

· 实验研究 ·

1,6-二磷酸果糖对反复热性惊厥大鼠 海马区超微结构损伤保护作用的研究

周戡平¹, 王帆², 杨琳¹, 黄绍平¹, 李瑞林¹

(1. 西安交通大学医学院第二附属医院儿科, 陕西 西安 710004; 2. 陕西省人民医院妇产科, 陕西 西安 710068)

[摘要] **目的** 1,6-二磷酸果糖(FDP)作为细胞代谢的能量物质已被证实在辅助治疗缺氧缺血性脑病及心肌受损性疾病方面具有重要作用。该研究探讨 FDP 对大鼠热性惊厥性海马超微结构损伤是否具有保护作用。**方法** 36只21日龄雄性SD大鼠均分为热性惊厥组(FS),高剂量果糖干预组(HD)及低剂量果糖干预组(LD)。水浴法建立热性惊厥模型;高、低剂量果糖干预组于惊厥前30 min各腹腔注射FDP 50 mg/100 g及25 mg/100 g大鼠体重;而FS组腹腔注射相同体积的0.9%氯化钠溶液。应用透射电镜分别观察海马CA1区神经元、细胞器的病理超微结构改变和神经突触参数变化特征。**结果** 果糖干预组在神经元变性坏死、线粒体肿胀、内质网脱颗粒及高尔基体扩张等方面较FS组减轻,差异有显著性。果糖干预组同FS组相比,脑海马CA1区神经突触间隙缩窄($F=7.29, P<0.01$),突触后致密物质厚度增加($F=12.47, P<0.01$),突触活性带长度延长($F=14.75, P<0.01$),突触界面曲率增加($F=3.77, P<0.05$),差异有显著性。在改善上述超微结构损伤方面,HD与LD组比较差异无显著性。**结论** FDP可以减轻反复热性惊厥大鼠海马区超微结构受损程度,但有效而适宜的用药剂量仍需进一步探讨。

[中国当代儿科杂志,2008,10(2):199-202]

[关键词] 1,6-二磷酸果糖;惊厥;发热性;脑损伤;海马;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)02-0199-04

Protective effect of fructose-1,6-diphosphate against ultrastructural damage in the hippocampus of rats with repeated febrile seizures

ZHOU Jian-Ping, WANG Fan, YANG Lin, HUANG Shao-Ping, LI Rui-Lin. Department of Pediatrics, Second Hospital Affiliated to Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China (Email: z-j-p1974@tom.com)

Abstract: Objective Fructose-1,6-diphosphate (FDP), serving as a cellular energy substance, has shown its roles in the treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy and myocardial damage. The present study aimed at exploring the potentiality of the protective effect of FDP against ultrastructural damage of the hippocampus caused by febrile seizures (FS) in rats. **Methods** Thirty-six 21-day-old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: untreated FS (control), high-dose FDP-treated FS and low-dose FDP-treated FS. FS were induced by hyperthermal bath. Thirty minutes before FS induction, rats in the high-dose and low-dose FDP-treated groups received a peritoneal injection of FDP at a dosage of 50 and 25 mg per 100 g of body weight respectively, whereas the same volume of 0.9% sodium chloride solution were injected to the rats in the control group. Transmission electron microscopy was used to examine the ultrastructural pathologic changes of neurons and organelles as well as the features of synaptic morphological parameters in the hippocampal CA1 area. **Results** Neuronal degeneration and necrosis, mitochondria swelling, polyribosomes disaggregation from endoplasmic reticula, and golgiosomes dilation in the hippocampal CA1 area in the two FDP intervention groups were less severe compared with the control group. FDP treatment resulted in significant increases in postsynaptic density thickness ($F=12.47, P<0.01$), synaptic active zone length ($F=14.75, P<0.01$) and synaptic interface curvature ($F=3.77, P<0.05$), as well as a shorter interspace of neural synapses ($F=7.29, P<0.01$) when compared with the control group. There were no significant differences in the ultrastructural changes between the two FDP treatment groups. **Conclusions** FDP can ameliorate ultrastructural damage in the hippocampus caused by FS in rats. However, further research is warranted for a reasonable and effective dosage of FDP.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (2):199-202]

Key words: Fructose-1,6-diphosphate; Seizures, febrile; Brain damage; Hippocampus; Rats

[收稿日期]2007-06-22;[修回日期]2007-07-22
[基金项目]陕西省科技攻关项目[2005K14-G7(2)];西安交通大学自然科学基金(xjj2004134)。
[作者简介]周戡平,男,博士研究生,主治医师。主攻方向:惊厥性脑损伤及其对学习记忆的影响。

