DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.041
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1217-02

论著

反应性胶质细胞增生和神经元活化在戊四氮点燃大鼠慢性癫痫形成过程中的作用

杨嘉君,朱遂强,王开颜,阮旭中 (华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科,武汉 430030)

提 要:目的 探讨戊四氮点燃过程中海马神经元细胞活化和胶质细胞增生与慢性癫痫发病机制的关系。方法 大鼠随机分为对照组和药物组(PTZ35 mg/kg,腹腔注射,每日1次),采用免疫组织化学方法观察核因子κB(NF-κB)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)表达水平。结果 药物组大鼠注射戊四氮后在行为学未出现惊厥,脑电图未出现痫性放电的点燃前潜伏期内,出现胶质细胞增生,以CA3区、门区明显,亦出现神经细胞活化,以齿状回、CA1区明显,与对照组比较,有显著性差异($P<0.05$)。结论 大鼠注射戊四氮后引起海马神经元活化、反应性胶质细胞增生,神经元可塑性是戊四氮点燃大鼠癫痫形成的重要机制。

关键词:点燃;神经元可塑性;核因子;胶质原纤维酸性蛋白;癫痫
中图法分类号:R329.28;R338.1;R742.102 文献标识码:A

Expressions of NF-κB and GFAP in rat hippocampus during pentylenetrazol kindling-induced epilepsy

YANG Jia-jun, ZHU Sui-qiang, WANG Kai-yan, RUAN Xu-zhong (Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of gliosis and neuronal activation with the mechanism of chronic epilepsy in rats induced by pentylenetrazol kindling. Methods Pentylenetetrazol (PTZ) at 35 mg/kg was injected intraperitoneally to rats every day for 4, 10, and 14 d respectively ($n=9$ for every group). Another 18 rats receiving intraperitoneal injection of saline at the same dose served as control. Expressions of NF-κB and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were detected with immunohistochemical methods in control and treatment group. Results During PTZ-kindling and before the occurrence of spontaneous seizure confirmed by behavior and EEG, reactive gliosis, mainly in the hilus and CA3, and neural activation, principally in the CA1 and dentate gyrus were observed in the hippocampi of treatment rats, distinctively compared with control ($P<0.05$). Conclusion The injection of pentylenetetrazol can cause the activation of neurons and reactive gliosis in the hippocampus. Neural plasticity may be an important mechanism of epileptogenesis in the process of PTZ kindling rats.

Key words: kindling; neuron plasticity; NF-κB; GFAP

目前,癫痫发生机制的研究热点集中在神经元可塑性上,戊四氮(Pentyleneletrazol, PTZ)点燃模型是研究癫痫发病机制和神经元可塑性的一种理想动物模型,但点燃发生的确切机制尚不清楚。既往研究认为,神经元活化及胶质增生与癫痫的发病密切相关,但多是癫痫状态下的大鼠,本研究以PTZ诱导大鼠形成癫痫,以点燃过程,即癫痫形成过程中的大鼠海马为研究靶点,用免疫组织化学方法动态观察了神经元活化标志(NF-κB)和胶质增生标记物胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)表达水平,进行组间比较,寻找其差异,为与癫痫形成相关的神经元可塑性提供重要依据,为癫痫临床防治提供实验依据。

1 材料与方法

健康成年雄性Wistar大鼠45只,体重200~260 g,由湖北省防疫站动物中心提供。随机分为对照组18只,药物组(P1、P2、P3)27只。药物组大鼠每日上午9:00腹腔注射PTZ(35 mg/kg, Sigma),对照组同时腹腔注射相同剂量的生理盐水,注毕观察大鼠行为改变。按Racine制定的标准观察是否有癫痫发作。

分别于P1组PTZ腹腔注射第4天;P2组PTZ腹腔注射第10天;P3组PTZ腹腔注射第14天,用2%戊巴比妥钠腹腔注射(40 mg/kg)麻醉后,断头取脑,恒冷箱切片机行10 μm脑冠状连续切片。GFAP单克隆抗体(深圳晶美公司,1∶1500),NF-κB多克隆抗体(广州中山公司,1∶100)。对照组染色0.01 mol/L^{-1} PBS(pH 7.4)代替一抗。采用SABC法行免疫组化染色。图像分析系统HPLAS-1000高分辨彩色病理图文分析行NF-κB、GFAP阳性细胞计数。

数据以$\bar{x}\pm s$表示,均数行ANOVA分析,药物组各组与对照组比较先行方差分析,再行Dunnett's t检验。

2 结果

2.1 行为学观察

PTZ腹腔注射的27只大鼠,其中作行为学和脑电观察的18只大鼠,按Racine标准判断癫痫发作,另外9只大鼠全部点燃。用作免疫组化大鼠取材时,经行为学观察和脑电证实均未出现痫性发作。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170333)
作者简介:杨嘉君(1968-),女,河南省洛阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事癫痫方面的研究,现在洛阳东方医院神经内科。电话:(0379)4964318
收稿日期:2002-05-13;修回日期:2002-07-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 GFAP 表达

于 20 倍物镜下阳性细胞计数结果，见表 1。对照组（N 组）大鼠海马各区、齿状回 GFAP 阳性细胞数较少。P1 组、P2 组、P3 组各组海马 CA 各区、齿状回门区可见 GFAP 阳性细胞数增加，胶质细胞胞体肥大不明显，突起增多，以 CA1 区、CA3 区和齿状回门区为甚，与 N 组比较，有显著性差异（$P<0.05$）。

表 1 各组海马 CA1、CA3、齿状回门区 GFAP 阳性细胞计数（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 GFAP positive neurons in the CA1, CA3 and hilus of dentate gyrus in the hippocampus of rats（$\bar{x}\pm s$）

