文章编号:1000-5404(2008)14-1353-04

论著

缺氧性脑损伤对大鼠癫痫敏感性和脑内 PSD-95 表达的影响

陈 秀[1],吴万福[1],胡长林[1],蔡文琴[2],杨 忠[2] ([1]重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010;[2]第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨缺氧性脑损伤后癫痫发作敏感性及其与 PSD-95 的关系。**方法** 采用成年雄性 SD 大鼠,以 8% 氧氮混合气体建立大鼠缺氧性脑损伤模型,腹腔注射戊四唑(pentylenetetrazol, PTZ) 10 mg/(kg·5 min)和 35 mg/(kg·2 d)点燃大鼠,检测其癫痫敏感性的改变。分别用免疫组织化学和免疫印迹方法观察大鼠颞叶皮层、海马和中脑神经元脱失的病理学改变以及脑内 PSD-95 表达的变化。**结果** 缺氧损伤后大鼠癫痫敏感性明显增强。缺氧大鼠和缺氧后 PTZ 致痫大鼠海马 CA1 区、颞叶皮层和中脑神经元不同程度的脱失,缺氧大鼠脑内 PSD-95 表达明显降低。**结论** 成年大鼠缺氧性脑损害后癫痫敏感性增强,可能与神经元脱失以及脑内 PSD-95 表达变化有关。

关键词: 缺氧性脑损伤;癫痫敏感性;神经元脱失;PSD-95;戊四唑

中图法分类号: R363.25;R742;R749.17 **文献标识码:** A

Effect of hypoxic brain injury on seizure susceptibility and PSD-95 expression in rats

CHEN Xiu[1], WU Wan-fu[1], HU Chang-lin[1], CAI Wen-qin[2], YANG Zhong[2] ([1]Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, [2]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between seizure susceptibility and PSD-95 expression in rats following hypoxic brain injury. Methods Male SD rats were divided into the control group and the hypoxia group. The hypoxic brain injury model was established by exposing the rats to global hypoxia induced by 8% nitrogen oxygen atmosphere. Pentylenetetrazol (PTZ) [10 mg/(kg·5 min) and 35 mg/(kg·2d)] were injected intraperitoneally into the rats from both groups to test the number of kindling, seizure stage and seizure threshold. The neuronal loss and PSD-95 expression in the temporal cortex, hippocampal CA1 subfield and midbrain were studied by using immunohistochemistry and Western blotting, respectively. Results The rats exposed to hypoxia exhibited increased seizure susceptibility to PTZ. Associated with this change in seizure susceptibility, neuronal loss was observed in the temporal cortex, hippocampal CA1 subfield and midbrain region in hypoxic rats and post-hypoxic kindling rats while PSD-95 expression was reduced in the both temporal cortex and hippocampus in hypoxic rats. Conclusion Neuronal loss is associated with the increased seizure susceptibility in adult rats following hypoxic cerebral injury. The decreased expression of PSD-95, as the consequence of hypoxic damage, may at least in part, contribute to hypoxia-induced reduction in seizure threshold.

Key words: hypoxic brain injury; seizure susceptibility; neuronal loss; PSD-95; pentylenetetrazol

临床上呼吸衰竭、溺水、窒息及中毒、麻醉手术意外等均可引起不同程度的脑损害,即缺氧性脑病。部分患者并发痫性发作且发作程度严重、持久、类型多样,对常用的抗癫痫药物几乎没有反应[1],此类癫痫属难治性癫痫的范畴。反复痫性发作可加重缺氧性脑损伤,形成恶性循环,增加患者死亡率和致残率。目前,缺氧性脑损伤后并发痫性发作机制不清楚,有关缺氧性脑损伤后癫痫敏感性的变化及其相关病理机制方面的报道相对较少。本研究以探讨缺氧性脑损害后癫痫敏感性的改变为契机,探讨其相关的发病机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型的制作

