文章编号:1000-5404(2007)01-0071-03

论著

匹罗卡品致大鼠癫痫持续状态后海马神经元凋亡的动态观察

张映琦[1],廖维宏[2],迟路湘[1],陈康宁[1],史树贵[1],范文辉[1],陈贞芳[1] (第三军医大学:[1]西南医院神经内科,重庆 400038;[2]大坪医院野战外科研究所第三研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨癫痫持续状态(*status epilepticus*,SE)后海马细胞凋亡的发生及其与caspase-3表达的关系。**方法** 采用匹罗卡品诱发大鼠SE模型,用TUNEL染色和免疫组化技术检测海马神经元凋亡和caspase-3表达的动态变化。**结果** 正常对照组大鼠海马未见TUNEL阳性细胞;SE后6 h,开始出现少量TUNEL阳性细胞;SE后72 h,达到高峰;SE后7 d,TUNEL阳性细胞开始减少。正常对照组大鼠海马可见少量caspase-3阳性表达;SE后6 h,大鼠海马caspase-3阳性表达增多,主要集中于CA1和CA3区;SE后48 h,caspase-3表达达到高峰;SE后72 h~7 d,caspase-3阳性染色细胞数开始减少;但仍显著多于对照组,差异有极显著意义($P<0.01$)。结果显示caspase-3表达分布与TUNEL染色基本一致,caspase-3表达高峰早于TUNEL所示凋亡细胞出现的高峰。**结论** 神经元凋亡参与了SE后海马神经元迟发性死亡过程并与caspase-3的激活有密切的关系。

关键词:癫痫持续状态;海马;caspase-3;匹罗卡品;凋亡
中图法分类号:R338.1;R741.02;R749.17 **文献标识码**:A

Dynamic changes of apoptotic neuron in hippocampus after pilocarpine induced *status epilepticus* in rats

ZHANG Ying-qi[1], LIAO Wei-hong[2], CHI Lu-xiang[1], CHEN Kang-ning[1], SHI Shu-gui[1], FAN Wen-hui[1], CHEN Zhen-fang[1] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, Chongqing 400038, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To probe the occurrence of neuroal apoptosis in rats after *status epilepticus* (SE) and the relationship between neuron apoptosis and caspase-3 expression. Methods Rat model of SE was induced by intraperitoneal injection of 300 mg/kg pilocarpine in 20 male Wistar rats. Another 5 rats served as control. The apoptotic neuron was detected by TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL), and caspase-3 expression was observed by immunocytochemistry at 6th, 48th, 72th h and 7th d after SE induction. Results In control rats, TUNEL-positive neuron could not be found in hippocampus. The number of TUNEL-positive neuron began to increase at 6th h after SE induction and peaked at 72th h, began to decrease at 7th d after SE induction. In control rats, there were few caspase-3 expression in hippocampus. The caspase-3 immunoreactivity began to increase at 6th h after SE and peaked at 48th h, especially in CA1 and CA3 region of hippocampus, began to decrease at 72th h and dropped to normal level at 7th d. The results indicated that the distribution of caspase-3 expression was consistent with the distribution of TUNEL-positive neuron. The peak of caspase-3 expression was earlier than that of TUNEL-positive neuron. Conclusion Neuron apoptosis participated in the process of delayed neuronal death in hippocampus after SE and was correlated with caspase-3 activation.

Key words: *status epilepticus*; hippocampus; caspase-3; pilocarpine; apoptosis

颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy,TLE)是人类最常见的癫痫类型,它的进程通常包括3个阶段:最初的脑损伤事件(如脑外伤、颅内感染、卒中或癫痫持续状态等)→潜伏期(癫痫产生)→反复惊厥发作(症状性癫痫)。以往的研究提出海马神经元缺失既是癫痫发作的结果,又是潜伏期(癫痫发生)中环路重建导致反复惊厥发作的重要因素之一[1,2]。因此,对癫痫持续状态(*status epilepticus*,SE)后海马神经元损伤进行研

作者简介:张映琦(1975-),女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事癫痫的发病机制和治疗方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68765256,E-mail:aiqi-syd@tom.com

