

神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.02.006

持续惊厥后幼年大鼠海马电生理学变化 及脑源性神经营养因子表达变化

熊佳佳, 蒋 莉, 陈恒胜, 胡 越

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:研究幼年期大鼠长时程惊厥(status convulsion, SC)后海马电生理学与海马脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达变化, 探索两者之间的可能关系。**方法:**选择生后 21 d Wistar 鼠 160 只, 随机分为对照组和实验组, 每组 80 只。腹腔注射氯化锂-匹罗卡品制造 SC 模型; 以腹腔注射生理盐水为对照组。造模后 1、7、14、21 d 膜片钳技术检测海马场兴奋性突触后电位(field excitatory postsynaptic potentials, fEPSP)斜率与波幅的变化, 比较长时程增强(long-term potentiation, LTP)现象。造模后 12 h、1 d、3、7、14、21 d 免疫组织化学观察海马区 BDNF 表达的定位情况, Western blot 方法鉴定其表达情况。**结果:**(1)SC 后 7 d, 实验组 fEPSP 斜率为(162.30 ± 28.50)%高于对照组(124.01 ± 26.46)%($P < 0.05$); SC 后 14 d 实验组和对照组 fEPSP 斜率分别为(83.06 ± 8.32)%和(121.64 ± 23.12)%, 波幅分别为(100.54 ± 16.03)%和(135.65 ± 35.85)%, 实验组较对照组斜率及波幅明显降低, 有统计学差异($P < 0.05$)。(2)免疫组织检查发现 SC 后大鼠海马 CA1, CA3 区 BDNF 阳性着色均有不同程度的增强, 实验组在 SC 后 12 h、1 d、3、7 d 较正常组有增多趋势, 14 d 及 21 d 组无明显差别。(3)Western blot 测定 BDNF 表达情况, SC 后 12 h、1 d、3、7 d 分别为: 1.08 ± 0.10、1.39 ± 0.08、0.85 ± 0.04、0.53 ± 0.06, 对照组分别为: 0.39 ± 0.16、0.37 ± 0.03、0.39 ± 0.02、0.37 ± 0.04, 实验组与对照组比较有统计学差异($P < 0.05$)。**结论:**(1)幼年大鼠 SC 后 fEPSP 斜率在 SC 后 7 d 较正常组增高; 在 SC 后 14 d fEPSP 斜率及波幅较对照组和其他实验组明显降低。提示 SC 后急性期 LTP 增高, 潜伏期 LTP 降低。(2)经免疫组化和 Western blot 方法检测, 提示 BDNF 表达受 SC 刺激影响, 在 SC 后急性期表达明显增多。(3)BDNF 在 LTP 形成过程中可能起重要作用。

【关键词】幼年大鼠; 长时程惊厥; 长时程增强; 脑源性神经营养因子

【中图分类号】R748; R741.044

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-02-05

作者简介:熊佳佳, Email: dr_xj@tom.com,

研究方向: 脑发育与脑损伤。

通信作者:蒋 莉, Email: dr_jiang@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号: 81071056)。

[8] Zhang Z, Fan J, Ren Y, et al. The release of glutamate from cortical neurons regulated by BDNF via the TrkB/Src/PLC- γ 1 pathway[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(1): 144-151.

[9] Lazo OM, Gonzalez A, Ascaño M, et al. BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching[J]. J Neurosci, 2013, 33(14): 6112-6122.

[10] 文 香, 蒋 莉, 陈恒胜. 无镁诱导神经元放电后细胞共培养微环境中脑源性神经营养因子的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(5): 375-379.

[11] Gaffield MA, Betz WJ. Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes[J]. Nat Protoc, 2006, 1(6): 2916-2921.

[12] Xu SJ, Wang P, Xia D. Quantitative analysis of synaptic vesicle release and readily releasable pool size in hippocampal neurons[J]. Acta Physiol Sinica, 2009, 61(6): 505-510.

[13] Tyler WJ, Pozzo-Miller LD. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the ac-

tive zones of hippocampal excitatory synapses[J]. J Neurosci, 2001, 21(12): 4249-4258.

[14] Shen W, Wu B, Zhang Z, et al. Activity-induced rapid synaptic maturation mediated by presynaptic cdc42 signaling[J]. Neuron, 2006, 50(3): 401-414.

[15] Kerchner GA, Nicoll RA. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(11): 813-825.

[16] Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, et al. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition[J]. Trends Neurosci, 2010, 33(3): 121-129.

[17] Copi A, Jungling K, Gottmann K. Activity- and BDNF-induced plasticity of miniature synaptic currents in ES cell-derived neurons integrated in a neocortical network[J]. J Neurophysiol, 2005, 94(6): 4538-4543.

