基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0129-06

皮质发育障碍模型鼠海马区神经元凋亡机制的研究

黄 华,冯占辉,何选丽,黄 敏,晏 勇
(重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨皮质发育障碍(Disorder of cortical developments,DCDs)模型鼠海马神经元的凋亡机制。方法:利用卡莫司汀(BCNU)诱导建立 SD 大鼠皮质发育障碍动物模型,在出生后 0 d(P0)、15 d(P15)、30 d(P30)、45 d(P 45)和 60 d(P 60)时,采用 TUNEL 检测海马区神经元凋亡,RT-PCR 方法和免疫组化分别对 8 只模型鼠和正常鼠检测海马区 Bcl-2 和 Bax 的在 mRNA 和蛋白水平的表达,并结合图像分析系统进行结果分析。结果:成功建立 SD 大鼠皮质发育障碍动物模型;与对照组比较,TUNEL、免疫组化和 RT-PCR 检测结果显示:P0 模型鼠组海马区神经元凋亡无明显变化,P15、P30、P45、P60 模型组神经元凋亡逐渐加重,有显著差异($P<0.05$),且随存活时间延长,模型组海马神经元 Bax 表达逐渐增强,Bax/Bcl-2 比值较对照组增高,具有显著统计学意义($P<0.05$)。结论:皮质发育障碍模型鼠海马区存在显著的神经元凋亡,Bcl-2 和 Bax 参与了其凋亡过程;皮质发育障碍模型鼠海马神经元凋亡可能参与了皮质发育障碍所致的癫痫及难治性癫痫的发病机制。

【关键词】皮质发育障碍;细胞凋亡;Bax;Bcl-2;癫痫
【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-18

Mechanism of apoptosis in hippocampus of the rats with disorder of cortical developments

HUANG Hua ,et al
(*Department of Neurology,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To study the mechanism of apoptosis in hippocampus of the rats with disorder of cortical developments. *Methods*: The Rats with disorder of cortical developments were established by carmustine (BUCN). AT P0,P15,P30,P45,P60,the number of apoptosis cell and expression of Bax and Bcl-2 in hippocampus were detected by TUNEL,immunohistochemistry method and RT-PCR; then the detected outcomes were analyzed by computer micrograph analysis system in control group and model group. *Results*:At P15, P30,P45,P60,the numbers of apoptosis,Bax,Bcl-2 masculine cell and bcl-2 MRNA,bax MRNA in hippocampus in the model group were more than those in the control group. The ratio of Bax/Bcl-2 in model group was significantly higher than those in the control group ($P<0.05$),but at P0,they were not different. *Conclusion*:Apoptosis exist notably in hippocampus of rat with disorder of cortical developments. bcl-2 and bax probably play a role in apoptosis. Apoptosis may be associated with the pathogenesis of epilepsy or intractable epilepsy.

【Key words】Disorder of cortical developments;Cell apoptosis;Bax;Bcl-2;Epilepsy

皮质发育障碍(Disorder of cortical developments,DCDs)是难治性癫痫的主要病因之一,但其发病机制仍不清楚。目前认为难治性癫痫的发病机制有[1~5]:①多药耐药基因在脑组织高表达;②抗癫痫药物作用靶点的改变;③免疫学异常;④突触传递功能的异常;⑤神经网络以及环路重组等,其中神经元凋亡在神经网络以及环路的重组发挥了重要作用。我们在前期的研究中发现 DCDs 模型鼠海马线性结构中断,锥体细胞丢失,这表明在海马区可能存在着细胞凋亡(Apoptosis),而这种凋亡也可能导致了海马结构和神经环路的重组[6]。DCDs 模型鼠海马区神经元的凋亡值得深入研究。因此,本实验拟用卡莫司汀诱导建立 SD 大鼠皮质发育障碍模型,分别采用 TUNEL 检测海马区神经元细胞的凋亡情况,RT-PCR 方法和免疫组化检测 bcl-2 和 bax 在 mRNA 和蛋白水平的表达,进而分析 DCDs 鼠海马神经元凋亡及其机制,并探讨 DCDs 模型鼠海马神经元凋亡在 DCDs 导致癫痫及难治性癫痫发病机制中的作

作者介绍:黄 华(1974-),男,主治医师,博士,研究方向:皮质发育障碍与难治性癫痫。
通讯作者:晏 勇,男,教授,E-mail: yyanpro@21cn.com 。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570636)。

