文章编号:1000-5404(2008)01-0049-04

论著

# 成年大鼠缺氧性脑损伤后亚临床痫性发作及海马苔藓纤维出芽

陈 秀[1],吴万福[1],胡长林[1],蔡文琴[2],杨 忠[2] ([1]重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010;[2]第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

**摘 要**:**目的** 探讨缺氧性脑损伤后亚临床痫性发作的病理生理机制。**方法** 采用成年雄性 SD 大鼠,充以 8% 氧氮混合气体缺氧后,监测大鼠脑电活动,检测海马组织苔藓纤维出芽(mossy fiber sprouting,MFS)的变化。**结果** 大鼠缺氧损伤后痫样放电的发生率为 19.67%,亚临床痫性发作组缺氧后 7 d 海马 CA3 区下锥体细胞层棕黑色颗粒逐渐增多;14 d 呈束状、斑片状颗粒沉积;28 d 呈现明显颗粒沉积条带,亚临床痫性发作组海马 CA3 区苔藓纤维出芽评分明显高于非亚临床痫性发作组和对照组,而 3 组齿状回(dentate gyrus;DG)内分子层苔藓纤维出芽评分无差异($P>0.05$)。**结论** 成年大鼠缺氧性脑损害后可出现痫样放电并在海马 CA3 区形成苔藓纤维出芽,而海马 CA3 区苔藓纤维出芽可能与缺氧性脑损伤后痫性发作有关。

**关键词**:缺氧性脑损伤;痫性发作;苔藓纤维出芽
**中图法分类号**:R366.4;R741.02;R742.1 **文献标识码**:A

# Subclinical seizure and mossy fiber sprouting in hippocampus of rats following hypoxic brain damage

CHEN Xiu[1], WU Wan-fu[1], HU Chang-lin[1], CAI Wen-qin[2], YANG Zhong[2] ([1]Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010; [2]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To explore the pathophysiological mechanism of subclinical seizures following hypoxic brain injury. Methods Totally 71 adult male SD rats were set in a close chamber with 8% nitrogen oxygen ventilation (0.5 L/min) till they lost breath every day for 7 d to induce hypoxic brain injury. Another 9 rats living in normal air condition served as control. Electroencephalography was carried out 20 min before the hypoxia and 2 h after hypoxic ventilation to detect subclinical seizures. The animals were sacrificed in 7, 14, and 28 d after the end of hypoxia. Mossy fiber sprouting in the hippocampus were detected by Timm's histochemical staining. Results Subclinical seizures occurred in 19.67% rats (14/71) following hypoxia. In Subclinical seizure group, brownish black granule sediment appeared in the pyramidal layer of CA3 region in 7 d following hypoxia, and became more intensive in bundle-like or patch-like way in 14 d, moreover, an obvious stained band was formed in 28 d. Compared with non-subclinical seizure group and control group, the scores of mossy fiber sprouting in the hippocampal CA3 region were higher in subclinical seizure group. But there was no significant difference of mossy fiber sprouting in dentate gyrus among the 3 groups above. Conclusion Subclinical seizures may occur following hypoxia in adult rats, and prominent mossy fiber spouting is formed in the hippocampal CA3 region of these rats, which may be related to seizure following hypoxic brain damage .

**Key words**: hypoxic brain injury; seizure; mossy fiber sprouting

临床上缺氧性脑损伤并不少见,呼吸衰竭、溺水、严重贫血、窒息及中毒、麻醉手术意外等均可引起不同程度的脑损害。其临床表现复杂多样,严重时出现意识障碍、癫痫发作甚至死亡。临床观察发现此类癫痫发作程度严重、持久、类型多样,而且对常用的抗癫痫药物几乎没有反应[1],即使联合用药效果也差。反复痫性发作可进一步加重缺氧性脑损伤,二者之间形成恶性循环,这样不仅增加患者病死率,而且增加致残率。其致痫机制并不清楚,相关的报道大多数是基于临床研究,而动物实验研究较少。因此,本实验检测了大鼠缺氧性脑损伤后亚临床痫性发作及其与海马苔藓纤维出芽(mossy fiber sprouting,MFS)的关系。

作者简介:陈 秀,女,四川省南充市人,博士研究生,主治医师,主要从事缺氧性脑损伤与癫痫方面的研究。电话:13883490579
通信作者:胡长林,电话:(023)63816676
收稿日期:2007-03-05;修回日期:2007-07-18

