维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0379-04

实验性癫痫大鼠齿状回中微管相关蛋白-2的变化及其在癫痫中的意义

李 昱，吕长虹
（重庆医科大学基础医学院病理学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨实验性癫痫大鼠齿状回中微管相关蛋白-2(MAP-2)的变化及其在癫痫MFs出芽和突触重建中的意义。方法：建立海马快速电点燃模型,运用免疫组化方法研究齿状回中MAP-2在点燃不同阶段的动态变化，并结合尼氏染色和电镜观察阐明MAP-2的变化特点，探讨其原因及意义。结果：齿状回分子层颗粒细胞树突的MAP-2的免疫反应性于点燃后3天明显增强，至14天达到高峰($P<0.01$)，20～30天降至对照水平（$P<0.01$）。MAP-2的增加与齿门神经元的变性之间存在指数曲线相关关系（$R^2=0.9362$）。电镜下，分子层神经元树突内的微管于点燃后3天增多，14天明显增多，至30天已有崩解。还可见轴突分支出芽，神经末梢与树突形成多个突触。结论：MAP-2的过度表达在癫痫大鼠苔纤维出芽和突触重建过程中发挥了重要作用，而大量受损的齿门神经元对抑制性细胞广泛的去神经支配可能是其过度表达的启动因素。

【关键词】癫痫；MAP-2；齿状回；点燃
【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-02-26

Changes of microtubule-associated protein-2 immunoreactivity in epileptic dentate gyrus and the significance in epilepsy

LI Yu, et al
(Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of microtubule-associated protein- 2 (MAP2) in epileptic dentate gyrus and the significance in epilepsy. *Methods*: Alterations in MAP2-immunoreactivity(MAP2-IR) in the kindling model of epilepsy were investigated in rats with survival times ranging from three to thirty days. Nissl staining and electron microscopic studies were also used to explore more deeply. *Results*: MAP2-IR was obviously enhanced in the dendrites of granule cells three days after kindling and remained enhanced up to fourteen days ($P<0.01$). It was returned to control patterns twenty to thirty days after kindling ($P<0.01$). Nissl staining demonstrated an exponential curve correlation between the enhancement of MAP-2 and degeneration of hilar neurons ($R^2=0.9362$). Electron microscopic studies showed that microtubules of dendrite in the dentate molecule was increased three days after kindling and obviously increased fourteen days after kindling, but it was decreased thirty days later. Sprouting of dentate granule cell axons and synaptic contacts between nerve terminal and dendrite were discovered. *Conclusion*: It suggests that the overexpression of MAP-2 via the formation of microtubules may play an important role in the sprouting of mossy fibers in epileptic rats, and the extensive denervation of inhibitory cells by many damaged hilar neurons may trigger a process that leads to overexpression of MAP-2.

【Key words】Epilepsy; Microtubule-associated protein-2 (MAP-2); Dentate gyrus; Kindling

微管相关蛋白-2（Microtubule associated protein-2, MAP-2）是微管的结构蛋白之一，因其调节微管的聚合作用和微管的稳定性，对神经元轴突和树突的发生、延长和稳定具有重要作用[1]。研究表明，许多神经元去神经支配后，其树突内MAP-2显著减少，而实验性脑创伤后神经再支配和突触重建过程中，神经元树突内的MAP-2显著增加[2]，提示MAP-2可参与新的传入纤维产生所致的突触重建。目前MAP-2与癫痫时苔纤维（MFs）出芽和突触重建的关系国内尚无报道。本实验通过建立海马快速电点燃模型，运用免疫组化方法研究癫痫大鼠齿状回中MAP-2在点燃不同阶段的动态变化，并结合尼氏染色和电镜观察，阐明MAP-2的病理变化特点及可能原因，并探讨其在癫痫MFs出芽和突触重

作者介绍：李 昱（1973- ），女，讲师，博士，
主要研究方向：神经及肿瘤病理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

建中的意义。

1 材料与方法

1.1 动物模型的复制

雄性6～8周龄Wistar大鼠共21只，随机分为对照组（6只，其中空白对照和实验对照各3只）、实验组（15只，其中点燃后3、7、14、20及30天各3只）。麻醉后立即进行海马快速电点燃，当出现不少于5次Ⅳ级（Racine分级法）以上痫性行为且记录到棘波即为快速点燃达标。

1.2 标本取材

按不同保留期限在麻醉后行经心灌流固定。取脑，分别从电极插入点所在冠状面前、后5mm各取一块，制成蜡块。

1.3 尼氏染色及HE染色

从电极插入点所在冠状面前5mm蜡块切片，进行尼氏染色（甲苯胺蓝法）及HE染色。

1.4 免疫组化染色

从电极插入点所在冠状面后5mm蜡块切片，SP法进行免疫组化染色。（抗MAP2单抗浓度1:1000，德国BMB产品；即用型SP试剂盒购自北京中山生物技术有限公司）。

