

神经疾病发病机制研究

DOI: 10.11699/cyxb20130612

癫痫大鼠模型海马组织突触素-1 的表达变化研究

冯亚梅, 毛诗贤

(贵阳医学院附属医院神经内科, 贵阳 550004)

【摘要】目的:探讨杏仁核点燃癫痫发生过程中突触素-1(synaptophysin, SYN-1)在海马表达动态变化。**方法:**建立杏仁核点燃癫痫大鼠模型及左乙拉西坦(levetiracetam, LEV)治疗模型,用 real time-PCR 测定不同时期 SYN 的表达量,并测量免疫反应光密度值。**结果:**SYN-1 见于癫痫 1 周组阳性细胞率最低,表达最少,8 周组表达最高,差异均有统计学意义($P<0.05$),并且 8 周组用药前后比较有统计学差异,大鼠在 14 d 开始出现自发发作。**结论:**SYN-1 与突触形成与重建密切相关,在癫痫组亚组 8 周组表达上调,提示其可能在慢性期参与了癫痫的维持。

【关键词】突触素;海马;癫痫;神经可塑性

【中国图书分类法分类号】R749.1+7

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-05

Changes in expressions of synaptophysin-1 in the hippocampus of rats in amygdala-kindling epilepsy model

FENG Yamei, MAO Shixian

(Department of Neurology, the Affiliated Hospital, Guiyang Medical College)

【Abstract】Objective: To establish the amygdala-kindling epilepsy rat model, to measure the expression of synaptophysin-1 (SYN-1) and to explore the pathogenesis of epilepsy. **Methods:** Totally 140 male Wistar rats were randomly divided into epilepsy group ($n=60$), drug treatment group ($n=60$) and sham operation group ($n=20$). Amygdala-kindling epilepsy model and levetiracetam treatment model were established. Expressions of SYN-1 at different time points were determined by real-time PCR and absorbance of immunoreaction was detected. **Results:** Expression of SYN-1 and positive cell rate was the lowest in epilepsy-one-week group and was the highest in epilepsy-eight-week group, with statistical differences among groups ($P<0.05$). There were statistical difference in epilepsy-eight-week group before and after drug treatment; spontaneous seizure was observed in rats at 14 d after drug treatment. **Conclusions:** SYN-1 is closely related with synaptic formation and reconstruction. Expression of SYN-1 is higher in epilepsy-eight-week group than in sham operation group, suggesting that SYN-1 may be involved in the maintenance of epilepsy at chronic stage.

【Key words】synaptophysin; hippocampus; epilepsy; synaptic plasticity

突触素-1(synaptophysin-1, SYN-1)是一种与突触结构和功能密切相关的钙结合糖蛋白,它广泛存在于机体所有神经末梢且特异地分布在突触前囊泡膜上,并参与 Ca^{2+} 依赖的神经递质的释放和突触囊泡的导入及再循环,被公认为突触前终末的特异性标记物。它的定量及定位可准确地反映突触的功能状态、密度及分布区域,由此反映其可塑性^[1]。由此可知,检测 SYN 的变化即为监测神经系统突触形成及其分布的其中一种方法。本研究利用杏仁核点燃癫痫大鼠模型,研究突触的标记蛋白 SYN-1 在癫痫发生过程中的动态表达变化及使用抗癫痫药物左乙拉西坦(levetiracetam, LEV)之后的变化,探讨癫痫发生中神经可塑性的变化。