(责任编辑: 冉明会)

Alteration of electrophysiology and expression of brain-derived neurotrophic factor in hippocampus of juvenile rats following a status convulsion

Xiong Jijia, Jiang Li, Chen Hengsheng, Hu Yue

(Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, Ministry of Education, Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

[Abstract] **Objective:** To investigate the alteration of electrophysiology and the change of expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus of juvenile rats following a status convulsion (SC) and to explore the relationship between the two. **Methods:** Totally 21-day-old Wistar rats were divided into control group ($n=80$) and experiment group ($n=80$). Rats in control group were injected with normal saline. Intraperitoneal injection of lithium chloride-pilocarpine was conducted to establish SC model. Changes in slope and amplitude of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) on 1, 7, 14, 21 d after model establishment were detected by patch clamp technique and long-term potentiation (LTP) was compared. Location of BDNF in the hippocampus was observed by immunohistochemistry at 12 h and on 1, 3, 7, 14, 21 d after SC. Expression of BDNF was quantitatively analyzed by Western blot. **Results:** (1) Slope of fEPSP on 7 d after SC was significantly higher in experiment group ($162.30 \pm 28.50\%$) than in control group ($124.01 \pm 26.46\%$) ($P < 0.05$). Slopes of fEPSP on 14 d after SC in experiment group and control group were ($83.06 \pm 8.32\%$) and ($121.64 \pm 23.12\%$), respectively; amplitudes in experiment group and control group were ($100.54 \pm 16.03\%$) and ($135.65 \pm 35.85\%$), respectively; slope and amplitude were decreased in experiment group than in control group with statistical differences ($P < 0.05$). (2) Immunohistochemistry showed that positive staining of BDNF in CA1 and CA3 region of hippocampus was enhanced after SC; enhancement of positive staining of BDNF in CA1 and CA3 region of hippocampus was higher in experiment group than in control group at 12 h and on 1, 3, 7 d after SC and there was no differences between two group on 14, 21 d after SC. (3) According to the results of Western blot, expression of BDNF in experiment group and control group at 12 h and on 1, 3, 7 d after SC was 1.08 ± 0.10 , 1.39 ± 0.08 , 0.85 ± 0.04 , 0.53 ± 0.06 and 0.39 ± 0.16 , 0.37 ± 0.03 , 0.39 ± 0.02 , 0.37 ± 0.04 respectively, with statistical differences between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusions:** (1) Slope of fEPSP of juvenile rats on 7 d after SC is significantly increased in experiment group than in control group and slope and amplitude of juvenile rats on 14 d after SC are significantly decreased in experiment group and control group, which indicates that LTP can be increased at acute stage after SC and be decreased at latency stage. (2) Expression of BDNF can be influenced by SC based on results of immunohistochemistry and Western blot and expression of BDNF can be increased at acute stage after SC. (3) BDNF plays an important role in the formation of LTP.

[Key words] juvenile rats; status convulsion; long-term potentiation; brain-derived neurotrophic factor

长时程惊厥或惊厥持续状态(status convulsion, SC)是常见的儿童危重症,将会导致与年龄相关的以海马为主的脑损伤^[1-2],产生癫痫、智力低下、认知功能障碍等神经系统后遗症。SC后,不仅导致海马等部位的神经元坏死和凋亡,还会影响海马区脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)等神经生长因子的分泌,对神经元突触功能也会产生一定的影响。海马是脑内与癫痫相关的特殊部位,既常与癫痫发作的发生有关,又是癫痫发作后易产生脑损伤的部位,同时还是学习记忆的关键脑区。大脑海马区突触水平存在一种信息储存方式,表现为突触连接在接受一定量的强化刺激后较长时间内维持高于刺激前的突触效能增强的现象,此即长时程增强(long-term potentiation, LTP)现象,

在神经电生理主要表现为场兴奋性突触后电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)的增强^[3]。LTP现象是学习记忆过程中起重要作用的基本功能性电生理机制,也是研究学习记忆神经机制的突触模型,它与N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)受体关系密切^[4]。研究发现,BDNF不仅在调节这两个受体激活过程中起重要作用,还能通过激活一系列复杂信号通路的下游效应参与突触可塑性的调节^[5-6]。本研究采用生后21 d大鼠(脑发育水平相当于人类幼年期),检测发育期大鼠SC后不同时间点海马脑片fEPSP的变化,比较LTP改变;并从蛋白水平研究BDNF表达改变,旨在研究SC后不同时间段,海马突触电生理及其调节因子BDNF表达变化及其相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级生后 21 d(相当于人类婴幼儿时期)健康雄性 Wistar 大鼠, 体质量在 40~60 g。购于第三军医大学大坪医院实验动物中心, 置于 SPF 级动物实验室饲养, 自由摄食、水, 室内温度 20 ℃~25 ℃, 相对湿度 40%~70%。在光/暗周期为 12 h/12 h 的条件下饲养。

