

荧光金逆行示踪观察匹罗卡品致病大鼠 CA1 区 锥体细胞突触联系变化的研究

宋延民¹, 龙莉莉², 肖波², 易芳²

1. 湖南省马王堆医院神经内科, 湖南省长沙市 410016

2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘要:目的 通过荧光金(FG)逆行示踪观察氯化锂-匹罗卡品致病模型大鼠慢性自发作期海马 CA1 区锥体细胞之间的突触联系变化。方法 SD 大鼠 20 只随机分为实验组和对照组。癫痫持续状态后 60 d 左右, 利用立体定位仪在活体内注射逆行性示踪剂 FG 至海马 CA1 区, 术后常规喂养 5~7 d 后灌注取材。激光扫描共聚焦显微镜下观察 FG 的分布。结果 7 只实验组大鼠中有 5 只可见有 FG 标记的锥体细胞, 对照组未见。实验组中有 2 只大鼠在海马下托亦可见有 FG 标记的锥体细胞, 而对照组未见。结论 颞叶癫痫大鼠海马 CA1 区锥体细胞之间和下托至 CA1 区有异常兴奋性突触联系, 其可能是构成异常兴奋性回路的解剖学基础。

关键词: 颞叶癫痫; 荧光金; 生长抑素; 突触联系; 大鼠

Changes of synaptic connections among pyramidal cells in the CA1 area of pilocarpine-induced epileptic rats observed by fluorogold

SONG Yan-Min, LONG Li-Li, XIAO Bo, YI Fang. Department of Neurology, Mawangdui Hospital of Hunan Province, Changsha 410016, China

Abstract: Objective In this study, we used fluorogold (FG) to observe the synaptic connections among pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus in pilocarpine-induced epileptic rats at the chronic phase. **Methods** Twenty SD rats were randomly divided into epilepsy ($n = 10$) and control ($n = 10$) groups. The models of epilepsy were established by intraperitoneal injections of pilocarpine and lithium. The controls were injected with normal saline. About 60 days after status epilepticus (SE), retrograde tracer FG was injected into the CA1 area of the hippocampus *in vivo* by using the stereotaxic apparatus. After surgery, animals were allowed to survive for 5-7 days before perfusion-fixation. Confocal microscopy was used to observe the distribution of FG. **Results** Additional FG-labeled pyramidal cells were seen remote from the zone of dye spread in the CA1 area in five rats of the epilepsy group, and also additional FG-labeled pyramidal cells were seen in the subiculum in two experimental rats; additional FG-labeled pyramidal cells were not seen in the control group. **Conclusions** Aberrant synaptic connections among pyramidal cells in CA1 area and aberrant connections of pyramidal cells between CA1 area and subiculum in the hippocampus might be an anatomy basis forming the aberrant excitatory circuit in rats with temporal lobe epilepsy.

Key words: temporal lobe epilepsy; fluorogold; somatostatin; synaptic connection; rats

颞叶癫痫是难治性癫痫中的一种主要类型, 严重危害着人们的身心健康。目前边缘性癫痫的发生和继发性自发发作的原因仍不清楚, 其中潜在的控制发作的自我补偿机制亦不明^[1]。癫痫的

发生常与以下变化相关: 神经元缺失、兴奋性增加、抑制性减弱、回路重组和突触的异常。其中海马兴奋性回路的重组在颞叶癫痫的发生中起着尤为重要的作用^[2, 3]。轴突出芽是颞叶癫痫的普遍现

基金项目: 湖南省科技厅一般项目(2007TP4005); 中南大学自由探索计划青年教师助推专项(201012200171)

收稿日期: 2010-12-22; 修回日期: 2011-03-07

作者简介: 宋延民(1980-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事癫痫及脑血管病的研究。

通信作者: 龙莉莉, 女, 博士, 主治医师。E-mail: longlili1982@yahoo.cn。

象,是兴奋性回路重组的重要结构基础^[4,5]。虽然目前已有一些关于兴奋性回路重组的报道^[6-8],但颞叶癫痫中兴奋性主细胞——锥体细胞的突触联系变化尚不十分清楚。本研究拟利用氯化锂-匹罗卡品致病大鼠模型,通过荧光金逆行示踪观察慢性自发作期海马 CA1 区锥体细胞之间的突触联系变化,揭示兴奋性回路重组在颞叶癫痫的发生和自我修复中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

Sprague-Dawley (SD) 大鼠由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供;匹罗卡品 (PILO) (美国 Boehringer Mannheim 公司);氯化锂 (LiCl) (美国 Sigma 公司);荧光金 (FG) (美国 Fluorochrome 公司);激光扫描共聚焦显微镜 (德国 ZEISS LSM 510);立体定位仪 (日本 Narishige SN-3 型)。

