文章编号:1000-5404(2007)10-0959-04

论著

伽玛刀对红藻氨酸模型大鼠海马形态学及苔藓纤维变化的影响

耿明英[1],程 远[1],许民辉[2],马 颖[1],沈光建[2],李飞鹏[2] ([1]重庆医科大学附属第二医院神经外科,重庆 400010;[2]第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经外科,重庆 400042)

提 要:目的 通过红藻氨酸(kainic acid, KA)癫痫大鼠模型的伽玛刀(gamma knife, GK)照射,探讨伽玛刀治疗癫痫的机制,以及伽玛刀与海马苔藓纤维发芽(mossy fiber sprouting, MFS)的关系。**方法** 74只Wistar大鼠分为3组:正常对照组(A组),红藻氨酸致痫模型大鼠组(B组),40 Gy伽玛刀照射红藻氨酸致痫大鼠组(C组)。应用常规病理、电镜观察海马结构形态学改变,Timm's银染色组织化学方法观察伽玛刀对海马区苔藓纤维发芽的影响。**结果** B组可见以CA1、CA3区及齿状回内分子层(inner molecular layer, IML)为主的神经元变性、坏死。C组与B组相比,神经元损伤减轻。对Timm's染色脑片海马CA3区透明层进行测定,B、C组大鼠海马苔藓纤维均出现明显的发芽现象,CA3区异常Timm's阳性颗粒光密度值显著高于A组($P<0.01$);C组与B组相比,1~14 d苔藓纤维发芽未见明显减少($P>0.05$),28~42 d显著减少($P<0.05$)。**结论** 海马细胞形态的改变——苔藓纤维发芽,可能是KA大鼠癫痫形成的重要机制。40 Gy的伽玛刀照射对减轻神经元的损伤有重要作用,抑制苔藓纤维发芽是主要机制之一。

关键词:伽玛刀;海马;苔藓纤维发芽;癫痫;大鼠
中图法分类号:R338.26;R749.17;R816.1 **文献标识码**:A

Effects of gamma knife on morphological changes of hippocampal formation and mossy fiber sprouting in epileptic rats induced by kainic acid

GENG Ming-ying[1], CHENG Yuan[1], XU Min-hui[2], MA Ying[1], SHEN Guang-jian[2], LI Fei-peng[2] ([1]Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010. [2]Department of Neurosurgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the relation between the pathogenesis of epilepsy and the mossy fiber sprouting (MFS) by using gamma knife (GK) radiation in rat model. **Methods** Seventy-four Wistar rats were randomly divided into 3 experimental groups: control group (normal rats, group A); rats that underwent kainic acidinduction alone (KA rats, group B); KA rats treated by 40 Gy gamma knife (group C). Conventional histopathological method and electron microscope were used to observe morphological changes in hippocampal formation. In addition, Timm's silver sulfide staining was used to examine the effect of GK on MFS. **Results** Hippocampal neuronal degeneration and necrosis, especially in CA1 and CA3 and inner molecular layer (IML) of the dentate gyrus were seen in group B. Fewer apoptotic neurons and milder lesions in neurons at the corresponding time point were revealed in group C than group B. Timm's staining showed that multiple aberrant Timm's granules were found in the IML of the dentate gyrus in groups B and C, but not in group A, The transparent layer of CA3 section of the hippocampus was more pronounced in groups B and C than A($P<0.001$). No significant difference was noted regarding MFS between group B and group C during 1 - 14 days($P>0.05$); 28 - 42 days later, it became significantly different($P<0.05$). **Conclusion** Changes of cell modality--mossy fiber sprouting of hippocampus may play an important role in the pathogenesis of epilepsy. Gamma knife (40 Gy) has definitive effect on inhibiting neuron damage, in which inhibiting MFS in the hippocampus is main mechanism to eliminate epilepsy.

