维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)03-0225-04

大鼠惊厥持续状态及培养海马神经元惊厥样放电后的 BDNF 表达研究

何志慧,蒋 莉,张 明,胡 越,张晓萍

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:结合在体和体外实验,探索脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor ,BDNF)在惊厥发作后表达的变化。方法:建立生后 20 天幼年(IRs)及 2~3 月健康成年(ARs) Wistar 大鼠惊厥持续状态(Status convulsion,SC)模型、原代培养海马神经元惊厥样放电模型,采用免疫组化、ELISA 对 SC 后 6 个时点大鼠海马、惊厥样放电后海马神经元 BDNF 的表达变化进行观察分析。结果:(1)SC 后大鼠海马各区 BDNF 阳性着色均有不同程度的增强,以齿状回更为明显;幼年鼠海马 BDNF 含量在 SC 后 3h 即显著增加(从惊厥前的 6.65 ± 1.60pg/μg 升至 11.22 ± 2.44pg/μg)(P<0.05),至惊厥后 1 天达到高峰,继之逐渐回落,SC 后 3 天仍显著高于发作前水平,7 天接近正常;成年鼠海马 BDNF 在 SC 后 1 天显著增加(从惊厥前的 5.91 ± 1.63 pg/μg 升至 13.37 ± 5.61 pg/μg)(P<0.05),至惊厥后 3 天达到高峰并高于同时点幼年鼠(P<0.05),之后逐渐下降,持续 7 天左右。(2)原代培养海马神经元惊厥样放电后 24h 细胞样本 BDNF 表达显著高于对照组(P<0.05)。结论:惊厥发作在动物和细胞模型均引起了自身 BDNF 的高表达,可能是海马神经元对惊厥损伤的内源性保护反应。幼年与成年大鼠海马惊厥后的 BDNF 表达在反应速度、维持程度上的差异性可能与未成熟脑对自身的保护性反应有关。

【关键词】Wistar 大鼠;海马神经元;惊厥;BDNF

【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-26

Study on the expression of BDNF after status convulsion in wistar rats and seizure-like discharge of cultured hippocampal neurons

HE Zhihui,et al

(*Department of Neurology,the Children's Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To explore the dynamic process of the expression of brain-derived neurotrophic factor(BDNF)in hippocampus cells after convulsion through in vitro and in vivo experiments. *Methods*:Seizures with duration of 30 minutes (30min SC) were induced in infant and adult Wistar rats (IRs&ARs) respectively. The rats were sacrificed at 6 different time points after SC termination.Dynamic change of BDNF level in happocampal cells was investigated by immunocytochemistry and ELISA. Primary hippocampal neurons cultured for 9 days were exposed to magnesium-free extracellular solution media for 3h to establish seizure-like discharge model. BDNF protein expressed in cultured hippocampal neurons was detected by immunocytochemistry. *Results*:(1)The cells expression of BDNF increased in CA1-CA4 and dentate of hippocampus after SC,and the most positive immunoreactivity was in dentate. The expression of BDNF was remarkably up-regulated at 3h (from 6.65 ± 1.60 pg/μg to 11.22 ± 2.44pg/μg) after SC in IRs group (P<0.05),and at 1d (from5.91 ± 1.63pg/μg to13.37 ± 5.61pg/μg) after SC in ARs group (P<0.05). This increases lasted for at least 7d in both IRs and ARs group, with peak levels at 1d and 3d respectively. The levels of BDNF in IRs group was still remarkably up-regulated at 3d after SC (P<0.05), but remarkably lower than that in ARs group (P<0.05).(2)Compared with the control group, the expression of BDNF protein in cultured neurons was remarkably up-regulated in seizure-like discharge model group (P<0.05) at 24h after discharge. *Conclusions*:Convulsion could up-regulate expression of BDNF both in animal model of SC and in seizure-like discharge model of cultured hippocampal neurons. This could be the internal protected response of hippocampal neurons to inhibit brain damage induced by Convulsion. There are differences in speed and degree of the expression of BDNF after convulsion between IRs and ARs,which indicate that there could be an internal protective response in premature brain after SC.

