

匹罗卡品致痫小鼠自发性癫痫发作模型的建立及 癫痫后海马新生神经细胞增生的研究

李艺,肖波,杨欢,龙莉莉,冯莉,陈锶,方红军,向田,吴倩,吴志国
中南大学湘雅医院神经内科,湖南省长沙市 410008

摘要:目的 探讨匹罗卡品致痫小鼠自发性癫痫发作(SS)模型的特点,并观察癫痫发作后其齿状回颗粒细胞下层新生神经细胞(NPC)增生变化。方法 建立SS小鼠模型,进行行为学检测。将SS发作小鼠在癫痫持续状态(SE)后不同时间点进行Doublecortin(DCX)免疫组化,Western blot观察海马NPC的分布和表达改变。结果 80%的模型小鼠出现持续SS,发作时程约10~40s,发作频率为 2.18 ± 0.45 次/周。DCX⁺细胞及其蛋白表达在模型组中显著增多($P < 0.05$),SE后4周最为明显,SE后8周开始下降,至SE后12周显著减少。增生的DCX⁺细胞呈簇状分布,随时间推移出现迁移分散。存在SS的模型小鼠相对于不存在SS的模型小鼠DCX⁺细胞增生更为明显。结论 匹罗卡品致痫后SS小鼠模型存在持续的NPC增生,这可能在慢性期癫痫持续发作的病理生理机制中有着重要作用。

关键词:癫痫;自发性痫性发作;新生神经元;Doublecortin;小鼠

Hippocampal neurogenesis in a mouse model of temporal lobe epilepsy with spontaneous seizures

LI Yi, XIAO Bo, YANG Huan, LONG Li-Li, FENG Li, CHEN Si, FANG Hong-Jun, XIANG Tian, WU Qian, WU Zhi-Guo. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410008, China (Corresponding author: XIAO Bo, E-mail: xiaobo62_xy@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To explore the characteristics of a pilocarpine-induced mouse model of spontaneous seizures (SS), and to observe the changes of neural progenitor cells (NPC) in the subgranular zone (SGZ) of dentate gyrus after seizure activities. **Methods** A pilocarpine-induced mouse model of spontaneous seizures was prepared. The behavioral characteristics were observed with continuous camera recording. The changes of NPC in the hippocampus were examined, with doublecortin (DCX) immunohistochemistry at different time points after status epilepticus (SE) in mice with continuous SS. The protein levels of DCX at different time points were determined by Western blot. **Results** Eighty percent of the mice with SE presented with SS. These mice began to show consistent SS after an average latent period of 3-10 days, which usually lasted 10-40 seconds at a frequency of 2.18 ± 0.45 per week. Both the DCX-labeling cells and their protein expression increased in the SGZ of SS mice ($P < 0.05$), peaked at 4 weeks after SE, and began to decrease at 8 weeks after SE. At 12 weeks after SE, the DCX-labeling cells and their protein expression were significantly reduced. The increased DCX⁺ cells proliferated in clusters, and then migrated to different areas with the increasing time. The mice with continuous SS after SE had more increased DCX⁺ cells in the SGZ than the mice without SS after SE. **Conclusions** The pilocarpine-induced mouse model of SS showed continuous NPC proliferation, which may play an important role in epileptogenesis during the chronic period.

Key words: epilepsy; spontaneous seizures; neural progenitor cells; Doublecortin; mice

基金项目:国家自然科学基金(81071048; 81100967);高等学校博士学科点专项科研基金(20110162120002);中南大学中央高校基本科研业务费专项资金(2011QNZT152)

