DOI:10.16016/j.2097-0927.202208025

脑创伤后 Reg3g 的表达及对早期癫痫发作的作用研究

周天钧,程赛宇 401120 重庆,重庆医科大学附属第三医院神经疾病中心

［摘要］ **目的** 探讨 Reg3g 信号激活在创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)脑组织中的时空表达规律和对 TBI 早期癫痫发作敏感性的影响。**方法** 采用控制性皮质撞击(controlled cortical impact, CCI)制备 TBI 模型,在分子与形态学实验中,60 只 C57BL/6N 野生型(wild type, WT)小鼠按照随机数字表法分为 4 组:sham 组、CCI 24 h 组、CCI 72 h 组、CCI 1 周组。通过 RT-PCR、Western blot、免疫荧光等方法检测 Reg3g 的时空表达规律。采用海人酸(kainic acid,KA)诱导癫痫,在脑创伤癫痫发作实验中,WT 小鼠和 Reg3g KO 小鼠各 30 只,按照随机数字表法分组,每组 15 只,分别为 WT(CCI)+NS 组、Reg3g KO(CCI)+NS 组、WT(CCI)+KA 组、Reg3g KO(CCI)+KA 组。在 CCI 基础上进行癫痫诱导发作,并记录在体脑电结果。**结果** ①与 sham 组相比,CCI 损伤侧皮层 24 h、72 h、1 周后,Reg3g 基因和蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);②免疫荧光结果显示,在 CCI 小鼠皮层组织,Reg3g 与 NeuN-阳性神经元完全共表达;③在生理盐水注射的 WT 和 Reg3g 基因敲除小鼠,并没有观察到明显的癫痫波。而在 KA 注射的 WT 小鼠和 Reg3g 基因敲除小鼠,可观察到明显的癫痫波。与 WT 小鼠相比,KA 注射的 Reg3g 基因敲除小鼠潜伏期明显缩短,总发作时间明显延长,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Reg3g 对 TBI 后早期癫痫发作起着明显的保护作用,Reg3g 可能是抑制 TBI 早期癫痫发作的重要调控靶点。

［关键词］ 脑创伤;Reg3g;癫痫发作;敏感性
［中图法分类号］ R651.15; R741.02; R742.1 ［文献标志码］ A

Expression of Reg3g after brain trauma and its effect on early epilepsy in mice

ZHOU Tianjun, CHENG Saiyu Center of Neurological Diseases, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401120, China

［**Abstract**］ **Objective** To investigate the temporal and spatial expression profile of Reg3g signal activation in traumatic brain injury (TBI) and its effect on early seizure sensitivity of TBI. **Methods** TBI model was established with controlled cortical impact (CCI). In molecular and morphological experiments, 60 C57BL/6N wild type (WT) mice were randomly divided into sham group, CCI 24-h group, CCI 72-h group and CCI 1-week group. The temporal and spatial expression of Reg3g was detected by RT-PCR, Western blotting and immunofluorescence assay. Epilepsy was induced by kainic acid (KA). In the brain trauma seizure experiment, 30 WT mice and 30 Reg3g KO mice were randomly divided into WT (CCI) + (normal saline, NS) group, Reg3g KO (CCI) + NS group, WT (CCI) + KA group and Reg3g KO (CCI) + KA group. Epileptic seizures were induced on the basis of CCI, and electroencephalography (EEG) was performed *in vivo*. **Results** ① Compared with the sham group, the mRNA and protein expression of Reg3g in the cortex of the CCI injured side was significantly increased in 24 and 72 h and 1 week after CCI ($P<0.01$). ② The results of immunofluorescence assay showed that Reg3g and NeuN were completely co-

［基金项目］ 国家自然科学基金面上项目(81671190)
［通信作者］ 程赛宇,E-mail: csy711@163.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

expressed in the neurons in the cortex of CCI mice. ③ No obvious epileptic waves were observed in WT and Reg3g KO mice injected with NS. Significant epileptic waves were observed in WT mice and Reg3g KO mice injected with KA. Compared with the WT mice, the latency of Reg3g KO mice injected with KA was significantly shorter and the total attack time was significantly longer ($P<0.05$). **Conclusion** Reg3g plays a significant protective role in early seizures after TBI, and it may be an important regulatory target to inhibit early seizures after TBI.

