

## 额叶 p-mTOR 异常表达与外伤性癫痫发生的相关研究

张艳丽<sup>1</sup>, 吐尔逊·沙比尔<sup>2</sup>

**【摘要】** 目的:探索外伤性癫痫(Posttraumatic epilepsy, PTE)发生与额叶 p-mTOR 异常表达的相关性。方法:将 78 只成年雄性 SD 大鼠分为正常对照组(A组)6只,生理盐水对照组(B组)和癫痫模型组(C组)各 36 只,C组右侧额叶注射 FeCl<sub>2</sub> 造模。应用免疫组化技术检测造模后 1h、24h、1周、2周、4周各组大鼠额叶皮质中 p-mTOR (Ser2448)的动态表达。结果:A组额叶 p-mTOR(Ser2448)表达的免疫组织化学染色,神经元胞质呈浅棕色,提示弱阳性表达;B组细胞染色程度较A组加深,p-mTOR(Ser2448)表达阳性细胞数增加;C组可见细胞结构紊乱,胞质呈明显的棕黄色,提示该蛋白在胞质中呈强阳性表达。C组和B组比较,1h表达开始升高( $t = -1.435, P = 0.182$ ),但差异无统计学意义,1周表达高峰( $t = -4.073, P = 0.002$ ),2周降低( $t = -2.614, P = 0.026$ ),4周时再次升高( $t = -2.506, P = 0.031$ ),差异具有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。结论:PTE的发病机制可能与 mTOR 信号通路上 p-mTOR(Ser2448)的表达异常增加有关。

**【关键词】** 外伤性癫痫;mTOR通路;发病机制

**【中图分类号】** R49;R742.1 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2018.02.001

**Assessment of the correlation between posttraumatic epilepsy and the abnormal expression of p-mTOR in frontal lobe**  
Zhang Yanli, Tuerxun·Shabier. Division of Rehabilitation Medicine, Department of Neurology, Heze Municipal Hospital in Shandong Province, Heze 274000, China

**【Abstract】 Objective:** To explore the correlation between the abnormal expression of p-mTOR in the frontal lobe and posttraumatic epilepsy (PTE). **Methods:** Adult male SD rats were randomly divided into control group ( $n=6$ ), saline group ( $n=36$ ) and epilepsy group ( $n=36$ ). Models were established by injecting FeCl<sub>2</sub> into the right frontal lobe. Immunohistochemistry was used to detect the dynamic expression of p-mTOR (Ser2448) in the frontal cortex of rats at different time points (1 h, 24 h, 1 week, 2 weeks, and 4 weeks after modeling). **Results:** As compared with the saline group, the expression of p-mTOR (Ser2448) in the frontal cortex of the epilepsy group began to increase after 1 h ( $t = -1.435, P = 0.182$ ), reached its maximum after 1 week ( $t = -4.073, P = 0.002$ ), reduced after 2 weeks ( $t = -2.614, P = 0.026$ ) and rose again after 4 weeks ( $t = -2.506, P = 0.031$ ). The difference was statistically significant. **Conclusion:** The pathogenesis of PTE may be related to the abnormal increase of the expression of p-mTOR (Ser2448) protein in the mTOR signaling pathway.

**【Key words】** posttraumatic epilepsy; mTOR pathway; pathogenesis

外伤性癫痫(Posttraumatic epilepsy, PTE)是继发于创伤性脑损伤(Traumatic brain injury, TBI)后的发作性功能异常。PTE是脑外伤的常见后遗症,在TBI患者中有着较高的发病率和死亡率<sup>[1]</sup>,同时也是临床上难治性癫痫的常见原因。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, p-mTOR)是一