1.1.2 主要试剂 氯化锂购于 Amresco 公司。阿托品注射液购于西南药业股份有限公司。地西洋注射液购于上海旭东海普药业有限公司。匹罗卡品、NaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂、MgSO₄·7H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、NaHCO₃、维生素 C、丙酮酸钠、乳酸钠、葡萄糖、蔗糖购于 sigma 公司。免疫组化试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司。蛋白裂解试剂盒、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度试剂盒、增强化学发光显影试剂盒购于 Beyotime 公司。聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购于 Millipore 公司。BDNF 抗体购于 Genetex 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 实验动物按抽签法随机分为生理盐水对照组、实验组(SC 组), 2 组均分为模型后 12 h、1、3、7、14、21 d 6 个时间点, 每个时间点均为 8 只; 其中实验组及对照组用于检测 LTP 的为造模后 1、7、14、21 d 4 个时间点, 共 64 只; 用于免疫组织化学及 Western blot 的为造模后 12 h、1、3、7、14、21 d 6 个时间点, 共 96 只。

1.2.2 模型制作 ①所有实验动物均按 127 mg/kg 剂量腹腔注射氯化锂。②18 h 后按 30 mg/kg 剂量腹腔注射匹罗卡品, 对照组以生理盐水替代匹罗卡品。③15 min 后按 1 mg/kg 腹腔注射阿托品以拮抗匹罗卡品外周胆碱能反应。④SC 1 h, 腹腔注射安定(10 mg/kg)止惊。观察实验动物, SC 组大鼠出现惊厥发作的行为学表现, 按 Racine 分级法分为 0~V 级, 分别表现为: 0 级: 无任何发作迹象; I 级: 凝视、咀嚼和须动; II 级: 点头、湿狗样抖动或搔抓; III 级: 前肢阵挛抽搐; IV 级: III 级加后肢站立的全身强直性发作; V 级: 伴有站立并摔倒的全身强直-阵挛性发作。对照组无惊厥发作表现。惊厥发作达 IV、V 级, 如注射匹罗卡品后 30 min 未达到 IV、V 级, 可再次按照原剂量的 1/5 追加匹罗卡品, 每只最高剂量为 50 mg/kg。注射后 30 min 惊厥发作未停止可以第 1 次注射的半量追加安定至发作终止(以 3 次为最高限)。本研究实验组动物的惊厥发作均达到 IV、V 级。

1.2.3 膜片钳检测海马 fEPSP 液体配制: (1)切片液配制(300 mmol/L, pH 7.3~7.4): KCl 3 mmol/L、NaHCO₃ 26 mmol/L、NaH₂PO₄·2H₂O 1.25 mmol/L、维生素 C 0.4 mmol/L、乳酸钠 2 mmol/L、丙酮酸钠 2 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、蔗糖 220 mmol/L、CaCl₂ 0.1 mmol/L、MgCl₂ 2 mmol/L、MgSO₄ 4 mmol/L, 其中 CaCl₂ 0.1 mmol/L、MgCl₂ 2 mmol/L、MgSO₄·7H₂O 4 mmol/L 已配置为母液保存。配置时先将前 8 种溶质溶解, 定容至 1 L, 经体积分数为 95%O₂ 和 5%CO₂ 混合气体饱和, 再加入

后 3 种母液, 放入冰箱制成冰水混合液备用。(2)记录液的配制(295 mmol/L, pH 7.3~7.4): NaCl 124 mmol/L、KCl 2.8 mmol/L、NaHCO₃ 26 mmol/L、NaH₂PO₄·2H₂O 1.25 mmol/L、维生素 C 0.4 mmol/L、乳酸钠 2 mmol/L、丙酮酸钠 2 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、CaCl₂ 2 mmol/L、MgSO₄ 2 mmol/L, 配置时先将前 8 种溶质溶解, 定容至 1 L, 经体积分数为 95%O₂ 和 5%CO₂ 的混合气体饱和, 再加入后 2 种母液, 37℃放置孵育。(3)电极内液: 2 mol/L NaCl, 10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 10 mmol/L 乙二醇二乙醚二胺四乙酸。

