

·论著·

幼年大鼠反复热性惊厥脑损伤的研究

常杏芝,秦炯,吴希如

(北京大学第一医院儿科,北京 100034)

[摘要] 目的 观察反复热性惊厥在幼年大鼠引起的脑损伤。方法 65只16d龄大鼠随机分为正常对照组、高热对照组和热性惊厥组,利用热水浴诱导惊厥模型。采用 Morris 水迷宫方法检测大鼠的空间学习记忆能力;采用尼氏染色、TUNEL 染色和电镜方法观察神经元损伤情况。结果 热性惊厥组大鼠寻找平台潜伏期较正常对照组明显延长[(8.33 ± 9.83) s vs (4.00 ± 2.96) s],差异有显著性($P < 0.01$);尼氏染色未见明显异常;TUNEL 染色显示惊厥组大鼠海马区阳性细胞数较正常对照组和高热对照组增加(9.67 ± 5.52 vs 5.08 ± 4.12, 9.67 ± 5.52 vs 3.17 ± 3.35),差异有显著性($P < 0.05$);电镜观察惊厥组大鼠可见线粒体肿胀、嵴模糊或断裂、空泡形成等。结论 在未成年大鼠,反复热性惊厥可引起脑损伤。

[关键词] 热性惊厥;脑损伤;大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2002)06-0439-04

Brain Damage Induced by Repeated Febrile Convulsions in Immature Rats

CHANG Xing-Zhi, QIN Jiong, WU Xi-Ru

Department of Pediatrics, First Hospital, Beijing University, Beijing 100034, China

Abstract: **Objective** To study the effect of brain damage induced by repeated febrile convulsions (FC) during early life in rats. **Methods** Sixty-five 16 d rats were randomly divided into two groups: normal control group ($n = 15$) and warm water-treated group ($n = 50$), and the latter was further divided into FC and non-FC groups. The rat FC model was developed by warm-water-immersion (45 °C). The memory capacity was tested by using a Morris water maze method. Neuronal changes were detected by thionine stain, TUNEL stain and electron microscopy. **Results** The searching platform latency of rats with FC was significantly longer than that of the normal controls [(8.33 ± 9.83) s vs (4.00 ± 2.96) s; $P < 0.01$]. The number of TUNEL-positive neurons significantly increased in the FC group compared with that of the normal control and non-FC groups [(9.67 ± 5.52) vs (5.08 ± 4.12); (9.67 ± 5.52) vs (3.17 ± 3.35), both $P < 0.05$]. The mitochondrion changes, manifesting as swelling, ridge unclear or disappeared and vacuolar appearance, were found electron microscopically, whereas no significant change was demonstrated by thionine stain. **Conclusions** Repeated FC may induce brain damage in immature rats.

Key words: Febrile convulsion; Brain damage; Rat

热性惊厥是儿童期常见的惊厥性疾病之一,大约2%~5%的5岁以内儿童发生过至少一次热性惊厥^[1]。目前,热性惊厥的预后仍是一个有争议的问题。热性惊厥究竟是否造成脑损伤,热性惊厥与智力低下及癫痫的关系等一直是小儿神经科医师与患儿家长密切关注的问题。本研究采用热水浴诱导大鼠惊厥模型,观察反复热性惊厥对学习记忆的影响及可能引起的神经元损伤。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

16日龄雄性SD大鼠65只,体重50~80g(购自北京大学医学部实验动物中心)。将大鼠随机分

[收稿日期] 2002-04-27; [修回日期] 2002-08-01
[基金项目] 卫生部临床学科重点项目(No 2001-3)
[作者简介] 常杏芝(1973-),女,博士,主治医师。

为2组:正常对照组(15只)与高热处理组(50只)。其中高热处理组,按大鼠是否惊厥再分为高热对照组和热性惊厥组。

1.2 热性惊厥动物模型的建立

热性惊厥动物模型参照文献^[2]建立。热水浴从大鼠生后22 d(P22)开始。高热处理组水浴温度为45℃。第1次水浴时间为5 min,出现惊厥者进入惊厥组;无惊厥者为高热对照组。每2 d诱导惊厥1次,共15次。正常对照组水浴温度为37℃,处置方法同高热处理组。记录大鼠的惊厥潜伏期、惊厥持续时间及惊厥时体温。

