文章编号:1000-5404(2013)20-2177-04

论著

幼鼠癫痫发生过程中胼胝体内髓鞘变化的研究

李听松[1,2],叶园珍[1,2],蒋 莉[1,2],陈恒胜[2],熊佳佳[1,2],孔 敏[1,2],胡 君[1,2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:神经内科[1],儿童医院儿科研究所,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地[2])

[摘要] **目的** 探讨幼鼠惊厥持续状态(status convulsion,SC)后癫痫发生过程中胼胝体内有髓神经纤维(myelinated fibers, MF)的变化。**方法** 选用21 d SD幼鼠122只,按随机数字表法分为对照组($n=48$)及实验组($n=74$)。实验组采用氯化锂匹罗卡品制备SC模型,应用无线遥测脑电图记录SC后癫痫发生不同时期脑电图变化;Gallyas银染观察胼胝体MF形态变化;Western blot检测胼胝体内髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)含量变化;透射电镜观察MF超微结构的改变。**结果** SC后不同时期脑电图的表现符合癫痫发生各阶段的变化;幼鼠SC后癫痫发生的慢性早期及慢性期胼胝体厚度明显变薄;与同龄对照组相比,幼鼠胼胝体内的MBP表达于SC后急性期即开始下降($P<0.05$),且潜伏期、慢性早期、慢性期均显著低于正常对照组($P<0.01$);透射电镜可见大鼠SC后急性期胼胝体内MF开始出现分层、肿胀,慢性早期及慢性期还可见空泡化。**结论** 幼鼠SC所致胼胝体内MF的损伤贯穿于SC后癫痫发生整个过程。

[关键词] 幼鼠;惊厥持续状态;有髓神经纤维;胼胝体
[中图法分类号] R322.81;R361;R742.1 [文献标志码] A

Change of myelinated fibers during epileptogenesis in corpus callosum of immature rats after status convulsion induced by lithium chloride-pilocarpine

Li Tingsong[1,2], Ye Yuanzhen[1,2], Jiang Li[1,2], Chen Hengsheng[2], Xiong Jiajia[1,2], Kong Min[1,2], Hu Jun[1,2] ([1]Department of Neurology, [2]Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the change of myelinated fibers in corpus callosum of immature rats after status convulsion (SC) induced by lithium-pilocarpine. **Methods** Seventy-four immature SD rats, in which SC was induced by lithium chloride-pilocarpine (pilo group) and forty-eight immature SD rats (control group) were evaluated. Morphological changes of myelinated fibers in corpus callosum were examined by Gallyas staining. The expression of myelin basic protein (MBP) was determined by Western blotting. The microstructural characteristics of myelinated fibers were determined by transmission electron microscopy at different time points (acute phase, latency phase, beginning of chronic phase and chronic phase). **Results** It was found that the callosal myelinated fibers of the pilo group were degenerated, and the MBP expression in corpus callosum of the pilo group was significantly decreased in comparison with the control group at the acute phase lasting to the chronic phase after SC. While the myelinated nerve fibers in control rats were normal, with plasma membrane rings of regular heights and dense structure, the fibers in pilo-treated rats showed stratification, collapse and disruption, as well as disordered arrangement at different time points after SC. **Conclusion** Myelinated fiber damage in corpus callosum of immature rats is irreversible at acute phase after SC.

[**Key words**] immature rats; status epilepticus; myelinated fiber; corpus callosum

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900455, 81071056), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSCT 2013jjB0031), and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-274). Corresponding author: Jiang Li, E-mail: neurojiang@gmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30900455, 81071056);重庆市自然科学基金(CSTC2013jjB0031);重庆市卫生局项目(2009-2-274)
[通信作者] 蒋 莉,电话:(023)63634224,E-mail: neurojiang@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130701.0925.003.html(2013-07-01)