急性海马脑片制备: 腹腔注射 10%水合氯醛(4 ml/kg), 麻醉大鼠。开胸, 钳夹腹主动脉, 心脏灌注冰冷氧饱和切片液 1 min, 快速断头取脑, 放入氧饱和 0 ℃~4 ℃切片液中 2 min。振动切片机(美国 WPI 公司, NVSLM-1 型)切取 400 μm 厚的海马脑片。将切好的脑片置于持续通氧混合气的记录液的孵育槽(美国 Warner 公司, BSC-PC 型)中 37 ℃孵育 2 h。

海马脑片 fEPSP 检测: 将海马脑片转移至记录槽, 持续灌流氧饱和记录液。双极刺激钨电极置于海马辐射层内 Schaffer 侧支上。内充 2 M 电极内液的玻璃微电极(阻抗 1~2 Ω)置于 CA1 区辐射层, 记录电刺激诱发的 fEPSP, 经 Multi-Clamp 700B 放大器(美国 Axon 公司)放大, 应用 pCLAMP 9.2 软件(美国 Axon 公司)进行采样处理并保存。测正常对照组和 SC 模型后 1、7、14、21 d 大鼠的海马 CA1 区突触 fEPSP。待基线稳定后测量海马脑片的初始 fEPSP, 统计时以此为初始波幅和斜率值。选取诱导最大反应值 50%的刺激强度作为基本刺激, 待基线稳定 30 min 后给予高频刺激(high frequency stimulation, HFS)诱导 LTP, 观察高频刺激后 5、10、20、30 min fEPSP 的斜率和 PS 的幅值的变化。HFS 的参数为 2 组 100 Hz 的 100 个脉冲, 组间隔 30 s。HFS 后 fEPSP 的斜率增大 20% 以上, 且持续时间 ≥ 30 min 为 LTP 诱导成功。

1.2.4 免疫组织化学检测 BDNF 表达 取 SC 后 12 h、1、3、7、14、21 d 6 个时间点模型成功的大鼠及对照组大鼠, 10%水合氯醛(4 ml/kg)麻醉后, 快速断头取左侧大脑置于 4%多聚甲醛溶液中后固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片。脱蜡, 梯度酒精水化, 免疫组化后续步骤按照免疫组化试剂盒操作说明书进行, 一抗工作滴度为 1:1 000。以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照, 其他步骤完全相同。

1.2.5 Western blot 实验 取 SC 后 12 h、1、3、7、14、21 d 6 个时间点模型成功的大鼠及对照组大鼠, 10%水合氯醛(4 ml/kg)麻醉后, 快速断头, 冰上取右侧海马, 按照蛋白提取试剂盒说明书要求加蛋白提取液, 冰上匀浆 30 min, 组织完全匀碎, 4 ℃离心(14 000 r/min)30 min, 吸取上清液, BCA 法测蛋白浓度。蛋白与上样缓冲液按 4:1 体积混匀, 100 ℃水浴 10 min。保持各孔蛋白上样量一致。用 12%的分离胶, 5%的浓缩胶电泳, 之后转移至 PVDF 膜, 5%脱脂牛奶封闭 1 h, 分别加一抗, BDNF(1:800), 4 ℃孵育过夜。Tris 盐缓冲液-Tween 洗膜后加入二抗(中杉 1:5 000), 增强化学发光法显色, 在自动凝胶电泳成像系统(Bio-Rad, 美国)显影, 采集图像并分析测定目的蛋白与 β-actin 的吸光度值, 以 β-actin 作为参照, 比较 BDNF 灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件包进行统计分析,数据结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。levene 检查方差齐性后,不同时间点实验组与对应时间点对照组 fEPSP 的斜率、波幅值比较及不同时间点实验组与对应时间点对照组 Western blot 结果之间比较采用 *t* 检验;不同时间点实验组与实验组、对照组与对照组之间 fEPSP 的斜率、波幅值比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 海马突触可塑性变化

2.1.1 SC 对海马脑片 fEPSP 斜率影响 以给予 HFS 前的 fEPSP 斜率为基础值,比较给予 HFS 后 30 min 时各组大鼠 fEPSP 的斜率与基础值的比值百分率。如表 1 所示,SC 后 7 d 实验组和对照组 fEPSP 斜率比值分别为(162.30 ± 28.50)%、(124.01 ± 26.46)%,SC 后 14 d 组的 fEPSP 斜率为其基础值的(83.06 ± 8.32)% ($n=8$),对照组为(121.64 ± 23.12)% ($n=8$),两时间点的实验组与对应对照组比较均有统计学差异($t=2.785, 4.442$, 均 $P<0.05$);SC 后 1、21 d 组 fEPSP 斜率的基础值百分数与其对应时间点的对照组大鼠比较差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组各时间点 fEPSP 斜率比较方差齐,差异均无统计学意义($P>0.05$)。记录的 fEPSP 波形见图 1。