用。

1 材料与方法

1.1 模型制作

孕 17 d 的 10 只 SD 大鼠（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），体重 290～320 g。随机抽取 5 只用于建立 DCDs 模型，按照 Benardete 等介绍的方法[7]加以改进，在孕 17 d 向 SD 孕鼠腹腔注射卡莫司汀（15 mg/kg，用生理盐水稀释至 4 mg/ml）；另 5 只作正常对照组，腹腔注射等量生理盐水。处理后将孕鼠放回笼中正常喂养待其分娩。5 只注药孕鼠共产仔鼠 53 只、存活 48 只；注入生理盐水孕鼠产仔鼠 60 只，存活 58 只。随机抽取模型组仔鼠和正常仔鼠各 40 只，分为 P0、P15、P30、P45、P60 共 5 组，每个时间点各 8 只。

1.2 子代大鼠生长发育和一般行为学观察

于 P0、P15、P30、P45 和 P60 各时间点测量各组仔鼠体重，每天 8AM 至 6PM 观察仔鼠有无异常行为、自发癫痫发作等。

1.3 病理学检查

分别于 P0、P15、P30、P45 和 P60 各时间点随机取 4 只模型组和 4 只对照组仔鼠，经腹腔注射 1%戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉动物。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 4 μm 的石蜡切片并染色。

1.4 TUNEL 检测海马神经元凋亡

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）。显微镜观察，细胞核内出现凋亡小体（细胞核中可见的棕黄色小体即为凋亡小体）即为阳性细胞，选取海马神经细胞分布均匀的视野，在 40 倍物镜下计数 10 个视野凋亡细胞数，以此作为海马神经细胞凋亡指数（Apoptosis index，AI）。

1.5 免疫组化 ABC 法检测 Bcl-2、Bax 表达

标本制作同上，按常规操作，工作浓度：Bcl-2 为 1∶100，Bax 为 1∶200。试剂一抗（多克隆抗鼠 Bcl-2、Bax 抗体及检测试剂（武汉博士德公司），操作按说明书进行。采用 Mias-2000 图像分析系统对免疫组化染色的切片进行图像分析，胞质染成棕黄色即为阳性。

1.6 RT-PCR 方法检测海马区的 bcl-2 mRNA、baxmRNA 的表达

1.6.1 在出生后 0 d、15 d、30 d、45 d 和 60 d 各时间点，给予模型组仔鼠和对照组仔鼠各 4 只腹腔注射 1%戊巴比妥钠 40 mg/kg，麻醉成功后立即断头取脑，分离出海马组织后立即放在液氮中保存。

1.6.2 RNA 提取、纯化及 cDNA 合成抽提 RNA 时每例标本取 200 mg 组织置于液氮中，击碎，加入 1 ml Trizol Reagenl 试剂（GIBCO BRI 公司），匀浆后按说明书提取组织总 RNA，并用寡聚（dT）纤维素进行纯化，最后，用 Reverse Transcription 试剂盒（Invitrogen 公司）将 RNA 反转录成 cDNA。

1.6.3 引物设计、合成及 PCR 反应：引物设计及合成由上海博亚生物工程公司完成，RT-PCR 引物根据 GenBank 中 bax 基因（基因号：NM017059）、bcl-2 基因（基因号：L14680）、GAPDH（基因号：M17701）用 DNAMAN 4.0 程序设计如下：

表 1 RT-PCR 引物设计及合成程序

	引物序列	扩增产物(bp)
bax	5'-CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC-3'	377
	5'-TGAGGACTCCAGCCACAAAGA-3'	
bcl-2	5'-CCGGGAGATCGTGATGAAGT-3'	546
	5'-ATCCCAGATCGTGATGAAGT-3'	
GAPDH	5'-GGCTGAGAATGGGAAGCTGGTCAT-3'	152
	5'-CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'	

1.6.4 RT—PCR 按照 Invitrogen 公司一步法 RTPCR 试剂盒（SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq kit）说明书，在冰上依次加入 12.5 μl 2×buffer，1.0 μl 总 RNA，0.5 μl 正向引物，0.5 μl 反向引物，0.5 μl ssRT/Taq 酶混合物，10 μl DEPC 水，总体积为 25 μl。在 PE-2400 DNA 扩增仪上进行 RT-PCR：50℃ 30 min 合成 cDNA，94℃ 2 min 预变性并活化 Platinure Taq，之后按 94℃45 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，进行扩增，30 个循环，最后 72℃延伸 7 min。RT-PCR 产物用 1.5% Agrose 电泳分离鉴定，所有操作均在完全相同条件下进行。

