

GM1 对惊厥持续状态幼鼠学习记忆功能及海马 CA1 区神经元的远期影响

王治静¹ 刘小红² 汪东¹

摘要 目的: 探讨 GM1 对惊厥性脑损伤幼年大鼠远期的学习记忆功能和海马 CA1 区神经元的保护作用。**方法:** 18 日龄 SD 大鼠 30 只随机分成 GM1 治疗组、惊厥持续状态(SC)模型组、正常对照组。经腹腔注射氯化锂-毛果芸香碱诱发 60min 的 SC 发作, 观察大鼠海马 CA1 区的神经元死亡和丢失情况; 利用跳台实验及 Morris 水迷宫实验评价大鼠的学习和记忆能力。**结果:** 跳台实验测试中, 与模型组比较, GM1 治疗组大鼠的第一次触电潜伏期显著延长, 而在 5min 内的触电次数及触电时间显著减少 ($P < 0.05$); Morris 水迷宫实验中, 与模型组比较, 治疗组的平均寻台潜伏期明显缩短, 而在平台区的搜索时间和穿越平台区的次数明显增多 ($P < 0.05$)。GM1 治疗组大鼠的脑组织病理变化比 SC 模型组轻, 其海马 CA1 区的神经元没有明显的死亡和丢失。**结论:** 幼年大鼠 SC 后给予大剂量 GM1 治疗, 可以有效地改善大鼠远期的学习记忆功能, 同时也可以减轻大鼠海马 CA1 区的神经元的坏死与丢失。

关键词 单唾液酸四己糖神经节苷脂; 惊厥持续状态; 学习记忆; 海马 CA1 区

中图分类号: R493, R741 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2008)-10-0919-04

The effects of monosialoganglioside (GM1) on long-term learning-memory function and neuron in hippocampal CA1 region of juvenile rats after status convulsion/WANG Zhijing, Liu Xiaohong, WANG Dong//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(10): 919-922

Abstract Objective: To investigate the effects of monosialoganglioside (GM1) on long-term learning-memory disorder and brain injury induced by status convulsion in juvenile rats. **Method:** Thirty SD juvenile rats were divided randomly into GM1 treated group, SC and normal control group. Status convulsion (over 60 minutes) was induced in juvenile rats by intraperitoneal injection with lithium-pilocarpine. The neuron cells density in hippocampus CA1 region was detected to evaluate the severity of brain injury. Step-down test was used to evaluate the short-term memory function of rats. Morris water maze test was used to evaluate the learning and long-term spatial memory function of rats. **Result:** In GM1 treated group, the latency of first shock was significantly longer than that in SC model group, however the frequency and duration of shock in 5min were significantly lower than those in SC model group ($P < 0.05$). In GM1 treated group, the mean latency to find the platform was significantly shorter and the time for searching the target quadrant was significantly longer than that in SC model group ($P < 0.05$). Histopathological examination demonstrated that in GM1 treated group brain injury significantly diminished and the cells loss in hippocampal CA1 region decreased. **Conclusion:** GM1 can significantly improve long-term learning-memory function and attenuate brain injury in juvenile rats after status convulsion.

Author's address Department of Neurology, Xian Children's Hospital, Xi'an, 710003

Key words monosialoganglioside; status convulsion; learning-memory; hippocampal CA1 region

惊厥持续状态(status convulsion, SC)为儿科常见的急危重症。如何防治惊厥性脑损伤, 成为临床研究重点。本研究采用健康幼年大鼠经腹腔注射氯化锂-毛果芸香碱(lithium-pilocarpine)诱发 SC 模型^[1]。利用 Morris 水迷宫实验和跳台实验评价大鼠的学习和记忆功能, 并检测海马 CA1 区的神经元死亡和丢失情况, 以探讨大剂量单唾液酸四己糖神经节苷脂(Monosialoganglioside, GM1)对幼鼠惊厥性脑损伤的保护作用, 为临床应用提供科学、可靠的依据。

18 日龄 SD 雄性大鼠 30 只, 由西安交通大学动物实验中心提供。随机分成 3 组: GM1 治疗组、SC 模型组、正常对照组。SC 模型采用氯化锂-毛果芸香碱(Sigma 公司)方法制作, 每只大鼠经腹腔注射氯化锂-毛果芸香碱(首先腹腔注射氯化锂 3mEq/kg 体重, 18—20h 后再注射毛果芸香碱 40mg/kg) 诱导惊厥发作; 若 30min 内无惊厥发作, 再按每次 10mg/kg 补充注射毛果芸香碱。按 Simialowski 6 级评定法^[2],

