

网络出版时间:2012-06-08 16:03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120608.1603.018.html>

癫痫小鼠颅脑损伤后海马与顶叶皮质中 C-FOS 蛋白的表达

杨延平¹, 孟 辉², 刘建新³

(1 陕西能源职业技术学院 医学技术系, 陕西 西安 710613; 2 陕西省交通医院, 陕西 西安 710068;

3 西安交通大学 医学院 神经生物学研究所, 陕西 西安 710061)

【摘要】 **【目的】**探讨具有癫痫基础病变小鼠在遭受颅脑损伤时, 海马和顶叶皮质中 C-FOS 表达与损伤的相关性及其在损伤中的意义, 为癫痫后颅脑损伤复合病变研究提供理论依据。 **【方法】**用腹腔注射匹罗卡品法构建小鼠(2 周龄)癫痫模型, 饲养 4 周后(6 周龄)采用自由落体法构建闭合性颅脑损伤小鼠模型和癫痫+闭合性颅脑损伤小鼠模型, 同时以正常小鼠为对照, 于造模后 0.5、3 h 及 1、3、7 d 取小鼠大脑, 制备切片, 采用尼氏染色、免疫组织化学染色方法, 从形态学以及蛋白质水平上研究各组小鼠大脑海马和顶叶皮质中 C-FOS 的表达情况。 **【结果】**癫痫模型、闭合性颅脑损伤模型及癫痫+闭合性颅脑损伤小鼠模型均构建成功。免疫组织化学染色结果显示, 癫痫合并闭合性颅脑损伤小鼠顶叶皮质、海马均有着色深浅不同、数目不等的 C-FOS 阳性细胞。与对照组相比, 单纯癫痫组、单纯闭合性颅脑损伤组、癫痫+闭合性颅脑损伤组 C-FOS 灰度值均显著($P < 0.05$)或极显著降低($P < 0.01$); 癫痫+闭合性颅脑损伤组小鼠海马和顶叶皮质 C-FOS 阳性细胞数均显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)高于单纯癫痫组与单纯闭合性颅脑损伤组。 **【结论】**癫痫小鼠颅脑损伤后, 海马和顶叶皮质持续高表达 C-FOS, 从而促进神经细胞凋亡, 加重颅脑损伤后的病理变化。

【关键词】 小鼠; 癫痫; 创伤性颅脑损伤; C-FOS 蛋白

【中图分类号】 Q78

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)07-0044-07

Epilepsy alters the expression of C-FOS protein in hippocampus and cortex of parietal lobe of adult mice insulted by traumatic injury

YANG Yan-ping¹, MENG Hui², LIU Jian-xin³

(1 Department of Medical Technology, Shaanxi Energy Institute, Xi'an, Shaanxi 710613, China; 2 Shaanxi Jiaotong Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China; 3 Institute of Neurobiology, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract: **【Objective】** The study was done to elucidate the influences of epileptic brain on the expression of C-FOS following Traumatic Brain Injury (TBI). **【Method】** The status epilepticus of two-week-old mice were induced by a single i. p. injection of Pilocarpine. Fed for another 4 weeks (6 weeks) after the free fall method, a closed head injury mice model and epilepsy+closed head injury model were constructed. Animals were then sacrificed 0.5, 3 h and 1, 3, 7 d after TBI and the brains were processed for quantitative immunohistochemical of C-FOS in hippocampus and cortex. **【Results】** Model of epilepsy, closed head injury and epilepsy model+closed head injury in mice model were constructed successfully, immunohistochemical staining showed that the epilepsy associated with craniocerebral injury in mouse parietal cortex, the hippo-

* [收稿日期] 2012-03-08

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金 (20100201120067)

[作者简介] 杨延平(1969—), 男, 陕西延安人, 副教授, 主要从事中枢神经病变与康复研究。E-mail: yangyanping6105@163.com

[通信作者] 孟 辉(1968—), 男, 陕西蒲城人, 副主任医师, 主要从事脑外伤研究。E-mail: mytao1014@126.com

campus had different coloring shades, not the number of the C-FOS-positive cells; with the blank control group, closed head injury group, simply head injury group, epilepsy, craniocerebral injury group, the C-FOS expression was significantly increased and maintained at a relatively high level ($P < 0.05$ or 0.01); epilepsy, craniocerebral injuries mice hippocampus and parietal cortex C-FOS-positive cell counts were also significantly ($P < 0.05$) or highly significantly ($P < 0.01$) higher than the pure epilepsy group with closed traumatic brain injury alone group. 【Conclusion】 Epilepsy the basis of lesions in mice brain injury, hippocampal, and parietal cortex sustained high expression of the C-FOS. Epilepsy lesions of brain damage, possibly through sustained high expression of the C-FOS to promote neuronal apoptosis, increased pathological changes after traumatic brain injury.

