

急性热应激与热惊厥幼龄大鼠海马 ZnT3 mRNA 表达和代谢变化的 ¹H-MRS 波谱研究

倪宏 陈大庆 郑伟良 水泉祥

【摘要】 目的 探讨氢质子磁共振波谱分析(¹H-MRS)结合神经病理手段对急性热应激(HS)和热惊厥(FC)后脑神经元代谢和损伤的早期检测价值。 方法 采用热水浴诱导 21 d 龄大鼠 FC 模型,应用 ¹H-MRS 检测 HS 和 FC 后脑内 N-乙酰天门冬氨酸(NAA)、复合胆碱(Cho)、肌酸(Cr)和乳酸(Lac)含量的变化,原位杂交检测海马锌离子转运体 3(ZnT3) mRNA 表达。 结果 MRS 检测结果显示对照组、HS 组与 FC 组 NAA/Cr 比值分别为 1.50±0.42,1.57±0.50 和 1.61±0.37,Cho/Cr 比值分别为 0.93±0.27,1.13±0.17 和 1.28±0.31,各组间差异均无统计学意义(*P*>0.05);Lac/Cr 仅见于 FC 组,为 0.64±0.23。FC 组海马齿状回检测到 ZnT3 mRNA 表达。 结论 Lac 波峰是惊厥性神经元损伤的特征性 ¹H-MRS 变化;ZnT3 与海马苔藓纤维再生性发芽密切相关;单次短暂的 FC 发作也能使脑神经元早期发生不同于 HS 的显著的神经营活性物质表达和物质代谢的变化,对脑神经元造成一定的损伤。

【关键词】 热性惊厥; 磁共振; 波谱; 锌离子转运体 3

【中图分类号】 R742.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)03-0250-04

Hippocampal Zinc transporter 3 mRNA expression and metabolic changes defined by ¹H-MRS in weaning rats following heat stress and febrile convulsion NI Hong*, CHEN Da-qing, ZHENG Wei-liang, SHUI Quan-xiang. *Institute of Pediatrics, Children's Hospital Affiliated to Soochow University University, Suzhou 215003, China

【Abstract】 Objective To assess the value of proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS) combined with neuropathological findings in early detection of metabolic abnormalities and damages of the brain neurons following heat stress (HS) and febrile convulsion (FC). **Methods** Febrile convulsion models were established in weaning rats (21 days old) by means of hot water bath. ¹H-MRS was performed to measure the changes in N-acetylaspartate (NAA), choline (cho), lactate (Lac) and creatine (Cr) contents in the brain tissue following HS or FC, and in situ hybridization was used to detect Zinc transporter 3 (ZnT3) mRNA expression in the hippocampus. **Results** In the control group, HS group and FC group, the NAA/Cr ratio (1.5±0.42, 1.57±0.59, and 1.61±0.37, respectively) and Cho/Cr ratios showed no significant differences, but a significant increase in Lac/Cr ratio was observed in FC group. ZnT3 mRNA expression was detected in the dentate gyrus of the rats following the onset of FC. **Conclusions** As Lac increase is a putative marker of seizure-induced neuronal damage, and ZnT3 is associated with mossy fiber sprouting in the hippocampus, our results suggest that even a single temporary FC may result in marked changes in neuronal metabolism and cause subtle brain injury.

【Key words】 Febrile seizures; Nuclear magnetic resonance; Spectroscopy; Zinc transporter 3

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.03.011

基金项目:国家自然科学基金(30470555,30870808);江苏省自然科学基金青年科技创新人才技术带头人项目(BK2007509)

作者单位:215003 苏州,苏州大学附属儿童医院儿科医学研究所(倪宏);325800 浙江省温州市苍南县人民医院儿科(陈大庆);310003 杭州,浙江大学附属邵逸夫医院放射科(郑伟良);310003 杭州,浙江大学附属儿童医院神经内科(水泉祥)

热性惊厥(febrile convulsion,FC)是一种发育期特殊类型的癫痫综合征,发病率居小儿时期惊厥性神经系统疾病之首。在全部小儿人口中约 5%~6%发生过 FC。由于长程 FC(大于 10~15 min)可能发展为海马硬化(medial temporal sclerosis,MTS)和成年颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy, TLE),因此有关发育期 FC 史与脑损伤以及成年期 MTS 和 TLE 的研究