## 1 材料与方法

### 1.1 成年大鼠缺氧性脑损伤模型的建立

成年雄性SD大鼠180只,体质量150~200 g,(第三军医大学实验动物中心提供)。参考文献[2]进行适当改进,大鼠置于自制密闭玻璃缺氧箱中,持续充以8%氧氮混合气体,流量为0.5 L/min,通气10 min后开始计时,直至大鼠出现四肢失去张力,呼吸暂停,将大鼠取出置于空气中,记录其缺氧维持时间,1次/d,连续进行7 d,箱内$CO_2$和水蒸气分别用钠石灰和$CaCl_2$吸收。用氧浓度仪监测,维持缺氧箱内的氧浓度为(8±0.5)%。采用脑电图、Nissle染色评价动物模型。

### 1.2 大鼠脑电活动记录及动物分组

脑电图(EEG)描记:记录电极对称植于大鼠头顶部,参考电极植于鼻尖,地线接于正中央。用北科DYD-2000数字视频脑电图仪描记大鼠缺氧前20 min、末次缺氧后2 h内脑电活动,纸速3 cm/s,每只大鼠的记录时间不少于1 800 s。亚临床痫性发作以电生理记录到痫样放电为标准[3,4],即出现棘波、尖波或高波幅慢波放电。大鼠分为缺氧组和对照组,缺氧组71只大鼠制模后,根据脑电记录有痫样放电的大鼠纳入亚临床痫性发作组($n=14$),没有痫性放电的大鼠编号后随机抽取纳入非亚临床痫性发作组($n=14$)。对照组9只雄性SD大鼠,将其置于同一容器,持续充以空气,其余条件相同。

### 1.3 标本采集及处理

对照组、亚临床痫性发作组和非亚临床痫性发作组大鼠在缺氧处理完后第7、14、28天,用0.4%硫化钠和4%多聚甲醛经心脏灌注固定,取脑置于25%蔗糖脱水,然后行冠状位冰冻切片。

### 1.4 Nissle染色

将冰冻切片放入0.1%甲苯胺蓝内,60 ℃×3 min;乙酸乙醇分化15~20 s,镜下控制反应;梯度乙醇脱水,二甲苯透明、DPX封片,显微镜下观察。

### 1.5 Timm染色

暗室中将晾干切片浸入新鲜配制的Timm孵育液(50%阿拉伯胶120 ml,柠檬酸缓冲液20 ml,氢醌60 ml,17%硝酸银1.5 ml),孵育60 min,自来水冲洗10 min,梯度酒精脱水透明封片。

### 1.6 Timm染色海马苔藓纤维出芽半定量评分

光镜下海马齿状回(dentate gyrus;DG)内分子层苔藓纤维出芽半定量评分标准[5]:0分:内分子层内未见Timm颗粒;1分:偶见不连续分布的颗粒;2分:较多颗粒不连续分布;3分:颗粒近连续分布;4分:颗粒连续分布;5分:颗粒形成致密的层状带。海马CA3区苔藓纤维出芽半定量评分标准[6]:0分:CA3亚区锥体层或始层无Timm颗粒;1分:偶见稀疏分散的颗粒;2分:有少量至中等程度的颗粒;3分:有突出颗粒;4分:有突出颗粒,且几乎沿CA3区呈连续分布;5分:沿整个CA3区有连续或近乎连续的稠密的呈层带状的颗粒。每只大鼠观察6张连续脑片的海马齿状回和CA3区,进行评分,取其平均分值。

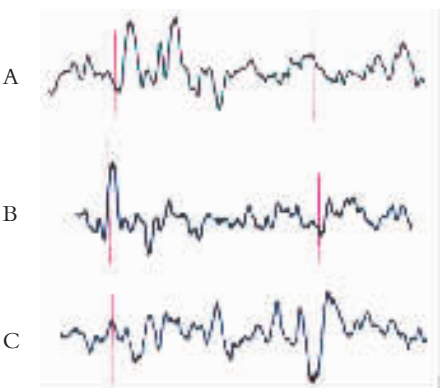
### 1.7 统计学方法

Timm染色结果取海马苔藓纤维出芽半定量评分的平均分值,各组数据采用非参数Kruskal-Wallis秩和检验,组间两两比较用Nemenyi法检验。所有数据使用SPSS 10.0统计软件进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 大鼠缺氧情况观察和脑电活动监测

大鼠缺氧维持时间在36~83 min。缺氧前大鼠EEG以θ波为主,较多β波重叠在θ波中,有少量α波和δ波,缺氧后大鼠EEG以θ,δ波为主,波幅减低,出现大慢波,在此背景上部分大鼠反复出现阵发性尖波、尖慢波、棘波发放(图1)。在末次缺氧后2 h内,有19.76%(14/71)大鼠出现痫性放电,即亚临床痫性发作。对照组($n=9$)无痫性放电。