【Key words】Wistar rats;Hippocampal neurons;Convulsion;BDNF

作者介绍:何志慧(1974-),女,主治医师,硕士,
主要研究方向:脑发育与癫痫性脑损伤。

基金项目:国家自然科学基金资助(30271382)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

国内外研究提示，惊厥发作后将导致选择性海马神经元死亡，引起脑损伤，同时也启动脑内神经元保护反应，如神经元内神经营养因子(Neurotrophic factors，NTFs)表达的改变。脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophicfactor，BDNF)是最重要的神经元保护因子和维持海马功能不可缺少的多肽物质，能促进神经元的生存、分化、发育和神经突起生长和分枝，促进神经元损伤后的修复和再生。BDNF是否在惊厥发作后也存在表达变化，在惊厥性脑损伤中发生作用，目前尚存争议。为此，我们以 Wistar 大鼠和原代培养海马神经元为研究对象，探索 SC 后 BDNF 表达的变化，以及年龄对惊厥后 BDNF 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

用于建立大鼠惊厥持续状态模型的动物为健康成年(2~3 月，体重 160~380g)及生后 20 天的幼年 Wistar 大鼠(体重 30~50g)各 50 只，均由重庆医科大学实验动物中心提供。用于海马神经元原代培养的动物为清洁级新生 Wistar 大鼠(出生不超过 24h)，雌雄不限，购自第三军医大学大坪医院实验动物中心。

1.2 实验模型的建立

1.2.1 动物模型与分组

生后 20 天的幼年及健康成年 Wistar 大鼠各 40 只，其中各 30 只采用氯化锂－匹罗卡品腹腔注射诱发 SC，另 10 只分别用于设立正常对照和实验对照(正常大鼠腹腔注射阿托品＋水合氯醛)，每组 5 只。分别于持续惊厥发作 30min(30/SC)后 3h、6h、12h、1 天、3 天、7 天.6 个时点各处死 5 只大鼠。实验动物在各个观察时点处死后，断头取脑，左侧半球采用免疫组化观察 BDNF 的定位与分布，自左半球视交叉至侧脑室后角平面连续冠状冰冻切片(8μm)，裱片于多聚赖氨酸处理的载玻片室温晾干，4℃丙酮固定 20min，-70℃保存；右侧半球分离出海马用于酶联免疫吸附实验对 BDNF 进行定量分析。

1.2.2 海马神经元放电模型建立

取新生 24h 内的 Wistar 乳鼠 75%乙醇消毒后，断头取脑，冰盘上钝性分离迅速取出海马组织，轻轻剔除脑膜及血管后置于冰 D-hanks 液中清洗 2 次。将海马剪成约 $1mm^3$ 小块，转入含 4ml 无血清 DMEM F12 培养液的离心管内，加入等体积 0.25%胰酶(终浓度为 0.125%)。用巴氏管轻轻吹打几次后置 37℃，5%CO_2 孵箱中消化 15~20min，每 5min 振荡 1 次。用 4ml 完全培养液终止消化，巴氏管反复轻轻吹打至组织块基本消失。200 目不锈钢筛网过滤，少量培养液冲洗筛网。离心，收集沉淀。用完全培养液制成细胞悬液，台盼蓝染色，血球计数板计数，以 1×10^6/ml 密度分别种植于放有包被过多聚赖氨酸盖片的 6 孔板或包被了多聚赖氨酸的 24 孔板内，置 37℃，5% CO_2 培养箱培养。24h 后将培养液换成无血清培养液，以后隔 2 天用无血清培养液半量换液 1 次。采用培养 9 天的海马神经细胞，分为 2 组，每组 5 孔。惊厥样放电模型组去除正常神经元培养液，更换为无镁细胞外液培养 3h 后恢复为原正常神经元培养液，继续培养 24h；对照组去除正常神经元培养液，更换为正常细胞外液培养 3h 后恢复为原正常神经元培养液，继续培养 24h。捞取经上述处理后的海马神经元爬片，用于免疫组织化学染色检测 BDNF 表达。

