

惊厥持续时间对惊厥后海马神经元凋亡及其对早期事件变化的影响

郭艺 蒋莉 苑爱云 胡越 李欣

【摘要】 目的 观察持续惊厥(SC)后大鼠海马神经元凋亡及线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)、细胞色素 C(cyt C)含量变化及惊厥持续时间对上述指标的影响。**方法** 采用氯化锂-匹罗卡品法诱发幼年 Wistar 大鼠 SC 发作,分别制备惊厥持续发作 30 min 和 3 h 的 SC 模型。于 SC 30 min 后 3、6 和 12 h 及 1 d, SC 3 h 后 3 h、6 h 及 1 d 时,采用流式细胞仪检测海马神经元凋亡及线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量的变化,比较惊厥持续时间与三者的相关性。**结果** SC 30 min 后凋亡细胞及线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量分别较正常对照组显著改变,6 h 时线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量变化达峰值,凋亡则于 12 h 时达峰值。SC 3 h 后凋亡细胞及线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量均显著高于 SC 30 min 后相同观察时间点。经偏相关参数分析,不同惊厥持续时间与海马神经元凋亡及线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量变化均呈正相关(P 均 < 0.05)。**结论** 严重惊厥可引起大鼠海马神经元凋亡及线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量的变化;惊厥持续时间越长,凋亡及其凋亡早期事件的变化越明显。

【关键词】 惊厥; 神经元; 凋亡; 线粒体膜电位; 细胞色素 C

Effect of duration of convulsion state on neuronal apoptosis and early apoptotic events in hippocampus of rats
GUO Yi, JIANG Li, YUAN Ai-yun, HU Yue, LI Xin. Department of Neurology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China

Corresponding author: JIANG Li (Email: dr_jiangli@126.com)

【Abstract】 Objective To explore the influence of duration of convulsion state (SC) on neuronal apoptosis, mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and cytochrome C (cyt C) release in hippocampus in Wistar rats after SC. **Methods** SC lasting for 30 minutes or 3 hours was induced by intraperitoneal injection of lithium chloride and pilocarpine. Rats were sacrificed at 3, 6, 12 hours and on 1 day after 30 minutes SC and at 3, 6 hours and on 1 day after 3 hours SC. The apoptosis, mitochondrial $\Delta\psi_m$ and intracellular cyt C were determined with flow cytometry, and the correlation with SC duration was compared. **Results** The proportion of apoptotic cells, the decrease in mitochondrial $\Delta\psi_m$ and the release of intracellular cyt C significantly changed at 30 minutes after SC. The peak level of apoptosis was seen at 12 th hour after SC and that of mitochondrial peaked at 6 th hour after SC in apoptosis and the two early apoptotic events, respectively. Compared with the same time point after 30 minutes SC, the levels of apoptosis and the two early apoptotic events after 3 hours SC were much higher. The neuronal apoptosis and the two early apoptotic events in hippocampus after SC showed positive correlation with the duration of SC in partial correlation analysis (all $P < 0.05$). **Conclusion** Severe seizure could induce the changes in neuronal apoptosis and the early apoptotic events in hippocampus after SC. The longer the duration of SC is, the more serious change in apoptosis and early apoptotic events are.

【Key words】 status convulsion; neuron; apoptosis; mitochondrial membrane potential; cytochrome C

小儿时期易有长时程惊厥及持续惊厥(SC)发作,本组前期实验^[1]及国内外的研究^[2,3]均证明,年龄与惊厥后神经元凋亡呈正相关,未成熟脑内存在主动抑制神经细胞凋亡的保护机制。但是,惊厥持续时间是否对惊厥性脑损伤具有影响,目前尚存在争议。本研究以幼年 Wistar 大鼠为观察对象,在 SC 后

海马神经元凋亡及调控凋亡的上游环节,探讨惊厥持续时间对惊厥性脑损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组: 20 日龄健康 Wistar 大鼠(相当于人类婴儿期)72 只(重庆医科大学实验动物中心提供)。其中 56 只用于制备 SC 模型,于终止 SC 后不同时间点处死($n=8$)。另设正常对照组和实验对照组(仅腹腔注射阿托品+水合氯醛),每组 8 只。