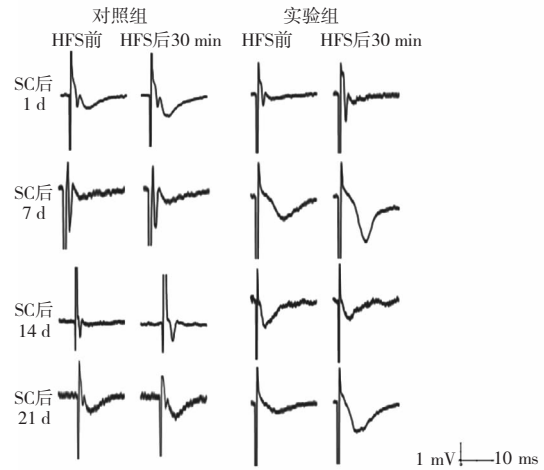


图 1 幼年大鼠 SC 后不同时间点海马脑片 HFS 前后 fEPSP 变化
Fig.1 Changes in fEPSP before and after HFS in hippocampal slice of juvenile rats at different time points after SC

2.1.2 SC 对海马脑片 fEPSP 波幅影响 以给予 HFS 前的 fEPSP 波幅为基础值,比较给予 HFS 后 30 min 时各组大鼠 fEPSP 的波幅与基础值的比值百分率。如表 2 所示,SC 后 14 d 实验组和对照组 fEPSP 波幅比值分别为(100.54 ± 16.03)%、(135.65 ± 35.85)%,两者比较差异有统计学意义($t=2.529, P<0.05$),SC 后 1、7、21 d 组 fEPSP 波幅与基础值的比值与其对应时间点的对照组大鼠比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 幼年大鼠 SC 后不同时间点海马脑片 fEPSP 斜率变化比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Comparison of slopes of fEPSP at different time points after SC in juvenile rats ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 时间点 | 组别 | HFS前 (%) | HFS后 5 min | HFS后 10 min | HFS后 20 min | HFS后 30 min |
|----------|-----|----------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| SC后 1 d | 对照组 | 100 | 143.85 ± 34.41 | 124.50 ± 30.96 | 136.05 ± 28.20 | 131.50 ± 16.92 |
| | SC组 | 100 | 146.51 ± 19.01 | 137.71 ± 11.12 | 129.27 ± 8.88 | 134.65 ± 34.38 |
| SC后 7 d | 对照组 | 100 | 168.26 ± 31.32 | 168.09 ± 24.98 | 141.38 ± 30.68 | 124.01 ± 26.46 |
| | SC组 | 100 | 171.11 ± 46.68 | 166.32 ± 34.52 | 156.69 ± 34.16 | 162.30 ± 28.50 ^a |
| SC后 14 d | 对照组 | 100 | 163.27 ± 45.15 | 157.84 ± 34.69 | 128.09 ± 29.61 | 121.64 ± 23.12 |
| | SC组 | 100 | 110.72 ± 13.61 | 100.00 ± 16.81 | 95.15 ± 10.02 | 83.06 ± 8.32 ^a |
| SC后 21 d | 对照组 | 100 | 143.50 ± 42.28 | 147.01 ± 29.94 | 132.20 ± 34.44 | 121.58 ± 31.89 |
| | SC组 | 100 | 192.82 ± 67.01 | 160.43 ± 37.54 | 142.71 ± 26.57 | 145.21 ± 14.90 |

注:a,与对应对照组比较 $t=2.785, 4.442$, 均 $P<0.05$

表 2 SC 后不同时间点大鼠海马脑片 fEPSP 波幅变化比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.2 Comparison of amplitudes of fEPSP at different time points after SC in juvenile rats ($\bar{x} \pm s, \%$)