作者介绍:冯亚梅, Email: fengyamei555@sina.com,

研究方向:杏仁核点燃癫痫大鼠海马组织的蛋白变化。

通信作者:毛诗贤, Email: maoshixian00@163.com。

基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项基金资助项目[编号:贵州省社合字(2009)39号]。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级 Wistar 健康雄性大鼠 140 只,为贵阳医学院动物中心提供,体质量 210~260 g。分隔喂养,随机抽取 20 只大鼠作为假手术对照组(D组),只安装电极而不刺激。剩余 120 只大鼠随机分为癫痫组(S组)和治疗组(Y组),每组根据实验需求分批进行,根据成功点燃后不同时期将 S 组分为 4 个亚组(S1、S2、S4、S8),每个亚组 15 只。根据胃内灌注 LEV 不同时间对 Y 组分为 4 个亚组(Y1、Y2、Y4、Y8),每个亚组 15 只,其中每个亚组取 5 只做荧光定量 PCR、10 只做免疫组化分析。死亡、电极脱落以及 2 周后无后放电的各组大鼠用同批次大鼠继续点燃后补充替代。

1.2 实验器材

BL-420 型生物多媒体计算机刺激记录系统(四川泰盟计算机公司生产),大鼠脑立体定位仪,电控箱。

1.3 杏仁核点燃 S 组及 Y 组模型的制作

大鼠经 4%水合氯醛(10 ml/kg)腹腔注射麻醉后,固定于大鼠脑立体定位仪上,暴露颅骨及前囟,根据 Paxinos 和 Watson^[2] 大鼠脑立体定位图谱确定大鼠右侧杏仁基地外侧核,在

其颅骨表面投射点钻孔,并固定双极螺旋镍铬电极,术后恢复 1 周开始点燃实验。用 BL-420 型生物多媒体计算机刺激记录系统刺激杏仁核,每日刺激 1 次(刺激参数为:细电流、串刺激、波宽 1 ms,频率:60 Hz,持续时间 1 s,强度 0.450 mA),同时每次电刺激停止后立即观察大鼠癫痫性行为。按 Racine^[9]方法进行分级,完全点燃的标准是连续 3 次获得 IV、V 级的运动惊厥^[9],之后不再给予上述刺激。确定慢性点燃模型成功建立后,取大鼠称重并记录,按 100 mg/(kg·d)计算 LEV 灌注量^[9],灌胃给药,2 次/d,分别连续给药 1、2、4、8 周,即为药物治疗组 Y(Y1、Y2、Y4、Y8),并观察发作后的发作强度。

1.4 实验方法

1.4.1 荧光定量 PCR

1.4.1.1 标本的准备 将各组大鼠用 10%水合氯醛麻醉,断头,剪开皮肤,从椎管纵向剪开颅骨,用组织钳缓慢咬合并逐渐取出表面颅骨,暴露双侧大脑半球,在其底部可见新月形的海马组织,用眼科镊轻轻取出置于锡纸上,并放入-80℃冰箱以留后用。

1.4.1.2 实验步骤 将实验的标本按序排放在管架,依次将各组组织转移至 5 ml 玻璃试管中(100 mg,米粒大小),依次每一管中加入 1 ml Trizol(预冷),电动匀浆器(转速 8 000 r/min)处理 30~45 s。每标本间处理后用酒精[75%乙醇的配置:1 倍的聚碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate,DEPC)处理水加 3 倍的无水乙醇]棉球擦拭,DEPC 处理水清洗。依次将匀浆液转至 1.5 ml EP 管中,各管中加入氯仿 200 μ l,振荡摇匀 15 s。4℃,12 000 r/min,离心 15 min。小心吸出水层加入依次编号的 EP 管中,再加入 2 倍体积的异丙醇(约 600 μ l),混匀,置于-20℃冰箱,30 min。4℃,10 000 r/min,离心 15 min,弃上清留沉淀。用 650 μ l 75%乙醇洗涤沉淀,4℃,8 000 r/min,离心 5 min,弃上清留沉淀,重复上述步骤 2 遍,充分吸尽残留液。打开管盖,干式恒温器 65℃,5~10 min,烘干。20 μ l DEPC 处理水,溶解 RNA,-20℃冰箱,保存,待用。