1.3 BDNF 免疫组织化学染色

上述各时点脑片按即用型 SP 免疫组化试剂盒说明操作，实验组和正常组切片在相同条件下完成免疫组化过程；阴性对照片不加一抗孵育，其它步骤完全相同。重点观察 BDNF 阳性细胞的类型与细胞分布部位。

上述细胞爬片按照免疫组织化学染色二步法操作，阴性对照片用正常山羊血清代替一抗，其它步骤完全相同。以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性表达神经元，每组取 3 张细胞爬片，在 100 倍视野下于每张爬片上、下、左、中、右随机取 10 个视野，用图象分析软件测量细胞内棕黄色颗粒的光密度值。

1.4 BDNF 酶联免疫吸附实验定量分析

上述 30/SC 后各时点实验动物取右侧半球分离出海马制作匀浆液，置 7.0ml 的高速离心管中，4 度 14000g 离心 15min，收集上清液，-70℃保存。考马斯亮蓝染料结合法测匀浆液(1:4 稀释)的总蛋白含量(μg/ml)，以光密度值为纵坐标，蛋白质含量为横坐标绘制标准曲线，得一标准曲线方程。待测上清液按 BDNF Emax Immunoassay system 操作手册说明进行实验得出平均光密度值，分别带入标准曲线方程计算出待测样品的蛋白质含量。

1.5 统计方法

采用 SPSS10.0 for windows 软件对实验数据进行统计处理。所有计量资料均值均用 $\bar{x}\pm sD$(均数±标准差)表示。单因素多均数间差异作 F 检验，均值间两两比较作 q 检验；成组设计资料两样本均数间比较采用 t 检验，以 $P<0.05$ 为有显著差异性。

2 结 果

2.1 SC 后大鼠海马 BDNF 表达的动态观察

2.1.1 BDNF 免疫组织化学染色结果

正常大鼠 BDNF 主要分布于海马 CA1~CA4 区锥体细胞和齿状回颗粒细胞，以胞浆着色为主，部分可见轴突着色。根据 ELISA 检测海马 BDNF 含量结果发现 30min SC 后 1 天幼年和成年大鼠海马 BDNF 含量较同年龄正常组有明显增加，故选取该时点脑组织切片观察海马 BDNF 变化趋势。发现海

维普资讯 http://www.cqvip.com

马各区 BDNF 阳性着色均有不同程度的增强，以齿状回更为明显(见图 1)。

2.1.2 SC 后不同龄期大鼠海马 BDNF 含量的动态变化结果

进一步对 30min SC 后海马神经组织 BDNF 进行定量分析，其动态变化见表 1。如表显示，持续 30min 的惊厥发作即可引起幼年和成年鼠海马 BDNF 表达的增加。SC 后 3h，幼年鼠海马 BDNF 含量即达到 11.22 ± 2.44 pg/μg，明显高于惊厥前的 6.65 ± 1.60 pg/μg($P<0.05$)，至惊厥后 1 天达到高峰，继之逐渐回落，SC 后 3 天仍显著高于发作前水平，7 天接近正常。SC 后成年鼠海马 BDNF 也呈增加的趋势，与发作前相比，直至发作后 1 天 BDNF 的增加才显著性差异($P<0.05$)，SC 后 3 天达到高峰并高于同时点幼年鼠($P<0.05$)，之后逐渐下降，持续 7 天左右。幼年大鼠海马 BDNF 对惊厥刺激的反应速度快于成年大鼠，但维持程度不如成年大鼠。

