文章编号:1000-5404(2012)04-0311-04

论著

X射线诱导建立皮质发育障碍大鼠模型的研究

冯占辉[1],马勋泰[2],于云莉[1],楚 兰[1],蔡登华[1],黄 华[3],晏 勇[3] (550004 贵阳,贵阳医学院附属医院神经内科[1];646000 四川 泸州,泸州医学院附属医院神经内科[2];400016 重庆,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[3])

[摘要] **目的** 探讨X射线建立皮质发育障碍(disorders of cortical developments,DCDs)模型的最佳放射剂量。**方法** 应用X射线不同放射剂量照射妊娠17 d的SD大鼠。分5组:A组(125 cGy照射组)、B组(150 cGy照射组)、C组(175 cGy照射组)、D组(200 cGy照射组)、E组(225 cGy照射组),同时设立对照组。观察指标:①统计各组仔鼠的存活率,观察仔鼠一般行为学特点。②第28天采用Morris水迷宫实验测试各组仔鼠学习和空间记忆能力。③第56天处死仔鼠观察大脑形态、常规病理检查。④第63天用红藻氨酸诱导各组仔鼠癫痫发作,比较其痫性发作阈值和死亡率。**结果** ①对照组与A、B、C组仔鼠的存活率较高。E组因仔鼠死亡率过高未进入进一步的观察。②第28天水迷宫实验结果显示,C组和D组仔鼠在逃避潜伏期及跨过原平台次数较对照组明显延长($P<0.05$)。③第56天C、D组仔鼠大脑皮质弥漫性皮质发育不良伴神经元异位结节发生率为100%。④第63天红藻氨酸诱发癫痫发作实验中,B、C组仔鼠痫性发作的潜伏期缩短,但癫痫持续状态时间与对照组比较差异无显著性($P>0.05$)。**结论** X射线是制作DCDs模型鼠的良好手段,175 cGy剂量组可以制作出理想的仔鼠DCDs模型。

[关键词] 皮质发育畸形;X线;迷宫学习;大鼠;疾病模型,动物
[中图法分类号] R-332;R742.02;R818.02 [文献标志码] A

A rat model of disorders of cortical developments induced by X-ray

Feng Zhanhui[1], Ma Xuntai[2], Yu Yunli[1], Chu Lan[1], Cai Denghua[1], Huang Hua[3], Yan Yong[3] ([1]Department of Neurology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province, 550004; [2]Department of Neurology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhaou, Sichuan Province, 646000; [3]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the optimal dose of X-ray exposure to establish rat model of disorders of cortical development (DCDs). **Methods** Pregnant Sprague-Dawley rats were exposed to X-ray at different radiation doses at embryonic day 17. The rats were divided into different groups according to the radiation doses, Group A 125 cGy, Group B 150 cGy, Group C 175 cGy, Group D 200 cGy, and Group E 225 cGy. The following indexes were observed in all groups. The survival rate of rat offspring in each group were calculated. Morris water maze test were adopted to test the learning and memory capacity of rat offsprings in each group on P28d. The changes of brain pathology in cerebral cortex and hippocampus was observed to confirm the types of DCDs on P56d. Kainic acid were used to induce seizure and their seizure threshold and mortality induced by seizure were studied on P63d. **Results** 1) The survival rate of rat offsprings among the control group and groups A, B, and C were comparatively high. 2) Morris water maze test showed that the escape latency and times of crossing platform of rat offsprings in the groups C and D were always longer than those of the control group($P<0.05$). The incidence rate of DCDs of offsprings in the groups C and D reached 100%. 4) The latent period of Kainic acid inducing seizure was shortened in the groups B and C ($P<0.05$), but the time of epileptic state and the mortality induced by seizure of rat offspring in the two groups were the same as that of control group($P>0.05$) in kainic acid inducing seizure on P63d. **Conclusion** X-ray exposure is a good way to establish DCDs model. The model induced by 175 cGy X-ray is of high survival rate, mental retardation, lower threshold of epileptic seizure and typically pathologic changes of DCDs.

