维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)03-0253-04

长程惊厥发作后神经元死亡的动态研究

蒋　莉，蔡方成，陈　琼，张晓萍
（重庆医科大学儿科学院神经内科　重庆　400014）

【摘　要】目的：探讨成熟期大脑惊厥后脑损伤的发生发展规律、及其与血清特异性烯醇化酶（NSE）变化的相关性。方法：采用美解眠全身注射在30只成年Wistar鼠中，建立惊厥大发作模型（惊厥持续时间15～20min）。分别于惊厥发作停止后4、12、24、48、72h和7天各处死5只动物，采用HE和硫堇染色，光及电镜观察海马及皮层神经元病变。同时使用ELISA法测定血清NSE浓度变化。结果：（1）长程惊厥发作后，将出现选择性海马神经原损伤。惊厥发作后4h内，即有明显神经元死亡过程发生。坏死细胞数于惊厥后24～48h达高峰（180±38个），是对照组（38±6个）的5倍。（2）严重惊厥发作后4h，实验动物血清NSE浓度开始增高，于惊厥后24～48h达高峰（5.13±0.77nmol/L），明显高于惊厥前水平（3.53±0.87nmol/L）。结论：长程惊厥发作后，对成熟期大脑能产生以海马为主的选择性脑损伤，血清NSE的变化与其神经元死亡的发生发展规律一致。血清NSE可能作为临床检测脑损伤的有效指标。

【关键词】长程惊厥；脑损伤；神经元特异性烯醇化酶；大鼠
【中国图书分类法分类号】R742　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2001-11-12

A dynamic study of neuron death after prolonged seizure in rats

JIANG Li, et al
(Department of Neurology, College of Pediatrics, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore the feature of selective neuron injury after prolonged seizure in mature brain, and explore the relationship of serum neuron specific enolase (NSE) with brain damage. *Methods*: Prolonged seizures were evoked by Megimide in 30 adult Wistar rats . All of the rats experienced prolonged seizures with duration of 15 ~ 20 min. Every five rats sacrificed at the time of 4, 12, 24, 48, 72 hours and 7days after seizure stopped. The dead neurons were observed microscopically (HE & Thioine staining) and electron-microscopically at the areas of hippocampus, and the cortexes. At the same time points, the level of NSE in rats' sera was tested by ELISA. *Results*: (1) There was an obvious selective neuron death after prolonged seizure. The process of neurons' death was remarkably shown even at the early stage of 4 hours after severe seizures. The peak of necrosis process was counted in 24 ~ 48 hours after the seizure (180±38 cells) and it was 5 times higher than the control (38 ±6 cells). (2) By ELISA study, NSE level also increased after 4 hours after the seizure, and reached its peak concentration at 48h (5.13±0.77nmol/L) ---much higher than controls' (3.53±0.87nmol/L) . *Conclusion*: Prolonged seizure in mature brain will lead to selective neuron death mainly at the area of hippocampus, which was in accord with the process of the change of level of NSE in sera. Serum NSE level could be a useful marker for detecting neuron death.

【Key words】Prolonged seizure; Brain damage; Neuron specific enolase (NSE) ; Rat

惊厥发作是临床最常见的急症。但由于在临床研究中无法进行脑组织的病理学研究，惊厥发作是否导致脑组织的损伤，目前尚有争议[1]。尽管一些临床研究表明，惊厥发作时，患者血清中存在某些与神经元有关的生化指标变化，却无法证实这些生化指标与神经元病变的相关性。为此，本研究通过制造实验性惊厥模型，从细胞及亚细胞水平确认惊厥后神经元的变化及其规律，并同时研究神经元特异性烯醇化酶（Neuron specific enolase, NSE）与神经元病变的相关性，为临床确定和判断惊厥性脑损伤提供病理基础和有效指标。

1　材料与方法

1.1　惊厥模型的建立

作者介绍：蒋　莉（1964-　），女，副教授，博士。
主要研究方向：小儿神经系统疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

40只健康成年Wistar鼠（生后满2～3月），雌雄各半（重庆医科大学动物实验中心提供），其中惊厥实验组30只，年龄匹配正常对照和无惊厥对照组各5只。

惊厥组按20mg/kg剂量，经背部皮下及腹腔注射美解眠溶液（沈阳范家屯制药厂，50mg/20ml；批号：800701）。若15min内无惊厥发作，再按每次0.25～2.5mg追加美解眠，至1h内出现反复全身惊厥大发作。正常对照组按同样方法注射生理盐水。无惊厥对照组为同龄鼠中，美解眠用量已达实验组中致惊的平均剂量，但观察3 h后始终无惊厥发作的大鼠。