A:尖波;B:尖慢波;C:棘波

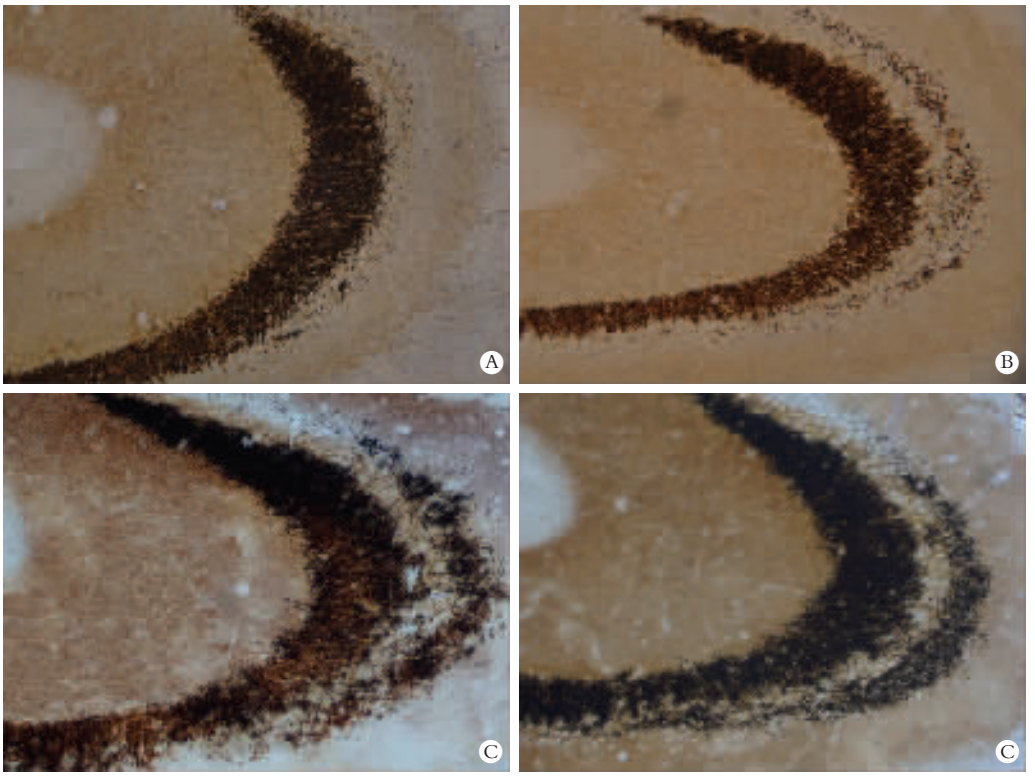
**图1 大鼠缺氧后EEG结果**

### 2.2 Nissle染色结果

对照组大鼠皮层神经元排列规则,极性好,细胞核大而圆,核仁明显,细胞质染色均匀;海马区神经细胞排列紧密、规则,细胞体突起明显,核大而圆。缺氧组第7 d大鼠脑片显示:大鼠皮层、海马CA1、CA3及齿状回等区域变性、坏死的神经元细胞质浓缩、深染,核碎裂,排列紊乱、稀疏,间隙增宽,细胞体突起明显减少,核仁模糊。

### 2.3 Timm染色结果

对照组大鼠海马结构内银颗粒沉积将苔藓纤维染成棕黑色,主要集中在CA3区的透明层内和齿状回颗粒细胞层下的门区内,CA3区锥体细胞层和齿状回内分子层未见染色颗粒(图2A)。亚临床痫性发作组缺氧处理后7 d CA3区下锥体细胞层(即始层)棕黑色颗粒逐渐增多;14 d呈束状、斑片状颗粒沉积;28 d呈现明显颗粒沉积条带(图2B~D),而7、14、28 d齿状回内分子层仅见少量棕色颗粒。非亚临床痫性发作组7、14、28 d在CA3区锥体细胞层可见较多的稀疏染色颗粒,齿状回IML几乎未见染色颗粒。经Kruskal-Wallis检验,3组大鼠海马CA3区苔藓纤维发芽评分结果有显著差异($P<0.01$,表1),而齿状回苔藓纤维发芽评分无统计学意($P>0.05$,表1)。组间两两比较用Nemenyi法检验,结果表明亚临床痫性发作组海马CA3区苔藓纤维发芽评分明显高于非亚临床痫性发作组和对照组($P<0.05$);非亚临床痫性发作组又高于对照组($P<0.05$)。