一直是小儿神经科学领域的热点课题^[1-3]。利用 FC 动物模型的实验研究表明,FC 可造成发育期脑急性和远期的不良影响,包括行为的改变、认知能力的损害以及海马神经元嗜银样变性(发芽)等^[4,5]。然而如何判断 FC 后脑内易感神经元早期轻微损伤目前尚不清楚。为此,本研究采用热应激(HS)致发育期大鼠惊厥模型,通过磁共振波谱分析(MRS)手段观察 HS 和 FC 对脑内神经细胞代谢和损伤的影响,并采用原位杂交技术对海马苔藓纤维发芽标记物锌离子转运体 3(ZnT3) mRNA 在海马的定位表达进行分析。我们假设 HS 和 FS 能够影响脑内神经元代谢和 ZnT3 表达,力图通过上述方法,探讨 FC 对易感神经元早期轻微损伤的影响,最终达到为临床合理干预提供依据。

材料与方法

一、FC 动物模型的建立

参照杨志仙等^[6]的方法建立模型。45℃热水浴,水深以大鼠沿玻璃水槽(30 cm×30 cm×50 cm)壁站立时仅露出头部为准。大鼠放入水中后即开始沿玻璃水槽壁绕游数秒,随即双后肢撑地,双前肢置于水槽侧壁保持直立姿势使头部露出水面数秒,然后再次壁绕游泳,两种行为交替进行,直到 4 min 后被取出水面或者出现惊厥的症状。惊厥的前兆通常为身体向槽底下沉现象。大鼠惊厥判断标准为:0 级,无惊厥;1 级,面部抽动;2 级,点头;3 级,前肢阵挛抽搐;4 级,全身强直;5 级,全身强直阵挛。5 级惊厥发作最初多表现为点头和前肢阵挛,紧接着出现后肢阵挛,并迅速发展为全身强直阵挛发作,之后阵挛逐渐减弱,侧卧伴呼吸增快,偶出现面部或躯体颤动,最后意识恢复,能够直立,惊厥终止^[7]。记录大鼠体质量、入水前和出水时的肛温、惊厥等级和潜伏期。

二、实验动物分组与实验试剂、器材

21 d 龄雄性 SD 大鼠 22 只,体质量 52~58 g,由浙江大学医学实验动物中心提供,按照随机数字表法分为对照组(5 只,不做任何处理)和 FC 处理组(17 只)。17 只 FC 处理大鼠中 9 只达到 5 级(为 FC 组),7 只未出现惊厥(为 HS 组),1 只达到 2 级惊厥,弃用。各组大鼠处理后 1 h,100 g/L 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.4 mL/100 g),作 MRS 检测,随后立即断头取脑,行原位杂交检测。

ZnT3 原位杂交试剂盒由天津 TBD 公司提供。磁共振仪器:美国 GE1.5 T Signa MR 扫描仪。

三、扫描方法和参数

实验大鼠经全麻后头颅放在 C3 线圈的中心部

位并将头部固定以防轻微运动影响图像质量。首先常规采用轴位(相当于标本切面)行 FSE 序列 T2 加权(T2WI)扫描观察有无信号改变。参数为:TR 2000 ms,TE 90 ms,FOV 8 cm,层厚 2~3 mm,无间距扫描,矩阵 256×256,数据采集次数 2 次。获取 6 层图像,选取显示海马、侧脑室及丘脑同时显示的层面进一步作 MRS 分析定位扫描。MRS 采集参数:采用点分辨表面线圈波谱分析法(point resolved spectroscopy,PRESS)技术,FOV 14 cm,矩阵 64×64,层厚 4 mm,单位采集容积约 80 mm³。采集后的数据传输到 ADW4.1 工作站作进一步处理和分析。

四、MRS 分析指标

由于 21 d 龄大鼠脑组织较小,同时为避免脑内水和脂质对 H⁺ 信号的干扰,每例大鼠分别选丘脑与海马、大脑皮层交界部位多点测量,取平均值,代表整个脑区包括大脑皮层、海马和丘脑的代谢变化。测量波谱中 4 个主要代谢峰:N-乙酰天门冬氨酸(NAA)化学移位 2.0 ppm、肌酸(Cr)化学移位 3.0 ppm、复合胆碱(Cho)化学移位 3.2 ppm 和乳酸(Lac)化学移位 1.33 ppm。采用两种代谢物波峰高度比值表示代谢物的含量,以 Cr 作为参照,选用 NAA/Cr、Cho/Cr 和 Lac/Cr 作为参数,再与对照组比较。

