

阿司匹林对癫痫大鼠海马苔藓纤维芽生的影响*

崔小丽 杨 丰 王 莹 贾瑞华 景芸芸 江 文[△]

(第四军医大学西京医院神经内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨阿司匹林对癫痫大鼠海马齿状回苔藓纤维芽生的影响。方法:应用氯化锂-匹罗卡品诱导癫痫大鼠模型,将大鼠随机分为正常对照组、模型组和阿司匹林(20 mg/kg, i.p. 1/d)干预组(造模终止后干预组以开始干预时间点的不同分为0 h, 3 h和24 h 三组)。20天后,通过Timm染色观察不同时间点阿司匹林干预后癫痫大鼠海马齿状回苔藓纤维芽生的情况。结果:与正常对照组相比,癫痫大鼠海马齿状回有明显的苔藓纤维芽生($P<0.05$)。阿司匹林0 h干预组海马齿状回苔藓纤维芽生减少不明显($P>0.05$),3h干预组和24h干预组海马齿状回苔藓纤维芽生明显的减少($P<0.05$);3 h干预组和24 h干预组相比海马齿状回苔藓纤维芽生无明显的差异($P>0.05$)。结论:合适的时间窗给予阿司匹林能够明显减少苔藓纤维芽生。这对癫痫的临床治疗有一定的指导意义。

关键词: 癫痫; 海马; 齿状回; 苔藓纤维芽生; 阿司匹林

中图分类号: Q95-3 R742.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)02-220-03

Effects of Aspirin on Mossy Fiber Sprouting in Hippocampus of Epileptic Rats*

CUI Xiao-li, YANG Feng, WANG Ying, JIA Rui-hua, JING Yun-yun, JIANG Wen[△]

(Department of Neurology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, Shanxi, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of aspirin on mossy fiber sprouting (MFS) in hippocampal dentate gyrus (DG) of epileptic rats. **Methods** Lithium-pilocarpin was used to induce epilepsy model of rats. The rats were randomly and equally divided into control group, epileptic group and aspirin group (20 mg/kg, i.p. 1/d). In building mode terminated, the aspirin group divided into 0 h, 3 h and 24 h three groups by different time points of start intervention. After 20 days, Timm histochemistry was used to observe the hippocampal DG MFS. **Results** Compared with control group, A significant difference was found in epileptic rats ($P<0.05$). 20-day aspirin treatment could decrease the MFS in hippocampal DG at 3 h and 24 h group ($P<0.05$) but not at 0h group ($P>0.05$). There was no statistical difference between 3 h aspirin group and 24 h aspirin group. **Conclusions:** Aspirin administrated at suitably time windows can decrease MFS significantly. These results suggest potential new targets for antiepileptic therapy.

Key words: Epilepsy; Hippocampus; DG; MFS; Aspirin

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R742.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-220-03

前言

癫痫是一组由不同病因所引起,脑部神经元高度同步化,且常具自限性的异常放电所致,以发作性、短暂性、重复性及刻板性的中枢神经系统功能失常为特征的综合征。其发病机制尚不明确。癫痫的患病率为1%,约30%患者为药物难治性,最终成为难治性癫痫,且手术切除癫痫灶仅适于其中一小部分^[1],所以探索新的抗癫痫治疗策略势在必行。颞叶癫痫海马环路内存在轴突出芽和突触重建,海马苔藓纤维芽生(mossy fiber sprouting, MFS)所致的突触重组是癫痫病理生理过程中一个非常重要的形态学变化。MFS可以引起海马神经元兴奋性增高,兴奋环路的形成,以致癫痫反复发作^[2],引起难治性癫痫。在癫痫患者和致病动物海马组织中^[3],均可见苔藓纤维芽生。1969年

walker首次明确提出了炎症免疫机制参与了癫痫的发病,这一结论被后来的实验进一步证实^[4]。由脑损伤事件诸如神经损伤、中风、感染、热性惊厥等引起的炎性反应可以导致症状性癫痫,且是癫痫发作的高危因素^[5]。炎性反应可以导致难治性癫痫的形成,癫痫形成后又伴有苔藓纤维芽生。炎性反应和苔藓纤维之间有怎样的关系,降低炎性反应能否减少苔藓纤维芽生?据报道环氧酶在神经变性疾病,神经精神疾病,癫痫的病理形成中起重要作用。综上所述抗炎药可能为难治性癫痫的治疗提供新的思路。本实验旨在探索抗炎药阿司匹林是否能减少苔藓纤维芽生,减少癫痫的形成,从而具有潜在的辅助抗癫痫作用。

1 材料和方法

1.1 材料

* 基金项目:国家自然科学基金(30670690)

