿状回区 BrdU 阳性的细胞进行计数。所有照片均在同一放大倍数（×200）、同一荧光强度下分析。

1.8 统计学处理

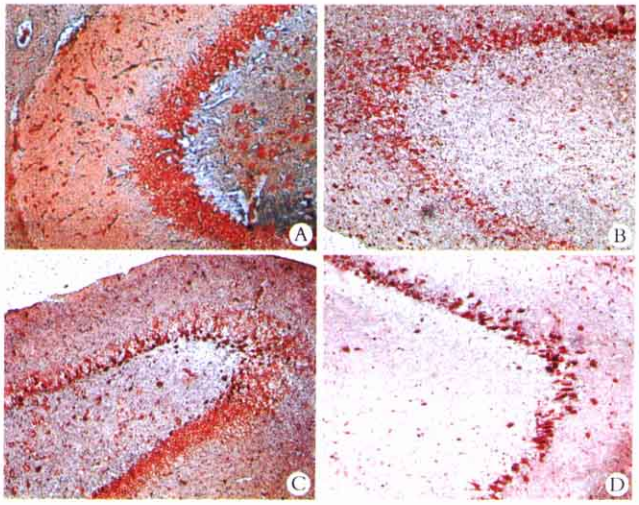
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件包进行统计分析。细胞计数：组内模型组和对照数据进行配对 t 检验，组间数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 NSE 标记神经元

模型鼠急性期 CA3、CA4 区神经元数量开始减少，静止期进一步减少，CA3 区神经元数目从（29.30 ± 1.93）逐渐减少到（19.77 ± 1.57），CA4 区的神经元数目从（26.95 ± 1.36）逐渐减少到（15.10 ± 1.16），其中慢性期减少的最明显，齿状回神经细胞数量无明显变化（图 1）。具体细胞计数见表 1～3。

对照组大鼠各区各期的神经元数目无明显变化。



A：正常对照；B：静止期；C：急性期；D：慢性期

图 1 大鼠 CA3 区 NSE 标记 （S-P×200）

表 1 齿状回区 NSE 标记每 4 mm² 神经元计数（n=30，$\bar{x} \pm s$）

分期	模型组	对照组	P
急性期	80.03 ± 2.16	80.27 ± 1.84	>0.05
静止期	80.37 ± 1.90	80.20 ± 2.19	>0.05
慢性期	79.57 ± 1.78	79.47 ± 1.98	>0.05

表 2 海马 CA3 区 NSE 标记每 4 mm² 神经元计数（n=30，$\bar{x} \pm s$）

分期	模型组	对照组	P
急性期	29.30 ± 1.93	35.87 ± 1.46	<0.05
静止期	24.90 ± 1.24	35.00 ± 1.39	<0.05
慢性期	19.77 ± 1.57	35.27 ± 1.74	<0.05

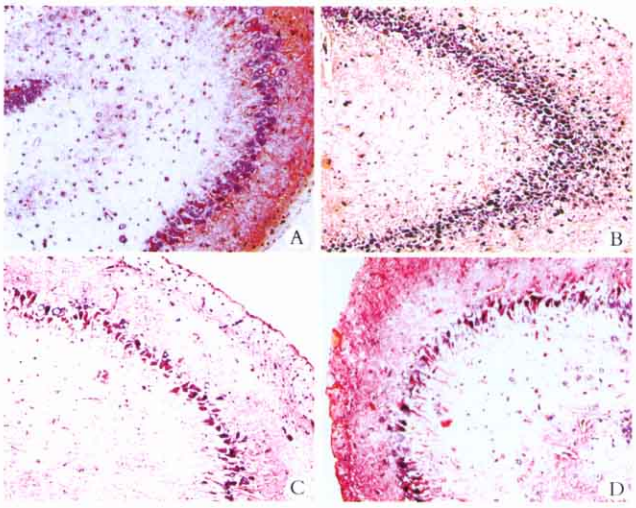
表 3 海马 CA4 区 NSE 标记每 4 mm² 神经元计数（n=30，$\bar{x} \pm s$）

