

文章编号:1673-5501(2007)05-0369-06

母体 IgG 对 N-甲基-D-天冬氨酸诱导乳鼠痉挛发作模型的作用及其对脑 FOS 蛋白的影响

曾 敏^{1,2} 张炜华¹ 王红梅¹ 姬 曼³ 邹丽萍¹

摘要 目的 探讨母体 IgG 对 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)诱导 Wistar 乳鼠痉挛发作模型抗痉挛的作用机制及其对脑内 FOS 蛋白的影响。**方法** 从母鼠取血后提取 γ 球蛋白,采用离子交换法(DEAE-52)提纯大鼠母体 IgG。将 30 只 Wistar 乳鼠随机分为 3 组:对照组($n=6$),NMDA 组($n=12$)和母体 IgG 组($n=12$)。母体 IgG 组生后第 11 天起,于 8:00 时连续给予皮下注射所提取的各自母体 IgG $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,所有注射剂量均稀释至 5 mL。对照组和 NMDA 组同时同部位注射等剂量生理盐水。NMDA 组和母体 IgG 组生后第 15 天在分别注射生理盐水和母体 IgG 1 h 后,给予腹腔注射 NMDA $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,诱发大鼠痉挛发作,制作 Wistar 乳鼠痉挛发作模型。对照组则在皮下注射生理盐水 1 h 后腹腔注射生理盐水 $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。观察比较 NMDA 组和母体 IgG 组痉挛发作情况,采用免疫组化法观察各组乳鼠脑神经细胞 FOS 蛋白阳性细胞的表达数量。**结果** ①对照组始终未出现临床症状。NMDA 组抱团样发作总次数较母体 IgG 组明显增多(336 次 vs 109 次, $P < 0.05$);NMDA 组致痫症状评分为 5.67 分,母体 IgG 组为 3.53 分,差异有统计学意义($P = 0.012$)。母体 IgG 组抱团样发作潜伏期 $\geq 40 \text{ min}$ 的比例为 80%,NMDA 组为 32%,差异有统计学意义($P = 0.022$)。②NMDA 组 FOS 蛋白阳性细胞呈弥漫性分布,其中以皮质、梨状皮质、海马和丘脑表达最多,染色深,其中皮质 I ~ V 均可见大量的 FOS 蛋白阳性细胞。母体 IgG 组 FOS 蛋白阳性细胞在以上各个脑区表达普遍减低。**结论** NMDA 组 FOS 蛋白阳性细胞呈弥漫性分布、色深,其表达是对损伤刺激的早期反应,乳鼠痉挛发作模型 FOS 蛋白表达和 NMDA 受体分布部位基本一致。皮质、丘脑和海马、梨状皮质等边缘系统可能是 NMDA 诱导痉挛发作的主要结构。母体 IgG 具有抗痉挛作用,并可脑内使 FOS 蛋白表达降低。

关键词 母体 IgG; 婴儿痉挛; 神经元; FOS 蛋白; N-甲基-D-天冬氨酸

Effects of maternal immunoglobulin G in infant rats with NMDA-induced spasms and the expressions of FOS protein in neurocytes

ZENG Min^{1,2}, ZHANG Wei-hua¹, WANG Hong-mei¹, Ji Man³, ZOU Li-ping¹ (1 Department of Neurology, Beijing Children's Hospital, The Capital University of Medical Sciences, Beijing 100045, China; 2 Pediatric Intensive Care Unit, Fu Wai Hospital, Peking Union University, Beijing 100037, China; 3 Beijing Institute for Neuroscience, The Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China)

Corresponding Author: ZOU Li-ping, E-mail: zouliping21@hotmail.com

Abstract Objective Infantile spasms is an age-dependent expression of a damaged brain. The term "infantile spasms" has been used to describe the seizure type, the epilepsy syndrome. The traditional medical treatment of West syndrome has not changed for many years. A lot of new drugs were applied to this syndrome, but the effect was uncertain. High dose Immunoglobulin G and ACTH infusion were the main medical treatment methods. In our study, we investigated the protective effect of maternal immunoglobulin G on spasm activity and FOS protein expression in infant rats with NMDA-induced spasm. The purpose of this investigation was to determine the role of maternal immunoglobulin G in infantile spasm rat model. **Methods** Three female Wistar rats and 30 their neonatal rats were used. After giving birth, 8 - 10 mL blood was drawn from the three female Wistar rats. γ Globulin was abstracted from their blood, then was purified to get rat maternal Immunoglobulin G. Thirty neonatal rats were