[**Key words**] traumatic brain injury; Reg3g; seizures; sensitivity

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81671190). Corresponding author: CHENG Saiyu, E-mail: csy711@163.com

创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)是由于头部受到外部直接或间接机械力而导致的暂时或永久性脑功能损伤,成为当前全球死亡和残疾的重要原因[1]。TBI 根据病程可以分为颅脑受到暴力作用时产生的不可逆性的原发性脑损伤和继发性脑损伤两个阶段。TBI 其原因、严重程度、发病机制和临床结果各不相同[2]。创伤后出现血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性增加、缺血缺氧所致的氧化应激反应、钙通道异常、神经炎症反应和谷氨酸兴奋性毒性等均是引起继发性脑损伤重要病理因素[3]。颅脑损伤涉及多因素和多机制,从而引起致癫痫的脑损害而形成创伤后癫痫,创伤后癫痫发作是 TBI 引起的常见并发症之一[4]。由于创伤后癫痫发作的机制仍然不完全明确,治疗仅限于传统的抗惊厥和抗癫痫药物,因此,针对创伤后癫痫的研究具有重要的科学意义[5]。

胰腺炎相关蛋白(pancreatitis-associated protein, PAP)家族是一组属于再生基因(regenerating gene, Reg)家族的小分泌蛋白,在结构上被归类为钙依赖型(c 型)凝集素[6]。根据基因序列及编码产物的差异,Reg 基因家族根据其一级结构分为 4 个亚型(Reg Ⅰ、Reg Ⅱ、Reg Ⅲ和 Reg Ⅳ)。其中,Reg Ⅲ (Reg3)基因又根据编码长度和蛋白构型差异分为 α、β、γ 和 δ 4 种[7]。这些蛋白质的表达模式和病理生理作用已在啮齿动物和人类中得到广泛研究。REG 家族蛋白作为多功能分泌分子,具有营养、调控凋亡和炎症等多种免疫调节作用。其最初发现于再生胰腺组织中,越来越多的证据阐明了 REG 家族在胃肠道的各种炎症性相关疾病(如人类克罗恩病和溃疡性结肠炎)以及类风湿性关节炎等动物模型中表达[7]。Reg3g 作为一种多功能蛋白,诸多研究发现其主要表达于周围神经组织神经元和中枢神经组织中[8-10],并且 Reg3g 在神经损伤后具有增强神经再生[11]等多种功能。这些研究说明,Reg3g 在神经系统的生理病理过程中起着重要的作用,但是在 TBI 中的作用和机制并不清楚。因此,本研究通过制备 TBI 模型,应用基因和蛋白检测,结合荧光等技术手段,初步探索 Reg3g 在 TBI 中的表达特点和分布规律;应用 Reg3g 敲基因小鼠观察 Reg3g 对 TBI 早期癫痫发作的保护作用。通过该研究可能为脑创性引发癫痫的分子机制提供初步的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8~12 周龄清洁级健康雄性 C57BL/6N 小鼠[重庆医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(京)2015-0001]和 Reg3g 全身敲除小鼠(陆军军医大学王法祥博士课题组)共 120 只,体质量 17~24 g,分笼饲养,普通饲料喂养,温度 20~22 ℃,湿度 65%~70%。所有操作符合动物伦理学要求。

1.2 动物分组与模型制备

在分子与形态学实验中,所有野生型(WT)C57BL/6N 小鼠按照随机数字表法分为 4 组:sham 组、CCI 24 h 组、CCI 72 h 组、CCI 1 周组各 15 只。在 TBI 癫痫发作实验中,WT 小鼠和 Reg3g KO 小鼠各 30 只,按照随机数字表法分组,每组 15 只,分别为 WT(CCI)+NS 组、Reg3g KO(CCI)+NS 组、WT(CCI)+KA 组、Reg3g KO(CCI)+KA 组。TBI 模型(controlled cortical impact, CCI)按照参考文献进行制备[12]。将小鼠麻醉后,剪去头部毛发,固定,根据脑图谱,以 Bregma 为原点,选择 AP=-2.0 mm、ML=-2.0 mm 为圆心,用颅骨钻打出 1 个直径 3 mm 圆,去除颅骨后,采用瑞沃德颅脑脊髓打击器,将 2 mm 直径的圆形打击棒调整对准颅骨上 3 mm 直径圆的中心。随后设置打击速度 3.8 m/s,打击深度 1 mm,打击停留时间 0.12 s,进行头部皮层打击,打击完成后用生理盐水清除血迹,缝皮、消毒后将实验动物放于麻醉苏醒监护笼内,保护体温复苏,待小鼠完全苏醒与开始活动后返回笼中单独饲养。假手术组除 CCI 损伤外,接受所有外科手术操作。

1.3 实验标本处理

根据不同时间点和要求取各实验组小鼠,断头取脑,剥离脑组织后,以撞击点为中心周围 3 mm×3 mm×2 mm 的整个皮层组织(包括打击部位及其周围区域)为取材部位。取材后的脑组织立即装入微量离心管内,放入液氮中保存。供 RT-PCR($n=6$)和 Western blot 检测($n=6$)。另取各组小鼠,使用生理盐水和 4%的多聚甲醛灌注后,固定 24 h,用 15%~30%的蔗糖梯度脱水沉底。冰冻切片机切片后进行免疫荧光染色($n=3$)。

