惊厥后大鼠海马神经再生与凋亡的动态变化

李 听 松 郭 艺 蒋 莉 * 张 晓 萍 何 志 慧 (重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

摘要 探讨惊厥持续状态(status convulsion, SC)后大鼠海马神经再生与凋亡的动态变化。 建立成年Wistar 鼠 30 min SC 模型,在 SC 后 1 天至 56 天的 6 个时间点上处死动物,处死前 1 天均腹腔注射 5-溴 2-脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU);采用免疫组织化学方法动态检测 BrdU、nestin 的表达,确定神经干细胞增殖水平;双重荧光染色标记 nestin/TUNEL,确定新生神 经干细胞存活时间。与对照组相比, BrdU 阳性细胞数目于 SC 后第 7 天在 CA1 区达增殖高峰, 28 天降至正常水平;于 SC 后第 28 天在齿状回达增殖高峰, 56 天降至正常水平;在 SC 后第 7 天, CA3 区有大量的 BrdU 阳性细胞; BrdU 和 nestin 阳性细胞数目无统计学差异。在 SC 后的前 3 天, CA1 区 新增殖的神经细胞呈 TUNEL 阳性;齿状回新增殖细胞始终表现 TUNEL 阴性。上述结果提示: SC 后能激活自体神经干细胞原位增殖,并且部分新生细胞向损伤区域迁移。

关键词 惊厥持续状态;成体神经干细胞;增殖;凋亡

研究表明包括人在内的成年哺乳动物中,其中枢 神经系统的某些部位存在神经干细胞,在一定生理和 病理条件下神经干细胞可以增殖,并且分化成神经元 和胶质细胞¹¹,显示了中枢神经系统具有自我修复的 潜能。长时程惊厥发作可以导致以选择性海马神经 元死亡为特征的惊厥性脑损伤,产生癫痫、智力低 下等神经系统后遗症。研究惊厥持续状态(status convulsion, SC)后体内神经干细胞再生特点,对实现惊 厥性脑损伤的内源性修复具有重要的意义。因此, 我们用成年 Wistar 大鼠制作 SC 动物模型,探索惊厥 后海马神经干细胞增殖反应、神经再生与新生细胞 凋亡的动态变化特点,初步探讨成体神经干细胞在SC 后机体自我修复中的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 SC 动物模型制备与分组

健康成年 Wistar 大鼠 56 只(重庆医科大学实验 动物中心提供), 年龄 2~3 月, 体重 160~250 g, 雌雄不 限。其中 48 只参照本组前期实验^[2]采用氯化锂 - 匹 罗卡品(lithium-pilocarpine) (Sigma 公司)诱发 SC 模 型。每只大鼠经腹腔注射 3 mEq/kg 氯化锂, 18~20 h 后再经腹腔注射 50 mg/kg 匹罗卡品, 若 30 min 内无 惊厥发作.再按每次 10 mg/kg 追加匹罗卡品, 两次 注射匹罗卡品后, 仍无惊厥发作, 则该动物被剔除实 验组。在大鼠惊厥发作 15 min 后, 腹腔注射 1 mg/kg 阿托品(上海禾丰制药有限公司)。在惊厥发作30 min后,腹腔注射300 mg/kg水合氯醛(上海禾丰制药 有限公司)止惊,分别于30 min SC后1天、3天、 7天、14天、28天及56天处死动物,每组8只。 另外8只设实验对照组(腹腔注射阿托品和水合氯 醛),动物断头取脑,即行快速冰冻切片。

1.2 BrdU标记

所有实验动物在 SC 后 0 天、2 天、6 天、13 天、27 天、55 天给予腹腔注射 5- 溴脱氧尿苷嘧啶 (5-bromo-2 -deoxyuridine, BrdU) (Sigma 公司), 共 4 次, 每 2 h 一次, 每次 50 mg/kg, 最后一次 24 h 后处死 动物。

1.3 组织染色

将脑组织从视交叉后 2 mm 至侧脑室后角行连 续冠状冰冻切片,包括皮质、海马、侧脑室下区等, 每两张切片间隔 50 μm,切片厚度 7 μm。

1.3.1 BrdU 免疫组化染色 0.3% 过氧化氢处理
30 min, 消除内源性过氧化酶活性; 2 mol/L HCl, 37℃,
45 min, DNA 变性; 5%BSA, 室温温育 30 min; 加小
鼠抗 BrdU 单克隆抗体(1:500) (Sigma 公司), 4℃,
过夜; 兔抗小鼠生物素化 IgG, 室温 1 h; 链酶亲和素 -