收稿日期:2011-10-15;修回日期:2011-12-04

作者简介:李艺(1983-),女,医师,博士,主要从事癫痫发病机制的研究。Email:yili.vivian@gmail.com。

通讯作者:肖波(1962-),男,教授,博士,主要从事癫痫的临床和基础研究。Email:xiaobo62_xy@yahoo.com.cn。

近年来癫痫发作相关的新生神经元增生与其发病机制的关系已成为癫痫研究的热点^[1]。成年哺乳动物脑中有两个主要的神经元再生区域:侧脑室下层(SVZ)和海马齿状回颗粒细胞下层(SGZ)^[2,3]。SGZ的NPC约90%成为兴奋性的颗粒细胞,整合至原有的神经网络中发挥作用^[3]。这些新生神经元可受环境因素及病理状况的影响表现出很强的可塑性,但自发性痫性发作是否能够影响神经元的再生,从而影响癫痫的发生发展尚未有详细研究。本实验拟探讨与人类癫痫发作形式相似的匹罗卡品致痫小鼠自发性痫性发作模型行为学特点,并研究其新生神经细胞特异性表达蛋白DCX在海马结构的分布和表达改变,从而探索自发性痫性发作对于新生神经细胞增生的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

本实验选用6~8周龄健康雄性C57BL/6小鼠,由中南大学动物学部提供。①10只模型小鼠用于行为学研究;②自发性癫痫小鼠造模成功后(至少存在3次SS发作)1周、2周、4周、8周、12周行海马组织DCX免疫组化(每时间点6例)和Western Bolt检测(每时间点6例),同法检测同等数量的对照组小鼠;③自发性癫痫小鼠造模4周后通过行为学监测将至少存在3次SS发作的小鼠($n=3$)和SE发作后但未监测到SS发作的小鼠($n=3$)的海马结构行DCX免疫组化染色进行比较。

1.2 癫痫动物模型制作及行为学观察

模型组小鼠注射东莨菪碱硝酸甲酯(1 mg/kg, ip),30 min后给予匹罗卡品(320-350 mg/kg, ip)诱导癫痫持续状态(SE)的产生。2 h后给予地西泮(7.5 mg/kg, ip)终止痫性发作。对照组小鼠除了注射与模型组小鼠所用匹罗卡品等剂量的生理盐水外,余处理同模型小鼠。模型组小鼠3只一笼分养,利用录像系统连续记录小鼠的行为学表现(8 h/d);观察录像资料对模型小鼠的痫性发作形式和频率进行记录。

1.3 Doublecortin (DCX) 免疫组织化学染色

水合氯醛麻醉小鼠,灌注取脑,行冰冻切片。1%过氧化氢溶液中漂洗30 min,正常兔血清封闭抗原2 h,滴加1:8000羊抗小鼠多克隆抗体DCX(Santa Cruz, USA)4℃过夜;生物素化兔抗羊IgG抗体孵育1 h(1:200, Vector Laboratories, USA),在亲和素-生物素化的辣根过氧化物酶(1:100, Vector Laboratories,

USA)中培养1 h, DAB显色。每步骤间用PBS洗3×5 min,最后梯度酒精脱水,封片。阴性对照采用PBS分别取代一抗、二抗。应用HPIAs-1000高清晰彩色病理图像分析系统进行图像分析。

1.4 Western Blot 半定量分析 DCX 的表达变化

将小鼠麻醉后灌注取脑,分离海马组织。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,再将其转移到PVDF膜。应用1:8000羊抗小鼠多克隆抗体DCX(Santa Cruz, USA)及其二抗(兔抗羊抗体,1:10000, Santa Cruz, USA)孵育。增强化学发光法检测目的条带,Kodak X光胶片曝光,显影及定影;胶片扫描后用Band Scan 4.5图像分析软件对结果进行灰度分析,以 β -actin做内对照,计算DCX蛋白的相对表达量。

1.5 统计处理

本实验数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,模型组与对照组间比较用两样本 t 检验,成组设计多样本均数用单因素方差分析(ANOVA),检验水准 $P < 0.05$ 。统计分析和图表绘制用SPSS 17.0统计软件完成。