种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,具有复杂的生物学效应,越来越多的证据表明 mTOR 异常激活可诱导 PTE 的发生,并在 TBI 患者及 PTE 动物模型中 mTOR 通过磷酸化被激活,活化的 mTOR 可通过磷酸化下游多种效应分子产生多重病理生理改变而引起癫痫的进一步发展<sup>[2]</sup>。既往研究发现人与鼠的 mTOR 序列一致性高达 98%<sup>[3]</sup>。目前在其他病因引起的癫痫中发现 mTOR 通路的异常激活,但 mTOR 信号通路在 PTE 中的激活情况及与 PTE 的关系目前还不明确<sup>[4-5]</sup>。目前 PTE 的动物模型有铁离子模型、液压打击模型、自由落体模型、控制性皮质撞击模型等,由于铁离子模型接近人类脑外伤后出血的病理及临床改变,成功率

基金项目:国家自然科学基金(81260180)

收稿日期:2016-05-06

作者单位:1. 菏泽市立医院神经内科康复医学病区,山东 菏泽 274000;

2. 新疆医科大学第一附属医院神经内科,乌鲁木齐 830054

作者简介:张艳丽(1975-),女,副主任医师,主要从事神经康复方面的研究。

通讯作者:吐尔逊·沙比尔,tuerxun1215@163.com

高,便于观察及干预性的研究,同时额叶皮质定位操作简单,故本实验通过常用的右额叶注射  $\text{FeCl}_2$  法建立 PTE 大鼠模型<sup>[6]</sup>,观察额叶皮质 mTOR 通路相关蛋白 p-mTOR(Ser2448)的动态表达,探讨其在 PTE 中的发病作用,为 PTE 的防治提供理论基础。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 健康成年雄性 SD 大鼠 78 只,体重 180~220g,分为正常对照组(A组,  $n=6$ ),生理盐水对照组(B组,  $n=36$ )和癫痫模型组(C组,  $n=36$ )。

1.2 方法 ①PTE 模型的制作:大鼠以 10%水合氯醛(350mg/kg)腹腔麻醉,术区备皮后固定于大鼠立体定向仪头架上,消毒,暴露颅骨,生理盐水组和癫痫模型组大鼠右额叶皮质的钻孔坐标为:前囟前 2.0mm,中线旁 3.0mm,硬膜下 2.0mm,然后微量进样器缓慢进针至靶点,分别向靶点缓慢注射 10 $\mu\text{L}$  的生理盐水或  $\text{FeCl}_2$  (0.1mol/L)<sup>[6]</sup>, $\text{FeCl}_2$  粉剂由武汉莱康生物提供。速率均为 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ ,注射后留针 5min。麻醉清醒后进行行为学检测,根据 Racine 分级判断模型是否成功,0级:无任何癫痫发作;I级:凝视发作;II级:出现规律性点头或湿狗样抖动,伴有或不伴有面部抽动记;III级:一侧前肢震颤;IV级:站立、双前肢震颤及持续性点头;V级:前肢震颤加重,失去平衡跌倒而出现全身性强直-阵挛性发作;VI级:发作衰竭导致死亡,出现 4 级或以上发作行为为制模成功<sup>[7]</sup>。②动物处理:分别于制模后 1h、24h、1周、2周、4周,先分别从 A、B、C 组各取 6 只,腹腔麻醉(以 100g/L 水合氯醛 300g/kg 腹腔麻醉)后,夹闭腹主动脉和下腔静脉,经升主动脉插管,灌注生理盐水 200ml,再灌注含 4%多聚甲醛的 0.1mol/L PBS(pH7.4, 4 $^{\circ}\text{C}$ ) 300ml,缓慢灌注至肢体完全僵硬、断头完整取脑,矢状切片,福尔马林固定,石蜡包埋,石蜡包埋后切片厚 3 $\mu\text{m}$ 。二甲苯脱蜡 3 次,每次 2min,然后切片常规脱蜡、水化(环保透明脱蜡液 30min $\rightarrow$ 无水乙醇 5s $\rightarrow$ 95%乙醇 10s $\rightarrow$ 80%乙醇 5s $\rightarrow$ 自来水水洗 3min $\rightarrow$ 蒸馏水 3min)。

