

· 论著 ·

5-羟色胺 1A 受体激动剂 8-OH-DPAT 对癫痫合并抑郁神经发生的研究

杨萍, 孙美珍, 杨小燕, 李琼

山西医科大学附属第一医院神经内科, 山西省太原市 030001

摘要:目的 探讨 5-羟色胺 1A(5-HT_{1A})受体与匹罗卡品诱导的癫痫大鼠合并抑郁海马齿状回神经发生的关系。方法 从匹罗卡品诱导的慢性自发性颞叶癫痫大鼠中筛选出合并抑郁的大鼠 32 只,随机分成模型组、卡马西平(CBZ)组、CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量(0.1 mg/kg)组、CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量(1.0 mg/kg)组,每组 8 只。对照组 8 只,注射生理盐水(10 ml/kg)。药物干预后,制备大鼠脑片,利用免疫组织化学方法检测大鼠的神经发生。结果 模型组海马齿状回神经发生较对照组明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。CBZ 组、CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组、CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组较模型组神经发生明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组较 CBZ 组、CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组神经发生明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。但 CBZ 组与 CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组比较神经发生的差异没有统计学意义($P > 0.05$)。结论 高剂量的 5-HT_{1A} 受体激动剂 8-OH-DPAT 在实验的过程中能够增加癫痫合并抑郁大鼠的神经发生。

关键词: 癫痫; 抑郁; 神经发生; 5-羟色胺 1A 受体; 8-OH-DPAT; 大鼠

Effect of 5-hydroxytryptamine 1A receptor activator 8-OH-DPAT on neurogenesis in epileptic rats with depression

YANG Ping, SUN Mei-Zheng, YANG Xiao-Yan, LI Qiong. Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To explore the correlation between 5-hydroxytryptamine (5-HT) 1A receptors and hippocampal dentate gyrus neurogenesis in pilocarpine-induced epileptic rats with depression. **Methods** Thirty-two rats with depression which were selected from pilocarpine-induced spontaneous temporal lobe epileptic rats were randomly divided into 4 groups ($n=8$ each): model, CBZ, CBZ + 8-OH-DPAT low dose (0.1 mg/kg) and CBZ + 8-OH-DPAT high dose (1.0 mg/kg). The rats receiving an injection of normal saline were used as the control group. Neurogenesis in the brain tissue was determined with immunohistochemistry. **Results** The hippocampal dentate gyrus neurogenesis increased significantly in the model group compared with that in the control group ($P < 0.05$). The CBZ and the CBZ + 8-OH-DPAT low dose and high dose groups showed increased neurogenesis compared with the model group ($P < 0.05$). More remarkably increased neurogenesis was found in the CBZ + 8-OH-DPAT high dose group compared with the CBZ and the CBZ + 8-OH-DPAT low dose groups ($P < 0.05$). There were no significant differences in the neurogenesis between the CBZ + 8-OH-DPAT low dose and the CBZ groups. **Conclusions** High doses of 8-OH-DPAT can increase neurogenesis in epileptic rats with depression.

Key words: epilepsy; depression; neurogenesis; 5-hydroxytryptamine 1A receptor; 8-OH-DPAT; rats

目前抑郁与癫痫共存被认为是一种常见的神经精神病学现象^[1]。神经发生(neurogenesis)是脑内产生新的神经元的过程,其中海马齿状回(dentate gyrus, DG)的亚颗粒增生带(subgranular-zone,

SGZ)是目前研究最多的神经发生区域之一^[2]。已有充分的证据显示 5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)^[3,4]等神经递质与癫痫、抑郁有关,并且 5-HT 可以调节海马的神经发生。本研究使用 5-

基金项目:山西省归国人员基金(2008-52)

收稿日期:2010-11-17;修回日期:2011-01-23

作者简介:杨萍(1984-),女,医师,研究生,主要从事癫痫的研究。

HT1A 受体特异性激动剂 8-OH-DPAT 腹腔注射匹罗卡品诱导慢性癫痫大鼠合并抑郁大鼠模型,测定其行为学指标,采用免疫组化方法研究海马齿状颗粒细胞神经发生并探讨其相互关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