[**Key words**] malformations of cortical development;X-ray;maze learning; rats;disease models, animal

Supported by the National Nature Science Foundation of China (30570636) and the Starting Funds for Doctorial Research From Affiliated Hospital of Guiyang Medical College (2010). Corresponding author: Yan Yong, E-mail:proyanyong@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30570636);贵阳医学院附属医院博士科研启动基金项目(2010)
[通信作者] 晏 勇,E-mail:proyanyong@126.com

皮质发育障碍(disorders of cortical developments, DCDs)临床表现常以痫性发作、精神发育迟滞和局灶神经功能障碍为主。该疾病的诊断主要来自影像学,而来自临床尸检和活检的大脑标本是极其有限的,因此建立DCDs的动物模型非常必要。模型的制作方法主要包括利用药物造模,如用卡莫司汀诱导建立大鼠DCDs[1];利用放射线造模,如应用X射线[2]和γ射线[3]。应用药物造模的最大困难是药物剂量的选择,以及孕鼠对药物的耐受程度不同,因此造成应用药物造的模型缺乏稳定性;应用γ射线虽然历史悠久,但γ射线透射能力弱和能量的易衰减性,操作人员计算放射剂量复杂,实际放射剂量不容易计算,因此国外学者也是逐渐在尝试X射线造模。X射线优势在于透射能力强,且较γ射线具更好的易操作性。因此,本实验拟在孕鼠神经元增殖和迁移时期(孕17 d)时,给予不同剂量X线照射,建立X射线诱导的DCDs动物模型,为研究皮质发育障碍的学者提供一个稳定的模型。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与设备

实验动物开胸、取脑手术器械1套(上海医疗器械有限公司),灌流固定泵(中国保定兰格恒流水泵有限公司),ELEKTA 8MV直线加速器(日本),大鼠Morris水迷宫(上海欣软信息科技有限公司),光学显微镜(Olympus公司,日本),红藻氨酸(Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组 18只健康孕17 d的SD大白鼠均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,实验过程严格遵守实验动物管理条例保护的有关规定。对18只孕鼠采用随机数字表法,分为对照组和5个实验组,每组3只,5个实验组分别为A组(125 cGy照射组)、B组(150 cGy照射组)、C组(175 cGy照射组)、D组(200cGy照射组)、E组(225 cGy照射组)。

1.2.2 建模 按照文献[2]介绍的方法,把15只健康妊娠17 d的SD大鼠依次放入一长20.0 cm、宽12.5 cm、高11.0 cm的特制放疗盒中。照射时把该盒平放放疗台上,应用ELEKTA 8MV直线加速器(大坪医院放疗科)照射,按实验分组采用相应剂量,剂量率为200 MU/min。A组照射用时54 s,B组照射用时56 s,C组照射用时60 s,D组照射用时62 s,E组照射用时65 s。照射后将孕鼠放回笼中,正常喂养待其分娩。在仔鼠生后21 d断奶、分笼用于实验。从仔鼠存活率的比较中,E组存活率明显低于其他组别,故该组别直接被排除,不再进行后续实验。对照组仔鼠死亡率3.2%,A组死亡率0%,B组和C组死亡率6.5%,D组死亡率50%,E组死亡率80%。最佳剂量模型鼠的选择标准:生存率高,精神发育迟滞明显,痫性发作阈值降低,病理类型为弥漫性DCDs伴神经元异位结节。

1.2.3 子代大鼠生长发育和一般行为学观察 实验期间尽量保证环境安静,按照大鼠本身的生活节律,如自由摄食饮水和昼夜交替节律。每天8:00~18:00观察仔鼠意识状态(清醒、嗜睡);生活能力(摄食和饮水能力);行为表现(有无肢体活动障碍,攻击行为和自发性癫痫发作等)。通过上述方面确定仔鼠有无行为异常及自发癫痫发作等。

1.2.4 Morris水迷宫行为的测定 仔鼠出生后第28天从各组仔鼠选取10只进行Morris水迷宫行为测定。Morris水迷宫实验装置参照文献[4]制作。①定位航行实验(place navigation test, PNT):用于测量仔鼠对水迷宫学习和记忆能力。②空间搜索实验(spatial probe test, SPT):用于测量大鼠学会寻找平台后对平台空间位置记忆的保持能力,即在第5天撤除水下平台,然后任选同一个入水点将大鼠面向池壁放入水中,测其在120 s内跨过原平台所在位置的次数。