基金项目 北京市自然科学基金自助项目(7042024)

作者单位 1 首都医科大学附属北京儿童医院神经内科与康复中心 北京,100045; 2 中国医学科学院阜外医院小儿恢复室 北京,100037; 3 首都医科大学神经科学研究所 北京,100045

通讯作者 邹丽萍, E-mail: zouliping21@hotmail.com



randomly divided into three groups; Control Group ($n = 6$): from postnatal days 11, normal saline injection was given subcutaneously at 8AM for five consecutive days and normal saline injection was given intraperitoneally one hour after the last subcutaneous injection. NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartate) Group ($n = 12$): postnatal days 11, normal saline was also injected subcutaneously at 8AM for five consecutive days and NMDA ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was injected intraperitoneally at about one hour after the last saline injection; maternal immunoglobulin G Group ($n = 12$): From postnatal days 11, corresponding maternal immunoglobulin G ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was injected subcutaneously at 8AM for five consecutive days and NMDA ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) injection was given intraperitoneally at 9AM after the last subcutaneous injection. All perfused brain tissues of rats were sectioned, and the *c-fos* expression was detected by immunohistochemistry staining on the 15th day in rat pups of the infantile spasm model. In neocortex, thalamencephalon, piriform cortex, dentate gyrus and hippocampal areas CA2 and CA3, the same particular region had been selected to count FOS protein positive nuclei cells in a HP field in three groups, respectively. **Results** ①The number of the emprosthotonus onset in NMDA group(339) was much bigger than those in maternal immunoglobulin G group(109) ($P < 0.05$). The average seizure grade of maternal immunoglobulin G group (3.35) was significantly lower than that of NMDA group (5.67). The ratio of emprosthotonus onset latent period which was longer than 40 minutes in maternal Immunoglobulin G group was significantly higher than that in NMDA group. ②Few positive FOS protein cells were detected in neocortex, thalamencephalon, piriform cortex, dentate gyrus and the hippocampal areas CA2 and CA3 in control group. On the contrast, robust FOS protein positive cells were observed in the neocortex layer I - V, thala-mencephalon, piriform cortex, dentate gyrus and the hippocampal areas CA2 and CA3 in NMDA group. However, the FOS protein positive cells in maternal Immunoglobulin G group dramatically decreased at the same region of brain tissues compared to those in NMDA group ($P < 0.01$). In maternal immunoglobulin G Group, some FOS protein positive cells were detected in layer II and IV in neocortex, but few were observed in the other layers.

Conclusions Maternal immunoglobulin G could suppress behavioral spasm in infant rats with NMDA-induced spasm and reduce the expression of FOS protein. The area of FOS protein expression was consistent with the distribution of NMDA-receptor in brain. Neocortex, hippocamal, thalamencephalon, piriform cortex might play an important role in infantile spasms.

Key words Maternal immunoglobulin G; Infantile spasm; Neuron; FOS protein; *N*-methyl-*D*-aspartate

婴儿痉挛症是婴儿时期的一种恶性癫痫类型,以体轴性的屈曲或伸展痉挛发作为特征,伴有智力发育落后和 EEG 高峰失律。本病发病的高峰年龄是 4~6 个月婴儿,发病率为 1/2 000~1/3 000 活产儿。国内、外关于本病发病机制的研究很多,但迄今为止,本病的发病机制还不清楚。目前认为婴儿痉挛的病因具有多样性,任何可以影响大脑发育的因素都可导致婴儿痉挛症^[1]。一直以来,丙种球蛋白是治疗婴儿痉挛症最主要的免疫治疗方式,因此推论免疫紊乱可能是婴儿痉挛症患儿发病的诱发因素之一。多项研究表明,婴儿痉挛症患儿存在体液免疫的紊乱,而这一紊乱主要表现在免疫球蛋白水平的变化上^[2-4]。多数研究表明婴儿痉挛症患儿血清 IgG 水平较正常人群降低^[3-4],提示婴儿痉挛症患儿存在免疫缺陷。胎儿以及出生后数月婴儿体内的 IgG 主要来源于母体,而且婴儿痉挛症患儿的发病高峰恰好与婴儿体内的母体抗体消失有时间上的吻合。

