维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号：0253－3626(2005)05－0640－04

# 未成熟大脑对惊厥性脑损伤耐受性的分子生物学机理研究

蒋　莉，蔡方成，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：探讨幼龄鼠未成熟脑组织对惊厥性脑损伤中细胞凋亡与坏死病理过程具有主动保护性抑制机制的分子生物学机理。方法：健康成年及幼龄 Wistar 鼠经皮下与腹腔内注射美解眠致惊。两组分别于严重惊厥发作后 1、2、4、12、24、48、72h、7 天时点上断头处死取脑，在进行组织病理学动态观察神经元坏死、凋亡的基础上，采用免疫组化法，原位检测脑片凋亡相关基因 bcl－2、$P_{53}$的表达变化，分别计算其弱、强阳性表达细胞数。结果：(1)严重惊厥后，成年鼠与幼鼠脑内 $P_{53}$和 bcl－2 的表达截然不同。成年鼠 $P_{53}$阳性表达率高达 90%，其中一半属中、高度强阳性。但 bcl－2 表达率仅 57%，且主要呈低度表达；相反，幼鼠以 bcl－2 强表达为主，其阳性表达率达 85%以上。(2)动态观察获类似结果。严重惊厥后 3 天，成年鼠脑内仍有持续 $P_{53}$强表达，但其 bcl－2 于发作后仅数小时，已回落与对照无差异；相反，幼鼠则在发作 3 天内显示 bcl－2 的持续强表达，而 $P_{53}$于发作后 12h 开始明显降低，并于 24h 后与对照不再有差异。结论：持续惊厥发作后，未成熟及成熟期神经元中凋亡的诱导和抑制基因均同时表达，但两者间存在显著年龄差异。未成熟脑神经元中，以凋亡抑制基因 bcl－2 表达为主，而成熟脑神经元中凋亡诱导基因 $P_{53}$表达更显著。

【关键词】惊厥；脑损伤；Wistar 鼠；bcl－2；P53

【中国图书分类法分类号】R742.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005－05－20

# A molecular biological study on resistance to brain damage induced by prolonged seizure in premature brain

*JIANG Li, et al*

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

【Abstract】*Objective*: To explore the molecular biological base of internal protective response in premature brain which reduces the process of apoptosis and necrosis of neurons. *Methods*: Megimide was injected in healthy adult and baby rats (ARs & BRs) respectively to evoke prolonged seizures and status epilepticus(SE). ARs and BRs rats were sacrificed at 1,2,4,12,24,48,72 hours and 7 days after prolonged seizure stopped. Hippocampus, dentate gyrus and parietal cortex of their brain were taken for immunocytochemistry studies for apoptosis associated genes bcl－2 and P53 expression. *Results*: (1) There was a much stronger and higher rate (90%) of P53 expression in ARs' brain, and such state continually kept even at 72h after seizure stopped; however bcl－2 expression was weak and low (57%), and no difference was found in bcl－2 expression only several hours compared with normal control. (2) In BRs' brain there was more than 85% neurons within a strongest expression of bcl－2; and the strongest bcl－2 expression sustained in 72h after SE, however P53 expression lasted less than 24h. *Conclusion*: Significant difference between premature and mature brain is shown on the genes' expression associated apoptosis after seizure. Anti apoptosis gene (bcl－2) expression is much higher and longer than apoptosis gene(P53) in BRs' brain, and it is reversed in ARs group. So the strongest expression of bcl－2 after SE could be the important molecular biological basis for the special resistance to neuron injury in premature brain.

【Key words】Seizure; Brain damage; Wistar rats; bcl－2; P53

近年的研究发现，长程惊厥或癫痫持续状态(status epilepticus, SE)发作后将导致选择性海马神经元坏死和凋亡，产生不可逆性脑损伤[1,2]。本课题组对不同年龄大鼠持续性惊厥发作后神经元死亡形式及其动态发展规律的对比研究，已发现幼龄鼠脑组织对惊厥发作诱发的神经元死亡，尤其凋亡过程存在一个主动的保护抑制反应，提示未成熟期大脑对惊厥性脑损伤有显著耐受性[3]，此与婴幼儿 SE

