文章编号:1000-5404(2010)13-1375-04

论著

# 幼鼠癫痫持续状态成年后脑内髓鞘变化的研究

刘淑丹[1],张桂祯[2],王晗知[1],何扬涛[1],肖 岚[1],李红丽[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室[1];610083 成都,成都军区总医院信息科[2])

**[摘要]** **目的** 探讨致癫痫持续状态幼鼠(status epilepticus, SE)成年后发展为自发反复性癫痫发作(spontaneous recurrent epileptic seizure, SRS)的大鼠脑内髓鞘的变化。**方法** 采用氯化锂-匹罗卡品腹腔注射出生后20~28 d体质量(70±5)g雄性SD幼鼠SE模型,应用多道生理信号采集处理系统检测大鼠脑电图(electroencephalogram,EEG)异常活动波,采用Nissl染色方法观察脑内神经元的变化,证实SRS模型大鼠诱导成功;应用卢卡斯快蓝(luxol fast blue,LFB)染色及髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)免疫组织化学染色等技术观察脑内髓鞘的变化。**结果** SRS模型组脑电图与正常对照组相比,可见频发尖波、棘-慢、尖-慢综合波;Nissl染色显示神经元数目在海马CA1(242.1±33.6)、CA3(354.8±26.8)和齿状回门区(61.8±8.3)减少($P<0.01$),部分细胞变性和坏死。LFB染色可见SRS模型组在胼胝体(callosum corpus,cc;0.162±0.017)、扣带回(cingulated gyrus,cg;0.139±0.013)与海马白质(0.080±0.007)区域内的着色范围明显缩小,着色浅淡,与正常对照组相比有显著差异($P<0.01$);MBP免疫阳性沉淀在cc(0.183±0.013)、cg(0.192±0.016)、第一躯体感觉皮质区(S1BF;0.076±0.012)和第一听皮质区(Au1;0.085±0.014)内的平均光密度值(OD)显著低于正常对照组($P<0.01$)。**结论** 致痫幼鼠成年后伴有慢性癫痫发作可造成中枢神经系统髓鞘脱失。

**[关键词]** 氯化锂-匹罗卡品;慢性癫痫;脑电图;脱髓鞘;髓鞘碱性蛋白
**[中图法分类号]** R749.17; R322.81; R361.2 **[文献标志码]** A

# Change of myelin sheath in adult rats with persistent epilepsy at their young age

Liu Shudan[1], Zhang Guizhen[2], Wang Hanzhi[1], He Yangtao[1], Xiao Lan[1], Li Hongli[1] ([1]Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Informatics, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the change of myelin sheath in adult rats having persistent epilepsy at their young age and then progressing to spontaneous recurrent epileptic seizure (SRS) in adult age. **Methods** A persistent epilepsy model of infantile rat was induced by intra-peritoneal injection with lithium chloride pilocarpine. Abnormal waves of epilepsy on electroencephalogram (EEG) were displayed with a multi-channel physiological signal collection system. Change of neurons in the hippocampus was observed with Nissl staining. Change of myelin sheath was observed with luxol fast blue (LFB) staining. Expression of myelin basic protein (MBP) was detected with immunohistochemical staining. **Results** More sharp, spike and ware, sharp and ware waves of epilepsy were observed on EEG of SRS model group than on EEG of normal group. The number of neurons stained with Nissl dye in the hippocampal CA1, CA3 and cingulated gyrus was decreased, with some cells degenerated and necrotized. The LFB stained area of corpus callosum and cingulum was significantly smaller in model group than in control group ($P<0.05$). The average optical density of immune positive MBP deposit in primary somatosensory cortex barrel field (S1BF) and primary auditory cortex (Au1) field was significantly lower in model group than in control group ($P<0.05$). **Conclusion** Chronic epilepsy attack in adult rats with persistent epilepsy at their young age may lead to demyelination in the central nervous system in adult age.