1.6.5 半定量分析 电泳结果经 GeneSnaI（SynGene.Version 5.00.09）成像后用 GeneToots（SynGene1.Version 3.00.22）进行半定量分析，曲线下峰面积作为 PCR 产物含量，用目的基因（bax、bcl-2）与同一标本内参照基因（GAPDH）积分值之比，表示该基因 mRNA 相对表达水平。

1.7 统计学分析

采用 SPSS10.0 软件进行统计处理，RT-PCR 检测的实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间的表达差异应用成组 t 检验进行分析，$P<0.05$ 为显著性差异。用计算机显微图像分析系统观察

TUNEL 阳性细胞、Bax、Bcl-2 阳性细胞分布，计算阳性细胞数，各组测定数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，进行方差分析，$P<0.05$ 为显著性差异。

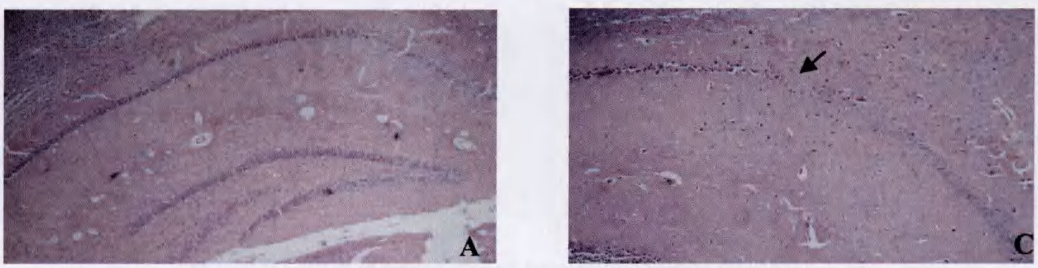
2 结 果

2.1 一般行为学观察

模型组仔鼠体型较小，活动量减少，轻度嗜睡、灵活性降低等表现，但试验过程中未观察到自发性癫痫发作。

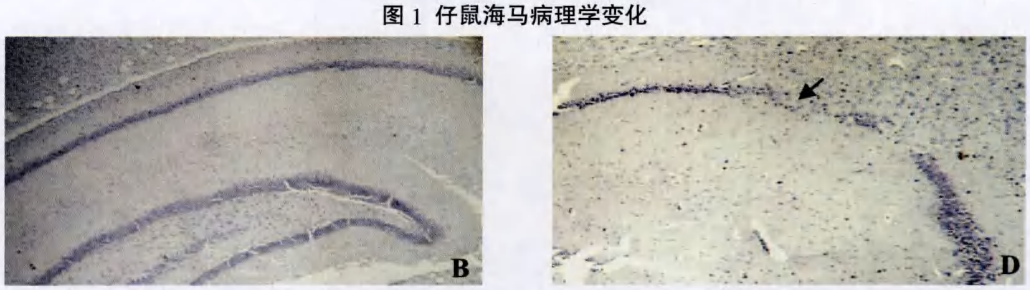
2.2 病理检查

HE 和尼氏染色显示对照组仔鼠海马各区线型结构清楚，无异位细胞出现（图 1A、图 2B）。模型组仔鼠海马 CA1~CA2 区线型结构模糊、中断，异位神经元呈簇状堆积，扰乱锥体细胞层，可见海马神经元呈结节状异位（图 1C、图 2D 箭头所示）



