



凋亡抑制剂TPCK对致痫大鼠早期抽搐发作的影响

大鼠杏仁核注射海人酸(KA)所致癫痫发作具有理想的颞叶癫痫模型所应具备的条件:在症状学上,海马、杏仁核和其他边缘结构占有中心地位;病理上特异的海马损伤与颞叶癫痫的海马硬化相关;有自发抽搐;与人类颞叶癫痫一样,对大部分抗癫痫药物耐受[1]。其机制目前尚不清楚。有证据表明,自发抽搐的形成与苔状纤维发芽密切相关[2],而苔状纤维发芽又与CA3神经元的死亡密切相关。正常情况下,苔状纤维与CA3神经元形成突触联系。注射KA后,首先引起CA3神经元死亡,随后才开始苔状纤维发芽[3][4]。凋亡抑制剂对甲苯磺酰-L-苯丙氨酸甲基甲酮(N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone, TPCK)可以减少KA所致海马CA3神经元的死亡,但这一神经保护作用是否具有治疗癫痫作用尚不清楚。本实验采用记数抽搐的方法,旨在研究TPCK是否可以减少KA致痫大鼠的抽搐发作次数。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

参考文献[5]。雄性Wistar大鼠19只,体质量180~220 g(由南方医院动物所提供)。用10%水合氯醛麻醉(3.5 ml/kg·b.w.,腹腔注射)后,固定于立体定向头架上。沿中线切开头皮后,根据坐标位置(相对于前囟:AP=-2.8 mm;L=4.0 mm)用牙科钻在颅骨上钻一小孔,将微量注射器插入硬膜下7.8 mm处,将KA(购自Sigma公司,0.8 μg溶于0.3 μl的0.1 mol/L、pH 7.4的PBS缓冲液中)注入杏仁核。留置15 min后拔除,以防药液沿针道外溢。待麻醉苏醒后,诱发动物抽搐至少1 h。遂予腹腔注射安定(30 mg/kg·b.w.)以终止抽搐。术中采用反馈式热垫保持肛温(37±0.5)℃。

1.2 实验分组

将实验大鼠随机分为对照组(10只)和给药组(9只)。给药组于KA注射前1 h腹腔注射TPCK(Sigma, USA) 100 mg/kg·b.w.。对照组以相同的方式腹腔注射溶剂(0.05%聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯)。

1.3 抽搐发作记数

参考文献[6]。一次抽搐定义为出现肢体阵挛或全身痉挛。自KA注射后第2周开始,对每只动物每天观察2 h(9:00-10:00, 15:00-16:00),每周观察5 d,持续观察6周,以周为单位记录抽搐次数。

1.4 组织学观察

6周后所有动物经10%水合氯醛(8 ml/kg·b.w.)深度麻醉,迅速开胸暴露心脏,经升主动脉用100 ml生理盐水快速冲洗后,用500 ml 4%的多聚甲醛缓冲液由快到慢灌注固定3~4 h。断头取脑,置于4℃相同固定液中后固定2~4 h。再经梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋。在距离前囟约3.6 mm处制作脑部冠状石蜡切片,进行HE染色后,于显微镜下观察组织病理学改变,并在高倍镜下(40×10)下对CA3区存活神经元记数(锥体细胞个数/mm²)。

1.5 统计分析

对照组和给药组之间抽搐次数及海马CA3区存活神经元数差异采用t检验。

2 结果

2.1 TPCK对海马CA3神经元的保护作用

对照组与给药组海马CA3区存活神经元数分别为 (26.7 ± 9.2) 和 $(72.3 \pm 10.5) / \text{mm}^2$ ，两组之间有显著性差异($P < 0.05$)。

2.2 TPCK对KA致痫大鼠抽搐发作次数的影响

观察期间大鼠的自发抽搐表现为凝视、湿狗样抖、颜面部及咀嚼肌和前肢的抖动、后腿站立、反复站立、跌倒等。为便于观察，仅将肢体阵挛或全身痉挛定义为抽搐。抽搐记数结果(95%可信限)见图1。在同一观察时间段，给药组和对照组的抽搐发作次数无显著性差异($P > 0.1$)。