**[Key words]** lithium chloride-pilocarpine; chronic epilepsy; electroencephalogram; myelin basic protein; demyelination

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30672447). Corresponding author: Li Hongli, Tel: 86-23-68752231, E-mail: lihlimm@163.com

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30672447)
**[通信作者]** 李红丽,电话:(023)68752231,E-mail:lihlimm@163.com

癫痫是一种脑部神经元异常放电导致中枢神经系统(central nervous system,CNS)功能突然反复和短暂失常为特征的临床综合征,其发病机制十分复杂,至今尚未清楚。近年对于星形胶质细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞参与并调控神经元的功能及功能异常的研究受到密切关注[1,2]。

脊椎动物CNS中的髓鞘是由少突胶质细胞质向其附近神经轴突延伸并包绕形成的多片层结构,神经纤维要经过髓鞘化才能发挥正常的传导功能[3]。CNS髓鞘与癫痫之间关系逐渐成为研究焦点,对常染色体突变导致先天性脑髓鞘发育缺陷的小鼠研究发现,在生后第2周出现震颤,并随年龄增长而加重,随后出现经常性惊厥,该缺陷小鼠在6个月内死亡。提示髓鞘的发育异常与脱失可造成癫痫等病症的发生,CNS内髓鞘异常可能是癫痫的致病因素之一[4]。但近年较多研究也证实髓鞘病变也是由癫痫导致的结果,但由癫痫引起的脑内脱髓鞘区域的变化如何,目前仍然存在争议。本实验通过建立幼年致痫引发成年后慢性癫痫发作的模型,观察CNS髓鞘变化,为深入研究癫痫与髓鞘之间关系提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 癫痫模型制备

1.1.1 实验动物 清洁级健康雄性出生20~28 d[5] SD大鼠25只,体质量(70±5)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。将实验动物分为两大组,生理盐水对照组5只和模型组20只。

1.1.2 模型制备方法动物致痫步骤 ①腹腔注射浓度为127 mg/kg氯化锂(Sigma, L9650);②17 h后腹腔注入1 mg/kg硫酸阿托品;③30 min后腹腔注射新鲜配制的30 mg/kg匹罗卡品(Sigma P6503)。④癫痫发作60 min后腹腔注射3.5% 水合氯醛(Fluka 23100 ) 3.5 mg/kg终止发作,30 min后仍没有终止发作,可原剂量重复注射1次;⑤对照组除以生理盐水代替匹罗卡品外,其他处理措施同模型组[6]。观察实验鼠致痫情况,采用实验动物癫痫发作Racie分级[7]评判。0级:无抽搐发作;1级:面部肌肉痉挛表现为咀嚼运动;2级:颈部肌肉痉挛表现为点头运动;3级:一侧前肢阵挛;4级:站立伴双前肢阵挛;5级:在4级基础上身体向后倒下。

### 1.2 脑电图(electroencephalogram,EEG)检测

幼鼠癫痫发作组和对照组的大鼠存活90 d后,麻醉动物将其头部固定于脑立体定位仪(SR-6N Japan,NSI LAB)上,消毒后暴露颅骨,钻开两个对称直径1.0 mm孔。分别用2颗已消毒的不锈钢螺丝钉反旋入2个小孔内,固定。1~2 d后应用多道生理信号采集处理系统(RM 240BD 成都仪器厂)将正负电极分别夹于两螺丝钉上,参考电极夹于头皮皮肤上或耳上,进行EEG记录并分析。

### 1.3 组织切片制作与染色

1.3.1 取材 选取EEG异常并存活30 d后模型组大鼠($n=8$)及对照组大鼠($n=5$),麻醉后4%多聚甲醛灌注固定取脑,后固定24 h,再经20%~30%蔗糖梯度脱水,做冠状连续冰冻切片,切片厚度20 μm。

1.3.2 Nissl染色 选取冰冻贴片60 ℃烤箱放置2 h后回温,氯仿/无水乙醇1∶1室温浸泡过夜,回浸95%乙醇,甲苯胺蓝染色3~5 min,蒸馏水浸泡,95%乙醇浸泡5~30 min,100%乙醇脱水,二甲苯透明,封片。

1.3.3 卢卡斯快蓝(luxol fast blue ,LFB)染色 切片经氯仿/无水乙醇1∶1室温浸泡过夜,回浸95%乙醇,LFB染色,56 ℃放置6~8 h,降温确保下步分色,95%乙醇浸泡,蒸馏水浸泡,0.05%碳酸锂分色1 min并保持分色一致,蒸馏水浸泡,95%乙醇浸泡5~30 min,100%乙醇脱水,二甲苯透明,封片。

