

母子隔离应激对幼鼠癫痫易感性的影响

周浩¹ 刘烨² 梁锦平¹ 邵建玲³

(1. 重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 重庆 400014; 2. 重庆医科大学附属第二医院耳鼻咽喉-头颈外科, 重庆 400010; 3. 贵阳市妇幼保健院检验科, 贵州 贵阳 510404)

[摘要] 目的 初步探讨母子隔离应激对幼鼠癫痫易感性影响及其潜在机制。方法 60只 Sprague-Dawley 幼鼠随机分成3组: 对照组、生后第2~17天每天母子隔离15 min组和隔离3 h组。在生后18 d分别行杏仁核刺激诱导惊厥实验, 灌注取脑, 免疫组化检测海马 GABA_Aα₁ 亚单位表达情况。结果 与对照组比较, 每天母子隔离3 h组幼鼠的体重减轻, 杏仁核点燃惊厥阈值降低, 完全点燃所需刺激次数减少, 惊厥发作程度加重, 海马 CA1区 GABA_Aα₁ 亚单位表达减少($P < 0.05$), 而每天母子隔离15 min组与对照组幼鼠在以上几个方面比较则差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 早期每天母子隔离3 h的应激对幼鼠脑发育、癫痫易感性产生不良影响, 海马 GABA_Aα₁ 亚单位表达减少可能作为一个重要的潜在机制。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(8): 662-665]

[关键词] 应激; 癫痫; 易感性; GABA_Aα₁; 海马; 幼鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)08-0662-04

Effect of maternal isolation stress on epilepsy susceptibility in young rats

ZHOU Hao, LIU Ye, LIANG Jin-Ping, SHAO Jian-Ling. Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Liang J-P, Email: ljp023@yahoo.com)

Abstract: Objective To study the effect of maternal isolation stress on the epilepsy susceptibility in young rats and the possible mechanism. **Methods** Sixty Sprague-Dawley young rats were randomly divided into a normal control and two maternal isolation groups that were subjected to maternal isolation for 15 min or 3 hrs daily on postnatal days 2-17. On postnatal day 18, an amygdala kindling test was performed to induce seizures. The expression of GABA_A receptor α₁ in the hippocampus was determined by immunohistochemistry. **Results** The weights were reduced, the threshold of amygdala kindling and the stimulation number for full kindling decreased significantly, and seizures were more severe in the maternal isolation 3 hrs group compared with the normal control group. The expression of GABA_A receptor α₁ in the hippocampus CA1 area in the maternal isolation 3 hrs group decreased significantly compared with that in the normal groups. There were no significant differences in the aspects above mentioned between the maternal isolation 15 min and normal control groups. **Conclusions** The stress of early daily maternal isolation for 3 hrs may affect adversely brain development and increase epilepsy susceptibility in young rats. The decreased expression of GABA_A receptor α₁ in the hippocampus may contribute to the potential mechanism. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(8): 662-665]

Key words: Stress; Epilepsy; Susceptibility; GABA_A receptor α₁; Hippocampus; Young rats

人类和动物婴幼儿期, 神经系统发育尚未成熟, 惊厥阈值低, 对癫痫有高度的易感性。γ-氨基丁酸(GABA)是哺乳动物中枢神经系统主要的抑制性神经递质, 然而 GABA 能神经元的功能在未成熟脑表现以去极化为主, 虽然这对神经细胞的迁移、分化及增殖非常重要, 但同样也是增加未成熟脑惊厥易感性危险因素之一。GABA 有两型受体: GABA_A、GABA_B, 其中 GABA 主要通过 A 型受体发挥作用, 且 GABA 受体 A 亚型是哺乳动物中枢神经系统中

主要的抑制性神经递质受体, 由 α、β、γ、δ 和 ρ 5 种亚基构成。α 有(α₁₋₆)6 种亚型, 其中 α₂、α₃、α₅ 主要在胚胎期和生后早期表达, α₁ 则主要在发育晚期和成熟期表达, α₁/α₂ 的比例升高与 GABA 从去极化向超极化转变, 即功能成熟保持一致^[1]。检测癫痫患者和癫痫动物模型的海马组织, 发现 GABA 的功能呈现未成熟表型^[2], 且重复的游泳应激可以减少大鼠海马 GABA_Aα₁ 亚单位的表达^[3], 也有报道生后母子隔离应激可以增加幼鼠锂-