作者介绍：蒋　莉(1964－　)，女，博士，
主要研究方向：惊厥性脑损伤及其保护机制。

基金项目：国家自然科学基金(30271382)

维普资讯 http://www.cqvip.com



发作的病死率和致残率较年长儿及成年人低的临床现象一致[1]。然而，未成熟脑耐受惊厥性脑损伤的机理尚不明确，本文拟以成年鼠为对照，从研究调控细胞调亡分子表达变化入手，探讨这种保护性抑制反应的分子生物学机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型建立

健康成年(2～3 月)及幼年(生后 20 天)Wistar 鼠各 45 只(重庆医科大学实验动物中心提供)。采用美解眠腹腔及皮下结合注射的方法，制造长程惊厥发作模型[2]，其中成年组惊厥持续时间 15～20 (17.9±1.9)min；幼年组惊厥持续时间 21～71 (43.2±13.8)min，且出现惊厥持续状态的幼鼠达 50%。

于惊厥发作停止后 1h 至 7 天内 8 个不同时点上，各处死 5 只实验鼠，断头取脑，分别进行以下实验。

### 1.2 脑组织形态学检查

大鼠断头取脑后，尽快将其左半球经 10%甲醛缓冲液固定，常规石蜡包埋，从视交叉处开始做冠状连续切片，取相邻切片，分别采用 HE 染色观察坏死神经元、TUNEL 染色判断调亡神经元。并计算坏死及凋亡细胞发生率。

### 1.3 bcl－2、P53 的免疫组化检测

取与 HE 染色相邻脑片，按 SABC 法进行免疫组化染色，分别观察 bcl－2、P53 在脑组织中的表达变化(兔抗鼠 bcl－2 多抗和兔抗鼠 p53 多抗，由北京中山生物制品有限公司生产；即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒，由武汉博士德生物工程有限公司生产)。其中阴性对照以 PBS 代替特异性抗体；阳性对照采用 K562 细胞。

结果判断：以细胞膜及胞浆内出现棕黄着色为阳性反应细胞。参照 Simler 等[4]标准进行染色强度分级：(－)：胞膜及胞浆内无明显染色，放大倍数为 40×10 时仍难辩认；(＋)：浅着色，胞膜及胞浆内部分浅棕色，放大倍数为 40×10 时可以辩认，但着色弱，放大倍数为 10×10 时难辩认；(＋＋)：中度着色，胞膜及胞浆内均浅棕色，放大倍数为 10×10 时能辩认；(＋＋＋)：强着色，胞膜及胞浆内深棕色，放大倍数为 10×10 时能清楚辩认。为进行量化分析，对(－)、(＋)、(＋＋)、(＋＋＋)级染色分别记为 0、1、2、3 分。

### 1.4 统计学处理

采用 SAS 软件进行实验数据统计学处理。两均数间差异的比较用配对 $t$ 检验或 $t'$ 检验；多均数间比较，用方差分析，$q$ 检验作两两比较。以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

## 2 结 果

### 2.1 惊厥后神经元死亡的动态观察

本组惊厥发作后，成年及幼年鼠大脑神经元均出现坏死和凋亡，病变部位主要在颞叶及海马区。成年及幼年鼠惊厥后神经元坏死基调亡存在显著年龄差异(表 1)[3]，特别是神经元凋亡，在惊厥发作 12h 内，幼鼠海马神经元凋亡过程明显回落，甚至低于惊厥发作前水平。

### 2.2 惊厥后脑片 Bcl－2、P53 免疫组化检测

Bcl－2、P53 免疫组化阳性反应基本上都出现在神经元胞浆内。阳性反应细胞亦主要分布于海马、颞叶皮层。海马中大部分神经元都有免疫组化阳性表达(特别是 CA3、CA1 及齿状回锥体细胞)，故按海马神经元染色差异进行脑片组化染色强度分级。