1.3.4 髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)免疫组织化学染色 切片经0.01 mol/L PBS充分洗涤后置于3% $H_2O_2$ 5~10 min阻断内源性过氧化酶,滴加抗体MBP(1∶200, Santa Cruz),4 ℃过夜,PBS漂洗,2 min 3次。滴加HRP标记二抗(抗山羊IgG 1∶200,Dako),室温孵育20~30 min,PBS漂洗,2 min 3次。DAB显色,梯度脱水,封片。

### 1.4 图像分析和统计学处理

采用Image-Pro plus 5.0图像分析系统对切片进行图像分析。对照大鼠脑立体定位图谱,取前囟后2.8~3.8 mm的切片3张,每张切片按照海马、大脑皮质分区随机选取5个100倍视野,细胞计数分析和测量平均光密度值。实验数据采用SPSS 13.0软件进行统计学处理,检测结果用$\bar{x}\pm s$表示,多样本均数比较采用方差分析。

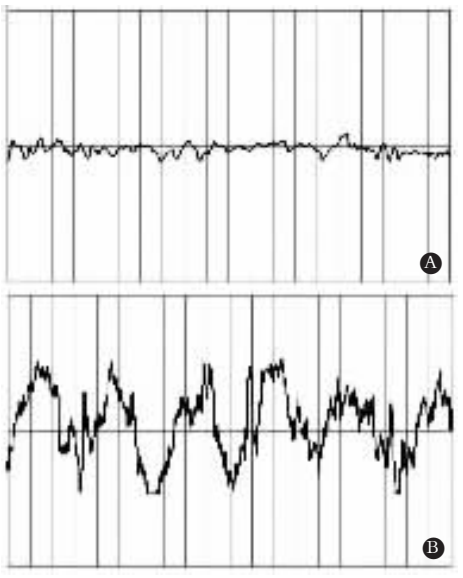
## 2 结果

### 2.1 幼鼠致SE发作后可引发成年SRS发作

2.1.1 幼鼠SE发作状态 氯化锂-匹罗卡品腹腔注射可诱导幼鼠出现SE发作状态模型组幼鼠($n=20$)腹腔注射匹罗卡品后15~30 min可出现洗脸样动作、节律性咀嚼、点头等面部痉挛样动作;随后出现前肢阵挛,之后很快表现为前肢阵挛伴站立,进一步发展到全身强直阵挛发作伴站立、摔倒,反复发作,均达到4~5级发作,达到SE状态。腹腔注射生理盐水对照组幼鼠均未出现癫痫发作或死亡。

2.1.2 成年SRS发作EEG检测 对照组大鼠($n=5$)脑电图基本节律以α、β波为主,散在θ波(图1A)。SE发作后幼鼠存活90 d后($n=8$)进行EEG检测。可见频发尖波、棘-慢、尖-慢综合波(图1B)。

2.1.3 Nissl染色结果 SRS模型组大鼠脑内神经元有不同程度丢失,海马区最为显著。对照组大鼠脑内海马CA3区、CA1区及齿状回颗粒细胞层分别见大量致密的锥体细胞及颗粒细胞,门区有中等量神经元,排列整齐,形态完整,细胞质内尼氏小体丰富,神经元呈蓝色。SRS模型组大鼠脑内海马CA3区、CA1区及齿状回颗粒细胞层内神经元排列松散、细胞轮廓模糊,着色不清晰,突起不明显。上述区域内大神经元数目明显减少,与正常组相比有显著差异($P<0.01$),见表1。