1.2 SC 模型制备: 参照我们前期实验采用的氯化锂-匹罗卡品(lithium - pilocarpine, Sigma 公司)诱发 SC 模型^[4]。大鼠惊厥发作 15 min 后,腹腔注射阿

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271382)

作者单位:400014 重庆医科大学附属儿童医院神经内科

通讯作者:蒋莉(Email:dr_jiangli@126.com)

作者简介:郭艺(1979-),女(汉族),四川省人,博士研究生,研究方向为小儿神经病学(Email:yig0274@yahoo.com.cn)。

托品(1 mg/kg);分别在惊厥发作 30 min 和 3 h 时,腹腔注射水合氯醛(400 mg/kg)止惊。于 SC 30 min 后 3、6 和 12 h 及 1 d, SC 3 h 后 3 h、6 h 及 1 d 断头取脑,迅速分离海马组织,用流式细胞仪检测。

1.3 细胞凋亡的动态观测:将分离出的海马组织用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,去除附带血管及结缔组织,用机械法制备单细胞悬液;0.01 mol/L PBS 洗沉淀 2 次,用 100 μ l 反应缓冲液(将试剂盒中的结合缓冲液稀释 10 倍)重悬细胞,调节细胞浓度为 1×10^6 /L。分别加入 5 μ l 钙结合蛋白 V (Annexin-V)和碘化丙啶(PI),室温避光孵育 20 min 后加入 300 μ l 反应缓冲液,上机于 SC 30 min 后 3 h、12 h 及 1 d, SC 3 h 后 3 h 及 1 d 测定早期凋亡细胞在总细胞数中的百分比。

1.4 凋亡传导途径中细胞凋亡早期事件检测:鉴于凋亡早期事件的发生早于凋亡,故选择 SC 30 min 后 3 h、6 h 及 1 d, SC 3 h 后 3 h 及 6 h 进行检测。

1.4.1 SC 后海马神经元线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)的测定:制备海马单细胞悬液,细胞浓度为 1×10^6 /L,悬液中加入 JC-1 工作液,使其终浓度为 5 mg/L,室温避光孵育 30 min,上机计数 1×10^4 个细胞,激发波长为 488 nm,并使用电子补偿纠正绿色荧光和红色荧光的重叠部分。

1.4.2 SC 后海马细胞色素 C(cyt C)含量测定:制备浓度 1×10^6 /L 海马单细胞悬液。2 500 r/min (离心半径 10 cm)离心 5 min,弃上清后加入体积分数为 4%的多聚甲醛 1 ml,4 $^{\circ}$ C 固定 30 min,离心,沉淀中加入 1 ml 质量分数为 0.2%的皂素重悬细胞,4 $^{\circ}$ C 透膜 15 min,离心,弃上清液后将细胞平均分两管,分别加入异硫氰酸荧光素(FITC)-cyt C 抗体及其同型对照(eBioscience 公司),抗体浓度维持于 0.5 mg/L,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,离心后 PBS 洗 2 次,上机计数 1×10^4 个细胞,激发波长 488 nm。

1.5 统计学处理:采用 SPSS12.0 统计学软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数间比较用 t 检验,两变量间关系用偏相关参数分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海马神经元早期凋亡动态变化比较(表 1):与正常对照组比较,实验组 SC 30 min 后 3 h 海马细胞凋亡数显著增加,12 h 达高峰,1 d 后有回落趋势。而将 SC 持续时间延长至 3 h,SC 后 3 h、1 d 海马细胞凋亡数目均高于 SC 30 min 后同时间点值,以 SC 后 1 d 增加更为显著。