五、切片 ZnT3 mRNA 原位杂交监测

原位杂交步骤按照参考文献[8]进行。Dig 标记单核苷酸 ZnT3 mRNA,探针序列为 5'-GTGTGCTAAATACCCACCAACCACCTCCCC-3',采用 TBD 的原位杂交试剂盒。具体步骤为:石蜡切片脱蜡至水;置打孔液中室温 10 min 以改变组织细胞的通透性,使探针快速顺利的穿透细胞膜;置过氧化氢封闭液室温 20 min,以封闭内源性过氧化氢酶;滴加复合消化工作液,覆盖组织表面,室温 10 min;滴加预杂交工作液,覆盖组织表面,37℃湿盒孵育 2 h;揭去盖玻片以 0.2Xssc 室温洗三次,每次洗涤 5 min;滴加杂交工作液,覆盖组织表面,37℃湿盒孵育 4 h;揭去盖玻片以 2Xssc 37℃洗 3 次,每次洗涤 5 min,0.1 mol/L TBS 37℃洗 3~5 次,每次洗涤 5 min;滴加小鼠抗地高辛生物素标记的抗体工作液(现用现配);滴加高敏过氧化物酶链亲和素复合物工作液(现用现配);DAB 显色,光学显微镜下观察至细胞内胞浆阳性颜色与细胞外背景颜色对比度反差明显时,蒸馏水洗终止反应。细胞浆显棕黄色颗粒为阳性反应。苏木素复染,胞核为蓝色;80%乙醇→90%乙醇→无水乙醇→二甲苯脱水,每步须 3~5 min,中性树胶封片保留。

六、统计学方法

数据以均数±标准差表示,用 SAS 统计软件作正态性 W 检验和方差齐性检验,符合正态性分布和方差齐时,再采用单因素方差分析比较 3 组间 NAA/Cr、Cho/Cr 值,进一步两两比较采用 Dunnett 分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

对照组、HS 组和 FC 组大鼠体质量分别为 (54.87±1.95) g、(54.08±1.34) g、(54.82±1.92) g,3 组之间体重差异无统计学意义($F=0.436, P=0.653$)。对照组、HS 组、FC 组大鼠放入水中之前平均体温分别为 (36.70±0.15) °C、(36.60±0.14) °C、(36.70±0.19) °C,3 组之间差异无统计学意义($F=0.846, P=0.446$);放入热水浴后的平均体温分别为 (36.80±0.21) °C、(42.39±0.21) °C、(42.47±0.24) °C,3 组之间的差异有统计学意义($F=1207.500, P=0.000$),其中 HS 组、FC 组与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

MRS 检测结果显示,对照组、HS 组与 FC 组 NAA/Cr 比值、Cho/Cr 比值差异均无统计学意义($P > 0.05$)。Lac/Cr 仅见于 FC 组,为 0.64±0.23。(表 1,图 1~3)

光镜下 ZnT3 mRNA 阳性细胞表现为较背景染色深的棕褐色细胞,胞质着色。HS 组、对照组(包括阴性对照)未见 ZnT3 mRNA 阳性细胞,而 FC 组则于海马齿状回见大量 ZnT3 mRNA 阳性细胞(图 4)。

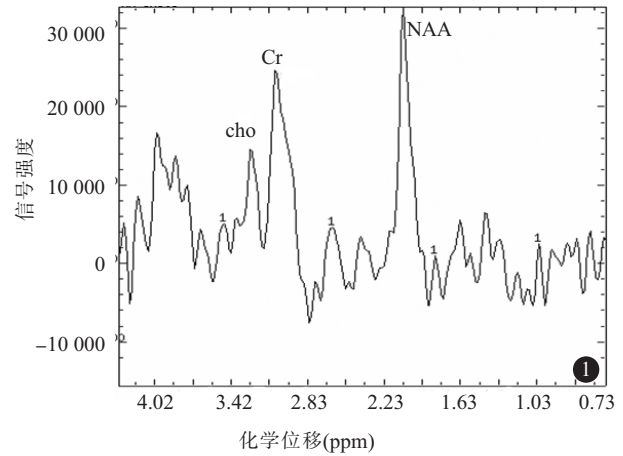
表 1 各组 MRS 波谱结果($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 MRS changes in N-acetylaspartate (NAA), choline (Cho) and lactate (Lac) ratios in the control, HS and FC groups (Mean±SD)

组别	例数	NAA/Cr	Cho/Cr	Lac/Cr
对照组	5	1.50±0.42	0.93±0.27	-
HS组	7	1.57±0.50	1.13±0.17	-
FC组	9	1.61±0.37	1.28±0.31	0.64±0.23
F值		0.106	2.893	
P值		0.899	0.081	

