

· 论 著 ·

癫痫后学习记忆障碍大鼠海马中脑源性神经营养因子表达的变化

王维平¹, 娄燕², 李攀¹, 段瑞生¹, 霍会永¹

(1. 河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050000; 2 河北省人民医院儿科, 石家庄 050051)

[摘要] **目的:**探讨戊四氮(pentylentetrazole, PTZ)化学点燃癫痫大鼠在Y迷宫中学习记忆能力与海马脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) mRNA和蛋白质表达变化的关系,以期研究癫痫患者的记忆损害及其治疗提供线索。**方法:**成年健康雄性SD大鼠随机分为癫痫持续状态(status epilepticus, SE)组、SE对照组、慢性癫痫(chronic epilepsy, CEP)组和CEP对照组。SE模型按40 mg/kg腹腔注射PTZ溶液,10 min后注射20 mg/kg,然后每10 min注射10 mg/kg,直至诱发大鼠癫痫持续状态发作。CEP模型按35 mg/kg腹腔注射PTZ溶液,每48 h一次,直到连续3次Racine IV~V级性发作。对照组与相应模型组同时腹腔注射同等容量的生理盐水。用交替电刺激Y迷宫试验检测大鼠学习记忆能力,采用RT-PCR和免疫组织化学法检测大鼠海马BDNF mRNA和蛋白质的表达变化。**结果:**交替电刺激Y迷宫试验中,SE组大鼠与SE对照组相比致后1 d和2 d的选择错误总数明显增加($P < 0.05$);CEP组致后1 d、30 d、31 d的选择错误总数与CEP对照组相比均有明显增加($P < 0.05$)。在海马中,致后1 d的SE组和CEP组以及致后30 d的CEP组BDNF mRNA和蛋白质表达水平均较低。**结论:**癫痫持续状态可导致大鼠短时间的学习记忆功能受损,而慢性癫痫引起的学习记忆能力损伤持续时间较长。癫痫所致的学习记忆功能障碍可能与海马BDNF的表达减少有关。

[关键词] 记忆障碍;脑源性神经营养因子;海马;癫痫;学习障碍

[中图分类号] R 742.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)05-0488-04

Expression changes of brain-derived neurotrophic factor in hippocampus of rats with post-epilepsy learning and memory deficiency

WANG Wei-ping¹, LOU Yan², LI Pan¹, DUAN Rui-sheng¹, HUO Hui-yong¹ (1. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Department of Pediatrics, the People's Hospital of Hebei Hospital, Shijiazhuang 050051)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the relationship between the learning/memory ability and the expression changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in hippocampus of epileptic rats kindled by Pentylentetrazole (PTZ). **Methods:** Adult male Sprague-Dawley (SD) rats, weighing (200 ± 20)g, were randomly divided into status epilepticus (SE) group, Control I, chronic epilepsy (CEP) group and Control II. Rats in SE group were initially administrated *i. p.* with 40 mg/kg PTZ, 10 min later with 20 mg/kg PTZ, and then with 10 mg/kg PTZ thereafter until the development of SE; rats in CEP group were administrated with 35 mg/kg PTZ for 3 times at an interval of 48 h, until the development of Racine IV-V epilepsy; and rats in Control I and Control II groups were given normal saline in the same manners as SE group and CEP group, respectively. Alternative electro-stimulus Y-maze test was used to evaluate the learning/memory ability of rats; RT-PCR and immunohistochemistry method were used to determine the expression of BDNF mRNA and protein in rats' hippocampus. **Results:** On the first and second day after kindling, we found that the total errors of rats in SE group were obviously increased compared with those in Control I ($P < 0.05$); the total errors of CEP group on the first, thirtieth and thirty-first day were obviously increased compared with those in Control II ($P < 0.05$). Lower expression of BDNF mRNA and protein in hippocampus was found 1 day after kindling in SE and CEP group and 30 days after kindling in CEP group. **Conclusion:** Status epilepsy can induce short term deficiency of learning and memory in rats, while chronic epilepsy induces a longer deficiency. Learning and memory deficiency caused by epilepsy might be related to the decrease of BDNF mRNA and protein expression.