作者简介:崔小丽(1983-)女,硕士研究生,研究方向:炎症和癫痫,电话:029-84775368,

E-mail: LiLi6416669@126.com

[△]通讯作者:江文, E-mail: jiangwen@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-10-17 接受日期:2010-11-12)

健康清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 50 只购自第四军医大学实验动物中心, 体重 (200—250) g 左右。饲养于 (12—12) h 光暗环境, 自由饮水, 给予标准饮食。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 30 只大鼠随机等分为正常对照组、模型组、建模终止后 0 h 阿司匹林干预组、3 h 阿司匹林干预组、和 24 h 阿司匹林干预组 (每组 6 只)。

1.2.2 动物模型制作 先腹腔注射氯化锂 (3 meq/kg, 美国 Sigma 公司), 18-20 h 后注射匹罗卡品 (30 mg/kg, 美国 Sigma 公司)。注射匹罗卡品前 20 min 给予溴甲基东莨菪碱 (1 mg/kg, i.p) 以减轻胆碱能外周反应, 注射匹罗卡品后密切观察大鼠行为学表现, 惊厥强度标准按 Racine 法^[6]分级 (0 级: 无任何反应; I 级: 面部阵挛, 包括眨眼、动须、节奏性咀嚼等; II 级: I 级加节律性点头; III 级: II 级加前肢阵挛; IV 级: III 级加后肢站立; V 级: IV 级加摔倒)。当癫痫大鼠出现 IV 级及以上 SE 发作持续 70 min 后给予腹腔注射地西洋注射液 (10 mg/kg) 终止, 正常对照组大鼠注射等量生理盐水。

1.2.3 阿司匹林干预 阿司匹林 (20 mg/kg, Sigma 公司) 溶于含 5 % 二甲基亚砜 (5 % DMSO) 的生理盐水, 初始给药的时间点分别为建模终止后 0 h, 3 h, 24 h。各组都是连续给药 20 天。正常对照组和模型组都是给予等量的含 5 % DMSO 的生理盐水。

1.2.4 组织制备 连续给药 20 天后, 以 10 % 水合氯醛 (35 mL/kg) 麻醉, 经升主动脉插管, 含 0.37 % 硫代硫酸钠的生理盐水 150 mL 冲洗后灌注 4 % 多聚甲醛 400 mL, 取脑后浸入 4 % 多聚甲醛, 后固定 (4~6) h。置于 30 % 蔗糖溶液至沉底, 冰冻切片机冠状位连续切片, 片厚 30 μ m, 贴附于载玻片上。每只大鼠隔 5 张脑片取一张组成一套, 每套切片约 8—10 张, 共 6 套片子。

1.2.5 Timm 染色及评分标准

(1) Timm 染色液配制 50 % 阿拉伯胶 60 ml (阿拉伯胶 30 g, 去离子水 60 ml, 搅拌, 静置 24 h 后以双层纱布过滤), 柠檬酸缓冲液 10 ml (柠檬酸·H₂O 25.5 g, 柠檬酸钠·2H₂O 23.5 g, 去离子水 100 ml), 5.6 % 的对苯二酚 30 ml, 17 % 硝酸银 0.5 ml, 染色前将以上试剂在暗室内充分混合。

(2) Timm 染色步骤 ①暗室内将切片放入 Timm 染色液中孵育 1.5 h。②暗室内自来水冲洗 15 min。③移出暗室, 再以自来水冲洗 15 min。④常规脱水、透明、封片: 70 % 乙醇 5 min → 80 % 乙醇 5 min → 90 % 乙醇 5 min → 100 % 乙醇 5 min → 二甲苯 (I) 15 min → 二甲苯 (II) 15 min → 中性树胶封固。

(3) 苔藓纤维芽生评分标准^[7] 齿状回内分子层。

0 分: 未见 Timm 颗粒; 1 分: 偶见散在的片状分布的 Timm 颗粒; 2 分: 较多片状分布的 Timm 颗粒; 3 分: Timm 颗粒接近连续分布; 4 分: 浓密的 Timm 颗粒带, 连续或接近连续分布; 5 分: 浓密、层状带 Timm 颗粒连续分布。

1.2.6 图像分析 齿状回内分子层 Timm 银染出芽苔藓纤维半定量评分采用双盲法, 每只大鼠每隔 5 张脑片取 1 张脑片, 200 倍光镜 (BX51, Olympus) 下观察并评分, 结果以均数 ± 标准差表示。

1.2.7 统计学处理 各组之间总体比较采用 Kruskal-Wallis H Test, 若有差别两两之间采用 Mann-Whitney U Test, $P < 0.05$ 为差异有显著性。用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 皮罗卡品模型大鼠发作表现