讨 论

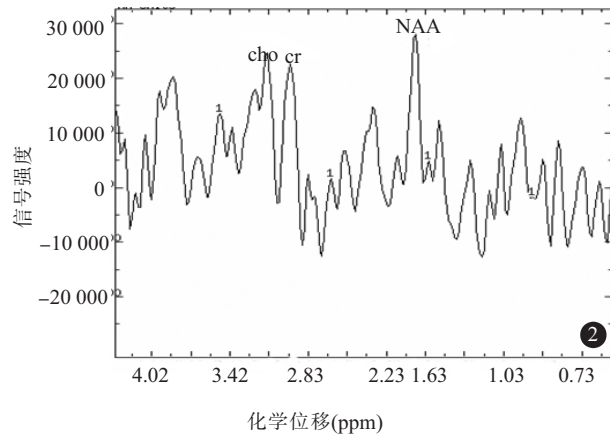
氢质子磁共振波谱分析(¹H-MRS)通过利用电学环境下原子核的共振频率发生偏移(化学移位),经过傅立叶变换后,形成按频率—信号强度分布的谱线,通过某些物质在特定的频率产生的信号强度来判断该物质的浓度,是现今唯一能进行活体组织代谢定量分析的无创手段,能够提供生物体的



NAA在 2.0 ppm 处,Cr 在 3.0 ppm 处,Cho 在 3.2 ppm 处

图 1 对照组 MRS 波谱

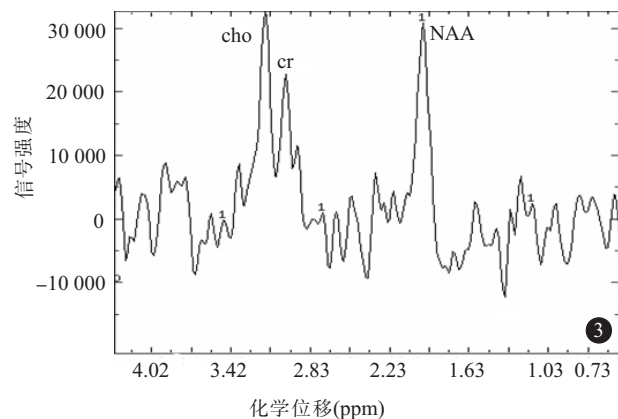
Fig.1 Brain MRS spectra of the control rats



NAA在 2.0 ppm 处,Cr 在 3.0 ppm 处,Cho 在 3.2 ppm 处

图 2 HS 组 MRS 波谱

Fig.2 Brain MRS spectra of rats in the HS group

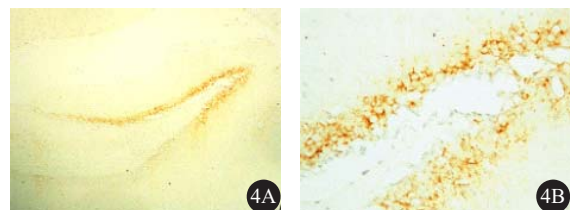


NAA在 2.0 ppm 处,Cr 在 3.0 ppm 处,Cho 在 3.2 ppm 处,并且于 1.33 ppm 处出现 Lac 波峰

图 3 FC 组 MRS 波谱

Fig.3 Brain MRS spectra of rats in the FC group

在体定位生化信息^[9-11]。国内外近年来陆续有报道采用 MRS 方法检测成年大鼠脑内生化学代谢情况,而对幼龄大鼠的 MRS 脑功能观察较少文献报道。本



4A:×100;4B:×200

图 4 原位杂交检测 FC 组海马齿状回 ZnT3 mRNA 表达 DAB 显色
Fig.4 In situ hybridization of ZnT3 mRNA in the dentate gyrus of rats following FC(DAB)

研究采用 21 d 龄大鼠,检测 HS 和 FC 对脑 MRS 参数的影响。由于幼龄大鼠脑组织体积较成年鼠小得多,获得清晰图像和波谱图十分困难。为此,我们经过反复试验,采用特殊线圈,并对系统多次调试,最终获得理想结果,为进一步开展幼龄大鼠脑功能研究作了有意义的探索。