Key words: mouse; epilepsy; traumatic brain injury; C-FOS protein

创伤性颅脑损伤(Traumatic Brain Injury, TBI)对人类生命健康危害巨大,其发生率和损伤后致死率、致残率逐年上升,因此开展此方面的相关研究十分必要。传统观点认为,坏死是颅脑损伤后神经细胞死亡的惟一方式,但近年来国内外的研究表明,创伤性颅脑损伤中存在细胞凋亡,神经细胞死亡可能通过坏死和凋亡2种途径实现^[1]。由于细胞坏死不可修复,因此人们试图通过对细胞凋亡途径进行调控从而更好地改善创伤性颅脑损伤的预后。然而,目前对创伤性颅脑损伤与神经细胞凋亡调控的研究,大多建立在单纯创伤性颅脑损伤的基础上,对已存在神经组织基础病变的颅脑损伤的研究尚未见报道。

癫痫(Epilepsy)是最常见的神经系统疾病之一,癫痫发作后的持续状态(Status epilepticus, SE)可造成脑的持久性损伤,导致认知功能障碍,增加痫性发作的复发风险^[2]。一次长时间或反复的癫痫发作可引起海马等易损区神经元坏死、反应性胶质细胞增生、苔藓纤维发芽以及形成高兴奋性神经通路等病理改变^[3]。C-FOS是一种即早基因(Immediate early genes, IEG),可在中枢神经系统的某些部位低水平表达,当机体受到某些病理和生理性刺激后,C-FOS表达量迅速增加,成为脑内神经元兴奋性激活的标志。其编码的C-FOS蛋白是一种核蛋白,属于内源性损伤因子,也是神经元受损程度的标记物,其表达水平的高低,间接反映了神经元的损伤程度。目前,有关癫痫持续状态下颅脑损伤中C-FOS蛋白表达的研究尚未见报道。为此,本研究首次报道癫痫持续状态小鼠在遭受颅脑损伤时C-FOS蛋白表达的变化,探讨具有神经组织基础病变的小鼠颅脑在遭受损伤时,C-FOS蛋白表达与颅脑损伤的相关性及其在颅脑损伤中的意义,为颅脑损伤治疗的深入研究提供实验基础和理论依据,以提高对具有基础病变的颅脑外伤治疗和预后水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器及试剂 主要仪器有SLEE CRY-OSTAT MNT全自动冰冻切片机(美国),Olympus BX51显微镜,Metamorph/DP71/BX51型图像分析仪(日本)。主要试剂有兔抗鼠C-FOS单克隆抗体(Santa Cruz),生物素化C-反应蛋白抗体IgG(上海信然),Sp-9001免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中杉),ZLI-9032樱花牌冷冻切片包埋剂(OCT)、Pilocarpine(Sigma),氢溴酸东莨菪碱(上海禾丰)。

1.1.2 试验动物 清洁级健康雄性昆明小鼠,由西安交通大学医学院动物实验中心提供,300只,2周龄,体质量10~12 g/只。

1.2 小鼠模型的制备

1.2.1 癫痫(EP)模型的制备^[4] 将2周龄小鼠300只随机分为备用组($n=100$)和致癫痫组(EP组, $n=200$)。所有小鼠均皮下注射氢溴酸东莨菪碱1 mg/kg,30 min后EP组小鼠腹腔注射匹罗卡品300 mg/kg,备用组小鼠腹腔注射生理盐水35 μ L/g,连续观察5 h,注意小鼠是否有癫痫发作,并按文献[5]的分级标准(0级.无抽搐;Ⅰ级.耳、面部抽搐;Ⅱ级.肌阵挛,但无直立位;Ⅲ级.肌阵挛,伴直立位;Ⅳ级.全身强直阵挛发作;Ⅴ级.强直阵挛发作,并失去体位控制)进行分级,以持续出现5 h以上Ⅲ~Ⅴ级癫痫,但在解除癫痫发作后状态良好的小鼠为癫痫持续状态模型小鼠。EP组小鼠及备用组小鼠分笼饲养4周,常规饮食,放置在安静、光线较暗的地方,避免相互激惹和声光刺激而再次诱发癫痫。