1.3 检测指标 ①HE 染色:将水化后的切片放入苏木精染色 1~2min,蒸馏水冲洗数秒,1%盐酸酒精(70%酒精 99ml+浓盐酸 1ml)冲洗 10~30s,1%氨水酒精(70%酒精 99ml+浓氨水 1ml)冲洗数秒至 30s 不等,蒸馏水冲洗 3min 后使用伊红染色 40s,最后蒸馏水冲洗至无色。②免疫组化染色:组织切片后 60 $^{\circ}\text{C}$  烘片 10h 后二甲苯脱蜡 2 次,梯度乙醇脱水,蒸馏水冲洗净, PBS 漂洗;将玻片浸入 3%过氧化氢溶液中, PBS 漂洗;滴加一抗,兔抗人 p-mTOR(Ser2448)单克隆抗体由美国 Cell Signaling Technology 公司提供,4 $^{\circ}\text{C}$  孵

育过夜,室温中放置后 PBS 漂洗,滴加聚合物辅助剂,室温孵育, PBS 液漂洗;滴加二抗,抗兔通用型免疫组化试剂盒,购于丹麦 Dako 公司。室温孵育, PBS 漂洗;滴加 DAB 溶液显色,蒸馏水终止反应,棕黄色为染色阳性;苏木素复染后自来水冲洗,依次置于梯度乙醇脱水、二甲苯透明;中性树脂胶封片,观察结果。半定量分析 p-mTOR(Ser2448)在额叶中的平均光密度(Mean Optical Density, MOD)值。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数比较采用独立样品  $t$  检验分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 HE 染色结果 A 组(图 1a、b):组织结构清晰,额叶的皮层未见神经元变性。B 组(图 1c、d):额叶可见螺旋状神经元纤维,胞浆变性、细胞肿胀不明显。C 组(图 1e、f):额叶皮质可见镂空或网状病灶,细胞层次紊乱,神经元严重变性,细胞核固缩、深染,细胞核仁消失,胶质细胞明显增生,可见噬神经现象。

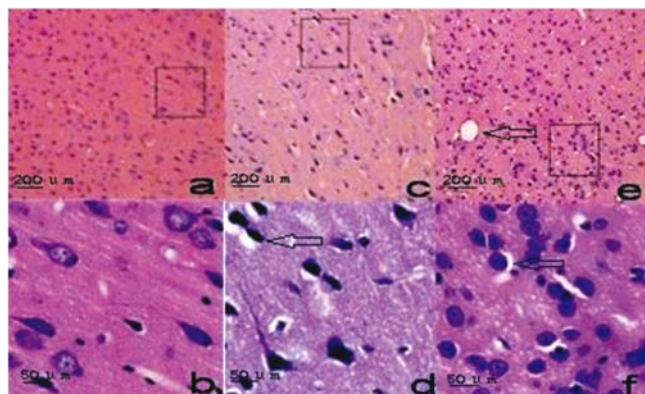


图 1 额叶皮层神经元 HE 染色结果( $\times 400$ )

图 1a、c、e 中的方框代表低倍镜下随机选取的视野,图 1b、d、f 分别为随机视野的高倍镜图像,箭头代表变性的神经元细胞

2.2 免疫组化结果 免疫组化定位 p-mTOR(Ser2448)在额叶中主要表达在神经元的细胞质中(p-mTOR 抗原与抗体结合后显示为棕色),细胞核及细胞外未见表达。图 2 显示 1 周后 A 组(图 a、b)额叶 p-mTOR(Ser2448)表达的免疫组织化学染色,神经元胞质呈浅棕色,提示弱阳性表达;B 组(图 c、d)细胞染色程度较 A 组加深,p-mTOR(Ser2448)表达阳性细胞数增加;C 组(图 e、f)可见细胞结构紊乱,胞质呈明显的棕黄色,提示该蛋白在细胞质中呈强阳性表达。C 组和 B 组比较,1h 表达开始升高( $t = -1.435, P = 0.182$ ),但差异并不显著,1 周表达高峰( $t = -4.073, P = 0.002$ ),2 周降低( $t = -2.614, P = 0.026$ ),4 周时再次升高( $t = -2.506, P = 0.031$ ),差异具有统计学

