论著

文章编号:1000-5404(2010)13-1442-04

母子隔离应激增加幼鼠海马CA1区锥体神经元的兴奋性

周 浩[1],刘 烨[2],梁锦平[1],陈恒胜[3],邵建玲[4] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:神经内科[1],儿研所神经电生理室[3];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院耳鼻咽喉—头颈外科[2];551404 贵州,贵阳市儿童医院检验科[4])

[摘要] 目的 初步探讨母子隔离应激对幼鼠海马CA1区锥体神经元自发性放电特征和海马$GABA_A$受体α_1亚单位表达的影响及其与癫痫易感性的关系。**方法** 54只新生的SD大鼠幼鼠用于实验,雌雄不拘,随机分成3组($n=18$),正常组(正常喂养,每天不用隔离)、隔离15 min组、隔离3 h组。在生后16 d,3组幼鼠分别行氯化锂-匹罗卡品诱导的惊厥实验,全细胞膜片钳检测海马CA1区锥体神经元自发性放电特征,灌注取脑免疫组化检测海马$GABA_A$受体α_1亚单位表达情况。**结果** 隔离3 h组体质量(24.60±1.89)g与正常组体质量(29.44±2.03)g比较明显减轻($P<0.05$)、幼鼠诱发惊厥的潜伏期隔离3 h组(11.50±2.10)min短于正常组(15.32±1.34)min($P<0.05$)、海马CA1区锥体神经元自发性放电频率隔离3h组(3.64±2.84)Hz要明显快于正常组(1.15±0.69)Hz($P<0.01$)、海马CA1区$GABA_A$受体α_1亚单位累计化学光密度,隔离3 h组(161.10±5.70)少于正常组(175.40±7.20)($P<0.01$)。隔离15 min组幼鼠体质量(29.34±1.85)g、诱发惊厥的潜伏期(16.47±1.73)min、海马CA1锥体神经元自发性放电频率(1.36±0.83)Hz、海马CA1区$GABA_A$受体α_1亚单位累计化学光密度(171.50±6.80),在以上几方面隔离15 min组和正常组比较均无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 早期母子隔离3 h的应激对幼鼠生长发育、癫痫易感性产生不良影响,海马CA1锥体神经元兴奋性增加、$GABA_A$受体α_1亚单位表达减少可能作为其潜在的病理机制之一。

[关键词] 应激;海马;惊厥;易感性;$GABA_A\alpha_1$

[中图法分类号] R338.26; R338.8; R363.271 **[文献标志码]** A

Stress due to mother and infant isolation enhances excitability of pyramidal neurons in hippocampal CA1 of infantile rats

Zhou Hao[1], Liu Ye[2], Liang Jinping[1], Chen Hengsheng[3], Shao Jianling[4] ([1]Department of Neurology, Children's Hospital, [3]Laboratory of Neuroelectrophysiology, Institute of Pediatrics, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2]Department of Otorhinolaryngologic and Cephalocervical Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [4]Department of Laboratory Medicine, Guiyang Children's Hospital, Guiyang, Guizhou Province, 551404, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of stress due to mother and infant isolation on spontaneous discharge of pyramidal neurons in hippocampal CA1 and expression of hippocampal $GABA_A$ receptor α_1 in infantile rats, and its correlation with susceptibility to epilepsy. **Methods** Infantile rats were randomly divided into normal group, 15-min isolation group, and 3-h isolation group. Sixteen days after birth, convulsion was induced in rats with lithium chloride-pilocapine. Characteristics of spontaneous discharge of pyramidal neurons in hippocampal CA1 were detected with whole-cell patch clamps. Expression of hippocampal $GABA_A$ receptor α_1 in perfused brain tissue was detected with immunohistochemistry. **Results** The body weight was significantly lower, the susceptibility to convulsion and the excitability of pyramidal neurons in hippocampal CA1 were higher, and the expression level of hippocampal $GABA_A$ receptor α_1 in brain tissue was lower in 3-h isolation group than in normal group. However, no significant difference was found in the above parameters between 15-min isolation group and normal group. **Conclusion** Stress due to 3-h mother and infant isolation may produce adverse effects on the growth and development, and susceptibility to epilepsy of infantile rats. Increased excitability of pyramidal neurons in hippocampal CA1 and decreased expression of hippocampal $GABA_A$ receptor α_1 in brain tissue may be one of the potential mechanisms.