惊厥在小儿时期发病率高达3%～4%，容易出现严重惊厥和惊厥持续状态(status convulsion, SC)，遗留癫痫、智力低下等后遗症。SC至癫痫形成的过程称为癫痫发生(Epileptogenesis)。直至目前SC后癫痫发生的具体机制目前尚不完全清楚。有研究表明[1]，SC后幼鼠脑内存在神经元凋亡坏死、突触重塑、胶质增生、苔藓纤维芽生等不同变化。而作为脑白质的重要组成部分，有髓神经纤维是否亦存在于SC后癫痫病理的形成过程中，目前尚不清楚。本研究以21 d幼鼠为研究对象，利用氯化锂匹罗卡品制作急性SC模型，长程检测SC后脑电图的动态变化，从组织形态和超微结构等层面研究SC后不同时期有髓神经纤维的动态变化，以期为研究惊厥如何继发癫痫提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型制备

1.1.1 实验动物及分组　选用出生21 d SPF级健康雄性SD幼鼠122只(购自重庆医科大学实验动物中心)，体质量(50.52±4.35)g。对每只幼鼠进行编号，采用随机数字表法将其随机分为对照组(n=48)及实验组(n=74)。利用氯化锂-匹罗卡品制备SC模型。在出现SC并存活的实验组63只幼鼠中按抓阄法选取12只作为急性期组(SC后24 h)，12只作为潜伏期组(SC后3～5 d)。在剩余的39只幼鼠中，将出现脑电图自发反复放电的24只幼鼠进一步分为慢性早期组(自发放电24～72 h内，n=12)、慢性期组(慢性早期后2个月，n=12)[2]。将未出现SC、SC后死亡、SC后存活但持续2个月以上无脑电图自发性放电的幼鼠排除于本实验。

1.1.2 惊厥模型制备　给予实验组幼鼠腹腔注射氯化锂(127 mg/kg，美国Sigma公司)20 h后，采用匹罗卡品(Pilocarpine，30 mg/kg，美国Sigma公司)诱发惊厥发作，发作情况采用动物癫痫发作Racie分级[3]，将发作持续30 min或30 min以上定义为SC。在幼鼠发作持续90 min后安定(10 mg/kg)止惊。对照组幼鼠给予等体积生理盐水代替氯化锂及匹罗卡品。

1.1.3 长程动态检测脑电图　惊厥诱发前4 d，麻醉幼鼠，皮层电极安装参照既往报道[4]。消毒腹部，将腹部皮下组织与腹肌钝性分离，将无线脑电图植入子埋于皮下，缝合皮肤。待幼鼠恢复2 d后开始记录脑电图的变化，每天12 h连续监测。脑电图记录持续至出现自发放电的脑电图为止。记录超过2个月脑电图无改变者，排除出本实验。将波幅高于2倍基线，持续时间超过10 s，频率大于5 Hz作为脑电图自发放电的标准[5]。

1.2 Gallyas银染

每组随机选取5只幼鼠，银染方法参照文献[6]进行。显微镜下采集图像(90i, Nikon, 日本)。在所得的组织切片上测量胼胝体厚度，对照脑立体定位图谱，在每张切片的胼胝体处随机选取5个点，利用image J测量这5个点所对应的胼胝体厚度，将均值作为该切片上胼胝体厚度的值。

1.3 Western blot测定MBP表达量

各组随机选取7只幼鼠，Western blot测定髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)含量参考既往方法[3]。采用Caveolin-1作为内参(1∶1 000, SC-894, Santa, USA)。用Image J软件分析各条带的光密度值，蛋白的相对定量结果以目的条带光密度值/内参光密度值，即*OD*比值的形式表示。

1.4 透射电子显微镜观察有髓神经纤维结构变化

取用于Gallyas银染的对侧大脑，于胼胝体处取1 mm×1 mm×1 mm的组织块，将其浸泡于4%戊二醛中4 ℃固定2 h，再经0.1 mol/L PBS(pH=7.2)冲洗干净后用在锇酸中4 ℃染色2 h。经逐级脱水后浸入100%树脂中孵育，后将组织块切成60 nm厚的超薄切片，在透射电镜下放大25 000倍，每个组织块选取4个视野进行拍照，每只大鼠共拍摄15张照片。

