论著

文章编号:1000-5404(2006)15-1570-03

# 局灶性皮质发育障碍模型鼠大脑皮质病灶组织的超微结构观察

马勋泰[1],晏 勇[1],王学峰[1],罗春阳[2],王晓平[3],晏 宁[4] ([1]重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016;[2]重庆市中山医院神经内科,重庆 400013;[3]四川省人民医院神经内科,成都 610031;[4]重庆市第三人民医院神经内科,重庆 400014)

**提 要:目的** 探讨皮质发育障碍(disorders of cortical development,DCDs)模型鼠小脑回(又名小的脑回或微脑回)周围病灶组织的电镜、病理特征,分析其与癫痫发生的关系。**方法** 9只健康新生Wistar雄性大鼠分为正常对照组、液氮损伤组和假手术组,每组3只,建立液氮损伤诱导的局灶性DCDs模型大鼠,观察其行为学和脑电图的变化,行HE、Nissl染色,在解剖镜下取材,透射电镜下观察并照像。**结果** 正常对照组和假手术组大鼠无任何抽搐发作,液氮损伤组偶有抽搐发作,但大多表现为活动增多、兴奋躁动、搔抓和"洗脸样活动"频繁。皮层电极EEG示小波幅节律为主,无典型的尖波、棘波、尖慢波、棘慢综合波发放。电镜所见DCDs鼠微脑回周围锥体神经元内线粒体肿胀,内质网扩张,胶质细胞肿胀,毛细血管周围水分积聚,部分髓鞘退变,异常神经纤维网,突触未见明显异常。**结论** 小脑回周围病灶组织的超微结构病变可为局灶性DCDs所致癫痫提供病理基础。

**关键词**:皮质发育障碍,局灶性;病理学

**中图法分类号**:R322.81;R329.27;R742.8 **文献标识码**:A

# Ultrastructural changes of focal tissue in cerebral cortex of disorders of cortical development in rats

MA Xun-tai[1], YAN Yong[1], WANG Xue-feng[1], LUO Chun-yang[2], WANG Xiao-ping[3], YAN Ning[4] ([1]Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016; [2]Department of Neurology, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400013; [3]Department of Neurology, The People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610031; [4]Department of Neurology, The Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China)

**Abstract: Objective** To study the pathological characteristics of disorders of cortical development (DCDs) and to analyze the relationship between the characteristics and epileptogenesis. **Methods** A total of 9 newborn healthy male Wistar rats were randomly divided into three groups including freeze-lesioned, sham-operated and normal groups. The disorders of cortical development model was established by liquid nitrogen lesion. All rats in the three groups were raised for 16 to 18 weeks after operation, then the focal cerebral tissues were taken and observed by transmission electron microscope (TEM) as well as histochemistry (HE and Nissl stain). **Results** Seizures did not occur in normal rats or sham-operated rats, while in freeze-lesioned rats besides seizures by chance, the main display was more activities, exciting, restlessness, and frequent action of face-wash. EEG of freeze-lesioned rats showed no typical sharp waves, or spikes. All freeze-lesioned rats displayed typical cortical malformation——a longitudinal microgyrus. The electron microscopic examination showed mitochondrial lesions, abnormal neuropil and endoplasmic reticulum expand in neurons and myelinoclasis in neurogliocytes. The changes were more severe around microgyria. **Conclusion** DCDs lead to main lesion around microgyrus. These changes could be one of mechanisms in an intrinsic epileptogenicity of cortical dysplasias from the pathological characteristics by electron microscopy.

**Key words**: disorders of cortical development, microgyrus; electron microscopy

皮质发育障碍(disorders of cortical development, DCDs)是难治性癫痫的主要病因之一,占儿童耐药性癫痫手术病例的近40%,而占癫痫病因约25%[1-4]。自1907年Alzheimer提出是癫痫的病因以来,人们一直致力于DCDs引起癫痫发病的研究。尤其Taylor于1971年报道了10例癫痫患者手术切片病理检查结果为斑片状异常,存在异位神经元后,又有人发现该神经元出现在胶质细胞瘤、低分化星形细胞瘤等中,从而提

基金项目:重庆市教委应用基础研究基金资助项目[渝教科(2001)12-29];重庆市医学科技基金资助项目(01-1-013)
Supported by the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing Municipal Education Committee [(2001)12-29] and the Scientific Research Foundation for Medical Science of Chongqing(01-1-013)

作者简介:马勋泰(1972-),男,四川省达州市人,博士研究生,主治医师,主要从事癫痫的基础与临床方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)89014166,E-mail:maxuntai2002@126.com