国外有研究^[5]表明,*N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)诱导 Wistar 乳鼠痉挛发作模型在发病年龄、发表现、EEG 特征以及精神运动发育等均与临床婴儿痉挛发作具有相似性,是目前研究婴儿痉挛症理想的动物模型。细胞受刺激后立即表达的基因称为“即刻早期基因”(immediate early genes, IEA),包括 *c-fos*、*c-jun* 和 *Krox* 等。*c-fos* 基因在受到刺激后立即表达 mRNA,其 mRNA 半衰期很短并很快转录

为对应的 FOS 蛋白。FOS 蛋白目前常用于作癫痫研究中,有学者利用 FOS 蛋白表达的变化,具体地描绘了内嗅区-海马系统的三突触传递途径和海藻酸钠诱导大鼠癫痫发作的传播途径^[6]。Morgan 等^[7]认为 FOS 蛋白是测定惊厥通路的敏感指标。

目前国内、外尚未见大鼠母体 IgG 干预后,其痉挛发作乳鼠脑内 FOS 蛋白改变的文献报道。本实验通过观察痉挛发作大鼠的临床表现,并利用免疫组化,测定各组脑内 FOS 蛋白的含量变化,以了解母体 IgG 干预前、后乳鼠脑内海马、梨状皮质以及丘脑等各脑区兴奋性的变化,以明确痉挛发作乳鼠脑内的责任结构以及母体 IgG 干预后的影响,阐明有关婴儿痉挛的某些发病机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物准备 Wistar 大鼠(由中国军事科学院提供,均有合格证书)3 只及其所生的乳鼠 30 只,体重 15~20 g,其中雌性 16 只,雄性 14 只。乳鼠出生后第 2 天分离母鼠和乳鼠,乳鼠由另外有乳母鼠代替喂养。实验期间自由摄取水和食物。

1.2 母体 IgG 提取、纯化和鉴定 将 Wister 母鼠于产后 2 d 用 10% 乌拉坦 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉后,固定于手术台上,沿腹正中线打开腹腔,暴露腹腔静脉,10 mL 注射器刺

入,缓慢抽吸采血8~10 mL,4℃静置过夜,吸取上清留用。

γ球蛋白的提取采用硫酸铵盐析法^[8]:大鼠血清加入等量生理盐水混匀后,缓慢滴入饱和硫酸铵溶液并搅拌,使饱和硫酸铵终浓度达到50%。室温放置30 min后,4℃ 3 000 r·min⁻¹离心15 min。弃上清,沉淀中加入适量生理盐水,缓慢滴入饱和硫酸铵溶液并搅拌,使饱和硫酸铵终浓度达到40%。室温放置30 min后,4℃ 3 000 r·min⁻¹离心15 min。弃上清,沉淀中加入适量生理盐水混匀,缓慢滴入饱和硫酸铵溶液并搅拌,使饱和硫酸铵终浓度达到40%。室温放置30 min,4℃ 3 000 r·min⁻¹离心15 min。弃上清,沉淀即为γ球蛋白,加入生理盐水3~4 mL,装入透析袋,流水透析3 h,换缓冲液透析2~3 h,每天换液3~4次,4℃保存。

DEAE-52 柱层析纯化 IgG:将 DEAE-52 用 0.017 5 mmol·L⁻¹ pH 6.3 磷酸缓冲液浸泡 3 d,每天换液 3 次,备用。将预处理好的 DEAE-52 均匀倒入柱中,使之无气泡,柱体垂直于地面。使用相应磷酸缓冲液,开放上、下水口,保持液面稳定,流速为每分钟 20 滴,共 2 h 左右。沿柱壁缓慢加入提取好的球蛋白,在下水口开始收集,流速同前,每管收集 3 mL,用 20% 磺柳酸测定蛋白阳性反应,并标记管号。蛋白测定:记录每管吸光度(A)值,在蛋白曲线上计算含量并记录。浓缩和稀释:将 A>0.1 的提取液合并后,再次测定 A 值并计算最终蛋白含量,生理盐水透析 2~3 d,聚乙二醇浓缩,于 4℃ 保存备用。

母体 IgG 纯度鉴定:电泳槽内加入巴比妥缓冲液,在琼脂板孔内加入待测样品 10 μL,并在其中一孔中加入指示剂(甲苯胺蓝)5 μL,接通电源,调节电压 70~80 mV,待指示剂显示电泳完全后(约 50 min),加入稀释(1:5 或 1:10)的大鼠抗血清,4℃ 冰箱过夜,结果呈现一条白色弧形沉淀线,未见其他条带。表明提取的母体 IgG 较纯,不含有其他成分。