A：对照组；B：亚临床痫性发作组 7 d；C：亚临床痫性发作组 14 d；D：亚临床痫性发作组 28 d

**图 2　对照组和亚临床痫性发作组海马 CA3 区病理变化**　（Timm × 200）

**表 1　各组海马 CA3 和 DG 区苔藓纤维出芽评分比较**

| 组别 | $n$ | CA3 | | DG | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 秩和(Ri) | 平均秩和($\overline{Ri}$) | 秩和(Ri) | 平均秩和($\overline{Ri}$) |
| 对照组 | 9 | 86.5 | 9.611[ab] | 79.5 | 8.833 |
| 非亚临床痫性发作组 | 14 | 243.5 | 17.393[a] | 141.5 | 10.172 |
| 亚临床痫性发作组 | 14 | 313 | 23.072 | 166 | 11.857 |
| $H$ | | 9.532 | | 5.437 | |
| $P$ | | <0.01 | | >0.05 | |

a：$P<0.05$，与亚临床痫性发作组比较；b：$P<0.05$，与非亚临床痫性发作组比较

## 3　讨论

大鼠反复间断缺氧后，脑电图出现弥漫性慢波增多，Nissle 染色显示大鼠弥漫性缺氧性脑损伤形成，病变累及海马、皮层、皮层下结构等区域，使这些部位的神经元排列紊乱、稀疏，肿胀、变性、坏死，证明此方法处理的大鼠存在缺氧性脑损伤。在缺氧性脑损害后发现部分大鼠脑电图呈现弥漫性慢波背景基础上出现棘波、尖波、尖慢波等痫性放电。痫性发作以电生理记录痫样放电为标准，即亚临床痫性发作或临床前发作，出现现棘波、尖波或高波幅慢波放电。根据大鼠缺氧后脑电图呈现的异常波形，因此可称为缺氧性脑损伤后亚临床痫性发作或临床前发作。目前国内外类似的研究少，本研究亚临床发作率为 19.67%。临床上，各种原因所致的缺氧性脑损害并不少见，其后并发癫痫发作常属难治性癫痫的范畴。但动物实验中很难观察到通过缺氧诱发典型的痫性发作，但脑电图可记录到痫性放电，因此，对缺氧性脑损伤后早期亚临床痫性发作的研究有助于探讨此类癫痫发病机制。

在正常情况下，海马齿状回颗粒细胞的轴突，即苔藓纤维，穿过多形细胞层，投射至海马门的中间神经元和 CA3 区锥体细胞的顶树突近段。苔藓纤维发芽系一种神经再生现象，即海马齿状回颗粒细胞的轴突（苔藓纤维）在齿状回内分子层、CA3 区锥体细胞层或下锥体细胞层（即始层）的异常生长，形成苔藓纤维突触重组。有关引起苔藓纤维出芽的机制目前不十分清楚，涉及神经营养因子、钙通道蛋白、谷氨酸受体以及细胞黏附分子等因素，也有学者认为是各种神经损伤激活 MAPK 信号转导通路，触发靶蛋白基因表达，新蛋白合成优先促使这些蛋白的运输，以营养和指导轴突生长，促使神经元轴突发芽，导致神经网络突触重组，从而对细胞的结构和功能产生长时程影响，最终形成苔藓纤维发芽。

海马内苔藓纤维出芽所导致的突触重组是癫痫病理生理过程中一个非常重要的变化，本实验结果显示缺氧性脑损害后亚临床痫性发作大鼠海马 CA3 区苔藓纤维发芽明显，并且随时间增加不断加重，经缺氧处理过的非亚临床痫性发作大鼠海马苔藓纤维也有一定程度出芽，提示缺氧性脑损伤后，无论有无亚临床痫性