2 结果

2.1 匹罗卡品致痫后自发性癫痫发作模型小鼠的行为学特点

小鼠SE造模成功后50 d($n=10$)仅有2只始终未有SS出现;自发性癫痫发作在匹罗卡品模型中SE后的发生率为80%。模型组小鼠在SE后(4.8±2.7)d开始出现SS发作。与急性期SE不同,SS发作时程较短,常为10~30 s,一般不超过1 min;表现为自发性凝视不动,鼻唇抽搐,单侧或双侧的前肢阵挛;亦可表现为双侧前肢阵挛、伴直立、跌倒或翻转,或四肢强直阵挛发作。发作间期行为学表现正常。SS可稳定持续存在,且有逐渐增加趋势:模型小鼠在SE后1周至7周内分别平均有(0.86±0.90)次、(1.00±1.41)次、(1.43±1.13)次、(1.43±1.13)次、(2.71±3.35)次、(0.86±0.90)次、(5.14±6.36)次SS发作,见图1。

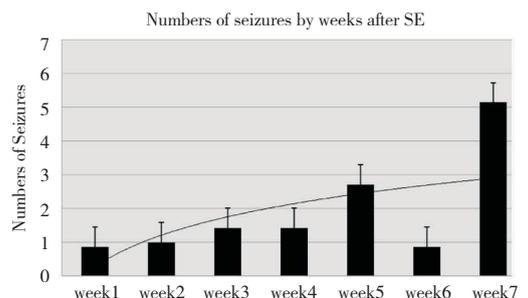


图1 匹罗卡品致痫后自发性癫痫发作小鼠模型中癫痫发作的时间规律。

2.2 匹罗卡品致病后自发性癫痫发作模型小鼠海马结构 DCX 的表达分布变化

在对照组小鼠中可见 DCX 蛋白的表达主要位于细胞胞体的胞浆、树突和轴突内。DCX⁺ 细胞发出的树突穿过颗粒细胞层内, 伸向分子层; 其胞核多限于颗粒细胞层和门区之间的颗粒细胞下层 (SGZ), 少数位于颗粒细胞层内侧, 但一般不超过颗粒细胞层的内 1/3。

在癫痫组模型小鼠 SE 后 1 周、2 周、4 周和 8 周, 可见到在 SGZ 的 DCX⁺ 细胞数目持续增多, 在 SE 后 4 周

最为明显, SE 后 8 周开始呈下降趋势; 并且可见少数 DCX⁺ 细胞异常移位表达于门区和颗粒细胞层的中 1/3。DCX⁺ 细胞的增多表现为数目增多的同时伴有 DCX⁺ 细胞树突的分支增加, 提示 DCX⁺ 细胞更为成熟。至癫痫模型小鼠 SE 后 12 周, 可见 DCX⁺ 细胞排列松散于 SGZ 区, 细胞数目相比 SE 后 8 周明显减少, 相比对照组亦有所减少; 但 DCX⁺ 细胞在门区和颗粒细胞层的中外 1/3 的异常移位表达持续存在, 见图 2。