1.4.2 病理学观察组织

1.4.2.1 标本的准备 利用 10%的水合氯醛腹腔注射将大鼠麻醉后,固定在手术台上,腹部朝上,四肢及门齿分开固定,依次切开皮肤、皮下组织、肋骨,打开胸腔,暴露心脏、肝脏,取灌注针自心尖向右上 45°进针至主动脉起始端,剪破右心耳,快速灌注生理盐水 100~200 ml 后,接着以 4%多聚甲醛 200 ml 灌注,至大鼠四肢强直、肝脏变白后停止灌注,拔出穿刺针。断头取脑后将其置于 4%的多聚甲醛(4℃)中固定 1~2 d,之后行常规石蜡包埋备用。

1.4.2.2 免疫组织化学染色(PV 二步法) 采用 SABC 法(SABC 法免疫组化试剂盒购于武汉博士德生物工程公司)行免疫组化染色,经过贴片、晾干、透明、封片,最后光镜下观察。应用 Biomias2001 图像分析系统对海马进行图像分析,所有切片分析在同一强度、同一放大倍数下进行。得出每个视野阳性神经元的吸光度值。

1.5 统计学处理

通过 SPSS 13.0 软件进行与实验相关的统计学分析,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用配对 *t* 检验法;各亚组间计量资料的分析采用单因素方差分析,方差齐时用 *LSD-t* 法作多重比较。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 结果(SYN-1 在 S 组、Y 组及 D 组的表达)

经荧光定量 PCR 检测溶解,SYN-1 在 Y 组、S 组及 D 组

表达量不同,经统计学分析可知,SYN-1 mRNA 在癫痫发作 1 周后表达量降低($t=15.102, P=0.000$),2 周时开始升高($t=2.761, P=0.059$),8 周组表达量最高与 D 组比较差异有统计学意义($t=64.023, P=0.000$),1 周组与 8 周组之间差异有统计学意义($F=130.864, P=0.000$)。而 Y 组组间升高趋势无明显时间差异性;同时进行相应时间段内 S 组与 Y 组相应时间段配对比较,可知除 2 周组外,1 周组用药前后($t=9.872, P=0.001$)、4 周组用药前后($t=2.892, P=0.026$)、8 周组用药前后($t=16.327, P=0.000$)差异均有统计学意义,见表 1(其中 ΔCt 为内参基因的 Ct 值归一目标基因的 Ct 值, $\Delta\Delta Ct$ 为用校准样本的 ΔCt 值归一试验样本的 ΔCt 值, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 为表达量的比值)。

表 1 SYN-1 在 S 组、Y 组及 D 组的表达比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison on expressions of SYN-1 among S group, Y group and D group ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数(n)	ΔCt	$-\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
S1	5	7.098 $\pm$ 0.142	-1.840 $\pm$ 0.133	0.200 $\pm$ 0.101 ^{abc}
S2	5	5.394 $\pm$ 0.622	-0.305 $\pm$ 0.282	0.443 $\pm$ 0.094
S4	5	5.493 $\pm$ 0.480	-0.032 $\pm$ 0.256	0.525 $\pm$ 0.136 ^b
S8	5	3.934 $\pm$ 0.193	0.122 $\pm$ 0.547	1.475 $\pm$ 0.143 ^{abc}
Y1	5	5.950 $\pm$ 0.186	0.114 $\pm$ 0.382	0.382 $\pm$ 0.042 ^b
Y2	5	6.107 $\pm$ 0.506	-0.603 $\pm$ 0.138	0.323 $\pm$ 0.032
Y4	5	6.070 $\pm$ 0.166	-0.112 $\pm$ 0.318	0.322 $\pm$ 0.022 ^b
Y8	5	6.129 $\pm$ 0.238	0.073 $\pm$ 0.349	0.330 $\pm$ 0.027 ^b
D	10	6.242 $\pm$ 0.204	-1.325 $\pm$ 0.156	0.352 $\pm$ 0.025

注: $P<0.05$,a,各组与 D 组比较;b,与相应时间段比较;c,亚组内部比较

2.2 病理切片结果(SYN-1 免疫组化染色)