1.4 RT-PCR 检测 Reg3g mRNA 转录水平

每组取 6 只 CCI 模型小鼠,每只小鼠的脑组织分别加入 TRIzol 试剂同时放入匀浆珠后,使用匀浆仪进行匀浆与裂解,加入 0.2 mL 氯仿后盖好盖,进行剧烈振荡,4 ℃,12 000×g 离心 10 min。离心后吸取上层透明水相加入同等体积异丙醇充分混匀,4 ℃,12 000×g 离心,去上清液以获得 RNA 沉淀。75%乙醇洗涤后加入适量的 Rnase-Free dd H_2O 充分溶解,获得总 RNA。Nanodrop 2000 分光光度计测定浓度以及 $D(260)/D(280)$ 比值为 1.8~2.0。按照 TaKaRa 逆转录试剂说明书进行 cDNA 逆转录。后继按照 TaKaRaTB Green 试剂说明书进行扩增。

引物序列:Reg3g 上游引物 5′-CGAATCCTTCCTCTTCCTC-3′,下游引物 5′-GCCTTGAATTTGCAGACAT-3′,扩增片断为 118 bp;β-actin 上游引物 5′-GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG-3′,下游引物 5′-ATGCCACAGGATTCCATACC-3′,扩增片断为 174 bp。PCR 反应条件如下:95 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。结果采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 RNA 的相对定量。

1.5 Western blot 检测 Reg3g 蛋白表达水平

每组取 6 只 CCI 模型小鼠,每只小鼠的脑组织分别加入 1 mL RIPA 裂解液和 10 μL 蛋白酶抑制剂(碧云天公司),同时放入匀浆珠后,使用匀浆仪进行匀浆与裂解。4 ℃,12 000×g 离心 10 min,取上清液。根据 BCA 法蛋白定量试剂盒说明书(碧云天生物技术公司,中国上海)测定蛋白浓度后,使用 loading buffer 按照一定比例稀释蛋白和进一步加热变性。蛋白量上样后恒压电泳(80 V)35 min,恒压电泳(120 V)45 min。PVDF 转膜后置于 0.05% TBST 溶解的 5%脱脂奶粉中,室温孵育 2 h 进行封闭。封闭结束后,加入一抗 Reg3g(1∶1 000,Sab,USA)和 GAPDH(1∶1 000,Abcam,USA)孵育,4 ℃过夜。次日,用 TBST 清洗 3 次,每次 10 min。加入 HRP 标记的二抗(1∶10 000,博士德生物技术公司,中国武汉),在室温条件下孵育 1 h。用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。使用 ECL 显影并采集图像,光密度(ImageJ 1.8.0)定量分析。

1.6 免疫荧光检测 Reg3g 的表达与定位

取 3 只 CCI 模型小鼠脑组织切片,每只小鼠取 3 片:①清洗:将-20 ℃冻存液中保存的脑片取出,室温复温 10 min,PBS 中摇洗 3 次,每次 3 min。②破膜:在 EP 管中加入 0.2% Triton X-100,并将脑片捞入 EP 管中浸没,室温 2 h,捞出脑片,PBS 洗 3 次,每次 3 min。③孵育一抗:将脑片捞入提前用 PBS 配好的荧光一抗兔抗 Reg3g(1∶50,LSbio,lot#LS-B15393),小鼠抗-NeuN(1∶50,EMD Millipore corp,USA,lot#2967854),对照组只加 PBS 溶液。将 EP 管放入 4 ℃过夜。④孵育二抗:将 EP 管中的脑片捞出 PBS 洗 3 次,每次 3 min,避光环境下再捞入 PBS 配制的荧光二抗,546 标记的驴抗兔 IgG(1∶200,Life technologies,USA,lot#1748346)和 647 标记的驴抗小鼠 IgG(1∶200,life technologies,USA,lot#1692912),37 ℃水浴锅中避光孵育 50 min。⑤避光滴加 DAPI 染核,37 ℃避光孵育 10 min,捞出脑片 PBS 洗 2 次,每次 3 min,避光环境下捞片,沥干多余水分,并用封片剂进行封片。片子略干后于镜下观察并采图。

1.7 早期癫痫发作易感性评估

评估 Reg3gKO 小鼠 CCI 损伤早期 KA 诱导癫痫发作易感性的影响。

(1)电极准备:使用 2 通道不锈钢绝缘电极,并将绞合的双极线植入到右侧皮层位置[13][bregma(mm):nose bar 0,anteroposterior -1.5,lateral 1.2,dorsoventral 1.0)]。电极和套管用丙烯酸牙科接合剂牢牢地固定在头盖骨,并通过硬膜外螺钉固定电极。植入完成后,动物返回笼中恢复。