1.2 实验动物及分组

20 只 6~8 周龄健康雄性 SD 大鼠,体重 (250 ± 20)g,在室温 18~25℃、相对湿度 50%~60%、人工 12 h 昼/夜循环照明环境中用全价营养饲料分笼饲养,大鼠能自由摄食及饮水。每日定时清洗笼舍。随机将大鼠分为实验组 (A 组, $n=10$) 和对照组 (B 组, $n=10$)。

1.3 癫痫动物模型制作

1.3.1 实验组 大鼠腹腔注射氯化锂 (LiCl) 3 mEq/kg (约 125 mg/kg), 18~24 h 后给予匹罗卡品 (PILO) 20 mg/kg 腹腔注射 (PILO 和 LiCl 均用无菌生理盐水溶解,新鲜配制),若无痫性发作或痫性发作未达到 Racine^[9] 制定的痫性发作标准 III~V 级者,每隔 30 min 可重复腹腔注射匹罗卡品 10 mg/kg/次,直至出现痫性发作。发作程度按 Racine 制定的标准进行分级,达到 III~V 级的大鼠进入癫痫持续状态 (SE),归于致病成功组;未达到 III~V 级的大鼠继续注射 PILO 直至次数达到 6 次,其间达 III 级以上的动物也归到致病成功组;6 次后仍未达到标准的归于致病不成功组。致病成功后从第一次大发作开始持续发件 50 min 以上者,以 10% 水合氯醛 3 ml/kg 终止。急性诱发 SE 后,每天观察动物行为,观察时间为 8:00AM~8:00PM。

1.3.2 对照组 与氯化锂-匹罗卡品实验组大鼠相同的时间点,给予大鼠腹腔注射生理盐水 125 mg/kg,注射后也立即开始观察大鼠的行为学变化。

1.4 在体注射荧光金至海马 CA1 区

在 SE 后 60 d 左右,模型大鼠腹腔注射 10% 水

合氯醛 (3 ml/kg),待麻醉后固定于脑立体定位仪上,剪去头部局部毛发,消毒后沿矢状线切开皮肤,剥离筋膜,露出颅骨表面,找到前后囟,调整立体定位仪,使前后囟在一个水平面上。根据脑立体定位图谱,于前囟后 3.1 mm、中线两侧旁开 2.0 mm 处颅骨钻钻开颅骨,用 1 μ l 微量注射器 (已吸入 1 μ l 用无菌注射用水配置好的 4% 荧光金溶液) 自脑表面垂直缓慢进针 2.8~2.9 mm (控制注射速度 0.1 μ l/min),每侧各注射 4% FG 0.5 μ l,留针 5 min 以保证溶液充分渗入,然后缓慢撤针。再次消毒,缝合皮肤。对照组大鼠亦按同样方法注射 4% 荧光金至海马 CA1 区,每侧各 0.5 μ l。麻醉苏醒前注意保暖,苏醒后放回笼照常喂养 5~7 d,以使荧光金充分运输。

1.5 灌注取材,冰冻切片

注射 FG 后 5~7 d 行灌注取材,取脑置 4℃ 的 4% 多聚甲醛中至少 24 h 充分固定以免荧光金扩散,蔗糖过夜沉底。冰冻切片行 35 μ m 厚脑冠状连续切片,隔三取一,每只大鼠取 4 套,收集有海马的脑片于 0.01 mol/l 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中。将脑片贴片于用多聚赖氨酸处理过的载玻片上,切片充分晾干后, -20℃ 冰箱保存备用,切片及贴片过程中注意避光。

1.6 结果观察

每只大鼠随机选取 5 张有注射针道的切片,对照组大鼠选取断面水平相似的有注射针道的切片,共聚焦显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 行为学变化

实验组大鼠共 10 只,其中 9 只大鼠达到 Racine III~V 级并进入 SE;进入 SE 状态后,有 2 只因抽搐致死,其余 7 只大鼠在 24~72 h 后进入静止期,静止期大部分动物行为正常。存活的大鼠在 15~45 d 后均出现自发性发作,发作呈强直-阵挛性发作,持续时间短暂,约半分钟至 1 min,发作次数从 1 天数次至数天 1 次不等,慢性期内的大鼠无死亡。注射 FG 后,大鼠行为无明显变化。

2.2 被 FG 标记的锥体细胞

海马 CA1 区被 FG 标记的神经元有锥体细胞和其他非主细胞,锥体细胞占多数。被标记的细胞表面可见金黄色颗粒状物 (见图 1、图 2)。7 只实验组大鼠中有 5 只在远离注射部位的 CA1 区 (靠近 CA2 区) 可见有 FG 标记的锥体细胞 (见图 3)。对照组无一只在远离注射部位发现有 FG 标记的