通讯作者:晏 勇,E-mail:maxuntai2002@126.com

收稿日期:2005-07-06;修回日期:2006-02-23

出了神经元移行障碍是难治性癫痫重要病因的假说，并第 1 次提出了局灶性皮质发育障碍这个概念。尽管国外对本综合征的临床表现、脑电图、影像学和病理报道并不少，但对其超微结构仍不够清楚。本研究拟建立模拟人类多小脑回的局灶性 DCDs 大鼠模型，在电镜下观察病灶组织的超微结构，寻找可能的癫痫病理和引起脑组织结构改变的原因。

## 1　材料与方法

### 1.1　局灶性 DCDs 模型的建立

9 只健康新生 Wistar 雄性大鼠，体质量为 3 ~ 6 g，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供，分 3 组，正常对照组、液氮损伤组和假手术组各 3 只。实验方法按照文献[5]进行。假手术组用类似方法但铜制探针在室温条件下置于额顶颅骨上 8 s，损伤的位点与前相同。正常对照组不经任何处理。然后，在相同条件下喂养 16 ~ 18 周用于实验。

### 1.2　一般行为学观察

观察动物的意识状态（清醒、嗜睡、昏睡、昏迷），生活能力（摄食、饮水能力），行为表现（抽搐发作、是否活动增多及兴奋躁动、攻击行为等）。详细记录（时间 15:00 ~ 23:59）。

### 1.3　脑电图描记

用 3 根电极，左右两侧顶部头皮下各 1 根，鼻窦处插入 1 根为接地电极，在二道生理记录议上描记脑电活动。尽量在大鼠安静时采集脑电图记录，要求每只记录时间不得少于 30 min。

### 1.4　HE 和 Nissl 染色

用 4% 多聚甲醛 PBS 液经心脏灌注固定取材，选大脑中隔区后包括海马的层面为中心冠状石蜡切片，每例共取约 10 片，片厚 5 μm，行 HE 染色、硫堇染色法（Nissl 染色）。

### 1.5　电镜标本的制作

灌流固定 3 组均 3.5% 水合氯醛腹腔注射，用量为 1.0 ~ 1.5 ml/100 g，仰卧位固定动物，用橡皮筋将四肢、上门齿固定在鼠板上，手术剪剪开胸腔，将针直接经左心室插入主动脉，剪开右心耳，灌流固定泵依次加入 100 ~ 150 ml 生理盐水（速度 15.0 r/min），至洗液澄清，继以 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 350 ~ 500 ml（速度 13.0 r/min，pH 7.4，4 ℃），直到眼球苍白，肝发白。如果出现肌肉抽动、鼠尾上翘，肢体僵硬，表示灌注效果好。250 ml 含 2% 多聚甲醛、2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液代替 4% 已经预冷的多聚甲醛 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液进行内固定。取有海马结构的 2 ~ 3 mm 厚冠状切面脑块，然后用 2.5% 戊二醛（pH 7.4）进行固定 24 h。最后根据大鼠立体定位图谱在解剖镜下取距微沟 2 ~ 5 mm 大脑皮质 1 $mm^3$ 组织 6 块，1% 锇酸固定 2 h，丙酮脱水，环氧树脂胞埋，0.1% 醋酸铀和 3% 柠檬酸铅双重电子染色，H-60 透射式电子显微镜下进行超微结构观察，每个组织块观察 3 个铜网，选择病灶部位并照像。

## 2　结果

### 2.1　大鼠行为学观察

正常对照组和假手术组大鼠无任何抽搐发作，液氮损伤组偶有抽搐发作，但大多表现为活动增多、兴奋躁动、搔抓和“洗脸样活动”。

### 2.2　脑电图（EEG）变化

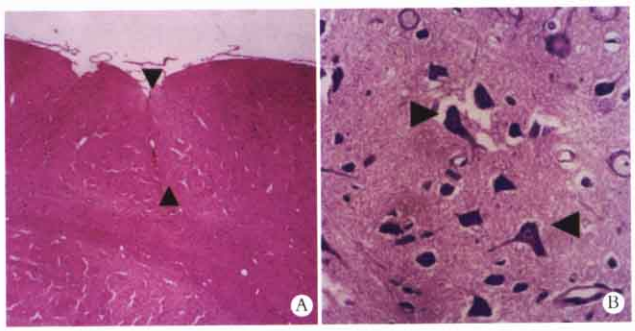
皮层电极 EEG 示小波幅节律为主，无典型的尖波、棘波、尖慢波、棘慢综合波发放。