热性惊厥性脑损伤及其干预措施的研究已日益受到关注^[1~4]。1,6-二磷酸果糖(FDP)作为促进细胞代谢的能量物质,在缺氧缺血性及缺氧/再灌注损伤性疾病的保护性研究中效果显著^[5,6]。我们采用热水浴法建立热性惊厥大鼠模型,通过神经形态学研究方法探讨 FDP 对大鼠热性惊厥性脑损伤有无保护作用。

1 对象和方法

1.1 对象

21 日龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只(西安交通大学医学院实验动物中心提供),体重 50 ± 5 g;大鼠按 1~36 编号,采用随机数字法随机均分为热性惊厥组(FS)、高剂量果糖干预组(HD)、低剂量果糖干预组(LD),每组大鼠数目为 12 只;各组均于(20 ± 3)℃ 温度下饲养,12 h 光照,12 h 暗环境,自由进食饮水。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 采用改良热水浴法^[7]建立热性惊厥大鼠模型。每只大鼠上、下午诱发惊厥 1 次,连续 5 d 共 10 次;HD、LD 组于惊厥前 30 min 各腹腔注射 FDP 50 mg/100 g,25 mg/100 g 大鼠体重,而 FS 组腹腔注射相同体积的 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.2 电镜标本的制作 大鼠末次惊厥后 24 h,各组按随机数字法随机选取 2 只大鼠,以 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉,剖胸暴露心脏,经左心室-升主动脉插管,依次灌注 0.9% 氯化钠溶液 30~50 mL(快速);4℃ 2% 多聚甲醛,2.5% 戊二醛固定液(pH 7.4)100~150 mL(先快后慢)。灌注时间共约 30 min。剥离出脑组织,浸没于 0℃ 2% 多聚甲醛,2.5% 戊二醛固定液中。切除嗅球和小脑组织,于外侧膝状体水平冠状位切取海马部位组织片(厚 1 mm),在海马 CA1 区用注射器针头(直径约 1 mm)点取脑组织数块,迅速送电镜室制作常规透射电镜标本。脑组织块中任选 6 块进行包埋,任选 2 个包埋块制作电镜切片 6~10 张不等,再任选 2 张切片观察,随机视野下每个切片观察的目标细胞或细胞器数目为 50 个(粗面内质网和高尔基体计数单位为组)及 25 个(突触数目),合计为 100 个(组)及 50 个。

1.2.3 神经元病变观察 6 000 倍电镜视野下随机选取 100 个神经元进行观察,记录变性(细胞核肿胀、染色质浓缩边集、核仁皱缩变形)及坏死(细胞核固缩、碎裂、溶解,核仁消失)神经元的个数。

1.2.4 线粒体病变观察 30 000 倍电镜视野下随机选取 100 个线粒体进行观察,记录肿胀(体积增大,形状变圆,嵴肿胀变短,数目减少,排列紊乱)及空泡变(体积高度扩张呈球形,嵴基本消失,线粒体内基本为无结构的空泡样结构替代)线粒体的个数。

1.2.5 内质网病变观察 20 000 倍电镜视野下随机选取 100 组粗面内质网进行观察,记录脱颗粒(内质网膜上核糖体减少)内质网的病变程度和个数。轻、中、重粗面内质网脱颗粒分别指核糖体减少 <1/3, >1/3 ≤ 2/3, >2/3。

1.2.6 高尔基体病变观察 20 000 倍电镜视野下随机选取 100 组高尔基体进行观察,记录扩张(扁囊扩张、结构紊乱)高尔基体的病变程度和个数。轻、中、重高尔基体扩张分别指扁囊扩张体积增加 <1/3, >1/3 ≤ 2/3, >2/3。

1.2.7 神经突触形态学参数测量 40 000 倍电镜视野下随机选取 50 个 Gray I 型^[8]神经突触进行观察并照相,利用 Q550CW(德国 Leica 公司)图形信号采集分析系统对突触照片进行分析并测量以下主要参数:突触间隙(synaptic cleft,采用多点平均法测量)、突触后致密物质(postsynaptic density, PSD)厚度(PSD 的最大值)、突触活性带(active zone, AZ)长度、突触界面曲率(synaptic curvature of synaptic interface, PSD 的弧长与弦长之比);同时应用立体计量学方法和通行公式^[8]分析计算突触的数密度(Nv)及面密度(Sv)。

1.3 统计学处理

所有计量资料均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS10.0 统计软件依资料性质分别进行方差分析及两两均数之间 q 检验、 χ^2 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 神经元变性坏死