A. 对照组 C. 模型组（HE × 100） ↑表示海马异位神经元

图 1 仔鼠海马病理学变化

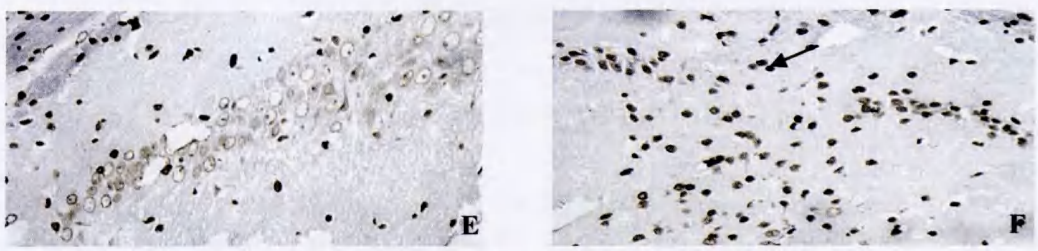


B. 对照组 D. 模型组（Nissel × 100） ↑表示海马异位神经元

图 2 仔鼠海马病理学变化

2.3 海马神经元凋亡

光镜下观察，TUNEL 染色阳性凋亡神经元的细胞核呈棕黄色，神经元体积缩小，呈三角形或扇形，核固缩深染，核内染色质浓聚，染色质浓集于核周，呈新月形、环形、长条形、块状小体甚至形成核碎片。而阴性神经元的胞核则不显示黄色，神经元形态正常故较易区别。TUNEL 结果显示，在对照组仔鼠 P0 和 P15 海马未见 TUNEL 阳性细胞，P30、P45 和 P60 可见少量 TUNEL 标记细胞（见图 3E）。模型鼠仔鼠海马在 P0 时未见 TUNEL 阳性细胞，P15、P30、P45 和 P60 时可见 TUNEL 阳性细胞，且随鼠龄增长逐渐增多（见图 3F）。除 P0 之外，其余各时间点的模型仔鼠海马 TUNEL 阳性细胞均较同龄对照组显著增多，有统计学意义（$P<0.05$）见表 1。