**表 1 不同年龄实验鼠惊厥后神经细胞坏死及 TUNEL 染色阳性细胞动态变化[3]**

| 病变神经元数(个) | 对照组 | 惊厥发作后 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 4h | 12h | 24h | 48h | 72h | 7 天 |
| 坏死神经元 | | | | | | | |
| 成年组 | 38±8 | 77±23★ | 115±53 | 180±38△★ | 166±32△★ | 190±29△△★★ | 110±55 |
| 幼年组 | 33±7 | 51±14 | 85±53 | 90±59 | 95±61 | 98±48 | 67±22 |
| 凋亡神经元 | | | | | | | |
| 成年组 | 34±6 | 65±5△△ | 116±89 | 133±11△△★★ | 194±31△△★★ | 171±27△△★★ | 51±16★ |
| 幼年组 | 36±9 | 63±6△ | 47±8 | 40±14 | 38±19 | 39±13 | 14±3 |

注：(1)每组每时点观察 5 张(神经元坏死)和 3 张切片。每张切片在海马 CA3、齿状回、颞叶皮层各计数 200 个，共 600 个神经元；

(2)不同年龄组鼠同时点比较：★$P<0.05$，★★$P<0.01$ (3)与同年龄组对照比较：△$P<0.05$，△△$P<0.01$

**表 2 成年及幼年鼠惊厥后 p53、bcl－2 免疫组化染色强度比较**

| 实验组 | P53 染色强度分级 | | | | | Bcl－2 染色强度分级 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 脑片数(张) | － | ＋ | ＋＋ | ＋＋＋ | 脑片数(张) | － | ＋ | ＋＋ | ＋＋＋ |
| 成年鼠 | 40 | 4 | 16 | 13 | 7 | 40 | 17 | 17 | 5 | 1 |
| 幼年鼠 | 40 | 14 | 16 | 8 | 2 | 40 | 6 | 18 | 11 | 5 |

维普资讯 http://www.cqvip.com



表 3 两组大鼠惊厥后不同时点 p53、bcl－2、HSP70 免疫组化染色阳性细胞积分($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 种类 | 正常对照 | 惊厥后 1h | 惊厥后 2h | 惊厥后 4h | 惊厥后 12h | 惊厥后 24h | 惊厥后 48h | 惊厥后 72h | 惊厥后 7 天 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 成年鼠 | P53 | 0.2±0.1 | 1.4±0.2▲ | 1.8±0.4▲ | 2.4±0.2▲ | 2.0±0.4▲ | 1.6±0.2▲★ | 1.4±0.5▲ | 1.6±0.2▲◆ | 0.4±0.2 |
| | Bcl－2 | 0.2±0.1 | 0.8±0.3 | 1.4±0.5▲ | 1.2±0.3▲◆ | 0.8±0.3 | 0.6±0.2 | 0.6±0.2 | 0.2±0.1 | 0.4±0.4 |
| 幼龄鼠 | P53 | 0.2±0.1 | 1.2±0.4 | 1.4±0.5▲ | 2.0±0.3▲ | 1.2±0.18 | 0.4±0.2 | 0.6±0.4 | 0.4±0.18 | 0.4±0.2 |
| | Bcl－2 | 0.4±0.2 | 1.2±0.5 | 1.8±0.3☆ | 2.0±0.4☆ | 1.4±0.5 | 1.4±0.2▲ | 1.6±0.4☆ | 1.0±0.3 | 0.6±0.4 |

注：(1)与同组对照相比▲$P<0.05$，☆$P<0.01$；与幼龄鼠同时点同种类比较◆$P<0.05$，★$P<0.01$

(2)每个时点检测 5 个标本

2.2.1 Bcl－2、P53 蛋白阳性表达的总体比较

对照组中，成年大鼠脑片中分别有 2/5、和 2/5 张脑片呈 bcl－2、P53 染色阳性(＋)；幼鼠有 1/5、2/5 张呈 bcl－2、P53 染色阳性(＋)，两组间无显著差异。惊厥发作后，成年和幼年鼠海马、大脑皮层(特别是颞叶)神经元 bcl－2、P53 蛋白表达均较对照增强。从两组实验动物来看，惊厥发作 7 天内 40 张脑片中，P53、bcl－2 表达呈(－)、(＋)、(＋＋)、(＋＋＋)表达的脑片数比较见表 2。