1.3 动物分组与处理 所提取的母体 IgG 经生理盐水最终透析,调整终浓度为 1 mg·mL⁻¹。NMDA 用生理盐水配制,浓度为 1 mg·mL⁻¹。不同窝别乳鼠 3 窝共 30 只,分别将同胞乳鼠采用抽签法随机分成 3 组,将 30 只乳鼠分别编号,抽签结果对照组为 1、3、6、15、26 和 30 号乳鼠,NMDA 组为 4、5、11、13、14、18、19、20、21、24、28 和 29 号乳鼠,母体 IgG 干预组为 2、7、8、9、10、12、16、17、22、23、25 和 27 号乳鼠。对照组(n=6):乳鼠生后第 11 天开始,每天 8:00 时皮下注射生理盐水 10 mL·kg⁻¹ 次,连续 5 d,生后第 15 天,于皮下注射生理盐水 1 h 后,腹腔注射生理盐水 15 mL·kg⁻¹;NMDA 组(n=12):乳鼠生后第 11 天开始,每天 8:00 时皮下注射生理盐水 10 mL·kg⁻¹ 1 次,连续 5 d,生后第 15 天,于皮下注射生理盐水 1 h 后,腹腔注射 NMDA 15 mg·kg⁻¹;母体 IgG 组(n=12):乳鼠生后第 11 天开始,每天 8:00 时皮下注射各自母体 IgG 10 mg·kg⁻¹ 1 次,连续 5

天,生后第 15 天,于皮下注射母体 IgG 1 h 后,腹腔注射 NMDA 15 mg·kg⁻¹。

1.4 动物症状观察

1.4.1 抱团样发作次数 NMDA 腹腔注射后观察 3 h,观察各组乳鼠抱团样发作的次数,未发展至抱团样发作的按 0 次计算。

1.4.2 致痫症状评分 NMDA 腹腔注射后观察 3 h,根据 NMDA 诱导痉挛发作分级,进行相应的症状评分:0 分:无发作;1 分:安静、喘息;2 分:活动增多、易激惹、摆尾;3 分:自我撕咬或相互撕咬;4 分:抱团样发作次数<5 次;5 分:抱团样发作次数~14 次;6 分:抱团样发作次数~29 次;7 分:抱团样发作次数≥30 次;8 分:强直表现后四肢不自主舞蹈样动作;9 分:死亡。

1.4.3 NMDA 诱导抱团样发作潜伏期 抱团样发作潜伏期是指从腹腔注射 NMDA 至出现抱团样发作的时间,分别记录每组潜伏期≥40 min 的比例。

1.5 FOS 蛋白免疫组化染色(ABC 法)

1.5.1 取脑和脑组织固定、后固定以及切片 乳鼠生后第 15 天,分别于注射 NMDA 或生理盐水 3 h 后断头取脑组织。分别于 0.4% 多聚甲醛固定 2 d(4℃),再于 4% 多聚甲醛 30% 的蔗糖液中后固定浸泡 2 d 至下沉(4℃)。用冰冻切片机行连续冠状冰冻切片,厚度为 50 μm,切片至海马部刚切出时连续留片。各组取相同部位脑片进行 FOS 蛋白免疫组化染色。

1.5.2 免疫组化染色 切片于 0.01 mol·L⁻¹ PBST(0.3% Triton, pH=7.4)冲洗 3 次,每次 5 min;1 mol·L⁻¹ HCl 抗原修复 30 min,DDW 室温浸泡 3 次,共 10 min;3% H₂O₂ 消除内源性的过氧化酶活性 10 min;0.01 mol·L⁻¹ PBST 冲洗 3 次,每次 5 min;5% 羊血清室温封闭 30 min,抑制非特异性的背景出现,倾去血清;抗大鼠 c-fos 抗体(1:1000),室温孵育 48 h;PBST 漂洗 3 次,每次 5 min;二抗即生物素结合辣根过氧化物酶(1:300,0.01 mol·L⁻¹ PBST 稀释),室温孵育 3 h,放入冰箱 4℃ 过夜;PBST 漂洗 3 次,每次 5 min;三抗即辣根酶标记的链霉素卵白素(1:300,0.01 mol·L⁻¹ PBST 稀释)室温 3 h;PBST 漂洗 3 次,每次 5 min;用含 0.02% H₂O₂ 的 0.6% DAB 显色 10~30 min, PBST 冲洗后裱片,乙醇梯度脱水干燥,二甲苯透明,树脂胶封固,设立阴性对照片,以 PBST 代替一抗。