锥体细胞,均局限在注射部位相邻区域内。7 只实验组大鼠中有 2 只在海马下托亦可见有 FG 标记的

锥体细胞(见图 4),对照组均未见。FG 标记的锥体细胞离注射部位越远,荧光越暗。

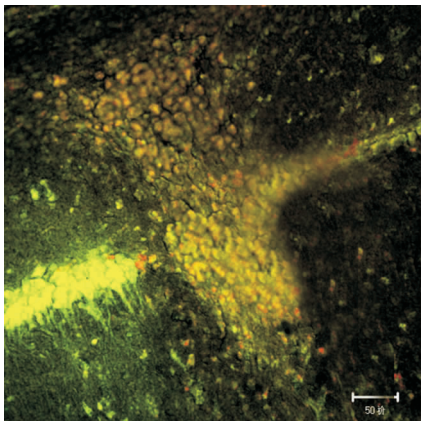


图 1 FG 注入海马 CA1 区呈金黄色 免疫荧光 × 200

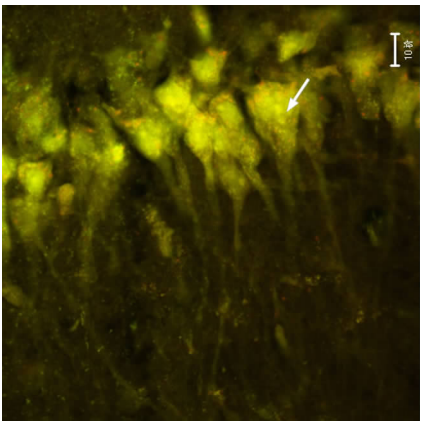


图 2 FG 标记的锥体细胞表面可见金黄色颗粒状物 (箭头所示) 免疫荧光 × 1000

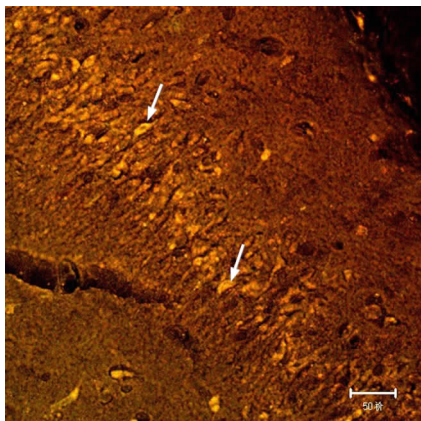


图 3 实验组 CA1 区远离注射部位处可见被 FG 标记的锥体细胞(箭头所示)免疫荧光 × 200

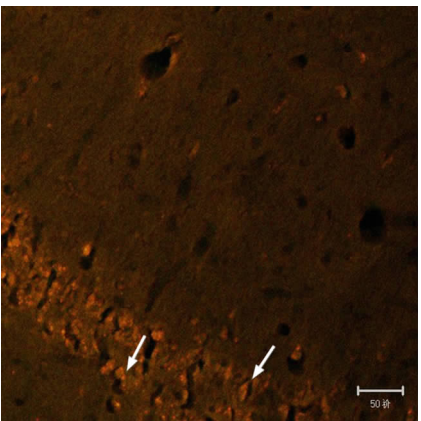


图 4 实验组海马下托可见被 FG 标记的锥体细胞 (箭头所示) 免疫荧光 × 200

3 讨论

正常海马兴奋性回路已被确定,即兴奋性信号由内嗅皮层锥体细胞的轴突形成穿通径路(perforated pathway, PP)纤维投射到齿状回外、中分子层,终止于颗粒细胞的树突远端树突棘;齿状回颗粒细胞轴突——苔藓纤维投射到 CA3 透明层,终止于锥体细胞顶树突基部;CA3 锥体细胞轴突的 Schaffer 侧枝(Schaffer's lateral branch)投射到同侧 CA1 腔隙层,终止于锥体细胞的顶树突干;最后 CA1 锥体细胞轴突经下托到达内嗅皮质完成整个海马内回路。该回路中任一局部的功能变化或结构异常就将导致整个海马的兴奋性异常^[10, 11]。

本研究发现,颞叶癫痫大鼠慢性期 CA1 区远离

注射部位处和海马下托均有 FG 标记的锥体细胞,而对照大鼠中未见,提示颞叶癫痫慢性期存在异常的兴奋性神经网络联系,包括 CA1 区锥体细胞之间的异常联系和海马下托至 CA1 区的异常联系。