1.2.2 闭合性颅脑损伤(TBI)模型及癫痫+闭合性颅脑损伤(EP+TBI)模型的制备 参考文献[6]的方法,采用自由落体装置制作闭合性脑损伤模型。取多功能架1台,在其金属杆顶端固定一个朝向平

台端试管夹,夹端固定竖立的带刻度玻璃管(管径 6 mm),玻璃管上套一个可以在杆上自由滑动的螺母(内径 6.5 mm,质量 50 g),用橡皮泥将一个锥形金属锤(尖端直径 3 mm)固定于玻璃管的底端,在距玻璃管低端 10 cm 处固定电磁铁,用以吸附螺母。

从备用组中取饲养 4 周存活的健康小鼠 85 只,随机分为闭合性颅脑损伤模型组(TBI 组, $n=60$)和对照组(CK, $n=25$);取饲养 4 周存活的癫痫模型小鼠 60 只作为癫痫+闭合性颅脑损伤模型组(EP+TBI 组)。将以上 3 组小鼠分别用 50 g/L 的苦味酸标记编号后,注射 100 g/L 水合氯醛(剂量为 40 mg/kg)麻醉,将 TBI 组和 EP+TBI 组小鼠固定于多功能架底部平台上,使其下颌紧贴于平台的边缘,调整玻璃管高度,将金属锤头端顶在小鼠的颅骨上,位置约在正中矢状线右侧 2~4 mm 处,给电磁铁通电吸附螺母,断电后使其自由落下,通过撞击金属锤,造成闭合性颅脑损伤。对照组小鼠抓持过程同上,但不放下螺母。观察 3 组小鼠的症状并统计死亡率。

1.3 小鼠脑组织的采集和切片制作

分别于造模后 0.5, 3 h 及 1, 3, 7 d 取各组小鼠 5 只,腹腔注射 100 g/L 水合氯醛麻醉(剂量为 40 mg/kg);剪开胸腔,用磨钝头皮针从与鼠体纵轴成 45°角方向插入左心室,剪开右心耳,快速滴注温生理盐水 100 mL;再滴注 4℃的 40 g/L 多聚甲醛 200 mL,先快后慢,持续 1 h;断头取脑,置 40 g/L 多聚甲醛中固定过夜;分次浸入 200, 300 g/L 蔗糖沉底,梯度酒精(体积分数 70%, 80%, 90%, 95% 和 100%)脱水,二甲苯透明;用组织包埋剂包埋修整脑组织,快速制作冠状面冰冻的切片,片厚 40 μ m,取含背海马、大脑顶叶皮质的切片,置 0.01 mol/L PBS 溶液中,于 4℃冰箱保存待染。

1.4 小鼠脑组织的染色观察

1.4.1 尼氏染色 取 CK 和 EP+TBI 组冰冻切片,用 0.01 mol/L PBS 洗 10 min,室温下与甲苯胺蓝染液作用 5 min,用蒸馏水冲洗至水中无明显蓝色,梯度酒精脱水分色,二甲苯透明,中性树胶封片,贴标签,光镜下观察并照相。

1.4.2 免疫组织化学染色 冰冻切片用 0.01 mol/L PBS 振荡洗涤 3 次(每次 10 min,后续步骤每次洗涤时间均为 10 min),滴加体积分数 0.3% H_2O_2 ,室温浸泡 30 min;用 0.01 mol/L PBS 振荡洗涤 3 次,加体积分数 0.1% Triton,室温浸泡 30 min;0.01 mol/L PBS 振荡洗涤 3 次,加正常兔血清封闭液封闭 30 min;滴加一抗工作液(兔抗鼠 C-FOS

单克隆抗体,抗体浓度为 1:200),置于湿盒中在 4℃冰箱内孵育 72 h;0.01 mol/L PBS 振荡洗涤 3 次,滴加二抗工作液(生物素化 C-反应蛋白抗体 IgG),37℃孵育 1 h;0.01 mol/L PBS 洗 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液(S-A/HRP),37℃孵育 30 min,0.01 mol/L PBS 振荡洗涤 2 次,TBS 洗 1 次,DAB 显色试剂盒显色 3 min;0.01 mol/L PBS 振荡洗涤 3 次,裱片阴干,常规脱水、透明,中性树胶封片,最后用 Metamorph/DP71/BX51 型图像分析仪观察,应用 i-solution 图像分析软件进行 C-FOS 阳性细胞计数和灰度值测定。每只小鼠各时相点选 5 张切片,海马和顶叶皮质各选择 5 个视野,海马的 5 个视野从背侧海马 CA1~CA3 锥体细胞层均匀选择,顶叶皮质视野包含 II~VI 层。灰度值测定以同张切片胼胝体灰度值进行校正。

