

· 论 著 ·

皮质发育障碍模型鼠脑 γ -氨基丁酸的表达

罗春阳¹, 晏 勇², 马勋泰², 王学峰²

(1. 重庆市中山医院神经内科 400013; 2. 重庆医科大学附属第一医院神经内科 400016)

摘要:目的 建立 Wistar 大鼠大脑皮质发育障碍(DCDs)模型,探讨 γ -氨基丁酸(GABA)与皮质发育障碍所致癫痫发作的关系。方法 采用 γ -射线照射孕 15d 大鼠的方法制作皮质发育障碍模型,免疫组化方法观察 GABA 在脑组织的表达。结果 模型组大鼠脑质量低于健康对照组大鼠,皮质变薄,皮质层状结构紊乱,皮质下神经元呈结节状异位,海马锥体神经元呈团状分布,GABA 免疫阳性神经元减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 皮质发育障碍模型大鼠 GABA 阳性神经元减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),可能是皮质发育障碍所致癫痫的发病机制之一。

关键词:皮质发育障碍;难治性癫痫; γ -氨基丁酸**中图分类号:**R365.742**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2009)22-2837-02

Expressions of GABA in animal models of disorders of cortical development

LUO Chun-yang¹, YAN Yong², MA Xun-tai², et al.

(1. Department of Neurology, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400013, China; 2. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective We established animal models in disorders of cortical development (DCDs) in Wistar rats to study the mechanisms underlying epileptogenesis with DCDs and understand the relationship between γ -aminobutyric acid (GABA) and DCDs.

Methods Animal models in DCDs were γ -radiated pregnant rats. The expressions of γ -aminobutyric acid (GABA) in cortex were observed by immunohistochemistry. **Results** (1) The weight of brain in model groups rats were light than that of the control groups. (2) Model rat showed a thin cortical plate and distinct clusters of neuronal elements that represented heterotopias. There were clusters of large neurons in both superficial and deep layers in the model rat cortex. (3) The GABA positive cells in the cortex of model rats could be detected loss by immunohistochemistry. **Conclusion** The decreasing expression of GABA in the rats' cortex of DCDs may have relationship with the mechanisms of the epilepsy.

Key words: disorders of cortical development, intractable epilepsy, γ -aminobutyric acid

大脑皮质发育障碍(disorders of cortical development, DCDs)是引起难治性癫痫(intractable epilepsy, IE)的主要原因之一,约占 IE 患者总数的 40%^[1],75%~90%的 DCDs 患者可出现痫性发作,类型复杂多样,常与皮质发育畸变的解剖部位有关。15%~30%的 DCDs 患者在某一阶段会出现癫痫持续状态,该类型手术效果极差^[2]。神经递质在癫痫发病中的作用日益受到重视,中枢神经系统中 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)含量降低是神经细胞过度兴奋诱发同步放电,产生癫痫发作的重要原因之一。

本实验采用免疫组织化学技术(immunohistochemistry, IHC)研究皮质发育障碍模型鼠 GABA 免疫反应阳性神经元的变化,探讨 GABA 在所致癫痫发作中的作用。

1 材料与方

1.1 实验动物及分组 Wistar 孕 15d 大鼠 4 只,由第三军医大学大坪医院动物中心提供,其中 3 只孕鼠于妊娠 15d 经 γ -射线照射后生育 26 只鼠,至 12 周存活 20 只(雄性 11 只,雌性 9 只),随机挑选 10 只作为 γ -射线照射组;1 只 Wistar 孕鼠未经 γ -射线照射生育 10 只鼠作为正常对照(雄性 5 只,雌性 5 只)。 γ -射线照射鼠和对照鼠两组在相同条件下喂养 12 周用于实验。

1.2 方法

1.2.1 皮质发育障碍模型的制作 参照 Babb 等^[3]的方法并做部分改动。把孕 15d Wistar 大鼠放入长 20cm、宽 12.5cm、高 10cm 的纸盒中,再将纸盒放入⁶⁰Co 治疗机接受 γ -射线照射,照射剂量 2.0Gy,时间 210s。照射后将孕鼠放回笼中正常喂养待其分娩。幼鼠出生后 21d 断奶,常规饲养至 12 周。观察 γ -射线照射组和对照组大鼠的意识状态(清醒、嗜睡、昏睡、昏迷),生活能力(运动、摄食、饮水、生育),行为表现(抽搐发

作、是否活动增多及兴奋躁动、攻击行为等),详细连续观察(时间 15:00~23:59),共 8 周。用 5 根电极,左右两侧颅内额叶皮质下及海马各 1 根,鼻根额窦处插入 1 根为参考电极,在二道生理记录仪上描记脑电活动,1%戊巴比妥(45mg/kg)麻醉下采集脑电图,每只累计描记时间不得少于 12h,每次连续描记时间不少于 30min,白天(16:00~18:00)和晚间(19:00~21:00)均记录。 γ -射线照射组和对照鼠均在同一时段记录。