1 西安市儿童医院神经科, 西安, 710003

2 西安交通大学医学院第一附属医院儿科

作者简介: 王治静, 男, 主治医师

收稿日期: 2008-06-16

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

将大鼠惊厥发作分为 0—V 级: IV 级发作表现为头部抽搐合并前肢颤抖加后肢站立, V 级发作为惊厥致跌倒、全身强直性抽搐。IV 级和 V 级发作为全身性惊厥或大发作, 持续 60min 以上的大发作确认为本实验 SC 模型组和 GM1 治疗组。在惊厥停止后, 模型组经腹腔注射生理盐水, 治疗组腹腔注射生理盐水稀释的 GM1(齐鲁制药有限公司): 剂量为 20mg/kg 体重, 注射 1 次/d, 连续注射 7d。正常对照组不注射氯化锂-毛果芸香碱, 不诱导 SC, 腹腔注射生理盐水剂量与前两组相同。

1.2 大鼠跳台实验

在大鼠 10 周龄即 SC 后 2 月时进行, 以评价其短时程记忆功能。训练: 以铃声作为条件刺激, 非条件刺激为足底电击(电流强度为 0.7mA, 工作电压为 36V)。将大鼠放入箱内适应环境 3min, 铃响 5s 后, 电击 10s, 间歇 20s。大鼠受到电击后跳上绝缘跳台为被动回避反应; 听到铃声而未受到电击即跳上跳台者为主动回避反应。以 10 次训练为 1 训练单元, 中间休息 15min, 每日每鼠训练至学会(在绝缘跳台上停留时间超过 5min), 共训练 5d。测试: 将大鼠放在跳台上, 立即通电, 观察大鼠的行为反应。其观察指标: 以将大鼠放在跳台上到第 1 次跳下的时间为第一次触电潜伏期, 5min 内的触电次数及触电时间。

1.3 Morris 水迷宫实验

在大鼠 11 周龄时进行, 以评价其长时程空间学习和空间记忆功能。测试包括定位航行实验和空间探索实验。定位航行实验(place navigation test, PNT)分 5d 进行, 训练 4 次/d/只(每只大鼠随机从每个象限的中点面壁式入水 1 次)。图像采集系统及分析系统自动记录大鼠的寻台潜伏期、游泳速度、寻台策略(直线式、趋向式、随机式、边缘式), 按照 4 种策略寻台效率的不同, 将 4 种寻台策略分成两大类: 学习型策略(直线式和趋向式)和非学习型策略(随机式和边缘式)。如果 120s 内未找到站台, 由实验者将大鼠引上站台休息 5s, 并将其寻台潜伏期记为 120s。空间探索实验(spatial probe test, SPT)于第 5d 下午将站台撤除, 选定和站台区域相对的象限的中点为入水点, 记录大鼠在 120s 内在站台所在象限探索的时间以及穿越平台区的次数, 以此评价大鼠的长时程空间记忆功能。

1.4 脑组织病理改变

于 12 周龄时处死动物取脑标本进行病理观察。3 组大鼠经水合氯醛麻醉, 生理盐水快速经左心冲洗 2 min 后, 即予 40g/L 多聚甲醛灌注 5min, 断头取

脑, 再行后固定于灌注液 48h, 常规脱水、石蜡包埋。从视交叉处开始作冠状连续切片, 片厚 5 μ m, 取含有背侧海马最大断面的切片, 用甲苯胺蓝进行 Nissl 染色。每个脑组织取 3 张冠状切片, 用图像分析系统(Leica 图像分析系统)测算出每只动物海马区 CA1 区锥体神经元的密度, 并计算平均值。

1.5 统计学分析

数据资料采用 SPSS 10.0 软件进行处理。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 q 或 t 检验。计数资料以 % 表示, 其差异比较用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 跳台实验结果

在 5d 的训练中, 模型组、治疗组和正常对照组大鼠平均每天训练至学会所需要训练的次数分别是 (8.23 \pm 2.38) 次、(5.12 \pm 2.45) 次、(4.52 \pm 2.56) 次, 与模型组相比较, 治疗组所需要的次数明显减少 ($P < 0.05$)。测试结果提示治疗组和正常对照组大鼠的第 1 次触电潜伏期较模型组显著延长, 而在 5min 内的触电次数及触电时间方面较模型组显著减少 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 跳台实验结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	第 1 次触电潜伏期(s)	5min 内触电次数(次)	5min 内触电时间(s)
正常对照组	10	284.05 \pm 15.65	1.02 \pm 0.23	13.52 \pm 1.76
SC 模型组	10	187.34 \pm 34.63 ^①	4.67 \pm 2.25 ^①	31.43 \pm 4.38 ^①
GM1 治疗组	10	225.44 \pm 21.46 ^②	2.89 \pm 2.16 ^②	22.35 \pm 4.52 ^②
F 值		338.27	12.08	143.87
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

