

大鼠杏仁核电刺激癫痫持续状态后颞叶癫痫模型 海马区神经生长相关蛋白 43 的表达

刘杰¹, 金澎¹, 齐兆鹏², 成磊¹, 谢红伟¹, 孟娟¹, 隋爱华³

1. 青岛大学医学院附属医院神经外科, 山东省青岛市 266003

2. 莒县人民医院神经外科, 山东省莒县 276500

3. 青岛大学医学院附属医院中心实验室, 山东省青岛市 266003

摘要:目的 探讨神经生长相关蛋白 43 (GAP-43) 在大鼠杏仁核电刺激癫痫持续状态后颞叶癫痫 (SE) 模型海马区的表达及意义。方法 健康雄性 Wistar 大鼠 60 只, 分成 4 组: 空白对照组、未刺激组、未发作组和发作组。空白对照组: 不植入电极; 未刺激组: 植入电极未行电刺激; 发作组: 植入电极电刺激后 15 d 内、30 d 内能观察到稳定的自发性反复发作 (SRS) 的大鼠归为发作组, 其余归为未发作组。分别在 15 d、30 d 时, 将标本应用 RT-PCR 及免疫荧光检测方法检测大鼠海马 GAP-43 的表达。结果 致痫 15 d, 发作组、未发作组和未刺激组的 GAP-43 表达高于空白对照组, 并依次降低 ($P < 0.05$)。致痫 30 d, 发作组和未发作组 GAP-43 表达仍高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 未刺激组与空白对照组水平相当, 二者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 GAP-43 参与了神经元损伤修复和突触重塑, 其可能是颞叶癫痫的病理基础——突触重塑的重要分子机制。

关键词: 颞叶癫痫; 癫痫持续状态; 神经生长相关蛋白 43; 突触可塑性

Expression of GAP-43 in hippocampus of rat model of temporal lobe epilepsy after status epilepticus induced by electrical stimulation of amygdala

LIU Jie, JIN Peng, QI Zhao-Peng, CHENG Lei, XIE Hong-Wei, MENG Juan, SUN Ai-Hua. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital, Qingdao Medical University, Qingdao, Shandong 266003, China

Corresponding author: JIN Peng, E-mail: kjinpeng@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression of growth-associated protein-43 (GAP-43) in the hippocampus of rat model of temporal lobe epilepsy (TLE) after status epilepticus induced by electrical stimulation of the amygdala and its significance. **Methods** Sixty healthy male Wistar rats were divided into blank control, unstimulated, non-seizure, and seizure groups. The blank control group had no implanted electrodes; the unstimulated group had implanted electrodes, but did not undergo electrical stimulation; the seizure group had spontaneous recurrent seizure within 15 and 30 days after electrical stimulation through implanted electrodes; other rats were included in the non-seizure group. The expression of GAP-43 in the hippocampus of rats was evaluated by RT-PCR and immunofluorescence assay at 15 and 30 days after electrical stimulation. **Results** At 15 days after electrical stimulation, the seizure, non-seizure, and unstimulated groups had significantly higher expression of GAP-43 than the blank control group, and GAP-43 expression decreased significantly from the seizure group to the blank control group ($P < 0.05$). At 30 days after electrical stimulation, the seizure and non-seizure groups still had significantly higher expression of GAP-43 than the blank control group ($P < 0.05$); there was no significant difference in GAP-43 expression between the unstimulated and blank control groups ($P > 0.05$). **Conclusions** GAP-43 is involved in the damage repair and synaptic plasticity of neurons, which may be the pathological basis of TLE and the important molecular mechanism of synaptic plasticity.

Key words: temporal lobe epilepsy; status epilepticus; growth-associated protein-43; synaptic plasticity

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目 (2006BS03001)

收稿日期: 2012-11-30; 修回日期: 2013-01-19

作者简介: 刘杰 (1987-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事癫痫的研究。E-mail: liujie861126@163.com。

通讯作者: 金澎 (1973-), 男, 副教授, 博士后, 主要从事脑功能研究。E-mail: kjinpeng@163.com。

大量研究证明,突触重塑对于海马兴奋性的异常增高及颞叶癫痫敏感性的发生和维持有重要作用。但迄今为止,突触重塑的分子机制仍不清楚。国内外研究认为,神经生长相关蛋白(GAP-43)在神经元轴突生长、突触重塑过程中发挥重要作用,是突触重塑的内在决定因素,同时兼有神经元修复作用。大鼠杏仁核电刺激癫痫持续状态后颞叶癫痫模型(SE)与人类的慢性颞叶癫痫病理特征极其相似。本研究通过建立大鼠SE模型,然后采用RT-PCR及免疫荧光检测方法,观察GAP-43在SE大鼠海马区的动态表达水平,以探讨其在颞叶癫痫发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