1.2.2 脑组织石蜡切片和尼氏(Nissl stain)染色 先用生理盐水再用 4%多聚甲醛经左心室灌注,使脑标本固定,取出大脑组织,称重后以 4%多聚甲醛再次固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。脑切片厚 5 μ m。切片放入 0.25%硫堇(thionin)染液浸染 10min(硫堇染色显示尼氏体),再用 95%乙醇分色后,常规封片。在显微镜下观察皮质和海马的结构。

1.2.3 GABA 免疫阳性细胞的半定量分析 脑组织石蜡切片采用免疫组织化学染色 ABC 方法,显示 GABA 免疫反应阳性细胞。显色封片后,显微镜下观察,并在 200 倍光学显微镜下记录 GABA 阳性细胞数。每只动物使用 2 张海马区免疫组化切片,由作者和另外两名经过专业培训的技术人员观察并记 GABA 阳性细胞数;所有切片均由第三者进行编号,以避免观察评分者主观上的影响。将 2 张切片一定视野内的阳性细胞数进行平均,取其平均值作为该只动物的 GABA 免疫阳性细胞数。

1.2.4 统计学方法 所有数据用 SPSS10.0 版本统计分析软件进行处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 行为学观察 DCDs 模型组大鼠出生时体质量较正常大

鼠轻,运动功能无障碍,有生育能力,对刺激反应较强,少部分大鼠(2/20,10%)有自发性面、耳部抽搐发作和点头样动作,无四肢抽搐。绝大多数(18/20,90%)表现活动增多、兴奋躁动、搔抓和“洗脸样动作”。对照组和母鼠无抽搐发作。

2.2 脑大体标本肉眼观察 模型鼠出生 12~16 周脑质量仅为正常对照组的 50%~60%,脑大体标本见四叠体明显露出(插页 III 图 3),小脑无变化,大脑皮质明显变薄,约为正常的 60%,部分动物可见胼胝体缺失。双侧大脑皮质和海马多个结节状物,部分地方灰白质分界不清。

2.3 脑电图 对照组和母鼠组 EEG 无异常。EEG 示 DCD 模型组 60%(12/20)额叶皮质及海马频繁棘波、尖波和棘慢波发放。

2.4 脑组织形态学变化 尼氏染色:脑组织切片经尼氏染色后呈深蓝色,可见尼氏体。模型鼠大脑可见皮层结构紊乱,结节多位于 2~3 层,海马 CA1 区团块状结构清楚可见,CA2 有中断,CA3 结构紊乱,有向锥体细胞层发芽的趋势,CA4 区结构紊乱(插页 III 图 4)。

表 1 大鼠大脑皮质 GABA 免疫阳性细胞个数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GABA 阳性细胞数
DCD 组	10	176±54
对照组	10	253±48

DCD 组与对照组相比, $P < 0.05$ 。

2.5 免疫组织化学染色结果 GABA 免疫反应阳性物质位于神经细胞的胞浆,均匀深染呈棕黄色,苏木素轻度复染后细胞核呈圆形淡蓝色,有的可见核仁(插页 III 图 5、6)。健康对照组动物在大脑皮质可见 GABA 免疫阳性细胞分布广泛,GABA 阳性细胞数为(253±48)个。DCD 组动物皮质 GABA 免疫阳性细胞数为(176±54)个,显著少于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

根据脑的发育特征,弥漫性皮质发育障碍分为神经元移行障碍、皮质异常组织畸形和神经元及胶质细胞分裂引起的畸形^[4]。作者用 γ -射线照射制作皮质发育障碍动物模型,类似人类神经元异位和多微脑回畸形,经过对脑标本的大体观察和组织切片证实模型制作成功^[5]。该实验观察到模型组鼠脑质量低于对照组鼠,模型鼠有自发癫痫发作。病理可见模型鼠大脑皮质变薄,皮质层状结构紊乱,皮质下神经元呈结节状异位,海马锥体神经元呈团状分布,GABA 免疫阳性神经元表达减少。这些病理改变符合人类多微脑回畸形的病理特征,具备癫痫病组织的基本病理学改变,可以模拟人类多微脑回畸形。通过免疫组化方法观察到 GABA 免疫反应阳性细胞分布广泛。在对照组大鼠大脑皮质中 GABA 阳性细胞数为(253±48)个, γ -射线照射组大鼠皮质 GABA 阳性细胞数为(176±54)个,显著少于对照组($P < 0.05$)。其减少可能由于胎鼠脑射线损伤,使大鼠脑内 GABA 的释放和降解增多,而合成减少,同时谷氨酸(Glu)增加。