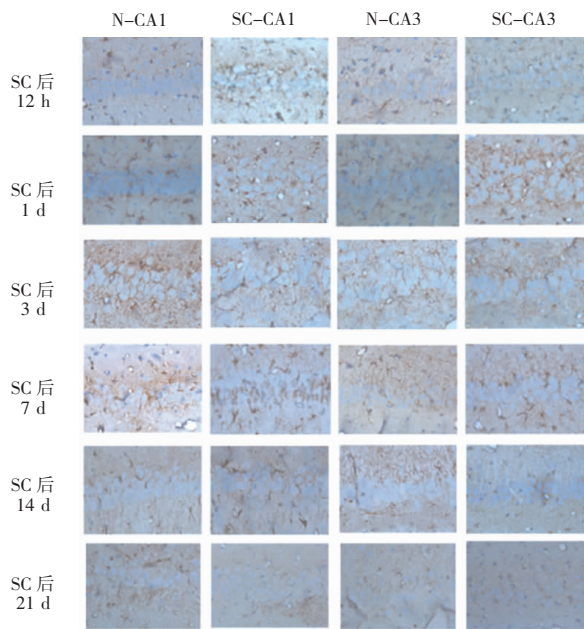
| 时间点 | 组别 | HFS前 (%) | HFS后 5 min | HFS后 10 min | HFS后 20 min | HFS后 30 min |
|----------|-----|----------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| SC后 1 d | 对照组 | 100 | 132.64 ± 37.11 | 138.61 ± 35.90 | 139.85 ± 35.54 | 141.44 ± 24.50 |
| | SC组 | 100 | 165.50 ± 41.40 | 154.23 ± 37.42 | 150.85 ± 27.79 | 149.03 ± 19.09 |
| SC后 7 d | 对照组 | 100 | 151.55 ± 24.96 | 156.17 ± 24.39 | 156.94 ± 32.38 | 136.44 ± 31.22 |
| | SC组 | 100 | 151.97 ± 42.97 | 141.81 ± 38.78 | 136.52 ± 29.64 | 132.19 ± 27.41 |
| SC后 14 d | 对照组 | 100 | 119.94 ± 16.06 | 136.45 ± 24.82 | 146.44 ± 31.58 | 135.65 ± 35.85 |
| | SC组 | 100 | 120.27 ± 29.14 | 121.76 ± 21.56 | 115.58 ± 17.71 | 100.54 ± 16.03 ^b |
| SC后 21 d | 对照组 | 100 | 118.85 ± 41.75 | 122.37 ± 32.35 | 122.03 ± 35.58 | 116.06 ± 35.02 |
| | SC组 | 100 | 156.77 ± 40.23 | 157.31 ± 31.86 | 197.74 ± 87.04 | 156.49 ± 44.87 |

注:a,与对应对照组比较 $t=2.529, P<0.05$; b,与其他实验组比较, $P<0.05$

各对照组 fEPSP 波幅方差齐, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 实验组 4 个时间点之间比较方差齐, 组间比较差异有统计学意义 ($F=5.838, P<0.05$)。实验组中 14 d 组分别与 SC 后其他 3 个时间点比较差异均有统计学意义 ($P=0.002, 0.038, 0.001$)。

2.2 免疫组织化学方法定位观察 SC 后 BDNF 的表达变化

BDNF 在正常大鼠大脑海马在 CA1-CA4 区和齿状回区锥体细胞及颗粒细胞以及周围的星形胶质细胞表达。因其为分泌型神经营养因子, 故在胞浆棕黄色着色为主, 部分可见轴突着色, 见图 2。



图中 N-CA1、N-CA3 分别表示对照组 CA1 区和对照组 CA3 区, SC-CA1、SC-CA3 分别表示实验组 CA1 区和实验组 CA3 区

图 2 免疫组织化学检测幼年大鼠海马 CA1、CA3 区 BDNF 表达 (200 ×)

Fig.2 Expression of BDNF in CA1 and CA3 regions at different time points after SC detected by immunohistochemistry (200 ×)

2.3 SC 后大鼠海马 BDNF 表达变化

Western blot 检测 SC 后 12 h 至 21 d 6 个时点不同组大鼠海马 BDNF 表达变化(图 3, N 表示对照组), 并以 β -actin 的灰度为参照比较 BDNF 值, 图 4 显示 SC 后 12 h、1、3、7 d BDNF 表达实验组较对应时间点的对照组有明显的增加 ($t=10.21, 34.237, 28.126, 6.692$, 均 $P<0.05$)。SC 后 14、21 d 与对应时间点正常组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

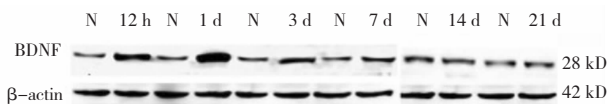
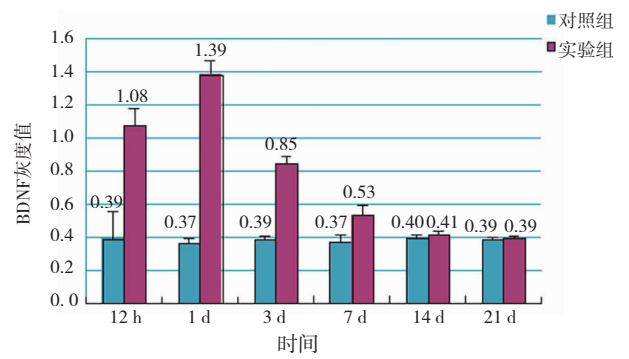