5~8周龄体重在230~270 g之间的成年Wistar大鼠60只,由青岛市药品检验所提供【许可证号SCXK(鲁)20090007】。将大鼠分为四组:空白对照组:不植入电极;未刺激组:植入电极后未行电刺激;发作组:电刺激后15 d内、30 d内能观察到稳定的自发性反复发作(SRS)的鼠归为发作组,其余归为未发作组。其中空白对照组4只,未刺激组16只,其余归为发作组和未发作组。将四组分为15 d、30 d两个亚组,在电刺激后15 d、30 d两个时间点统一处死动物,以R15、R30表示在两个时间点进行RT-PCR反应,以I15、I30表示在两个时间点进行免疫荧光检测。

1.2 模型制作及评分

1.2.1 模型的建立 大鼠麻醉(呼吸心跳均匀,刺激后肢无反应或者角膜反射消失)固定于脑立体定位仪上,然后沿正中切开颅骨表面皮肤约1 cm左右,暴露颅骨及前囟,创面止血。以前囟后3.0 mm、旁开4.8 mm、硬脑膜下8.8 mm为坐标,分别于左右两侧杏仁核插入自制漆包镍铬电极,电极两尖端间距0.25 mm;并在顶骨、额骨上用两个螺丝加强固定,用牙托粉固定颅骨表面。术后观察大鼠呼吸、心率、体温,各项指标正常后放回饲养笼。术后给予青霉素预防感染。

1.2.2 刺激参数 单相方波,强度400 μ A,波宽1 ms,频率60 Hz,仅持续刺激一次,时间20 min,同时观察大鼠行为表现。

1.2.3 Racine评分 根据Racine的评分标准^[1]进行发作级别评分。I级:不动、闭眼、胡须动;II级:点头、咀嚼伴有面部抽搐;III级:一侧前肢抬

起,阵挛;IV级:站立并伴有两侧前肢的阵挛;V级:站立、跌倒,伴有全身性阵挛发作。其中IV、V级发作为继发性全身发作。由于视频监控设备的分辨率不能达到I、II级的监测标准,故本研究只记录III~V级大鼠癫痫的发作情况。

1.3 标本的采集及切片

1.3.1 新鲜脑组织的提取 麻醉,直接断头取脑,在冰面上取电极插入点前后之间1 cm脑组织,于-80℃冰箱内保存。

1.3.2 石蜡切片的制作 将各组大鼠在15 d、30 d两个时间点麻醉,灌注取脑,留取电极插入点前后之间1 cm脑组织,制成5 μ m石蜡切片用于免疫荧光的检测。

1.4 免疫荧光组织化学染色

切片常规脱蜡,0.02 mol/L PBS漂洗3次转移至3% H_2O_2 中室温孵育10 min,蒸馏水冲洗;微波抗原修复,0.02 mol/L PBS漂洗3次,每次3 min;加正常山羊血清工作液室温封闭30 min;转移切片至1:200兔抗GAP-43多克隆抗体工作液中,4℃过夜;37℃水浴箱复温1 h,0.02 mol/L PBS漂洗切片3次后转移至TRITC标记的羊抗兔IgG(1:200)工作液中,37℃避光孵育45 min;0.02 mol/L PBS漂洗切片3次后裱片,缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察并采集图像。在100倍镜下,每张切片拍摄病灶海马区阳性细胞最多但互不重叠的3个视野,用IPP 6.0图片分析软件计数每个视野的平均阳性细胞数,进行统计分析。

1.5 RT-PCR检测

用Trizol提取组织总RNA,依照试剂盒说明反转录成cDNA,总体积20 μ L。PCR反应:引物序列:GAP-43上游引物:5'-GGAGATGGCTCTGCTAC-3',下游引物:5'-CACATCGGCTTGTITTAG-3',产物片段长度237 bp; β -actin-f:GAACCTAAGGCCAACC, β -actin-r: TGTCACGCACGATTTC,产物片段长度305 bp。PCR反应参数:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,58.5℃退火30 s,72℃延伸35 s,共35个循环;72℃延伸5 min。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳。以GAP-43与 β -actin灰度值之比作为GAP-43 mRNA的相对表达量。

1.6 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行统计处理,所有计量资料均进行正态检验和方差齐性检验。实验数据中计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组

间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用LSD-t检验;组内比较采用配对*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型发作情况