1.5 电镜观察

从B组15只动物中随机选取点燃后3天、14天和30天大鼠各1只，并从对照组中随机选取1只大鼠，从取材时电极插入点所在冠状面后5mm组织中切取齿状回分子层1mm^{3}的组织3块置于0.5%戊二醛中固定，超薄切片电镜观察。

1.6 统计学处理

通过图象分析仪分别对齿门划定区域内尼氏染色神经元的数目/面积百分比及分子层划定区域内MAP-2的面积百分比进行定量分析，再分别作成组设计方差分析和两两比较的q检验以及两者的相关分析。

2 结 果

2.1 点燃后各阶段齿门神经元的变化特点

点燃后3天，齿门神经元有明显变性改变，部分神经元内可见中央性尼氏小体溶解现象，且齿门神经元的数目明显减少，点燃后7天齿门神经元的数目继续减少，至点燃后14天下降至最低水平(F=312.30，P<0.01)，以后基本维持于该水平(表1)。

2.2 点燃后不同阶段齿状回MAP-2变化

对照组齿状回内MAP-2主要存在于颗粒细胞、CA4锥体细胞和齿门神经元的树突内，胞体内也有少量存在。点燃后3天，齿状回颗粒细胞的树突内MAP-2免疫反应性（MAP2-IR）明显增强（P<0.01）呈点状，在分子层内1/3沿着颗粒细胞层呈放射性分布。点燃后7天，在分子层内1/3，继续增强的MAP2-IR（P<0.01）呈细丝状，密集地围绕颗粒细胞层呈放射性分布，并向分子层外2/3延伸。点燃后14天，齿状回分子层内MAP2-IR显著增强，贯穿整个分子层形成了一个密集带。点燃后20～30天，齿状回颗粒细胞的树突内的MAP2-IR减低，逐渐回到对照水平（和对照组相比，P>0.05）（表2，图1,2）。

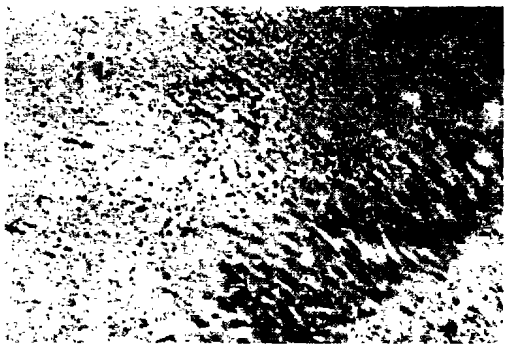


图1 点燃后3天大鼠齿状回分子层内点状密集的MAP-2免疫反应产物围绕颗粒细胞呈放射状分布 SP法 ×400



图2 点燃后14天大鼠齿状回分子层内细丝状密集的MAP-2免疫反应产物在整个分子层形成了一个密集带 SP法 ×400

2.3 齿状回分子层内MAP2-IR的变化与齿门神经元数目变化的相关分析

点燃以后齿状回分子层内MAP2-IR和齿门神经元的数目都经历一变化过程，为寻求二者的关系，对点燃后3～14天齿状回MAP2-IR的面积百分比（Y）和齿门神经元的数目/面积百分比（X）作一相关分析，结果表明：点燃后3天至14天期间，二者存在指数曲线相关关系，即MAP2-IR的增加伴随着齿门神经元数目的减少。指数曲线方程为：$\hat{Y}$=61.66(0.8317)x。确定系数R^2=0.9362，表明该阶段MAP2-IR的增加伴随着齿门神经元数目的减少。

2.4 超微结构观察

与对照组相比，点燃后3天大鼠齿状回分子层中神经元树突内微管增多，胞浆内细胞器、核仁、

维普资讯 http://www.cqvip.com

核染色质及胶质细胞均无明显改变。点燃后14天，分子层神经元胞浆内粗面内质网明显增生，同时神经元树突内微管进一步增多且多处视野内可见一些神经末梢与富含微管的树突形成多个突触联系，其后膜较前膜厚而致密，突触间隙清晰、稍宽，为Gray I 型突触或非对称性突触。此外，许多视野内可见神经元近端轴突有分支现象，且近端轴浆内线粒体非常丰富。点燃后30天，分子层神经元胞浆内仍无明显超微结构改变，树突内的微管开始崩解，微管的数量有所减少，但是仍可见多个神经末梢与树突形成多个突触联系（图3,4）。