[Key words] stress; hippocampus; convulsion; susceptibility; $GABA_A\alpha_1$

Corresponding author: Liang Jinping, E-mail: ljp023@yahoo.com

应激是个体生命中存在的一种普遍现象,适当应激有利于机体自稳态的维持,应激反应过度则可造成机体的功能障碍。中枢神经系统是应急反应的调控中心,边缘系统(海马、杏仁核等结构)与应急调节密切相关,应激过度可导致边缘系统在神经传导、神经递质

[通信作者] 梁锦平,电话:(023)63631443, E-mail:ljp023@yahoo.com

分泌等方面出现不可逆的损害,这些损害与神经系统疾病如:抑郁、癫痫发病高度相关。

幼鼠生后第 2 天(P2)到生后第 14 天(P14)母子每天隔离 3 h 的应激可以增加杏仁核点燃惊厥的易感性[1],应激作用因素可导致海马 CA1 区神经元兴奋性增加[2],相关实验证实敲除大鼠 γ-氨基丁酸 A 型受体 α_1 亚单位($GABA_A\alpha_1$)基因, 导致 $GABA_A$ 受体数量表达减少,增加大鼠癫痫的易感性[3],海马 CA1 区锥体神经元 $GABA_A\alpha_1$ 介导的抑制性突触后电流减弱,同样增加幼鼠癫痫的易感性[4]。然而应激对海马 CA1 区锥体神经元兴奋性及海马 $GABA_A\alpha_1$ 表达有何影响?以及是否通过这些影响来增加癫痫易感性? 目前,这些问题尚未完全解决。所以本实验采用母子隔离应激方法,建立氯化锂-匹罗卡品诱导的惊厥模型,全细胞膜片钳检测海马 CA1 区锥体神经元自发性放电特征,免疫组化检测海马 $GABA_A$ 受体 α_1 亚单位表达情况,研究母子隔离应激对幼鼠癫痫易感性有何影响、以及母子隔离应激对幼鼠癫痫易感性影响是否通过打乱海马部位兴奋与抑制功能的平衡来实现的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 54 只新生的 SD 大鼠幼鼠用于实验,雌雄不拘(孕鼠由重庆医科大学实验动物中心提供,体质量 250 ~ 310 g),幼鼠出生当天计为 P0,饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗的环境,自由进食。

1.1.2 试剂与设备 氯化锂-匹罗卡品(购于上海 Sigma 公司)、兔抗-$GABA_A$ 受体亚型 α_1、二抗免疫试剂盒(百萃生物科技公司提供)、振动切片机(NVSLM1)、Multiclamp-700B 放大器、微电极拉制仪(Model P-97 型)、共聚焦显微镜(Nikon90i)。

1.2 方法

1.2.1 分组及方法 实验按需要完全随机分成 3 组(n = 18): 正常组(每天正常喂养,不用隔离)、隔离 15 min(幼鼠出生当天计为 P0,从 P2 至 P15,采用母子隔离方法,每天同一时间把幼鼠单独置于安静、保暖的环境 15 min,隔离结束把幼鼠放回笼中)、隔离 3 h(方法同前、每天隔离 3 h)。

1.2.2 惊厥模型制作[5] 生后 16 d,详细记录幼鼠体质量,氯化锂按 3 mg/kg 腹腔注射,18 ~ 24 h 后腹腔注射匹罗卡品 30 mg/kg,行为学按 Racine 分级方法[6],1 级:面部阵挛,包括动须,咀嚼等;2 级:1 级发作行为加节律性点头;3 级:2 级行为加前肢阵挛;4 级:3 级行为加后肢站立;5 级:4 级行为加摔倒。3 级以下为局部发作,4 级以上为全面性点燃,诱发成功即出现 4 级以上发作行为。如 30 min 内未诱发 4 级以上行为,按 10 mg/kg 追加匹罗卡品,最后用地西泮 4 mg/kg 腹腔注射终止惊厥,实验过程中死亡、未诱发出惊厥行为的幼鼠不计入实验总体,实验结束每组共有 8 只幼鼠符合实验要求。