16只未刺激组大鼠未观察到明显的自发性反复癫痫发作现象;40只植入电极行电刺激的大鼠中,在电刺激过程中出现明显Ⅲ~Ⅴ级发作的大鼠共38只,2只未观察到明显癫痫发作的大鼠排除在实验组以外。在38只大鼠中,15d内出现SRS的大鼠共10只,在15~30d内出现SRS的大鼠共11只,即在30d内出现明显Ⅲ~Ⅴ级癫痫发作的大鼠共21只,未发作的大鼠共17只。将21只癫痫发作大鼠归为发作组,17只未发作大鼠归为未发作组,与未刺激组和空白对照组大鼠一起进行RT-PCR和免疫荧光检测。刺激结束至可观察到3级以上癫痫发作的时间大都在4~30d之间,平均19d,SRS在30d内出现的概率为55.3%,由于实验条件所限,Ⅰ~Ⅱ级发作难以监测到,故该时间段不能作为真正意义上SRS出现的潜伏期,只能在一定意义上说明问题。

2.2 各组 GAP-43 mRNA 在不同时间点的相对表达量

15d时,发作组、未发作组和未刺激组的条带相比空白对照组的条带亮,且相对表达量较空白对照组明显高,说明GAP-43 mRNA表达较对照组高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);发作组和未刺激组相比组间差异明显,也具有统计学意义($P < 0.05$);30d时未发作组GAP-43 mRNA表达较15d时表达量无明显差异,组内差异无统计学意义($P > 0.05$);未刺激组30d时GAP-43 mRNA表达较15d时表达减少,与空白对照组相比无明显差

异;同时,发作组、未发作组与未刺激组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但发作组与未发作组之间在15d、30d时差异都不具有统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 发作组、未发作组、未刺激组和空白对照组在15 d、30 d GAP-43 mRNA 相对表达量

组别	15 d	30 d
发作组	0.683 ± 0.108	0.386 ± 0.145
未发作组	0.544 ± 0.115	0.486 ± 0.127
未刺激组	0.493 ± 0.097	0.258 ± 0.089
空白对照组	0.234 ± 0.132	0.234 ± 0.132

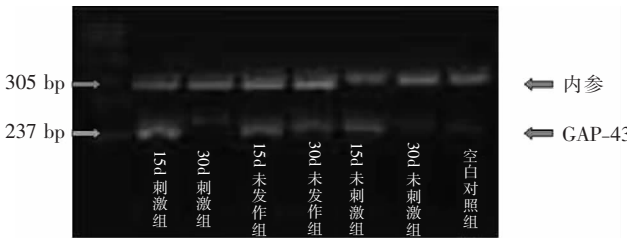


图1 发作组、未发作组、未刺激组和空白对照组在15 d、30 d GAP-43 mRNA 相对表达量。

2.3 各组 GAP-43 荧光免疫反应情况

空白对照组海马的颗粒细胞、锥体细胞门区、CA3区的GAP-43呈无表达或者低表达状态。在15d时,未刺激组GAP-43荧光染色表达一般,染色阳性细胞稀少;与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);与未发作组和发作组比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。在15d和30d时,未发作组和发作组可见海马门区及CA3区GAP-43荧光表达较强,染色阳性细胞较多;与空白对照组相比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);发作组与未发作组之间比较,差异不具有统计学意义($P > 0.05$),见表2。

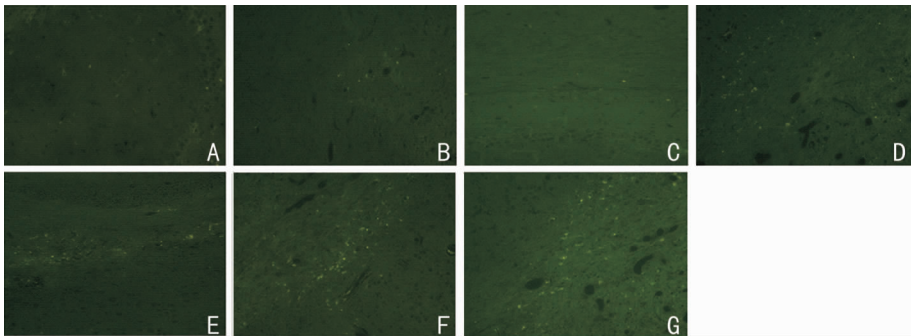


图2 发作组、未发作组、未刺激组和空白对照组在15 d、30 d时GAP-43表达。A:空白对照组;B:15 d未刺激组;C:30 d未刺激组;D:15 d未发作组;E:30 d未发作组;F:15 d发作组;G:30 d发作组。