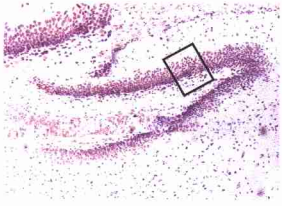


图 1-1 幼年大鼠 30min SC 后 1 天海马齿状回及 CA3 区 BDNF 免疫组化阳性细胞(×100)，左上角为矩形图形的放大(×400)

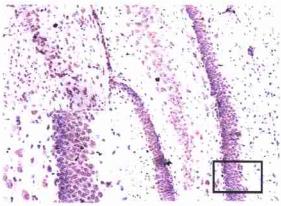


图 1-2 成年大鼠 30min SC 后 1 天海马齿状回及 CA 区 BDNF 免疫组化阳性细胞(×100)，左下角为矩形图形的放大(×400)

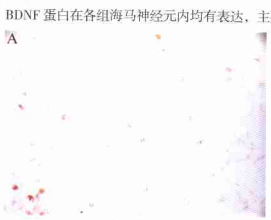
表 1 30min SC 不同龄期大鼠海马 BDNF 表达的动态变化(pg/μg)

组别	正常组	实验对照组	惊厥后					
			3h	6h	12h	1 天	3 天	7 天
幼年组	6.65 ± 1.60	6.13 ± 1.47	11.22 ± 2.44*	10.35 ± 1.52*	12.16 ± 2.68*	13.16 ± 2.05*	10.27 ± 1.76*	7.75 ± 2.17
成年组	5.91 ± 1.63	6.98 ± 1.56	9.97 ± 1.12	9.33 ± 1.25	10.60 ± 2.06	13.37 ± 5.61*	13.96 ± 2.80*▲	9.04 ± 2.80
t	0.714	0.893	1.044	1.163	1.031	0.077	2.492	0.803
p	0.495	0.398	0.327	0.278	0.333	0.940	0.037	0.803

(1)与同年龄正常组相比较*$P<0.05$ (2)与不同年龄组相同时点间相比较▲$P<0.05$

2.2 培养海马神经元放电后 BDNF 免疫组织化学染色结果

BDNF 蛋白在各组海马神经元内均有表达，主要在神经元胞浆内表达(见图 2)。以细胞内棕黄色颗粒的光密度值表示表达强度(见表 2)，结果显示在惊厥样放电模型组中神经元内 BDNF 表达高于对照组($P<0.05$)。



A 对照组 B 惊厥样放电模型组

图 2 不同处理组海马神经元内 BDNF 蛋白表达(DAB ×200)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 不同实验条件对培养海马神经元 BDNF 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	视 野 数	光密度值(OD)
对照组	(个)	0.109 ± 0.026
惊厥放电模型组	30	0.126 ± 0.023▲
F 值	30	4.812

注:与对照组比较▲$P<0.05$

3 讨 论

本组前期研究表明 SC 后海马存在以神经元凋亡为主的神经元死亡,而神经元凋亡的发生存在明显的年龄差异,未成熟脑内存在主动抑制神经元死亡的保护机制[1],但其机制目前尚不清楚。鉴于BDNF在神经元生长、分化维持存活中的作用,我们通过制造 SC 动物模型,并结合体外培养神经元惊厥样放电,观察惊厥后 BDNF 表达的变化。

在体实验中,我们采用相当于人类婴儿期和成人期的 Wistar 大鼠用氯化锂—匹罗卡品方法制造惊厥发作的 SC 模型[2],证实在 SC 后,海马各区的神经元内,尤其是齿状回出现 BDNF 蛋白的高表达。进一步采用定量研究发现,惊厥后早期(惊厥后 3h),所有 SC 大鼠海马 BDNF 的表达均呈增加趋势,并可持续性上升,至少维持 7 天左右。本组采用幼体与成年鼠进行比较,结果显示两组动物 SC 后 BDNF 表达变化存在一定年龄差异,而其年龄差异性主要反映在对惊厥刺激的应答速度及程度,幼年大鼠海马 BDNF 对惊厥刺激的反应速度快于成年大鼠,但维持程度不如成年大鼠。