成年雌性健康清洁级 SD 大鼠 160 只,重量为 180 ~ 230 g,由山西医科大学实验动物中心提供。实验动物均以标准饲料喂养,自由摄食饮水,自然光照射,换气扇通风。随机分成对照组 8 只(生理盐水 10 ml/kg),实验组 152 只(其中造模时死亡 22 只)。从 130 只癫痫大鼠中筛选出合并抑郁的大鼠 32 只,并随机分成 4 个组,即模型组、CBZ 组、CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量(0.1 mg/kg)组、CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量(1.0 mg/kg)组,每组 8 只。

1.2 药物与主要试剂

匹罗卡品(pilocarpine, POLO)产自美国 ABCR 公司,氯化锂(lithium chloride, LiCl) 、8-OH-DPAT、BrdU 产自美国 Sigma 公司,小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(BM0201)、山羊抗小鼠 IgG-TRITC(SA1021)均由武汉博士德公司提供。

1.3 模型制作

腹腔注射氯化锂 3 mEq/kg, 18 h 后再给予匹罗卡品 30 mg/kg,在注射匹罗卡品前 30 min 注射阿托品 1mg/kg 以拮抗外周胆碱能作用,若 30 min 内无惊厥发作,可按每次 10 mg/kg 追加匹罗卡品,追加达 4 次仍未达到 IV 级发作的不再追加。对照组注入生理盐水 10 ml/kg。操作完毕后使其采取侧卧位送回鼠笼。

行为学观察参考 Racine 分级标准,0 级:无惊厥;I 级:不动和面部自动症(眼闭,面部痉挛等);II 级:头部的点动,有更多严重的面部与口部的痉挛;III 级:一侧的前腿阵挛抽搐;IV 级:双前腿抬起并阵挛抽搐;V 级:双腿抬起阵挛抽搐,并失平衡摔倒。IV 级和 V 级发作为全身性惊厥或大发作。癫痫持续状态后 40 min 给予安定 4 mg/kg 和 10% 水合氯醛 3 mL/kg,终止发作。点燃出 Racine(IV 级以上)并存活者入组,并纪录大鼠脑电图。

1.4 抑郁的测定

1.4.1 体重及摄食量 每日 8:00 加食物 50 g,次日 8:00 称食物余量,同时称动物体重。

1.4.2 敞箱试验(open-field test) 敞箱装置由不透明材料制成,底面为 76 cm × 76 cm 的正方形并被

等分为 25 个等边方格,周围有高 42 cm 的墙壁。将大鼠置于中心方格内,观察大鼠在 5 min 内中央格停留时间、穿越格数(四爪均进入的方格方可记数,为水平运动得分)、后肢直立次数(两前爪腾空或攀附墙壁,为垂直运动得分)、清洁运动记数、粪便粒数。彻底清洁敞箱后再进行下一只大鼠的观察。

1.4.3 抑郁的判定 抑郁大鼠体重增长缓慢,摄食量减少,敞箱试验中水平运动次数、垂直运动次数、理毛时间减少、中央格停留时间、粪粒粒数增加,与对照组比较有统计学意义即可评定是抑郁。

1.5 免疫单标记法给药方式

溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)液溶于生理盐水中,浓度为 10 mg/ml 进行标记,每次剂量为 50 mg/kg,每 2 小时 1 次,连续注射 2 次。大鼠在末次注射 BrdU 24 h 后,左心灌注固定取脑。