[KEY WORDS] brain-derived neurotrophic factor; hippocampus; epilepsy; learning disorders; memory disorders

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5): 488-491]

临床发现很多癫痫患者除癫痫发作症状外,常伴有学习记忆功能受损,极大的影响了患者的生存质量^[1]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是脑内分布最广的神经营

养因子。研究证明BDNF对基底前脑胆碱能神经

[作者简介] 王维平,博士,教授、主任医师,博士生导师。
E-mail: LDH-WWP-LCY@163.com

元等多种神经元的发生和存活都具有促进作用,不但能抵抗伤害性刺激,促使神经元损伤后的再生,还能影响突触及神经元的可塑性。近来还证明 BDNF 直接参与调节学习和记忆过程。

本研究拟探讨戊四氮 (pentylentetrazole, PTZ) 化学点燃癫痫大鼠在 Y 迷宫中学习记忆能力与海马 BDNF mRNA 和蛋白质表达变化的关系,以期研究癫痫患者的记忆损害及其治疗提供线索。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组 健康成年雄性 SD 大鼠 78 只,体质量(200±20)g,由河北省实验动物中心提供[许可证号:SCXK(冀)2003-1-003]。经交替电刺激 Y 迷宫试验筛选后获得合格动物 75 只,随机分为癫痫持续状态(status epilepticus, SE)组、SE 对照组、慢性癫痫 (chronic epilepsy, CEP) 组和 CEP 对照组。造模过程中出现死亡或不符合模型要求者,予以剔除并随机补充,保证每组动物 15 只。

1.2 模型制备 SE 模型给予大鼠 40 mg/kg 腹腔注射 PTZ 溶液(美国 Sigma 公司,批号 056K1174,浓度为 10 mg/ml,用生理盐水溶解),10 min 后注射 20 mg/kg,然后每 10 min 注射 10 mg/kg,直至诱发癫痫持续状态发作,惊厥行为表现采用 Racine 6 级评价标准^[2]。CEP 模型按 35 mg/kg 腹腔注射 PTZ 溶液,每 48 h 一次,直到连续 3 次 Racine IV~V 级性发作。对照组与相应模型组同时腹腔注射同等容量的生理盐水。

1.3 交替电刺激 Y 迷宫试验 造模后 1 d、2 d、30 d、30 d 两个时间点进行交替电刺激 Y 迷宫试验^[3],每天进行 30 次尝试,规定大鼠受电击后从起始臂直接逃至安全臂为“正确反应”,先进入通电臂则为“错误反应”,并记录为 1 次错误。以动物选择错误次数作为评价大鼠学习能力的指标。

1.4 海马组织中 BDNF mRNA 的 RT-PCR 检测 造模后 1 d 和 30 d 两个时间点,每组随机选取大鼠 4 只,Y 迷宫试验结束后迅速分离海马。参照 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)说明书,提取海马总 RNA。逆转录:取 8 μg RNA 按照美国 Promega 公司提供的逆转录系统试剂盒说明书在美国 PE 公司 GeneAmp 9600 型 PCR 仪中逆转录合成 cDNA。根据文献报道的 BDNF 序列,设计合成扩增 BDNF cDNA 的引物,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列分别为:BDNF 上游引物 5'-CAC TCC GAC CCC GCC CGC CG -3';下游引

物:5'-TCC ACT ATC TTC CCC TTT TA -3';扩增长度 364 bp。为了准确检测表达水平,选用大鼠 β-actin cDNA 引物序列作为内参照。β-actin 上游 5'-GCC ATG TAC GTA GCC ATC CA-3';下游 5'-GAA CCG CTC ATT GCC GAT AG-3';扩增长度为 375 bp。PCR 总反应体积 25 μl,按以下步骤进行扩增,BDNF 基因扩增条件为:94℃ 2 min,然后 94℃ 40 s,56℃ 40 s,72℃ 40 s(35 个循环),72℃ 延伸 5 min。扩增目的片段长度为 364 bp。同时扩增鼠 β-actin 作内参照。产物分析:取 RT-PCR 产物 4 μl,加上样缓冲液 1 μl,在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,用 UVP 凝胶图像成像系统扫描定量并摄像电泳条带的灰度,以确定扩增物的相对量。凝胶图像分析系统(Gel-Pro Analyzer Version 3.0)分析结果。