①与正常对照组比较 $P < 0.05$; ②与 SC 模型组比较 $P < 0.05$

2.2 Morris 水迷宫实验测试结果

2.2.1 定位航行实验: 该试验以寻台潜伏期的长短判断学习的快慢, 数值越小, 提示学习并获得某一技能的速度越快。各实验组的平均寻台潜伏期均随训练时段的增多而逐渐缩短, 正常对照组、SC 模型组、GM1 治疗组大鼠的学习型策略和非学习型策略的构成比分别为 180 次(90.0%)、149 次(74.5%)、175 次(87.5%)和 20 次(10.0%)、51 次(25.5%)、25 次(12.5%), 显示 3 组大鼠的寻台策略构成比的差异具有显著性意义 ($P < 0.05$), SC 模型组与 GM1 治疗组的寻台策略的构成比的差异同样具有显著性意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.2.2 空间探索实验: 正常对照组、SC 模型组、GM1 治疗组在 120s 内穿越平台区的平均次数分别为 (15.20 \pm 3.00) 次、(9.83 \pm 3.98) 次、(13.05 \pm 3.22) 次, 在平台区的搜索时间分别为 (54.34 \pm 7.57)s、(38.18 \pm 6.81)s、(49.17 \pm 10.88)s。无论在平台区的搜索时间, 还是穿越

表2 三组大鼠每日平均寻台潜伏期的结果

组别	例数	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
正常对照组	8	33.75±3.24	27.75±3.15	24.25±2.49	19.25±2.12	17.13±2.80
SC模型组	8	53.50±2.78 ^①	49.75±2.60 ^①	43.63±1.85 ^①	39.50±2.45 ^①	31.87±2.23 ^①
GM1治疗组	8	47.13±2.36 ^{①②}	41.25±1.91 ^{①②}	33.50±2.20 ^{①②}	28.88±2.03 ^{①②}	23.25±2.96 ^{①②}
F值		91.78	145.11	155.63	168.37	60.99
P值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

①与正常对照组比较, $P<0.05$; ②与SC模型组比较, $P<0.05$

平台区的次数, 正常对照组与GM1治疗组均多于SC模型组, 其差异有显著性意义($P<0.05$)。

2.3 脑组织病理改变

正常对照组大鼠的海马组织结构正常, 未见坏死神经元, 高倍镜下可见这些神经元细胞完整、边缘清晰, 胞浆丰富、呈蓝色, 细胞核大、透明, CA1区的神经元密度为(4821.34±732.62)个/mm³。模型组CA1区出现锥体细胞排列紊乱, 较多的锥体细胞被破坏, 细胞发生固缩, 体积明显减小, 胞质浓缩, 细胞核消失, 大量神经元缺失, 细胞间隙增大, 在死亡细胞中散在分布着正常的锥体细胞。治疗组也出现了上述病理改变, 但GM1治疗后锥体细胞存活数量增多, 损伤程度明显减轻, 海马CA1区正常神经元密度为(3795.29±931.61)个/mm³, 与模型组(2946.24±1020.99)个/mm³相比, 其差异有显著性意义($P<0.05$)。

3 讨论

惊厥持续状态是儿童时期常见的急危重症, 据流行病学资料显示: 15岁以下儿童4%—8%有过SC, 其病死率达3%—20%; 也有统计学资料表明: SC后的慢性脑病和脑萎缩发病率占6%—15%, 局灶神经症状恶化占9%—11%, 提示神经损伤与SC有关。在大鼠12周龄时观察到SC大鼠海马结构改变, 其海马CA1区的锥体细胞层出现明显的神经元凋亡性死亡和细胞丢失, 且细胞层结构紊乱, 神经元密度显著低于正常对照组($P<0.05$), 这与近年来国内外其他一些研究的结果一致^[3-5], 证实了SC发作可导致以海马区神经元死亡为主的选择性脑损伤。海马在学习和记忆中发挥重要作用, SC后海马结构遭受破坏, 会出现明显的学习记忆功能障碍^[6]。本实验中, 无论跳台实验结果, 还是Morris水迷宫实验结果, 均显示SC模型组大鼠的学习和记忆能力显著低于正常对照组的大鼠, 说明幼年期大鼠持续惊厥发作可导致大鼠远期的学习记忆功能明显的减退。临床资料也证实持续惊厥发作可产生不可逆的脑损伤, 其发作持续时间越长, 脑损伤越严重, 若处理不当或不及时, 可造成生命危险, 存活者可因脑损伤而致严重后遗症^[7]。如何防治惊厥性脑损伤, 成为