1.2.3 海马标本制作及组化方法 10% 水合氯醛 3 ml/kg 麻醉幼鼠,开胸灌注、先用 100 ml 生理盐水冲洗、再用 10% 多聚甲醛固定后,迅速取脑置于 10% 多聚甲醛中,4 ℃冰箱保存 24 h。常规脱水、包埋、切片后进行免疫组化染色,免疫组化染色用 S-P 法。最后每只幼鼠在相似层面各取 1 ~ 3 张切片,利用显微图像分析系统,在 200 倍物镜下,对海马各区(主要是:齿状回、CA1、CA3)$GABA_A\alpha_1$ 阳性表达细胞(细胞质呈棕黄色)的平均光密度进行分析。

1.2.4 海马脑片制作 乙醚麻醉 16 d 大的幼鼠,迅速断头取脑,置于(0 ~ 4 ℃)冰冷(浓度 mmol/L、pH = 7.4 左右、渗透浓度 290 ~ 310 mol/L)的切片液 5 min,快速分离海马,用振动切片机(NVSLM1)切 300 ~ 400 μm 厚的脑片,迅速转移到(浓度 mmol/L pH = 7.4 左右 渗透浓度 290 ~ 310 mol/L)通 95% CO_2/5% O_2 混合气体的人工脑脊液中 37 ℃孵箱孵育 1 h。

1.2.5 海马 CA1 区全细胞膜片钳记录 在室温下,利用 Multiclamp-700B 膜片钳放大器进行全细胞膜片钳记录,记录电极由玻璃毛细管经 Model P-97 型微电极拉制仪拉制而成,充分振荡电极液后,排空气泡,当电极尖端与细胞膜接触,先给予一个正压,待形成高阻抗封接(>1 GΩ)后,负压破膜后立即进行电压和电容补偿,电流信号经 2 kHz 滤波及 Digidatal322 型 A/D, D/A 转换器进行数模转换后存于计算机指定文件夹,采样频率设为 10 kHz,在记录过程中保持电位及钳制测试脉冲程序设定,信号采集与储存采用 Clampex 9.2 软件完成,海马锥体神经元通过它的形态特征、放电频率(1 ~ 4 Hz)、动作电位的发放频率适应性几方面来鉴定,每个神经元记录自发性放电 5 ~ 10 min。

1.2.6 海马 CA1 区锥体神经元动作电位发放频率适应性的计算方法 动作电位的发放频率适应作为细胞兴奋性的一个标志,对于重复发放的神经元来说,表现出明显的发放频率适应性(spike frequency adaptation),即当电流刺激开始后,连续两个动作电位之间的波峰间隔随着发放过程而逐渐加宽,一般到第 4、5 个动作电位时,这种增加趋势逐渐开始稳定,因此一般用第 5 个波峰间隔时间与 1 个波峰间隔时间的比值的倒数表示动作电位的发放频率适应性大小,我们每组选 6 个神经元进行计算动作电位发放频率适应性的大小。

1.3 统计学分析

所有的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 17.0 和 Clampexfit 9.2 软件分析,显著性水准为 0.05,隔离应激组幼鼠与正常组幼鼠在体质量、诱发出惊厥发作的潜伏期、海马部位 $GABA_A\alpha_1$ 阳性细胞累计化学光密度、海马 CA1 区锥体神经元自发性放电频率等方面的比较用两样本均数的 t 检验。