为了减少在体实验多因素的影响,进一步确认惊厥发作与 BDNF 表达的相关性,本研究进一步进行海马神经元原代培养,并采用在无镁细胞外液培养条件下制造惊厥样放电模型,将惊厥样放电后 24h 的细胞样本进行 BDNF 免疫细胞化学染色。结果发现惊厥样放电模型组 BDNF 表达高于对照组,具有显著统计学差异。提示在惊厥性放电对海马神经元损伤过程中,伴发有神经元内 BDNF 的高表达,这与本研究的动物实验结果相一致。

国外的一些研究也有类似结果,如:Katoh-Semba 等用海人酸诱发大鼠癫痫发作,用双向酶免疫分析方法检测发现惊厥发作后 12~24h 内,海马、梨形皮质区及内嗅皮质区 BDNF 含量增加约 10 倍,在隔区、大脑皮层、纹状体和下丘脑 BDNF 也增加 2~4 倍[3]。Hideo Hagihara 等用匹罗卡品诱发癫痫发作后 4h 后即出现海马 BDNF mRNA 的高表达[4]。而惊厥发作后脑内 BDNF 表达增高,对惊厥的发生发展有何具体意义尚不明确[5]。不少研究表明,BDNF 可以保护中枢神经系统对抗代谢性和兴奋性氨基酸毒性损伤;可以抵抗一氧化氮(NO)介导的谷氨酸细胞毒性,保护神经元免受损伤[6,7],因此惊厥后 BDNF 的高表达,可能对脑组织神经元保护及促进受损神经元的恢复有重要意义。Scharfman 等却发现向脑内注入 BDNF 后可以诱发癫痫发作[8],也有研究表明惊厥后 BDNF 有可能参与了癫痫发作后的海马齿状回苔藓纤维发芽(mossy fiber sprout, MFS)和突触重建,从而促进了癫痫的慢性发作[9]。结合本组实验发现 BDNF 与不同年龄鼠细胞凋亡发生间存在一定相关性,即未成熟鼠 SC 后凋亡发生较成年组轻,而其 BDNF 表达反应速度显著快于成年鼠[10]。因此惊厥发作在动物和细胞模型均能引起自身 BDNF 的高表达,是否是海马神经元对惊厥损伤的内源性保护反应,值得进一步研究。

(通讯作者:蒋 莉,重庆医科大学附属儿童医院神经内科,E-mail: dr_jiangli@126.com)

参 考 文 献

[1] 蒋 莉,蔡方成,李 欣.惊厥持续状态中大鼠脑内神经元死亡的年龄特征[J].中华儿科杂志,2002;40(9):545-549.

[2] 胡 越,蒋 莉.有效控制氯化锂—匹罗卡品诱发惊厥持续状态发作的实验研究[J].儿科药学杂志,2003;9(4):5-8.

[3] Katoh-Semba R,Takeuchi IK,Inaguma Y,et al. Brain-derived neurotrophic factor, nerve growth and neurotrophin-3 selected regions of the rat brain following kainic acid-induced seizure activity [J].Neurosci Res,1999;35(1):19-29.

[4] Hideo Hagihara,Mizumi Hara,Kyouko Tsunekawa,et al. Tonic-clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine treated mice[J].Molecular Brain Research,2005;139:258-266.

[5] Danzer sc,crooks kr.Increased expression of brain derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures [J].Neurosci,2002;22:9754-9763.

[6] Tremblay R,Hewitt K,Lesiuk H,et al.Evidence that brain derived neurotrophic factor neuroprotection is linked to its ability to reverse the NMDA induced inactivation of protein kinase cincortical neurons[J].Neurochem,1999;72(1):102-111.