[收稿日期] 2010-01-14; [修回日期] 2010-02-24
[作者简介] 周浩, 男, 硕士研究生。
[通信作者] 梁锦平, 副教授。

匹罗卡品诱导惊厥的易感性^[4]。然而,目前母子隔离应激对幼鼠杏仁核点燃惊厥及海马 GABA_Aα₁ 亚单位表达的影响国内尚未见报道。本实验采用经典的母子隔离应激方法,研究不同应激时程对幼鼠脑发育、癫痫易感性的影响,检测海马 GABA_Aα₁ 亚单位表达,初步探索母子隔离应激对幼鼠癫痫易感性的影响与海马 GABA_Aα₁ 亚单位表达之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 动物 Sprague-Dawley (SD) 孕鼠购于重庆医科大学动物实验中心,幼鼠出生当天计为 P0,饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗的环境,自由进食。
- 1.1.2 试剂与设备 直径 0.1 mm 镍铬合金漆包电极(购于深圳瑞沃德生命科技有限公司),牙科水泥,不锈钢螺钉,自制连接器,大鼠脑立体定位仪(Stoelting1886),多导生理记录仪(iwiorx214),刺激隔离器(ISO-Flex),微型颅骨钻(TX-AO50024),数码摄像机(Sony T500),自制屏蔽笼。兔抗-GABA_A受体亚型 α₁、二抗免疫试剂盒(百萃生物科技公司提供),共聚焦显微镜(尼康 90i)。

1.2 方法

- 1.2.1 分组及方法 60 只 SD 幼鼠按照实验需要完全随机分成 3 组:①对照组($n=20$):不实施母子隔离,常规喂养;②隔离 15 min 组($n=20$):生后第 2 天开始至生后第 17 天,采用母子隔离方法,每天同一时间把幼鼠与母鼠分离,单独置于安静、保暖环境 15 min;③隔离 3 h 组($n=20$):方法同前,每天隔离 3 h。每组取 10 只幼鼠于生后第 18 天执行快速杏仁核点燃^[5],另外 10 只幼鼠用于免疫组化染色。
- 1.2.2 杏仁核电极放置 10% 的水合氯醛按 3 mL/kg 麻醉幼鼠,将幼鼠固定于立体定位仪,微型颅骨钻钻孔,双股缠绕直径 0.1 mm 镍铬合金漆包电极沿孔垂直插入左侧杏仁核基底外侧核(ABL),电极尖端间距 0.1~0.15 mm。根据 SHERWOOD AND PAOLA 幼鼠定位图谱左侧 ABL 坐标(前囟后 1.8 mm、旁开 4.6 mm、深 7.8~8.2 mm、门齿 0.0 mm)。不锈钢微型眼镜螺丝固定于前额作为地线,另一个固定于枕骨起加强固定作用。所有电极均接入 3 孔插件。用牙科水泥混合 502 胶水固定,术后保暖,腹腔常规注射青霉素 3~5 万 U 预防感染,灌牛奶增强抵抗能力。
- 1.2.3 杏仁核电点燃参数 频率 60 Hz、波宽