发作大鼠均形成了苔藓纤维发芽,但亚临床痫性发作大鼠苔藓纤维发芽更明显。目前认为海马神经元特别是门区及CA3区细胞死亡是诱发苔藓纤维发芽的关键因素,但也有认为是癫痫反复发作的结果[7]。还有认为二者互为因果,癫痫反复发作诱发了苔藓纤维发芽,而苔藓纤维发芽形成的局部兴奋性环路又导致癫痫的反复发作。本研究中苔藓纤维发芽形成除与痫性发作有关外,可能与缺氧损伤也密切相关,缺氧致海马门区和CA3区神经细胞大量死亡,从而诱发苔藓纤维发芽。苔藓纤维发芽形成提示颗粒细胞兴奋性增高;同时它与CA3区锥体细胞建立了突触联系或突触重建,形成了兴奋性突触环路,使痫性发作的易感性增加[8]。此外,苔藓纤维末梢上有大量的高亲合性的海人酸受体及富含谷氨酸,可以引起兴奋性突触后电位,并且由于突触重组打破了齿状回内分子层兴奋-抑制平衡,引起癫痫发作。尽管苔藓纤维发芽也可形成抑制性突触,但兴奋性突触的形成占优势,同时齿状回对兴奋的滤过作用降低,冲动便在再生神经回路中迅速传播,最终导致癫痫反复发作。因此,可以认为缺氧性脑损伤后亚临床痫性发作时海马CA3区苔藓纤维发芽可能是造成缺氧性脑损伤后痫性发作难治的重要机制之一。本实验中齿状回内分子层苔藓纤维发芽评分无差异,可能与观察时间窗有关。

## 参考文献:


[1] Victor M, Ropper A H. Adams and Victor's Principles of Neurology[M]. 8th ed. New York: McGraw-Hill Companies, 2005: 1184-1185.

[2] Yang S N, Huang C B, Yang C H, *et al*. Impaired SynGAP expression and long-term spatial learning and memory in hippocampal CA1 area from rats previously exposed to perinatal hypoxia-induced insults: beneficial effects of A68930[J]. Neurosci Lett, 2004, 371(1): 73-78.

[3] Hartings J A, Williams A J, Tortella F C. Occurrence of nonconvulsive seizures, periodic epileptiform discharges, and intermittent rhythmic delta activity in rat focal ischemia[J]. Exp Neurol, 2003, 179(2): 139-149.

[4] Niederhauser J J, Esteller R, Echauz J, *et al*. Detection of seizure precursors from depth-EEG using a sign periodogram transform[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2003, 50(4): 449-458.

[5] Holmes G L, Gairsa J L, Chevassus-Au-Louis N, *et al*. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects[J]. Ann Neurol, 1998, 44(6): 845-857.

[6] Liu Z, Yang Y, Silveira D C, *et al*. Consequences of recurrent seizures during early brain development[J]. Neuroscience, 1999, 92(4): 1443-1454.

[7] 李国良,肖 波,谢光洁. 海马苔藓纤维出芽与颞叶癫痫[J]. 国外医学 神经病学神经外科学分册, 2002, 29(6): 515-518.

[8] Babb T L, Ying Z, Mikuni N, *et al*. Brain plasticity and cellular mechanisms of epileptogenesis in human and experimental cortical dysplasia[J]. Epilepsia, 2000, 41(Suppl 6): S76-S81.


(编辑 吴培红)

# 个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)01-0052-01

## 荨麻疹患者血清特异性IgE检测结果分析

黄 海,王儒鹏,何云志 (第三军医大学新桥医院皮肤科,重庆 400037)

为了解重庆地区荨麻疹患者过敏原情况,对近期送检至我科320例荨麻疹患者血清11类常见过敏原IgE抗体水平的检测分析,结果报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

320例荨麻疹患者全部来自同一时期我院皮肤科门诊患者,其中男性126例(39.4%),女性194例(60.6%);年龄15~78岁,平均34.2岁;其中急性荨麻疹109例(34.1%),慢性荨麻疹211例(65.9%),急慢性荨麻疹诊断符合《杨国亮皮肤病学》诊断标准[1]。

### 1.2 试验方法

取静脉血,分离血清,采用海奥生物公司IVT过敏原检测试剂盒IVT-701、IVT-702,按试剂盒说明书进行操作。选用测试的过敏原种类分为吸入组和食入组。

### 1.3 统计学方法

采用$\chi^2$检验。

## 2 结果

### 2.1 总IgE阳性率及特异性IgE检测结果

分为急性荨麻疹及慢性荨麻疹2组,各组总IgE阳性率及特异性IgE阳性率阳性率结果见表1,根据检测结果,可以得出以下结论:①两组总IgE阳性率高,只有在慢性荨麻疹组中个别病例未见总IgE升高。②特异性IgE检出阳性率在慢性荨麻疹组中较低。③两组的特异性IgE阳性结果存在明显不同,急性荨麻疹组以食入性特异IgE为主,而慢性荨麻疹以吸入性特异IgE为主。

(下转59页)

作者简介:黄 海,男,湖南省长沙市人,技师,主要从事皮肤疾病临床检验方面的研究。电话:(023)68774252

收稿日期:2007-07-10;修回日期:2007-11-15