收稿日期:2006-01-23;修回日期:2006-04-10

究,具有重要的意义和临床价值。近年来的研究表明,SE 引起的海马神经元损伤既有急性神经元坏死,也有一些神经元经过 2 ~ 3 d 后才出现死亡,称为迟发性神经元死亡(delayed neuronal death, DND)。一些最近的研究还揭示 caspase 介导的程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)是迟发性损伤的重要组成[3,4]。因此,对 SE 后海马神经元凋亡及其与 caspase-3 关系的研究,将有助于我们更深入的了解 SE 后海马神经元损伤的机制及癫痫灶的形成过程,为 TLE 的治疗找到更理想的方法。

本实验采用国际公认的匹罗卡品(pilocarpine,PILO)腹腔注射诱发大鼠 SE 模型,在 SE 后的不同时相点,用末端脱氧核苷酸转移酶介导 dUTP 缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling,TUNEL)和免疫组化技术观察了大鼠海马神经元凋亡和 caspase-3 表达的动态变化规律。

1 材料与方法

1.1 动物的分组和给药

健康雄性 Wistar 大鼠,25 只,体质量 200 ~ 250 g,由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。所有动物在笼子里饲养,保持在 7:00/19:00,亮/暗周期;室温 22 ~ 24 ℃,自由进食和饮水。25 只大鼠分为 5 组,每组 5 只:①对照组;②SE 后 6 h 组;③SE 后 48 h 组;④SE 后 72 h 组;⑤SE 后 7 d 组。

SE 模型用 PILO 300 mg/kg 腹腔注射建立,PILO 注射前用生理盐水配制,注射容量为 4 ml/kg;对照组大鼠接受生理盐水腹腔注射。各时相点大鼠出现 SE 1 h 后用安定(4 mg/kg)肌注以抑制癫痫发作,降低这一时期的高死亡率。凡 SE 持续时间未达预定要求或中途死亡者从本实验中排除。

PILO 为 Sigma 公司产品;*In Situ* Cell Death Detection Kit,POD 为 Roche 公司产品;Rabbit Anti-caspase-3、浓缩型 SABC-兔 IgG 试剂盒和浓缩型 DAB 试剂盒(武汉博士德公司产品);其他试剂均为国产分析纯级。

1.2 观察方法和指标

1.2.1 大鼠行为观察 参照 Racine[5] 的(0 ~ Ⅴ级)评价标准,0 级:无任何发作迹象;Ⅰ级:凝视,头面部轻微颤动;Ⅱ级:点头或湿狗样抖动(wet dog shakes, WDS)Ⅲ级:前肢局限性惊厥;Ⅳ级:具有后肢站立的全身强直性惊厥;Ⅴ级:具有站立伴摔倒的全身强直-阵挛性发作。达到Ⅲ级改变以上者定为癫痫发作,连续的痫性发作超过 30 min 以上者为 SE。

1.2.2 Nissl 染色评价海马神经元损伤 入选大鼠分别于 SE 后 6、48、72 h 和 7 d 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg,麻醉成功后立即暴露心脏,经左心室插管至升主动脉,快速灌注 PBS 250 ml,随后灌注 4% 多聚甲醛-PB 液 500 ml(0.1 mol/L,pH 7.4)进行内固定,然后选海马最大切面处标本经充分水洗(过夜)后,行脱水、透明、石蜡包埋、制成厚度为 10 μm 的连续石蜡切片并染色。

1.2.3 TUNEL 染色评价神经元凋亡 标本制备同上,每个标本取邻近的 2 张切片行 TUNEL 染色。具体操作方法参照试剂盒说明书(Roche 公司)。

1.2.4 caspase-3 免疫组化染色 标本同上,每个标本取邻近的 2 张切片行 caspase-3 免疫组化染色。具体操作方法参照试剂盒说明书和文献(武汉博士德公司)。

1.3 图像分析

每个实验动物 TUNEL 染色和 caspase-3 免疫组化染色各取邻近切片 2 张,观察海马 CA1 区 100 倍视野内阳性细胞数(阳性细胞核深染,呈棕黄色),取均数。然后进行统计分析。

1.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,根据方差齐性与否分别用参数检验和非参数检验。方差齐性资料均数间两两比较用 t 检验,非齐性资料用秩和检验。