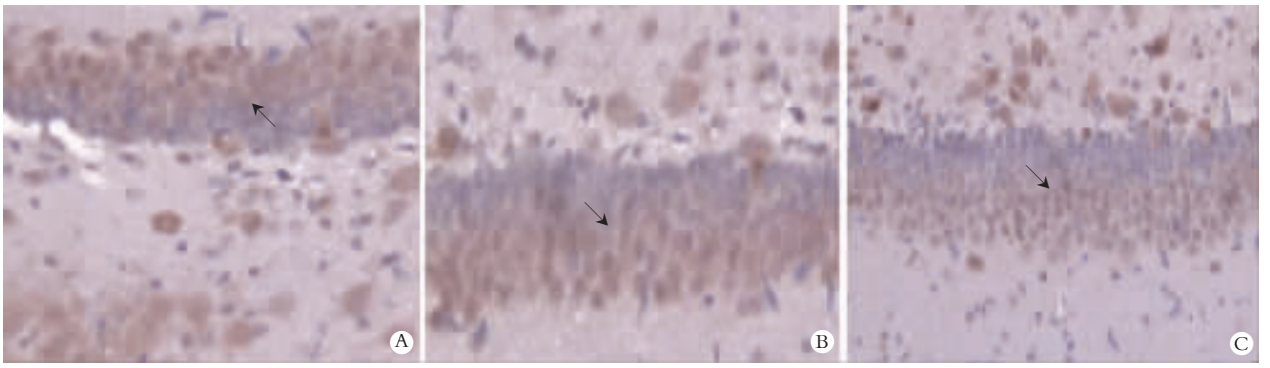
2 结果

2.1 应激对幼鼠体质量的影响

正常组体质量为(29.44 ± 2.03) g;隔离 15 min 组为(29.34 ± 1.85) g;隔离 3 h 组为(24.6 ± 1.89) g,隔离 15 min 组幼鼠体质量与正常组幼鼠体质量比较无显著性差异(P > 0.05),隔离 3h 组幼鼠体质量明显轻于正常组幼鼠体质量(P < 0.05)。

2.2 氯化锂-匹罗卡品诱导惊厥的结果

以相同浓度的氯化锂预处理 18 ~ 24 h 后,严格按体质量计算匹罗卡品的量,精确计时,从开始注射到诱发出惊厥行为所需时间为潜伏期。幼鼠诱发惊厥的潜伏期,母子隔离 15 min 组为(16.47 ± 1.73) min 与正常组(15.32 ± 1.34) min 比较无显著性差异(P > 0.05),母子隔离 3 h 组为(11.50 ± 2.10) min 较正常组(15.32 ± 1.34) min 明显缩短(P < 0.05)。



A:正常组;B:隔离15 min组;C:隔离3 h组 ↑:阳性表达神经元

图1 3组16 d SD大鼠幼鼠的海马CA1区$GABA_A\alpha_1$表达情况 (S-P×200)

2.3 三组海马$GABA_A\alpha_1$免疫组化情况

正常对照组$GABA_A\alpha_1$表达主要集中在海马的CA1区、CA3区、齿状回。母子隔离15min组$GABA_A\alpha_1$免疫化学累积光密度在以上3个区域较对照组无显著性差异($P>0.05$),母子隔离3 h组在海马CA1区$GABA_A\alpha_1$免疫化学累积光密度较对照组明显降低($P<0.01$),而在海马CA3、齿状回$GABA_A\alpha_1$免疫化学累积光密度较正常组无统计学差异($P>0.05$,表1,图1)。

2.4 应激对3组海马CA1区锥体神经元自发性放电频率的影响

离体海马脑片典型的锥体细胞(图2),正常组记录了19个海马CA1区锥体神经元,隔离15min组记录了20个海马CA1区锥体神经元,隔离3 h组记录了16个海马CA1区锥体神经元,隔离3 h组锥体神经元的自发性放电频率为(3.64±2.84)Hz比正常组的自发性放电频率(1.15±0.69)Hz的要快($P<0.01$);隔离15 min组海马CA1区锥体神经元自发性放电频率为(1.36±0.83)Hz与正常组(1.15±0.69)Hz比较无明性差异($P>0.05$)。

表1 3组幼鼠海马各区$GABA_A\alpha_1$阳性神经元的平均光密度($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	CA1	CA3	齿状回
正常组	175.40±7.20	168.70±8.50	165.10±3.50
隔离15 min组	171.50±6.80	167.70±4.90	167.30±4.30
隔离3 h组	161.10±5.70[a]	170.90±5.10	164.40±5.20

a: $P<0.01$,与正常组比较

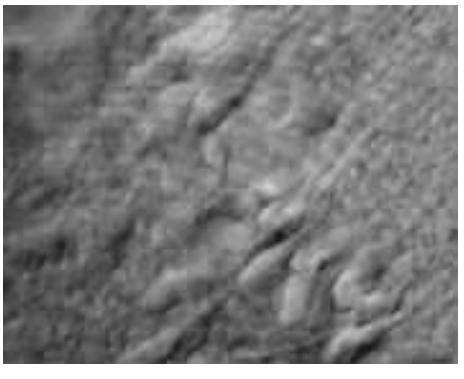


图2 16 d SD大鼠离体海马脑片的锥体层细胞形态观察

(红外微分干涉相差显微镜 ×400)

2.5 应激对3组海马CA1区锥体神经元动作电位的发放频率适应性的影响

每组选6个海马CA1区锥体神经元进行动作电位发放频率适应性大小的计算,隔离3 h组动作电位的发放频率适应性大小为(1.15±0.54)与正常组(1.85±0.54)相比,隔离3 h组锥体神经元动作电位的发放频率适应性明显降低($P<0.05$),离15 min组动作电位的发放频率适应性大小为(1.93±0.48)与正常组(1.85±0.54)比较无统计学差异($P>0.05$)。