收稿日期: 2006-10-10 接受日期: 2007-01-25

国家自然科学基金(No.30672217)和重庆市教委科研基金(No. 200307)资助项目

^{*}通讯作者。 Tel: 023-63624424, E-mail: dr_jiangli@126.com

生物素-过氧化酶复合物(SABC),室温,1h;以上每 一步骤后,均进行磷酸盐缓冲液冲洗3次,每次5 min; DAB 显色,显微镜下重点观察海马结构。二抗试剂 盒和 DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物公司。 1.3.2 Nestin免疫组化染色 基本步骤同3.2, HCl 变性一步除外,山羊抗大鼠 nestin 多克隆抗体(1: 300)购自 Santa Cruz 公司。

1.3.3 双重荧光染色标记nestin/TUNEL 5%正常 山羊封闭血清,室温温育30 min;加山羊抗大鼠 nestin 多克隆抗体(1:300)(Santa Cruz 公司),4 ℃,过夜; 兔抗山羊生物素化 IgG,室温1h; SABC-Cy3(武汉博 士德公司),室温1h; 0.1%Triton X-100/0.1% 枸橼酸, 4 ℃, 2 min; TUNEL反应液(Roche公司), 37℃, 60 min; 每一步骤后,均进行磷酸盐缓冲液冲洗3次,每次5 min。荧光显微镜下重点观察海马结构。

1.4 图像处理

每个样本自视交叉后 2 mm 处开始, 依次选取 4 张切片, 显微镜摄像, 运用 Image-Pro Plus 5.1 图像处 理软件进行分析, 计数海马结构中 BrdU 和 nestin 阳 性细胞数目。

1.5 统计学处理

实验数据用均数±标准差(xxs)表示,应用

SPSS13.0 进行统计学分析。对齿状回区增殖细胞数 目进行对数变换, 然后做方差分析和两两比较 (Scheffe 法);对CA1、CA3区细胞数目用秩和检验 进行比较。以P<0.05认为有统计学意义。

2 结果

2.1 SC 后不同时间点海马内 BrdU 与 nestin 阳性 细胞数目动态变化

在正常成年大鼠海马结构中,只有齿状回的颗粒 细胞下层(SGZ)存在少量 BrdU 阳性细胞,排列稀疏, 胞核染色浅,CA1区和CA3区未见BrdU阳性细胞;SC 后齿状回的 BrdU 阳性细胞数目呈持续增加趋势(表 1,图1、图2),在SC 后第28天达增殖高峰,56天 降至正常水平;SC 后除齿状回 BrdU 阳性细胞显著增 高外,CA1 区及 CA3 区出现 BrdU 阳性细胞显著增 高外,CA1 区及 CA3 区出现 BrdU 阳性细胞。SC 后 3天,CA1 区 BrdU 阳性细胞明显增多,于第7天达到 高峰,第28天消失;在SC 后第7天,CA3 区可见大 量 BrdU 阳性细胞,胞核呈三角形、椭圆形,染色较 深;nestin 动态变化情况同 BrdU 类似,阳性部位主要 在胞浆,呈团块状(表1,图3);BrdU 和 nestin 两者阳 性细胞在 SC 后同一时间点的相同脑区,其增殖数量 无统计学差异。





(B)

(C)



图 1 30 min SC 后 7 天海马区 BrdU 免疫组化阳性细胞分布 A: BrdU*细胞主要分布于 CA1 区和 CA3 区, 40 ×; B: CA1 区 BrdU*细胞, 200 ×(右下角, 400 ×); C: CA3 区 BrdU*细胞, 400 ×。



图 2 30 min SC 后 28 天海马区 BrdU 免疫组化阳性细胞分布 A: BrdU*细胞主要分布于齿状回, 40 ×; B: 齿状回 BrdU*细胞, 200 ×(右下角, 400 ×)。

SC 后不	样本量	齿状回		CA1		CA3	
同时间点	<i>(n)</i>	BrdU	Nestin	BrdU	Nestin	BrdU	Nestin
对照	8	9.5 ± 3.0	8.7 ± 4.1	0	0	0	0
1天	8	$19.7 \pm 5.5*$	$16.2 \pm 3.2^{*}$	$122.8 \pm 18.3*$	$114.3 \pm 15.9^{*}$	0	0
3 天	8	$18.8 \pm 3.6*$	$18.1 \pm 3.4^{*}$	$190.2 \pm 42.6*$	$171.1 \pm 23.1^{*}$	0	0
7 天	5	$18.4 \pm 4.3*$	$15.8 \pm 4.4^{*}$	$556.2 \pm 57.3*$	$556.8 \pm 53.1^{*}$	$70.4\pm20.2*$	$63.4 \pm 18.6^{\textit{*}}$
14 天	5	$24.4 \pm 7.6*$	$21.6\pm8.1^{\#}$	$213.8\pm86.3*$	213.7 ± 73.9*	$10.5\pm6.3*$	$9.3 \pm 5.2^{*}$
28 天	5	$182.8 \pm 24.2*$	$185.8 \pm 21.3^{*}$	0	0	0	0
56天	8	10.5 ± 4.2	9.2 ± 3.9	0	0	0	0