FS、LD、HD 组大鼠海马 CA1 区神经元变性坏死的比例依次为 56%, 38%, 31%, 提示果糖干预组大鼠海马 CA1 区的神经元变性坏死比例下降,与 FS 组差异有显著性($\chi^2 = 14.21, P < 0.01$)。但 LD、HD 两组相比差异无统计学意义, $\chi^2 = 1.16, P > 0.50$ (表 1,图 1)。

2.2 线粒体肿胀空泡变

FS、LD、HD 组大鼠海马 CA1 区线粒体肿胀及空泡变的比例依次为 58%, 47%, 37%, 提示果糖干预可以减轻大鼠脑海马 CA1 区的线粒体病变,

与 FS 组的差异有显著性($\chi^2 = 10.12, P < 0.05$)。但 LD,HD 两组相比差异无显著性, $\chi^2 = 2.09, P > 0.25$ (表 1,图 1)。

2.3 粗面内质网脱颗粒

FS,LD,HD 组大鼠海马 CA1 区中、重度内质网脱颗粒的比例依次为 42%,29%,19%,提示果糖可以减轻大鼠脑海马 CA1 区的内质网脱颗粒的现象,与 FS 组的差异有显著性($\chi^2 = 15.95, P < 0.05$)。但 LD,HD 两组相比差异无显著性, $\chi^2 = 5.44, P > 0.10$ (表 1,图 2)。

2.4 高尔基体扩张

FS,LD,HD 组大鼠海马 CA1 区中、重度高尔基体扩张的比例依次为 36%,23%,17%,提示果糖可

以减轻大鼠脑海马 CA1 区的高尔基体扩张现象,与 FS 组的差异有显著性($\chi^2 = 15.25, P < 0.05$)。但 LD,HD 两组相比差异无显著性, $\chi^2 = 2.07, P > 0.25$ (表 1,图 2)。

2.5 神经突触形态学参数

果糖干预组同 FS 组相比,脑海马 CA1 区神经突触间隙缩窄($F = 7.29, P < 0.01$),PSD 厚度增加($F = 12.47, P < 0.01$),AZ 长度延长($F = 14.75, P < 0.01$),突触界面曲率增加($F = 3.77, P < 0.05$),差异有显著性;而三组在突触面密度($F = 1.82, P > 0.05$)及数密度($F = 2.37, P > 0.05$)方面无统计学差异(表 2)。

表 1 各组大鼠海马 CA1 区神经元及细胞器超微结构病变

组别	观察目标 (个)	神经元		线粒体		内质网脱颗粒			高尔基体扩张		
		变性	坏死	肿胀	空泡变	轻度	中度	重度	轻度	中度	重度
FS	100	30	26	35	23	16	20	22	23	21	15
LD	100	22	16	32	15	23	15	14	19	13	10
HD	100	19	12	26	11	17	11	8	16	11	6
χ^2 值		14.21		10.12		15.95			15.25		
P 值		<0.01		<0.05		<0.05			<0.05		

表 2 各组大鼠海马 CA1 区神经突触形态学参数

($\bar{x} \pm s$)

组别	突触数 (个)	突触间隙 (nm)	PSD 厚度 (nm)	活性带长度 (nm)	突触界面 曲率	面密度 (突触数/ μm^3)	数密度 (μm^{-1})
FS	50	48.33 $\pm$ 6.29	69.37 $\pm$ 20.19	353.64 $\pm$ 127.97	1.0735 $\pm$ 0.1309	0.028 $\pm$ 0.012	0.0987 $\pm$ 0.0187
LD	50	33.65 $\pm$ 5.35	90.61 $\pm$ 24.87	396.52 $\pm$ 144.59	1.1642 $\pm$ 0.1754	0.029 $\pm$ 0.011	0.1148 $\pm$ 0.0215
HD	50	26.89 $\pm$ 5.12	98.03 $\pm$ 25.97	405.38 $\pm$ 153.29	1.1938 $\pm$ 0.1962	0.031 $\pm$ 0.013	0.1351 $\pm$ 0.0209
F 值		7.29	12.47	14.75	3.77	1.82	2.37
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	>0.05	>0.05