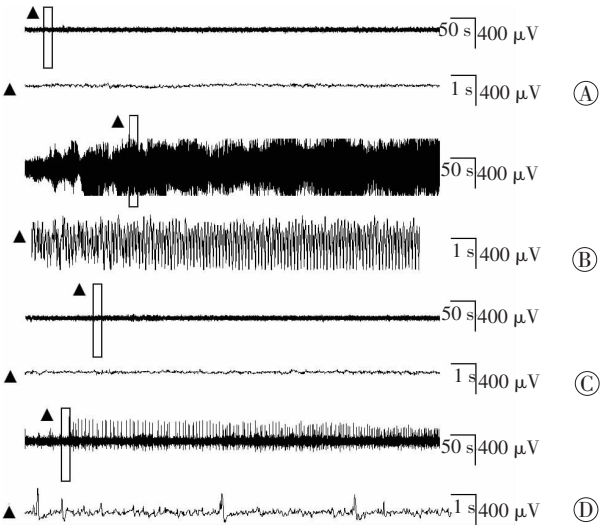
1.5 数据收集及统计分析

采用SPSS 13.0软件包进行统计学处理，计量资料采用$\bar{x}\pm s$表示，两组间比较采用独立样本t检验。

2 结果

2.1 氯化锂-匹罗卡品致幼鼠SC后的脑电图表现

匹罗卡品注射后5～30 min，幼鼠(71/74)序贯出现点头、咀嚼、前肢阵挛、站立伴双前肢阵挛、跌倒等动作。在急性期及潜伏期，实验组8只幼鼠死亡。对照组幼鼠在整个过程中无癫痫发作及死亡。对照组幼鼠脑电图主要以α、β波为主，有散在的θ波存在(图1A)，无自发放电现象；幼鼠SC后急性惊厥脑电图主要表现为高波幅的尖波、棘波发放(图1B)；潜伏期脑电图与正常脑电图相近(图1C)；自发发作脑电图表现如图1D所示，表现为散在尖波、棘波发放，持续时间超过10 s。61.5%(24/39)的实验组幼鼠出现了自发性发作脑电图。