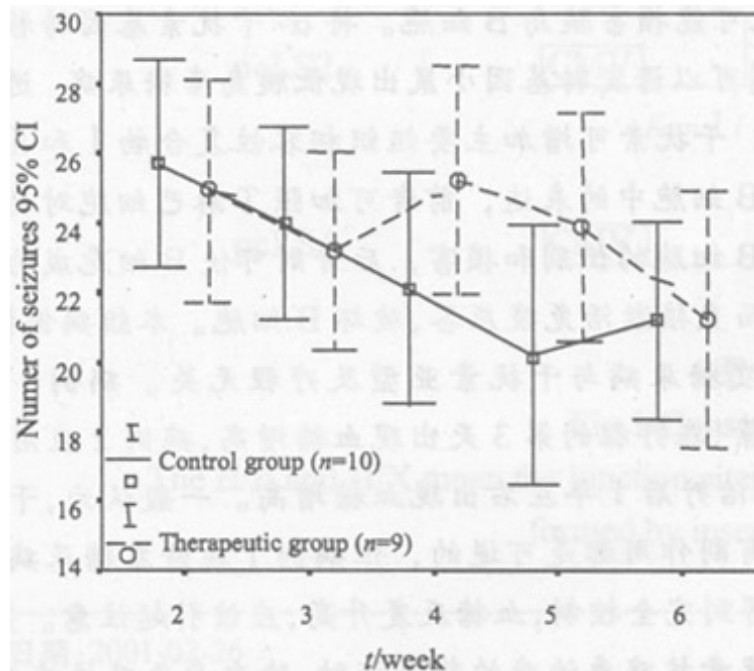


图1 给药组与对照组的抽搐发作次数比较

Fig.2 Comparison of numbers of seizures between therapeutic group and control group

3 讨论

海马硬化是颞叶癫痫的主要病理改变，50%~70%慢性癫痫患者的尸检发现有海马硬化。它既是癫痫发作的结果，又是癫痫频发和难治的原因，并且可以致残(记忆力下降、智能和精神障碍以及痴呆)。神经元死亡、丢失是海马硬化的主要病理特征[7]。大鼠杏仁核注射KA所致癫痫可以模拟海马硬化的形成，是理想的颞叶癫痫动物模型。

杏仁核注射KA引起抽搐相关的CA3区神经元损害，表现为急性坏死(约30%)和迟发性死亡(约70%)，而迟发性死亡具有凋亡的特性，其机制尚不十分清楚。目前倾向于认为是兴奋性氨基酸介导的兴奋毒性引起的。KA注射后，可引起海马齿状回颗粒细胞的丛集放电，使苔状纤维末梢释放谷氨酸，谷氨酸和CA3神经元胞体的谷氨酸受体结合，一方面激活非NMDA受体，引起突触后神经元去极化， Na^+ 大量内流，继发 Cl^- 和水分的内流，使神经元严重水肿、迅速溃变死亡[8]；另一方面与NMDA受体和代谢型谷氨酸受体结合，导致 Ca^{2+} 内流和胞内 Ca^{2+} 释放，使胞内 Ca^{2+} 浓度持续增高，诱导即刻早期基因c-Fos和c-Jun的表达，启动细胞走向凋亡[8]

[9]。有证据表明,以TUNEL阳性细胞为特征的凋亡是其中主要的死亡形式。因此,近年国内外有许多研究者提出用凋亡抑制剂治疗癫痫。丝氨酸蛋白酶抑制剂TPCK是酯溶性物质,易于通过血脑屏障。众多离体实验证明,TPCK是一种强力的凋亡抑制剂[10]。而Hara等[11]则证明了TPCK在沙土鼠脑缺血模型中的神经保护作用。我们的研究也表明,TPCK可以抑制KA所致大鼠海马CA3神经元的凋亡,从而提高CA3区神经元存活数(另文发表)。

本研究结果表明,尽管TPCK提高了海马CA3存活神经元数,但在6周内,其不能够减少KA致痫大鼠的抽搐发作次数,没有抗癫痫治疗效果。原因可能是:(1)TPCK不能提供足够的神经保护作用,因为仍有全部急性坏死的神经元和部分凋亡的神经元不能免于死亡,因此,我们尚不能据此完全否定神经保护剂的抗癫痫作用,但至少凋亡抑制剂的抗癫痫作用方面,应持有相当谨慎的态度;(2)抽搐记数用的是行为学指标,不一定能够反映真实的放电情况,在疗效判定上可能存在偏差;(3)CA3神经元的死亡可能并不是或不完全是KA致痫大鼠自发抽搐的原因。

参考文献:

[1] Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy[J]. *Neuroscience*, 1985,14(2):375-405.