1.5 统计学处理

数据以“平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)”表示,应用 Graphpad Prism 4.0 进行数据统计分析,用单因素方差分析(One-Way ANOVA Newman-Keuls post-hoc multiple comparisons)进行多组比较, $P < 0.05$ 为具有显著差异, $P < 0.01$ 为具有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 小鼠 EP 模型的建立

备用组小鼠均无癫痫发作。EP 组所有试验小鼠在腹腔注射匹罗卡品后 5~10 min 出现竖毛、流涎、抖动等外周胆碱能反应,接着出现湿狗样震颤、凝视、静止不动、咀嚼、吸鼻、尾巴直立上翘、反复头颈上仰等,随后出现面部阵挛、点头、前后肢痉挛、伴直立、追尾、翻转或跌倒,最终发展至全身强直痉挛。18~33 min 后,有 130 只小鼠呈 III~V 级癫痫持续状态,其中 III 级 43 只,IV 级 40 只,V 级 47 只,癫痫持续状态发生率为 65.0%;这 130 只小鼠中有 24 只在 5 h 内抽搐致死,有 106 只存活达 5 h 以上,为癫痫持续状态模型成功小鼠,另有 20 只在饲养过程中死亡,死亡率约 33.8%。癫痫诱导成功后 4 周,对 EP 组小鼠脑组织尼氏染色,结果显示,海马扇形区有明显的细胞丢失现象,证实 EP 模型制作成功。

2.2 小鼠 TBI 和 EP+TBI 模型的建立

造模后,TBI 和 EP+TBI 组小鼠立即出现抽搐、呼吸节律改变等症状,部分鼠外观可见损伤部位肿大、颜色发青等。建模时,TBI 组有 15 只小鼠死亡,死亡率为 25%;而 EP+TBI 组有 30 只小鼠死亡,死亡率为 50%。

2.3 癫痫小鼠颅脑损伤后海马和顶叶皮质的尼氏染色结果

癫痫小鼠颅脑损伤后海马和顶叶皮质的尼氏染色结果见图 1。图 1 显示,对照组海马、顶叶皮质神

经元可见大量的颗粒细胞及锥体细胞,细胞排列整齐致密,胞浆透亮,染色质均匀,形态正常,胞浆内尼氏小体丰富。

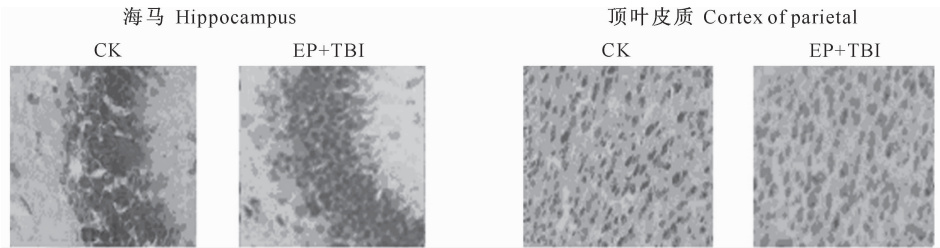


图 1 癫痫小鼠颅脑损伤后海马(×400)和顶叶皮质(×40)的尼氏染色结果
Fig. 1 Epilepsy mice after craniocerebral injury in the hippocampus (×400) and parietal lobe cortex (×40) Nebuchadnezzar's dyeing

造模 3 h 后,在 EP+TBI 组小鼠大脑顶叶皮质、海马中可见颗粒细胞及锥体细胞,但细胞排列紊乱,轮廓模糊、边界不清,形态不完整,细胞肿胀、间距加大,胞浆内尼氏小体减少(图 1)。