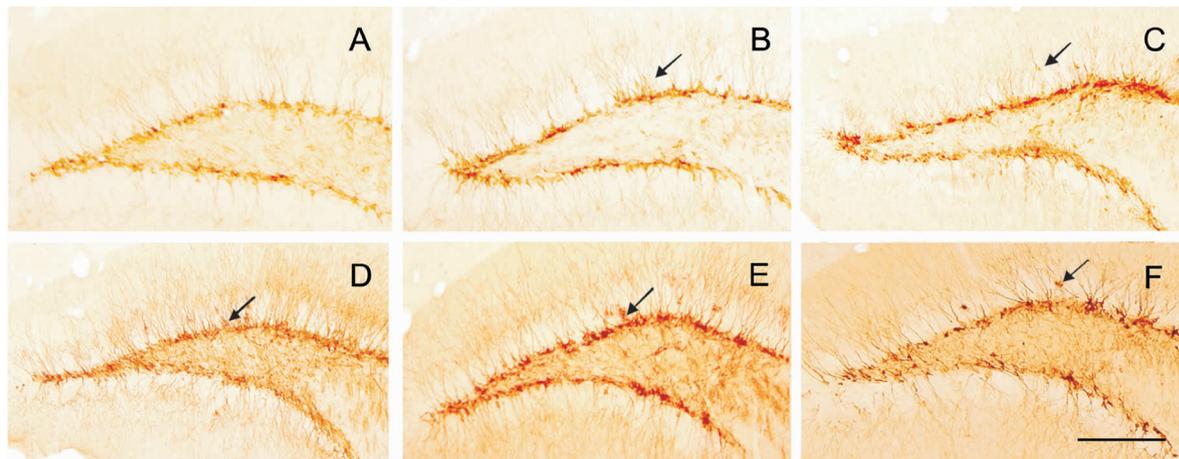


图 2 匹罗卡品致病后自发性癫痫发作小鼠 DCX 免疫组化染色。A: 对照组小鼠海马区 DCX 染色。B-F: 匹罗卡品致病后自发性癫痫发作小鼠 SE 后 1 周 (B)、2 周 (C)、4 周 (D)、8 周 (E)、12 周 (F) 海马区 DCX 染色。B-F 图中箭头所指示异位的 DCX⁺ 细胞。Scale bar = 100 μm。

2.3 对照组和癫痫模型小鼠海马结构中 DCX 的半定量测定

对照组海马结构的 DCX 含量在各时间点无明显差异 ($P > 0.05$), 而模型组小鼠海马结构的 DCX 含量在 SE 后 1 周、2 周、4 周相比对照组持续增加 ($P < 0.05$), 并在第 4 周达高峰; 其值分别为 (0.36 ± 0.02) 、 (0.42 ± 0.04) 和 (0.44 ± 0.05) ; 而其对照组为 (0.30 ± 0.02) 、 (0.29 ± 0.02) 和 (0.28 ± 0.02) 。至 SE 后 8 周 DCX 表达水平开始下降, 为 (0.34 ± 0.03) ; 此时间点 DCX 表达水平与对照组 DCX 表达水平 (0.28 ± 0.02) , 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在 SE 后 12 周 DCX 表达水平相比前 8 周显著下降, 为 (0.28 ± 0.07) , 与对照组 DCX 表达水平相似 ($P < 0.05$)。β-actin 蛋白的含量在对照组和模型小鼠各时间点的表达含量无明显差异 ($P > 0.05$), 见图 3、表 1。

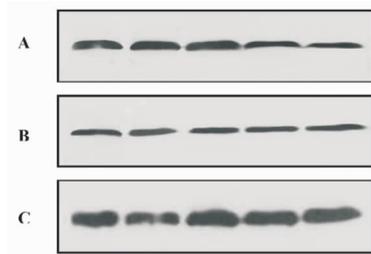


图 3 匹罗卡品致病后自发性癫痫发作小鼠和对照组各时间点海马结构 DCX 的半定量检测。A 为 Western Blot 显示 DCX 在匹罗卡品致病后各时间点的表达水平; B 为对照组在各时间点的表达水平; C 为 Western Blot 显示在匹罗卡品致病后各时间点小鼠 β-actin 的表达水平。

2.4 匹罗卡品致病后自发性癫痫发作模型与 SE 后未出现自发性癫痫发作小鼠海马结构 DCX 表达的比较

取匹罗卡品致病后自发性癫痫发作模型小鼠 DCX⁺ 细胞增生最为明显的 SE 后 4 周为时间点进行对比。将 SE 后 4 周存在自发性癫痫发作模型小鼠与 SE 后 4 周末

检测到自发性癫痫发作的模型小鼠(各组均为3例)海马结构进行免疫组化染色进行比较,发现这两组相对

对照组均存在显著增生。但是存在自发性痫性发作的模型小鼠 DCX⁺ 细胞增生更为明显,见图4。

表1 匹罗卡品致痫后自发性癫痫发作小鼠和对照组海马结构 DCX 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