2 结果

2.1 PILO 对大鼠行为学的影响

大鼠腹腔注射 PILO(300 mg/kg)后,立即出现外周胆碱能反应(如瞳孔缩小,立毛,流涎,血泪症,腹泻等)并可持续约 15 min。在(23.35 ± 4.72) min 后 19 只(19/20)大鼠出现癫痫发作,均进展为 SE,其中有 5 只死亡(5/20),对照组大鼠无上述行为学改变。

2.2 SE 后大鼠海马神经元的损伤

Nissl 染色显示,SE 后 48 h,海马 CA1 和 CA3 区大多数锥体细胞被破坏,并被小的,深染的固缩细胞所取代;SE 后 72 h 至 7 d,大鼠海马神经元损伤程度进一步加重,CA1 和 CA3 区出现大量锥体神经元缺失,正常细胞结构和组成几乎被完全破坏。

2.3 SE 后海马神经元凋亡发生的动态过程

TUNEL 染色,在对照组中大鼠海马未见 TUNEL 阳性细胞。SE 后 6 h 大鼠海马可见少量 TUNEL 标记细胞,细胞核呈棕黄色,核固缩呈圆形或不规则形;高倍镜下可见染色质深染聚集成块或碎裂,核边聚等,符合凋亡细胞形态变化,而坏死神经元细胞核染色淡且模糊,细胞形态可不完整。SE 后 48 h,大鼠海马 CA1 和 CA3 区出现较多 TUNEL 阳性细胞;SE 后 72 h,达到高峰,与 Nissl 染色减弱相伴随;SE 后 7 d,大鼠海马 TUNEL 阳性细胞数量明显减少。PILO 组不同时程两两比较除 SE 48 h 和 SE 7 d 之间无显著性差异外($P > 0.05$),其余均有极显著性差异($P < 0.01$)。

2.4 SE 后海马内 caspase-3 表达的动态变化

对照组中大鼠海马仅见少量 caspase-3 阳性染色细胞,主要集中于 CA 和 CA3 区,分别为(31.40 ± 5.75)和(55.30 ± 6.50);PILO 诱导大鼠 SE 后 6 h,大鼠海马 caspase-3 阳性表达开始增多;至 SE 后 48 h,达到高峰[CA1 为(136.38 ± 12.88),CA3 为(201.75 ± 9.53)],齿状回也可见少量 caspase-3 阳性染色细胞;SE 后 72 h 至 7 d,caspase-3 阳性染色细胞数开始减少,但仍显著多于对照组,差异有极显著意义($P < 0.01$)。

3　讨论

细胞凋亡（apoptosis）又称程序性细胞死亡（programmed cell death，PDC），是一种基因控制的细胞自主性死亡过程。目前认为细胞凋亡是肿瘤、癫痫、缺血、外伤和神经变性疾病（如 Alzheimer 病等）所引起的细胞死亡的最后通路。

1994 年，Pollard 等[6]首次报道了大鼠一侧杏仁核注射海人酸（kainic acid，KA）致痫后 4 ~ 48 h 神经元凋亡的变化。他们发现，癫痫发作后 24 h，海马 CA3 和 CA4 区出现大量凋亡神经元，其中 CA3 区锥体层在 24 h 和 48 h 各有 30% 和 60% 的细胞呈现 TUNEL 阳性染色，而 CA1 区仅有少量阳性染色。这之后有关癫痫后神经元凋亡的研究观察时间也大多在 6 ~ 72 h。在本实验中，我们观察了 PILO 致大鼠 SE 后 6 h 至 7 d 海马神经元凋亡的动态变化。结果显示，在 SE 后海马各区均有凋亡细胞出现，主要集中在 CA1 区，SE 后 6 h，开始出现少量 TUNEL 阳性细胞；SE 后 72 h，达到高峰；SE 后 7 d，TUNEL 阳性细胞开始减少。与 Pollard 等的报道有所不同。该结果一方面反映了癫痫发作后海马神经元凋亡的分布和程度可能受到致痫因素、给药途径、实验动物种系以及个体差异等多种因素的影响；另一方面也再次证实了神经元凋亡参与了 SE 后海马神经元迟发性神经元死亡。