1.5.3 FOS 蛋白阳性细胞计数 每组计数 5 个标本,每个标本选择相应部位 5 张切片,通过光镜下观察(×100),应用图像分析软件,分别计数皮质、梨状皮质和海马 CA2、CA3、齿状回一个高倍视野下(×100)的阳性细胞数目,记录均值。

1.6 图像分析及统计学方法 图像分析采用 Leica 显微镜分析系统。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以百分比表示,应用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,致痫症状评分比

较采用两独立样本 *t* 检验,免疫组化 FOS 蛋白阳性细胞计数比较采用单因素方差分析,潜伏期率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 动物表现 给予 NMDA 后,NMDA 组和母体 IgG 组在数分钟后即可出现不同程度的发作,开始出现行为抑制,表现为蹲伏、闭目和喘息,对外界刺激反应减退。数分钟至 10 min 后,逐渐活动增多,并很快出现活动过度、胡乱摆尾、乱窜,伴有尖叫。随后,乳鼠开始撕咬自己的尾巴或与同伴进行相互撕咬,有些乳鼠在此阶段还伴随出现后肢的单次痉挛样动作,此后即出现典型的点头抱团样发作,表现为体轴性屈曲、头尾相对、四肢蜷于腹侧,整体酷似球状,痉挛可单次或成串出现,间期多表现为兴奋性四处走动,严重者可出现持续性痉挛发作,时间可达 30~60 min。点头抱团样发作后少部分乳鼠出现强直痉挛,四肢伸直,随后双上肢持续舞蹈样动作或死亡。其表现大致可以分为:行为抑制、兴奋多动以及抱团样发作甚至强直痉挛 3 个阶段。在上述任一阶段中,乳鼠的发作均可逐渐减轻至消失,最后完全安静。

对照组未观测到抱团样发作。NMDA 组抱团样发作的总次数为 336 次,其中 1 只未发展到抱团样发作,抱团样发作后强直痉挛死亡 2 只。母体 IgG 组总抱团样发作总次数为 109 次,无乳鼠死亡,3 只未发展到抱团样发作。NMDA 组和母体 IgG 组抱团样发作次数差异有统计学意义 ($P = 0.011$)。NMDA 致痫症状评分:母体 IgG 组症状评分较 NMDA 组显著降低 (3.53 分 vs 5.67 分, $P = 0.012$),母体 IgG 干预后 NMDA 致痫症状减轻。母体 IgG 组抱团样发作潜伏期 ≥ 40 min 的比例显著低于 NMDA 组 (32% vs 80%,

$P = 0.022$)。

2.2 FOS 蛋白免疫组化结果 各组间梨状皮质、皮质、丘脑以及海马 CA2、CA3 区 FOS 蛋白阳性细胞计数比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1 各组 FOS 阳性蛋白细胞计数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The counts of FOS protein positive cells in different groups ($\bar{x} \pm s$)

Position	Control	NMDA	Maternal IgG
CA2	7.8 ± 4.2	219.7 ± 65.2	116.1 ± 37.9 ¹⁾
CA3	9.0 ± 5.9	76.7 ± 20.0	16.1 ± 6.8 ¹⁾
Dentate gyrus	8.0 ± 4.7	380.2 ± 81.0	125.6 ± 20.7 ¹⁾
Piriform cortex	0	500.4 ± 91.6	155.7 ± 26.7 ¹⁾
Cortex	12.3 ± 5.0	125.6 ± 32.5	36.0 ± 9.7 ¹⁾
Hippocampal	2.3 ± 2.0	130.0 ± 30.2	34.9 ± 10.8 ¹⁾

notes: 1) vs control, NMDA group, $P < 0.01$. count system: Leica IM50, Leica Qwin. 10X/HP. The results were expressed as all FOS protein positive cells/HP

FOS 蛋白阳性细胞在对照组表达水平很低,仅在皮质、梨状皮质和海马等处有少量表达 (图 1A)。NMDA 组 FOS 蛋白阳性细胞呈弥漫性分布,其中以皮质、梨状皮质、海马和丘脑表达最多,染色深,其中皮质 I~V 均可见大量的 FOS 蛋白阳性细胞 (图 1B);母体 IgG 组 FOS 蛋白阳性细胞在以上各个脑区表达普遍减低,染色浅 (图 1C),仅皮质 II 和 IV 可见 FOS 阳性细胞,但数量较 NMDA 组明显减少。