成年雄性 SD 大鼠,体质量 200~250 g,由第三军医大学实验动物中心提供,分为缺氧组($n=35$)和对照组($n=35$)。参考国内外建立缺氧脑损害方法[2,3]进行适当改进,缺氧组大鼠

作者简介:陈 秀,女,四川省南充市人,博士研究生,主治医师,主要从事缺氧性脑损伤与癫痫方面的研究。电话:(023)63816676

通信作者:胡长林,电话:(023) 63816676

收稿日期:2007-04-25;修回日期:2007-07-12

置于自制密闭玻璃缺氧箱中,持续充以8%氧氮混合气体,流量为0.5 L/min,通气10 min后开始计时,直至大鼠出现四肢失去张力,呼吸暂停,取出大鼠置于空气中,记录其缺氧维持时间,每日1次,连续进行3 d,箱内CO_2和水蒸气分别用钠石灰和$CaCl_2$吸收。用氧浓度仪监测,维持缺氧箱内的氧浓度为(8±0.5)%。对照组大鼠置于同一容器,充以空气,其余条件相同。

1.2 癫痫敏感性的检测

1.2.1 戊四唑致首次痫性发作阈剂量和潜伏期 缺氧组和对照组各取10只大鼠,于造模后24 h开始腹腔注射戊四唑(PTZ,Sigma公司)10 mg/(kg·5 min)直到第1次出现伴向后站立的肌阵挛为止[4],记录PTZ致首次痫性发作阈剂量和潜伏期。

1.2.2 PTZ致痫性发作程度和点燃数量 缺氧组和对照组另各取15只大鼠,于造模后24 h腹腔注射阈下剂量PTZ 35 mg/(kg·2 d),连续20 d。每次注射后观察30 min,根据改良Racine评分标准[5]判断痫性发作程度,即0级:无惊厥;1级:湿狗样颤动,面肌抽动、咀嚼;2级:肌阵挛;3级:肌阵挛,站立;4级:强直-阵挛发作,倒向一侧;5级:全面强直-阵挛发作,向后倒。4~5级发作连续3次以上,即达到点燃标准。记录PTZ点燃过程中大鼠痫性发作程度以及两组大鼠20 d后被点燃的数量。将缺氧组和对照组中被PTZ点燃大鼠分别纳入缺氧后点燃组和单纯点燃组。

1.3 免疫组织化学

缺氧组、对照组、缺氧后点燃组和单纯点燃组大鼠,用水合氯醛(350 mg/kg)腹腔麻醉,以4%多聚甲醛经心脏灌注,取脑置于4%多聚甲醛中后固定24 h,30%蔗糖脱水,然后行冠状位冰冻切片。切片用3%H_2O_2和正常山羊血清封闭后,分别加入鼠Neu-N单抗(1∶400, Chemicon公司)和鼠PSD-95单抗(1∶500, Affinity BioReagents公司)后4 ℃过夜,Neu-N染色脑片的后续操作采用S-P法,DAB显色,光镜下,阳性细胞呈黄棕色;PSD-95染色脑片漂洗后加羊抗鼠Cy3(1∶100)后37 ℃孵育2 h,甘油封片,荧光显微镜下,阳性细胞呈现红色荧光。阴性对照采用PBS分别取代一抗。在40倍物镜下进行图像分析,阳性细胞计数方法,同一批染色的切片,根据显色程度定下同一标准,每个标本随机抽取6张切片,每张切片选择皮层和海马各2个视野(每个视野相当于切片上0.132 mm^2),然后由计算机自动计数,统计阳性神经元数。

1.4 PSD-95蛋白免疫印记分析

缺氧组、对照组、缺氧后点燃组和单纯点燃组大鼠,断头取脑,冰上分离颞叶皮层和海马,匀浆液2 100×g离心10 min(4 ℃),去上清液,稀释沉淀,再15 000×g离心15 min(4 ℃)两次,留上清液,Bradford法蛋白定量。采用8%的SDS-PAGE电泳,然后半干转至PVDF膜。用5%脱脂奶粉封闭2 h,然后依次加入鼠抗PSD-95抗体(1∶1 000,)37 ℃孵育2 h, 4 ℃过夜,生物素化的羊抗鼠IgG(1∶1 000,武汉博士德公司),SA/HRP(1∶1 000,武汉博士德公司),DAB显色。β-actin作内参。各反应间用TBST充分洗涤。PVDF膜常温晾干后进行条带图像扫描分析,计算各条带的光密度值(optical density, OD)。

