

## 新生儿反复惊厥对认知和海马 CaMK II 表达的远期影响及干预研究\*

倪宏<sup>1)\*\*</sup> 姜玉武<sup>2)</sup> 陶陆阳<sup>1)</sup> 楼江燕<sup>1)</sup> 王浙东<sup>1)</sup> 吴希如<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>苏州大学附属儿童医院儿科医学研究所, 苏州大学衰老与神经疾病实验室, 苏州 215003;

<sup>2)</sup>北京大学第一医院儿科神经组, 北京 100034)

**摘要** 新生儿惊厥活动可造成严重的神经后遗症, 如成年期大脑对惊厥的易感和易损性提高, 严重者产生认知功能损害。对发育期惊厥性脑损伤远期预后的研究, 尤其是分子机制及其干预的研究具有重要的临床意义。探讨了新生儿大鼠单次长程或反复惊厥对学习、记忆能力和海马突触后致密物质钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 表达的远期影响及运动训练的干预作用。生后 6 天(P6) 的 SD 大鼠随机分成单次长程惊厥组(SS)、反复惊厥组(RS)和对照组, 每组 12 只。3 组大鼠分别于 P27~P31、P58~P61、P80~P82 采用 Morris 水迷宫检测学习、记忆功能。P51~P56 对 SS 组和 RS 组进行踏转轮训练。最后脑组织切片观察 CaMK II mRNA 在海马的表达。结果显示, 第一次 Morris 水迷宫测试 RS 组第 1 天~第 4 天潜伏期明显高于对照组, 具有显著性差异( $P<0.05$ ), 第二次水迷宫 RS 组第 1 天~第 2 天的逃避潜伏期较对照组仍显著延长, 具有显著性差异( $P<0.05$ ), 第三次测试各组之间差异无统计学意义。搜寻策略显示, 在第一次 Morris 测试时 RS 组第 3 天~第 4 天边缘式搜寻比例明显高于对照组, 具有显著性差异( $P<0.01$ ), 同时 RS 组第 3 天~第 4 天趋向式搜寻比例明显低于对照组, 具有显著性差异( $P<0.01$ ), 而第二次和第三次水迷宫测试 3 组间趋向式和直线式搜寻策略无明显差异。在记忆实验中, 原平台象限游泳距离与总距离的比值, RS 组第三次较对照组显著降低, 有统计学意义( $P<0.05$ ); 另外 RS 组 1~3 天趋向式搜寻比例均明显低于对照组, 有显著性差异( $P<0.05$ )。CaMK II 原位杂交显示, 各组 CaMK II mRNA 在海马均有明显表达, 但是在齿状回和门区 RS 组表达明显低于对照组, 具有统计学意义( $P<0.01$ )。研究表明, 新生儿反复长程惊厥能够对学习和记忆功能产生远期的损害, 可能与海马记忆分子 CaMK II 表达下调有关, 而单次长程惊厥对学习记忆无明显影响。早期运动训练能够明显改善反复惊厥所致的学习能力损害, 但对记忆能力效果仍较差。

**关键词** 惊厥, Morris 水迷宫, 运动训练, 钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMK II)

**学科分类号** R493, R741, R322.81

新生儿期惊厥是十分常见的临床病症。临床和基础实验均表明, 尽管未成熟大脑具有特有的抗损伤特性, 但是发育期常见的病理因素如缺氧缺血、惊厥活动, 能够通过功能活动依赖 (activity-dependent) 机制, 不可逆地改变未成熟大脑发育进程和突触构建方式, 使成年期大脑处于惊厥的易感和易损状态, 严重者产生认知功能损害<sup>[1,2]</sup>。因此, 对发育期惊厥后脑兴奋毒性损伤后引起远期预后的研究, 尤其是分子机制及其干预的研究具有重要的临床意义。

在我们的前期基础研究中发现, 生后 6 天的大鼠采用三氟乙醚吸入建立新生大鼠长程或反复惊厥模型, 于发育中不同时间点直到成年期检测行为改变, 发现惊厥阈下降, 学习记忆和活动水平受到损害, 并且与海马 NMDA 受体和 GABA 受体亚基表达异常相关<sup>[3,4]</sup>。然而由于 NMDAR 和 GABAR 亚单位

表达数量及种类繁多, 何种亚单位组成的 NMDAR 和 GABAR 亚型起主要作用尚不清楚, 并且突触定位困难, 往往不能区别 NMDAR 和 GABAR 表达的变化是发生在突触前膜还是突触后膜, 从而制约了针对受体亚单位水平的新抗痫和抗损伤药物的研发。