2.4 癫痫小鼠颅脑损伤后海马与顶叶皮质 C-FOS 免疫组织化学染色结果

癫痫小鼠颅脑损伤后海马与顶叶皮质 C-FOS 免疫组织化学染色结果见图 2。

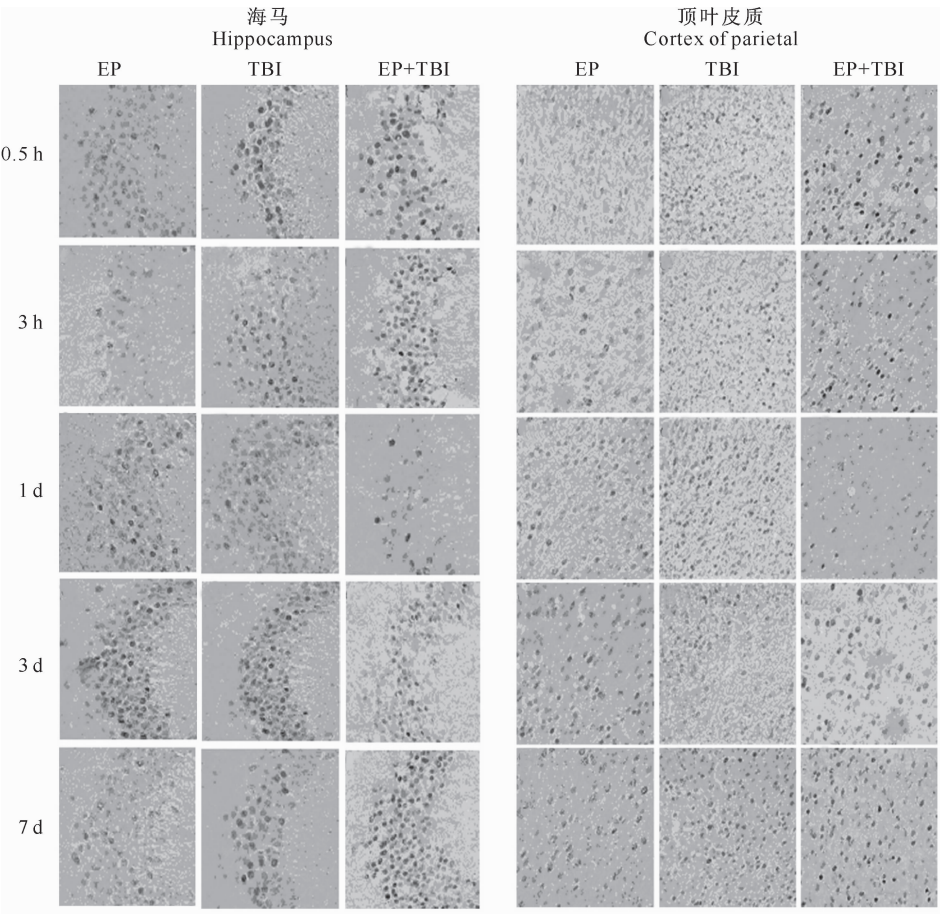


图 2 癫痫、闭合性颅脑损伤、癫痫+闭合性颅脑损伤小鼠脑组织海马(×400)和顶叶皮质(×40)C-FOS 的免疫组织化学染色结果

Fig. 2 C-FOS immunohistochemical staining in hippocampus (×400) and parietal cortex (×40) of EP,TBI and EP+TBI mouse

C-FOS 蛋白主要定位于胞核或胞浆,光学显微镜下,可见 EP 组、TBI 组和 EP+TBI 组小鼠海马、顶叶皮质均有着色深浅不同、数目不等的棕黄色 C-FOS 阳性细胞(图 2)。EP 组、TBI 组、EP+TBI 组小鼠海马和顶叶皮质 C-FOS 阳性细胞数均显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)高于对照组;EP+

TBI 组小鼠海马和顶叶皮质 C-FOS 阳性细胞数大多也显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)高于 EP 组、TBI 组;EP 组海马和顶叶皮质中的 C-FOS 阳性细胞数在 3 h 和 3 d 均明显增加,呈现双峰现象,但 EP+TBI 组海马和顶叶皮质中的 C-FOS 阳性细胞数只有 1 个峰,且峰值出现在损伤后 3 h(表 1)。

表 1 癫痫、闭合性颅脑损伤、癫痫+闭合性颅脑损伤小鼠脑组织海马和顶叶皮中的 C-FOS 阳性细胞数

Table 1 Counting of C-FOS immonohistochemical staining positive cells in hippocampus and parietal cortex of EP,TBI and EP+TBI mouse

组别 Group	海马 Hippocampus				
	0.5 h	3 h	1 d	3 d	7 d
对照组 CK	75.70±6.30 aA	85.50±8.75 aA	90.01±11.04 aA	70.72±12.67 aA	86.97±10.56 aA
EP 组 EP group	120.02±7.43 bB	182.47±9.56 bB	142.69±8.56 bB	175.23±20.23 bB	120.21±6.21 bB
TBI 组 TBI group	95.23±5.21 cAB	182.12±9.21 bB	160.11±14.23 bB	99.56±6.35 cAB	100.11±10.21 bAB
EP+TBI 组 EP+TBI group	200.58±19.24 dB	246.56±14.21 cB	200.17±20.45 cB	129.23±26.23 dB	126.32±16.42 bB