GABA 是脑内重要的抑制性神经递质,脑内约有 1/3 的突触以 GABA 为递质,海马内约有 11% 的神经元为 GABA 能神经元。多数的 GABA 能神经元属于中间神经元,但有脑区还存在 GABA 能投射神经元。这些内源性抑制性中间神经元作用于锥体神经元使之超极化,从而抑制其过度同步化或持续性发放。

脑内 GABA 主要集中在灰质,在神经元胞浆内浓度很高。GABA 无论是通过中间神经元控制,还是通过投射神经元控制;无论作用于突触前,还是作用于突触后;无论是由 GABA A 受体介导,还是由 GABA B 受体介导,都是起抑制作用,与神经元的兴奋作用抗衡,抑制性神经递质 GABA 与兴奋性神经递质 Glu 在兴奋-抑制平衡调节中起重要作用,Glu 的增加

导致兴奋突触机制增强,建立异常的、反复兴奋的兴奋性联系,从而引起神经元异常同步化过度放电^[6]。在皮质发育异常的神经细胞中,GABA 受体减少,而 Glu 受体增加导致过度兴奋毒性,一旦该平衡被打破就可能致癫痫的发生。

有研究发现,皮质发育障碍脑组织 GABA 能抑制性神经元减少,某些谷氨酸、N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体亚型增加,提示神经元抑制性降低、兴奋性增加,这在癫痫患者所形成的巨大神经网络重复性去极化中具有重要作用,可能是 DCDs 易发生癫痫的病理生理学基础^[7]。皮质网络环路的断裂^[8]、兴奋及抑制的失衡^[9-10]被认为是皮质发育不良动物模型中兴奋性增高的原因,也是 DCDs 动物模型中异位神经元兴奋性增加的基础。本研究结果提示,DCDs 致癫痫发作的重要原因是脑中 GABA 这一主要抑制性神经递质传递的显著减少。目前作者正探索建立能模拟人类各种 DCDs 类型的动物模型,借助 DCDs 动物模型进行兴奋性氨基酸检测、GABA 受体和功能研究,以及 DCDs 的神经网络和突触环路研究,从不同角度探索 DCDs 所致癫痫和难治性癫痫的发病机制。

皮质发育障碍易于发生癫痫。发育异常组织和正常组织之间,以及发育异常组织内部都有异常的突触联系,从而形成了一种异常的、兴奋性较高的神经网络,增加了癫痫发作的易感性。尽管 DCDs 在出生时已形成,但一般几年后才出现癫痫发作,故可以在一个时间窗内阻止癫痫的发生。DCDs 动物模型的成功制作有助于研究癫痫性 DCDs 的分子和细胞机制,同时基于 GABA 在致痫中的作用,推断可以通过 GABA 系统来加以控制,这可为临床上治愈 DCDs,开发并检验新型抗癫痫药(antiepileptic drugs, AEDs)提供思路。

参考文献:

- Guerrini R, Sicca F, Parmeggiani L. Epilepsy and malformations of the cerebral cortex[J]. *Epileptic Disord*, 2003, 5(Suppl 2):S9.
- Sisodiya SM. Malformations of cortical development: burdens and insights from important causes of human epilepsy[J]. *Lancet Neurol*, 2004, 3(1):29.
- Babb TL, Ying Z, Mikuni N, et al. Brain plasticity and cellular mechanisms of epileptogenesis in human and experimental cortical dysplasia[J]. *Epilepsia*, 2000, 41(S6):76.
- 晏勇. 皮质发育障碍与癫痫发作[J]. *重庆医学*, 2001, 30(5):464.
- 罗春阳, 晏勇. 胚胎期 γ -射线照射所致大鼠后代皮质发育障碍的影响[J]. *重庆医学*, 2005, 34(9):1354.
- 马勋泰, 晏勇. 谷氨酸在实验诱导皮质发育障碍大鼠脑皮质中的分布[J]. *重庆医学*, 2005, 34(4):517.
- Crino PB, Duhaime AC, Baltuch G, et al. Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia[J]. *Neurology*, 2001, 56:906.
- Rosen GD, Burnstein D, Galaburda AM. Changes in efferent and afferent connectivity in rats with induced cerebrocortical microgyria [J]. *J Comp Neurol*, 2000, 418:423.
- Zhu WJ, Roper SN. Reduced inhibition in an animal model of cortical dysplasia [J]. *J Neurosci*, 2000, 20:8925.
- Rosen GD, Jacobs KM, Prince DA. Effects of neonatal freeze lesions on expression of parvalbumin in rat neocortex [J]. *Cereb Cortex*, 1998, 8:753.