近年来临床研究的重点, 寻找安全有效的脑损伤保护药物是当务之急。

GM1是哺乳类神经节苷脂的主要种类, 它参与神经系统的发育过程, 具有广泛的神经保护作用^[8]。在正常发育过程中, GM1可能参与神经元的生长、分化和表型的表达, 以及细胞的迁移和神经生长锥的定向延伸^[9]。在病理如缺血、缺氧、惊厥等过程中常伴有脑内GM1含量的下降和神经细胞的受损, 补充一定量的GM1可防止损伤造成的神经元的凋亡, 增强突触的可塑性, 改善学习记忆^[10-11]。张强^[12]等研究发现: 癫痫鼠给予GM1干预后, 其神经细胞损伤明显减轻, 海马、额叶区神经生长因子(NGF)表达明显高于未干预组。本实验中, GM1治疗组大鼠的海马损伤程度明显减轻, 锥体细胞存活数量增多, CA1区正常神经元密度明显高于模型组($P<0.05$), 说明GM1治疗可以有效的保护大鼠海马结构的完整。跳台实验结果证明: GM1治疗组的大鼠对电击的记忆明显强于模型组, 提示SC后及时地给予GM1治疗可以有效改善大鼠的学习和记忆功能。在Morris水迷宫的定位航行实验中, GM1治疗组的动物无论在学习效率上, 还是在学习策略的选择上均优于SC模型组($P<0.05$), 说明GM1可以明显改善SC大鼠远期的空间学习能力; 在空间探索实验中, GM1治疗组的大鼠无论在平台区的搜索时间, 还是穿越平台区的次数均多于SC模型组($P<0.05$), 说明GM1可以有效地改善大鼠远期的空间记忆功能。

GM1治疗可以有效地保护SC大鼠的海马组织结构的相对完整从而改善其远期的学习记忆功能。机制可能在于: ①SC引起脑缺氧缺血, 神经元内游离Ca²⁺增高, 导致细胞内钙超载, 触发神经元产生一系列病理生理改变而导致神经元损伤^[13]。GM1能保护细胞膜Na⁺-K⁺-ATPase和Ca²⁺-ATPase活性, 阻止Ca²⁺内流, 降低自由基浓度, 抑制磷脂酶A2和磷脂酶C的活性, 防止膜脂质水解, 稳定细胞膜结构和功能^[14]; ②SC时神经元过度放电, 兴奋性氨基酸(EAA)持久释放, 导致神经元凋亡和坏死^[15]。GM1可降低EAA的神经毒性^[16], 对过度兴奋的EAA受体有抑制作用, 而不影响正常EAA的神经功能; ③GM1本身具有神经营养作用, 并可调节NGF, 与

NGF 结合或直接作用于细胞膜,使其发挥更强的作用,促进神经再生^[17]。虽然 GM1 抑制 SC 后神经细胞凋亡和坏死的机制目前尚不清楚,但本研究不仅从细胞形态学而且从行为学方面证实了 GM1 对大鼠惊厥持续状态导致的脑损伤有保护作用,为临床应用提供了科学、可靠的依据,可能对惊厥性脑损伤患者提供一种新的治疗方法。