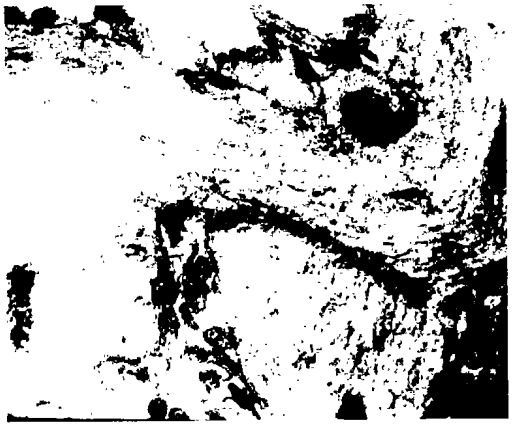


图3 点燃后14天大鼠齿状回分子层内树突中微管明显增多 TEM×35 000

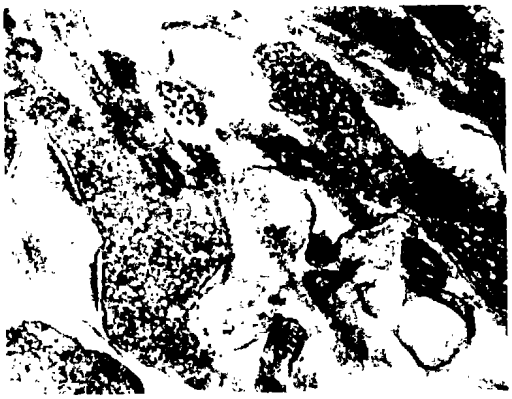


图4 点燃后14天大鼠齿状回分子层内神经轴索末梢中充满圆形小泡，且神经末梢与树突形成不对称性突触联系 TEM×35 000

3 讨 论

3.1 MAP2的变化与MFs出芽和突触重建的关系

MFs出芽和突触重建是癫痫齿状回特征性的变化之一[3~5]。本实验中微管组成成分MAP2-IR也经历一变化过程。点燃后，齿状回分子层内MAP2-IR逐渐增强，于点燃后14天达到最高峰，然后逐渐恢复至对照水平。这一变化时程与已知的MFs反应性出芽的时程间具有相关性——前者产生于MFs发芽以前并持续于发芽期间。电镜下齿状回分子层的超微结构变化与光镜下该区域内MAP2-IR 的动态变化密切相关。第一，作为微管结构蛋白之一的MAP-2具有促微管聚合的启动作用，它对于微管稳定性、细胞器的结构以及神经元的总体构建均有重要作用。点燃的早期和中期齿状回分子层内MAP2-IR的增加与该层树突内微管的增多相平行；点燃的晚期树突内微管崩解、数量减少，同时MAP2-IR也逐渐下降至对照水平。尤其在点燃中期，数量显著增多的微管和大量增生的粗面内质网提示该期微管蛋白的合成非常旺盛。第二，正常情况下轴突分支应从轴突远端（轴突终末）发出，近端轴突一般不分支。实验中观察到癫痫中期广泛出现近端轴突分支现象，并且持续到癫痫点燃后30天。这种不寻常的分支现象与光镜下颗粒细胞轴突出芽相吻合。第三，在癫痫中、后期观察到许多视野内有多个神经末梢与富含微管的树突形成非对称性突触联系，而兴奋性的颗粒细胞的轴突—MFs与其树突建立的突触也为非对称性突触。综合以上结果可为MAP-2的变化与MFs出芽及突触重建的关系提供一定的超微结构依据。调节微管聚合作用和微管稳定性的MAP-2在神经细胞发育过程中，对轴突和树突的发生、延长和稳定发挥着重要作用，而微管组成成分MAP2-IR的增强产生于MFs出芽以前并持续于出芽期间，结合电镜结果，我们认为在癫痫点燃后神经再支配过程中，作为微管结构蛋白之一的MAP-2，其增加有助于新的神经侧突产生以及突触重建，可作为MFs出芽和突触重建的间接指征。

3.2 齿门神经元脱失与齿状回分子层内MAP2-IR变化的关系

齿门神经元具有两种类型，一种是选择性易损的中间神经元，如生长抑素能神经元、神经肽Y能神经元和苔状细胞等，它们组成GABA能篮细胞的激活系统；另一种为选择性不易受损的神经元，如GABA能神经元。正常状态下，这些激活系统对GABA能篮细胞产生兴奋作用，后者则介导颗粒细胞的前馈和反馈抑制，降低颗粒细胞的兴奋性，从而维持兴奋和抑制的平衡[6]。大鼠点燃后，齿门神经元的数目有一个变化过程，即点燃后3天数目减少，至点燃后14天减至最少，以后维持该水平不变。癫痫状态下脱失的齿门细胞究竟为何种类型，