Najm 等^[12]在海人酸(KA)诱发大鼠癫痫模型中发现,癫痫发作时和发作后 24 h 在海马区域均检测到明显的 Lac 波峰,同时 c-fos 表达增加,病理分析证明海马神经元发生丢失现象,而环己亚胺(蛋白合成抑制剂,保护 KA 引起的细胞损伤)预处理可阻断 Lac 波峰出现,抑制 c-fos 表达,但不能阻断 NAA 波峰,而此时病理染色未发现神经元损伤表现,表明原位(in situ)Lac 的显著增高是惊厥诱导的神经元损伤的标志,而 NAA 含量的变化则反应神经元的代谢情况。本研究尽管未检测到 HS 组和 FC 组 NAA/Cr 和 Cho/Cr 较对照组的显著性增高,但我们注意到 FC 组略高于 HS 组,同时 HS 组又略高于对照组的发现,提示 HS 和 FC 的早期神经元活动略有增加。更重要的是我们在 FC 组观察到明显的 Lac 波峰,而 HS 组和对照组则无。这与 Singh 等^[13]的研究相一致。Singh 等^[13]在超声波诱发大鼠脑损伤动物模型中发现,NAA/Cr 和 Cho/Cr 与对照组无显著性差异,而出现明显 Lac 波峰,提示发生了可逆性神经元损伤变性,因为已知变性降解的神经元可释放 Lac。惊厥后 Lac 明显增高的机理尚不清楚,目前一般认为惊厥后 Lac 明显增高是由于神经元过度兴奋引起神经元损伤,继而产生神经元不可逆性能量衰竭,使得细胞内、细胞之间或其它部位的内呼吸停止,Lac 产生增多而不能被及时清除从而导致 Lac 蓄积。因此,本研究提示,即使是单次 FC 发作,也能造成脑神经元早期发生不同于 HS 的显著的神活动性物质表达和物质代谢的变化,对脑神经元造成一定的损伤。

发育期惊厥能够所致海马苔藓纤维再生性发芽现象是近年来研究的热点。海马苔藓纤维即齿状回

颗粒细胞轴突。当受到强的刺激如惊厥活动时则能诱导海马 MS 再生,其中最显著的特征是再生性发芽(regenerative sprouting)现象,即 MF 轴突侧枝向齿状回内分子层和 CA3 区锥体细胞层生长。在临床难治性 TLE 患者和动物模型海马中均存在显著的病理学改变,即 MS 发芽和向门区的轴突再生现象,而且 CA3 区发芽程度与认知功能损害呈正相关。所以目前主流观点认为 MS 再生性发芽是鉴别惊厥性脑损伤的金指标^[14,15]。现已证实,Zn²⁺在突触前膜囊泡内的积聚是通过特定的转运体完成的,其中 ZnT3 被证实在此转运家族中负责 MS 通路中将 Zn²⁺转运入突触前膜囊泡内^[16-18]。本实验对 ZnT3 mRNA 阳性神经元分析表明,FC 组海马齿状回区明显表达,同时在 HS 和对照组未见明显表达,表明 FC 组海马齿状回区域存在异常增高的锌离子转运,是否单次热惊厥能够引起海马齿状回再生性发芽值得今后进一步分析。

参 考 文 献

- [1] Dubé C, Richichi C, Bender RA, et al. Temporal lobe epilepsy after experimental prolonged febrile seizures: prospective analysis [J]. Brain, 2006, 129(Pt4): 911-922.
- [2] Chang YC, Huang AM, Kuo YM, et al. Febrile seizures impair memory and cAMP response-element binding protein activation[J]. Ann Neurol, 2003, 54(6): 706-718.
- [3] Scantlebury MH, Gibbs SA, Foadjo B, et al. Febrile seizures in the predisposed brain: A new model of temporal lobe epilepsy[J]. Ann Neurol, 2005, 58(1): 41-49.
- [4] Toth Z, Yan XX, Haftoglou S, et al. Seizure-induced neuronal injury: vulnerability to febrile seizures in an immature rat model[J]. J Neurosci, 1998, 18(11): 4285-4294.
- [5] Dube C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, et al. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term[J]. Ann Neurol, 2000, 47(3): 336-344.
- [6] Yang ZX, Qin J, Du JB, et al. Febrile seizure, but not hyperthermia alone, induces the expression of heme oxygenase-1 in rat cortex[J]. Chin Med J, 2006, 119(3): 191-196.
- [7] 倪宏,姜玉武,陶陆阳,等. 新生儿反复惊厥对认知和海马 CaMKII 表达的远期影响及干预研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(1): 97-104.
- [8] Ni H, Lu ZH, Tang M, et al. A transient increase in CCK mRNA levels in hippocampus following audiogenic convulsions in audiogenic seizure-prone rats [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2000, 21(5): 385-390.
- [9] Lee SK, Kim DW, Kim KK, et al. Effect of seizure on hippocampus in mesial temporal lobe epilepsy and neocortical epilepsy: an MRS study[J]. Neuroradiol, 2005, 47(12): 916-923.
- [10] Guye M, Ranjeva JP, Le Fur Y, et al. ¹H-MRS imaging in intractable frontal lobe epilepsies characterized by depth electrode (下转 257 页)