Key words: gamma knife; hippocampus; mossy fiber sprouting; epilepsy; rat

作者简介:耿明英(1973-),女,山东省东阿县人,博士研究生,主治医师,主要从事脑肿瘤及脑功能性疾病的无创外科治疗方面的研究。电话:(023)66337272, E-mail: cactusflower@QQ.com
通讯作者:程 远,电话:13708329653, E-mail: chengyuan023@yahoo.com.cn
收稿日期:2006-07-19;**修回日期**:2007-01-10

海马苔藓纤维发芽(mossy fiber sprouting, MFS)所致的突触重组是癫痫病理生理过程中一个非常重要的形态学变化。苔藓纤维发芽是兴奋性环路的形成,是癫痫反复发作的重要原因[1]。苔藓纤维发芽与其他神经元建立新的神经网络成为癫痫扩散的新途径,对海马兴奋性的增高及癫痫敏感性的维持均有重要作用。某些药物就是通过干预苔藓纤维发芽达到阻断癫痫反复发作的目的。伽玛刀作为癫痫有效的外科治疗方法,治疗机制仍不十分清楚。我们利用伽玛刀照射KA大鼠癫痫模型,观察组织学、超微结构、苔藓纤维发芽的变化,来探讨伽玛刀的治疗机制,旨在为伽玛刀的抗癫痫作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 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的清洁级 Wistar 成年雄性大鼠 153 只,7~8 周龄,体质量(230±10)g。术前均自由进食水。将大鼠分为3组:①正常对照组(A组)3只;②红藻氨酸致痫模型大鼠组(B组)75只;③40 Gy 伽玛刀照射红藻氨酸致痫大鼠组(C组)75只。检测1、3、7、14、28、42 d共6个时间点。

1.1.2 主要试剂 阿拉伯胶、硝酸银、多聚甲醛、1,4 对苯二酚、硫化钠(Na_2S)。

1.2 方法

1.2.1 动物致痫 实验当日用生理盐水将红藻氨酸配制成0.4 g/L溶液。按12 mg/kg给予模型鼠腹腔注射,A组大鼠给予10 ml/kg生理盐水腹腔注射。①采用 Mazarati[2] Ⅴ级实验动物痫性发作分级标准对致痫大鼠进行分级。达到Ⅲ~Ⅴ级发作为致痫成功鼠。为保证模型的均一性,致痫成功的Ⅲ~Ⅳ级大鼠发作达到50 min时用苯巴比妥30 mg/kg腹腔注射终止发作后进入实验组,不符合上述条件的致痫大鼠弃用。24 h摄像系统观察大鼠发作情况。②LMS-2B型二道生理记录仪对致痫大鼠进行脑电描记。癫痫发作后4 h采用1%的戊巴比妥钠腹腔麻醉(40 mg/kg)开始检测。每个时间点每组抓取1~2只大鼠进行检测,每次测30 min。

1.2.2 伽玛刀照射 红藻氨酸致痫成功后6 d对模型鼠进行照射。动物麻醉后,消毒并切开头皮显示 Bregma 点。用牙科钻于 Bregma 点上钻一未透过颅骨的骨孔,将消毒后的硫酸铜点于其中。用涂有医用生物胶的自身骨膜封闭骨孔后,缝合头皮。参照诸葛启钏[3]编译的大鼠解剖图谱将大鼠安置在与Leksell头架相联的动物固定架上。通过1.5T的核磁共振仪定位扫描(层厚1 mm,无间距)。2个4 mm等中心点照射左侧海马背侧部分。照射中心点:①Bregma点-4.16 mm(Z),皮层下4 mm(Y),左侧旁开4 mm(X);②Bregma点-4.16 mm(Z),皮层下4 mm(Y),左侧旁开1.2 mm(X)。中心剂量为40 Gy(C组),70%有效等剂量曲线。

1.3 标本制备及 Timm's 染色

1.3.1 光镜标本制备 用生理盐水150 ml对麻醉后的大鼠进行心脏进行灌注,再进行200 ml 4%多聚甲醛灌注。取2~3 mm冠状海马厚片固定,石蜡包埋,常规光镜制片,片厚5 μm,染色。在光镜下观察海马结构的形态学改变。

1.3.2 透射电镜标本的制备 4%多聚甲醛+2.5%戊二醛的0.1 mol/L磷酸缓冲液对麻醉后的大鼠进行心脏进行灌注。将组织标本用1%锇酸固定,系列丙酮脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,解剖镜下取CA3、CA1和齿状回IML各1 mm^3组织,经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后置于透射电镜下进行超微结构观察。

1.3.3 Timm's 染色[4] 心脏灌注:生理盐水150 ml冲洗至流出的液体变清亮,再灌入0.1% Na_2S 150 ml(pH 7.4),最后用200 ml 4%多聚甲醛进行灌注。标本取出后放入4%的多聚甲醛液固定24 h,入30%蔗糖磷酸缓冲液内至组织块沉底。脑块取出后用恒冷箱切片机进行连续冠状切片,每张脑片厚20 μm。