(2)药物注射和行为学检测:每组 15 只小鼠,在 WT 型小鼠和 Reg3g KO 小鼠 CCI 损伤后 7 d 进行,早上禁食约 2 h。KA 组使用海人酸(kainic acid,KA,Sigma-Aldrich,St. Louis,MO)诱发癫痫发作。KA(5 mg/kg)溶解在生理盐水中并通过腹膜内注射递送。NS 组只注射生理盐水。将每只小鼠置于观察笼子中,记录脑电的同时,进行行为学观察,观察 90 min 以评估癫痫发作的严重程度。参照 Racine 评级标准评定实验动物癫痫发作行为表现;Ⅰ级:节律性口角、耳或面部抽动;Ⅱ级:点头,尾巴僵硬或甩尾并伴更严重的面部抽动阵挛;Ⅲ级:出现前肢肌阵挛但不伴直立;Ⅳ级:多肢抽动或强直;Ⅴ级:站立,全面性强直-阵

挛发作,失去平衡而跌倒。

(3)脑电(electroencephalogram,EEG)记录与评估:癫痫发作是在自由移动的小鼠脑部中测定的,这些动物脑部电极系统通过万向轴输送至记录与处理系统。采用 RM6240E 多通道生理信号软件记录脑电图同步活动,主要观察潜伏期时间,癫痫发作持续时间[13-14]。癫痫波特点:与基线相比,具有 200~600 μV 高尖锐波特征,这些波形或为分离形式,或为成簇出现(3~5 Hz,4~10 s),部分平均持续时间为 20~60 s 的阵发性放电。根据文献[15]报道,以注射药物后检测到的第 1 个癫痫波的时间段为潜伏期。

1.8　统计学分析

用 SPSS 13.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组比较采用独立样本 t 检验,多组间行单因素方差齐性检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　CCI 后 KA 诱导的急性发作期行为学变化

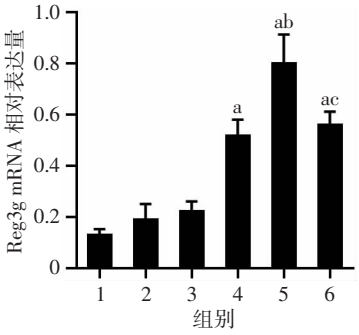
所有 CCI 后小鼠注射 KA,均出现癫痫活动相关的行为学改变,如颤动、面部肌肉肌阵挛的自动咀嚼、运动不能和湿狗样抖动等表现。WT 组和 Reg3g KO 小鼠组发作分级见表 1。与 WT 型小鼠相比,Reg3g KO 小鼠组 Racine 分级明显增高。

表 1　WT(CCI)组和 Reg3g KO(CCI)组急性发作期 Racine 分级百分比(%,$n=15$)

组别	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
WT+NS 组	0	0	0	0	0
Reg3g KO+NS 组	0	0	0	0	0
WT+KA 组	46.67	26.67	26.67	0	0
Reg3g KO+KA 组	0	0	13.33	26.67	60.00

2.2　Reg3g 在 WT 小鼠 CCI 模型不同时间点的 mRNA 表达

应用 RT-PCR 技术,通过对 WT 小鼠 sham 组、CCI 对侧皮层不同时间点组、CCI 损伤侧皮层不同时间点组的 Reg3g mRNA 检测,发现 Reg3g mRNA 在 sham 组的表达较弱,而 CCI 损伤侧 24 h、72 h、1 周后 Reg3g mRNA 表达明显升高($P<0.01$)。与 CCI 损伤侧 24 h 相比,72 h 皮层 Reg3g mRNA 表达进一步升高($P<0.01$)。结果还显示,CCI 1 周损伤侧皮层的 Reg3g 表达水平与 CCI 24 h 相比差异无统计学意义,但明显低于 CCI 72 h 损伤侧($P<0.05$,图 1)。结果表明,在 CCI 模型不同时间点,Reg3g 基因有不同程度的升高,TBI 在进展过程中影响了 Reg3g 的基因表达。