结果提示惊厥后成年和幼龄鼠脑内神经元 P53 和 bcl－2 表达程度均有显著不同($\chi^2$ 值分别为 9.923，10.206，$P<0,05$)。在成年鼠脑片中 P53 阳性表达率高达 90%(36/40)，且 50%呈中～高度(＋＋～＋＋＋)表达，而 bcl－2 阳性表达率仅为 57%(23/40)，且主要呈低度(＋)表达(42%，17/40)；幼龄鼠则呈相反变化，P53 阳性表达率为 65%(26/40)，主要呈低度表达(40%)，而 bcl－2 阳性表达率高达 85%(34/40)，其中 40%呈中～高度表达。

2.2.2 惊厥后脑内 Bcl－2、P53 蛋白表达动态比较

进一步将免疫组化染色强度进行量化分析(低、中、高度表达分别记为 1、2、3 分)，按惊厥发作后不同时点分别观察，两实验组比较结果见表 3。

从表 3 可知，与正常对照相比，成年鼠持续惊厥后 1hP53 表达已明显增加，在 4～12h 内达高峰，以后缓慢降低，但在惊厥后 3 天表达仍然明显强于对照。尽管 bcl－2 表达也同时上升，但上升速度缓慢，在 2～4h 才明显高于对照组。其持续时间也短，12h 后已不再与对照有差异。表达程度更不如 P53 明显。幼龄鼠则呈完全相反的变化，惊厥后出现 bcl－2 持续而明显增强的表达和 P53 短暂的表达。提示持续惊厥发作后，成年鼠以诱导细胞凋亡的基因表达为主，而幼鼠则以抗凋亡基因表达更明显。

## 3 讨 论

如前所述，长程持续性惊厥发作，将通过细胞坏死和细胞凋亡过程引起大鼠海马区选择性神经元死亡。本文采用连续动态观察证实幼年鼠经历比成年鼠更长时程的惊厥发作后，其海马神经元坏死及凋亡数均明显少于成年鼠，特别是神经元凋亡，在惊厥发作 12h 内，幼鼠海马神经元凋亡过程明显回落，甚至低于惊厥发作前水平，表明幼龄鼠脑内存在一个神经元保护机制，遏制了长程惊厥发作后脑内神经元的凋亡的进展，从而使未成熟大脑对惊厥性脑损伤有显著耐受性。

众所周知，凋亡是细胞受基因控制的主动死亡过程，P53、bcl－2 都是调控细胞凋亡的关键基因。Bcl－2 基因是从滤泡性淋巴细胞瘤分离出来的一种癌基因，该基因的编码产物是 bcl－2 蛋白。后者实际上是广泛存在于正常组织细胞的膜蛋白，分布于核膜、线粒体和内质网膜上，在发育期的神经元中含量丰富[5]。bcl－2 蛋白的过量表达可以增加细胞对多种死亡诱导性刺激(如异体血清、撤出神经生长因子或葡萄糖、膜过氧化反应、$Ca^{2+}$ 激动剂、化疗药物等)的耐受能力，促进细胞生存，延长其寿命，防止其死亡，而不影响细胞的增殖过程。因此，bcl－2 被认为是作为细胞凋亡的一个潜在抑制因子，调节和遏制细胞的程序化死亡[5,6]。P53 基因则促进凋亡的发生[7]。该基因的野生型存在于正常细胞内，对细胞增殖起抑制作用，参与细胞的“自杀”过程。尽管 P53 基因并不是凋亡所必须，但 DNA 损伤导致的细胞凋亡必须要有 P53 基因参加。它能使损伤细胞停止在 G1 期以使 DNA 损伤修复后再进入 M 期，如损伤不能修复则启动细胞凋亡程序。P53 蛋白可能是程序性细胞死亡的强诱导剂[7]，P53 基因可能是通过降低细胞内源性 bcl－2 蛋白的表达并抑制 bcl－2 蛋白功能；或提高细胞内 bax 蛋白表达，使 bcl－2/bax 蛋白比例失调而促进细胞凋亡[7]。有研究认为[8]，在中枢系统中，P53 基因诱导是分裂后细