分期	模型组	对照组	P
急性期	26.95 ± 1.36	30.14 ± 1.56	<0.05
静止期	19.97 ± 1.45	30.03 ± 1.67	<0.05
慢性期	15.10 ± 1.16	30.17 ± 1.42	<0.05

2.2 细胞凋亡的测定结果

对照组在各个时期海马结构内都存在少数细胞的凋亡，但是数量很少，模型鼠齿状回和海马 CA1、CA2 各个时期与对照组相比细胞的凋亡无明显的差异，但是海马 CA3 和 CA4 区与对照组相比急性期开始出现细胞凋亡的增多，静止期凋亡细胞

数目进一步增加，慢性期最多（图 2）。

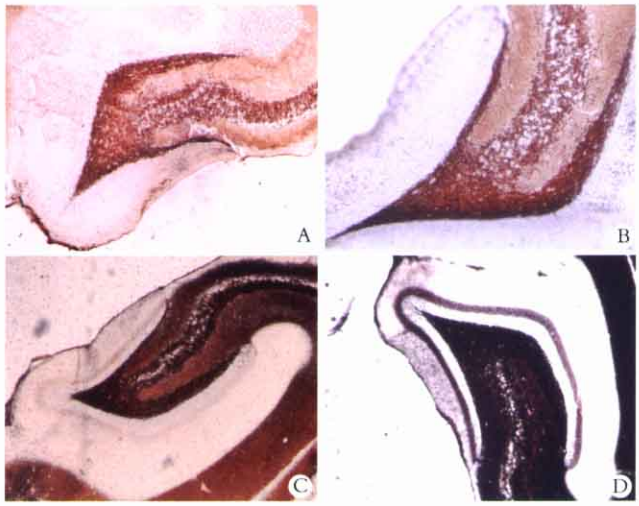


A：正常对照；B：静止期；C：急性期；D：慢性期

图 2　大鼠 CA3 区细胞凋亡情况　（TUNEL ×200）

2.3　Timm's 染色

Timm's 染色可见齿状回颗粒细胞轴突即 MF 发出侧棘后，进入分子层，在此分支形成密集的网络，光镜下呈致密的带状，同时也有一些侧棘穿过多形层，进入门区，在此分枝形成密集的网络。急性期：模型组和对照组均未见明显的齿状回颗粒细胞的发芽。静止期：模型鼠齿状回的浅颗粒层和内分子层开始出现 MF 发芽，并逐渐增加，在外分子层形成密度较小的淡染的色带，门区 MF 发芽也逐渐增加，染色密度逐渐加深，对照组无明显的 MF 发芽。慢性期：模型鼠齿状回颗粒细胞 MF 发芽进行性增加，齿状回外分子层和门区色带加深（图 3）。