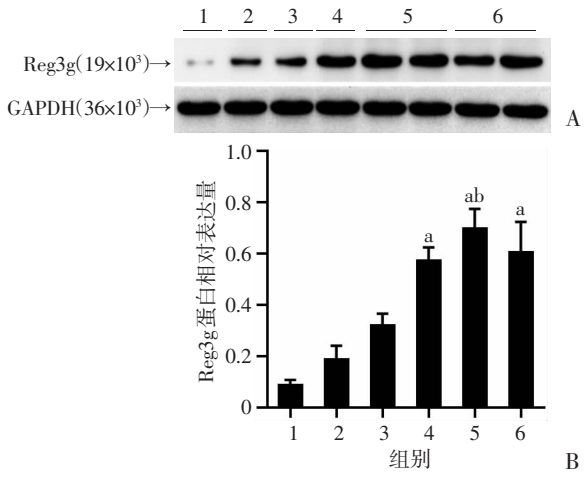


1:Sham;2:CCI 24 h 对侧;3:CCI 72 h 对侧;4:CCI 24 h 损伤侧;5:CCI 72 h 损伤侧;6:CCI 1 w 损伤侧;a:$P<0.01$,与 Sham 比较;b:$P<0.01$,与 CCI 24 h 损伤侧比较;c:$P<0.05$,与 CCI 72 h 损伤侧比较

图 1　RT-PCR 检测 Reg3g 在各组皮层中的 mRNA 表达($n=6$)

2.3　Reg3g 在 WT 小鼠 CCI 模型不同时间点的蛋白表达

使用 Western blot 检测技术,进一步观察 WT 小鼠 sham 组、CCI 损伤侧组和 CCI 对侧组不同时间点皮层组织的 Reg3g 蛋白表达。结果显示,sham 组也存在较弱的 Reg3g 蛋白表达,在 CCI 损伤侧皮层 24 h、72 h 和 1 周 Reg3g 蛋白表达明显升高($P<0.01$)。尽管 CCI 1 周损伤侧皮层的 Reg3g 蛋白表达水平明显升高,但与 CCI 24 h 损伤侧和 72 h 损伤侧表达比较差异无统计学意义(图 2)。结果表明,在 TBI 发病过程中,Reg3g 蛋白表达增强,Reg3g 参与了 TBI 的发病过程。



1:Sham;2:CCI 24 h 对侧;3:CCI 72 h 对侧;4:CCI 24 h 损伤侧;5:CCI 72 h 损伤侧;6:CCI 1w 损伤侧;a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 CCI 24 h 损伤侧比较

图 2　Western blot 检测 Reg3g 在各组皮层中的蛋白表达($n=6$)

2.4 Reg3g 在模型鼠脑组织中的表达与定位

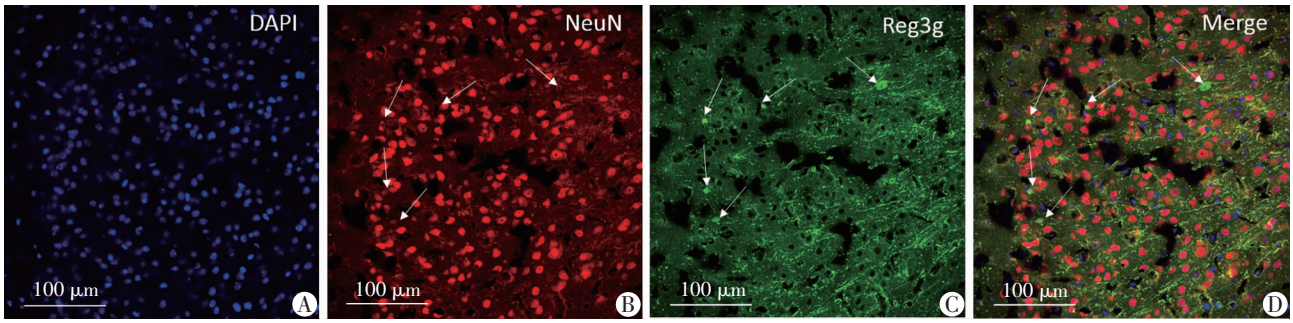
为进一步明确 Reg3g 表达与细胞定位情况,使用免疫荧光技术,检测 Reg3g 与神经元标记蛋白 NeuN 的细胞共定位表达。免疫荧光染色显示,在 CCI 小鼠皮层组织,Reg3g 与 NeuN-阳性神经元完全共表达(图 3)。结果表明,在脑创伤后组织中,Reg3g 主要表达于神经元胞体中。

2.5 Reg3g 对脑创伤急性期癫痫发作敏感性影响

在 CCI 模型基础上,进一步检测对癫痫发作的敏感性(潜伏期,latency)影响,以明确 Reg3g 在 TBI 早期癫痫发作中的功能特点。如图 4 所示,在生理盐水注射的 WT 小鼠和 Reg3g 基因敲除小鼠,并没有观察到明显的癫痫波。而在 KA 注射的 WT 小鼠和 Reg3g 基因敲除小鼠,可以观察到明显的癫痫波,并且与 KA 注射的 WT 小鼠相比,KA 注射的 Reg3g 基因敲除小鼠的潜伏期明显缩短($P<0.05$),发作总持续时间明显延长($P<0.05$)。结果显示,Reg3g 基因敲除小鼠在 KA 诱导的急性癫痫发作痫样放电潜伏期明显缩短,放电明显增加,提示 Reg3g 基因在 TBI 早期癫痫发作敏感性中起着重要的作用。