1.5 脑组织 BDNF 免疫组织化学检测 造模后 1 d 和 30 d 两个时间点,每组随机选取大鼠 6 只,Y 迷宫试验结束后迅速常规灌注,开颅取脑,将含有海马的中段脑组织进行后固定;常规脱水、透明、石蜡包埋。用石蜡切片机,自视交叉向后呈冠状位连续石蜡切片,切至出现海马结构,每片厚度为 5 μm,每隔 5 张取 1 张,每个标本取 10 张,用于免疫组化染色及阴性对照实验。

BDNF 免疫组织化学染色按以下步骤进行:二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,高压抗原热修复,3% 过氧化氢溶液清除内源性过氧化物酶,10% 正常山羊血清封闭非特异性抗原,依次滴加兔抗 BDNF 多克隆抗体稀释液(1:100)(阴性对照用 PBS 代替一抗),生物素标记的羊抗兔 IgG 工作液(二抗),辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液(三抗)。DAB 显色,上行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察海马各分区 BDNF 的表达。

1.6 统计学处理 各组检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据均采用 SAS 6.12 统计软件包进行 *t* 检验或单因素 ANOVA 分析。

2 结果

2.1 致模型建立情况 SE 组大鼠 25 只,发作达 Racine 标准 IV~V 级、持续 30~60 min 为造模成功,10 只因强直收缩死亡。CEP 组大鼠 20 只,16~22 次注射后有 15 只出现连续 3 次 Racine IV~V 级发作,达到完全点燃,5 只因强直收缩死亡。脑电图检查示,SE 模型者呈尖-慢波、尖波和棘波发放;CEP 模型者显示在低幅的 9~11 Hz α 背景节律下,阵发出现高幅多棘波;对照组脑电活动无癫痫放电。

2.2 交替电刺激 Y 迷宫试验 与各对照组相比,

各模型组致前1 d和2 d的选择错误总数均无明显差异,且各组致前2 d的选择错误总数均明显小于致后1 d($P < 0.05$,表1);SE组致后1 d、2

d及CEP组致后1 d、30 d、31 d的选择错误总数明显增加($P < 0.05$),SE组致后30 d、31 d的选择错误总数无明显差异(表1)。

表1 致前后各组大鼠在交替电刺激Y迷宫中选择错误总数的比较
Tab 1 Comparison of total error in Y-maze in rats before and after kindling

($n = 15, \bar{x} \pm s$)

Group	Pre-kindling		Post-kindling			
	2 d	1 d	1 d	2 d	30 d	31 d
SE control	11.7±2.7	8.5±3.1*	7.7±2.7	7.3±3.2	8.1±3.3	7.5±2.8
SE	12.2±2.0	8.9±3.2*	10.0±3.0 [△]	10.3±2.7 ^{△△}	9.3±3.7	8.9±3.1
CEP control	12.1±3.2	9.3±2.9*	8.0±2.8	8.8±2.9	9.1±3.3	8.1±2.3
CEP	11.4±3.7	8.8±2.0*	10.3±3.1 [▲]	10.9±3.0	11.9±3.3 [▲]	10.7±3.8 [▲]

* $P < 0.05$ vs pre-kindling 2 d; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs SE control group; [▲] $P < 0.05$ vs CEP control group

2.3 大鼠海马组织BDNF mRNA的表达 各组标本BDNF mRNA的RT-PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图1。经凝胶图像分析系统分析,致后1 d SE组和CEP组BDNF mRNA表达水平明显低于相应对照组($P < 0.05$);致后30 d CEP组BDNF mRNA表达水平明显低于相应对照组($P < 0.05$),SE组BDNF mRNA表达水平与相应对照组相比无明显差异。见表2。