癫痫发作后海马神经元损伤的机制还不是很清楚。以往的研究表明，癫痫导致的神经元凋亡与谷氨酸的 N-甲基-D-天门冬氨酸（N-methyl-D-aspartate，NMDA）受体激活、细胞内钙超载、一氧化氮产生等多种因素有关。PILO 是一种 M 型胆碱能受体激动剂，胆碱能受体兴奋可激活谷氨酸兴奋通路诱发痫性发作和 SE，导致海马 CA1 区、CA3 区神经元受到损害。这些部位的选择性易损可能为：①海马含丰富的 NMDA 受体。②内嗅皮层-齿状回-CA3 区-CA1 区“三突触”谷氨酸能通路兴奋性升高的结果。③CA1 区和 CA3 区仅由脉络膜前动脉供血，经过较长的分支和扭转才到达 CA1 区，说明该区为乏血管区，因此，也易受长时间抽搐发作引起的缺氧、缺血性变化所致的损伤。

Caspase 家族是一类具有在天门冬氨酸后进行酶切特性的半胱氨酸蛋白酶，是直接导致凋亡细胞解体的蛋白酶系统，在细胞凋亡的分子机制网络中居中心地位，其活化是细胞凋亡执行阶段的中心环节。大量的事实证明，该家族成员 caspase-3 是哺乳动物细胞凋亡中的关键蛋白酶，处于级联反应的核心位置，发挥非常重要的作用，被称为死亡蛋白酶[7]。

近年来，国外有关 caspase-3 与神经系统生理病理关系的研究较多，但是多集中于神经系统的生长发育、缺血性脑血管病、Alzheimer 病及帕金森病等上，关于 caspase-3 与癫痫后神经元凋亡的研究尚不多。Faherty 等[8]发现海人酸注射后的 2 ~ 3 d，caspase-3 出现高表达，给予 caspase-3 抑制剂 z-DEVD-fmk 对 CA3 区神经元有保护作用，从而证实癫痫后神经元的凋亡与 caspase-3 的激活有密切的关系。

本实验也观察到 PILO 诱导大鼠 SE 后 6 h，大鼠海马 caspase-3 阳性表达开始增多，主要集中于 CA1 和 CA3 区；至 SE 后 48 h，caspase-3 表达达到高峰，齿状回也可见少量 caspase-3 阳性染色细胞；SE 后 72 h 至 7 d，caspase-3 阳性染色细胞数开始减少，但仍显著多于对照组（$P < 0.01$）。结果显示 caspase-3 表达分布与 TUNEL 染色基本一致，但 caspase-3 表达高峰早于 TUNEL 所示凋亡细胞出现的高峰。由于 caspase-3 是凋亡过程中一个重要的早期指标，因此其表达增多要早于细胞 DNA 断裂的发生及组织形态学上凋亡细胞的出现高峰，本实验结果与此相符，提示 SE 后海马神经元凋亡与 caspase-3 激活密切相关。这一发现为临床脑保护治疗方法的开发提供了新的思路和理论依据。

参考文献：

[1] Borges K, Gearing M, Mcdermott D L, *et al*. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model [J]? Exp Neurol, 2003, 182(1): 21 - 34.

[2] Brandt C, Glien M, Potschka H, *et al*. Epileptogenesis and neuropathology after different types of *status epilepticus* induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats[J]. Epilepsy Res, 2003, 55(1 - 2): 83 - 103.

[3] Narkilahti S, Nissinen J, Pitkanen A. Administration of caspase 3 inhibitor during and after *status epilepticus* in rats: effect on neuronal damage and epileptogenesis[J]. Neuropharmacology, 2003, 44(8): 1068 - 1088.

[4] Puig B, Ferrer I. caspase-3-associated apoptotic cell death in excitotoxic necrosis of the entorhinal cortex following intraperitoneal injection of kainic acid in the rat? [J]. Neurosci Lett, 2002, 321(3): 182 - 186.

[5] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 281 - 294.

[6] Pollard H, Charriaut-Marlangue C, Cantagrel S, *et al*. Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons[J]. Neuroscience, 1994, 63(1): 7 - 18.

[7] Nicholson D W, Thornberry N A. Caspases: killer proteases[J]. Trends in Biochemical Science, 1997, 22(8): 299 - 306.

[8] Faherty C J, Xanthoudakis S, Smeyne R J. caspase-3-dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1999, 70(1): 159 - 163.

（编辑　栾　嘉）