1.3 水迷宫实验方法

Morris水迷宫实验装置参照文献^[3]自制直径100 cm的镀锌圆池,池内水深25 cm,水温(22±2)℃,水中加墨汁,使水池不透明,用E、S、W、N 4个点将水池人为划分为4个象限。实验第1天让大鼠入池自由游60 s以熟悉环境。之后在SW象限中点距池边25 cm处置一高23.5 cm、直径8 cm的平台,隐于水面下1.5 cm。第2~5天大鼠分别从E、S、W、N 4个不同入水点入水,面朝池壁。记录大鼠入水到找到水下平台所需时间即寻找平台潜伏期(searching platform latency, SPL)。若60 s大鼠未找到平台,由测验者引导其上平台。每日测试6次。在大鼠被诱导惊厥前(P17-21)、后(P53-57)分别进行水迷宫实验。

1.4 动物标本制备方法

1.4.1 TUNEL染色标本制备 本次热水浴后24 h,每组随机取4只大鼠,10%水合氯醛麻醉,经升主动脉快速灌注0.9%氯化钠10~30 ml,继以含4%多聚甲醛的0.1 mmol/L磷酸缓冲液1 500 ml/kg进行内固定,取脑,置上述缓冲液中后固定18~20 h。液氮速冻,恒冷冰冻切片机中行冠状切片,切片厚度10 μm。

1.4.2 电镜标本制备 末次热水浴后24 h处理大鼠,每组随机取2只。灌注固定方法同前,固定液为0.9%氯化钠+2%多聚甲醛+2.5%戊二醛0.1 mmol/L磷酸缓冲液。剥离并切取相同部位约1 mm厚海马组织(垂直于海马组织长轴横切),常规电镜标本制备,半薄切片甲苯胺蓝染色定位于海马CA1区;超薄切片厚600埃。

1.5 尼氏染色

第2次水迷宫结束后处理大鼠,每组随机取6只。标本制备方法同TUNEL染色标本制备。0.2%硫堇染液37℃浸染10~30 min,双蒸水冲洗,95%的酒精脱色30 s~1 min,常规封片。结果判

断:在40×显微镜下计数海马CA1区、CA3区和门区各1 250 μm²的神经元数目。

1.6 原位末端标记(TUNEL)检测

采用地高辛标记的TUNEL试剂盒(购自北京大学医学部病理学系),按照试剂盒说明进行操作。结果判断:兰紫色为阳性反应颜色。在10×显微镜下,计数海马区阳性反应细胞数,每只大鼠计数3张脑片,取其均值进行统计学分析。

1.7 数据处理及统计学分析

采用SPSS 10.0进行数据处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学处理采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

2 结果

2.1 热水浴诱导大鼠惊厥模型

大鼠在45℃温水中,以尾部及双下肢支撑身体直立,以保持头部露出水面,偶尔游动。2~3 min后大鼠烦躁,上跳,或潜入水底,奔跑,数秒后再次贴壁直立。约4~5 min大鼠出现点头和前肢阵挛,紧接着后肢阵挛,并迅速发展为全身强直阵挛发作,或直接表现为强直阵挛发作。大鼠惊厥发作时可伴有尾巴竖立,跳跃,尖叫。惊厥强度高时,大鼠呼吸节律不整,肢体发绀。惊厥发作10次后,大鼠出现行为改变,表现为易激惹,攻击性强。在37℃温水中,大鼠以尾部及双下肢支撑身体直立,偶尔游动,无惊厥发作等异常表现。经筛选,有19只大鼠高热未惊厥;31只大鼠发生惊厥,其中3只在第1次惊厥时死亡,3只分别在第7、8和10次惊厥时死亡;1只正常组大鼠在饲养过程中不明原因死亡。大鼠的平均惊厥潜伏期、惊厥持续时间及惊厥时的体温分别为(4.63±0.89) min, (6.66±2.39) min, (42.18±0.65)℃。