组别 Group	顶叶皮质 Cortex of parietal				
	0.5 h	3 h	1 d	3 d	7 d
对照组 CK	301.02±14.08 aA	365.25±13.25 aA	324.08±19.35 aA	230.00±11.20 aA	295.06±34.36 aA
EP 组 EP group	330.04±21.05 bAB	562.48±20.14 bB	478.10±23.12 bB	599.30±18.32 bB	406.70±38.32 bB
TBI 组 TBI group	356.20±12.05 bAB	530.10±22.01 bB	348.26±19.31 bAB	350.36±29.56 cAB	231.12±11.20 bAB
EP+TBI 组 EP+TBI group	486.56±12.05 cB	600.12±30.04 bB	461.22±30.25 cB	486.54±32.00 dB	336.00±29.35 cAB

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$)。表 2 同。
Note: Values in the same column marked different small letters means significant difference($P<0.05$),marked with different capital letter means extremely significant difference ($P<0.01$). The same as table 2.

由表 2 可知,与对照组相比,EP 组、TBI 组和 EP+TBI 组小鼠脑组织海马、顶叶皮质 C-FOS 阳性细胞灰度值显著($P<0.05$)或极显著降低($P<0.01$)。EP 组 C-FOS 阳性细胞灰度值呈倒双峰变

化,最低值分别出现在 3 h 和 3 d;TBI 组、EP+TBI 组 C-FOS 阳性细胞灰度值最低值均出现在损伤后 3 h。在 3 h 时,EP+TBI 组与 TBI 组和 EP 组 C-FOS 阳性细胞灰度值均有显著性差异。

表 2 癫痫、闭合性颅脑损伤、癫痫+闭合性颅脑损伤小鼠脑组织海马和顶叶皮质中 C-FOS 阳性细胞的灰度值

Table 2 Grey value of C-FOS immonohistochemical staining positive cells in hippocampus and parietal cortex of EP,TBI and EP+TBI mouse

组别 Group	海马 Hippocampus				
	0.5 h	3 h	1 d	3 d	7 d
对照组 CK	220±3.26 aA	209±2.12 aA	217±3.26 aA	220±3.56 aA	220±5.26 aA
EP 组 EP group	187±5.18 bB	158±6.64 bB	195±4.95 bAB	163±2.92 bB	188±6.56 bB
TBI 组 TBI group	177±5.04 bB	161±7.38 bB	198±5.32 bAB	189±6.12 cB	169±2.28 cB
EP+TBI 组 EP+TBI group	172±4.04 cB	170±3.44 cB	176±3.26 cB	194±6.00 dB	197±5.18 bB

组别 Group	顶叶皮质 Cortex of parietal				
	0.5 h	3 h	1 d	3 d	7 d
对照组 CK	209±2.12 aA	220±3.26 aA	220±5.36 aA	215±3.36 aA	221±4.00 aA
EP 组 EP group	188±3.94 bB	156±3.06 bB	169±6.26 bB	150±3.14 bB	189±4.94 bB
TBI 组 TBI group	182±2.36 bB	152±3.28 bB	159±3.28 cB	173±5.96 cB	188±6.86 bB
EP+TBI 组 EP+TBI group	170±3.86 cB	146±3.18 cB	172±4.24 bB	159±6.36 bB	186±3.12 bB

3 讨 论

3.1 匹罗卡品致癫痫持续状态(SE)模型的构建

癫痫是神经系统常见病,临床表现以慢性、自发性和反复性发作为特征。本研究所采用匹罗卡品致

癫痫 SE 模型是近年来国内外常用的一种癫痫化学点燃模型^[7-8],其病程发展(癫痫持续状态—潜伏期—反复自发癫痫发作)及海马等边缘结构的病理变化均与人类癫痫疾病相似^[9-11]。

本研究中,小鼠癫痫诱导成功的行为学判定标

准为:竖毛、凝视、静止不动、吸鼻或湿狗样震颤,尾巴直立上翘,进而发展为反复头颈上仰等,头面部阵挛、翻转或跌倒,最终呈快速点头样动作,持续 5 h 以上者作为 EP 模型制作成功小鼠,用于下一步试验。癫痫诱导 4 周后,EP 组小鼠脑组织尼氏染色结果显示,海马扇形(CA)区有明显的细胞丢失现象,这也证实了 EP 模型制作成功。