常规配制 Timm's 混合液。染色前,在暗室内将0.5 ml的17%硝酸银溶液加入上述 Timm's 混合液中,充分混匀,倒入已经放好脑切片的染色缸中,染色40~60 min。自来水冲洗10 min以上,吹干、脱水、透明、封固。

1.4 评定标准

1.4.1 苔藓纤维发芽的分级 采用 Gregory 法[5]对 Timm's 染色脑片苔藓纤维发芽进行分级。0级,未见出芽;1级,偶可见点状出芽;2级,可见点状或稀疏带状出芽;3级,可见片状出芽;4级,可见高度集中的连续片状出芽;5级,可见浓密片状出芽。

1.4.2 CA_3 苔藓纤维发芽的计算 采用 HPS 2000 高分辨彩色病理图文分析系统计算 Timm's 染色脑片海马 CA3 区透明层银染颗粒的光密度值。每片取3个视野的均值进行统计分析。

1.4.3 时间描述 所有对应性描述均以伽玛刀照射组(C组)的起始时间为起点。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 光镜下海马结构形态学观察

B组CA1、CA2、CA3区及齿状回以神经毡水肿,以神经元变性、坏死为主。星形胶质细胞水肿,以上变化在1、3 d时变化不明显,7 d后随时间的延长更加严重,42 d时低倍镜下观察到大量的神经元结构消失。C组照射侧与同期B组相比,神经元坏死没有加重表现。C组右侧(未经照射侧的脑组织)与B组比较形态学改变无明显差异。

2.2 电镜下海马 CA3 区超微结构观察

随时间延长可见到B组海马结构损伤呈进行性加重,神经元数量减少为显著特征。42 d时在海马区几乎见不到完整的神经元形态;粗面内质网增生,池腔扩张;线粒体肿胀,大小不一,嵴断裂呈溶解及空泡状;内质网的核糖体脱落、游离核糖体解聚;神经毡水肿加重,血管壁未见分层。C组与B组1~14 d,相比较改变无明显差异,28~42 d,神经毡及细胞器肿胀

程度减轻，神经元凋亡细胞没有增加，血管壁未见分层。

2.3　Timm's 染色脑片显微镜观察结果

A 组 Timm's 染色颗粒呈点状及条带状均匀分布，约 0～2 级改变（图 1A）。与 A 组相比，B、C 各组每个时间点均明显增强。1～3 d，B 组呈现出 1～2 级改变，7 d 后随时间的延长而加深，28～42 d 达高峰，约 3～5 级改变（图 1B）。与 B 组相比较，C 组 1～14 d 内，呈 2～4 级改变；28～42 d 苔藓纤维发芽明显减少，呈 3～4 级改变（图 1C）。



A：正常对照组；B：红藻氨酸致痫模型组；C：40 Gy 伽玛刀照射红藻氨酸致痫大鼠组

图 1　3 组大鼠 CA3 区 Timm's 颗粒的分布　（Timm's ×100）

2.4　各组苔藓纤维发芽阳性颗粒光密度值的比较

B、C 组与 A 组相比，Timm's 阳性颗粒光密度值均有显著性差异（$P<0.01$）。B、C 组两组间海马 CA3 区透明层内 Timm's 阳性颗粒光密度值在 1～14 d 差异无统计学意义（$P>0.05$）；28～42 d 两组间差异有统计学意义（$P<0.05$）（表 1）。

表 1　海马 CA3 区 Timm's 阳性颗粒光密度值比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d	42 d
A 组	19.7 ±4.1	19.7 ±4.1	19.7 ±4.1	19.7 ±4.1	19.7 ±4.1	19.7 ±4.1
B 组	33.1 ±3.3[a]	41.7 ±3.2[a]	48.4 ±2.3[a]	59.4 ±2.2[a]	76.4 ±4.2[a]	80.9 ±3.3[a]
C 组	31.8 ±3.5[a]	41.2 ±3.5[a]	43.9 ±3.3[a]	54.4 ±2.9[a]	68.6 ±3.5[ab]	70.1 ±2.3[ab]

a：$P<0.01$，与 A 组比较；b：$P<0.05$，与 B 组比较

3　讨论

自 Talairach 1959 年提出癫痫立体定向放射外科治疗的概念以来，临床应用已取得了一定的成果，治疗原理仍不明确。现在关于伽玛刀治疗癫痫的机制只形成几种假说。本研究在成功建立红藻氨酸致痫模型的基础上，从结构形态学改变及 Timm's 染色两个方面来探讨伽玛刀治疗癫痫的机制。