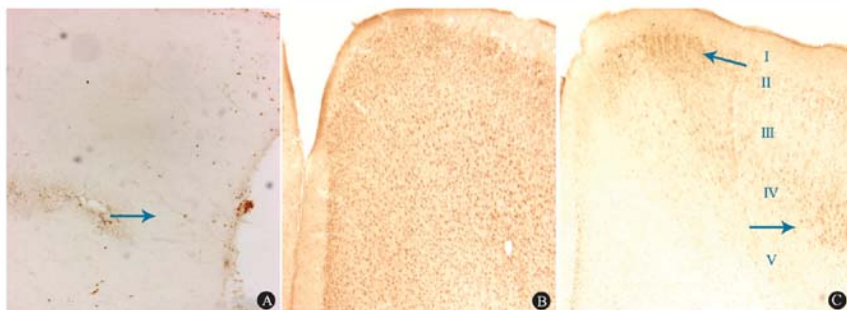


图 1 皮质 FOS 蛋白阳性细胞分布情况 (免疫组化, $\times 100$)

Fig 1 Distribution of FOS protein positive cells in cortex ($\times 100$)

notes: A (control group): only few FOS protein positive cells from layer I to layer V; B (NMDA group): a large number of FOS protein positive cells; C (Maternal IgG Group): FOS protein positive cells in layer II and IV, few in other layers

3 讨论

3.1 母体 IgG 对 NMDA 诱导乳鼠痉挛发作的行为学保护

作用 本实验给予乳鼠痉挛发作模型以母体 IgG 10 mg · kg⁻¹ 连续 5 d 皮下注射预处理后, NMDA 组和母体 IgG 组抱

团样发作次数差异有统计学意义,母体 IgG 组发作的潜伏期普遍延长,病死率下降。结果提示,母体 IgG 皮下注射可减轻 NMDA 诱导的鼠脑痉挛发作。这一结果证实了母体 IgG 具有抗痉挛作用,同期进行的研究发现,注射 IgG 组鼠脑内 ACTH 表达较注射生理盐水组明显增加。而 ACTH 是目前治疗婴儿痉挛的有效药物,说明母体 IgG 可能是通过上调 ACTH 表达而发挥作用^[9,10],而使用同样剂量的非母体大鼠 IgG 不能发挥上述的作用^[10]。大量动物实验及临床试验均已证实,IVIG 对包括婴儿痉挛的多种难治性癫痫有一定疗效,但其使用的剂量是 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,而母体 IgG 的剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,两者相差 40 倍。提示,母体 IgG 对 NMDA 诱导鼠脑痉挛发作的行为学保护作用可能具有特异性。

3.2 FOS 蛋白在 NMDA 诱导鼠脑痉挛发作模型的定位表达

由于婴儿痉挛都具有相同的临床表现和 EEG 高峰失律。由此推论不同病因引起的婴儿痉挛都具有相同的最终病理生理通路^[11]。经典的发病机制假说是痫性放电起源于脑干,冲动投射在皮质产生高峰失律,传递至脊髓则产生痉挛发作。而脑干功能异常也可通过弥散的皮质投射系统来影响大脑半球。随着神经影像学的发展,特别是 MRI 技术的成熟,目前已能很好地定位皮质的局灶性损害病灶,有学者提出皮质的病灶可引发亚皮质放电,基底节区和皮质很可能是婴儿痉挛的起源部位^[12]。

本研究中,NMDA 诱导的痉挛发作鼠脑 FOS 蛋白表达的主要部位在皮质、海马、梨状皮质和丘脑等区域,特别是海马齿状回等部位可见大量的 FOS 蛋白阳性细胞。以往的大量研究认为,NMDA 受体主要分布在海马、新皮质、膝状体、梨状皮质、丘脑、小脑颗粒细胞和脊髓,特别是梨状皮质、海马 CA3 和齿状回等部位。本研究结果表明,NMDA 诱导痉挛发作鼠脑 FOS 蛋白表达的主要部位与文献报道的基本一致。对大鼠躯体感觉皮质区癫痫放电的研究发现,NMDA 受体是产生和维持这种爆发性癫痫放电的活跃因素^[8]。因此我们推论,皮质、梨状皮质、丘脑和海马可能是 NMDA 诱导鼠脑痉挛发作的主要结构,NMDA 受体可能由 NMDA 诱导鼠脑痉挛发作中有重要作用。