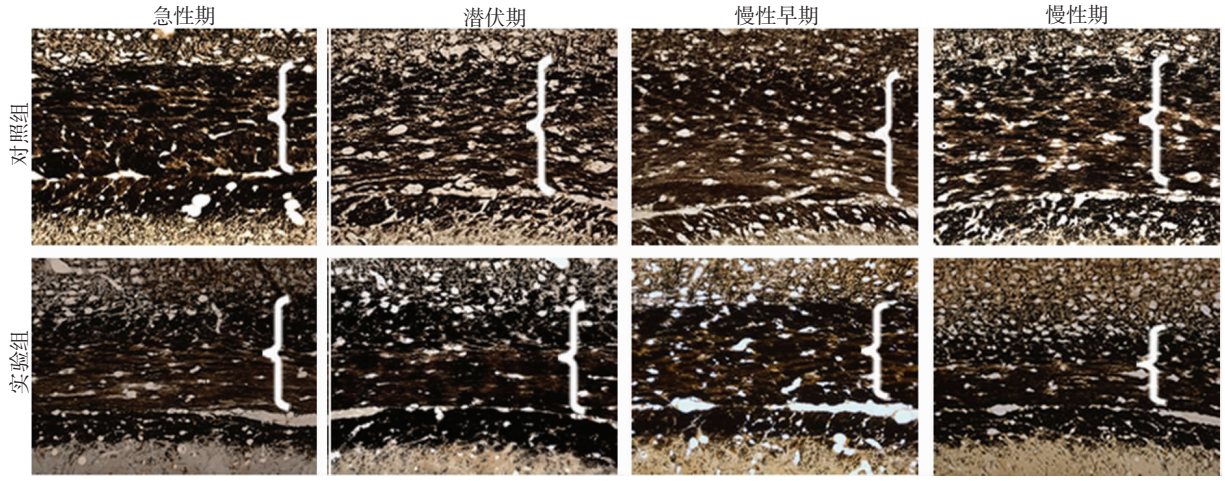


A：正常脑电图；B：急性惊厥发作脑电图；C：潜伏期脑电图；D：自发发作脑电图　▲：示局部放大

图1 幼年鼠SE后各期脑电图的变化

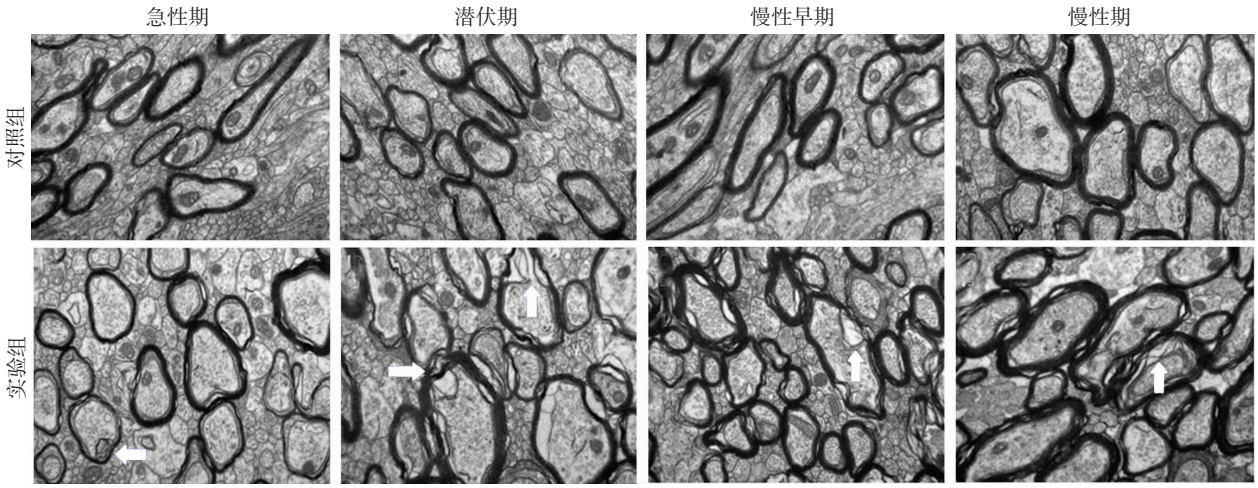
2.2 Gallyas银染结果

利用Gallyas银染可观察到幼鼠SC后慢性早期及慢性期胼胝体厚度变薄(图2、表1)。



┤:示可测量的胼胝体厚度

图 2　Gallyas 银染显示各组幼鼠 SC 后不同时期胼胝体变化　(×200)



↑:示髓鞘病变

图 4　各组幼鼠 SC 后不同时期胼胝体内有髓神经纤维超微结构变化　(×25 000)

表 1　Gallyas 银染显示各组幼鼠 SC 后不同时期胼胝体厚度变化

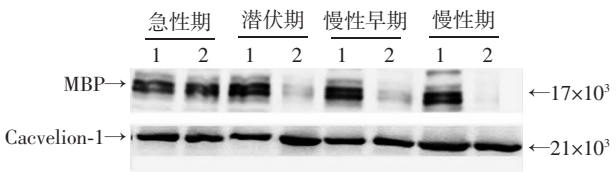
(μm, $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	急性期	潜伏期	慢性早期	慢性期
同龄对照组	389.46 ± 22.52	405.22 ± 25.73	401.37 ± 30.50	404.25 ± 27.55
实验组	383.65 ± 22.52	385.77 ± 27.54	288.64 ± 21.08[a]	256.62 ± 25.33[a]

a: $P<0.01$, 与同龄对照组比较

2.3　Western blot 检测幼鼠胼胝体 MBP 的表达情况

利用 Western blot 检测到幼鼠 SC 后不同时期胼胝体内的 MBP 表达均低于同龄对照组,如图 3 所示。不同时间点 MBP 与内参 Cavelion-1 的灰度比值见表 2。