3.2 C-FOS 表达与颅脑损伤的关系及其在有基础病变颅脑损伤中的意义

细胞凋亡受基因调控。在创伤性颅脑损伤后神经元的凋亡过程中,目前研究较多的调控基因主要有即刻早期基因 *IEG*、*Bcl-2* 基因家族,*Caspase* 基因家族,*p53* 基因家族的 *Fas* 与 *Fas-L* 等。正常情况下,*IEG* 在神经元中的表达水平极低,但当脑组织受到癫痫、缺血、创伤等因素刺激之后,*IEG* 可被不同程度地激活。*C-FOS* 是最常见的即刻早期基因,其表达产物 C-FOS 蛋白和 *IEG* 家族中的 *C-JUN* 所表达核蛋白 JUN 结合形成异源二聚体复合物,即转录激活蛋白 1 (AP-1)^[12]。AP-1 参与了 DNA 调节序列结合蛋白质复合物的构成,可被基因启动或增强子序列识别并结合,同时能调节前脑啡肽、神经生长因子、血管活性肠肽、酪氨酸羟化酶等其他后期反应基因的长期表达,诱导或促进迟发性神经细胞的凋亡,表明 C-FOS 表达与细胞损伤后的继发改变有关^[13]。

C-FOS 表达具有快速、短暂的时间依赖特征,解除相应刺激后,其表达也很快消失,且其表达量与损伤程度呈正相关^[14-17]。本试验建立 EP 模型 30 min 后,小鼠大脑顶叶皮质和海马中均有 C-FOS 阳性细胞,且阳性细胞数于造模后 3 h 和 3 d 分别达到峰值,呈双峰表现,其与对照组有显著或极显著差异。原因可能是,癫痫、机械性损伤可激活钙离子通道,使 Ca^{2+} 内流,细胞内 Ca^{2+} 浓度增高,从而诱导 C-FOS 高表达,导致第 1 次表达高峰;随后,由于脑水肿导致脑血管痉挛,再灌注损伤和伤后神经元代谢障碍会引起兴奋性氨基酸含量增高,兴奋性氨基酸作用于 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体,使其激活引起钙离子通道开放,细胞内 Ca^{2+} 浓度急剧增高,导致 C-FOS 又一次高表达,这可能是第 2 次表达高峰出现的原因。在 EP+TBI 组中,造模后 0.5 h 小鼠大脑顶叶皮质和海马即出现较高水平的 C-FOS 表达,3 h 达峰值,且维持在相对较高水平;EP 组与其不同,1 d 后其 C-FOS 表达水平出现明显的下降,并呈双峰。产生这种变化的原因可能是,由

于 EP+TBI 动物模型处于具有反复自发作特性的癫痫慢性期,合并颅脑损伤后,在双重刺激下引起较为明显的 C-FOS 阳性表达,并且维持在相对较高水平,在此期间无明显下降^[18]。C-FOS 的持续高表达可诱导 *p53* 表达增加,持续增加的 *p53* 可直接诱导启动细胞凋亡程序,使神经细胞凋亡,导致继发性脑损伤。本试验结果提示,具有癫痫病变的大脑可能通过 C-FOS 的持续高表达促进神经细胞凋亡,加重颅脑损伤后的病理变化。因此,寻找有效的 C-FOS 表达抑制剂,有望为具有基础病变继发颅脑损伤的治疗开辟新途径。

4 结 论

C-FOS 在癫痫合并颅脑损伤动物模型中高水平表达,表明 C-FOS 参与了调控癫痫合并颅脑损伤后的神经细胞凋亡;小鼠癫痫可以快速诱导并明显增加成年后颅脑损伤后顶叶皮质和海马中 C-FOS 的高表达,提示具有癫痫病变基础的大脑可能通过促进细胞凋亡加重颅脑损伤后的病理变化。

[参考文献]

- [1] Ng I, Yeo T T, Tang W Y, et al. Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans [J]. *Neurosurgery*, 2000, 46(4): 949-956.
- [2] Van Eijsden P, Notenboom R G, Wu O de, et al. *In vivo* 1H magnetic resonance spectroscopy, T2-weighted and diffusion-weighted MRI during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in the rat [J]. *Brain Research*, 2004, 1030(1): 11-18.
- [3] Wasterlain C G, Niquet J, Bim, et al. Seizure-induced neuronal death in the immature brain [J]. *Prog Brain Res*, 2002, 135: 335-353.
- [4] Yu J M, Zhang K Z, Jiang Y P. Establishing the mouse models of acute epilepsy induced by pilocarpine [J]. *Zhongguo Lingchuang Kangfu*, 2005, 9(29): 55.
- [5] Vourliotis E M, Riechert U, Holtt V, et al. Pentylentetrazole (PIZ)-induced c-Fos expression in the hippocampus of kindled rats is suppressed by concomitant treatment with naloxone [J]. *Brain Res*, 1998, 792(2): 299-308.
- [6] Feeney D M, Boyeson M G, Linn R T, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat [J]. *Brain Res*, 1981, 211: 67-77.
- [7] Furtado M A, Braga G K. Behavioral, morphologic and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal micro injection of pilocarpine [J]. *Epilepsia*, 2002, 43(Suppl 5): 37-39.
- [8] Turski W A. Pilocarpine-induced seizures in rodents-17 years on [J]. *Pol J Pharmacol*, 2000, 52(1): 63-65.
- [9] Costa M S, Rocha J B. Pilocarpine induced status epilepticus increases glutamate release in rat hippocampal synaptosomes