1.2.5 病理标本制备及组织化学染色过程 仔鼠出生后第56天选择实验组和对照组仔鼠各6只,于第56天灌流固定,取脑标本观察仔鼠大脑形态。应用仔鼠大脑组织行HE染色及病理观察。

1.2.6 红藻氨酸诱发实验 仔鼠出生后第63天在对照组和实验组大鼠中各选择6只,按Gupta等[5]方法在仔鼠腹腔注射红藻氨酸15 mg/kg,观察癫痫发作情况,发作程度按Racine法分级。记录注射红藻氨酸至癫痫开始发作的时间作为潜伏期,以及癫痫发作持续的时间(癫痫再次发作不计入其中),并记录仔鼠癫痫发作级别,最后计算各组癫痫发作导致仔鼠的死亡率。

1.3 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件,以$\bar{x} \pm s$表示,各组均数间计量资料的比较用单因素方差分析,两组间的比较采用LSD法。

2 结果

2.1 子代鼠生长发育情况

A、B组仔鼠出生时及出生后体质量与对照组比较无明显差异。C组仔鼠出生时和出生后14 d体质量较对照组仔鼠下降,随着鼠龄的增长,在第28天和第56天时两组间体质量未见差异($P>0.05$)。D组仔鼠出生后不同时间点体质量较对比对照组下降,体形瘦小、生长发育缓慢,并随鼠龄的增长两组间差别越显著。E组出生后体质量较对照组比较明显降低,并且随着鼠龄的增长全部死亡。见表1。

表1 各组仔鼠各时间点体质量比较(g, $n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	14 d	28 d	56 d
对照组	6.45±0.32	29.38±1.24	43.10±1.79	128.24±3.67
A组	6.37±0.21	29.31±1.12	42.34±1.67	127.80±4.68
B组	6.31±0.25	29.06±1.18	42.41±1.76	127.99±3.95
C组	6.12±0.12[a]	26.52±1.41[a]	41.37±1.71	127.02±2.85
D组	6.01±0.16[a]	25.25±1.46[a]	39.26±1.29[a]	113.84±6.20[a]
E组	5.04±0.06[a]	–	–	–

a: $P<0.05$,与对照组比较

2.2 一般行为学观察

A和B组未发现明显行为异常、意识状态和自发癫痫发作等现象。C组易激惹,活动量少,反应迟钝,摄食和饮水正常。D组仔鼠活动量减少、轻度嗜睡,并有反应迟钝、灵活性降低等表现,摄食和饮水较正常对照组减少。实验过程中未观察到自

发性癫痫发作。

2.3 水迷宫实验

A 组仔鼠和对照组比较逃避潜伏期未见差异($P>0.05$)。B 组仔鼠学习记忆能力存在下降,随着训练次数的增多,学习记忆能力增强,第 3 天和第 4 天逃避潜伏期较对照组未见统计学差异($P>0.05$)。C 和 D 组仔鼠在水中游泳速度减慢,平衡能力降低,逃避潜伏期较对照组明显延长($P<0.05$)。可以发现 C 和 D 组仔鼠随着每天的学习,仔鼠寻找平台能力逐渐增强,逃避潜伏期逐渐缩短,与对照组比较仍明显延长($P<0.05$,表 2)。第 5 天撤除平台后,A 组跨过原平台的次数为(7.76 ± 0.61)次,B 组为(6.53 ± 0.57)次,C 组为(5.43 ± 0.51)次,D 组为(5.08 ± 0.62)次。A 组仔鼠跨过原平台所在位置的平均次数与对照组(7.94 ± 0.64)次比较无差别($P>0.05$),B、C 和 D 组跨过原平台位置的平均次数明显少于对照组($P<0.05$)。