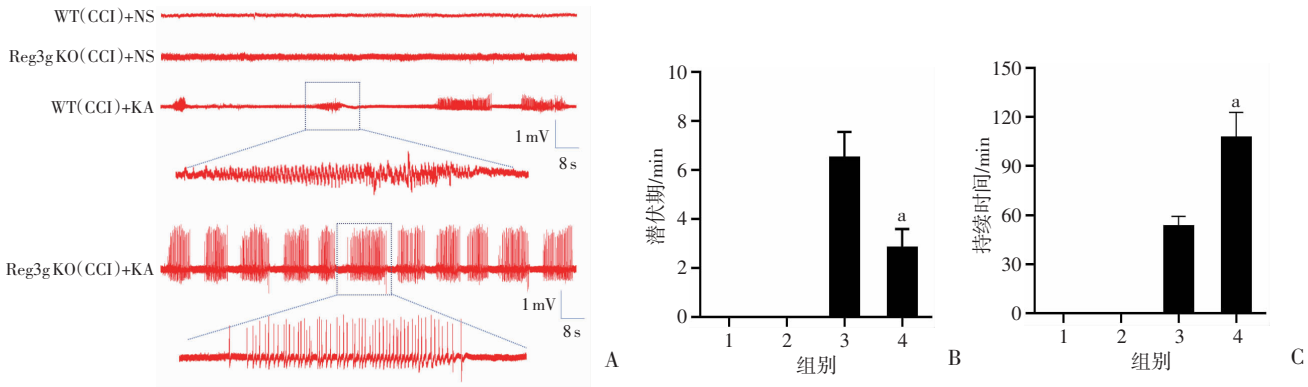
3 讨论

创伤性脑损伤(TBI)不仅是导致年轻人发病和死亡的主要原因,而且还是癫痫发作的主要原因。创伤后的早期癫痫在脑损伤后 1 周内即可发生,其发生率为 4.4%~53%,约 25%经历过早期创伤后癫痫发作的患者会在数月或数年后再次癫痫发作[16]。TBI 诱导的癫痫发作通常对传统抗癫痫药物具有抗药性,因此了解 TBI 后的癫痫发作诱导机制至关重要。此外,早期的创伤后癫痫发作在 TBI 诸多病理机制中起着重要的作用。因此,控制创伤后癫痫发作至关重要,但其机制目前仍不明确。本研究通过制备 TBI 模型,应用 RT-PCR 和 Wstern blot,结合免疫荧光等技术手段,发现 Reg3g 在 TBI 组织中呈现基因和蛋白高表达特点,并



A:DAPI; B: NeuN 箭头示与 Reg3g 表达重叠的 NeuN-阳性神经元; C: Reg3g 箭头示 Reg3g 表达;D:Merge 箭头示 Reg3g 与 NeuN-阳性神经元共表达

图 3 Reg3g 在 CCI 模型小鼠脑组织中的细胞表达与定位



A:WT 和 Reg3g KO 的 CCI 模型小鼠注射生理盐水(NS 组)或海人酸(KA 组)后的在体脑电;B、C:WT 和 Reg3g KO 的 CCI 模型小鼠注射 NS 或 KA 在体脑电的潜伏期时间(B)和持续时间(C) 1:WT(CCI)+NS;2:Reg3g KO(CCI)+NS;3:WT(CCI)+KA;4:Reg3g KO(CCI)+KA ;a:$P<0.05$,与 WT(CCI)+KA 组小鼠比较

图 4 KA 诱导的 CCI 模型小鼠脑电记录

且主要表达于神经元胞体中。同时,Reg3g 基因敲除后明显增强了 TBI 后早期癫痫发作的敏感性。本研究数据支持神经源性的 Reg3g 在 TBI 病理过程中起着较强的保护作用这一论点。本研究初步提示,Reg3g 可作为抑制 TBI 诱发癫痫发作的潜在新靶点。