表1 SC 后海马内不同区域 BrdU 与 nestin 阳性细胞数目动态变化

①7天、14天、28天组大鼠在SC后3~5天内,各有3只死亡,退出实验过程。②BrdU数目与正常对照组比较,*P<0.05; nestin数目与正常组比较,*P<0.05。



图 3 30 min SC 后 7 天和 28 天海马区 nestin 免疫组化阳性细胞分布

A: 30 min SC 后 7 天 CA1 区 nestin* 细胞, 100 ×; B: 30 min SC 后 7 天 CA1 区 nestin* 细胞, 400 ×; C: 30 min SC 后 28 天齿状回 nestin* 细胞, 100 ×; D: 30 min SC 后 28 天齿状回 nestin* 细胞, 400 ×。



图 4 30 min SC 后 3 天, 增殖神经干细胞的凋亡情况 30 min SC 后, CA1 区 nestin*细胞第 3 天明显增多, 但大多为凋亡细胞, 200 ×。



图 5 30 min SC 后 7 天, 增殖神经干细胞的凋亡情况 30 min SC 后, CA1 区 nestin⁺ 细胞第 7 天明显增多, 但大多为非凋亡细胞 200 ×。

2.2 增殖细胞的 TUNEL 染色结果

在 SC 后的第1和3天, CA1 区的 nestin 阳性细胞绝大多数表现为 TUNEL 阳性;而在第7天,表现为 TUNEL 阴性, CA3 区亦表现为 TUNEL 阴性;整个观察时段,齿状回的 nestin 阳性细胞始终为 TUNEL 阴性(图4、图5)。

3 讨论

研究表明 SC 可导致以选择性海马 CA1、CA3 区神经元死亡为主的惊厥性脑损伤,如何积极有效地 促进 SC 后神经结构与功能的恢复已成为目前神经病 学和康复医学研究的一个热点。鉴于成年动物在应 激性刺激后,存在脑内神经干细胞的增殖反应,本实 验以成年 Wistar 鼠为对象,在 SC 后不同时点动态观 察内源性 NSC 在海马神经再生与新生细胞凋亡的变 化,初步探讨内源性神经干细胞在 SC 后脑损伤自我 修复中的潜在作用。

BrdU 是胸腺嘧啶类似物,能在细胞周期的 S 期 掺入DNA 合成, BrdU 阳性细胞被认为是具有增殖活 性的细胞,而非发生 DNA 损伤的成熟神经细胞^[3]; nestin 是神经上皮前体细胞中的一种中间丝蛋白,在 神经干细胞早期中呈一过性表达后,以一种渐进性下 调方式在分化细胞中表达逐渐减少,可作为神经干细 胞标记蛋白。本实验中,我们采用 BrdU、nestin 染 色联合标记增殖细胞,结果发现在 SC 后1 天开始在 海马不同脑区,有 BrdU 和 nestin 阳性细胞的显著性 增加,提示 SC 后海马存在明显的细胞增殖反应;同 时, BrdU和 nestin 阳性细胞的分布具有相似性, 进一 步对 BrdU 和 nestin 阳性细胞定量分析,结果提示在 SC 后的相同时点上,实验大鼠海马结构中同一区域 内 BrdU 和 nestin 阳性细胞数目在统计学上无显著性 差异,因此推测在本试验中BrdU阳性细胞可能为SC 后增殖的神经干细胞。

不少研究表明,成年啮齿类动物的主要神经再生 区是侧脑室下区(subventricular zone, SVZ)和齿状回 颗粒细胞下层(subgranular zone, SGZ)^[1]。与文献报 道相似,我们在正常成年大鼠海马结构中也仅在齿状 回 SGZ 发现少量神经干细胞,在CA1和CA3区未见 此类细胞。然而,SC 后除齿状回 SGZ 区神经干细胞 呈持续增加趋势,于第28天达到增殖高峰外,SC 后 第7天在CA1区和CA3区亦出现大量的神经干细胞。 如上所述,海马CA1和CA3区是惊厥性脑损伤敏感 区域,SC将导致以CA1和CA3区神经元凋亡为主的 脑损伤⁽⁴⁾,本研究表明SC后伴随着神经元的死亡,在 惊厥性脑损伤敏感区内确实存在神经细胞自我修复 的潜能;鉴于海马CA1、CA3区不是主要的神经再 生区,本组SC后海马CA1、CA3区内的神经干细胞 应该系其他部位迁移而来,提示SC后神经干细胞具 有向病损部位迁移的趋势。目前,神经干细胞具体 的迁移过程和相关的分子机制尚不清楚。由于SVZ 和CA1区解剖位置临近,大多数学者认为CA1区神 经干细胞来源于SVZ这一神经再生区^[5-7],我们也发 现SC后SVZ有BrdU阳性细胞表达;亦有学者却认为 CA3区的新生神经细胞来源于SGZ^[8]。