- 1 ms、串长 10 s、间隔 5 min、强度 0.4 mA、160 个恒流脉冲刺激。
- 1.2.4 杏仁核后放电阈值(ADT)的测定 屏蔽干扰环境中用多导生理记录仪记录背景脑电 5 min,刺激电流从 20 μA 开始,>1 min 的间隔时间,每次递增 20 μA,测后放电阈值(ADT 定义为波幅及频率>背景波幅及频率两倍的尖/棘波时需要的刺激电流值)。
- 1.2.5 点燃及行为分级 术后恢复 2 d,所有刺激点燃都在 9:00~18:00 之间完成(防止发育造成电极位置的变异)。实验前将幼鼠放入 2 L 的烧杯中,保暖适应环境 10 min,测 ADT 后休息 30 min,开始刺激。行为学分类按 Racine 分级方法,1 级发作:面部阵挛,包括动须,咀嚼等;2 级发作:1 级发作为加节律性点头;3 级发作:2 级发作为加前肢阵挛;4 级发作:3 级发作为加后肢站立;5 级发作:4 级发作为加摔倒,3 级以下发作为局灶性发作,3 级以上发作为全面性点燃。点燃成功即稳定诱发 4 级以上发作行为。
- 1.2.6 海马标本制作及免疫组化方法 10% 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉幼鼠,开胸灌注。先用 100 mL 生理盐水冲洗,再用 10% 多聚甲醛固定后,迅速取脑置于 10% 多聚甲醛中,4℃ 冰箱保存 24 h。常规脱水、包埋、切片后进行免疫组化染色。步骤为:二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶 5~7 min,柠檬酸缓冲液热修复抗原(煮沸 2 次,自然冷却后),滴加封闭血清(室温孵育 20~30 min 后甩干),滴加一抗工作液 4℃ 过夜(1:50 稀释),滴加二抗(室温孵育 20~30 min),滴加 HPR 液(室温孵育 20~30 min),滴加 DAB 显色液,复染,封片,各步骤之间均用 0.01 mol/L PBS 充分洗涤。每只幼鼠在相似层面各取 1~3 张片子,利用显微图像分析系统,在 200 倍物镜下,对海马各区(主要是:齿状回、CA1、CA3) GABA_Aα₁ 阳性表达细胞(胞浆呈棕黄色)的平均光密度进行分析。
- 1.3 统计学分析 所有的数据均用 SPSS 13.0 软件分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性检验用 Levene's test,应激组与对照组的比较用独立样本的 t 检验, $P<0.05$ 显示差异有统计学意义。
- ## 2 结果
- 2.1 母子隔离应激对幼鼠体重的影响 于 P18 d 称体重对照组幼鼠平均体重为 38.3±

2.2 g,隔离 15 min 组平均体重为 38.6 ± 2.1 g,与对照组比较差异无统计学意义;隔离 3 h 组平均体重为 33.1 ± 2.5 g,与对照组比较,该组幼鼠体重明显轻于对照组幼鼠体重, $P < 0.01$ 。

2.2 3 组幼鼠杏仁核点燃结果

2.2.1 3 组幼鼠杏仁核点燃成功情况 对照组幼鼠有 8 只点燃、1 只电极脱落、1 只麻醉死亡;隔离 15 min 组幼鼠 9 只诱发成功、1 只电极脱落;隔离 3 h 组幼鼠 7 只诱发成功、1 只术后死亡、2 只电极位置不正确。

2.2.2 3 组幼鼠 ADT 的测定 对照组杏仁核平均 ADT 为 $110 \pm 16 \mu A$,隔离 3 h 组杏仁核平均 ADT 为 $90 \pm 11 \mu A$,与对照组比较 ADT 显著性降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而隔离 15 min 组杏仁核平均 ADT 为 $108 \pm 14 \mu A$,与对照组 ADT 比较差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。

2.2.3 3 组点燃率和诱发 5 级发作行为时后放电时程 把达到 5 级发作行为需要的刺激次数定义为点燃率,同时记录诱发 5 级发作行为时后放电时程(s),与对照组和隔离 15 min 幼鼠比较,隔离 3 h 组平均点燃率显著降低,后放电时程显著延长

($P < 0.05$);隔离 15 min 组与对照组比较平均点燃率和后放电时程差异均无统计学意义。见表 1。

表 1 3 组幼鼠杏仁核点燃参数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ADT (μA)	点燃率 (刺激次数)	5 级行为时后 放电时程(s)
对照组	8	110 ± 16	10.5 ± 2.3	56 ± 9
隔离 15 min 组	9	108 ± 14	11.3 ± 1.9	57 ± 11
隔离 3 h 组	7	$90 \pm 11^{a,b}$	$8.2 \pm 1.4^{a,b}$	$72 \pm 15^{a,b}$
F 值		7.323	5.238	5.819
P 值		0.018	0.039	0.031