3 讨论

母子隔离导致应激的方法已广泛应用,实验证实:出生后2~14天母子隔离3 h的应激可持久地增加大鼠边缘系统癫痫的易感性[7]。氯化锂-匹罗卡品腹腔注射诱发出惊厥发作需要的时间(潜伏期)是衡量惊厥易感性的客观标准。本实验出生后2~15天母子隔离3 h的应激,减少出生后16天幼鼠惊厥诱导的潜伏期,增加了惊厥的易感性,Huang等[8]采用出生后2~9天母子隔离应激方法(每天母子隔离1 h),同样增加幼鼠氯化锂-匹罗卡品诱导惊厥的易感性。然而母子隔离15 min的应激,则对诱导惊厥潜伏期没有明显的影响,说明只有应激达到一定的强度或超过一定的时程才会增加癫痫的易感性。

相关实验证实中枢神经系统GABA能神经元是同步化电活动的基础,通过基因敲除技术抑制$GABA_A\alpha_1$表达,$GABA_A$受体表达数量明显减少,惊厥易感性增加[3]。实验结果提示:母子隔离3 h应激组海马CA1区$GABA_A\alpha_1$表达选择性降低。GABA作为中枢神经系统主要的抑制性递质[9],参与30%~40%中枢神经系统神经元的抑制功能,其含量下降引起神经元过度兴奋,诱发同步性放电,成为癫痫发作的重要因素之一。GABA的受体有两型:$GABA_A$、$GABA_B$,GABA主要通过A型受体发挥作用,它由αβγδρ 5种亚基构成,这些亚基除δ以外,其他几个都有异构体其中α有(α_{1-6}),$GABA_A\alpha_1$是神经细胞内最普遍的抑制性受体,它属于配体门控氯离子通道,通过增加神经元细胞

膜氯离子的通透性,产生抑制性突触后电位(IPSP)发挥抑制作用。重复的游泳应激同样可以减少大鼠海马神经元 $GABA_A\alpha_1$ 表达[10],缺血缺氧也可导致大鼠海马 CA1 区 $GABA_A\alpha_1$ 表达减少[11],颞叶癫痫患者海马 CA1 区 $GABA_A\alpha_1$ 表达减少[12],然而无论是缺血,还是癫痫发作,通常都伴随着应激的发生,缺血缺氧应激也可增加大鼠癫痫的易感性[13],说明应激因素可引起海马 $GABA_A\alpha_1$ 表达下降,IPSP 降低,导致中枢神经系统抑制能力减弱,参与了癫痫的发生、发展。

锥体神经元作为海马主要的兴奋性神经元,它以谷氨酸作为兴奋性神经递质。海马 CA1 区锥体神经元全细胞膜片钳结果提示:母子隔离 3 h 的应激增加海马 CA1 区锥体神经元自发性放电频率,降低锥体神经元动作电位的发放频率适应性,从而增加了海马 CA1 区锥体神经元的兴奋性。已经证实不良的应激可以导致海马部位应激调节因子的过量释放[14][如促皮质激素释放激素(CRH)、皮质酮、五羟色胺、胆碱、肾上腺素、去甲肾上腺等],这些应激调节因子可通过多种途径导致海马神经元的兴奋性增加。应激因素使海马 CA1 区去甲肾上腺素分泌增加,去甲肾上腺素通过 α_1 受体的介导,降低了抑制性中间神经元对锥体细胞的抑制[15];另一个重要的应激调节因子(CRH)分泌增加,引起大鼠海马 CA1 区域细胞[16]自发性放电,产生抑制动作电位爆发后的超级化反应。皮质酮通过盐皮质激素受体作用导致海马 CA1 区锥体神经元兴奋性突触后电流迅速增强[17]。应激导致海马 CA1 区锥体神经元兴奋性增加,不仅与兴奋性神经递质(应激调节因子)有关,还与 GABA 的功能状态有关。有报道证实[18]:当 CA1 区 GABA 功能表现为去极化为主时,幼鼠癫痫易感性增高。海马作为边缘系统性癫痫发生发展的关键部位,海马 CA1 区神经元对应激(缺血缺氧等条件)高度敏感,各种应激调节因子的过量释放,导致海马 CA1 区锥体神经元兴奋性增加,幼鼠中枢神经系统兴奋与抑制功能失衡,导致幼鼠癫痫易感性的增加。