腹腔注射匹罗卡品后约 20 min 后大鼠出现前肢痉挛, 后肢站立并摔倒等 IV 级以上的发作表现。

2.2 Timm 染色结果

各组苔藓纤维出芽见图 1。各组齿状回颗粒细胞上区苔藓纤维出芽评分, 与正常对照组 (0.5 ± 0.22) 相比, 模型组 (4.83 ± 0.17) 和 0 h 干预组 (4.67 ± 0.21) 海马 DG 有明显的苔藓纤维芽生 ($P < 0.05$); 3 h 干预组 (1.50 ± 0.34) 和 24 h 干预组 (1.67 ± 0.33) 海马 DG 无明显的苔藓纤维芽生 ($P > 0.05$)。与模型组相比, 0 h 干预组海马 DG 苔藓纤维芽生无明显的减少 ($P > 0.05$); 3 h 干预组和 24 h 干预组海马 DG 苔藓纤维芽生明显的减少 ($P < 0.05$), 3 h 干预组和 24 h 干预组相比海马 DG 苔藓纤维芽生无明显的差异 ($P > 0.05$)。

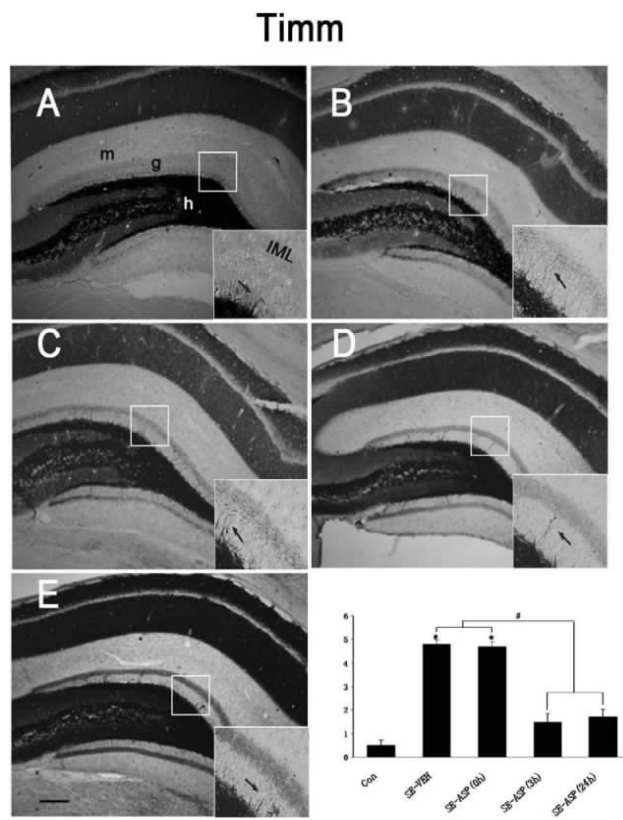


图 1 阿司匹林对癫痫大鼠海马齿状回苔藓纤维芽生的影响 Timm 染色 ($\times 50$, IML: $\times 400$)

m: 分子层, g: 颗粒细胞层, h: 门区, IML: 内分子层。A: 对照组; B: 模型组; C: 0 h 阿司匹林干预组; D: 3 h 阿司匹林干预组; E: 24 h 阿司匹林干预组; F: 齿状回颗粒细胞上区苔藓纤维出芽半定量评分, * 与正常对照组相比, 癫痫大鼠海马齿状回有明显的苔藓纤维芽生 ($P < 0.05$)。阿司匹林 0 h 干预组海马齿状回苔藓纤维芽生减少不明显 ($P > 0.05$), # 3 h 干预组和 24 h 干预组海马齿状回苔藓纤维芽生明显的减少 ($P < 0.05$); 3 h 干预组和 24 h 干预组相比海马齿状回苔藓纤维芽生无明显的差异 ($P > 0.05$)。标尺: 100 μ m

Fig. 1 Effects of Aspirin on hippocampal DG Mossy Fiber Sprouting in Epileptic Rats ($\times 50$, insert $\times 400$)

m: molecular, g: granular cell layer, h: hilus, IML: inner molecular layer. A: control group; B: epileptic group; C: 0 h aspirin group; D: 3 h aspirin group; E: 24 h aspirin group; F: semi-quantitative scale for MFS of supra-granular layer, * Compared with control group, A significant

difference was found in epileptic rats ($P < 0.05$). 0 h aspirin treatment could not decrease the MFS in hippocampal DG ($P > 0.05$). # aspirin treatment could decrease the MFS in hippocampal DG at 3h and 24h group ($P < 0.05$), there were no statistical difference between 3h aspirin group and 24h aspirin group. Scale bar : 100 μ m