3.3 母体 IgG 干预后痉挛发作鼠脑 FOS 蛋白表达减少可能的机制

谷氨酸和天冬氨酸是谷氨酸受体的配基和激动剂,这两种兴奋性氨基酸和谷氨酸受体结合后,对癫痫的发生和传播起着重要作用^[13]。有研究发现,慢性癫痫模型的谷氨酸和天冬氨酸浓度明显升高^[14]。

国内也有学者进行了类似的研究,给予戊四氮诱导惊厥大鼠大剂量静脉注射人类丙种球蛋白(IgG)后,发现应用 IgG 治疗组海马、齿状回、梨状皮质、颞叶皮质、下丘脑和乳头体 FOS 蛋白表达较生理盐水注射组明显减弱,数量减少,IgG 治疗组惊厥表现明显减轻,证实了 IgG 具有抗惊厥作用^[15]。本研究给予母体 IgG 预处理后,除了皮质 II 和齿

状回 FOS 蛋白中度表达外,皮质和海马其余各部位 FOS 蛋白阳性细胞明显减少,染色较浅。说明母体 IgG 对 NMDA 诱导痉挛发作鼠脑 FOS 蛋白表达具有抑制作用。认为母体 IgG 可能对神经细胞特别是细胞膜上的 NMDA 受体具有保护封闭作用,抑制 NMDA 受体和其相关的配体相结合,从而进一步阻止 Ca^{2+} 内流,抑制 FOS 蛋白表达。有学者给予 4-氨基吡啶诱导的惊厥大鼠注射 MK801 和氯胺酮等 NMDA 受体拮抗剂,发现大鼠海马各部位和皮质 FOS 蛋白表达大量减少^[16]。同时 EEG 监测也发现棘波发放的潜伏期延长、发生强直痉挛的大鼠数量也减少。母体 IgG 也可能通过不同途径具有和 NMDA 受体拮抗剂相似的拮抗 NMDA 受体的作用。

本研究结果提示,母体 IgG 的作用可能是一种广谱的免疫效应,可能在细胞内、外通过抑制某些 FOS 蛋白表达信息传递的中间环节,从而减少 FOS 蛋白表达,对于 NMDA 诱导鼠脑痉挛发作具有拮抗作用。

本研究的不足之处:①由于本实验需要观察鼠脑痉挛发作的临床表现,所以未能在鼠脑痉挛发作的不同时期取脑组织,观察不同脑区 FOS 蛋白表达的先后顺序,以明确痉挛发作鼠脑内兴奋区域的先后顺序。因此本实验未测定出痉挛发作鼠脑内兴奋性传播途径。②由于母鼠取血困难,未能获得足够量的母体 IgG,以行同母体 IgG 组不同母体 IgG 注射剂量的实验,也未能行不同剂量的 IgG 注射后,鼠脑痉挛表现以及 FOS 蛋白改变的测定。今后可以从这几个方面着手,或可阐明痉挛发作鼠脑癫痫起源的部位,以及其传播的途径。

参考文献

- [1] Riikonen R. A long-term follow-up study of 214 children with the syndrome of infantile spasms. *Neuropediatrics*, 1982, 13(1): 14-23
- [2] Montelli TC, Mota NG, Peracoli MT, et al. Immunological disturbance in West and Lennox-Gastaut syndromes. *Arq Neuropsiquiatr*, 1984, 42(2): 132-139
- [3] Zou LP, Zhang MH, Zhang N, et al. Immunologic aspects of topiramate treatment in West Syndrome patients. *HK J Paediatr (new series)*, 2003, 8(1): 31-34
- [4] Montelli TC, Soares AM, Peracoli MT. Immunologic aspects of West syndrome and evidence of plasma inhibitory effects on T cell function. *Arq Neuropsiquiatr*, 2003, 61(3B): 731-737
- [5] Kabova R, Liptakova S, Slamberova R. Age-specific N-methyl-D-aspartate-induced seizures: perspective for the West syndrome model. *Epilepsia*, 1999, 40(10): 1357-1369
- [6] Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 1988, 240(4860): 1759-1764

[7] Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*, 1991, 14:421-451

[8] 林清华, 主编. 免疫学实验. 武汉: 武汉大学出版社, 1999. 53-56

[9] Zhang WH(张炜华), Zou LP, Zeng M, et al. The effect of maternal immunoglobulin on the infantile spasms rat model and on the ACTH expression in brain. *J Appl Clin Pediatr(实用儿科临床杂志)*, 2006, 21(7): 426-427