本实验结果说明:在生后出生后 2 ~ 15 天母子隔离 3 小时应激增加了幼鼠氯化锂-匹罗卡品诱导惊厥的易感性,并且惊厥易感性的增加与海马 CA1 区锥体神经元兴奋性增加、海马 CA1 区神经元 $GABA_A\alpha_1$ 表达减少高度相关,这对应激参与未成熟脑癫痫发病机制的研究有重要意义,然而母子隔离应激导致海马 CA1 区锥体神经元兴奋性增加,$GABA_A\alpha_1$ 神经元表达下降的具体机制有待进一步研究。

志谢 感谢重庆医科大学附属儿童医院儿研所免疫组化室张晓萍老师给予本实验的无私帮助

参考文献:

[1] Jones N C, Kumar G, O'Brien T J, *et al*. Anxiolytic effects of rapid amygdala kindling, and the influence of early life experience in rats[J]. Behav Brain Res, 2009, 203(1): 81 - 87.

[2] Joels M. Stress, the hippocampus, and epilepsy[J]. Epilepsia, 2009, 50(4): 586 - 597.

[3] Ogris W, Lehner R, Fuchs K, *et al*. Investigation of the abundance and subunit composition of GABAA receptor subtypes in the cerebellum alpha1-subunit-deficient mice[J]. J Neurochem, 2006, 96(1): 136 - 147.

[4] Galanopoulou A S. Dissociated gender-specific effects of recurrent seizures on GABA signaling in CA1 pyramidal neurons: role of GABA (A) receptors[J]. J Neurosci, 2008, 28(7): 1557 - 1567.

[5] 张映琦, 廖维宏, 迟路湘, 等. 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 [J]第三军医大学学报, 2007, 29(1): 71 - 73.

[6] Racine, Ronald D. Kindling: The First Decade [J]. Neurosurgery. 1978 , 3 (2): 110 - 119

[7] Salzberg M, Kumar G, Supit L, *et al*. Early postnatal stress confers enduring vulnerability to limbic epileptogenesis[J]. Epilepsia, 2007, 48(11): 2079 - 2085.

[8] 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.

[9] 郝艳丽, 巨修练. GABAAR 研究进展[J]武汉化工学院学报, 2006, 28(2): 12 - 16, 18.

[10] Montpied P, Weizman A, Weizman R, *et al*. Repeated swim-stress reduces GABAA receptor alpha subunit mRNAs in the mouse hippocampus[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1993, 18(3): 267 - 272.

[11] 赵庆杰, 齐丹, 孟珊瑚, 等. γ-羟基丁酸对脑缺血再灌注后海马区 γ-氨基丁酸及其 A 型受体 α1 亚型的影响[J]中国临床康复, 2005, 9(45): 37 - 39.

[12] Loup F, Wieser H, Yonekawa Y, *et al*. Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy[J]. J Neurosci, 2000, 20(14): 5401 - 5419.

[13] 陈秀, 吴万福, 胡长林, 等. 缺氧性脑损伤对大鼠癫痫敏感性和脑内 PSD-95 表达的影响[J]第三军医大学学报. 2008, 30(14): 1353 - 1356.

[14] 王树人. 应激[M]//金惠铭, 王建枝. 病理生理学. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 127 - 140.

[15] 蒋文华. 海马结构[M]//蒋文华, 刘才栋. 神经解剖学. 上海: 复旦大学出版社, 2002: 369 - 377.

[16] Aldenhoff J B, Gruol D L, Rivier J, *et al*. Corticotropin releasing factor decreases postburst hyperpolarizations and excites hippocampal neurons[J]. Science, 1983, 221(4613): 875 - 877.

[17] Olijslagers J E, de-Kloet E R, Elgersma Y, *et al*. Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors [J]. Eur J Neurosci, 2008, 27(10): 2542 - 2550.

[18] Galanopoulou A S. GABA(A) Receptors in Normal Development and Seizures: Friends or Foes? [J]. Curr Neuropharmacol, 2008, 6 (1): 1 - 20.

(**收稿**:2009-11-30;**修回**:2010-03-21)

(编辑 邓强庭)