A：正常对照；B：静止期；C：急性期；D：慢性期

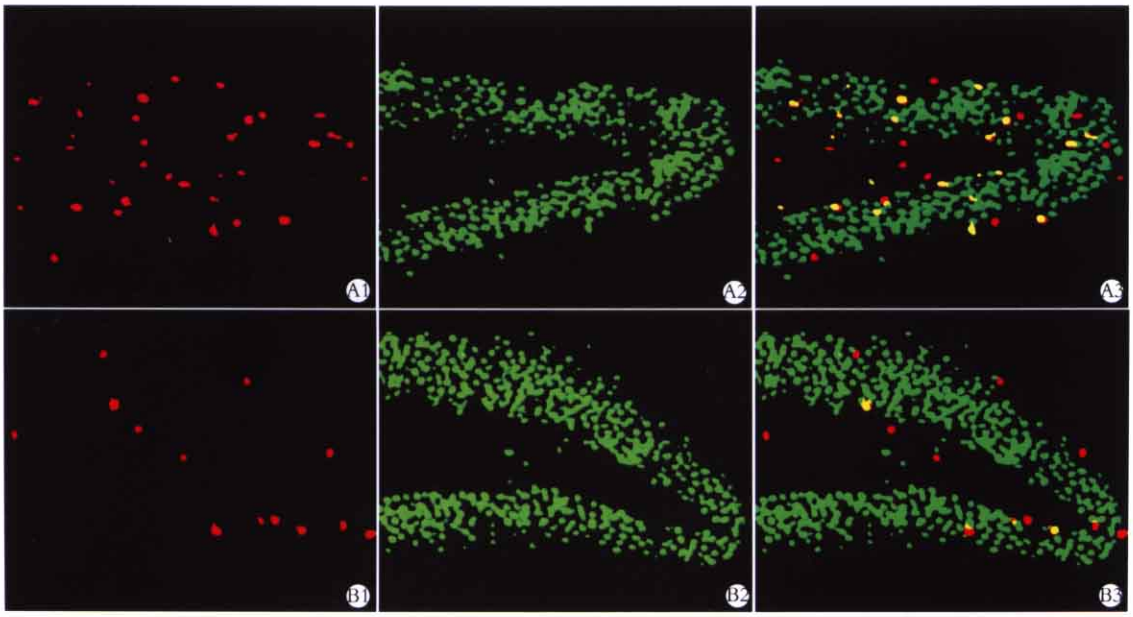
图 3　大鼠海马结构 MF 发芽情况　（Timm's 染色 ×400）

2.4　Nestin 荧光单标

对照组始终只在齿状回区存在少量的 Nestin 阳性细胞。模型鼠急性期：在齿状回区发现有少量的 Nestin 阳性细胞，其他的海马结构区未见明显的阳性细胞，与对照组相比差别不大；模型鼠静止期：发现 Nestin 阳性细胞明显增多，并且分布与整个海马结构；模型鼠慢性期：仍然存在少量的 Nestin 阳性细胞，但是数量较静止期明显减少，也是存在于整个海马结构中（图 4）。

2.5　BrdU 和 NSE 的荧光双标

在显微镜下目测对照组和模型组大鼠 NSE 阳性细胞数无明显差异，BrdU 阳性细胞数存在明显的差异，并有显著的统计学差异（$P<0.01$），双标显示的阳性细胞明显少于 BrdU 的阳性数目，两组比较，模型组双标阳性的细胞数明显增多（图 4）。



A：模型组，B：对照组；1：BrdU 标记；2：NSE 标记；3：BrdU 和 NSE 双标记

图 4　大鼠齿状回 BrdU 和 NSE 的荧光双标　（×200）

3 讨论

3.1 海马部位神经元的变化

在不同的癫痫模型动物的海马结构的研究中可以有不同的结果，有学者发现在海马，KA 的结合位点主要位于齿状回和 CA3/CA2 区[5]。本实验结果显示在侧脑室内注射微量的红藻氨酸所致的慢性颞叶癫痫模型大鼠的海马结构内 CA3、CA4 区的神经元丢失的较多，其中以 CA3 区最明显，从对照组的(35.87 ± 1.456)到慢性期的(15.10 ± 1.155)，细胞数目丢失了一半左右，这种结果和多年来大多数学者的结论相同，都说明在癫痫模型的海马结构中以 CA3 区的损害最为严重，损害出现的时间也最早，本实验显示在海马结构的 CA4 区也存在较重的损害，考虑到本实验的用药途径，可能因为 CA4 区距离侧脑室较近。

3.2 苔藓纤维发芽和海马结构的形态学改变

本实验应用 Timm's 染色来观察海马结构苔藓纤维的发芽情况，进一步观察海马结构的形态学改变。本实验利用该方法发现在侧脑室微量注射红藻氨酸所致的慢性颞叶癫痫模型大鼠苔藓纤维的发芽主要发生于齿状回颗粒细胞的突触，在内分子层内形成一条明显的色带，并且随着时间的推移，该色带颜色逐渐加重，同时海马结构的门区也存在发芽的苔藓纤维。电镜证实光镜下见到的 Timm's 颗粒位于超微结构突触末端[6]，这些形态学的改变说明在这些部位存在新形成的突触结构，Okzaki 等[7]采用 biocytin 标记发芽的苔藓纤维，在电镜下显示部分发芽的苔藓纤维与齿状回颗粒细胞的树突形成了直接的兴奋性突触联系。我们推测正是这些异常形成的突触的存在，导致了海马结构内细胞间联系的改变，从而为癫痫发作前大量细胞同步放电形成了结构基础。