1.5 统计学处理

两组动物点燃例数与非点燃例数用四格表的确切概率法,癫痫发作的级别用秩和检验,PTZ致痫剂量与潜伏期,阳性细胞数和光密度值以$\bar{x}\pm s$表示,采用独立样本t检验和方差分析。采用SPSS 10.0进行统计处理。

2 结果

2.1 癫痫敏感性的检测

2.1.1 PTZ致首次痫阈剂量和潜伏期的测定 缺氧组PTZ首次致痫阈剂量(mg/kg)明显低于对照组[(38.5±2.7) *vs* (52.5±1.6), $P<0.05$]。缺氧组PTZ致痫潜伏期(min)也显著低于对照组[(18.6±1.3) *vs* (27.3±1.6), $P<0.05$]。

2.1.2 PTZ致痫发作程度和点燃数量 PTZ点燃过程中痫性发作程度观察显示:缺氧组大鼠痫性发作程度明显比对照组严重(表1)。经20 d PTZ点燃,缺氧组和对照组大鼠分别点燃了11只和7只大鼠,缺氧组明显比对照组更易点燃。因此,纳入缺氧后点燃组和单纯点燃组大鼠分别为11只和7只,与对照组比较有统计学差异($P<0.05$)。

表1 缺氧组与对照组PTZ诱发痫性发作级别

PTZ注射次数	缺氧组平均痫性发作级别[a]	对照组平均痫性发作级别
1	1.64	1.72
2	1.61	1.62
3	1.97	1.77
4	1.88	2.01
5	2.06	1.98
6	3.07	2.33
7	2.76	2.54
8	3.32	2.74
9	3.71	3.02
10	4.01	2.98

a: $P<0.05$,与对照组比较

2.2 神经元计数

Neu-N染色显示;缺氧后点燃组大鼠各观察区域神经元数目明显少于其余各组,缺氧组大鼠颞叶皮层和中脑神经元数量也显著减于对照组和单纯点燃组,单纯点燃组CA1区神经元数目少于对照组($P<0.05$,表2)。

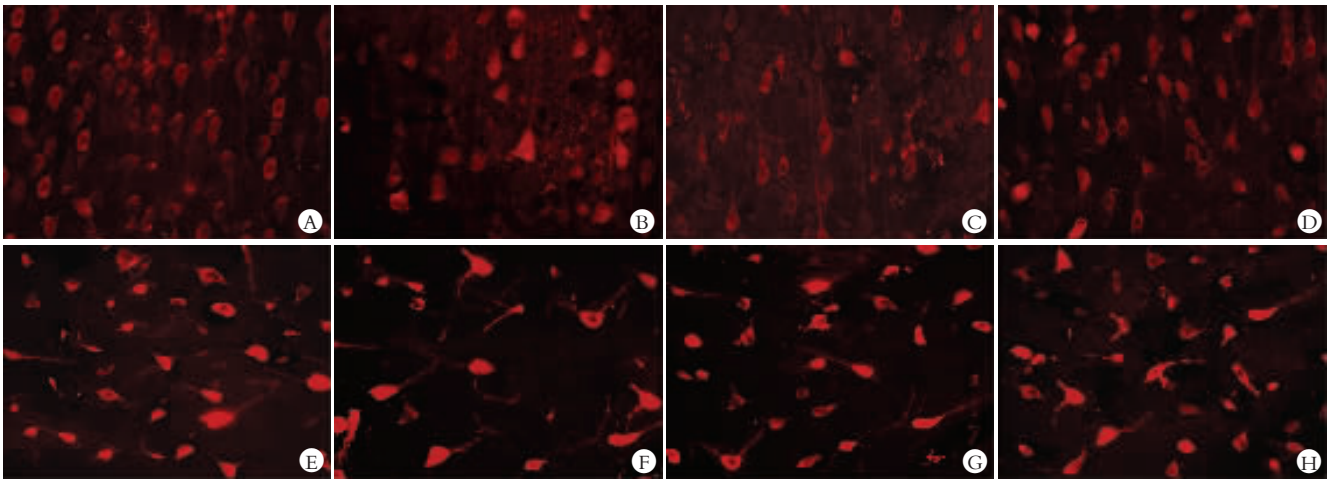
表2 各组颞叶皮层、海马CA1和中脑Neu-N阳性细胞数($\bar{x}\pm s$)