按Simialowski 6级评定法[2]惊厥发作分为0～V级。即：0级：无惊厥发作；Ⅰ级：点头，眨眼，颈动或湿狗样颤抖；Ⅱ级：节律性点头；Ⅲ级：头部抽搐加前肢颤抖；Ⅳ级：第Ⅲ级加后肢站立；Ⅴ级：惊厥致跌倒，全身强直性抽搐。凡惊厥持续5s以上者计为一次发作。达到Ⅳ级和Ⅴ级发作即为全身性惊厥或大发作。

1.2 脑组织形态学检查

惊厥组分别在惊厥发作后4、12、24、48、72h及7天各处死5只动物，断头取脑，将其左半球立即固定于10%的甲醛缓冲液，常规石蜡包埋，从视交叉处开始作冠状连续切片（片厚5μm），HE和Thionine（硫堇）染色观察细胞形态，重点是海马CA_1、CA_3区,齿状回及颞、顶叶皮层神经元改变。并在每组中任选两只鼠，断头后分离海马区，经4%的戊二醛缓冲液中固定后作600A超薄切片，铅铀染色，用日立H-600透射电镜观察细胞超微结构变化。正常及无惊厥对照鼠均在观察2～3天后处死（惊厥动物脑细胞死亡高峰时间）。

1.3 血清神经元特异性烯醇化酶（NSE）测定

在惊厥后各时点处死动物时，收集血液，4000 r/min离心10min，收集血清（避免溶血，所有溶血标本均弃之），-20℃冰冻贮存，待测定。

各时点血清NSE浓度采用ELASA法测定。用酶联仪在492nm波长处依次序测量光密度值（OD值）；根据标准物（分别含NSE 0，2.5，5.0，10.0，20.0，50.0ng/ml）的OD值与浓度绘制标准曲线，依标准曲线计算出各样品孔的相应浓度，再乘以2，即为各样品浓度。

1.4 统计学处理

采用SAS软件进行实验数据统计学处理。两均数间差异的比较用配对 t 检验或 t' 检验；多均数间比较，用方差分析，q检验作两两比较。以$P<0.05$为有显著性差异。

2 结 果

2.1 实验动物惊厥情况

惊厥实验组大鼠在注射美解眠后1～56min出现惊厥发作。其中以大发作为首发症状者12只，占40%，大多表现为程度不等的局限性发作、或从局部扩展为全身性发作。全组反复惊厥发作时间在15～20min（17.9±1.9min）。

2.2 神经元死亡的动态变化

HE及硫堇染色后，与正常对照相比，惊厥实验鼠在惊厥发作后4h即见部分神经元出现变性，主要表现为细胞肿胀、核染色质肿胀、粗大、核仁消失而使细胞核呈空泡状；继之出现核膜破裂，核溶解消失；胞浆内出现空泡（胞浆空化），继之空泡消失而现胞浆浓缩，胞膜皱缩，呈三角形或不规则形。神经元周围出现空隙。最终因核溶解消失，整个细胞呈均匀一致的红色，形成所谓“红色神经元”。并在整个神经细胞消失后，遗留一个“空穴”，病变区胶质细胞浸润。符合神经元坏死的细胞病理学特征（图1）。病变以海马CA3区、齿状回和颞叶锥体细胞为明显，并随惊厥停止后观察时间延长而明显，于惊厥后24～72h达高峰。惊厥后7天，上述变化减退，主要见神经元丢失后遗留的“空穴”，胶质细胞侵入病变神经元周围和神经元脱失区，而锥体层神经元减少。而从惊厥发作至7天，海马内微血管无异常变化。

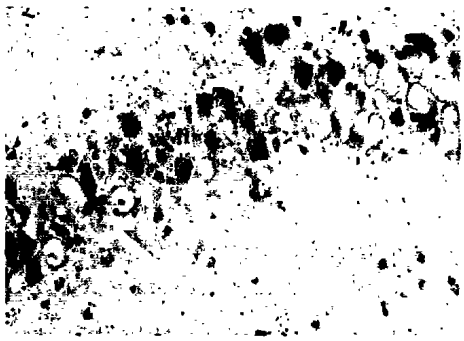


图1 惊厥后神经元空泡变性、核固缩、“红色神经元”（HE，×40）

为更加明确惊厥后神经元死亡的发生率，光镜下在大脑乳头体平面切片上对海马CA3区、齿状回、颞叶皮层、顶叶皮层各计数200个神经细胞，进行死亡神经元的定量观察。结果发现惊厥发作后，坏死神经元数以海马CA3最明显、齿状回次之，顶叶皮层最轻，提示选择性海马神经元死亡是惊厥性脑损伤的特征性改变（惊厥后3天各脑区病