1.6 免疫单标记法

水合氯醛麻醉大鼠后,依次用生理盐水、4% 多聚甲醛灌注,取脑,固定。放于恒冷切片机中用组织包埋剂包埋,恒冷冰冻切片机连续冠状切片取海马和齿状回互包平面,切片厚 25 μm,每隔 2 张取 1 张切片,每例标本取切片不少于 8 张,全部切片用于免疫组织化学染色。脑片入 0.01 M PBS 漂洗 5 min × 3 次;入新配制的 1% H₂O₂ 溶液中室温下孵育 30 min,灭活内源性过氧化物酶;入 2N 盐酸中 37 °C 60 min;0.1 M 硼酸缓冲液(pH 8.5) 25 °C 10 min,以中和盐酸;滴加正常山羊血清工作液封闭,室温孵育 30 min,倾去,勿洗,以减少特异性背景;入鼠抗尿嘧啶脱氧核苷(BrdU)单克隆抗体(1:100),4 °C 孵育 72 h,同时任取一张切片用 PBS 代替一抗作为阴性对照;入生物素标记的小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(二抗)工作液,37 °C 孵育 10 min;辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 °C 孵育 10 min;用 DAB 和 H₂O₂ 呈色 10 min;自来水充分冲洗,贴片、脱水、透明和封片,光镜观察。以上各步骤前后均用 0.01 mol/l 的 PBS(pH 7.2 ~ 7.4) 冲洗 3 次,每次 5 min。

1.7 结果分析和统计处理

BrdU 细胞计数:400 倍光镜下观察大鼠齿状回颗粒细胞全层(GCL)、颗粒下层增生带(SGZ, GCL 边缘与门区之间约 2 个细胞体厚的区域) BrdU 阳性细胞数,每只大鼠随机选取 8 个非连续的脑片进行记数,得出每张切片的平均值。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS17.0 软件包进行方差分析,组间

比较用 LSD-T 检验。其它各组计数资料进行单因素方差分析方法。

2 结果

2.1 癫痫行为学和脑电图观察

造模时症状 Racine 分级,其中 I 级 6 只(6/152),II 级 7 只(7/152),III 级 5 只(7/152),IV 级 32 只(32/152),V 级 102 只(102/152)。进入 SE 的大鼠均达 Racine 标准 IV ~ V 级,部分 III 级可以发展为 SE 发作,仅达 RacineI ~ II 级者均不会发展成 SE。首次注射不出现 SE 者 20 只(13.16%),在 30 min 后追加匹罗卡品,均出现 SE。大鼠死亡 22 只(13.33%),主要为 SE 所致。造模 SE 成功 130 只(86.67%)。

匹罗卡品腹腔注射后,5 ~ 10 min 大鼠出现凝视、不动,至 15 ~ 30 min 后开始表现为“湿狗样震颤”、自动症及轻度边缘性惊厥,30 min 后出现严重边缘性惊厥状态,表现为流涎、姿势失衡、肢体阵挛等,持续 5 ~ 10 h 左右,之后进入静止期,凡在急性期诱发出癫痫持续状态的大鼠,在 15 ~ 60 d 内 100% 呈现一次以上自发性发作。对照组大鼠未观察到诱发发作和自发性发作。

给药后 30 ~ 60 min,模型大鼠脑电图开始出现以棘波、尖波、尖慢综合波等波形为主的散在癫痫波形,间断发作(见图 1)。

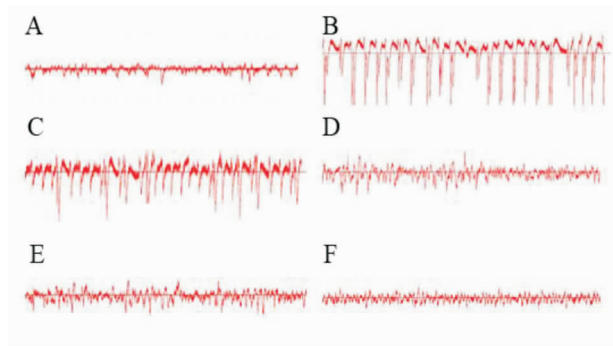


图 1 大鼠脑电图所见。A:对照组显示正常脑电图;B:模型组急性期可见阵发的棘波、尖波、尖慢综合波;C:模型组慢性期可见阵发的多棘波、尖波;D:CBZ 组可见阵发的多棘波、尖波,较慢性期的波幅压低;E:CBZ + 8-OH-DPAT(低)组可见散在单个棘波或尖波,且波幅明显降低;F:CBZ + 8-OH-DPAT(高)组可见单个棘波或尖波较 CBZ + 8-OH-DPAT 低组明显减少,且波幅明显降低。