意义(均  $P < 0.05$ ),见表1。

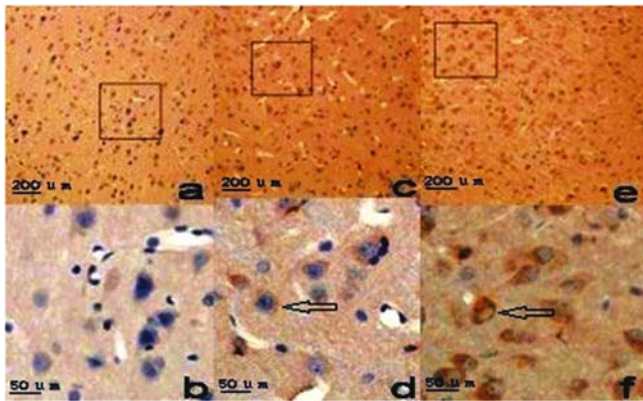


图2 额叶皮层神经元免疫组化结果 a、c、e( $\times 200$ ), b、d、f( $\times 400$ )

图2a、c、e中的方框代表低倍镜下随机选取的视野,图2b、d、f分别为随机视野的高倍镜图像,图2d、f箭头所指分别代表p-mTOR弱阳性表达和强阳性表达的神经元

表1 不同时间点B组和C组大鼠右侧额叶p-mTOR(Ser2448)表达的比较  $\bar{x} \pm s$

时间	B组	C组	t	P
1h	2.108±0.400	2.318±0.498	-1.435	0.182
24h	2.427±0.495	2.778±0.515	-2.969	0.014
1周	2.603±0.572	3.133±0.466	-4.073	0.002
2周	2.247±0.488	2.543±0.505	-2.614	0.026
4周	2.345±0.418	2.672±0.533	-2.506	0.031

### 3 讨论

根据目前已有的研究结果,mTOR信号通路参与了细胞凋亡、吞噬、胶质增生、突触可塑性、神经递质受体、离子通道、轴突芽生等癫痫多种分子水平、细胞水平的病理改变,上游信号通路PI3K/Akt磷酸化后可激活mTOR,mTOR是一种相对保守的非典型丝/苏氨酸蛋白激酶,具有复杂的下游效应,其中与PTE的发生有着重要联系的是p-mTOR C1介导的下游信号通路,包括核糖体S6通路和4EBP1通路,S6属于AGC激酶家族的丝氨酸/苏氨酸激酶,S6经p-mTOR C1激活后,磷酸化的S6k再将S6磷酸化,这样使得含嘧啶基序序列mRNA的翻译功能增强;4EBP1也是p-mTOR C1的另外一个靶点,当mTOR信号通路激活时,4EBP1会因被p-mTOR C1磷酸化而失活,导致4EBP1从真核细胞翻译因子4E(eIF-4E)释放出来,从而降低4EBP1对蛋白翻译的抑制作用,最终导致额叶神经元兴奋性增高,异常细胞同步放电,最终导致癫痫的发生<sup>[8-9]</sup>。本课题组通过向大鼠右侧额叶皮质内注射铁离子制造PTE动物模型,该研究中额叶p-mTOR染色MOD最大的细胞主要分布于颗粒细胞层的胞质,同时分子层及多形细胞层也可见散在阳性细胞分布。实验结果显示,p-mTOR在正常大鼠额叶少量表