A:对照组;B:SRS 模型组

扫描参数:扫描速度:200 ms/div;灵敏度:500 μV;时间常数(低通):0.2 s(图中每格大小);高通:30 Hz;采样频率:1 kHz

**图 1　SRS 模型组大鼠存活 90 d 时与对照组大鼠脑电检测波形图**

**表 1　对照组与 SRS 模型组 Nissl 染色后海马区神经元数目比较**(个,$\bar{x}\pm s$)

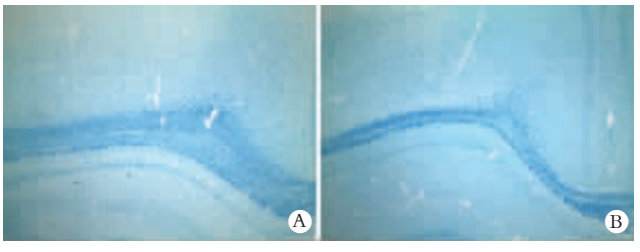
| 组别 | $n$ | CA1 区 | CA3 区 | 齿状回 |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 5 | 563.2±25.5 | 546.2±33.3 | 107.8±13.7 |
| SRS 模型组 | 8 | 242.1±33.6[a] | 354.8±26.8[a] | 61.8±8.3[a] |

a:$P<0.01$, 与对照组比较

## 2.2　SRS 模型组大鼠 120 d 后脑内显示明显髓鞘脱失改变

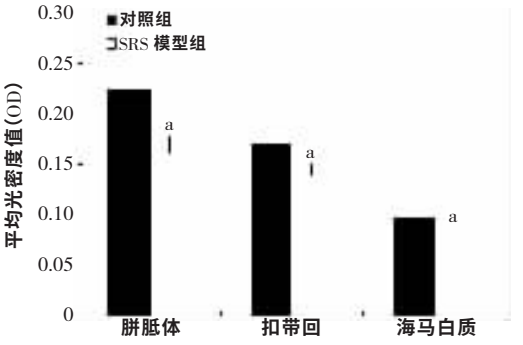
2.2.1　LFB 染色结果　　对照组大鼠脑内 LFB 阳性染色清晰的分布于胼胝体、扣带回和海马白质等白质区域染色深(图 2A)。模型组大鼠上述区域内 LFB 着色均较浅,着色范围减小(图 2B)阳性区域内平均光密度比值(OD)见图 3。与正常对照组相比相差显著($P<0.01$)。

2.2.2　MBP 免疫组化染色结果　　对照组大鼠脑内 MBP 免疫组化阳性区域与 LFB 染色区域大致相同,可见胼胝体、扣带回等白质区域、灰质区域内阳性染色边界清晰明显,即使在第一躯体感觉皮质 S1BF、第一听皮质 Au1 等皮质区髓鞘含量较少区域也可见其阳性表达(图 4A,B)。SRS 模型组大鼠脑内 MBP 免疫组化染色在胼胝体、扣带回等白质区域和第一躯体感觉皮质 S1BF、第一听皮质 Au1 等灰质区域内阳性着色变浅,区域明显减小(图 4C,D)。上述区域内平均光密度值(OD)与正常对照组相比相差显著($P<0.01$),见图 5。