3.3 新生细胞的变化、组成及来源

Timm's 染色在模型鼠的海马结构内发现了发芽的苔藓纤维，目前对它的来源有两种说法，有学者认为它来自于原来已经存在的颗粒细胞[8]，但是大部分学者认为其来源于新生的颗粒细胞[9]。本实验应用 BrdU 的免疫荧光技术证实了在模型鼠的海马结构齿状回颗粒细胞下层三期中一直有新生细胞的存在，同样在对照组大鼠也存在相同的情况，不同的是在模型鼠内新生的神经细胞数量明显增多，突触结构的异常。为了区别这些新生细胞的成分，本实验应用 BrdU 和 NSE 的免疫荧光双标技术，发现新生的细胞中有一部分为神经元，他们分布于齿状回的整个颗粒细胞层的区域，这与对照组大鼠有显著的区别，对照组大鼠的新生神经元一般只位于颗粒细胞下层的位置，并且数量很少。这些新生的神经元在分布上存在异常，我们推测这些分布异常地新生神经元可能影响了原有的突触间的联系，导致了苔藓纤维的发芽。

近年来，人们已经发现在成年哺乳动物的脑内仍然存在少量的具有分裂增殖能力的神经干细胞，所以本实验应用了神经干细胞的特异性标志物 Nestin 对海马结构进行免疫荧光的标记。我们发现实验模型鼠海马结构齿状回颗粒细胞下层存在 Nestin 阳性细胞——神经干细胞。我们推测那些分布异常、影响突触联系导致苔藓纤维发芽的新生神经元可能来源于颗粒细胞下层的神经干细胞。这些神经干细胞在癫痫模型鼠的静止期和慢性期大量的增殖分化产生大量的新生神经元，这些新生的神经元用于补充凋亡坏死的颗粒细胞。

参考文献：

[1] De-Lima E, Soares J M, Jr., Del-Carmen-Sanabria-Garrido Y, *et al*. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in rats[J]. Brain Res, 2005, 1043(1-2): 24-31.

[2] Norrholm S D, Das M, Legradi G. Behavioral effects of local microinfusion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) [J]. Regul Pept, 2005, 128 (1): 33-41.

[3] 李国强，周 政，刘仕勇，等. 侧脑室内注射海仁酸建立慢性大鼠颞叶癫痫模型[J]. 中国临床康复, 2005, 9(25): 117-119.

[4] Bharadwaj L, Dhami K, Schneberger D, *et al*. Altered gene expression in human hepatoma HepG2 cells exposed to low-level 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and potassium nitrate[J]. Toxicol *In Vitro*, 2005, 19(5): 603-619.

[5] Pennypacker K R, Hong J S. Kainate-induced changes in gene expression in the rat hippocampus[J]. Prog Brain Res, 1995, 105: 105-116.

[6] Vaidya V A, Siuciak J A, Du F, *et al*. Hippocampal mossy fiber sprouting induced by chronic electroconvulsive seizures[J]. Neuroscience, 1999, 89(1): 157-166.

[7] Okazaki M M, Evenson D A, Nadler J V. Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin[J]. J Comp Neurol, 1993, 352(4): 515-534.

[8] Lamont S R, Stanwell B J, Hill R, *et al*. Ketamine pre-treatment dissociates the effects of electroconvulsive stimulation on mossy fibre sprouting and cellular proliferation in the dentate gyrus[J]. Brain Res, 2005, 1053(1-2): 27-32.

[9] Arida R M, Scorza F A, Carvalho-Rde A, *et al*. Long-term cosequences of intrahippocampal kainate injection in the Proechimys guyannensis rodent[J]. Epilepsy Res, 2005, 65(3): 201-210.

(编辑 薛国文)