2.2 抑郁行为学观察

在体重、摄食量、水平穿越格数、竖立次数、理毛时间、中央格停留时间、粪便粒数等指标上,CBZ 组、CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组、CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组与 CBZ 组、CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组比较差异有统计学意义($P < 0.001$)。CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组与 CBZ 组比较差异无统计学意义(见表 1、表 2)。

表 1 实验 32 d 各组大鼠 open-field 行为学指标 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	垂直运动次数	水平运动次数	中央格停留时间(s)	理毛时间(s)	粪便粒数
对照组	8	22.75 ± 2.55★▲●■	60.13 ± 12.45★▲●■	0.50 ± 0.76★▲●■	13.38 ± 3.02★▲●■	3.50 ± 1.07★▲●■
模型组	8	7.50 ± 2.51◆▲●■	16.50 ± 6.09◆▲●■	4.13 ± 1.13◆▲●■	4.00 ± 1.85◆▲●■	9.88 ± 2.37◆▲●■
CBZ 组	8	12.63 ± 4.47◆★■	29.63 ± 4.03◆★■	2.38 ± 0.74◆★■	7.88 ± 2.53◆★■	7.13 ± 1.96◆★■
CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组	8	14.38 ± 3.29◆★■	32.50 ± 6.07◆★■	2.25 ± 0.71◆★■	8.50 ± 2.67◆★■	6.88 ± 1.81◆★■
CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组	8	21.38 ± 1.92★▲●	57.00 ± 8.40★▲●	0.75 ± 0.89★▲●	12.63 ± 1.85★▲●	4.00 ± 1.51★▲●
F		33.90	44.54	23.19	19.79	16.73
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:◆为与对照组比较;★为与模型组比较;▲为与 CBZ 组比较;●为与 CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组比较;■为与 CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组比较。

表 2 实验 32 d 各组大鼠体重、摄食量的比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重	摄食量
对照组	8	302.50 ± 7.56★▲●■	31.23 ± 2.29★▲●■
模型组	8	260.00 ± 10.69◆▲●■	17.13 ± 2.75◆▲●■
CBZ 组	8	276.00 ± 9.98◆★■	21.00 ± 2.78◆★■
CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组	8	281.25 ± 7.91◆★■	22.50 ± 2.78◆★■
CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组	8	291.88 ± 4.58◆★▲●	27.13 ± 2.18◆★▲●
F		28.98	36.06
P		<0.05	<0.05

注:◆为与对照组比较;★为与模型组比较;▲为与 CBZ 组比较;●为与 CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组比较;■为与 CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组比较。

2.3 病理学观察

实验 32 天注射 BrdU 后,模型组海马齿状回 BrdU 标记阳性细胞个数与对照组比较明显增加 ($P < 0.05$)。CBZ 组、CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组和 CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组标记阳性细胞个数明显高于模型组 ($P < 0.05$)。CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组标记阳性细胞个数明显高于 CBZ 组及 CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组 ($P < 0.05$),但 CBZ 组与 CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组比较差异没有统计学意义(见表 3、图 2)。

表 3 各组大鼠海马齿状回 BrdU 标记阳性细胞个数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	海马齿状回区阳性细胞数
对照组	8	3.25 ± 1.23 *▲●■
模型组	8	38.38 ± 6.41 ◆▲●■
CBZ 组	8	57.75 ± 12.41 ◆★■
CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组	8	58.88 ± 7.49 ◆★■
CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组	8	98.0 ± 9.75 ◆★▲●

注:◆为与对照组比较;★为与模型组比较;▲为与 CBZ 组比较;●为与 CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组比较;■为与 CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