局部的兴奋性联系似乎大多数存在于 CA3 区而非 CA1 区^[12, 13],Deuchars 等^[14]通过细胞内记录和生物素化的方法检测到 CA3 区锥体细胞之间的联系比例为 1: 16,CA1 区中却仅为 1: 100。因此正常情况下 CA1 区锥体细胞之间的联系很少,与本研究结果一致。而在颞叶癫痫大鼠慢性期,我们通过荧光金标记检测到海马 CA1 区锥体细胞之间的联系增强。由于荧光金主要通过逆行性轴浆运输的方式从轴突末端转运到细胞胞体^[15],因此

这种联系可能是锥体细胞之间的侧枝联系增强,且可能是异常的轴突出芽所致。该现象亦存在于海人酸致病模型^[16,17]和有海马硬化(中度神经元缺失和神经胶质增生)的人类颞叶癫痫^[18]中。以上提示CA1区锥体细胞的轴突出芽引起的细胞间侧枝联系增强是海马兴奋性回路重组的一个重要组成部分,并可能是颞叶癫痫锥体细胞减少和形态改变的一个补偿机制。

本研究还观察到,除了CA1区锥体细胞之间的异常联系,还有2只实验组大鼠可见有海马下托至CA1区的异常联系。下托-海马纤维在兔脑中曾有报道^[19]。这种纤维被认为是通过腔隙-分子层(lm)或始层(oriens stratum)到达CA1区的^[19],提示CA1区细胞可受下托细胞的传入控制。本研究中颞叶癫痫大鼠慢性期出现FG标记的下托锥体细胞,说明颞叶癫痫大鼠中下托-海马的联系增强。这种现象只在2只有高频率自发作的大鼠中存在,因此,下托-海马兴奋性突触联系的增强可能与自发作频率有关,但尚需更多样本量以及电生理的研究来证实。

兴奋性锥体细胞之间的异常突触联系,可能促进了异常兴奋性回路的形成,增强了海马区域兴奋性的正反馈,导致放电的同步化,从而在癫痫发生中起重要作用。

参 考 文 献

- [1] Tang FR, Loke WK. Cyto-, axo- and dendro-architectonic changes of neurons in the limbic system in the mouse pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 2010, 89(1): 43-51.
- [2] Macdonald RL. Inhibitory synaptic transmission. In: edited by Engel J Jr. Pedley TA. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 1997, 265-275.
- [3] Dichter MA, Wilcox KS. Excitatory synaptic transmission. In: edited by Engel J Jr. Pedley TA. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 1997, 251.
- [4] Bausch SB. Axonal sprouting of GABAergic interneurons in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*, 2005, 7(3): 390-400.
- [5] Magloczky Z, Freund TF. Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci*, 2005, 28(6): 334-340.
- [6] Cross DJ, Cavazos JE. Synaptic reorganization in subiculum and CA3 after early-life status epilepticus in the kainic acid rat model. *Epilepsy Res*, 2007, 73(2): 156-165.
- [7] Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ. Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience*, 2004, 126(3): 677-688.
- [8] Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y, et al. Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*, 1999, 408(4): 449-460.
- [9] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation II Motor Seizure. *Electroencephogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 781-794.
- [10] Mello LE, Cavelheiro EA, Tan AM, et al. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, 1993, 34(6): 985-995.
- [11] Okazaki MM, Evenson DA, Nadler JV. Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin. *J Comp Neurol*, 1995, 352(4): 515-534.
- [12] Christian EP, Dudek FE. Characteristics of local excitatory circuits studied with glutamate microapplication in the CA3 area of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*, 1988, 59(1): 90-109.
- [13] Christian EP, Dudek FE. Electrophysiological evidence from glutamate microapplications for local excitatory circuits in the CA1 area of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*, 1988, 59(1): 110-123.
- [14] Deuchars J, Thomson AM. CA1 pyramid-pyramid connections in rat hippocampus in vitro: dual intracellular recordings with biocytin filling. *Neuroscience*, 1996, 74(4): 1009-1018.
- [15] Koëbberta C, Appsb R, Bechmanne I, et al. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol*, 2000, 62(4): 327-351.
- [16] Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y, et al. Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*, 1999, 408(4): 449-460.
- [17] Wheal HV, Chen Y, Mitchell J, et al. Molecular mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity. *Prog Neurobiol*, 1998, 55(6): 611-640.
- [18] Lehmann TN, Gabriel S, Kovacs R, et al. Alteration of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia*, 2000, 41(Suppl 6): S190-194.
- [19] Berger TW, Swanson GW, Milner TA, et al. Reciprocal anatomical connections between hippocampus and subiculum in the rabbit: Evidence for subicular innervation of region superior. *Brain Res*, 1980, 183(2): 265-276.