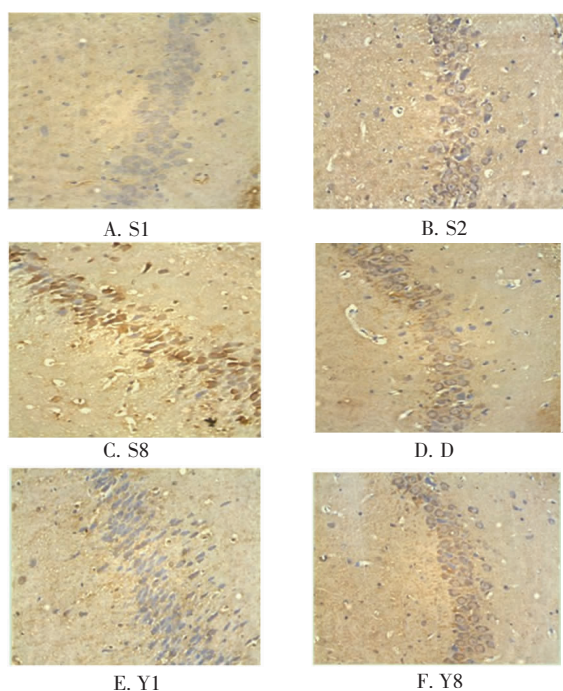
SYN-1 阳性表达为神经元细胞质内出现棕黄色颗粒,在海马结构内呈明显的板层样分布。可见 S 组在 1 周时阳性细胞表达减少($t=7.999, P=0.000$),而 2 周时表达增多,但差异无统计学意义($t=2.291, P=0.056$),至 8 周的时候表达阳性细胞已明显增多,具有统计学意义($t=-8.608, P=0.000$)。而 Y 组则无明显时间差异性,与 D 组比较无统计学意义(t 值分别为 1.131、0.651、1.139、1.954, P 值分别为 0.287、0.531、0.284、0.082);S 组及 Y 组内部亚组单因素方差分析,S 组内部亚组随时间增长、表达增高且差异存在统计学意义;同时进行相应时间段内 S 组与 Y 组阳性细胞量的配对比较,可知 8 周组用药前后比较差异有统计学意义($F=106.368, P=0.000$)。见表 2、图 1。

表 2 S 组、Y 组、D 组海马 SYN-1 免疫染色平均吸光度值($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Mean absorbance values of SYN-1 immunostaining among S group, Y group and D group ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数(n)	SYN-1
S1	10	191.176 $\pm$ 3.559 ^{ac}
S2	10	178.501 $\pm$ 3.562
S4	10	171.396 $\pm$ 5.958 ^a
S8	10	153.744 $\pm$ 5.319 ^{abc}
Y1	10	172.298 $\pm$ 4.490
Y2	10	176.058 $\pm$ 6.091
Y4	10	172.344 $\pm$ 5.120
Y8	10	170.188 $\pm$ 4.936 ^b
D	10	174.290 $\pm$ 4.863

注: $P<0.05$,a,各组与 D 组比较;b,与相应时间段比较;c,亚组内部比较



选取海马 CA3 区彩图,图 A 为 S 组 SYN-1 在 1 周时棕黄色颗粒阳性细胞表达减少;图 B 示 2 周时表达稍增多;图 C 即 8 周的时候表达棕黄色颗粒细胞已明显增多;图 D 示 D 组;图 E 示 Y 组 1 周与 S 组 1 周无明显差别;图 F 示 Y 组 8 周与 D 组无明显差别

图 1 SYN-1 免疫组化染色图 (400 ×)

Fig.1 SYN-1 immunohistochemical staining (400 ×)

3 讨论

突触是神经功能活动并能够传递信息的结构基础,只要有功能的神经元间的信息传递,就必须要有成熟的突触结构,所以了解突触形成、传递、重塑的相关机制,对研究癫痫的发生发展及治疗有着重大的意义。癫痫发生时海马部位发现的苔藓纤维异常出芽及伴随的突触重建被认为是其机制之一^[6-7],国内外学者研究证明许多因素可以促进突触的形成,突触的研究也越来越受到学者们的关注。