表1 长时程惊厥后3天实验鼠各脑区病变神经细胞分布（个，$\bar{X}\pm S$）

组别	海马CA3区	海马齿状回	颞叶皮层	顶叶皮层
成年组	88±18★●	66±16★	53±12★	19±7

注：（1）与顶叶皮层比较：★$P<0.01$，◆$P<0.05$
（2）与颞叶皮层比较：●$P<0.01$，△$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 长程惊厥发作后实验鼠神经细胞坏死数动态变化(个，$\bar{x}\pm s$)

组别	正常对照	无惊厥对照	惊厥后4h	惊厥后12h	惊厥后24h	惊厥后48h	惊厥后72h	惊厥后168h(7d)
成年鼠	38 ± 8	43 ± 7	77 ± 23	115 ± 53	180 ± 38▲	166 ± 32▲	190 ± 29☆	110 ± 55

注：(1) 每时点观察5张切片，每张切片在海马CA3、齿状回、颞叶皮层各计数200个，共600个神经元

(2) 与同组对照比较▲$P<0.05$，☆$P<0.01$

表3 长程惊厥发作后实验鼠血清NSE动态变化(nmol/L，$\bar{x}\pm s$)

组别	正常对照	惊厥后12h	惊厥后24h	惊厥后48h	惊厥后72h	惊厥后7d
成年鼠	3.58 ± 0.87	3.84 ± 0.05	4.78 ± 0.72	5.13 ± 0.77▲	4.45 ± 0.43	4.11 ± 0.56

注：(1) 每个时点检测5个标本，（2）与正常对照比较▲$P<0.05$。

变神经细胞数见表1）。惊厥后各时点病变神经元数变化（表2）表明，惊厥发作后神经元的坏死是一个动态变化过程。惊厥发作后早期（4h内）即有明显神经元死亡发生，以后呈进行性增加的趋势，在惊厥发作后24～72h，神经元死亡达高峰。

2.3 坏死神经元电镜观察

与正常对照相比，成年鼠惊厥发作后24h，大多数神经元都已有明显的细胞坏死性改变：主要表现为线粒体明显肿胀，细胞核染色质溶解变细，核膜尚完整，惊厥后72h，胞浆内线粒体内外室肿胀更明显，胞浆呈空泡化；细胞核染色质溶解加重，核内也可见空泡，核膜破裂，细胞死亡（图2）。至惊厥发作后7天，神经元形态及核、浆病变明显减轻，存留细胞形态基本恢复正常，但视野内神经元数目变稀少。



图2 惊厥后3天神经元肿胀、线粒体及内质网扩张、核溶解(×3000)

2.4 血清NSE浓度变化

实验动物惊厥后不同时间血清NSE浓度变化见表3。

结果表明惊厥发作后12h起，实验鼠血清NSE浓度即有随观察时间延长而进行性增加趋势，在惊厥后24～48h达高峰。其血清NSE浓度显著高于正常对照（$P<0.05$）。NSE浓度变化与表1中神经元死亡的发展规律一致。

3 讨 论

有关持续性惊厥和SE发作是否引起惊厥性脑损伤问题一直有着不同意见。早年，人们从一些颞叶癫痫患者追朔到幼年时期有高热惊厥发作史，提出严重或反复的高热惊厥发作，可能导致颞叶海马区损伤及海马硬化，长大后即成为颞叶癫痫顽固发作的原因[3,4]。1998年，Salanova[5]对38名顽固性颞叶癫痫患者作手术前MRI大脑体积分区测量及正电子发射断层扫描，证实95%的患者存在海马硬化或局部组织代谢低下，其中66%病例有复杂性高热惊厥史。同年，Fernandey等[6]报告两个家庭共23名成员的MRI脑体积测量，均存在左侧海马发育不良。从而认为[1,7]：遗传因素决定的隐匿性海马畸形是许多高热惊厥患儿长大以后发生海马硬化及顽固性颞叶癫痫的共同病理学基础。连锁分析提示该病理基因位点在8q13～21[1]。换言之，幼年时反复严重高热惊厥发作与日后海马硬化及颞叶癫痫发作并无直接因果关系，而是由同一病理基础所决定，并在不同年龄期的不同表现。然而，这种说法能否完全否定惊厥性脑损伤的可能性呢？近年的动物实验研究证实，严重惊厥发作本身确实能引起海马区的选择性脑损伤[8~11]。