### 2.3　小脑回大体标本

所有经液氮探针损伤的大鼠皮质在原损伤处都表现出一典型的小脑回，类似人类多小脑回畸形。它与颅中缝线平行，长 3 ~ 5 mm，距离颅中缝线 2 ~ 4 mm，大部分涉及感觉皮质第 1 区，也涉及到部分额、顶、枕叶。在海马结构或另外较远的脑区肉眼没有观察到明显的结构改变。假手术组和正常对照组鼠大脑皮质结构没有异常改变。

### 2.4　HE 和 Nissl 染色后的光镜观察

发育异常的大脑皮质具有典型的 3 或 4 层大脑皮质结构（图 1A）。小脑回皮质分层异常，细胞构筑混乱，轴突、树突导向异常，锥体细胞固缩，染色质加深，形态异常的神经元核周有成簇的尼氏小体，在小脑回周围皮质可见巨大神经元、巨大星形细胞、气球样细胞和贝茨巨大嗜酸细胞（图 1B）。而皮质下白质也可见巨大的嗜酸性泡状细胞，同侧远离小脑回的海马 CA3 区可见细胞排列紊乱，细胞丢失，而齿状回、CA1 和 CA2 区等没有观察到结构和细胞形态的明显改变。




A：小脑回结构　（HE×100）；B：小脑回周围异常神经元　（Nissl×400）

**图 1　DCDs 小鼠大脑回病理学观察**

### 2.5　电镜观察结果

2.5.1　正常对照组和假手术组鼠电镜观察结果　神经元和神经胶质细胞及细胞器结构清晰，未见异常。

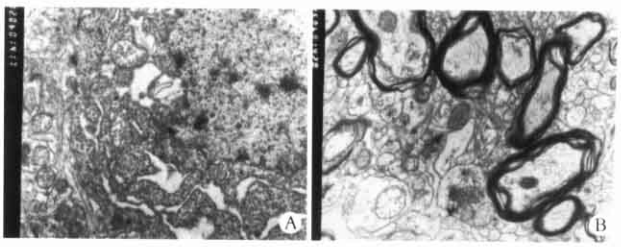
2.5.2　局灶性 DCDs 模型鼠电镜病理观察结果

2.5.2.1　神经元和胶质细胞异常　①神经元：部分核膜模糊，核周间隙扩大，染色质浓集边缘，部分与核膜融合。细胞质浓缩，细胞质内细胞器减少或消失。不少神经元细胞内见脂褐素颗粒。上述改变主要出现在微脑回周围病灶组织中。②胶质细胞：轻度肿胀，典型的毛细血管周围水分积聚，其周线粒体肿胀，嵴减少、变短，断裂，基质颗粒减少或消失，密度减低，部分髓鞘退变。神经胶质细胞原纤维增多，为很多的中间丝。

2.5.2.2　细胞器结构异常　①线粒体：模糊肿胀，体积增大，线粒体嵴模糊不清或部分脱失，变短，基质颗粒减少或消失，密度减低，但未见线粒体膜破裂及絮状沉积物，可见线粒体肥大及增生（图 2A）。②内质网：气球样细胞质中内质网肥大扩张，表现为内质网腔扩张，其腔内还可见低电子密度的分泌物潴留伴有颗粒改变，没有发现粗面内质网的脱颗粒及解聚、同心性膜性小体和池内封隔等现象。

2.5.2.3　质膜的分离——脱髓鞘现象　高度规则的重叠质

膜环，结构非常致密，但本实验观察到病灶组织中有髓纤维排列紧密紊乱，纵横扭曲，粗细大小不一，有很多髓鞘膜结构疏松，髓鞘外层与内层的髓鞘部分脱离二者之间可见到一些电子致密物质，因此推测髓鞘的变化不是在手术较短的时间内形成的，可能为 DCDs 形成的(图 2B)。




A：微沟周围线粒体 (×12 000)；B：微沟周围髓鞘 (×15 000)

**图 2 液氮损伤组大鼠脑皮质病灶组织电镜观察结果**

2.5.2.4 神经细胞核 核体积、外形、被膜、核仁均未见典型病变，仅细胞核染色质电子密度降低。

2.5.2.5 突触和神经纤维网 微脑回第 1 层有异常的神经纤维网，其间很多神经胶质突和非对称突触，一些突触连接缺乏，而在大脑皮质深层神经纤维网的外观和突触连接正常。巨大神经元有对称的轴-体突触，周围可见正常的神经纤维网。

## 3 讨论

由于人类多小脑回标本极少且获取困难，模拟人类多小脑回畸形的局灶性 DCDs 动物模型在近年来便成了国外公认的较多应用于研究 DCDs 所致难治性癫痫的发生机制的模型。该模型早年由 Dvorak 和 Feit 修订[5]，经液氮(－196 ℃)冷冻后的铜制探针也能诱导成功，该方法使用简单方便，成功率高。