	1周	2周	4周	8周	12周
模型组	0.36 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.44 ± 0.05	0.34 ± 0.03	0.28 ± 0.07
对照组	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.02

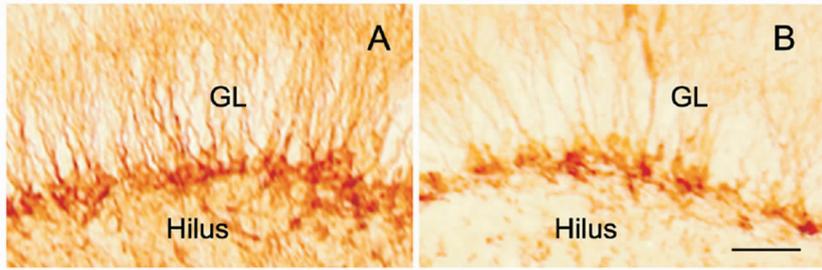


图4 匹罗卡品致痫后自发性癫痫发作小鼠与无自发性癫痫发作模型小鼠 DCX⁺ 细胞比较。A: 匹罗卡品致痫后自发性癫痫发作小鼠 SE 后 4 周海马区 DCX 染色。B: 匹罗卡品致痫后未出现自发性癫痫发作的小鼠 SE 后 4 周海马区 DCX 染色。GL: 颗粒细胞层, Hilus: 门区。Scale bar = 50 μm。

3 讨论

本实验的行为学研究发现匹罗卡品致痫后自发性癫痫发作小鼠其行为过程具有与 TLE 患者相似的表现: ①类似于颞叶癫痫患者在发病前常出现的脑外伤、感染、缺氧、癫痫持续状态、中毒等“初始的诱发性损伤期”(IPI)。②潜伏期: 在急性 IPI 期后的一段时间小鼠不出现痫性发作, 时程 3 ~ 10 d 不等, 其行为学表现基本正常。③自发性癫痫发作期: 在经过一段潜伏期后出现反复的 SS, 类似于人类复杂部分性发作的痫性发作。因此匹罗卡品致痫后自发性癫痫发作小鼠模型不仅具有与人类颞叶癫痫发作形式相似的优点, 并为研究自发性痫性发作的机制及其产生的影响提供了一个很好的平台。

此外, 本研究通过免疫组化和 Western Blot 发现在自发性癫痫发作小鼠模型中 DCX⁺ 细胞增多持续存在。这在 SE 后 1 周即可见到, 并在 SE 后 4 周达高峰。最初时增生的 DCX⁺ 细胞呈簇状分布, 随时间推移出现迁移分散; 这说明在癫痫发作后海马 DG 区出现了新生神经细胞的神经前体细胞增殖和迁移, 并且这种改变具有时间依赖性。随着时间的推移, DCX⁺ 细胞在数目增多的同时伴有树突的分支增加, 提示随病程延长 DCX⁺ 细胞更为成熟。这与既往研究发现的颞叶癫痫患者中表达 DCX⁺ 新

生神经细胞明显增加相符^[4]。在正常情况下新生神经元持续存在, 可大部分神经干细胞处于静止期, 因此处于一个相对较低的增殖状态而无明显变化。但新生神经元可受多种刺激, 如脑卒中、癫痫、功能锻炼等的影响而出现增生^[1, 5]。目前关于神经干细胞增殖和新生神经元的分化迁移的机制并未完全明了, 可能与癫痫发作后引起的细胞周围微环境改变(stem cell niche)、细胞自身及邻近或远隔的其他细胞所分泌的细胞因子、黏附因子、递质、细胞代谢产物等相关^[6]。