图 3 Western blot 检测幼年大鼠 SC 后各时间点实验组及对照组幼年大鼠海马 BDNF 表达

Fig.3 Expression of BDNF in hippocampus of juvenile rats in experiment group and control group at different time points after SC detected by Western blot



SC 后 12 h、1、3、7 d 实验组和对照组之间差异有统计学意义 $t=10.21, 34.237, 28.126, 6.692, P<0.05$

图 4 Western blot 检测幼年大鼠 SC 后各时间点实验组及对照组大鼠海马 BDNF 表达与 β -actin 灰度比值
Fig.4 Ratio of BDNF expression in hippocampus of juvenile rats against β -actin gray value in experiment group and control group detected by Western blot

3 讨论

氯化锂联合匹罗卡品用于大鼠能复制 SC 模型^[7], 已有研究证实 SC 后将导致脑内从形态到功能的一系列变化, 包括以海马区为主的大脑神经元坏死和凋亡, 海马神经元缺失, 神经营养因子 (neurotrophic factors, NTFs) 表达变化等生化改变^[8-12], 影响神经元之间信息传递的重要结构——突触功能的可塑性等。通过 Morris 水迷宫实验证实, 多次惊厥发作会导致大鼠学习记忆功能受损。

学习和记忆被认为是由于突触反复被兴奋引起的传递效率的改变, LTP 现象是对学习和记忆的细胞与分子水平认识的基础。fEPSP 是 LTP 的重要参数, 是发生在神经元之间突触连接部位的, 反应突触前膜和突触后膜联系和功能的一种电生理表现。在海马突触连接部位, 突触前神经元接受强直刺激, 释放兴奋性神经递质谷氨酸, 谷氨酸与突触后膜的谷氨酸受体 NMDA 结合, 而 NMDA 是受体偶联的离子通道, 允许钙离子通过, 进而突触后神经元钙离子内流, 介导产生 fEPSP^[4]。fEPSP 表示突触后相邻神经元树突部位电位总和大小, 一定程度反映参与兴奋的突触数量, 它的斜率反映突触对刺激的响应速度, 幅度反映突触响应的强度, 而幅度会受诱导 LTP 的刺激诱导出群体峰电位 (population spike, PS) 影响。有研究发现在小鼠癫痫模型中, fEPSP 幅度呈现从急性期的增高到慢性期的逐渐降低^[13]。本研究发现, 幼年期大鼠 SC 后急性期 (7 d) 的海马脑片 fEPSP 斜率较正常组增高; SC 后 14 d 即潜伏期 fEPSP 斜率下降, 低于正常组; SC 后 1、21 d 与

正常组比较无统计学差异。提示幼年大鼠持续惊厥 1 h 后急性期突触对刺激的反应速度增快,突触传递效能增强,LTP 增强;而在潜伏期突触对刺激的反应速度减慢,传递效能降低,LTP 降低。持续惊厥 1 h 对幼年大鼠海马突触传递效能影响至少延续至惊厥后 2 周。

SC 后脑组织内细胞损伤与抗损伤机制激活,发生一系列生化改变,如:Ca²⁺内流,谷氨酸释放增加,NTFs 表达变化等。本研究中,BDNF 在幼年大鼠海马区表达在 SC 后 12 h 开始增多,SC 后 1 d 达高峰,3、7 d 逐渐降低,但仍高于对照组,与本课题组前期研究结果^[10]一致;SC 后 14、21 d 降低至正常水平。在 SC 后的此种 BDNF 表达变化是否与 LTP 的改变相关?众所周知,BDNF 是神经营养因子中的一种,它能促进神经元生长、分化及存活,影响突触传递、调节突触可塑性反应及突触重构^[14-15]。有研究发现,不管是阻断受体酪氨酸激酶还是清除 BDNF,LTP 的形成均会受到影响。对 BDNF 基因敲除鼠的研究发现,在杂合子 BDNF(+/-)小鼠中,LTP 减弱;外源性给予 BDNF,LTP 可得到修复,说明 BDNF 在 LTP 形成过程中起重要作用。在急性海马脑片中突触局部喷放式应用很小浓度的 BDNF 会诱导快速的去极化;可使颗粒细胞树突棘和轴中 Ca²⁺水平增高,细胞体出现爆发样动作电位;局部喷放式的应用 BDNF 通过调节突触后钙内流成为 LTP 形成的闸门^[6]。