表 1 SC 持续 30 min 及 3 h 后大鼠海马凋亡神经元及线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量的动态变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Dynamic change of hippocampal apoptotic neurons and mitochondrial $\Delta\psi_m$ and intracellular cyt C in rats after 30 minutes and 3 hours SC($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	凋亡细胞数	线粒体 $\Delta\psi_m$	cyt C
正常对照组	0.13 $\pm$ 0.06	8.71 $\pm$ 0.99	18.87 $\pm$ 0.43
实验对照组	0.14 $\pm$ 0.04	8.62 $\pm$ 1.02	18.92 $\pm$ 2.25
实验组 SC 30 min 后 3 h	0.55 $\pm$ 0.21*	7.46 $\pm$ 0.27**	20.72 $\pm$ 0.80*
6 h		6.08 $\pm$ 0.43**	32.47 $\pm$ 6.28**
12 h	0.67 $\pm$ 0.18*		
1 d	0.44 $\pm$ 0.17*	7.71 $\pm$ 1.21*	21.43 $\pm$ 2.35
SC 3 h 后 3 h	0.63 $\pm$ 0.04*	6.27 $\pm$ 0.76***	23.94 $\pm$ 0.85**
6 h		5.48 $\pm$ 0.26***	35.75 $\pm$ 3.93**
1 d	1.81 $\pm$ 0.09**		

注:与正常对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 SC 30 min 后同时间点比较:*** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

2.2 海马神经元凋亡早期事件变化比较(表 1):SC 30 min 后 3 h,实验组大鼠海马神经元线粒体 $\Delta\psi_m$ 显著降低,6 h 达低谷,1 d 已迅速回升;细胞内 cyt C 含量在 SC 后显著增加,与线粒体 $\Delta\psi_m$ 有相似的变化趋势。SC 持续时间延长至 3 h 后,各时间点线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量较 SC 30 min 后相应时间点比较差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 海马神经元早期凋亡数、凋亡早期事件与惊厥时间的比较:大鼠海马神经元早期凋亡的发生与线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量变化的发生具有时序性,SC 30 min 后 6 h 大鼠线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量出现显著变化,海马神经元凋亡则于 SC 后 12 h 达峰值;SC 持续时间与细胞凋亡发生呈显著正相关($r=0.663$, $P < 0.01$);在线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 含量变化最早及达峰值时间点(SC 后 3 h 和 6 h)时,线粒体 $\Delta\psi_m$ 降低程度、cyt C 含量升高程度均与 SC 持续时间呈正相关,相关系数分别为 0.71 及 0.66(P 均 < 0.05)。

3 讨论

本组采用流式细胞仪检测证实惊厥发作可以诱导海马神经元凋亡,与国内外相关报道一致。进一步比较不同惊厥时程对凋亡的影响,结果显示,SC 后海马神经元凋亡与惊厥时程呈明显正相关,与 Mikati^[5]的研究结果一致。然而,由于实际工作中无法对人脑进行病理检查,惊厥时程是否对脑损伤具有影响目前尚存争议。部分研究者认为 SC 患儿的预后与病因密切相关,而与惊厥持续时间无显著相关性^[6];但 Maegaki 等^[7]却发现惊厥发作持续时间对预后具有重要影响,SC 2 h 以上者预后不佳。为此,我们进一步在凋亡发生早期事件环节上,研究惊厥

时程对凋亡发生的影响。

细胞凋亡是多种病理生理刺激所诱发的程序性细胞死亡。包括神经元在内的多种细胞,是否发生凋亡受其上游多个环节的影响。其中,线粒体 $\Delta\psi_m$ 降低及 cyt C 释放被认为是最重要的环节^[8]。线粒体 $\Delta\psi_m$ 是存在于生物膜两侧的电位差,线粒体 $\Delta\psi_m$ 降低将导致线粒体通透性转变孔道(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)开放,核通透性增加,线粒体基质中的离子、某些蛋白质释放出来,内膜两侧离子梯度消失,形成恶性循环,导致线粒体 $\Delta\psi_m$ 进一步下降直至完全崩解。MPTP 开放和线粒体外膜破裂后,线粒体膜间隙促凋亡因子 cyt C 释放至胞质,在凋亡促进基因的作用下,促使天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)复合体的装配形成,进一步激活 caspase-3,启动 caspase 级联反应,从而不可避免地发生细胞凋亡^[9,10]。因此,线粒体 $\Delta\psi_m$ 降低和 cyt C 释放被认为是细胞凋亡的早期事件。本研究结果显示,SC 后不仅存在神经细胞凋亡,而且同时存在海马神经细胞线粒体 $\Delta\psi_m$ 降低, cyt C 含量增加,从而在细胞凋亡及其早期环节上均证实 SC 后可导致脑损伤。同时,本组实验中凋亡发生与线粒体 $\Delta\psi_m$ 、cyt C 变化所呈现的时序性特点,进一步提示早期调控凋亡早期事件对减少凋亡的发生,最终减轻脑损伤程度具有重要临床意义。