表 2 发作组、未发作组、未刺激组 and 空白对照组在 15 d、30 d 时 GAP-43 表达

组别	15 d	30 d
发作组	16 ± 2.5	18 ± 1.9
未发作组	12 ± 3.3	13 ± 2.9
未刺激组	4 ± 1.7	2 ± 1.5
空白对照组	2 ± 1.2	2 ± 1.2

3 讨论

癫痫的电点燃诱发自发性反复发作,必需在动物出现 V 级发作后还需大量电刺激才能出现,即广泛电点燃模型。基于该模型制作过程比较繁琐, Vicedomini 等^[2]提出了电点燃诱导癫痫持续状态后模型,即 SE 模型,该模型具有以下特点:①在初始刺激与 SRS 之间有一潜伏期,该潜伏期反映癫痫在细胞和分子水平的形成过程^[3],这一特性与人类继发性癫痫发作极为相似。②该模型的病理变化是海马硬化,与人类颞叶癫痫患者海马的形态学变化相似;③该模型易诱发 SRS,且发作稳定、制作简单。因此该实验选用 SE 模型进行 GAP-43 与颞叶癫痫发生的相关实验研究。

GAP-43 最早于 80 年代初由 Skene 等^[4]从兔再生的外周神经中获得,大量研究表明 GAP-43 在生长、分化的神经元纤维末梢含量极高。当损伤时,损伤周围的神经元通过侧枝发芽和反应性轴突再生进行功能代偿,突触在形态和功能上的改变即所谓的突触重塑。这些区域 GAP-43 水平将升高,但随着损伤修复时间的延长而逐渐回落。通过免疫荧光发现,无论在电刺激还是植入电极未行电刺激的大鼠中,通常并不表达或低表达的海马颗粒细胞、门区及 CA3 区呈现 GAP-43 不同程度的高表达。GAP-43 已被作为当今研究脑损伤修复和突触重塑的一种首选标志物^[5]。同时 Lanerolle 等^[6]认为突触可塑性改变可能是颞叶癫痫的维持和认知功能损害的基础。因此,我们可以推断,GAP-43 参与癫痫的特异性表达。

国内外大量实验研究证实,在化学点燃致病模型中,GAP-43 伴随苔藓纤维出芽、突触重塑而增高^[7,8]。但随着突触重塑的完成,GAP-43 mRNA 开始下降,新鲜出芽逐渐减弱。本实验通过建立电刺激癫痫持续状态后模型发现,在该模型建立后的 15 d 和 30 d 内 GAP-43 的表达相比空白对照组呈持续高表达状态,与化学点燃模型结果相符^[8]。通过 RT-PCR 检测发现 15 d 时发作组 GAP-43 mRNA 的

表达明显高于其他组。随着癫痫状态的稳定建立,苔藓纤维出芽、突触重塑逐渐停止,最终 30 d 时 GAP-43 mRNA 的明显下降。通过免疫荧光检测发现,在发作组中 15 d 及 30 d 时 GAP-43 维持在高表达状态,同样与化学点燃模型结果吻合。因此,GAP-43 可作为神经系统中苔藓纤维出芽、突触重塑的重要标志物。

本实验通过 RT-PCR 检测发现,在 15 d 时,发作组、未发作组中均发现 GAP-43 mRNA 的高表达。30 d 时发作组 GAP-43 mRNA 的表达明显降低,而未发作组仍维持在高水平。一方面可能由于实验观察时间较短,突触重塑尚未完成,造成 GAP-43 持续高表达;另一方面可能与该实验本身条件有关,在未发作中可能存在 I - II 级发作的大鼠,但却未形成稳定的自发性反复发作,致使未发作组 GAP-43 mRNA 持续在高表达水平直至达到 SRS 状态。

通过本实验发现,在未刺激组中 GAP-43 初期高表达,这可能与神经元修复有关,当神经元修复完成后 GAP-43 恢复到正常表达水平。未发作组在 30 d 时较未刺激组仍处于高表达状态,考虑电刺激本身就属于“二次”损伤,加剧了 GAP-43 mRNA 的表达,直至完成新的突触重塑,这可能就是为什么行电刺激可能导致癫痫发作,而只植入电极不行电刺激却不会出现癫痫发作的原因。此外,该实验中同样行电刺激而有些大鼠在 30 d 内未形成稳定的自发性癫痫反复发作,是不是因此就可以否定“二次”损伤的作用呢?本研究前期实验证实,刺激前所选用大鼠的脑电基础状态无差别,即对电流刺激不存在易感性和抵抗性^[9]。考虑由于实验条件的限制,毕竟只能观察到 III - V 级癫痫发作,所以未发作或者推迟发作的具体机制还有待进一步实验研究。