[10] Zou LP, Zhang WH, Wang HM, et al. Maternal IgG suppresses NMDA-induced spasms in infant rats and inhibits NMDA-mediated neurotoxicity in hippocampal neurons. *J Neuroimmunol*, 2006, 181(1-2): 106-111

[11] Sheng M, McFadden G, Greenberg M, et al. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron*, 1990, 4(4): 571-582

[12] Labiner DM, Butler LS, Cao Z, et al. Induction of c-fos mRNA by kindling seizures: complex relationship mediate neuronal burst firing. *J Neurosci*, 1993, 13(2): 744-751

[13] Morgan JI, Hen DR, Hmstead JI, et al. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 1987, 237(4811): 192-197

[14] Dragnow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Meth*, 1989, 29(3): 261-265

[15] Hu J(胡晶), Zhou ZS, Liu PC, et al. Effects of immunoglobulin on convulsion rats and on c-fos expressions in neurocytes. *Chin J Pediatr(中华儿科杂志)*, 2000, 38(6): 358-360

[16] Szakacs R, Weiczner R, Mihaly A, et al. Non-competitive NMDA receptor antagonists moderate seizure-induced c-fos expression in the rat cerebral cortex. *Brain Res Bull*, 2003, 59(6): 485-489

(收稿日期: 2007-05-12 修回日期: 2007-07-28)

(本文编辑: 丁俊杰)

《中国循证儿科杂志》主要栏目及其特点

述评: 简述某一临床或科研热点问题的国内、外最新研究进展, 高度精练又不失全面; 前瞻性和指导性指出研究方向。述评的选题尽可能具体, 有较强的针对性, 字数1 800字左右, 附重要参考文献5条以内。主要是为从事儿科临床和基础研究工作者提供研究方向。

专家对话: 是由2~3位国内、外专家共同参与的谈话式栏目。选题方向为最新基础或临床研究问题, 也可以是有争议的基础或临床问题。选题要有深度, 由于是谈话式栏目, 对话的内容可具体而深入, 主要是为从事儿科基础和临床研究工作者提供研究思路。

论著: 本刊论著文章特别强调如下6点: ①要重视研究背景的撰写(字数800~1 000); ②资料和方法的描述要完整和详细; ③文内的图或表以中、英文表达, 图或表中的内容用英文表达; ④以近5年的参考文献为主, 参考文献的数量30条左右; ⑤英文摘要600~800个实词; ⑥应在讨论中指出本研究的不足之处或今后的研究方向。

循证病例讨论: 应包括如下几方面内容: 一个较完整的病例、根据病例提出的问题、证据寻找的方法、采用证据的标准和对证据的评价、对采用的证据进行Meta分析(或系统综述)、结论等几个方面。

综述: 以文献资料为基础撰写的论文形式, 对某阶段、某学科的某研究领域原始文献中有价值的内容复习。可分为: 成就综述: 介绍学科的发展水平和进展; 知识综述: 阐述公认和不一定公认的某学科的新理论、新技术和新方法; 争鸣综述: 介绍某专业各学派的主要观点。本刊对综述的要求是尽可能的全面、详细, 字数在10 000字左右, 参考文献50~200条。

讲座: 以文献资料为基础撰写的论文形式, 内容为公认的知识或观点。本刊近几年内将重点开设循证医学和/或医学统计学的系列性讲座。

病案报告: 介绍罕见病和少见病例的病情、诊治方法和经验; 须提供检查报告, 病理或尸检图片, 影像学图片等。

《现代小儿胸心外科学》出版

由张善通、陈张根和贾兵主编的《现代小儿胸心外科学》于2007年3月由上海科学技术文献出版社出版发行。

本书以复旦大学附属儿科医院30年来累积的经验和手术病例为基础, 并邀请我国内地和香港地区专家参加编写, 系统地介绍儿童胸心外科疾病的最新诊治方法和技术, 包括麻醉、体外循环和围术期处理、手术适应证、手术方法、介入治疗、内外科镶嵌治疗和术后并发症等的处理, 以及微创外伤、内镜外科和组织工程等。编写中还参考国外近年来公开发表的著作, 反映了学科的最新发展趋势。本书内容丰富全面, 图文并茂, 可供儿童胸心外科、成人胸心外科、心内科、麻醉科、体外循环、心超诊断、心内和心外科监护室医生、技师、护士以及研究生、本科生阅读。本书共57章, 约100万字。定价200元。