2.4 仔鼠大脑外形观察

第 56 天处死对照组和实验组 SD 仔鼠,肉眼观察 A 组大脑组织生长良好与对照组比较无明显差异。B、C 组大脑外形与对照组比较变小。D 组仔鼠与对照组相比脑组织体积显著缩小。从仔鼠冠状面形态中,发现 B、C、D 组脑体积略小,皮层变薄,厚度较小,双侧侧脑室、第三、第四脑室明显扩大,胼胝体变小伴有缺如,四叠体明显暴露,小脑体积相对变大。

表 2 实验各组和对照组仔鼠平均逃避潜伏期(s, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
对照组	37.49 ± 9.53	27.54 ± 7.22	16.18 ± 6.11	13.24 ± 4.86
A 组	37.56 ± 10.75	28.55 ± 9.81	21.03 ± 4.49	13.59 ± 4.52
B 组	45.55 ± 8.64[a]	31.06 ± 10.84[a]	22.31 ± 6.68	13.75 ± 4.81
C 组	80.78 ± 9.77[a]	61.63 ± 8.46[a]	46.24 ± 6.73[a]	40.58 ± 5.38
D 组	96.45 ± 11.35[a]	72.87 ± 11.65[a]	52.62 ± 7.24[a]	45.39 ± 7.10

a: $P<0.05$,与对照组比较

2.5 仔鼠大脑组织病理检查

对照组和实验组仔鼠第 56 天病理观察:对照组仔鼠皮层结构清晰;A 组 3 只仔鼠大脑皮层结构紊乱,其内有结节出现,DCDs 发生率为 50%;海马未见明显病变。B 组皮层结构紊乱,其内可见结节,DCDs 发生率为 100%;3 只仔鼠海马可见神经元异位团块,DCDs 发生率为 50%。C、D 组仔鼠大脑皮质变薄、层状结构紊乱,海马神经元异位团块明显,皮层和海马 DCDs 发生率均为 100%。对照组仔鼠 6 层大脑皮质层状结构清晰,神经元细胞排列有序,海马结构清晰。A 组大脑皮质结构紊乱,海马结构未见改变。B 组大脑皮质层状结构紊乱,其内有神经元异位结节,海马 CA1 区皮层下少量异位神经元,CA1 区结构未见改变。C、D 组仔鼠与对照组相比大脑皮质厚度变薄,层状结构紊乱,皮质Ⅱ ~ Ⅴ神经元细胞排列紊乱走向异常并成团状异位,海马 CA1 ~ CA2 区线型结构多处中断模糊,异位神经元呈簇状堆积,扰乱锥体细胞层,异位结节可为 1 ~ 3 个。见图 1。