[2] Okazaki MM, Molnar P, Nadler JV. Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth[J]. *J Neurophysiol*, 1999,81(4):1645-60.

[3] Schauwecker PE, Ramirez JJ, Steward O. Genetic dissection of the signals that induce synaptic reorganization[J]. *Exp Neurol*, 2000,161(1):139-52.

[4] Shetty AK, Turner DA. Fetal hippocampal cells grafted to kainate-lesioned CA3 region of adult hippocampus suppress aberrant supragranular sprouting of host mossy fibers[J]. *Exp Neurol*, 1997,143(2):231-45.

Henshall DC, Sinclair JS, Simon RP. Spatio-temporal profile of DNA fragmentation and its relationship to patterns of epileptiform activity following focally evoked limbic seizures[J]. *Brain Res*, 2000,858(2):290-302.

Mori Y, Kondziolka D, Balzer J, et al. Effects of stereotactic radio-surgery on an animal model of hippocampal epilepsy[J]. *Neurosurgery*, 2000,46(1):157-68.

[7] Buckmaster PS, Dudek FE. Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats[J]. *J Comp Neurol*, 1997,385(3):385-401.

[8] 韩济生. 神经科学原理[M]. 北京医科大学出版社, 1993. 536-7.

[9] Herdegen T, Blume A, Buschmann T, et al. Expression of activating transcription factor-2, serum response factor and cAMP/Ca response element binding protein in the adult rat brain following generalized seizures, nerve fibre lesion and ultraviolet irradiation[J]. *Neuroscience*, 1997,81(1):199-212.

[10] Higuchi M, Singh S, Chan H, et al. Protease inhibitors differentially regulate tumor necrosis factor-induced apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, cytotoxicity and differentiation[J]. *Blood*, 1995,86(6):2248-56.

[11] Hara A, Niwa M, Nakashima M, et al. Protective effect of apoptosis-inhibitory agent, N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone against ischemia-induced hippocampal neuronal damage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998,18(8):819-23.

参考文献:

[1] Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and

relevance to human temporal lobe epilepsy[J]. Neuroscience, 1985, 14(2):375-405.

[2] Okazaki MM, Molnar P, Nadler JV. Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth[J]. J Neurophysiol, 1999, 81(4):1645-60.

[3] Schauwecker PE, Ramirez JJ, Steward O. Genetic dissection of the signals that induce synaptic reorganization[J]. Exp Neurol, 2000, 161(1):139-52.

[4] Shetty AK, Turner DA. Fetal hippocampal cells grafted to kainate-lesioned CA3 region of adult hippocampus suppress aberrant supragranular sprouting of host mossy fibers [J]. Exp Neurol, 1997, 143(2):231-45.

Henshall DC, Sinclair JS, Simon RP. Spatio-temporal profile of DNA fragmentation and its relationship to patterns of epileptiform activity following focally evoked limbic seizures[J]. Brain Res, 2000, 858(2):290-302.

Mori Y, Kondziolka D, Balzer J, et al. Effects of stereotactic radio-surgery on an animal model of hippocampal epilepsy[J]. Neurosurgery, 2000, 46(1):157-68.

[7] Buckmaster PS, Dudek FE. Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats[J]. J Comp Neurol, 1997, 385(3):385-401.

[8] 韩济生. 神经科学原理[M]. 北京医科大学出版社, 1993. 536-7.

[9] Herdegen T, Blume A, Buschmann T, et al. Expression of activating transcription factor-2, serum response factor and cAMP/Ca response element binding protein in the adult rat brain following generalized seizures, nerve fibre lesion and ultraviolet irradiation [J]. Neuroscience, 1997, 81(1):199-212.

[10] Higuchi M, Singh S, Chan H, et al. Protease inhibitors differentially regulate tumor necrosis factor-induced apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, cytotoxicity and differentiation[J]. Blood, 1995, 86(6):2248-56.

[11] Hara A, Niwa M, Nakashima M, et al. Protective effect of apoptosis-inhibitory agent, N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone against ischemia-induced hippocampal neuronal damage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(8):819-23.