Reg3g 在神经系统中的表达和功能目前已经有一定的研究和探索,表现在外周和中枢均有表达。首先,诸多研究证实 Reg3g 在外周神经组织中能够诱导表达。在外周组织炎症和神经损伤后,背根神经节(DRG)神经元中强烈诱导 Reg3g 的表达,说明其在受损的周围神经中能够被诱导,其中雪旺细胞被认为是 Reg3g 表达的主要来源[10]。其次,Reg3g 在中枢神经组织中也能够被诱导表达。有研究通过对 TBI 模型等大鼠脑组织检测发现,TBI 周围区域内 Reg3g 蛋白表达明显升高[8,17]。为了探索 Reg3g 在 TBI 中的作用,本研究首先检测了 Reg 蛋白家族成员 Reg3g 在 TBI 脑组织中的基因和蛋白表达特点。通过检测 Reg3g 基因和蛋白结果发现,Reg3g 的表达不仅在第 1 天显著升高,而且在创伤后 1 周仍保持升高。以往的报道已经证实,IL-6 在癫痫组织中明显高表达,作为炎症因子在癫痫发作与病理形成过程中起着重要的作用[18]。另有报道 Reg3g 为 IL-6 上调"次级"信号因子,因此,我们推测 Reg3g 表达上调可能与 IL-6 的调控有关[19]。这些结果说明,Reg3g 强烈高表达在 TBI 中具有重要的作用。

诸多研究证明,Reg 基因与不同细胞类型中的表达和再生、细胞生长和存活、细胞黏附和凋亡等密切相关[20]。Reg3g 在外周神经系统中的表达得到广泛论证,但是 Reg3g 在中枢神经中的细胞定位特点尚无文献报道。在本研究中,使用免疫荧光双染发现,在 TBI 脑皮层组织中,Reg3g 主要表达于神经元标记蛋白 NeuN 阳性的神经元细胞中。有研究证明 Reg3g 可作为巨噬细胞的化学吸引介质,用于去除髓鞘和轴突碎片,而这种功能是神经再生的关键环节,这些现象表明神经元中高表达的 Reg3g 可能是去除神经元髓鞘和轴突碎片的关键作用所在,Reg3g 在周围神经再生过程中具有重要的作用[10-11]。先前的研究揭示 Reg3g 在胰腺炎的进展中起主要作用,其已被描述为肝脏和肠黏膜细胞中的生长因子以及胰腺腺泡细胞中的抗凋亡因子[20]。由于在 KA 诱导的癫痫模型能够诱导 Reg3g 的表达[17],据此我们推测 Reg3g 可能在 TBI 后早期癫痫发作中也起着重要的作用。本研究进一步通过制备 TBI 模型和诱导癫痫发作发现,Reg3g 基因敲除明显缩短了早期癫痫发作的潜伏期,Reg3g 的缺失使癫痫发作易感性得到了增强。前述研究结果说明,Reg3g 在 TBI 癫痫发作过程中起着重要的调控神经元兴奋性的作用。推测可能的原因:①Reg3g 与 IL-6 的相关性[19],考虑在癫痫过程中,细胞因子等的启动作用,Reg3g 通过进一步的自分泌和旁分泌以发挥短期控制和长期影响的作用,以进一步调控受损的神经元生长、分化和存活脑区;②由于神经元树突棘是兴奋性突触后结构的基础,动态变化是影响神经元突触重塑及放电环路形成,进而影响神经电活动和癫痫形成中最重要的病理改变[21]。而 Reg3g 明显高表达于神经元的特点可能在癫痫发作中影响神经元树突棘,进而在影响神经元兴奋性中起着重要的作用。另外,本研究中形态学特点显示 Reg3g 除了表达于神经元胞体外,也可能显示表达于神经元轴突。由于 Reg3g 抗体等实验限制,本研究尚未对其树突棘的确切定位进行论证,但这种影响作用仍然值得进一步探索与揭示。

综上所述,本研究通过制备 TBI 模型,检测了 TBI 后 Reg3g 基因和蛋白明显高表达,并且 Reg3g 主要高表达于神经元胞体,Reg3g 基因敲除明显缩短了 TBI 后早期癫痫发作的潜伏期,初步揭示了 Reg3g 在 TBI 后早期癫痫发作中起着明显的保护作用。但对于 TBI 后继的病理因素及 Reg3g 对自发性癫痫发作的行为、脑电等影响仍需进一步研究。

参考文献:

[1] The Lancet Neurology. The future research path of traumaticbrain injury [J]. Lancet Neurol, 2022, 21(4): 295. DOI: 10.1016/S1474-4422(22)00089-8.

[2] MAAS A I R, FITZGERALD M, GAO G Y, *et al*. Traumatic brain injury over the past 20 years: research and clinical progress[J]. Lancet Neurol, 2022, 21(9): 768-770. DOI: 10.1016/S1474-4422(22)00307-6.

[3] BRETT B L, GARDNER R C, GODBOUT J, *et al*. Traumatic brain injury and risk of neurodegenerative disorder [J]. Biol Psychiatry, 2022, 91(5): 498-507. DOI: 10.1016/j.biopsych.2021.05.025.

[4] BURKE J, GUGGER J, DING K, *et al*. Association of posttraumatic epilepsy with 1-year outcomes after traumatic brain injury [J]. JAMA Netw Open, 2021, 4(12): e2140191. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.40191.