参考文献

- [1] 胡越,蒋莉.有效控制氯化锂-毛果芸香碱诱发惊厥持续状态发作的实验研究[J].儿科药学杂志,2003,9(4):5—8.
- [2] 洪思琦,蒋莉,张晓萍,等.1,6-二磷酸果糖对惊厥持续状态后脑损伤保护作用的实验研究[J].中国小儿急救医学,2006,13(6):540—542.
- [3] 蒋莉,蔡方成,张晓萍.大鼠不同成熟期大脑对持续惊厥持续的耐受性[J].中华儿科杂志,2002,40(7):429—432.
- [4] 黄志凌,肖波,谭利明,等.姜黄素对癫痫持续状态致大鼠海马神经程序化死亡的影响[J].中国康复医学杂志,2006,21(7):590—592.
- [5] 张映琦,廖维宏,迟路湘,等.毛果芸香碱致大鼠癫痫持续状态后海马神经元凋亡的动态观察[J].第三军医大学学报,2007,29(1):71—73.
- [6] 温二生,王凤珍,胡志苹.海马与学习记忆的研究进展[J].赣南医学院学报,2006,4:651—652.
- [7] 左启华.小儿神经系统疾病[M].北京:人民卫生出版社,2005,435—443.
- [8] 张卿,左萍萍.神经节苷脂 GM1 神经保护机制的研究进展[J].中国药理学通报,2004,20(12):1329—1333.
- [9] 段建刚,项涛,陈红,等.外源性神经节苷脂对神经干细胞增殖分化的作用[J].中国康复医学杂志,2006,21(11):985—987.
- [10] Liu JR, Ding MP, Wei EQ, et al. Monosialoganglioside prevented ischemic rat hippocampal slices through stabilizing expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(6):727—732.
- [11] 刘雁勇,张卿,杨楠,等.神经节苷脂 GM1 对 D-半乳糖致衰老模型小鼠海马区神经发生的保护作用 [J]. 中国康复医学杂志,2007,22(7):589—591.
- [12] 张强,韩冰,董珠.外源性 GM1 对癫痫大鼠脑损伤的保护作用 [J]. 卒中与神经疾病杂志,2003,10(1):40—42.
- [13] Alexei P, Grazyna D, Stefan V, et al. The mechanism of neuro-protection by Topiramate in an animal model of epilepsy [J]. Epilepsia, 2004, 45(12):1478—1487.
- [14] Avrova NF, Zakharova IO, Tyurin VA, et al. Different metabolic effects of ganglioside GM1 in brain synaptosomes and phagocytic cells [J]. Neurochem Res, 2002, 27(7/8):751—759.
- [15] 刘学伍,吴伟,迟兆富.癫痫持续状态神经损伤机制的研究进展[J].临床神经病学杂志,2002,15(2):126—127.
- [16] 冯凯,孟晓梅,谢琰臣,等.神经节苷脂(GM-1)对体外培养 SH-SY5Y 细胞兴奋性氨基酸毒性损伤的作用[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2005,12(4):233—235.
- [17] 胡伟,赵聪敏,巩守平.神经生长因子和神经节苷脂对新生鼠缺氧缺血性脑损伤海马神经细胞的保护作用[J].第三军医大学学报,2006,28(4):2430—2433.

·调查研究·

广东省成人视力残疾主要致残原因和对策分析*

陈曦¹ 黄东锋^{1,5} 林爱华² 江明旭³ 刘鹏¹ 陈少贞¹ 李海⁴ 杨志明³ 龚春光³

摘要 目的:分析广东省视力残疾的主要致残原因,针对性地提出预防和治疗的建议。方法:在2006年随第二次全国残疾人抽样调查工作收集广东省视力残疾相关数据,依残疾程度、城乡区别及年龄段不同进行分组统计分析,考查其主要致残原因,并通过调研和医学分析给出预防和治疗的建议。结果:不同致残原因对于广东省视力残疾患者的残疾程度、城乡分布和年龄段发病情况有显著性差异($P < 0.01$)。广东省农村视力残疾发病率远高于城市,老年人以白内障、青光眼为主,青年人以遗传、先天和发育原因为主。其中一级视力残疾主要相关于青光眼、遗传先天和发育因素,以及角膜病和外伤。结论:为减少和减轻视力残疾需要加强农村的视力普查,加大视光明行动的扶持力度,将其由白内障扩展到青光眼、先天或遗传性眼病等严重致残的疾病。

关键词 视力; 残疾; 病因; 预防; 康复

中图分类号:R49 文献标识码:B 文章编号:1001-1242(2008)-10-0922-02

1987年第一次全国残疾人抽样调查以来,国内残疾人事业得到了前所未有的重视,政府先后颁布了《残疾人就业条例》、《中华人民共和国残疾人保护法》、《残疾人教育条例》等法案,在一些宪法和法律中也规定了有关保障残疾人合法权益的条款^[1-3]。第二次全国残疾人抽样调查是经国务院批准的重要国情调查,旨在摸清全国残疾人的分布、现状和需求等问题。经过周密的部署、培训、协调、组织、准备等过程,2005年4月,广东省抽样调查领导小组办公室全面启动各项筹备工作。2006年4月1日至5月底,开展了为期两个月的现场调查,对31050人进行了健康检查和残疾评定,获得了大量详实的数据。本课题的设计就是在已有数据的基础上,进一

步完善相关资料,进行汇总分析,重点研究广东省成人视力残疾的致残原因,从而提出切实有效的社会和医学预警机制以及治疗方案。

* 基金项目:广东省第二次全国残疾人抽样调查研究课题(20070331)

1 中山大学附属第一医院康复医学科,广州,510080

2 中山大学公共卫生学院医学统计与流行病学系

3 广东省残疾人联合会

4 深圳市松岗人民医院康复医学科

5 通讯作者

作者简介:陈曦,女,博士,主治医师

收稿日期:2008-3-17