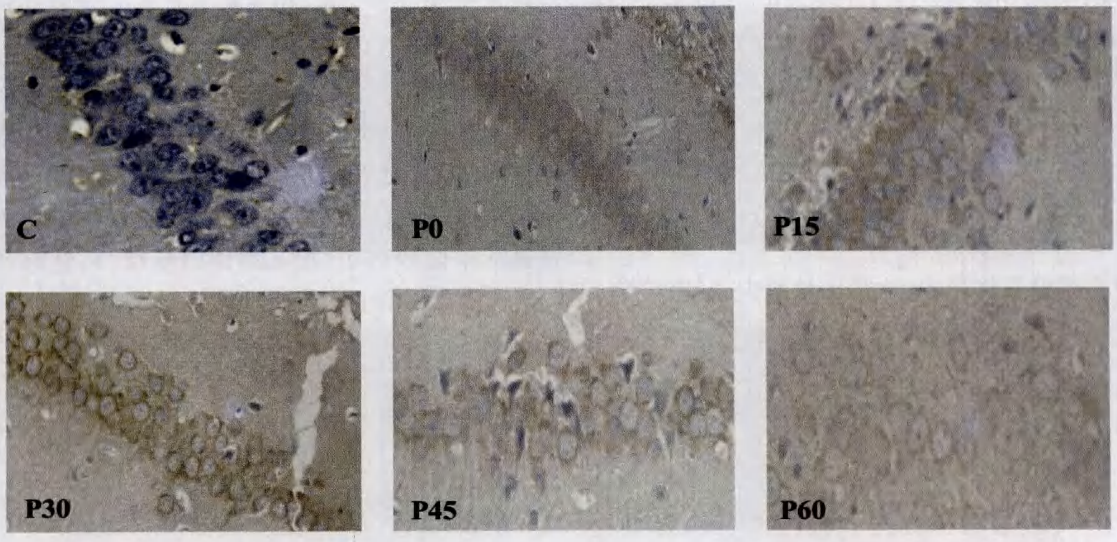


E. 对照组 F. 模型组（TUNEL × 200） ↑ 表示海马异位神经元

图 3 海马凋亡细胞

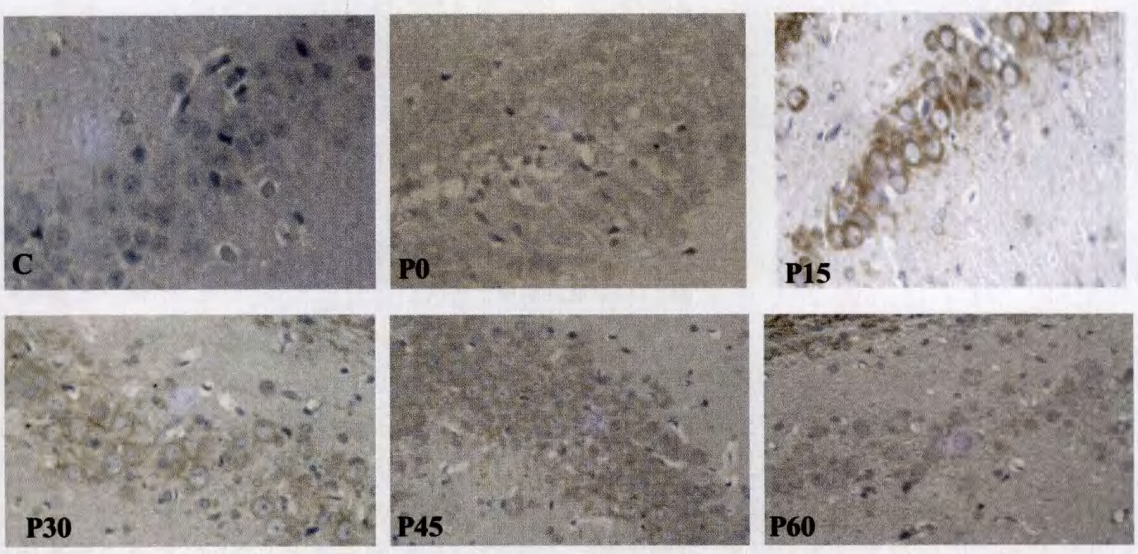
2.4 Bax 和 Bcl-2 蛋白在 DCDs 鼠海马的表达

在出生后 0 d 的模型鼠海马中 Bax 和 Bcl-2 未见表达，与对照组相比无显著差异；在 P15、P30、P45 和 P60 各时间点，模型鼠海马中 Bax 和 Bcl-2 的表达均较对照组增多，以及 Bax/Bcl-2 均较对照组有显著统计学差异（$P<0.05$），且随存活时间延长，Bax 逐渐增强，Bcl-2 在 P30 达到高峰后平稳下降。（见图 4、5，表 1）。



C. 对照组　P0、P15、P30、P45、P60 相应时间点的模型组（DAB × 200）

图 4　Bax 蛋白在海马的表达



C. 对照组　P0、P15、P30、P45、P60 相应时间点的模型组（DAB × 200）

图 5　Bcl-2 蛋白在海马的表达

表 1　海马神经细胞凋亡指数及 Bcl-2、Bax 表达（$\bar{x}\pm s$，n=10）

时间	对照组				模型组			
	AI	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2	AI	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
P0	10.21 ± 3.45	36.34 ± 4.21	44.45 ± 4.12	0.81	12.32 ± 4.11	39.46 ± 6.23	45.22 ± 7.22	0.87
P15	13.23 ± 3.67	46.27 ± 5.78	53.24 ± 3.18	0.86	28.53 ± 2.56*	119.30 ± 4.78*	89.27 ± 7.89*	1.33*
P30	17.56 ± 4.55	50.35 ± 2.16	57.35 ± 2.34	0.87	34.38 ± 2.67*	147.22 ± 8.34*	102.35 ± 3.89*	1.43*
P45	19.78 ± 6.22	65.67 ± 3.68	73.45 ± 3.67	0.89	40.73 ± 3.22*	158.32 ± 8.56*	110.32 ± 9.56*	1.43*
P60	22.25 ± 4.88	74.45 ± 2.77	80.56 ± 7.34	0.92	48.92 ± 5.88*	170.78 ± 7.89*	102.45 ± 8.39*	1.66*

注：* 与对照组同时间点相比，P<0.05

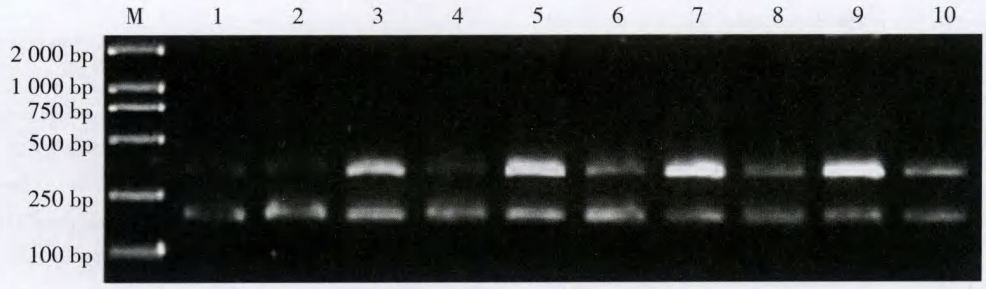
2.5 RT-PCR 结果

2.5.1 总 RNA 纯度和浓度 总 RNA 的电泳图表明所抽提到的总 RNA 是完整的，无降解。标本中总 RNA 的平均浓度为 1.824±0.02，平均纯度 $A_{200\ nm}/A_{280\ nm}$，为 1.80±0.617 4。