组别	n	颞叶皮层	海马CA1	中脑
对照组	7	195.4± 27.7	167.3±18.7	179.3±13.4
缺氧组	7	128.3±32.1[ab]	129.3±21.4[d]	144.7±11.4[ab]
单纯点燃组	4	178.3±14.7	141.7±17.7[a]	169.5±12.1
缺氧后点燃组	7	109.8±22.1[abc]	96.3±15.9[abc]	134.9±14.1[ab]

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与单纯点燃组比较;c: $P<0.05$,与缺氧组比较

2.3 PSD-95的表达

2.3.1 免疫荧光检测脑组织PSD-95的表达 荧光显微镜下可见:PSD-95主要分布于细胞体、树突及轴突样纤维上:对照组阳性细胞呈圆形、椭圆形或三角形。树突分枝较多,轴突样纤维细长,主要细胞质着色,轮廓清晰。缺氧后细胞肿胀,树突分技减少甚至消失轴突样纤维僵硬缩短,部分细胞核深染,整个胞体均深染。缺氧大鼠颞叶皮层、海马区域PSD-95阳性细胞数量明显少于其他各组(表3,图1)。



A:对照组颞叶皮层; B:缺氧组颞叶皮层; C:单纯点燃组颞叶皮层; D:缺氧后点燃组颞叶皮层; E: 对照组海马; F:缺氧组海马; G:单纯点燃组海马; H:缺氧后点燃组海马

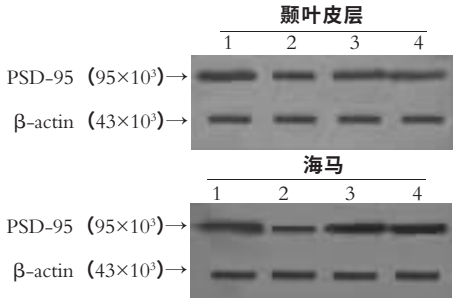
图 1　各组大鼠颞叶皮层与海马 PSD-95 免疫荧光染色　(×400)

表 3　各组颞叶皮层、海马区 PSD-95 阳性细胞数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	颞叶皮层	海马
对照组	7	130.0 ± 5.1	99.3 ± 11.4
缺氧组	7	97.4 ± 7.7^{abc}	67.3 ± 8.7^{abc}
单纯点燃组	4	128.3 ± 8.7	81.7 ± 7.7
缺氧后点燃组	7	127.8 ± 6.2	86.3 ± 5.9

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与单纯点燃组比较;c: $P<0.05$,与缺氧后点燃组比较

2.3.2　免疫蛋白印迹检测 PSD-95 表达　对照组、缺氧组、单纯点燃组和缺氧后点燃组颞叶皮层 PSD-95 含量[分别为(0.965 8 ± 0.038 8)、(0.787 1 ± 0.030 2)、(0.892 1 ± 0.023 1)、(0.903 3 ± 0.031 1)];海马 PSD-95 含量[分别为(0.894 3 ± 0.033 1)、(0.702 1 ± 0.020 1)、(0.877 1 ± 0.023 2)、(0.901 8 ± 0.030 8)](图 2)。缺氧组大鼠颞叶皮层与海马 PSD-95 蛋白表达明显降于其他各组($P<0.05$)。