本研究亦发现自发性癫痫发作模型小鼠中 DCX⁺ 细胞存在着异常移位: 在对照组中, DCX⁺ 细胞仅局限于颗粒细胞层和门区之间的 SGZ; 一般不超过颗粒细胞层的内 1/3。而在癫痫模型小鼠 SE 后 1 周至 12 周内, 可持续见到少数 DCX⁺ 细胞异常移位表达于门区和颗粒细胞层的中外 1/3。尽管有学者认为癫痫发作后增生的新生神经元可能对癫痫所致的神经元脱失起着代偿性弥补作用, 但更多学者认为这些痫性发作后异常增生的神经元, 特别是异常迁移的异位颗粒细胞在癫痫的发病机制中起着重要的作用, 即这些神经细胞有着不成熟突触的基底状树突^[7], 并且可接受苔藓纤维终末的传入联系^[8], 与 CA3 区的锥体细胞同步兴奋, 呈现自发性爆发性放电^[9], 可能是慢性期自发性癫痫发

作的重要机制之一。此外,在齿状回颗粒细胞层内异常移位的 DCX⁺ 细胞可能干扰海马结构环路突触信号传导环路从而导致了其功能的紊乱。有研究表明 cdk5 的表达可随着癫痫活动呈动态变化,并与颗粒细层的弥散化和自发性癫痫发作活动密切相关^[10]。而 DCX 可被 cdk5 磷酸化,使得其亲和性和稳定性下降,从而导致新生神经细胞的骨架动力性增强^[11],迁移活性增加。

本实验的前期研究发现诱发 SE 后,存在 SS 的模型小鼠相比未存在 SS 的模型小鼠海马区 DCX⁺ 细胞增生更为明显。这说明自发性痫性发作对于新生神经元的增生有不同的促进作用。既往已有研究提示癫痫持续状态后海马区可能存在新生神经元增生^[5,12]。但文献报道匹罗卡品导致的 SE 可以被 MAChR 拮抗剂阿托品阻断,而阿托品却不能阻断 SE 后的痫性发作。此外竞争性 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 可以预防匹罗卡品模型癫痫的发展却不能影响其始发^[13],这提示自发性癫痫发作与 SE 的发生发展可能存在着不同的机制,而并非是 SE 的简单延续^[14]。

综上,匹罗卡品致病后自发性癫痫发作模型小鼠中存在有新生神经元的持续增生,这可能是自发性癫痫对于癫痫发生发展机制的重要作用途径之一。

参 考 文 献

[1] Siebzehnrubl FA, Blumcke I. Neurogenesis in the human hippocampus and its relevance to temporal lobe epilepsies. *Epilepsia*, 2008, 49(5): 55-65.

[2] Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*, 2002, 22(3): 629-634.

[3] Garcia AD, Doan NB, Imura T, et al. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, 2004, 7(11): 1233-1241.

[4] Liu YW, Curtis MA, Gibbons HM, et al. Doublecortin ex-

pression in the normal and epileptic adult human brain. *Eur J Neurosci*, 2008, 28(11): 2254-6225.

- [5] Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 1997, 17(10): 3727-3738.
- [6] Suh H, Deng W, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25: 253-275.
- [7] Shapiro LA, Ribak CE. Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses. *Epilepsy Res*, 2006, 69(1): 53-66.
- [8] Pierce JP, Melton J, Punsoni M, et al. Mossy fibers are the primary source of afferent input to ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. *Exp Neurol*, 2005, 196(2): 316-331.
- [9] Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci*, 2000, 20(16): 6144-6158.
- [10] Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, et al. Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron*, 2004, 41(2): 215-227.
- [11] Umka J, Mustafa S, ElBeltagy M, et al. Valproic acid reduces spatial working memory and cell proliferation in the hippocampus. *Neuroscience*, 2010, 166(1): 15-22.
- [12] 杨萍,孙美珍,杨小燕,等. 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. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2011, 38(1): 14-18.
- [13] Smolders I, Khan GM, Manil J, et al. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol*, 1997, 121(6): 1171-1179.
- [14] Li Y, Peng Z, Xiao B, et al. Activation of ERK by spontaneous seizures in neural progenitors of the dentate gyrus in a mouse model of epilepsy. *Exp Neurol*, 2010, 224(1): 133-45.