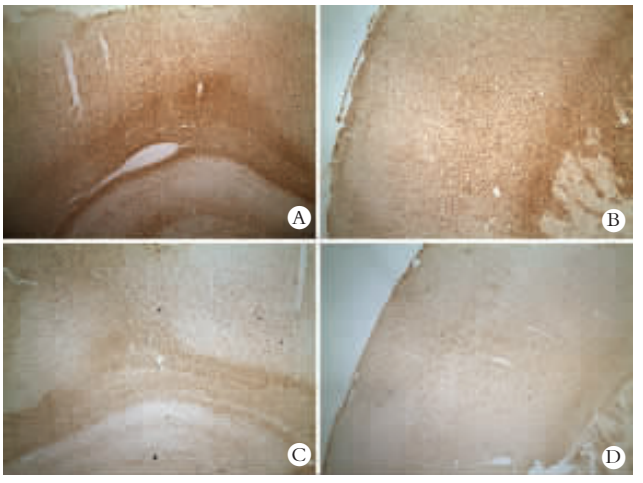

A:对照组;B:SRS 模型组

**图 2　两组大鼠扣带回区染色比较**　(LFB ×100)



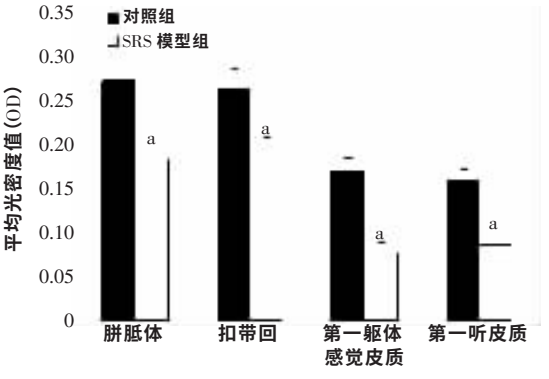

a:$P<0.01$, 与对照组比较

**图 3　对照组与 SRS 模型组 LFB 染色平均光密度值比较**($n=8$, $\bar{x}\pm s$)




A:对照组扣带回区;B:对照组第一听皮质区; C:SRS 模型组扣带回区;D:SRS 模型组第一听皮质区

**图 4　对照组与 SRS 模型组免疫组化染色髓鞘在扣带回区与第一听皮质区阳性染色比较**　(MBP ×100)




a:$P<0.01$, 与对照组比较

**图 5　对照组与 SRS 模型组 MBP 免疫组化染色光密度值(OD)比较**($n=7$, $\bar{x}\pm s$)

## 3　讨论

氯化锂-匹罗卡品(LI-PILO)诱导的幼鼠癫痫发作类似颞叶癫痫，可用于人类颞叶癫痫发病机制的研究,在行为学方面类似中央颞叶硬化的自发性复杂部分发作或继发全面性发作,反复抽搐,而且脑电图、病理学特征及病理生理方面类似颞叶癫痫,是理想的颞

叶癫痫模型[8]。幼年大鼠LI-PILO癫痫模型呈现急性期(亦称癫痫持续状态期)、静默期、慢性期[9]。急性期是指注射PILO成功点燃后至注射解痉剂停止发作之间的时间;静默期为存活鼠进入2~4 d的毒性阶段,表现为蜷伏不动,不思饮食,极易激惹,此后行为渐趋正常;慢性期是经过静默期后,可观察到Ⅰ~Ⅲ级的自发反复发作(spontaneous recurrent seizures, SRS)。本实验成功点燃癫痫后90 d后进行鼠脑电检测,显示频发尖波、棘-慢、尖-慢综合波。此类波形与癫痫患者或后天获得性致痫的啮齿类动物的脑电图特征相似,符合目前诊断慢性癫痫疾病的重要诊断依据[10]。提示LI-PILO点燃后90 d的动物已进入慢性期,具备SRS的特征。

啮齿动物如同人类一样,不同年龄阶段的神经系统发育情况不同。髓鞘形成是脑发育成熟的重要标志之一。啮齿类动物生后第9天髓鞘开始形成,第20天达高峰,持续至大约生后40 d。提示脑内髓鞘形成最佳时期集中于出生后较早阶段。同时,CNS正常的传导功能的建立有待于神经纤维髓鞘化后才能发挥,幼年期髓鞘发育与成熟是确保脑功能正常的至关重要时期。因此,在研究动物癫痫或惊厥发作模型时必须考虑年龄或日龄因素。啮齿动物日龄与人类年龄阶段划分虽无严格的对应关系,但有研究表明大鼠0~2个月为幼年期,2~20个月为成年期,20个月以后为老年期[11,12]。本研究采用3~4周龄大鼠,相当于在幼年期诱发癫痫,待其成长至90 d后处于成年期,脑电检测显示频发痫样电波,同时Nissl染色也观察到伴有神经元数目减少、变性坏死等改变,表明SRS模型建立成功,且幼儿期至成年整个脑发育时期均伴随癫痫自发反复性发作。

既往对颞叶癫痫患者脑皮质活检组织进行电镜观察发现,髓鞘厚薄不均,呈局灶性松解、脱失,髓鞘表面周期性纹理消失,甚至出现缺损、缺口或髓鞘的分离。提示癫痫发作可造成了CNS髓鞘病变。本实验运用LFB染色法直观地显示SRS模型鼠脑内髓鞘的分布情况,结果也显示正常对照组LFB阳性染色清晰分布于胼胝体、扣带回、海马白质等白质区域,SRS组LFB阳性染色区域与对照组相似,但其着色明显变浅、阳性区域范围明显缩小,平均光密度值显著降低($P<0.01$)。表明了SRS模型鼠脑内胼胝体、扣带回、海马白质等白质区域内出现了髓鞘丢失。