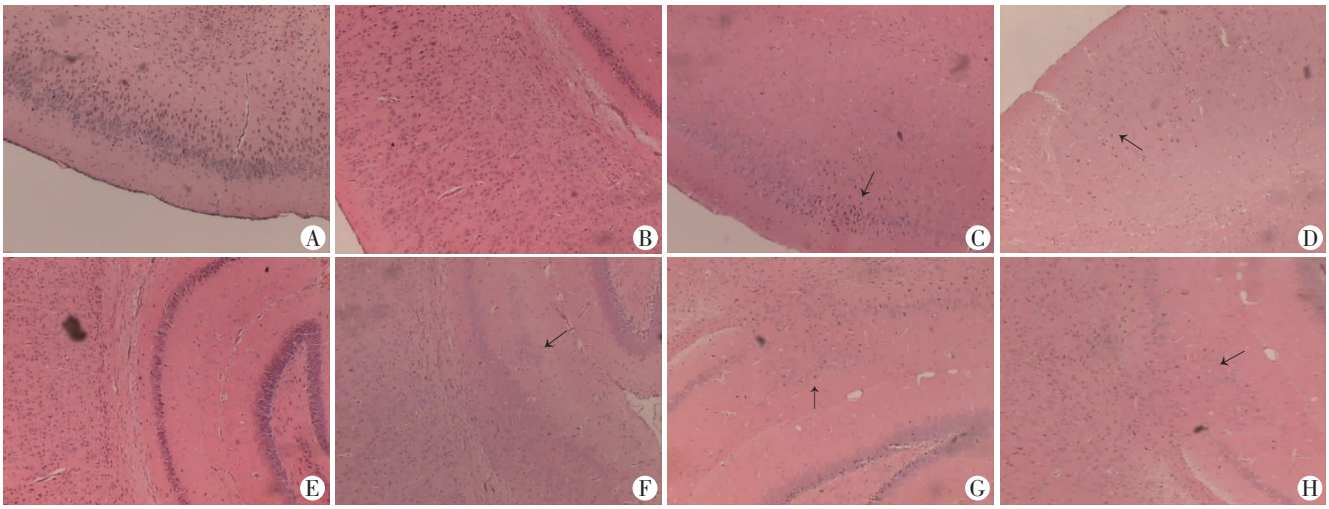
2.6 红藻氨酸诱发癫痫实验

A 组仔鼠红藻氨酸诱发癫痫发作情况与对照组相似。B、C 组仔鼠痫性发作的潜伏期缩短,但癫痫发作持续时间与对照组差异无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ ~ Ⅴ级均有发作。C 组死亡率偏高($P<0.05$)。D 组仔鼠痫性发作的潜伏期缩短、阈值降低,癫痫持续状态较对照组时间延长($P<0.05$),且死亡率显著高于对照组($P<0.05$),主要以Ⅴ级发作为主(表 3)。

表 3 实验各组和对照组仔鼠癫痫易感性及死亡率($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	痫性发作潜伏期(min)	癫痫持续状态时间(min)	死亡率
对照组	80.54 ± 6.24	192.33 ± 5.05	33%
A 组	79.54 ± 5.85	192.73 ± 5.63	33%
B 组	54.67 ± 6.10[a]	195.32 ± 6.57	33%
C 组	55.65 ± 4.96[a]	194.52 ± 5.51	50%[a]
D 组	36.92 ± 5.54[a]	245.65 ± 5.79[a]	83%[a]

a: $P<0.05$ 与对照组比较



↑:皮质或海马的灰质异位团块

A、E:A 组;B、F: B 组;C、G: C 组;D、H: D 组;A ~ D:大脑顶叶皮质;E ~ H:海马 CA1 区

图 1 第 56 天各实验组大鼠大脑皮质和海马病理学观察 (HE ×100)

3 讨论

DCDs占儿童耐药性癫痫手术病例的近40%,是难治性癫痫的主要病因[6-7]。DCDs的病因是大脑在发育过程中,分别或同时受到内、外环境中有害因素如药物、毒素、射线、外伤等因素的损伤,影响神经元的正常移行、分化、增殖等过程导致DCDs。在造成DCDs众多因素中,辐射是导致DCDs的1个重要原因[8]。电磁辐射主要包括:X射线、γ射线、紫外线等。本研究通过不同放射线剂量制作弥漫性DCDs伴神经元异位结节模型,从中筛选出最佳放射剂量。

本研究应用X射线照射孕17 d大鼠,结果显示仔鼠随着放射剂量的递增,大脑DCDs形态学改变越明显,同时伴有死亡率增高。基于形态学特点改变,我们明显可以看出A组虽然具有大脑皮层结构的紊乱,但海马的结构无明显改变,也未见异位神经元,因此至少在光镜层面上不好定义弥漫性DCDs,故我们淘汰这个剂量所制作的模型鼠。B组虽然可以看到顶叶的皮层结构紊乱,海马皮层下可见少量异位神经元团块,但是海马出现异位团块不恒定,因此我们认为该剂量所制作的模型不稳定。E组仔鼠出生后死亡率达到80%,随着时间延长死亡率逐渐增大,提示该剂量接近模型的致死量,不适合应用于造模。C、D组皮质和海马均存在神经元异位结节,行为学上存在易激惹,水迷宫实验结果提示智能发育迟滞存在,癫痫诱发实验中发作潜伏期缩短,皮质和海马DCDs发生率为100%,因此适合做模型。但相对比而言,C组仔鼠死亡率较D组显著降低,因此本研究认为C组更适合作为研究模型。符合选择标准:生存率高,精神发育迟滞明显,痫性发作阈值降低,病理类型典型。