[5] GOLUB V M, REDDY D S. Post-traumatic epilepsy and comorbidities: advanced models, molecular mechanisms, biomarkers, and novel therapeutic interventions [J]. Pharmacol Rev, 2022, 74(2): 387-438. DOI: 10.1124/

pharmrev. 121. 000375.

[6] YU J H, LIM J W, KIM H. Pancreatitis-associated protein-1 suppresses apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells in response to nuclear factor-kappa B activation[J]. J Physiol Pharmacol, 2019, 70(6): 2019, 70(6). DOI:10.26402/jpp.2019.6.04.

[7] SUN C, WANG X Y, HUI Y Y, *et al*. The potential role of REG family proteins in inflammatory and inflammation-associated diseases of the gastrointestinal tract[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 7196. DOI:10.3390/ijms22137196.

[8] AMPO K, SUZUKI A, KONISHI H, *et al*. Induction of pancreatitis-associated protein (PAP) family members in neurons after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(10): 1683-1693. DOI: 10.1089/neu.2008.0847.

[9] HE S Q, YAO J R, ZHANG F X, *et al*. Inflammation and nerve injury induce expression of pancreatitis-associated protein-II in primary sensory neurons[J]. Mol Pain, 2010, 6: 23. DOI:10.1186/1744-8069-6-23.

[10] NAMIKAWA K, FUKUSHIMA M, MURAKAMI K, *et al*. Expression of Reg/PAP family members during motor nerve regeneration in rat[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(1): 126-134. DOI:10.1016/j.bbrc.2005.04.105.

[11] NAMIKAWA K, OKAMOTO T, SUZUKI A, *et al*. Pancreatitis-associated protein-III is a novel macrophage chemoattractant implicated in nerve regeneration[J]. J Neurosci, 2006, 26(28): 7460-7467. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0023-06.2006.

[12] RAMIREZ S, MUKHERJEE A, SEPULVEDA S, *et al*. Modeling traumatic brain injury in human cerebral organoids[J]. Cells, 2021, 10(10): 2683. DOI: 10.3390/cells10102683.

[13] CHEN K D, HALL A M, GARCIA-CURRAN M M, *et al*. Augmented seizure susceptibility and hippocampal epileptogenesis in a translational mouse model of febrile status epilepticus[J]. Epilepsia, 2021, 62(3): 647-658. DOI:10.1111/epi.16814.

[14] WANG F X, YANG X L, MA Y S, *et al*. TRIF contributes to epileptogenesis in temporal lobe epilepsy during TLR4 activation[J]. Brain Behav Immun, 2018, 67: 65-76. DOI:10.1016/j.bbi.2017.07.157.

[15] WANG F X, XIONG X Y, ZHONG Q, *et al*. Foxp3 exhibits antiepileptic effects in ictogenesis involved in TLR4 signaling[J]. FASEB J, 2017, 31(7): 2948-2962. DOI: 10.1096/fj.201600989r.

[16] MARIAJOSEPH F P, CHEN Z B, SEKHAR P, *et al*. Incidence and risk factors of posttraumatic epilepsy following pediatric traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis[J]. Epilepsia, 2022, 63(11): 2802-2812. DOI:10.1111/epi.17398.

[17] KAWAHARA S, KONISHI H, MORINO M, *et al*. Pancreatitis-associated protein-I and pancreatitis-associated protein-III expression in a rat model of kainic acid-induced seizure[J]. Neuroscience, 2011, 175: 273-280. DOI:10.1016/j.neuroscience.2010.11.020.

[18] ALVIM M K M, MORITA-SHERMAN M E, YASUDA C L, *et al*. Inflammatory and neurotrophic factor plasma levels are related to epilepsy independently of etiology[J]. Epilepsia, 2021, 62(10): 2385-2394. DOI:10.1111/epi.17023.

[19] KUNZ D, WALKER G, BEDOUCHA M, *et al*. Expression profiling and Ingenuity biological function analyses of interleukin-6- versus nerve growth factor-stimulated PC12 cells[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 90. DOI:10.1186/1471-2164-10-90.

[20] KLASAN G S, IVANAC D, ERZEN D J, *et al*. Reg3G gene expression in regenerating skeletal muscle and corresponding nerve[J]. Muscle Nerve, 2014, 49(1): 61-68. DOI:10.1002/mus.23877.

[21] FUKATA Y, FUKATA M. Epilepsy and synaptic proteins[J]. Curr Opin Neurobiol, 2017, 45: 1-8. DOI:10.1016/j.conb.2017.02.001.

(**收稿**:2022-08-03;**修回**:2022-10-12)

(编辑 张 维)