在 fEPSP 产生过程中,谷氨酸与 NMDA 受体结合并且该受体偶联的 Ca²⁺通道开放,Ca²⁺内流,是 LTP 启动的前提。BDNF 可影响谷氨酸的释放,改变 NMDA 受体活性,调节神经元兴奋性递质发挥作用^[16],影响 fEPSP 形成。虽然 SC 后通过快速应答反应介导 BDNF 表达明显增多,启动保护机制;但是研究发现 SC 后 72 h 内神经元凋亡坏死明显^[8-9],神经元突触功能受损,故综合 SC 后抗损伤与损伤两方面的影响,SC 后 1 d fEPSP 斜率和波幅与正常组比较无明显差别。急性期后神经元凋亡及坏死趋于恢复正常,海马 BDNF 表达明显增加,谷氨酸释放明显增加,突触传递功能恢复,易化 LTP 形成,在 SC 后 7 d 组大鼠海马脑片记录到的 fEPSP 斜率高于正常组,波幅与正常组无差异考虑为刺激导致 PS 形成,影响 fEPSP 幅度。SC 后 14 d 处于潜伏期,继于急性期 BDNF 表达增高保护神经细胞存活,促进神经干细胞迁移并分化为神经细胞,修复神经元缺失;且有学者认为急性期后神经元突触兴奋性逐渐受到抑制性的调节,神经元丢失和苔藓纤维出芽加强抑制神经元功能^[17],有可能出现突触功能抑制,支持本

研究潜伏期 LTP 抑制现象。通过本研究可得知;SC 后急性期 LTP 的增高伴随着 BDNF 表达的增多,潜伏期 LTP 的降低伴随 BDNF 表达较急性期减少。然而 BDNF 具体通过什么通路调解 SC 对大鼠海马突触传递效能动态变化的影响还有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Lado A,Laureta C,Moshe L.Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain[J].Epileptic Disord,2002,4(2):83-97.
- [2] Ben-Ari Y,Holmes GL.Effects of seizures on developmental processes in the immature brain[J].Lancet Neurol,2006,5(12):1055-1063.
- [3] 韩太真.突触可塑性与长时程增强现象的研究进展[J].西安交通大学学报(医学版),2005(4):305-308.
- [4] 许琳,张均田.突触长时程增强形成机制的研究进展[J].生理科学进展,2001(4):298-301.
- [5] 陈玲.长时程增强分子机制的研究进展[J].国际神经病学神经外科学杂志,2006,36(6):537-539.
- [6] Bramham CR,Messaoudi E.BDNF function in adult synaptic plasticity:the synaptic consolidation hypothesis[J].Prog Neurobiol,2005,76(2):99-125.
- [7] Curia G,Longo D,Biagini G,et al.The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy[J].J Neurosci Methods,2008,172(2):143-157.
- [8] 蒋莉,蔡方成,李欣,等.惊厥持续状态中大鼠脑内神经元死亡的年龄特征[J].中华儿科杂志,2002,40(9):545-549.
- [9] 胡越,蒋莉,李欣,等.持续惊厥后影响海马神经元凋亡的相关因素[J].中华神经科杂志,2006,39(1):36-38.
- [10] 胡越,蒋莉,张晓萍.持续惊厥后海马神经营养因子表达及其影响因素[J].第三军医大学学报,2006,28(16):1663-1666.
- [11] Sloviter RS.Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis:the importance of the 'latent period' and other concepts[J].Epilepsia,2008,49(s9):85-92.
- [12] Marcio-de AF,Franco R,Soma C,et al.Exposure to nerve agents:from status epilepticus to neuroinflammation,brain damage,neurogenesis and epilepsy[J].NeuroToxicology,2012,33(6):1476-1490.
- [13] 张玥,蔡国恩,杨茜,等.匹罗卡品癫痫模型恐惧记忆减退的电生理学变化[J].上海交通大学学报(医学版),2009,29(2):135-138.
- [14] Lu Y,Christian K,Lu B.BDNF:a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory[J].Neurobiol Learn Mem,2008,89(3):312-323.
- [15] Lai KO,Wong AS,Cheung MC,et al.TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory[J].Nat Neurosci,2012,15(11):1506-1515.
- [16] Cunha C,Brambilla R,Thomas KL.A simple role for BDNF in learning and memory[J].Front Mol Neurosci,2010,3:1.
- [17] Holopainen IE.Seizures in the developing brain:Cellular and molecular mechanisms of neuronal damage,neurogenesis and cellular reorganization[J].Neurochem Int,2008,52(6):935-947.

(责任编辑:关蕴良)