1988年Jensh等[9]应用低剂量γ射线照射孕鼠,观察子代模型鼠大脑和其他器官在成长过程中形态学改变,发现子代模型鼠刚出生时体质量偏低,在发育的过程中逐渐与正常鼠达到一致。同年Kimler等[10]应用X射线造模,观察模型鼠的形态学和行为学后揭示模型鼠脑小畸形、皮层变薄、脑室扩大,行为学存在反应迟钝和痫性发作。本研究发现C组生长发育过程与Jensh等[9]研究基本一致,模型鼠的形态学特点与Kimler等[10]研究相同。1993年Ferrer等[11]应用2 Gy γ射线照射孕17 d大鼠,可见子代模型鼠大脑皮质内存在异常结节,并初步探讨结节形成的机制。2004年Kellinghaus等[12]应用不同剂量γ射线辐射孕鼠,探讨不同剂量下子代模型鼠大脑皮层及海马的形态学改变,本研究也得到类似的结果,并且红藻酸诱发实验很好的证实了模型鼠具有癫痫易点燃性。

模拟人类皮质异位症的模型除放射线造模外,尚包括注射药物模型,其中经典模型包括甲基偶氮甲醇模型和卡莫司汀模型,这两者模型的制作方法都是通过腹腔注射药物来完成的。药物模型的技术难点在于注射药物浓度的准确配置,注射部位的选择,注射过程中对孕鼠的保护,孕鼠对药物的耐受程度等。而X射线模型制作过程中,放射剂量是准确的,照射部位是明确的,在照射过程中也不需要人为的抓握,因此,放射线模型与药物模型从制作方法比较,应用放射线制作模型更具优势。

综上所述,本研究认为孕17 d鼠经X射线175 cGy照射后仔鼠的存活率较高,DCDs发生率高且稳定可靠,精神智能发育迟滞,病理改变典型、红藻氨酸易诱发癫痫发作,实验操作简单。因此,本研究认为175 cGy X射线模型鼠是研究DCDs成因及致痫机制可靠的动物模型。

参考文献:

[1] Moroni R F, Cipelletti B, Inverardi F, *et al*. Development of cortical malformations in BCNU-treated rat, model of cortical dysplasia[J]. Neuroscience, 2011, 175: 380-393.

[2] 张建刚, 宋延波, 张毅, 等. X射线照射致皮质发育障碍模型大鼠致癫性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(1): 74-77.

[3] Sun X Z, Inouye M, Hayasaka S, *et al*. Effects of different doses of gamma-radiation on the developing brain of mice[J]. Environ Med, 1995, 39(2): 113-116.

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

[5] Gupta Y K, Briyal S, Sharma M. Protective effect of curcumin against kainic acid induced seizures and oxidative stress in rats[J]. Indian J Physiol Pharmacol, 2009, 53(1): 39-46.

[6] Chang E F, Wang D D, Barkovich A J, *et al*. Predictors of seizure freedom after surgery for malformations of cortical development[J]. Ann Neurol, 2011, 70(1): 151-162.

[7] Pacione D, Blei F, Devinsky O, *et al*. Coagulation abnormalities in children undergoing epilepsy surgery[J]. J Neurosurg Pediatr, 2011, 7(6): 654-659.

[8] Zhou F W, Roper S N. Altered firing rates and patterns in interneurons in experimental cortical dysplasia[J]. Cereb Cortex, 2011, 21(7): 1645-1658.

[9] Jensh R P, Brent R L. The effects of prenatal X irradiation on the appearance of reflexes and physiologic markers in the neonatal rat[J]. Radiat Res, 1988, 116(3): 416-426.

[10] Kimler B F, Norton S. Behavioral changes and structural defects in rats irradiated in utero[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1988, 15(5): 1171-1177.

[11] Ferrer I. Experimentally induced cortical malformations in rats[J]. Childs Nerv Syst, 1993, 9(7): 403-409.

[12] Kellinghaus C, Kunieda T, Ying Z, *et al*. Severity of histopathologic abnormalities and in vivo epileptogenicity in the in utero radiation model of rats is dose dependent[J]. Epilepsia, 2004, 45(6): 583-591.

(**收稿**:2011-08-28;**修回**:2011-11-30)

(编辑 王小宴)