Group	CA1	CA3	Hilus of dentate gyrus
N	21.17±1.26	25.37±1.13	22.67±1.04
P1	35.07±1.54△	40.85±1.21△	39.22±0.71△
P2	42.01±0.65△	46.09±0.91△	44.52±1.05△
P3	47.13±0.73△	48.87±0.60△	55.87±0.86△

△: $P<0.05$ *vs* N

2.3 NF-κB 表达

对照组（N 组）的大鼠海马 CA1 区、齿状回少见到核黄褐色着染的神经细胞（NF-κB 活性的阳性细胞）。P1、P2、P3 组各组海马 CA1 区、齿状回可见到大量核黄褐色着染的神经细胞。于 20 倍物物镜下阳性细胞计数结果与 N 组比较，见表 2，P1、P2、P3 组 3 组海马 CA1 区、齿状回的阳性细胞数明显增加，具有显著性差异（$P<0.05$）。

表 2 各组海马 CA1、齿状回 NF-κB 阳性细胞计数（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 NF-κB positive neurons in the CA1 and dentate gyrus of the hippocampus in rats（$\bar{x}\pm s$）

Group	CA1	Dentate gyrus
N	5.15±0.25	11.12±1.05
P1	23.23±4.12△	27.86±3.15△
P2	69.01±3.93△	60.25±1.43△
P3	81.86±5.29△	71.97±6.15△

△: $P<0.05$ *vs* N

3 讨论

致痫剂慢性点燃动物的过程与人类的中枢神经系统反复发作异常放电，形成异常放电环路致癫痫的过程极其相似，所以，本研究以中枢性兴奋剂戊四氮（PTZ）成功地复制出点燃模型。又以戊四氮点燃大鼠形成癫痫过程中的大鼠海马为靶点，研究了海马区 NF-κB 和 GFAP 的表达，阐明神经元可塑性是癫痫发生的重要机制。

核因子 NF-κB 是一种多极基因调控蛋白，静息状态下，位于细胞浆中，可被多种因子活化，NF-κB 激活后，转位入核，与靶基因的 5′端调控因子结合，调节靶基因表达，调节神经元可塑性，所以 NF-κB 的核移位是神经元活动的重要标志。胶质原酸性蛋白为星形细胞特异性标记物，可代表胶质细胞大多数，GFAP 的表达水平可以判定胶质细胞的增生情况。星形胶质细胞在保持突触功能和介导轴突出芽中具有重要作用。

本实验结果显示：在戊四氮点燃大鼠形成癫痫的过程中，在大鼠行为学未出现惊厥，脑电图未出现痫样放电的过程中，NF-κB 和 GFAP 表达已增加，药物组各时间点与对照组比较，差异有显著性意义。我们推测，中枢兴奋剂（PTZ）激活 NF-κB 的过程大致如下：静息状态下，NF-κB 与其抑制蛋白 I-κB 结合，驻留在胞质内；细胞受到 PTZ 刺激后，I-κB 被迅速磷酸化，经过短暂的修饰后被蛋白降解；激活的 NF-κB 进入细胞核内，结合于特定基因的 κB 序列，启动基因转录，与 Michael 等[1]研究是一致的。外界因素刺激 IκB 发生磷酸化移位入核后，NF-κB 也可诱导自身克隆基因和 I-κB 的表达水平，以达到自身调节的作用[2]。

GFAP 的高度表达，提示点燃前的过程中星形胶质细胞一直处于一种异常活跃状态，在这种状态下与癫痫有关的前脑腓肽一类的物质在星形胶质细胞得到表达，这些物质都可作用于邻近的神经元，影响神经元的兴奋性、存活和突起的生长，进而形成胶质瘢痕，通过干扰神经元回路成为诱发癫痫的因素之一。由于星形胶质细胞细胞膜上有高亲和性载体，可以转运兴奋性氨基酸，提高神经元兴奋性，促进癫痫形成[3]。在点燃过程中，GFAP 参与了重构过程，脑病理的改变伴随着 GFAP 的增加。

Lerner-Natoli 等[4]认为 NF-κB 也可以在星形胶质细胞过多表达，可能是激活后引起的级联反应，这在癫痫的基因治疗方面引起关注。Mattson 等[5]认为 NF-κB 活化参与神经元的生长，并在神经元的可塑性可程中起重要作用。神经细胞 NF-κB 活化后可出现苔藓纤维发芽（研究待发表）、突触重健和胶质增生。

由此，我们可以推测，在点燃大鼠癫痫形成过程中，在自发性癫痫发作之前约 23 周的潜伏期，神经元被激活、胶质细胞增生，神经元发生可塑性变化，神经网络进行重组，建立异常神经网络，最终导致点燃，即癫痫形成，这为我们临床防治癫痫提供了实验室依据。

参考文献：

[1] Michael J M, Sankar C. Signal Transduction through NF-κB[J]. Immunol Totay, 1998, 19(1): 80—88.

[2] Siebenlist H, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-κB[J]. Annu Rev Cell Biol, 1994, 10(3): 405—455.

[3] Miller H P, Levey A I, Roth Stein J D, *et al*. Alterations in glutamate transporter protein levels in kindling-induced epilepsy[J]. J neurochem, 1997, 68(4): 1 564.

[4] Lerner-Natoli M, Montpiel P, Roussot M C, *et al*. Sequential expression of surface antigens and transcription factor NfkappaB by hippocampal cells in extotoxicity and experimental epilepsy[J]. Epilepsy Res, 2000, 41(2): 141—154.

[5] Mattson M P. Culmsee C, Yu Z, *et al*. Roles of nuclear factor κB in neuronal survival and plasticity[J]. J Neurochem, 2000, 74(2): 443—456.

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net