[J]. *Neurasci Let*, 2004, 356(1): 41-44.

[10] Glien M, Brandt C, Potschka H, et al. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: Low mortality but high proportion of rats developing epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2001, 46(2): 111-119.

[11] Kaya S S, Mahmood A, Li Y, et al. Apoptosis and expression of P53 response protein and cyclin D1 after cortical impact in rat brain [J]. *Brain Res*, 1999, 818(1): 23-33.

[12] Abrous D N, Rodriguez J, Ie Mosl M, et al. Effects of mild traumatic brain injury on immunoreactivity for the inducible transcription factors c-Fos, c-Jun, JunB and krox 24 in cerebral regions associated with conditioned fear responding [J]. *Brain Res*, 1999, 826(2): 181.

[13] Zhang X, Li A D, Wang T H, et al. The study on the apoptosis of nerve cells of spinal cord of rat following unilaterals sciatic nerve transection [J]. *Zhongguo Linchuang Kangfu*, 2003, 7(2): 202.

[14] Raghupathi R, McIntosh T K. Regionally and temporally distinct patterns of induction of c-fos, c-jun and jun-B mRNAs following experimental brain injury in the rat [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 37(12): 134.

[15] 童民锋, 刘伟国. *c-fos* 基因在大鼠创伤性颅脑损伤中不同阶段表达水平与细胞凋亡关系的研究 [J]. *浙江创伤外科*, 2009, 14(5): 432-433. (in Chinese)

Tong M F, Liu W G. Study on the expression of c-fos on different stages after traumatic brain injury and the relationship between the expression and apoptosis after head trauma [J]. *Zhejiang Journal of Traumatic Surgery*, 2009, 14(5): 432-433. (in Chinese)

[16] Hayes R L, Yang K. Changes in gene expression following traumatic brain injury in the rat [J]. *Neurotrauma*, 1995, 12(5): 779.

[17] Ivkovic S, Kanazir S, Stogiljkovic M, et al. Desensitization of *c-fos* mRNA expression in the rat brain following cortical lesions [J]. *Mol Cell Neurosci*, 1994, 5(1): 11.

[18] 陈丽丽, 黄靓妹, 詹红艳, 等. 匹鲁卡品致癫痫大鼠皮质和海马 C-fos 的表达变化 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(20): 2026-2029.

Chen L L, Huang L M, Zhan H Y, et al. Expression of C-fos in the cortex and hippocampus of rats after Pilocarpine-induced seizure [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2011, 20(20): 2026-2029. (in Chinese)

(上接第 43 页)

[12] 江千里, 王建民, 温丽敏, 等. 批量快速测定法测定标记基因为 *GFP* 的重组病毒滴度 [J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23(9): 1304-1305.

Jiang Q L, Wang J M, Wen L M, et al. Establishing a realtime large-scale recombinant virus titering method taking *GFP* as marker gene [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2002, 23(9): 1304-1305. (in Chinese)

[13] Ren X W, Liang M, Meng X, et al. A tumor-specific conditionally replicative adenovirus vector expressing TRAIL for gene therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2006, 13(2): 159-168.

[14] Sipo I, Hurtado P A, Wang X, et al. An improved Tet-On regulatable FasL-adenovirus vector system for lung cancer therapy [J]. *J Mol Med Germany*, 2006, 84(3): 215-225.

[15] 熊晓峰, 陈陵, 范亚川, 等. 负载 hTERT 调控相关 miR-138 复制缺陷型腺病毒的包装及鉴定 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(9): 896-898.

Xiong X F, Chen L, Fan Y C, et al. Package and identification of replication deficient adenovirus carrying hTERT-regulated miR-138 [J]. *Chongqing Medicine*, 2011, 40(9): 896-898. (in Chinese)