然而相对髓鞘的总量来说,有髓神经纤维只占髓鞘的小部分,所以不能仅依赖于LFB染色结果判断髓鞘含量的变化。MBP作为组成髓鞘的主要蛋白之一,位于脂膜胞质表面的一种周围膜蛋白,形成髓鞘主致密线,其作用是使髓鞘致密,约占髓鞘蛋白总量的1/3[13]。本实验采用MBP免疫组化染色结果进一步证实了SRS模型组脑内确实存在脱髓鞘的形态学改变。既往对癫痫发作后的临床患者的脑脊液及血液中MBP含量的检测也提示,髓鞘的传导、绝缘功能在癫痫发作后遭到损伤性破坏时,髓鞘损伤后的MBP因血脑屏障破坏后可释放入血液和脑脊液中,造成脑脊液中MBP含量增高,或血清MBP亦可增高,而脑实质内MBP表达则降低[14,15]。

综上所述,癫痫和髓鞘脱失为双向关系,存在潜在的共同发病机制,在一个因素存在的情况下易促使另一个因素的发生。但目前对于癫痫伴发脱髓鞘类疾病与脱髓鞘类疾病患者发生癫痫的研究相对较少,具体机制如何有待进一步探讨。

## 参考文献:


[1] Schwarcz R. Early glial dysfunction in epilepsy[J]. Epilepsia, 2008, 49(Suppl 2): 1-2.

[2] Kettenmann H, Ransom B R. Neuroglia[M]. New York: Oxford University Press, 2005.

[3] Scherer S S, Arroyo E J. Myelin: molecular architecture of CNS and PNS myelin sheath[J]. Encycl Neurosci, 2009, 78(2): 1169-1180.

[4] Hoffmann K, Lindner M, Groticke I, *et al*. Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice[J]. Exp Neurol, 2008, 210(2): 308-321.

[5] Blair R E, Deshpande L S, Holbert W H 2nd, *et al*. Age-dependent mortality in the pilocarpine model of status epilepticus[J]. Neurosci Lett, 2009, 453(3): 233-237.

[6] 梁益, 孙红斌. 氯化锂-匹罗卡品癫痫模型研究[J]. 实用医院临床杂志, 2008, 5(3): 112-115.

[7] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. Ⅱ. Motor seizure[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 281-294.

[8] Krsek P, Mikulecka A, Druga R, *et al*. An animal model of nonconvulsive status epilepticus: a contribution to clinical controversies[J]. Epilepsia, 2001, 42(2): 171-180.

[9] Morimoto K, Fahnestock M, Racine R J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain[J]. Prog Neurobiol, 2004, 73(1): 1-60.

[10] Staley K, Hellier J L, Dudek F E. Do interictal spikes drive epileptogenesis? [J]. Neuroscientist, 2005, 11(4): 272-276.

[11] Sperber E F, Veliskova J, Germano I M, *et al*. Age-dependent vulnerability to seizures[J]. Adv Neurol, 1999, 79: 161-169.

[12] Moshe S L. Seizures in the developing brain[J]. Neurology, 1993, 43(11 Suppl 5): S3-S7.

[13] Saresella M, Marventano I, Guerini F R, *et al*, Myelin basic protein-specific T lymphocytes proliferation and programmed cell death in demyelinating diseases[J]. Clin Immunol, 2008, 129(3): 509-517.

[14] Guan W, Yang Y L, Xia W M, *et al*. Significance of serum neuron-specific enolase in patients with acute traumatic brain injury[J]. Chin J Traumatol, 2003, 6(4): 218-221.

[15] 张帆, 顾仁骏, 张萍. 癫痫患者血清、脑脊液髓鞘碱性蛋白的测定及意义[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(15): 3574-3575.


(**收稿**:2010-02-03;**修回**:2010-04-10)

(编辑 王 红)