1:对照组; 2:缺氧组; 3:单纯点燃组; 4:缺氧后点燃组

图 2　各组颞叶皮层和海马 Western blot 检测 PSD-95 表达

3　讨论

本实验前期研究成年大鼠经 8% 氮氧混合气体缺氧处理后,采用电生理、光镜和电镜病理学观察,证实大鼠脑电发生以慢波为主的明显改变,皮层海马神经元肿胀、变性、坏死以及凋亡,说明成年大鼠经该缺氧处理能造成缺氧性脑损伤,为后续研究提供了实验基础[6]。本实验检测了成年大鼠缺氧性脑损伤后痫性发作敏感性的改变。结果显示缺氧性脑损伤大鼠经 PTZ 点燃例数明显增多,发作程度也明显加重,同时 PTZ 诱导痫性发作的阈剂量降低以及潜伏期缩短,说明缺氧性脑损伤大鼠痫性发作敏感性显著增高。

研究表明癫痫发作间期放电始自 CA1 区,海马 CA3 区的锥体细胞是发作间期棘波放电的起搏器,海马的三级突触局部回路是癫痫发生的结构基础,痫性发作多伴有海马结构异常。海马、皮层神经元对缺氧敏感,海马 CA1、CA3 和门区的抑制性中间神经元是海马结构内最易受损的部位。本实验中 Neu-N 染色结果也证实了缺氧损伤后大鼠海马 CA1 区、颞叶皮层以及中脑神经元脱失显著,残存神经元胞体萎缩,细胞质浓缩,突起减少或消失。缺氧后大鼠海马 CA1 区、颞叶皮层以及中脑神经元脱失的病理损害可能扰乱该区域 GABA 能神经元介导的痫性抑制作用[7]。脑缺氧损伤后神经元脱失,致残存神经元的代偿性异常兴奋或可复性改变可能是癫痫发作敏感性增强的结构基础[8]。因此,缺氧性脑损伤后神经元显著脱失可能增加癫痫的敏感性。此外,缺氧损伤时,海马区可出现兴奋性氨基酸如谷氨酸触发钙超载,此病理损伤降低痫性发作的阈值,增加癫痫的敏感性[9]。此外,缺氧后点燃组大鼠的神经元脱失尤其显著,可能是缺氧损伤和痫性发作共同作用的结果。

中枢神经系统突触后膜细胞质面的突触后密集区(PSD)是突触后信号传导和整合的结构基础,密切参

与突触功能的调节和突触后神经元对兴奋性刺激反应的调控,其包含各种受体蛋白、锚定蛋白、以及信号蛋白等,其中受体蛋白及其下游信号分子常结合于共同的锚定蛋白,组装为蛋白信号复合体,以利于突触后信号快速且特异性传递, PSD-95 系该区域的锚蛋白,其主要功能为调节突触功能以及发挥突触和下游信号通路联系作用,研究表明 PSD-95 与脑内兴奋性谷氨酸突触后受体即 NMDA 受体的调节亚基 NR2B 相互作用,可锚定,集聚 NMDA 受体于突触后膜,而且还能结合其下游特异性的信号分子如 Src-RTKs、nNOS 和突触 Ras-GTP 酶活化蛋白等,从而调节 NMDA 受体功能及其下信号转导通路的激活。还发现缺血、缺氧损害激活的钙蛋白酶可截去 NMDA 受体亚基 C 末端,使其丧失与 PSD-95 结合能力。PSD-95 参与突触的功能和活性的动态调节,在缺氧引起神经元损伤病变中,也涉及到 PSD-95 表达改变[10]。而脑内 NMDA 受体的密度和构型改变对痫性发作产生重要作用。提示脑内PSD-95 表达改变可能与大鼠痫性发作敏感性有关联。本研究结果显示,缺氧性脑损伤导致大鼠 PSD-95 表达降低同时癫痫敏感性增加,提示脑内 PSD-95 和 NMDA 受体亚基之间相互作用的某些变化可能有助于降低大鼠痫性发作的阈值。然而,有研究显示 PSD-95 的表达降低可以削弱 NMDA 受体介导的兴奋毒性,并提高神经元的抗毒性。PSD-95 作为 NMDA 受体和下游信号分子间桥梁蛋白,缺氧后其表达的降低可能会扰乱 NMDA 受体及其下游信号通路,此变化也可能为神经元对抗缺氧损伤的一种生理性代偿反应和自身保护机制。因此,PSD-95 表达下调既可能是缺氧后痫性发作敏感性增加的原因,也可能是缺氧致痫性发作敏感性增加后出现的代偿现象。对于缺氧性脑损伤后癫痫敏感性增加与 PSD-95 表达降低关系以及 PSD-95 与 NMDA 受体亚基之间的相互作用,需进一步探讨。本研究还显示,缺氧后点燃大鼠和单纯点燃大鼠 PSD-95 表达与对照组比较无显著差异,其机制尚不清楚。