本实验在电镜下观察到锥体神经元内线粒体肿胀、肥大及增生，嵴模糊不清或部分脱失，变短，基质颗粒减少或消失，内质网扩张，胶质细胞肿胀，毛细血管周围水分积聚，部分髓鞘退变，异常的神经纤维网，间有很多神经胶质突和非对称突触，一些突触连接缺乏，少见神经细胞核异染色质增多及染色质边缘化。另外大鼠行为学和常规病理方面也有改变。而正常对照组和假手术组却未见上述变化。因此可以说明液氮是大鼠大脑 DCDs 的直接诱因。

电镜下的突出表现为线粒体体积增大和量增多，部分形态不清，嵴消失，内质网扩张，说明神经元内部氧化代谢的增强，因为线粒体广泛分布于胞体和突起内，神经元内的线粒体与一般细胞中的相同，也具有细胞色素氧化酶系统等，故与氧化代谢有关。神经元损伤后死亡与线粒体凋亡相关因子细胞色素 C 激活 caspase 级联反应密切相关，线粒体内膜间隙存在许多凋亡相关蛋白，包括细胞色素 C、smac、DIA-BLO 蛋白以及凋亡诱导因子(AIF)，这些因子或蛋白释放到胞质，激活 caspases，引发凋亡的执行[6]。

结合液氮损伤致局灶性 DCDs 大鼠的行为学改变、脑电图和常规病理及电镜下线粒体等改变，我们可推测液氮损伤幼鼠大脑皮质后，短期内造成局部脑皮质缺血缺氧，细胞坏死性死亡，坏死灶周围胶质细胞和血管增生。随着时间的推移，小脑回变成皮质发育畸形病理灶，然而它并非是静止的，该病理灶对其周围某些神经元继续引发局灶性损伤，可能是细胞坏死时神经递质、酶和多种信使不断或爆发性的释放[7]。如果出现自发性癫痫发作，可能是这些局灶性损伤影响了周围的神经细胞并对此作出的反应，产生变化以补偿这种伤害，这样就减少了神经元兴奋功能的丧失，在一定程度上抑制了癫痫发作的进一步发展。另外，这些局灶性损伤组织可能是致癫痫灶，它在小脑回周围异常兴奋性突触环路共同促进了神经元的超兴奋性，从而引起痫性发作的易感性明显增加，临床上导致癫痫的发生。实验最初的损伤以及后来长期的病损引起了线粒体为主要的损伤，以及一些膜结构的破坏引起兴奋性神经递质大量释放，造成细胞内 $Ca^{2+}$ 的大量流入，聚集，对神经元产生明显的破坏性影响，胞内自由基水平升高，严重者可造成细胞死亡。因而，线粒体的病损可能是引起癫痫发生的始动因素。上述这些超微病理改变可能为临床多小脑回畸形的癫痫发生机制提供了帮助，然而实验很少观察到典型的痫性发作，可能跟我们实验设计的观察窗窄有关。总之，局灶性 DCDs 超微结构的研究使我们对 DCDs 所致的难治性癫痫的发生机制有了更新的认识。

**参考文献：**

[1] HUDGINS R J, FLAMINI J R, PALASIS S, *et al*. Surgical treatment of epilepsy in children caused by focal cortical dysplasia[J]. Pediatr Neurosurg, 2005, 41(2): 70－76.

[2] SISODIYA S M. Malformations of cortical development: burdens and insights from important causes of human epilepsy[J]. Lancet Neurol, 2004, 3(1): 29－38.

[3] GUERRINI R, SICCA F, PARMEGGIANI L. Epilepsy and malformations of the cerebral cortex[J]. Epileptic Disord, 2003, 5(Suppl 2): S9－S26.

[4] GARBOSSA D, VERCELLI A. Experimentally-induced microencephaly: effects on cortical neurons[J]. Brain Res Bull, 2003, 60(4): 329－338.

[5] HAGEMANN G, KLUSKA M M, REDECKER C, *et al*. Distribution of glutamate receptor subunits in experimentally induced cortical malformations[J]. Neuroscience, 2003, 117(4): 991－1002.

[6] JANICKE R U, SPRENGART M L, WATI M R, *et al*. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis[J]. J Biol Chem, 1998, 273(16): 9357－9360.

[7] REDECKER C, HAGEMANN G, KOHLING R, *et al*. Optical imaging of epileptiform activity in experimentally induced cortical malformations [J]. Exp Neurol, 2005, 192(2): 288－298.

(编辑 张大春)