增殖神经干细胞的存活状态是实现脑损伤自身 修复的重要条件。本实验结合 nestin 和 TUNEL 染色, 进一步动态观察 SC 后增殖神经干细胞的存活状态, 结果发现, SC 后 CA1、CA3 区绝大多数呈现 TUNEL 阳性, 至 SC 后 7 天, nestin 阳性细胞则为 TUNEL 阴 性, 提示 SC 后增殖的神经干细胞存在凋亡的动态变 化, 其原因尚不清楚, 结合本课题组前期发现, SC 后 第1天是脑损伤最敏感时期, 是 CA1、CA3 区锥体 细胞发生凋亡的高峰期^[4], 推测 SC 后早期增殖细胞 的凋亡与周围环境密切相关, SC 后神经再生区所处 微环境的病理改变可能决定早期增殖的新生细胞是 否存活^[9]。

本研究表明, SC 发作在一定的时间窗内能明显 激活自体神经干细胞原位增殖,并且部分向脑损伤敏 感区域迁移, 自体神经干细胞参与了 SC 后的病理生 理过程。然而, 新生神经干细胞是否可能替补修复 死亡的神经元, 重建损伤区域脑组织结构与功能, 实 现惊厥性脑损伤的内源性修复作用尚不明确, 有待更 深入研究。

参考文献 (References)

- [1] Abrous DN et al. Physiol Rev, 2005, 85: 523
- [2] 胡 越等。儿科药学杂志, 2003, 9:5
- [3] Bauer S et al. J Cell Biol, 2005, 171: 641
- [4] 胡 越等。中华神经科杂志, 2006, **39**: 36
- [5] Nakatomi H et al. Cell, 2002, 110: 429
- [6] Bendel O et al. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25: 1586
- [7] Parent JM et al. Hippocampus, 2006, 16: 321
- [8] Dong H et al. J Neurosci, 2003, 23: 1742
- [9] Ekdahl CT et al. Neurobiol Dis, 2003, 14: 513

Proliferation and Apoptosis of Adult Neural Stem Cell after Status Convulsion in the Adult Rat Hippocampus

Ting-Song Li, Yi Guo, Li Jiang*, Xiao-Ping Zhang, Zhi-Hui He

(Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract The objective of this research is to explore the proliferation and apoptosis of adult neural stem cell after status convulsion (SC) in the adult rat hippocampus. Seizures were induced in adult Wistar rats injected with lithium and pilocarpine intraperitoneally and controlled 30 minutes later. Rats were sacrificed at 6 time points (1, 3, 7, 14, 28, 56 days) after SC. Each rat was injected with bromodeoxyuridine (BrdU) intraperitoneally 1 day before killed. The expression of BrdU and neuroepthelial stem cell protein (nestin) were determined by immunohistochemistry to mark the proliferation of adult neural stem cell. Double-label immunofluorescence of nestin and in situ terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) were used to assess the survival of newly generated progenitor cells. In the normal hippocampus formation, only a small amount of BrdU⁺ and nestin⁺ cells were found in dentate gyrus, not CA1 and CA3 region. One day after SC, the amount of BrdU positive cells began to increase in the CA1 region and dentate gyrus, the former peaked 7 days, began to decrease 14 days after, and reached normal 28 days after, while the latter increased up to 20-fold 14 days after and reached normal at 56 days after SC. A large amount of BrdU positive cells were observed in CA3 region at 7 days following SC. The number of BrdU and nestin positive cells of the same region at the same time point had no statistical significance. TUNEL-positive nuclei were observed in almost all of the nestin positive cells in CA1 region within the first 3 days after SC, but didn't exist in dentate gyrus during the whole experiment process. Taken together, we can purpose that SC stimulates the proliferation of inherent neural stem cells within a certain time window, and part of the newly generated cells appear to migrate from proliferation area into the in juried area.

Key words status convulsion; adult neural stem cell; proliferation; apoptosis

Received: October 10, 2006 Accepted: January 25, 2007

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No.30672217) and Educational Commission of Chongqing (No.200307)

^{*}Corresponding author. Tel: 86-23-63624424, E-mail: dr_jiangli@126.com