时点、SE组在致后30 d均见BDNF免疫阳性产物末,DG区也可见大量免疫阳性纤维终末。SE组在致后1 d、CEP组在致后1 d、30 d BDNF免疫反应较弱,与各对照组相比,阳性纤维及细胞周围间质内的BDNF免疫阳性物质减少。阴性对照未见免疫反应产物。见图2和图3。

表2 大鼠海马组织BDNF mRNA表达

Tab 2 Comparison of BDNF mRNA levels in rat hippocampus

($n = 4, \bar{x} \pm s$)

Group	BDNF/ β -actin (Gray scale value)	
	1 d after kindling	30 d after kindling
Control	0.50±0.07	0.53±0.07
SE group	0.36±0.07*	0.49±0.09
CEP group	0.39±0.06*	0.41±0.06*

* $P < 0.05$ vs control group

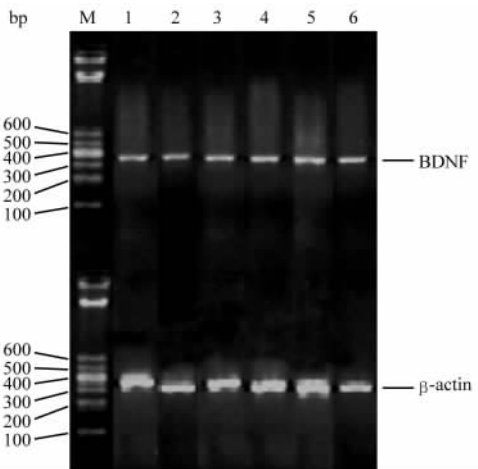


图1 各组标本BDNF mRNA的RT-PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 Electrophoresis results of RT-PCR product in all groups after kindling

M: Marker; 1,4:SE group;2,5:CEP group;3,6:Control group;1-3:1 d after kindling;4-6: 30 d after kindling

2.4 海马BDNF免疫组织化学染色 大鼠海马BDNF阳性反应产物呈棕黄色,着色部位为神经纤维,还可见于海马各区细胞周围间质内,未见细胞胞体内有阳性物质分布,背景无明显着色。对照组各

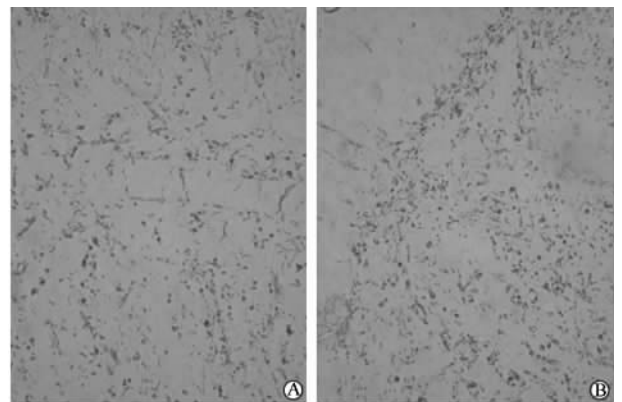


图2 致后1 d SE组海马BDNF免疫组织化学染色
Fig 2 BDNF immunostaining of hippocampus in SE group 24 hours after kindling (×400)

A: CA3; B: DG

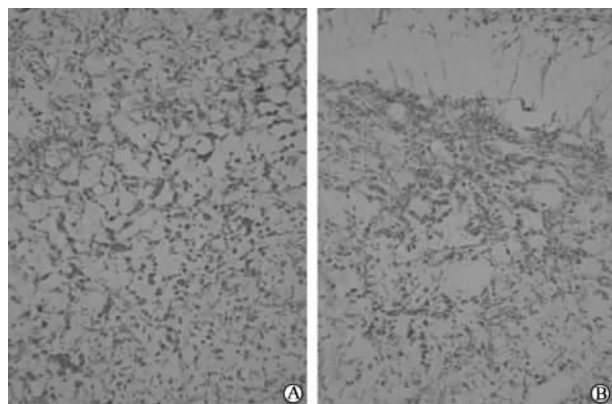


图3 致 后30 d SE组海马
BDNF免疫组织化学染色结果

Fig 3 BDNF immunostaining of hippocampus in
SE group 30 days after kindling($\times 400$)