本研究结果显示 B、C 各组光镜下观察到 CA1 区和 CA3 区及齿状回见大量神经元变性、坏死，星形胶质细胞水肿，以及空泡形成。以上变化随时间的延长更加明显。C 组与同期 B 组相比，神经元坏死减轻。B 组神经元随时间延长可见到细胞损伤呈进行性加重。C 组每个时间点神经元结构损伤均减轻，凋亡细胞减少，整个细胞器破裂、溶解及空化现象减轻，细胞器肿胀仍较普遍，但程度减轻。从以上结果可以看出癫痫大鼠发作时间越久，损伤越重，说明海马结构损伤与长时间抽搐发作引起的缺氧、缺血性变化有一定的关系。伽玛刀降低这种损伤，可能与伽玛刀照射后发作停止或减少，从而减少发作带来的脑的缺氧、缺血性损伤变化有关。本研究结果显示海马损伤结果与 Barnes[6] 和 Schwarzer 等[7] 报道基本一致，重于梁军潮等[8] 的实验研究结果，可能与模型的建立方法及大鼠的类型、伽玛刀照射参数不同有关。

苔藓纤维发芽是成人颞叶癫痫和动物癫痫模型常见的一种病理损伤性改变。所谓发芽是一种神经的再生现象，即海马结构齿状回颗粒细胞的轴突在齿状回内分子层、CA3 区下锥体层异常生长。谷氨酸激动剂红藻氨酸是一种从天然海藻中提取的强效神经毒素，可选择性的与海马齿状回颗粒细胞轴突末稍上的红藻氨酸受体结合，导致齿状回门区中间神经元的损害，降低其对颗粒细胞的抑制性，引起颗粒细胞过度兴奋，进而诱导突触重建-苔藓纤维发芽。发作频率高的大鼠比发作频率低的大鼠发芽密度更高[9]。从本次实验研究的超微结构来看，B 组及 C 组神经元均呈不同程度的损伤趋势，与苔藓纤维发芽的变化相一致。门区、CA3 区锥体细胞的损伤触发了苔藓纤维发芽及突触重组，也是自发性癫痫发作形成的关键。同时发作时间越久，细胞损伤越重，苔藓纤维发芽程度越显著。

在我们前阶段的研究结果显示，伽玛刀照射组癫痫发作较对照组显著减少，本实验结果显示 B 组苔藓纤维在 7 d 后才见到明显的发芽，随时间延长，评分增加。C 组与 B 组相比，伽玛刀照射后 1～14 d 均无显著性差异（$P>0.05$），在 28～42 d 差异才有了统计学意义（$P<0.05$）。这提示伽玛刀照射可以减少苔藓纤维发芽，改变兴奋性突触环路的重建，对临床症状的改善起到积极作用。这种改变有可能是伽玛刀治疗癫痫的重要机制之一。来自临床血管畸形及肿瘤继发性癫痫的临床研究结果显示，症状的好转与肿瘤的消失或

血管的闭塞并不同步，伽玛刀治疗后立即发生功能改变与血管或肿瘤的变化有着不同的机制[10]，动物实验也显示临床症状的好转早于组织学的变化[11,12]。大鼠海马区经放射线照射后，神经元有突触新生物形成，这一新生物的形成使致痫神经元产生传导阻滞，有利于临床症状的好转。伽玛刀照射可能通过以下两个途径发挥作用：①伽玛刀照射后改变了脑的其他功能，癫痫发作减少，神经元的兴奋性损伤作用减轻，使苔藓纤维发芽减少。②伽玛刀照射干扰了苔藓纤维发芽的途径，改变了兴奋性突触环路的重建，苔藓纤维发芽减少，最后癫痫发作减少。这两个问题是我们以后研究的重点。

参考文献：

[1] Lobo M K, Itri J N, Cepeda C, *et al*. Ionotropic glutamate receptor expression and dopaminergic modulation in the developing subthalamic nucleus of the rat: an immunohistochemical and electrophysiological analysis [J]. Dev Neurosci, 2003, 25(6): 384 - 393.

[2] Mazarati A M, Telegdy G. Effects of somatostatin and anti-somatostatin serum on picrotoxin-kindled seizures [J]. Neurophamacology, 1992, 31(8): 793 - 397.

[3] Paxinos G, Watson C. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 诸葛启钏, 译. 第3版. 北京：人民卫生出版社, 2005: 2 - 5.