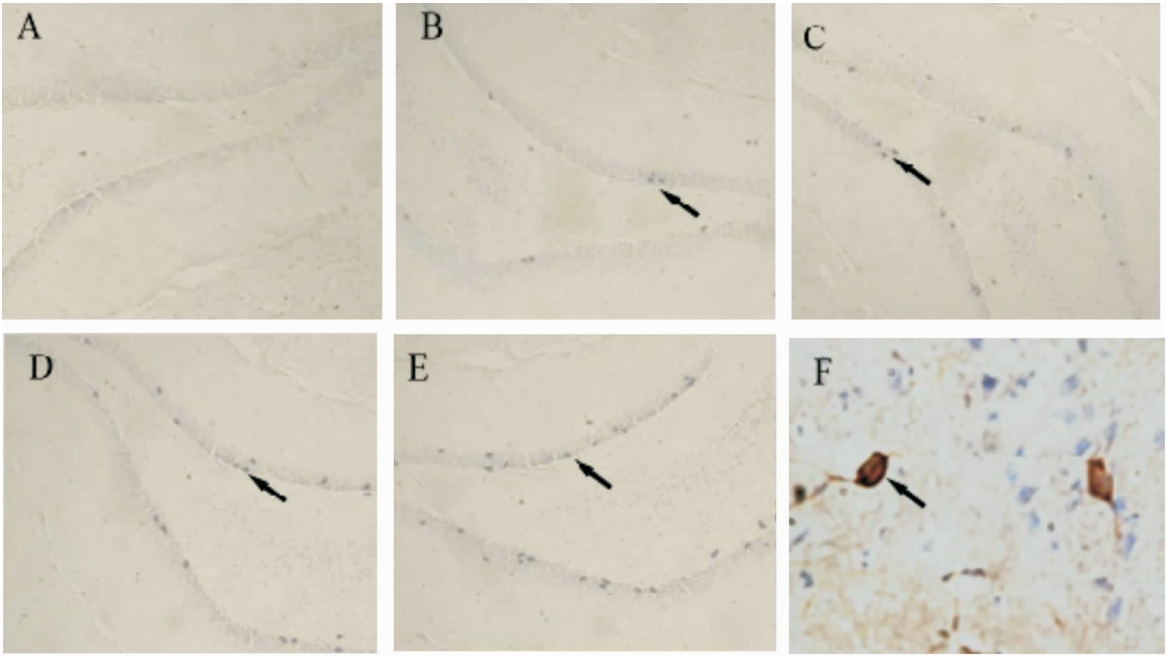


图 2 大鼠海马齿状回区 BrdU 标记细胞变化,箭头所指的是新生的神经元,×40 (A-E), ×400 (F)。A:对照组可见很少量新生的神经元;B:模型组可见少量新生的神经元;C:CBZ 组可见新生的神经元较模型组多;D:CBZ + 8-OH-DPAT 低剂量组可见大量新生的神经元;E:CBZ + 8-OH-DPAT 高剂量组可见大量新生的神经元;F:400 倍下的新生神经元。

3 讨论

近期的研究发现癫痫和抑郁存在双向关系及共同的发病机制。据报道,30% ~ 50% 的难治性癫痫病人患有重度抑郁,复发性癫痫病人患有抑郁的比率为 20% ~ 55%,而癫痫控制较好的病人患抑郁的比率仅为 3% ~ 9%^[5]。有学者认为抑郁是癫痫患者特别是颞叶癫痫最常见的神经精神障碍。本研究采用匹罗卡品建立颞叶癫痫模型,后期筛选出癫痫合并抑郁的大鼠比率为 24%。基本符合文献上报道。

研究发现,癫痫、抑郁发病均与神经可塑性有关系^[6,7]。成年中枢神经系统神经可塑性涉及树突延伸与功能改变、轴突发芽、长时程突触传递增强、突触再生和神经再生等改变。神经发生出现在成年

脑内不连续的区域,主要包括海马 DG、侧脑室室管膜及室管膜下区(subventricular zone, svz)两个区域。国内已有研究,利用氯化锂和匹罗卡品联合诱导大鼠癫痫模型,发现癫痫后发生了神经前体细胞的增殖,增殖的细胞大多数分化为神经元^[8]。