达;本研究结果提示PTE动物模型中存在p-mTOR的表达增高,这与2009年Codeluppi<sup>[10]</sup>在PTE患者反应性星形胶质细胞中发现mTOR激活的结果相似,考虑可能是由于PTE引起的一系列氧化应激反应导致额叶颗粒细胞进一步反应性增殖,以及氧化应激后导致已经成熟的神经元或胶质细胞增殖分化<sup>[11]</sup>,所以1周时MOD值最高;C组在2周时,p-mTOR的表达下降并接近正常水平,与B组该时间的比较差异具有统计学意义,分析原因可能与1周时产生的神经前体细胞分化为比较成熟的胶质细胞及损伤区神经元、胶质细胞坏死有关,故表达下降,但Sha等<sup>[12]</sup>研究显示p-mTOR的表达增高仍可持续到2周,原因可能与不同研究者采用不同的动物模型有关,具体机制还有待于进一步深入研究。在本研究中C组4周组p-mTOR表达再次升高,可能与发作性的癫痫发作导致的应激反应引起额叶颗粒细胞进一步反应增殖等因素有关<sup>[13]</sup>。

通过在大鼠额叶注射FeCl<sub>2</sub>引起大鼠PTE,并在大鼠额叶齿状回观察到反应性增殖的颗粒细胞,其增殖和分化可能与氧化应激反应导致mTOR通路的异常活化以及发作性癫痫的发生有关联,最终导致神经胶质细胞的过度增生,神经元数量减少、功能异常,海马结构紊乱<sup>[14-16]</sup>;同时在损伤灶周围皮质观察到反应性增生的锥体神经元及胶质细胞,其增殖和分化也可能与FeCl<sub>2</sub>氧化应激刺激导致mTOR通路的异常活化有关联,导致皮质结构的紊乱,从而诱发癫痫发作<sup>[17-18]</sup>,后期阵发性癫痫的刺激与mTOR通路的激活互为因果关系,相互促进进一步诱发慢性癫痫。同时我们观察到mTOR信号通路的异常激活在1周时最高,2周时降低,4周时又再次升高,和PTE大鼠的平均增加癫痫发作次数改变趋势相似,这种mTOR通路的异常激活可能是导致晚期PTE发作的重要证据<sup>[19-20]</sup>。然而,反应性增生的神经元及胶质细胞与mTOR的异常激活还需进一步的观察,是否可以使用mTOR通路的抑制剂RPN抑制mTOR的异常表达来治疗PTE还需进一步研究。本研究虽然发现PTE的发病机制可能与mTOR信号通路上额叶区p-mTOR(Ser2448)的表达异常增加有关,但并未涉及额叶及海马区相关蛋白的研究,故还需要进一步深入探索。

### 【参考文献】

[1] Frey LC. Epidemiology of posttraumatic epilepsy: a critical review[J]. Epilepsia, 2003, 44(10): 11-17.  
 [2] Cho CH. Frontier of epilepsy research-mTOR signaling pathway