光镜下，坏死神经元的早期突出表现是胞体肿胀、胞浆内空泡形成，继而核染色质粗大、固缩、核仁消失，核膜破裂，胶质细胞浸润，直至细胞崩解等；电镜下可见线粒体肿胀扩大至破裂、内质网及高尔基体扩张、胞浆空化而透亮，核染色碎裂、溶解，电子密度降低并可有核内空泡形成等，整个细胞体积增大，最后细胞崩解破坏。

维普资讯 http://www.cqvip.com

神经元的死亡和清除是一个非常迅速的过程。据认为[8]，从形成到被邻近胶质细胞识别、吞噬的时间大约只需1～2h。因此，单个神经元从死亡到清除的时间即使按4h至2天计算[12]，惊厥后2～3天依然存在的死亡神经元应被视为是新发生的坏死细胞。通过本研究对神经元死亡的动态观察显示，持续性惊厥发作后4h内即可见神经元死亡。随观察时间的延长而加重，于24～72h达高峰，直至惊厥后7天始接近正常对照水平。表明惊厥后脑内发生的神经元死亡病理过程将延续若干日。

神经元特异性烯醇化酶(NSE)是糖酵解途径的关键酶，特异性地存在于神经元和神经外胚层组织，是神经元损伤的特异性活体生物学标志[13~17]。然而，由于研究手段的局限性，临床很难开展NSE升高水平与神经元死亡严重程度间关系的研究[13~16]。本研究发现实验鼠持续性惊厥发作后12h即有血清NSE含量升高，24～48h达峰值，7天后接近正常。不仅与该组大鼠脑组织神经元死亡的发生发展规律一致，也与Degiorgio[14]对19例SE病人血清NSE临床研究完全吻合。进一步支持本文前述有关严重惊厥发作后，成年大鼠惊厥性脑损伤中神经元死亡过程的动态研究结果。同时也提示神经元特异性烯醇化酶可能成为临床观察惊厥后神经元损伤的特异性生化指标。

参 考 文 献

[1] Berkovic SF, Scheffer IE. Febrile seizures: genetic and relationship to other epilepsy syndromes[J]. Curr Opin Neurol, 1998;11:129-131.

[2] Diehl RG. Development and persistance of kindled seizure after repeated injections of pentylenterazol in rats and guinea pigs[J]. Epilepsia, 1984;25:505-508.

[3] Treiman DM. Generalized convulsive status epilepticus in the adult[J]. Epilepsia, 1993;34:2-11.

[4] Sagar HJ, Oxbury JM. Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy : correlation with early childhood convulsions[J]. Ann Neurol, 1987;22:334-340.

[5] Salanova V, Markand O, Worth R, et al. FDG-PET and MRI in temporal lobe epilepsy: relationship to febrile seizures, hippcampal sclerosis and outcome[J]. Acta Neurol Scand, 1998; 97:146-150.

[6] Femandez G, Effenberger O, Vinz B, et al. Hippocampal malfomiation as a cause of familial febrile convulsions and subsequent hippocampal sclerosis[J]. Neurology, 1998;50:909-914.

[7] Sloviter RS , Pedley TA. Subtle hippocampal malformation. Importance in febrile seizures and development of epilepsy[J]. Neurology, 1998;50:846-847.

[8] Olney JW, Ishimaru MJ. Exicitotoxic Cell Death, in Cell Death and Diseases of the Nervous System[M]. New Jersey: Humana Press, 1999;361-378.

[9] Moshe SL. Brain injury with prolonged seizures in children and adults[J]. J Child Neurol, 1998;13:3-6.

[10] Magloczky Z, Frennd TF. Delayed cell death in the contrateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield[J]. Neuroscience, 1995;66:847-860.

[11] Mello LE, Covolan L. Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures[J]. Epilepsy Res, 1996;26:123-129.

[12] Wylle Ah. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endonuslease activitation[J]. Nature, 1980;284: 555-556.

[13] Degiorgio CM, GottPS, RabinowiczAL, et al. Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus[J]. Epilepsia,1996;37:606-609.

[14] Degiorgio CM, Correale JP, Gott PS, et al. Serum neuron-specific enolase in human status epileptics[J]. Neurology, 1995; 45:1134-1137.

[15] Tanabe T, Suzuki S, Hara K, et al. Cerebrospinal fluid and serum neuron-specific enolase levels after febrile seizures[J]. Epilepsia, 2001;42(4):504-507.

[16] Rabinowicz AL, Correale J, Boutros RB. Neuron-specific enolase is increased after single seizures during inpatient video/ EEG monitoring[J]. Epilepsia, 1996;37:122-125.

[17] Zerr I, Zerr I, Bodemer M, et al. Cerebrospinal fiuid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Crentzfeldt-Jakob disease[J]. Lancet, 1995;345: 1609-1612.