2.2 水迷宫实验结果

热水浴前各组大鼠SPL没有明显差异。热水浴15次后,各组大鼠SPL均较同组热水浴前有明显缩短($P < 0.01$)。热性惊厥组大鼠SPL较高热和正常对照组均明显延长($P < 0.01$),高热对照组大鼠SPL较正常对照组明显延长($P < 0.05$)。见表1。

2.3 TUNEL染色和电镜观察结果

各组大鼠脑内均可见少数散在分布的TUNEL阳性细胞。见图1,2。计数结果提示惊厥组大鼠海马区TUNEL阳性细胞数较正常及高热对照组均明显增多(9.67±5.52 vs 5.08±4.12; 9.67±5.52 vs

3.17 ±3.35),差异有显著性($P < 0.05$);高热对照组与正常对照组相比(3.17 ±3.35 vs 5.08 ±4.12)未见明显差异($P > 0.05$)。电子显微镜观察发现,惊厥组大鼠海马区细胞线粒体明显扩张,嵴模糊、断裂,空泡形成;高热对照组细胞形态未见异常。见图 3,4。

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫寻找平台潜伏期

Table 1 SPL for rats in different groups ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	n	水浴前	水浴 15 次后
正常对照组	8	16.41 ±18.14	4.00 ±2.96 ^a
高热对照组	13	13.73 ±16.05	6.17 ±5.53 ^{a,c}
热性惊厥组	19	16.68 ±18.09	8.33 ±9.83 ^{a,b,d}

注: a 与水浴前同组比较 $P < 0.01$; b 与正常对照组比较 $P < 0.01$; c 与正常对照组比较 $P < 0.05$; d 与高热对照组比较 $P < 0.01$

2.4 尼氏染色结果

尼氏染色脑组织切片呈兰紫色,神经细胞形态清晰,可见细胞核,胞浆中可见尼氏小体,神经元未见明显异常的形态改变。神经元计数结果显示各处理组在海马区的神经元数目较正常对照组无明显减少($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠尼氏染色神经元计数

Table 2 Cell counts in thionine stain

($n = 6, \bar{x} \pm s, \uparrow / 12\ 500\ \mu\text{m}^2$)

组别	CA1	CA3	门区
正常对照组	13.83 ±0.75	10.00 ±0.63	8.00 ±1.10
高热对照组	13.17 ±0.75	9.83 ±1.72	7.33 ±0.52
热性惊厥组	13.67 ±0.52	10.17 ±0.75	7.17 ±0.75

3 讨论

大鼠于生后 50 d 左右进入青春期,生后 60 d 性成熟。在脑发育程度上,大鼠脑发育与人脑发育的年龄段对应关系目前还不十分清楚。研究表明,5 ~ 7 d 大鼠的脑发育程度与足月新生儿的脑发育程度相当,15 d 大鼠的脑发育程度与 1 岁儿童相当,28 ~ 30 d 大鼠的脑发育程度与 2 岁儿童相当^[4]。本研究从大鼠 22 d 开始,反复诱发热性惊厥 15 次至生后 52 d。人类热性惊厥多发于 6 个月至 5 岁的儿童中,5 岁以后的儿童中也有发生,但发生率较低。可以看出我们研究的大鼠的年龄段与人类热性

惊厥的好发年龄相当。

水迷宫实验是利用空间感知来检测大鼠空间学习记忆能力的可靠方法。我们在热水浴前后分别对大鼠进行水迷宫测试。热水浴 15 次后,各组大鼠寻找平台潜伏期均较热水浴前有明显缩短,与本研究所有大鼠均处于发育期有关。随日龄增加,所有大鼠的学习记忆能力均有所提高。水浴前,各组大鼠的寻找平台潜伏期没有差异;水浴后,惊厥组大鼠寻找平台潜伏期较高热和正常对照组均明显延长,高热对照组大鼠寻找平台潜伏期又较正常对照组延长。提示反复热性惊厥和高热因素均对大鼠的近期学习记忆能力有损伤,以惊厥引起的损伤更显著。高热因素影响大鼠学习记忆能力的原因可能与高热对脑内神经元的兴奋性和生化代谢的影响有关,因为病理检查并未发现高热对照组大鼠伴随的神经元损伤。Holmes 等^[5]的研究发现,频发的短暂惊厥可以对遗传性癫痫易感大鼠的学习记忆能力产生严重损伤。我们的研究结果与之相符,短暂复发的热性惊厥可以影响大鼠的学习记忆能力。