3 讨论

癫痫的形成过程伴有苔藓纤维芽生,苔藓纤维芽生引起突触重塑,异常神经环路形成,导致癫痫反复发作。近年来越来越多的证据表明炎症反应参与了癫痫发作的形成过程并起了重要的作用。有关动物实验的药理学和遗传学研究证实了炎性介质,诸如细胞因子、补体、前列腺素类物质促进了癫痫的发作,干预这些分子及其受体可以减少癫痫发作的频率和强度。那么抗炎药能否减少苔藓纤维芽生,进而减少癫痫的形成?阿司匹林为非甾体类抗炎药,一般是通过减少前列腺素类物质起到抗炎作用。另也有报道阿司匹林有神经保护作用^[9]。本课题从异常的神经环路着手,给予抗炎药阿司匹林,并寻找合适的给药时间窗进行探索。

Timm 染色法利用苔藓纤维比周围神经网络有较高的含锌量的特性对其进行特异性染色。通过 Timm 组化光镜下观察发现,出芽侧枝回返至齿状回内分子层,在门区和内分子层之间形成新的突触联系,说明了癫痫发作可诱导苔藓纤维芽生,这和以往的报道是一致的^[9]。2009 年美国学者 Paul S. Buckmaster,发现在终止癫痫发作 1-8 h 后给予免疫抑制利雷帕霉素 1 个月,明显的减少了苔藓纤维芽生,停药后会有新的苔藓纤维芽生产生^[10]。本实验观察也发现 3 h 和 24 h 阿司匹林干预组明显的减少了苔藓纤维芽生,但是 0 h 阿司匹林干预组不能减少苔藓纤维异常芽生。文献报道在癫痫鼠有自发性发作后即建模 40 天后给予选择性的环氧酶抑制剂未能减少苔藓纤维芽生^[11]。这些都表明了给药时间窗的重要性。可能原因是炎症反应在一定的条件下起保护作用,这和组织的微环境,损伤组织产生的炎性介质,靶细胞的功能状态,组织暴露于炎性状态的时间都有关系。

我们的实验证实了抗炎药阿司匹林在合适的时间窗明显的减少了苔藓纤维异常芽生,给临床治疗提供了一定的参考价值。抗炎药是通过什么样的途径减少了苔藓纤维芽生也是一个

很有意思的课题,在今后的实验中我们将会从行为学,神经元丢失,神经退行性变等各个方面进一步阐述,以期为临床治疗难治性癫痫提供依据。

参考文献(References)

- [1] Kwan P, Brodie MJ. Refractory epilepsy: mechanisms and solutions [J]. Expert Rev Neurother, 2006, 6(3):397-406
- [2] Ryuta Koyama and Yuji Ikegaya. Mossy Fiber Sprouting as a Potential Therapeutic Target for Epilepsy [J]. Current Neurovascular Research, 2004,1:3-10
- [3] Kadam SD, Dudek FE. Neuropathological features of a rat model of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy with associated epilepsy [J]. J Comp Neurol. 2007, 505:716-737
- [4] Annamaria Vezzani and Tiziana Granata. Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence [J]. Epilepsia, 2005, 46 (11):1724-1743
- [5] Annamaria Vezzani, Silvia Balosso, Teresa Ravizza. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy [J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2008, 22: 797-803
- [6] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation II: motor Seizure [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32: 781-94
- [7] Liu Z, Yang Y, Silveria DC, et al. Consequence of recurrent seizures during early brain development [J]. Neuroscience, 1999, 92: 1443-54
- [8] Ashish Dhir, Pattipati S. Naidu, Shrinivas K. Kulkarni. Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: Possible mechanism of action [J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 2006, 30:1478-85
- [9] Michael Lynch and Thomas Sutula. Recurrent excitatory connectivity in the dentate gyrus of kindled and kainic acid-treated rat [J]. J Neurophysiol, 2000, 83:693-704
- [10] Paul S. Buckmaster, Elizabeth A. Ingram, and Xiling Wen. Inhibition of the Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Suppresses Dentate Granule Cell Axon Sprouting in a Rodent Model of Temporal Lobe Epilepsy [J]. The Journal of Neuroscience, 2009, 29 (25):8259-69
- [11] L. Holtman, E.A. van Vliet, R. van Schaik, et al. Effects of SC58236, a selective cox-2 inhibitor, on epileptogenesis and spontaneous seizures in a rat model for temporal lobe epilepsy [J]. Epilepsy Research, 2009,84(1):56-66