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与隔离 15 min 组比较, $P < 0.05$

2.3 3 组海马 GABA_Aα₁ 亚单位免疫组化染色结果

对照组 GABA_Aα₁ 亚单位表达主要集中在海马 CA1、CA3、齿状回;母子隔离 15 min 组 3 个区域 GABA_Aα₁ 亚单位免疫组化累积光密度与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);母子隔离 3 h 组在海马 CA1 区 GABA_Aα₁ 亚单位免疫组化累积光密度较对照组及隔离 15 min 组明显降低($P < 0.01$),而在海马 CA3、齿状回 GABA_Aα₁ 亚单位免疫组化累积光密度与对照组及隔离 15 min 组无明显差异。见图 1、表 2。

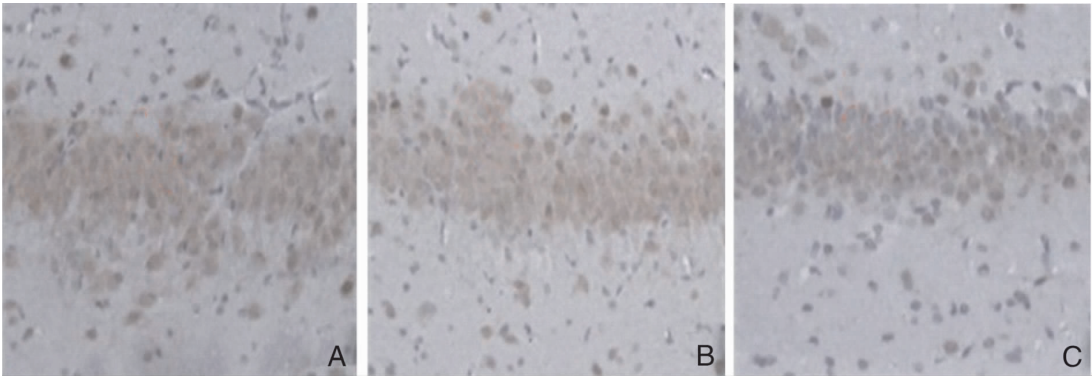


图 1 幼鼠海马 CA1 区 GABA_Aα₁ 表达情况(免疫组化×200) A:对照组,海马 CA1 区 GABA_Aα₁ 阳性表达较

高;B:隔离 15 min 组,海马 CA1 区 GABA_Aα₁ 阳性表达与对照组比较无明显差异;C:隔离 3 h 组,海马 CA1 区 GABA_Aα₁ 阳性表达较对照组及隔离 15 min 组明显降低。GABA_Aα₁ 阳性表达神经元呈棕黄色。

表 2 3 组幼鼠海马各区 GABA_Aα₁ 阳性神经元的平均光密度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CA1	CA3	齿状回
对照组	10	179.8 ± 6.7	173.2 ± 9.1	164.7 ± 4.8
隔离 15 min 组	10	182.4 ± 5.8	167.7 ± 4.9	163.6 ± 7.2
隔离 3 h 组	10	$141.7 \pm 4.9^{a,b}$	171.6 ± 8.1	168.8 ± 5.9
F 值		210.82	0.170	2.934
P 值		0.000	0.685	0.104

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与隔离 15 min 组比较, $P < 0.01$

3 讨论

杏仁核电点燃曾广泛应用于成年大鼠边缘系统惊厥的动物模型,其可重复性及精确性等优点同样适用于未成熟脑癫痫的研究,其中所测指标,如后放电阈值、点燃率大小可作为衡量癫痫易感性的客观标准。

本研究在幼鼠生后第 18 天进行杏仁核点燃,P2 ~ P17 母子隔离 3 h 应激降低后放电阈值及完全

点燃需要的刺激次数,增加5级发作行为的后放电时程,说明P2~P17母子隔离3h应激可增加幼鼠癫痫的易感性。Jones等^[6]采用P2~P14母子隔离3h应激同样发现可以降低青春期鼠惊厥阈值,增加癫痫易感性,而Edwards等^[7]报道生后母子隔离应激对癫痫没有影响,可能与应激方法或时间选择与本研究不同有关(仅仅在生后4~5d,每天母子隔离1h)。本研究发现在脑发育、癫痫易感性等方面,P2~P17母子隔离15min与对照组比较,差异无显著性,提示只有当应激刺激达到一定强度时,海马神经元才会产生不可逆性损害。