TUNEL 可标记组织细胞中核酸 DNA 片断的 3'-OH 末端,为检测 DNA 损伤的敏感方法^[6]。在我们的研究中,热性惊厥组大鼠海马区 TUNEL 阳性细胞数较高热和正常对照组明显增加($P < 0.05$),而后两者之间差异无显著性;同时,电镜观察发现惊厥组大鼠的线粒体明显肿胀、线粒体嵴模糊、断裂、溶解伴空泡形成,内质网轻度扩张。因此可以认为,TUNEL 染色和电镜观察从病理学角度证实了热性惊厥导致的神经元损伤。本研究中尼氏染色神经元未见明显的形态学改变和缺失,而 TUNEL 染色和电镜观察证实有神经元损伤,这种差异可能与以下因素有关: 所采用的检测方法灵敏度不同;

检测时神经元可能处于损伤的早期阶段。一般认为线粒体对损伤因素较为敏感,且线粒体损伤早期多表现为肿胀、嵴模糊、断裂;而 TUNEL 染色又是标记 DNA 损伤的敏感方法。因此,TUNEL 染色和电镜观察可以发现神经元损伤,而尼氏染色不见神经元改变。

既往有文献报道热性惊厥引起的海马神经元形态改变。Toth^[7]用热蒸汽模型诱导生后 10 d 大鼠热性惊厥,发现惊厥 24 h 后海马 CA1、CA3 区锥体细胞嗜银深染,持续至少 2 周;超微结构显示海马 CA1 区锥体细胞皱缩,电子密度增高,树突呈棘状皱缩,突触完整。Chisholm 等^[8]对生后 15 d 大鼠诱导热性惊厥,惊厥后第 90 天,尼氏染色显示 CA2 和 CA3 区锥体细胞结构变化:细胞外空间增大,有些

细胞嗜碱性染色密度增高,细胞核皱缩及核仁致密化,胞体出现空泡。上述研究均未见神经元丢失,与本研究尼氏染色神经元计数的结果一致。本研究中尼氏染色未见海马神经元形态的改变,与既往研究的差异可能与所采用的惊厥诱导模型和惊厥诱发日龄不同,由此导致的脑损伤程度不同有关。

我们的研究从脑功能检测和病理检查两方面再次证实了反复热性惊厥在未成年大鼠所致的神经元损伤。虽然实验室研究不同于临床,因为大鼠不同于人,大鼠被诱发的高热与人类疾病伴随发热的产生机制也不同;但本研究仍提示临床医师,热性惊厥并非是一绝对良性疾病。

(图见彩色插页)

[参 考 文 献]

[1] Dube C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, et al. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term [J]. *Ann Neurol*, 2000, 47(3): 336 - 344.

[2] 周国平,秦炯,汤秀英,等. 高热惊厥大鼠海马神经元数量和超微结构改变的实验研究 [J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(2): 105 - 108.

[3] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat [J]. *J Neuro Sci Methods*, 1984, 11(1): 47 - 60.

[4] Jiang W, Duong TM, de Lanerolle NC. Neuropathology of Hyperthermic seizures in the rat [J]. *Epilepsia*, 1999, 40(1): 5 - 19.

[5] Holmes GL, Thompson JL, Bates T, et al. Detrimental effects of frequent seizures on learning, memory, and behavior: a study using the pubescent genetically epilepsy-prone rat [J]. *Ann Neurol*, 1990, 27(1): 24 - 32.

[6] 赵卫红,寿好长,闫福岭. 细胞凋亡 [M]. 河南:河南医科大学出版社,1997, 173 - 214.

[7] Toth Z, Yan XX, Haftoglou S, et al. Seizure-induced neuronal injury: vulnerability to febrile seizures in an immature rat model [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(11): 4285 - 4294.