2.5.2 扩增循环数和模板量对 PCR 产物的影响 用相当于 8 μg 总 RNA 的逆转录产物于 20 μl 扩增体系中进行不同循环数扩增（18~32 个循环），目的基因扩增产物和循环数间具有良好的线性关系；而在 18~24 个循环之间时，GAPDH 扩增产物和循环数之间具有良好的线性关系。由此，在进行定量 RT-PCR 时选用 30 个循环。用总 RNA 的逆转录产物于 20 μl 扩增体系扩增 30 个循环。在所用模板浓度范围内，模板投入量和 PCR 产量之间具有良好的线性关系。

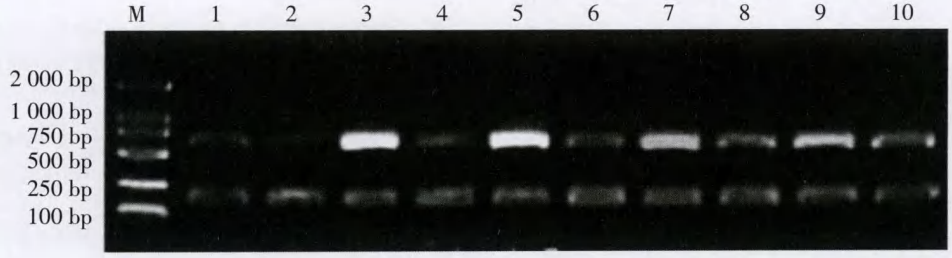
2.5.3 bcl-2 和 bax 基因的表达

对 PCR 产物电泳结果进行密度扫描，确定扩增产物的相对量。从电泳图（图 6、图 7）可以看出，bcl-2 和 bax mRNA 扩增产物在 P0 时对照组和模型组没有差异，而在 P15、P30、P45 和 P60 时，bcl-2、bax mRNA 表达量较对照组明显增高（$P<0.05$）。bcl-2 mRNA 表达量在 P15 和 P30 增高达高峰，在 P45 和 P60 时逐步下降，bax mRNA 表达量在 P15、P30、P45 和 P60 逐渐增高，在 P60 达到高峰。在 P15、P30、P45 和 P60，模型组 bax/bcl-2 也逐渐增高，与对照组相比有显著性差异（$P<0.05$）（见表 2）。



maker. 2 000 bp；1、3、5、7、9 为 P0、P15、P30、P45、P60 模型组泳道 2、4、6、8、10 为 P0、P15、P30、P45、P60 对照组泳道

图 6 bax 在不同时间点的表达



maker. 2 000 bp；1、3、5、7、9 为 P0、P15、P30、P45、P60 模型组泳道 2、4、6、8、10 为 P0、P15、P30、P45、P60 对照组泳道

图 7 bcl-2 在不同时间点的表达

表 2 不同时间点 bcl-2 mRNA 和 bax mRNA 的表达量（$\bar{x}\pm s$）

时间	对照组			模型组		
	bax	bcl-2	bax/bcl-2	bax	bcl-2	bax/bcl-2
0	35.23 ± 3.46	37.34 ± 3.46	0.94	37.46 ± 3.46	40.25 ± 3.46	0.93
P15	40.57 ± 3.22	44.33 ± 3.67	0.91	117.47 ± 3.67*	80.34 ± 3.35*	1.46*
P30	59.33 ± 4,12	63.25 ± 3.68	0.93	137.33 ± 5.33*	92.22 ± 3.49*	1.48*
P45	73.33 ± 5.21	78.22 ± 2.11	0.93	168.33 ± 4.79*	112.56 ± 7.89*	1.49*
P60	87.23 ± 8.12	92.27 ± 4,65	0.94	187.34 ± 3.56*	121.25 ± 6.78*	1.54*