维普资讯 http://www.cqvip.com

目前尚无定论。大多数学者认为致痫后，GABA能神经元存活下来，而SS能神经元和苔状细胞则发生了不可逆损伤,导致神经元脱失。由于正常状态下苔状细胞轴突支配齿状回分子层内侧，与分布于该层的颗粒细胞树突建立突触联系。致痫后苔状细胞丢失，齿状回分子层发生去神经支配，该区突触密度也随之减少，原来支配CA3区的齿状回颗粒细胞的轴突—MFs便开始分支、出芽，并穿过颗粒细胞层，分布于分子层内1/3，与颗粒细胞树突棘形成大量异位非对称突触，该区突触密度又得以恢复[7,8]。可见齿门神经元的脱失直接导致齿状回分子层去神经支配，而实验发现点燃后3天至14天期间，齿状回分子层内MAP2-IR的面积百分比与齿门神经元的数目/面积百分比间存在着指数曲线相关关系，这一关系提示齿门神经元的脱失伴随着MAP-2的增加。本实验发现齿状回分子层内MAP2-IR的增加与该层再神经支配密切相关，结合MAP-2对细胞骨架成分的轴突转运作用，我们认为，MAP-2的过度表达导致微管聚合物的过度产生，在癫痫大鼠苔纤维出芽和突触重建过程中发挥了重要作用，而大量受损伤的齿门神经元对抑制性细胞广泛的去神经支配可能启动了MAP-2的过度表达，因此我们认为癫痫状态维持的可能机制为：齿门神经元的脱失引起齿状回分子层发生去神经支配，成为该层分子层内MAP2增加的始动因素，MAP2增加所致的颗粒细胞轴突出芽并与树突建立突触联系使得颗粒细胞树突再神经支配，从而使颗粒细胞产生回馈性兴奋，导致癫痫状态的维持。

参 考 文 献

[1] Nunez J. Immature and mature variants of MAP2 and tau proteins and neuronal plasticity[J]. Trends Neurosci,1988; 11:477-479.

[2] Folkerts MM, Berman RF, Muizelaar JP,et al. Disruption of MAP-2 immunostaining in rat hippocampus after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma. 1998;15:349-363.

[3] Wenzel HJ, Wolley CS, Robbins CA, et al. Kainic acid-induced mossy fibers sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats[J]. Hippocampus, 2000;10:244-260.

[4] Lynch M, Sutula T. Recurrent excitatory connectivity in the dentate gyrus of kindled and kainic acid-treated rats[J]. J Neurophysiol, 2000;83:693-704.

[5] Wuarin JP, Dudek FE. Excitatoty synaptic input to granule cells increases with time after kainate treatment[J]. J Neurophyiol, 2001;85:1067-1077.

[6] De Lanerolle. N C., J.H.Kim, et al. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human teporal lobe epilepsy[J]. Brain Res, 1989;495:387-395.

[7] Sloviter R.S. Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats[J]. Neurosci Lett, 1992;17:91-96.

[8] Represa A., Jorquera I. Epilepsy induced collateral sprouting of hippocampal mossy fibers: does it induce the development of ectopic synapses with granule cell dendrites [J]. Hippocampus, 1993;3:257-268.

(上接第378页)

0.419, $P<0.01$）。PBMC、CD_4^+、CD_8^+与肿瘤细胞一样，在化疗过程中同样接受细胞毒性药物的损伤而产生“自净”，同时血液作为人体的保护屏障具有排毒、解毒功能，用血细胞的变化来反映组织的变化，使MDR的检测趋于简单。

3.4 IC法与FCM法检测PBMC P-gp 的比较

无论是肿瘤病人或正常人，用IC检测PBMC P-gp表达率较FCM低（$P<0.05$），说明IC法较FCM法敏感性差，检出率低。

参 考 文 献

[1] Walter T, Klimecki, Bernard W.P Glycorprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers [J]. blood,1994;83(9):2451-2458.

[2] Peteni M, Galimberti S. Treatment of multidrug resistance in oncology and hematology[J]. Tumori,1997;83 (s5): 17-21.

[3] Fojo AT, Ueda K, Slamor DJ, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissue[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:265-272.

[4] Doris Drach, Shourong zhao, Johannes Drach, et al. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cell express a function multidrug resistance phenotype[J]. Blood , 1992;80(11):2729-2735.

[5] Dhoge CR, Moerloose BM, Benoit YC, et al. Expression of the MDR gene product p-glycoprotein in childhood neuroblastoma[J]. Cancer , 1997;80(7):1250-1257.