[7] Brandoli C,Sanna A,De bernardi MA,et al.Brain-derived nen-

(下转第 274 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

通过把两次扫描放在同一个序列中，使球管重复曝光间隔时间固定为 0.6 的整数倍，确保球管曝光的起始位置相同，减影后图像重建，图像质量均为Ⅰ级，球管重复曝光间隔时间不为 0.6 的整数倍时，减影均不成功，实验结果支持控制球管重复曝光时间间隔，可确保球管曝光的起始位置相同这一假设。通过注射对比剂后减影，图像重建，得到优秀的"血管"图像，图像质量优于手动去骨减影法，而且不用花费重建时间。

3.2 探测器宽度对减影图像质量有影响

本实验采用螺旋方式扫描，把两次扫描放在同一个序列中，使扫描时间及两次扫描的间隔时间之和固定为 0.6 的整数倍，每个扫描采集不同层数的图像，4 组为 16 的整数倍，6 组不为 16 的整数倍，减影后采集图像层数为 41 层、55 层、77 层时减影后有少量骨结构高密度存在(图像质量Ⅱ级)，重复扫描减影后重建图像完全去除骨结构，结果提示当球管曝光起始位置确定后，采集层数(探测器使用宽度)不是影响减影图像质量的主要因素。本研究用 20mm 探测器宽度，球管每旋转一圈，可获得 16 幅图像，层厚为 0.625 的层厚采集，仅用中间 10mm 探测器，在 16 的整数倍时探测器的利用率较高，而非 16 的整数倍时仅用了探测器宽度的部分，探测器利用率降低。因采集层数不是影响减影图像质量的主要因素，为了提高探测器的利用效率，建议用 16 的整数倍图像层数来采集。

DSCTA 的图像影响因素较多，除球管曝光起始位置、探测器的使用宽度外，扫描物体的运动可能是严重影响图像质量重要因素，不同的运动方式的影响程度，可能的解决方法，DSCTA 的 X 线质量对图像的影响，如何降低 DSCTA 的射线剂量，均值得进一步研究。

(通讯作者：谢鹏，教授。)

参 考 文 献

[1] Teksama M, McKinney A, Casey S, et al. Multi-section CT angiography for detection of cerebral aneurysms[J].AJNR, 2004; 25(9): 1485-1492.

[2] Matsumoto M, Sato M, Nakano M, et al.Three dimensional computerized tomography angiography guided surgery of acute ruptured cerebral aneurysms [J].J Neurosurgery, 2001; 94(5): 718-727.

[3] Tomandl BF, Hammen T, Klotz E, et al.Bone-subtraction CT angiography for the evaluation of intracranial aneurysms [J].AJNR, 2006; 27(1): 55-59.

[4] Kwon SM, Kim YS, Kim TS, et al.Digital subtraction CT angiography based on efficient 3D registration and refinement[J].Computed Med Imaging Graph, 2004; 28(7): 391-400.

[5] Venema HW, Hulsmans FJ, den Heeten GJ.CT angiography of the circle of Willis and intracranial internal carotid arteries: maximum intensity projection with matched mask bone elimination—feasibility study[J].Radiology, 2001; 218(3): 893-898.

(上接第 228 页)

rotrophic fanctor and Basic fibroblast growth factor down regulate NMDA receptor fuction in cerebellar granule cells[J].Neurosci, 1998; 18(19): 7953-7961.

[8] Scharfman he, goodman jh.Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain derived neurotrophic factor [J].Exp neurol, 2002; 174: 201-214.

[9] Steve C, Danzer, Xiaoping He.Ontogeny of Seizure-Induced Increases in BDNF Immunoreactivity and TrkB Receptor Activation in Rat Hippocampus[J].HIPPOCAMPUS, 2004; 14: 345-355.

[10] 胡 越，蒋 莉，张晓萍.持续惊厥后海马神经营养因子表达及其影响因素[J].第三军医大学学报，2006; 28(16): 1663-1665.