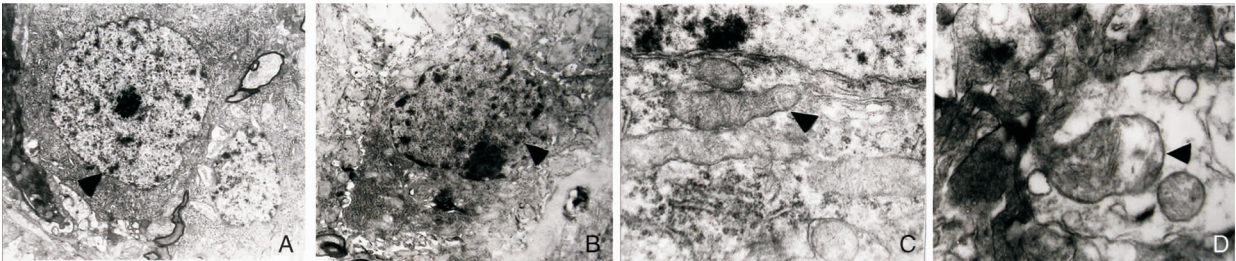


图 1 神经元及线粒体超微结构病变 A:果糖干预组正常神经元(×6 000); B:热性惊厥组神经元核膜皱缩凹陷,核碎裂、边集,细胞濒临死亡(×6 000); C:果糖干预组正常线粒体(×30 000); D:热性惊厥组线粒体体积高度扩张,嵴基本消失,线粒体内基本为无结构的空泡样结构(×30 000)。

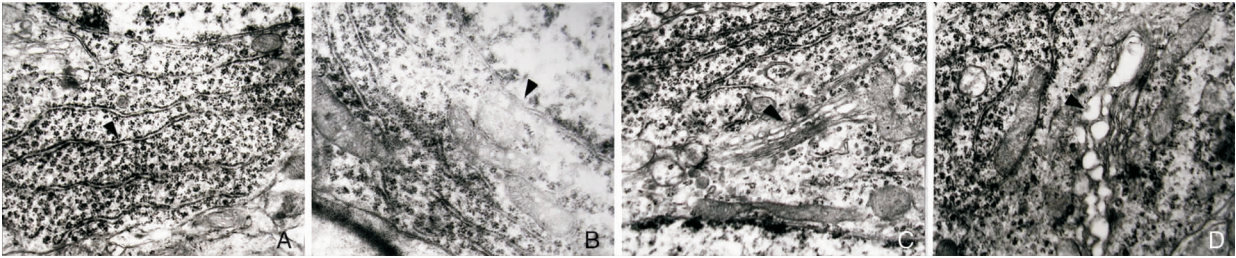


图 2 粗面内质网及高尔基体超微结构病变(×20 000) A:果糖干预组:正常粗面内质网; B:热性惊厥组:粗面内质网脱颗粒,核糖体减少; C:果糖干预组:正常高尔基体; D:热性惊厥组:高尔基体扁囊扩张、结构紊乱。

3 讨论

神经元通过树突、轴突等附属结构建立起来的相互联系(主要为突触)是神经冲动和讯号有效传递及正常学习记忆活动的物质基础。本课题以往研究发现热性惊厥大鼠脑海马 CA1 区出现了以神经元变性坏死、线粒体肿胀空泡样变、粗面内质网脱颗粒和高尔基体扩张囊泡化为特征的病理变化,推测这些改变是反复热性惊厥导致学习记忆能力损害的神经细胞学机制^[7]。

神经突触的可塑性是神经系统在各种外界刺激下出现在结构和功能方面的适应性变化,这种改变延续整个生命过程^[9]。突触前后膜、突触间隙、突触活性带长度、PSD 厚度变化能较敏感地反映突触可塑性变化的特征。PSD 厚度改变能反映突触后膜上受体和离子通道的变化,PSD 的各种通道和受体蛋白作为中介者,对信号分子、调解分子和靶分子进行优化和调控^[10]; PSD 厚度越大,越有利于神经元之间的相互沟通;突触间隙与突触后膜厚度以及前终扣密切相关^[11],当突触间隙增大,神经递质传递所需的时间会延长,在传导过程中被降解的几率增加^[12],神经传导的效能就会下降;而较长的突触活性带及较大的突触界面曲率则可以增加突触传导过程中递质及囊泡的接触面积,提高神经信息传递和学习记忆的有效性^[13]。

FDP 作为细胞代谢过程中的重要能源物质和中间调节体,在机体遭受有害刺激时发挥稳定细胞膜、改善能量代谢、抑制 Ca^{2+} 内流、抗炎抗氧化损伤、调节细胞信号转导系统等多重作用^[6,14~16]。我们以腹腔预注射 FDP 的方式以探讨 FDP 对热性惊厥脑损伤的保护作用,研究发现,FDP 干预可使热性惊厥大鼠海马区神经元变性坏死及细胞器病理改变的程度减轻;并有利于预防反复热性惊厥导致的大鼠海马区突触后致密物质厚度减小,突触活性带长度缩短,突触界面曲率下降及突触间隙异常增宽等损害正常突触联系功能的病理超微结构变化。本研究还发现 FDP 对反复热性惊厥大鼠海马 CA1 区神经突触的面密度及数密度变化无显著效应,可能与这两个指标需要较长时间才出现改变有关^[8],而本研究试验动物的热性惊厥经历时间相对较短(5 d)。