维普资讯 http://www.cqvip.com



胞的不可逆损伤标记，对判断选择性神经元损伤有一定价值。本研究发现，大鼠惊厥发作后，同时出现P53、bcl－2蛋白的表达增强，说明细胞凋亡及抗凋亡机制均被启动。成年鼠惊厥后，P53蛋白表达迅速增强，于惊厥后1h已显著增加，2h达到高峰，并维持较高水平直到惊厥后48～72h；与此相反，bcl－2蛋白的表达时间及程度均不及P53，说明成年鼠惊厥性脑损伤过程中，诱导凋亡的机制增强，使神经元过多地死亡，从而导致脑损伤。幼龄鼠的基因表达则呈相反变化，不仅bcl－2的表达持续时间较P53长，且其程度也较高，故以抗凋亡效应为主，从而减轻了细胞凋亡及迟发性脑损伤的严重程度。据认为[9,10]，P53和bcl－2基因之间存在某些功能上的联系。恶性肿瘤中，P53与bcl－2基因表达呈明显负相关。有人更认为[10]，bcl－2基因的转移和表达，可在一定程度上抑制由P53诱导的细胞凋亡；而另有些文献则推测P53可能作为细胞内源性bcl－2蛋白表达的负调控转录因子，下调bcl－2的表达并抑制其功能[9]，两者间的蛋白表达存在负反馈调节作用。本研究中，不同成熟期神经元P53、bcl－2蛋白呈明显相反性表达，究竟这是由于正常未成熟脑细胞中bcl－2含量丰富，受刺激后迅速高度表达，从而抑制了P53的功能？抑或是因成熟期神经元受兴奋毒刺激后，通过不同的反应机制，使P53、bcl－2表达存在相异的表达时序性？尚值得进一步深入研究。

尽管惊厥发作后致脑损伤的机制中尚涉及其他因素，但是本研究结果揭示：惊厥后不同发育期神经元中P53／bcl－2的表达程度和时间程序，是参与神经元对损伤的耐受性、遏制凋亡过程的重要因素。

## 参 考 文 献


[1] Moshe SL. Brain injury with prolonged seizures in children and adults[J]. J Child Neurol, 1998;13:3－6.

[2] 蒋 莉，蔡方成，张晓萍. 大鼠不同成熟期大脑对持续惊厥的耐受性[J]. 中华儿科杂志，2002;40:429－433.

[3] 蒋 莉，蔡方成，李 欣，等. 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;40:545－549.

[4] Simle S, Hirsch E, Danober L. C－fos expression after single and kindle audiogenic seizure in Wistar rats[J]. Neurosci Lett, 1994;27:281－284.

[5] Hardwick MJ. Viral Encephalitis, in Cell Death and Disease of the Nervous System[M]. New Jersey: Humana Press, 1999;305－313.

[6] Hockenberg D. The role of bcl－2 in regulation of programmed cell death, Preceeding Annual Metting Amarian Association[J]. Cancer Res, 1992;33:585－588.

[7] 王焕明. P53基因与癫痫[J]. 国外医学神经病学与神经外科学分册，1999;26:6－9.

[8] Sakhi S, Sun N, Wing L, et al. Nuclear accumulation of P53 protein following kainic acid－induce seizures[J]. Neuroreport, 1996;7:493－496.

[9] Robert TS, Enrino M. Fifte Annual Pezcoller Symposium: Apoptosis[J]. Cancer Res, 1994;54:302－305.

[10] 成 军. 程序性细胞死亡与疾病[M]. 北京：北京医科大学及中国协和医科大学联合出版社，1997;62－73.


（上接第635页）


[6] 杨晓明，谢 玲，吴祖泽，等. 肝部分切除后人肝再生增强因子mRNA表达增强[J]. 生理学报，1997;49(5):599－601.

[7] 王爱民，杜双存，杨晓明，等. 重组人肝再生增强因子可逆转免疫损伤性肝纤维化[J]. 中国病理生理杂志，2000;16(4):298－300.

[8] 王爱民，杨晓明，郭瑞峰，等. 重组人肝再生增强因子对大鼠实验性肝纤维化的保护作用[J]. 中华医学杂志，1998;78(9):707.

[9] Lu C, Li Y, Zhao Y, et al. Intracrine hepatopoietin potentiates AP－1 activity through JAB1 independent of MAPK pathway[J]. FASEB J, 2002;16(1):90－92.