SYN-1 是一种与突触结构和功能密切相关的膜蛋白,与神经系统突触重建密切相关,近年来广泛用于癫痫患者及癫痫动物模型的研究以判断其突触重建情况。SYN 1 可以作为突触可塑性研究的重要指标,可用来检测突触的密度和分布。海马内苔藓纤维出芽导致的突触重建是癫痫病理生理过程中的一个重要变化,它对癫痫的发生具有重要的意义。本实验的癫痫组模型 SYN-1 mRNA 表达量在 1 周时明显减少,免疫组化染色阳性细胞率明显降低,并且与 D 组有统计学差异,表明在重复电刺激过程中,可能产生了对海马突触前膜囊泡数量及功能的损害,此时突触传递活动减弱,神经递质合成释放也减少。由此可知,癫痫点燃过程中,可能对突触数目及

功能造成了极大的损伤,因此也导致 SYN-1 表达的明显减少;而 2 周后 SYN-1 表达量开始上调,但没有统计学意义,说明此时由于神经轴突的再生,齿状回内分子层开始出现苔藓纤维出芽,并形成了新的兴奋性传导环路,这也是导致癫痫反复自发性发作的原因。而 8 周以后,SYN-1 表达量大幅增加,且与 D 组比较有明显差异,提示癫痫的维持和加重可能与 SYN-1 的表达增高有关,在癫痫早期,突触间正常传递活动的破坏及神经元的损伤和脱失,均可能为慢性期苔藓纤维出芽及其伴随的突触重建奠定功能和结构上的基础,由此推测:在癫痫后期,新的轴突侧支及新突触形成引起了突触前终末 SYN-1 表达的增加。而治疗组通过胃内灌注 LEV,不同时间段内 SYN-1 表达未见明显差异,但 8 周组用药后存在的表达明显减少,表明 LEV 通过与突触泡蛋白 2A 的结合导致突触囊泡数量减少,导致突触传递活动减弱、神经递质释放减少,在一定程度上可以减少癫痫发生过程中对突触数目及功能的损伤,由此导致 SYN-1 表达减少并使 LEV 达到其治疗作用。

SYN-1 在 S8 周组 mRNA 表达量及免疫染色阳性细胞率最高,而 S1 周组表达量最低,药物治疗组无明显时间差异性,S8 周组用药前后比较有统计学差异,SYN-1 可能在慢性期参与了突触的形成,并与癫痫发作的维持有关。

参考文献

- [1] Pereno G L, Beltramino C A. Timed changes of synaptic zinc, synaptophysin and MAP2 in medial extended amygdala of epileptic animals are suggestive of reactive neuroplasticity[J]. Brain Res, 2010, 1328: 130-138.
- [2] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. 2nd ed. Australia Academic Press, 1986.
- [3] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. motor seizure[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32 (3): 281-294.
- [4] Cross D J, Cavazos J E. Synaptic reorganization in subiculum and CA3 after early-life status epilepticus in the kainic acid rat model[J]. Epilepsy Res, 2007, 73(2): 156-165.
- [5] 程敏, 黄志, 李思秀. 左乙拉西坦, 丙戊酸钠, 苯巴比妥对大鼠热惊厥的预防效果[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(7): 573-575.
- [6] Cheng M, Huang Z, Li S X. Prophylactic efficacy of levetiracetam, valproate or phenobarbital on febrile convulsions in rats[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2010, 12(7): 573-575.
- [7] 张明磊, 杨金升. 突触素与癫痫[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2010, 13(2): 75-77.
- [8] Zhang M L, Yang J S. Synaptophysin and epilepsy[J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2010, 13(2): 75-77.
- [9] Liu Q Z, Wang F, Mu Q C, et al. Expressions of GAP43, P38 mRNA and protein in insular electrical kindled rats and its significance[J]. Chinese Medical Journal, 2010, 90(19): 1348-1352.

(责任编辑: 冉明会)