本研究采用 25 mg/100 g 体重和 50 mg/100 g 体重的 FDP 剂量进行干预,数据显示 HD 组较 LD 组在神经元变性坏死、线粒体肿胀、粗面内质网脱颗粒及高尔基体扩张等病理超微结构变化方面为轻,

但在统计学上差异无显著性。以上提示 FDP 的剂量超出一定“合适剂量”(目前仍未确定)后,FDP 对惊厥性脑损伤的保护作用与剂量之间不存在直线型剂量-效应关系;此外,也不能排除观察目标(细胞及细胞器)数目可能不足造成的影响。

[参 考 文 献]

- [1] 尹蓉,郭伍英,姜海燕. 291 例热性惊厥患儿的脑电图及其与临床关系[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(3):267-268.
- [2] 周戡平,王帆,李瑞林,袁宝莉,郭亚乐. 1,6-二磷酸果糖对大鼠热性惊厥性脑损伤保护作用的研究[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(2):129-133.
- [3] Natsume J, Bernasconi N, Miyauchi M, Naiki M, Yokotsuka T, Sofue A, et al. Hippocampal volumes and diffusion-weighted image findings in children with prolonged febrile seizures[J]. Acta Neurologica Scandinavica, 2007, 115(Suppl 3):25-28.
- [4] Vestergaard M, Pedersen CB, Sidenius P, Olsen J, Christensen J. The long-term risk of epilepsy after febrile seizures in susceptible subgroups[J]. Am J Epidemiol, 2007, 165(8):911-918.
- [5] 贲云. 1,6 二磷酸果糖治疗窒息新生儿缺氧性心肌损害疗效观察[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(4):374-375.
- [6] Kaakinen T, Heikkinen J, Dahlbacka S, Alaoja H, Laurila P, Kiviluoma K, et al. Fructose-1,6-bisphosphate supports cerebral energy metabolism in pigs after ischemic brain injury caused by experimental particle embolization[J]. Heart Surg Forum, 2006, 9(6):828-835.
- [7] 周戡平,王帆,李瑞林,袁宝莉,李静. 热性惊厥对大鼠行为运动及空间学习记忆的影响[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(1):49-53.
- [8] Pan B, Yang DW, Han TZ. Changes of synaptic structure after long-lasting LTP induced by high and low frequency tetanus in slices of the rat visual cortex[J]. Acta Physiol Sin, 2005, 57(1):77-82.
- [9] Dieguez D, Barea-Rodriguez EJ. Aging impairs the late phase of long-term potentiation at the medial perforant path-CA3 synapse in awake rats[J]. Synapse, 2004, 52(1):53-61.
- [10] Yamauchi T. Molecular constituents and phosphorylation-dependent regulation of the post-synaptic density[J]. Mass Spectrom Rev, 2002, 21(4):266-286.
- [11] Leite JP, Neder L, Arisi GM, Carlotti CG, Assirati JA, Moreira JE. Plasticity, synaptic strength, and epilepsy: what can we learn from ultrastructural data? [J]. Epilepsia, 2005, 46(Suppl 5):134-141.
- [12] Stanley EF. Presynaptic calcium channels and the depletion of synaptic cleft calcium ions[J]. J Neurophysiol, 2000, 83(1):477-482.
- [13] Rosenmund C, Rettig J, Brose N. Molecular mechanisms of active zone function[J]. Curr Opin Neurobiol, 2003, 13(5):509-519.
- [14] Song X, Wu B, Takata T, Wang X, Oizumi XS, Akisaki T, et al. Neuroprotective effect of D-fructose-1,6-bisphosphate against beta-amyloid induced neurotoxicity in rat hippocampal organotypic slice culture: involvement of PLC and MEK/ERK signaling pathways[J]. Kobe J Med Sci, 2005, 51(5-6):73-83.
- [15] Cuesta E, Boada J, Calafell R, Perales JC, Roig T, Bermudez J. Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats[J]. Crit Care Med, 2006, 34(3):807-814.
- [16] Markov AK, Warren ET, Cohly HH, Sauls DJ, Skelton TN. Influence of fructose-1,6-diphosphate on endotoxin-induced lung injuries in sheep[J]. J Surg Res, 2007, 138(1):45-50.

(本文编辑:吉耕中)