A: CA3; B: DG

3 讨论

PTZ可使致 动物产生与人类极为相似的行为及神经病理学改变^[4],其本身不具有神经毒性作用,对大鼠的记忆无明显影响^[5]。Y迷宫被广泛应用于大鼠辨别性学习、空间变化作业、工作记忆以及参考记忆的测试^[6]。本实验显示:SE组大鼠致 后1 d Y迷宫选择错误总数增加,而CEP组大鼠的选择错误总数在致 后1 d和30 d均有明显增加。表明,癫 持续状态可引起大鼠短时间的学习记忆能力受损;反复发作的慢性癫 也引起大鼠学习记忆能力损害,且持续时间较长。

海马是BDNF表达最丰富的脑区,学习的获得与海马中的BDNF mRNA激活有关^[7]。本研究结果显示:SE导致大鼠短期内出现明显的交替电刺激Y迷宫学习记忆功能受损,同时伴有海马组织BDNF mRNA以及CA3、DG区BDNF蛋白表达水平的降低;随着时间的推移,大鼠的学习记忆功能逐渐恢复,海马BDNF表达水平也相应增高。CEP引起大鼠近期和远期学习记忆功能受损,伴随海马BDNF的表达水平下降。结果表明海马BDNF的表达变化可能参与了癫 后认知功能改变的病理生理过程。

此外,海马CA3和DG区均可见大量BDNF免疫阳性纤维终末,说明CA3区锥体细胞合成BDNF并可沿神经元轴突顺行运输。这可能证实了神经元可产生并顺行运输营养性分子的看法^[8]。传统的观点认为BDNF与其支配神经元轴突末梢膜上的高亲和性受体TrkB结合后,逆行运输至胞体产生生物学效应。近年来许多研究表明BDNF在神经元内可顺行运输至末梢并释放,继而被二级或三级靶神经元摄取,参与多项重要的生理功能^[9]。结合本实验,我们认为大鼠学习记忆功能降低至少部分可能是由于海马神经纤维顺行运输的BDNF减少所致。

[参考文献]

- [1] Bulteau C, Jambaque I, Viguier D, et al. Epileptic syndromes, cognitive assessment and school placement: a study of 251 children[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2000, 42: 319-327.
- [2] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure[J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32: 281-294.
- [3] 余建,黄育文,陈忠. 经过改良的评价大鼠空间记忆能力的交替电刺激Y型迷宫[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2003, 32: 121-125.
- [4] Qu H, Eloqayli H, Sonnewald U. Pentylentetrazole affects metabolism of astrocytes in culture[J]. *J Neurosci Res*, 2005, 79(1-2): 48-54.
- [5] 张力三,金春雷,李青,等. 慢性癫 对大鼠空间学习记忆再生能力的影响[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2004, 33: 205-208.
- [6] Conrad C D, Lupien S J, Thanasoulis L C, et al. The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze[J]. *Brain Res*, 1997, 759: 76-83.
- [7] Yamada K, Nabeshima T. Interaction of BDNF/TrkB signaling with NMDA receptor in learning and memory[J]. *Drug News Perspect*, 2004, 17: 435-438.
- [8] Menna E, Cenni M C, Naska S, et al. The anterogradely transported BDNF promotes retinal axon remodeling during eye specific segregation within the LGN[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24: 972-983.
- [9] von Bartheld C S, Wang X, Butowt R. Anterograde axonal transport, transcytosis, and recycling of neurotrophic factors: the concept of trophic currencies in neural networks[J]. *Mol Neurobiol*, 2001, 24(1-3): 1-28.

[收稿日期] 2006-07-07

[修回日期] 2006-12-20

[本文编辑] 曹静