有研究表明 5-HT_{1A} 受体与神经可塑性有关,5-HT 对发育和成年期的中枢神经系统均有神经营养效应,海马齿状回神经元富含 5-HT_{1A} 受体,介导了 5-HT 发挥重塑海马等神经营养作用^[9]。而 5-HT_{1A} 与抑郁、焦虑和癫痫等的发病机制密切相关,同时也是药物治疗的重要靶点。国外研究运用 PET 证实癫痫合并抑郁患者中可发现 5-HT_{1A} 受体结合减少^[10]。Jason 等^[11]发现 5-HT_{1A} 受体激动能诱导齿状回的细胞的增殖。Kalinin^[12]提出具有 5-HT

能特性的抗癫痫药物(如 SSRIs),因其具有抗抑郁作用而有助于减少自杀风险。

综上所述,5-羟色胺 1A 受体与神经可塑性有着密切关系,而前两者都在癫痫合并抑郁的病理生理的改变起着重要作用,本研究通过 5-羟色胺 1A 受体激活后神经可塑性的变化,来观察其对于癫痫合并抑郁的症状有无影响。本实验使用 BrdU 标记的阳性细胞数(细胞增殖)来反映癫痫合并抑郁后的神经发生,发现相较于单一经典的卡马西平用药,合并高剂量的 8-OH-DPAT 组大鼠的新生神经元明显增多,并且差异有统计学意义,而合并低剂量 8-OH-DPAT 组却无统计学意义。而且合并高剂量的 8-OH-DPAT 组的大鼠体重、摄食量、活动能力等差异有统计学意义,脑电图有明显的好转,而合并低剂量 8-OH-DPAT 组却无统计学意义,可能低剂量组诱导的神经发生不足以改善癫痫合并抑郁的症状。由于本实验样本量不足,未设置中剂量组。本研究说明高剂量的 5-HT1A 受体激活剂所诱导的神经发生改善癫痫合并抑郁的症状,5-HT1A 受体激活对癫痫合并抑郁具有神经保护作用。

本研究实验研究结果表明 5-HT1A 受体激动剂可能是通过增加海马齿状回的神经发生来改善癫痫及抑郁症状,但并未进行临床研究,需要进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Seethalakshmi R, Krishnamoorthy ES. Depression in epilepsy: phenomenology, diagnosis and management. *Epileptic Disord*, 2007, 9: 1-10.
- [2] Kuhn HG, Dichinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neu-

- ronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 1996, 16(6): 2027-2033.
- [3] Kanner AM. Current review in clinical science: depression in epilepsy: neurobiologic perspective. *Epilepsy Curr*, 2005, 5: 21-27.
- [4] 陈晨,张建宁,杨卫东,等. 5-羟色胺及其受体与癫痫关系的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(4): 325-328.
- [5] Gilliam F, Santos J, Vahle V, et al. Depression in Epilepsy Ignoring Clinical Expression of Neuronal Network Dysfunction. *Epilepsia*, 2004, 45: 28-33.
- [6] Park JH, Cho H, Kim H, et al. Repeated brief epileptic seizures by pentylentetrasole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats. *Neuroscience*, 2006, 140(2): 673-684.
- [7] Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*, 2006, 16: 239-249.
- [8] Dityatev A, Dityateva G, Sytnyk V. Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapse. *J Neurosci*, 2004, 24(42): 9372-9382.
- [9] Jason JR, Barry LJ. 5-HT1A receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyms. *Brain Res*, 2002, 955(1-2): 264.
- [10] Isabelle M, Karine O, et al. 5-HT1A receptor binding and intracerebral activity in temporal lobe epilepsy: an [18F] MP-PF-PET study. *Brain*, 2004, 127: 900-913.
- [11] Jason J, Radley, Barry L. Jacobs. Pilocarpine-induced status epilepticus increases cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats via a 5-HT1A receptor-dependent mechanism. *Brain Res*, 2003, 966: 1-12.
- [12] Kalinin VV. Suicidality and antiepileptic drugs: is there a link? *Drug Saf*, 2007, 30: 123-142.