相关实验证实:中枢神经GABA能系统是神经元活动同步化的基础,通过基因敲除技术抑制 α_1 亚单位表达后,GABA_AR表达数量明显减少,惊厥易感性增加^[8]。本研究发现母子隔离3h组海马CA1区GABA_A α_1 亚单位表达选择性降低。GABA作为中枢主要抑制性递质^[9],主要通过A型受体发挥其抑制作用。A型受体是由 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ρ 5种亚基构成,其中 α_1 作为苯二氮类抗惊厥作用的一个位点是配体门控氯离子通道受体,通过增加神经元细胞膜氯离子的通透性,产生抑制性突触后电位(IPSP)而发挥抑制作用。人类颞叶癫痫患者的海马组织CA1区GABA_A α_1 亚单位表达显著减少^[10],说明不同条件下的应激可以导致海马GABA_A α_1 亚单位表达减少。本研究也发现母子隔离应激导致该部位GABA_A α_1 亚单位表达减少,GABA_AR表达数量减少,抑制能力下降,从而增加幼鼠癫痫的易感性。

本研究结果显示在生后P2~P17母子隔离3h应激可影响幼鼠生长发育,增加幼鼠杏仁核点燃惊厥的易感性,而海马CA1区GABA_A α_1 受体的表达减少可作为一个潜在机制,这对应激参与未成熟脑癫痫发病机制的研究有重要意义,然而,仅仅导致海马CA1区GABA_A α_1 受体亚单位表达减少的具体机

制有待进一步研究。

致谢:由衷感谢重庆医科大学附属儿童医院儿研所神经电生理实验室陈恒胜老师,免疫组化室张晓萍老师给予的无私帮助。

[参 考 文 献]

[1] Galanopoulou AS. GABAA receptors in normal development and seizures: friends or foes? [J]. Curr Neuropharmacol, 2008, 6(1):1-20.

[2] Dulac O, Nabbout R, Plouin P, Chiron C, Scheffer I. Early seizures: causal events or predisposition to adult epilepsy? [J]. Lancet Neurol, 2007, 6(7):643-651.

[3] Montpied P, Weizman A, Weizman R, Kook KA, Morrow AL, Paul SM. Repeated swim-stress reduces GABAA receptor alpha subunit mRNAs in the mouse hippocampus [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1993, 18(3):267-272.

[4] Lai MC, Holmes GL, Lee KH, Yang SN, Wang CA, Wu CL, et al. Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats—the role of corticosterone [J]. Epilepsy Res, 2006, 68(2):123-136.

[5] 常红升,沈鼎烈,杨峰,王学峰,郝玉琴,晏勇.大鼠杏仁核快速点燃癫痫模型[J].中华神经科杂志,1997,30(5):283-286.

[6] Jones C, Gaurav K, O'Brien J, Morris M, Sundra M, Michel R. Anxiolytic effects of rapid amygdala kindling, and the influence of early life experience in rats [J]. Behavioural Brain Research, 2009, 203(1):81-87.

[7] Edwards HE, Dortok D, Tam J, Won D, Burnham WM. Prenatal stress alters seizure thresholds and the development of kindled seizures in infant and adult rats [J]. Horm Behavior, 2002, 42(4):437-447.

[8] Ogris W, Lehner R, Fuchs K, Furtmüller B, Hoyer H, Gregg E, et al. Investigation of the abundance and subunit of GABA receptor subtypes in the cerebellum α_1 -subunit-deficient mice [J]. J Neurochem, 2006, 96(1):136-147.

[9] 郝艳丽,巨修练. GABA_AR 研究进展[J]. 武汉化工学院学报 2006,28(2):12-16.

[10] Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y, Aguzzi A, Fritschy JM. Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy [J]. J Neurosci, 2000, 20(14):5401-5419.

(本文编辑:黄 榕)