参考文献:

[1] Victor M, Ropper A H. Admas and Victor's Principles of Neurology [M]. 7 ed. New York: McGraw-Hill Companies, 2001: 1184 - 1185.

[2] Yang S N, Huang C B, Yang C H, *et al*. Impaired SynGAP expression and long-term spatial learning and memory in hippocampal CA1 area from rats previously exposed to perinatal hypoxia-induced insults: beneficial effects of A68930[J]. Neurosci Lett, 2004, 371(1): 73 - 78.

[3] 彭 斌, 李舜伟, 谭会兵. 缺氧诱导大鼠脑细胞低氧诱导因子一1α 表达的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2002, 19(2): 67 - 69.

[4] Huang L T, Holmes G L, Lai M C, *et al*. Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures [J]. Epilepsia, 2002, 43(10): 1141 - 1148.

[5] Becker A, Grecksch G, Thiemann W, *et al*. Pentylenetetrazol-kindling modulates stimulated dopamine release in the nucleus accumbens[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 66(2): 425 - 428.

[6] 陈 秀, 吴万福, 胡长林. 成年大鼠缺氧性脑损伤后亚临床发作及胶质原纤维酸性蛋白的表达[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(12): 1256 - 1259, 1319.

[7] Veliskova J, Claudio O I, Galanopoulou A S, *et al*. Seizures in the developing brain[J]. Epilepsia, 2004, 45(Suppl 8): 6 - 12.

[8] Chen W F, Chang H, Huang L T, *et al*. Alterations in long-term seizure susceptibility and the complex of PSD-95 with NMDA receptor from animals previously exposed to perinatal hypoxia[J]. Epilepsia, 2006, 47(2): 288 - 296.

[9] Raol Y S, Budreck E C, Brooks-Kayal A R. Epilepsy after early-life seizures can be independent of hippocampal injury[J]. Ann Neurol, 2003, 53(4): 503 - 511.

[10] Takagi N, Logan R, Teves L, *et al*. Altered interaction between PSD-95 and the NMDA receptor following transient global ischemia[J]. J Neurochem, 2000, 74(1): 169 - 178.

(编辑 薛国文)

《第三军医大学学报》2008 年第 20 期放射专题预告

中华医学会定于 2008 年 10 月 16 - 20 日在重庆国际会议展览中心召开第十五次全国放射学学术会议。这是放射界的全国盛会首次选择在西部地区召开。届时将有众多国际、国内著名专家到会作专题学术报告,并进行多种形式的学术交流。大会组委会将从"常规 X 线及数字 X 线成像的临床应用"、"CT、MRI 及其新技术临床应用与基础研究"、"介入放射学诊疗技术应用及研究"、"PACS 系统的应用经验"、"放射学设备管理、维修、维护以及放射技术学"、"放射学护理"等方面选出部分优秀论文在《第三军医大学学报》(CSCD 核心库)2008 年第 20 期刊出。敬请广大读者关注。如需订购第 20 期杂志,请与本刊联系。

联系人:王 红 **联系电话:**(023)68752782