国内有文献报道,在癫痫点燃模型中,致病大鼠在 1 d 后、7 d 后、15 d 后和 30 d 后为 GAP-43 表达高峰期^[10]。该模型前期研究发现,在 7 d 内出现稳定的高反应性癫痫状态大鼠几乎没有,呈现潜伏期,15 d 后才处于自发作期,因此我们选择 15 d 和 30 d 作为研究的两个时间点。通过检测我们发现,致病大鼠在该两个时间点 GAP-43 确实呈高表达状态,是否在潜伏期有同样表达,还需要大量实验进行研究。

本实验成功建立了电刺激大鼠杏仁核的 SE 模型。通过实验我们发现,GAP-43 与颞叶癫痫的发生存在相关性,表明该蛋白在癫痫发生的突触重塑过

程中起到重要作用。GAP-43 可能是突触重塑变化的重要分子基础。例如 B 激肽受体在颞叶癫痫的苔藓纤维出芽也起到重要作用^[11], 所以 GAP-43 是否是参与突触重塑癫痫发作的决定因子还是联合其它相关蛋白共同起作用? 目前国内外尚无统一报道。总之颞叶癫痫海马突触重塑是多因素、多步骤复杂的变化过程, 还需大量实验进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Racine RJ. Modulation of seizure activity by electrical stimulation: motor seizures. *Electroencephal Clin Neurophysiol*, 1972, 32: 281-294.
- [2] Vicedomini JP, Nadler JV. A model of status epilepticus based on electrical stimulation of hippocampal afferent pathways. *Exp Neurol*, 1987, 96: 681-691.
- [3] Pitkanen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol*, 2008, 1: 173-181.
- [4] Naffah-Mazzacoratti MG, Funke MG, Sanabria ERG, et al. Growth-associated phosphoprotein expression is induced in the supragranular regions of the dentate gyrus following pilocarpine-induced seizures in rats. *Neuroscience*, 1999, 91(4): 485-492.
- [5] Bendotti C, Baldessari S, Pende M, et al. Relationship between GAP-43 expression in the dentate gyrus and synaptic reorganization of hippocampal mossy fibres in rats Treated with kainic acid. *Eur J Neurosci*, 1997, 9: 93-101.
- [6] Lanerolle NC, Kim JH, Williamson A, et al. A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia*, 2003, 44: 677-687.
- [7] Bendotti C, Baldessari S, Pende M, et al. Relationship between GAP-43 expression in the dentate gyrus and synaptic reorganization of hippocampal mossy fibres in rats treated with kainic acid. *Eur J Neurosci*, 1997, 9(1): 93-101.
- [8] 李国良, 张宁, 李静, 等. 匹罗卡品诱导颞叶癫痫大鼠齿状回苔藓纤维出芽及突触重建. *中南大学学报*, 2004, 29(4): 424-428.
- [9] 齐兆鹏, 金澎, 刘占涛, 等. 大鼠杏仁核电刺激癫痫持续状态模型的建立及其自发性反复癫痫发作的研究. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(9): 1579-1581.
- [10] 刘庆祝, 王峰, 牟青春, 等. 大鼠岛叶电点燃模型海马 GAP43、P38 mRNA 和蛋白的表达. *中华医学杂志*, 2010, 90(19): 1348-1352.
- [11] 张志强. B 激肽受体在颞叶癫痫病理过程中的作用. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2005, 32(5): 471-472.

《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于 1974 年, 由教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个相联学科的专业学术期刊。本刊被收录为“中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)”。

《国际神经病学神经外科学杂志》现主要栏目有论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道、专家论坛和综述等。杂志立足于国内神经病学、神经外科学领域的前沿研究, 及时报道国内外神经科学领域最新的学术动态和信息。促进国内外学术的双向交流, 为中国神经科学走向世界搭建新的平台。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿, 通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为 CN 43-1456/R, ISSN 1673-2642, 邮发代号 42-11, 全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊, 每期定价 13 元, 全年定价 78 元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

为更好地筹集办刊资金, 保证刊物的健康发展, 本刊将竭诚为药品厂商、医疗器械厂商和广告公司提供优质服务, 并长期向各级医疗单位征集协办单位, 具体事宜请与本刊编辑部联系。

联系地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号(中南大学湘雅医院内)《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部, 邮编: 410008, 电话/传真: 0731-84327401, E-mail 地址: jinn@vip.163.com, 网址: <http://www.jinn.org.cn/>。