1:对照组;2:实验组

图 3　Western blot 检测各组幼鼠 SC 后不同时期胼胝体内 MBP 的表达

2.4　透射电镜观察有髓神经纤维的变化

借助透射电镜可见正常的有髓神经纤维髓鞘完整而致密地包绕着轴突,轴突内线粒体无肿胀,而在 SC 后急性期始出现髓鞘的分层、肿胀,慢性早期及慢性期还可见空泡化(图 4)。

表 2　各组幼鼠 SC 后不同时期胼胝体内 MBP 表达变化

(灰度值比, $\bar{x} \pm s$, $n=7$)

组别	急性期	潜伏期	慢性早期	慢性期
同龄对照组	0.76 ± 0.08	0.77 ± 0.07	0.79 ± 0.08	0.78 ± 0.09
实验组	0.54 ± 0.08[a]	0.31 ± 0.05[a]	0.263 ± 0.07[a]	0.22 ± 0.03[a]

a: $P<0.01$, 与同龄对照组比较

3　讨论

3.1　幼鼠日龄及动物癫痫模型的选择

本课题组及其他研究提示,从神经元损伤的角度无法解释 SC 后小儿易遗留癫痫的临床现象[1,7]。由于脑内有髓神经纤维在维持神经冲动的正常传递中具有重要作用,而婴幼儿脑内神经纤维髓鞘化正处于快速期,SC 后有髓神经纤维的损伤逐渐受到关注。有研究发现,幼鼠(20 ~ 28 d)SC 后在其成年期可见到脑白

质中存在脱髓鞘现象[8]；还有人发现大鼠在SC后2周及4周也可见到皮层或海马内存在髓鞘病变[3]。然而，幼年期SC后髓鞘的病变是急性病变还是继发于早期神经元损伤的晚期损伤，是否贯穿于幼鼠SC后癫痫发生的过程，则不得而知。

人类脑内神经纤维髓鞘化的快速期大概在生后2年以内[9]。与人类脑发育相对应，大鼠15 d相当于1岁儿童，28～30 d相当于2岁儿童[10]。鉴于生后2年是脑内神经纤维髓鞘化的关键时期，本研究特选用21 d幼鼠（相当于人类1～2岁）为研究对象，该年龄亦是儿童癫痫好发年龄，故较适用于研究幼年期有髓神经纤维髓鞘化与癫痫的关系。

本研究采用的氯化锂-匹罗卡品模型是最常用的动物癫痫模型之一[11]，可用于人类颞叶癫痫的研究[12]。大鼠SC后，将经历急性期、潜伏期、慢性期早期以及慢性期等不同时期。其中慢性早期是以脑电图记录到自发反复放电为标志，这也是癫痫模型制作成功的标志[2]。本研究结果发现幼鼠SC后急性期脑电图表现为高波幅的尖波、棘波发放。而潜伏期脑电图与正常脑电图相近，与文献[13]报道一致。经历了前两个时期后，本研究中有61.5%的幼鼠出现自发性反复发作的脑电图改变，表现为散在的尖波、棘波发放。模型成功率以及脑电图表现与Leroy[14]报道一致。

3.2 幼鼠SC后癫痫发生不同时期存在有髓神经纤维的持续性损伤

中枢神经系统中，有髓神经纤维是由髓鞘包绕轴突而成。MBP为形成髓鞘的主要蛋白之一，约占髓鞘蛋白总量的1/3，是形成髓鞘主致密线的成分。MBP含量的降低能有效反映髓鞘的损伤程度。本研究结果发现，幼鼠SC后急性期至慢性期的各个观察时间点，胼胝体及海马内MBP的表达均低于同龄对照组。我们进一步利用透射电镜观察有髓神经纤维超微结构的变化，结果发现SC后急性期即存在有髓神经纤维的髓鞘分层、肿胀，慢性早期及慢性期还可见到空泡化。这就提示幼鼠神经纤维及髓鞘化进程在SC后急性期即被破坏，且在后期也未能得到修复。