[4] Raol Y S, Budreck E C, Brooks-Kayal A R. Epilepsy after early-life seizures can be independent of hippocampal injury [J]. Ann Neurol, 2003, 53(4): 503 - 511.

[5] Holmes G L, Sarkisian M, Ben-Ari Y, *et al*. Mossy fiber sprouting after recurrent seizures during early development in rats [J]. J Comp Neurol, 1999, 404(4): 537 - 553.

[6] Barnes G, Puranam R S, Luo Y, *et al*. Temporal specific patterns of semaphorin gene expression in rat brain after kainic acid-induced status epilepticus[J]. Hippocampus, 2003, 13(1): 1 - 20.

[7] Schwarzer C, Sperk G, Samanin R, *et al*. Neuropeptides-immunoreactivity and their mRNA expression in kindling: functional implications for limbic epileptogenesis [J]. Brain Res Brain Res Rev, 1996, 22(1): 27 - 50.

[8] 梁军潮，徐如详，王伟民，等. 低剂量伽玛刀照射癫痫大鼠脑神经元的超微结构研究[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2005, 10(2): 83 - 85.

[9] Lemos T, Cavalheiro E A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rat[J]. Exp Brain Res, 1995, 102(3): 423 - 428.

[10] Gerszten P C, Adelson P D, Kondziolka D, *et al*. Seizure outcome in children treated for arteriovenous malformations using gamma knife radiosurgery[J]. Pediatr Neurosurg, 1996, 24(3): 139 - 144.

[11] Liscak R, Vladyka V, Novotny J, Jr., *et al*. Leksell gamma knife lesioning of the rat hippocampus: the relationship between radiation dose and functional and structural damage[J]. J Neurosurg, 2002, 97(Suppl 5): 666 - 673.

[12] Regis J, Kerkerian-Legoff L, Rey M, *et al*. First biochemical evidence of differential functional effects following Gamma knife surgery [J]. Stereotact Funct Neurosurg, 1996, 66(Suppl 1): 29 - 38.

（编辑　薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)10-0962-01

沙利度胺治疗骨髓增生异常综合征引起深静脉血栓形成1例

周景英，裴　莉，陈洁平　（第三军医大学西南医院血液内科，重庆 400038）

患者，女性，21岁，因“确诊骨髓增生异常综合征7个月余，左下肢肿胀8 d”入院。第1次入院前半年无明显诱因出现口唇发白、黑朦、乏力。到当地医院行血常规检查提示红细胞减少。随后入住我院，查体：中度贫血貌，胸骨压痛(－)，肝脾肋下未及，浅表淋巴结未扪及肿大，血象：WBC 6.5×10⁹/L，RBC 3.27×10¹²/L，HGB 72 g/L，PLT 354×10⁹/L。骨髓涂片：骨髓增生活跃，原始＋早幼粒细胞占5%，原幼单核细胞占12%。诊断骨髓增生异常综合征(RAEB)明确，予标准剂量TAE方案化疗，具体为吡喃阿霉素(THP)总量90 mg，阿糖胞苷(Ara-c)1 050 mg，足叶乙甙(VP-16)500 mg。多次复查血象提示红细胞无明显上升，1个月后复查骨髓象提示原始幼稚细胞比例无明显下降。入院后80 d给予沙利度胺治疗，首剂50 mg/d，每周增加50 mg/d，最大剂量350 mg/d。12周后改为300 mg/d维持治疗。服药4周后红细胞逐渐上升，血红蛋白96 g/L。8周后复查骨髓象提示原幼粒及原幼单较前明显下降。沙利度胺用药时间为12周。

入院前5 d开始出现左足及小腿轻度肿胀，次日起左侧大腿肿胀。查体：左下肢膝关节平面以上轻度肿胀，膝关节平面以下明显肿胀，左小腿及足背足底皮肤张力明显增高。骨盆CT未见明显异常。下肢彩超及左下肢深静脉造影：左侧股浅静脉汇入处、左侧股总静脉、左侧髂静脉、左侧髂静脉血栓形成。给以尿激酶9 d及球囊扩张术等治疗后下肢肿胀消失。复查下肢超声提示左侧股总静脉前后壁厚度缩小。

（下转966页）

作者简介：周景英(1980－)，女，重庆市铜梁县人，医师，主要从事白血病和淋巴瘤等血液系统疾病方面的研究。电话：(023)68765199

收稿日期：2006-04-28；修回日期：2006-06-01