注：* 与对照组同时间点相比，$P<0.05$

3 讨 论

DCDs 又称皮质发育不良、皮质发育畸形、灰质异位征、神经元移位征等,临床以多种类型的癫痫发作,发育迟缓和智力障碍等为主要表现,是导致药物难治性癫痫的主要原因。为了解 DCDs 不同类型的形成机制和 DCDs 引起难治性癫痫的机理,DCDs 的动物模型就应运而生,成为难治性癫痫研究的重要工具。其中 MAM 动物模型是较为经典的 DCDs 模型,但是由于国内购买困难,多采用 BCUN 大鼠 DCDs 模型。在本实验中观察到模型组仔鼠体型较小,活动量减少,轻度嗜睡、灵活性降低等表现,病理组织学 HE 和 Nissl 染色可见海马 CA1~CA2 区线型结构模糊、中断,异位神经元呈簇状堆积,扰乱锥体细胞层,可见海马神经元呈结节状异位[8],这与文献报道一致,说明模型建立成功。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡(Programmed cell death,PCD),是一种基因控制的细胞自主性死亡过程。bcl-2 基因家族是近年来研究较多的一种凋亡基因,bcl-2 和 bax 形成了凋亡的正负调控,它们的比例决定了细胞是否走向凋亡。当 Bax 在细胞中过量表达,Bax/Bax 二聚体的比例大于 Bcl-2/Bax 二聚体的比例时,促进细胞的死亡。当 Bcl-2 过量表达,Bcl-2/Bax 二聚体大于 Bcl-2/Bcl-2 的比例时凋亡被抑制。

本试验 TUNEL 结果显示随着模型鼠存活时间的延长,海马神经元凋亡数目逐步增多,免疫组化和 RT-PCR 结果提示 bcl-2、bax 在其 MRNA 和蛋白水平均存在高表达,在 P15 d 后 bax/ bcl-2 比值越来越高,促进了皮质发育障碍模型鼠中海马神经元凋亡。但是关于 DCDs 海马神经元凋亡的诱导因素目前仍然不清楚,可能与大脑发育过程中血管内皮发生障碍和小胶质细胞激活有关,前者导致海马区的缺氧,而激活的小胶质细胞释放大量的炎症介质可能是凋亡的启动因素。但其确切机制有待进一步深入研究。

60%皮质发育障碍所致的癫痫为难治性,其原因是多方面的。海马神经元凋亡在其中可能发挥了一定的致癫作用,有文献[9,10]表明凋亡可能与海马的神经元的重组有关,海马正常的神经环路的改变,海马苔藓纤维芽生,突触重塑有关,这些改变也正是难治性癫痫的重要发病机制。本试验结果表明在 DCDs 模型鼠海马区存在大量神经元凋亡,这为诠释 DCDs 导致癫痫或难治性癫痫的发病机制提供了理论依据,也就为临床治疗 DCDs 所致的 IE 提供了新的治疗观点和契机。

参 考 文 献

[1] Chen L,Liu CQ,Hu Y,et al. Association of a polymorphism in MDR1 C3435T with response to antiepileptic drug treatment in ethic Han Chinese children with epilepsy[J]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi,2007,9(1):11-14.

[2] Sisodiya S. Etiology and management of refractory epilepsies[J]. Nat Clin Pract Neurol,2007,3(6):320-330.

[3] Pitkanen A. Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: animal data[J]. Neurology,2002,59 (9 Suppl 5):S27-33.

[4] Hulkkonen J,Koskikallio E,Rainesalo S,et al. The balance of inhibitory and excitatory cytokines is differently regulated in vivo and in vitro among therapy resistant epilepsy patients[J]. Epilepsy Res,2004,59(2-3):199-205.

[5] Franaszczuk PJ,Kudela P,Bergey GK. External excitatory stimuli can terminate bursting in neural network models[J]. Epilepsy Res,2003,53(1-2):65-80.

[6] Cross DJ,Cavazos JE. Synaptic reorganization in subiculum and CA3 after early-life status epilepticus in the kainic acid rat model [J]. Epilepsy Res,2007,73(2):156-165.

[7] Benardete E A,Kriegstein A R.Increased excitability and decreased sensitivity to GABA in all animal model of dysplastic cortex[J]. Epilepsia,2002,43(9):970-982.

[8] 何选丽,晏 勇.卡莫司汀诱导大鼠皮质发育障碍模型的研究[J].第三军医大学学报,2007,29(17):1729-1731.

[9] Tian FF,Guo TH,Chen JM,et al. Changes of mossy fiber sprouting in hippocampus of pentylenete trazole kindling rats[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban,2007,32(6):1026-1030.

[10] Rao MS,Hattiangady B,Reddy DS,et al. Hippocampal neurodegeneration,spontaneous seizures,and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy[J]. J Neurosci Res,2006,83(6):1088-1105.

(责任编辑:关蕴良)