3.3 有髓神经纤维的损伤对癫痫发生的影响

在中枢神经系统皮质和海马网络内，癫痫样放电的传播速度为70～200 mm/s，该传播速度远远低于正常情况下电活动在有髓神经纤维中的传播速度。癫痫样放电主要是通过新皮质第5层传播到远端皮质区域的，其中异常放电神经元的轴突上行至分子层，作用于临近的神经元顶树突，致使癫痫样放电向周围传播[15]。癫痫样放电在海马和皮质中的远距离传播往往是跳跃的、不连续的。这样的传播形式也就构成了癫痫发作症状学及脑电图学的基础。髓鞘作为电绝缘成分，包绕着轴突，保证了神经元电活动传导过程中能快速、有效、精密的传递。结合儿童时期的发育特点及本研究发现，我们推测，幼鼠SC后引起的神经纤维的髓鞘病变，可能通过影响神经纤维结构或功能变，最终影响神经冲动传导的速度和方向，导致痫样发作的反复发生。

综上，在幼鼠SC后的癫痫发生过程中，有髓神经纤维的损伤贯穿其中。而SC后髓鞘损伤，神经纤维结构的完整性因此而受到破坏，有可能是SC后癫痫形成的可能机制之一。如能有效控制幼年期惊厥后髓鞘的损伤，可能会减少惊厥后继发癫痫的发生。然而惊厥后髓鞘病变的机制、髓鞘脱失后对轴突有怎么样的影响，具体通过何机制参与癫痫，尚需进一步研究。

参考文献：

[1] Holopainen I E. Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization[J]. Neurochem Int, 2008, 52(6): 935－947.

[2] Mazzuferi M, Palma E, Martinello K, *et al*. Enhancement of GABA (A)-current run-down in the hippocampus occurs at the first spontaneous seizure in a model of temporal lobe epilepsy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(7): 3180－3185.

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

[4] You Y, Bai H, Wang C, *et al*. Myelin damage of hippocampus and cerebral cortex in rat pentylenetetrazol model[J]. Brain Res, 2011, 1381: 208－216.

[5] Goffin K, Nissinen J, Van-Laere K, *et al*. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat [J]. Exp Neurol, 2007, 205(2): 501－505.

[6] Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, *et al*. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination [J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 366－374.

[7] 胡越，蒋莉，李欣，等. 持续惊厥后影响海马神经元凋亡的相关因素[J]. 中华神经科杂志，2006，39(1)：36－38

[8] 刘淑丹，张桂祯，王晗知，等. 幼鼠癫痫持续状态成年后脑内髓鞘变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(13)：1375－1378.

[9] Johnson M H. Functional brain development in humans[J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(7): 475－483.

[10] Jiang W, Duong T, de-Lanerolle N C. The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat [J]. Epilepsia, 1999, 40(1): 5－19.

[11] Pitkanen A, Schwartzkroin P A, Moshe S L. Models of seizures and epilepsy[M]. Burlington: Elsevier Academic Press, 2006: 712－715.

[12] 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.

[13] Curia G, Longo D, Biagini G, *et al*. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy[J]. J Neurosci Methods, 2008, 172(2): 143－157.

[14] Leroy C, Pierre K, Simpson I A, *et al*. Temporal changes in mRNA expression of the brain nutrient transporters in the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat [J]. Neurobiol Dis, 2011, 43(3): 588－597.

[15] de-Curtis M, Avanzini G. Interictal spikes in focal epileptogenesis [J]. Prog Neurobiol, 2001, 63(5): 541－567.

（收稿：2013-03-20；修回：2013-04-19）

（编辑 黄 超）