[8] Chisholm J, Kellogg C, Franck JE. Developmental hyperthermic seizures alter adult hippocampal benzodiazepine binding and morphology [J]. *Epilepsia*, 1985, 26(2): 151 - 157.

(本文编辑:俞燕)

幼年大鼠反复热性惊厥脑损伤的研究 (正文见第439页)



图1 正常对照组海马区TUNEL染色照片, 可以见到TUNEL染色阳性细胞 ($\times 250$)

Figure 1 Photographs of TUNEL-stained sections in hippocampus (normal control group).

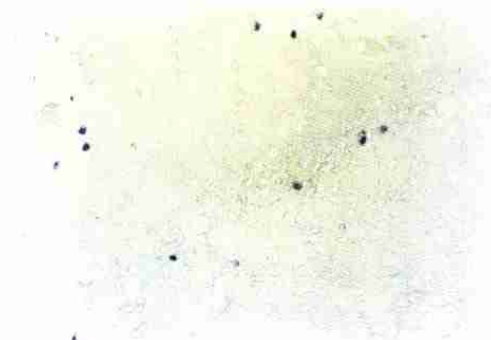


图2 热性惊厥组海马区TUNEL染色照片, 见较多TUNEL染色阳性细胞 ($\times 250$)

Figure 2 Photographs of TUNEL-stained sections in hippocampus (febrile seizure group).

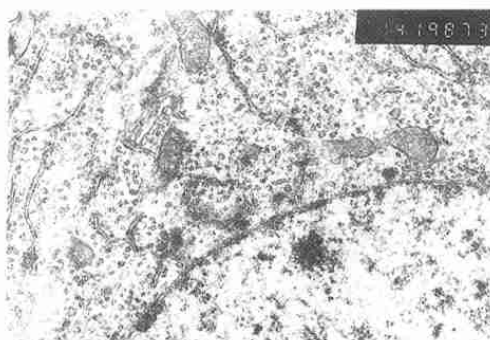


图3 正常对照组海马神经元超微结构, 线粒体大小正常, 横行嵴规则 ($\times 14\ 000$)

Figure 3 Ultrastructure of hippocampal neurons (normal control group).



图4 热性惊厥组海马神经元超微结构: 线粒体明显肿胀, 横行嵴断裂, 溶解伴空泡形成 ($\times 14\ 000$)

Figure 4 Ultrastructure of hippocampal neurons (febrile seizure group).

儿童型脊髓性肌萎缩症的临床与病理研究 (正文见第453页)

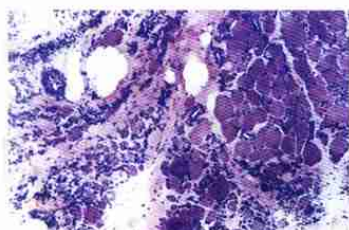


图1 SMA I型: 大组分布束性肌萎缩伴肌细胞呈圆形改变 (HE染色, 光镜, $\times 200$)

Figure 1 SMA I displayed large-group atrophic fibers with round changes (HE, $\times 200$)

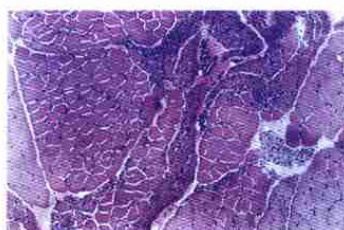


图2 SMA II型: 肌纤维呈束性萎缩 (HE染色, 光镜, $\times 200$)

Figure 2 The fibers showed cluster atrophy (HE, $\times 200$)

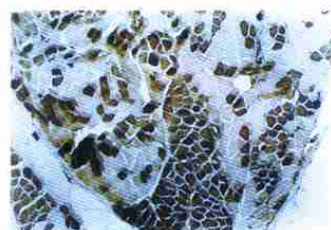


图3 SMA III型: 肌细胞呈同型群组化现象, I型和II型纤维集簇化, I型纤维呈深染, II型纤维呈浅染色 [ATP酶染色 (pH 4.3), 光镜, $\times 100$]

Figure 3 The type grouping were apparent in SMA III, Type I fiber displayed dark stain and Type 2 with light stain (ATPase at pH 4.3 $\times 100$)