- [J]. *Experimental & molecular medicine*, 2011, 43(5): 231-274.
- [3] Gödel M, Hartleben B, Herbach N, et al. Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2011, 121(6): 2197-2209.
- [4] Shima A, Nitta N, Suzuki F, et al. Activation of mTOR signaling pathway is secondary to neuronal excitability in a mouse model of mesio-temporal lobe epilepsy [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2015, 41(7): 976-988.
- [5] Bockaert J, Marin P. mTOR in brain physiology and pathologies [J]. *Physiological reviews*, 2015, 95(4): 1157-1187.
- [6] 林元相, 徐如祥, 姜晓丹, 等. 皮层注射氯化亚铁建立外伤性癫痫动物模型 [J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5(4): 372-377.
- [7] Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijckelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats [J]. *Physiology & behavior*, 2009, 98(5): 579-586.
- [8] Tee AR, Sampson JR, Pal DK, et al. The role of mTOR signaling in neurogenesis, insights from tuberous sclerosis complex [C]// *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 2016, 52(1): 12-20.
- [9] Pitkänen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets [J]. *The Lancet Neurology*, 2011, 10(2): 173-186.
- [10] Codeluppi S, Svensson C I, Hefferan M P, et al. The Rheb-mTOR pathway is upregulated in reactive astrocytes of the injured spinal cord. [J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2009, 29(4): 1093-1104.
- [11] Althaus A L, Sagher O, Parent J M, et al. Intrinsic neurophysiological properties of hilar ectopic and normotopic dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy and a rat model [J]. *Journal of neurophysiology*, 2015, 113(4): 1184-1194.
- [12] Sha L Z, Xing X L, Zhang D, et al. Mapping the spatio-temporal pattern of the mammalian target of rapamycin (mTOR) activation in temporal lobe epilepsy. [J]. *Plos One*, 2012, 7(6): 391-412.
- [13] Romá-Mateo C, Aguado C, García-Giménez J L, et al. Oxidative stress, a new hallmark in the pathophysiology of Lafora progressive myoclonus epilepsy [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 88(1): 30-41.
- [14] Ostendorf A P, Wong M. mTOR Inhibition in Epilepsy: Rationale and Clinical Perspectives [J]. *CNS drugs*, 2015, 29(2): 91-99.
- [15] Binder D K, Steinhäuser C. Functional changes in astroglial cells in epilepsy [J]. *Glia*, 2006, 54(5): 358-368.
- [16] Lipton J O, Sahin M. The neurology of mTOR [J]. *Neuron*, 2014, 84(2): 275-291.
- [17] Kharatishvili I, Pitkänen A. Posttraumatic epilepsy [J]. *Current opinion in neurology*, 2010, 23(2): 183-188.
- [18] Berdichevsky Y, Dryer A M, Saponjian Y, et al. PI3K-Akt signaling activates mTOR-mediated epileptogenesis in organotypic hippocampal culture model of post-traumatic epilepsy [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2013, 33(21): 9056-9067.
- [19] Russo E, Citraro R, Constanti A, et al. The mTOR signaling pathway in the brain; focus on epilepsy and epileptogenesis [J]. *Molecular neurobiology*, 2012, 46(3): 662-681.
- [20] Meng X F, Yu J T, Song J H, et al. Role of the mTOR signaling pathway in epilepsy [J]. *Journal of the neurological sciences*, 2013, 332(1): 4-15.

• 外刊拾粹 •

帕金森病引起的严重吞咽困难

吞咽困难是帕金森病(PD)的常见并发症。关于PD患者吞咽困难发生频率的数据报告差异显著。本研究旨在更好地了解帕金森病患者吞咽困难的患病率、严重程度和特点。对确诊为帕金森病的连续门诊患者采用运动障碍协会版的帕金森病联合评定量表进行评定,将其分为Hoehn期和Yahr期。所有受试者均接受了纤维内镜吞咽检查(FEES)。针对每种稠度的渗透和误吸、漏出和残留物进行评价。对照组由年龄在50岁及以上的无吞咽障碍病史的成年人组成。119例PD患者中只有6例FEES结果不显著,其中喉部渗透患者占55%。在119患者中30例(25%)观察到误吸,其中24(20%)为无症状误吸。只有漏出罕见于PD患者。尽管73%的人表示他们没有吞咽食物或饮料的困难或任何窒息问题,但16%的无症状人群存在严重的误吸问题。结论:本研究证实帕金森病各期中吞咽困难的患病率较高,针对吞咽问题的客观研究结果与自我报告症状之间存在差异。

Pflug C, Bihler M, Emich K, et al. Critical Dysphagia is Common in Parkinson Disease and Occurs Even in Early Stages: A Prospective Cohort Study. *Dysphagia*, 2018, 33(1): 41-50.

中文翻译由复旦大学华山医院吴毅教授主译编