针对有关惊厥时程与脑损伤关系的争议,本实验将 SC 发作延长至 3 h。结果发现 SC 3 h 后,除海马神经元凋亡显著高于 SC 30 min 后同时间点外,神经细胞线粒体 $\Delta\psi_m$ 明显低于 SC 30 min 后同时间点, cyt C 含量变化也有类似趋势。提示惊厥持续时间越长,海马神经元凋亡早期事件变化越明显,从

而在细胞凋亡及其上游水平进一步证实惊厥持续时间与脑损伤存在明显的相关性。有动物实验也证实惊厥持续 20~40 min 即可出现神经元损伤,若超过 60 min 脑内神经元便开始死亡。因此,及早终止 SC 发作,对减少神经元丢失,防止疾病进一步恶化,改善预后具有重要的临床意义。

参考文献:

- 1 蒋莉,蔡方成,张晓萍.大鼠不同成熟期大脑对持续惊厥的耐受性[J].中华儿科杂志,2002,40(7):429-433.
- 2 Setkowicz Z, Janeczko K. Long-term changes in susceptibility to pilocarpine-induced status epilepticus following neocortical injuries in the rat at different developmental stages[J]. Epilepsy Res, 2003, 53(3): 216-224.
- 3 Cilio M R, Sogawa Y, Cha B H, et al. Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are specific for age and model[J]. Epilepsia, 2003, 44(4): 518-528.
- 4 胡越,蒋莉.有效控制氯化锂-匹罗卡品诱发惊厥持续状态发作的实验研究[J].儿科药理学杂志,2003,9(4):5-8.
- 5 Mikati M. Neuronal cell death in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy is induced by the initial status epilepticus and not by later repeated spontaneous seizure[J]. Epilepsia, 2004, 45(3): 296.
- 6 Kang D C, Lee Y M, Lee J, et al. Prognostic factors of status epilepticus in children[J]. Yonsei Med J, 2005, 46(1): 27-33.
- 7 Maegaki Y, Kurozawa Y, Hanaki K, et al. Risk factors for fatality and neurological sequelae after status epilepticus in children[J]. Neuropediatrics, 2005, 36(3): 186-192.
- 8 邱振中,李锐,邱财荣,等.丹参对烧伤大鼠肝细胞线粒体呼吸功能的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2006,13(3):156-158.
- 9 Zhang Y, Bhavnani B R. Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release[J]. BMC Neurosci, 2005, 6(1): 13.
- 10 梁敏,王宇田.调节神经元凋亡信号转导途径的关键酶:死亡相关蛋白酶[J].中国危重病急救医学,2005,17(5):318-319.

(收稿日期:2006-10-03 修回日期:2006-12-22)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

第二期全国医学论文写作研修班会议通知

为提高广大作者医学论文特别是英文医学论文的写作水平,中华医学会《中华医学杂志》(英文版)定于 2007 年 8 月 24—26 日在北京举办“第二期全国医学论文写作研修班”[国家级继续医学教育项目,项目编号:2007-15-01-032(国)]。研修班将邀请国内知名流行病学、统计学专家讲授科研选题、科研设计和统计学相关知识,邀请中华医学会杂志社的社长、总编辑、编辑部主任和有丰富写作经验的专家讲授医学论文各部分的写作技巧,论文写作中的伦理学问题,版权知识,一稿多投、重复发表、二级发表问题,向英文期刊投稿的注意事项,英文摘要的写作以及撰写英文医学论文的注意事项等。此次培训班授予国家级继续教育 I 类学分 8 分。

有意向参加该研修班的同志,请与英文版编辑部孙静编辑联系,地址:北京市东四西大街 42 号,邮编 100710。电话:010-85158320,传真:010-85158333, Email: sunj@cma.org.cn。并留参会者姓名、性别、单位、通讯地址、联系电话、Email 等。有关研修班的详情请及时浏览英文版的网站: www.cmj.org。

(中华医学会《中华医学杂志》英文版)