为此, 本研究在上述工作基础上进一步探讨新生儿反复惊厥对认知功能和突触后致密物质钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II, CaMK II) 的远期影响。新近研究表明, 运动训练、丰富环境可以改善儿童脑可塑性。我们最近开展的

\* 国家自然科学基金(30470555), 江苏省自然科学基金青年科技创新人才技术带头人(BK2007509)和江苏省高校自然科学基金(07KJB320103)资助项目。

\*\* 通讯联系人. Tel: 0512-67786601, E-mail: nhdoctor@163.com

收稿日期: 2007-06-06, 接受日期: 2007-07-02

研究表明, 泡泡浴结合水中游泳操治疗小儿脑瘫的方法对认知功能有明显的改善作用, 说明运动训练是一项有前途的康复方法. 但是目前国内外在这方面的研究还刚刚开始. 本研究采用分子生物学和行为学指标结合的方法, 有关Morris水迷宫部分选用指标全面, 不仅有逃避潜伏期, 还细致分析了搜寻策略的各个指标, 以突触后膜记忆分子CaMK II为分子标记物, 定位明确, 并且首次将运动训练手段运用到发育早期惊厥所致认知功能损伤的非药物干预策略研究中来, 以期为临床应用提供理论依据.

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验动物.** 日龄 6 天 Sprague-Dawley 大鼠 36 只, 体重 8.30~15.30 g, 清洁级, 由浙江省医学科学院实验动物中心提供. 所有大鼠在避强光、24 h 昼夜循环、避噪音、自由饮食和进水条件下饲养.

**1.1.2 主要试剂.** 三氟乙醚 (Aldrich Chem.Co.P.O. Box355) 密封避光保存; 两端标记寡核苷酸探针干粉、寡核苷酸探针稀释液、寡核苷酸探针预杂交液、复合消化液(P/E) pH6.4、生物素标记的小鼠抗地高辛、高敏过氧化物酶链亲和素复合物、DEPC、DAB Kit、蛋白酶K、Na<sub>4</sub>•EDTA、曲拉通X-100购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司.

### 1.2 行为学训练器材

**1.2.1 Morris 水迷宫:** 包括一个盛有水的圆形水池、隐藏在水面下的平台及一套图像自动采集和处理系统(摄像机、录像机、显示器和分析软件等). 水池直径 1.2 m, 高 0.5 m, 内置一高 0.3 m 的平台, 水池内加入牛奶, 使动物在行为训练时无法看见平台. 在水池边缘上等距离设 4 个标记点, 将水池等分为 4 个象限, 平台置于第 3 象限的中央, 并隐藏于水面下 1~2 cm, 水温(25±1)°C.

**1.2.2 踏转轮训练仪器.** 包括同步低频电动机、变频调速器和钢质转轮 3 部分. 转轮直径 21 cm、宽 26 cm、周长 63 cm, 可在同步低频电动机的驱动下进行转动, 转动的快慢可由变频调速器来控制. 用秒表记录转轮转动一周的时间, 根据周长计算出转轮的速度.

### 1.3 实验动物操作方法

**1.3.1 三氟乙醚致新生期大鼠惊厥模型的建立.** 取日龄 6 天 SD 大鼠, 根据随机数字表法对实验动物进行随机化区组设计, 将实验动物分为对照组

(*n*=12)、单次惊厥组(*n*=12)和反复惊厥组(*n*=12). 将惊厥组仔鼠放置于 40 cm×20 cm×20 cm 的实验舱中, 通过舱顶的注射孔滴入 0.1 ml 三氟乙醚, 封闭实验舱, 从仔鼠出现惊厥开始计时, 30 min 后取出仔鼠, 观察仔鼠 4 h. 仔鼠每天诱导惊厥 1 次, 单次惊厥组诱导 1 天, 反复惊厥组连续 6 天. 对照组仔鼠除不给予三氟乙醚外, 其他处理与惊厥组完全相同<sup>[9]</sup>.

**1.3.2 Morris 水迷宫实验.** Morris 水迷宫测定方法: 由圆形水池和自动录像及分析系统两部分组成. 水池内放入奶粉使之成为乳白色, 平台位于水下 2 cm, 将每只动物头部染黑, 于象限边 1/2 弧度处将动物头朝池壁入水, 60 s 未找到站台者, 将其引致站台. 每次训练后大鼠停留在平台 20 s, 再进行下一次训练.

Morris 水迷宫测试程序主要包括定位航行试验和空间探索试验 2 个部分. 其中定位航行试验(place navigation) 历时数天. 空间探索试验(spatial probe) 是在定位航行试验后去除平台, 然后任选一个入水点将大鼠放入水池中, 记录其在一定时间内的游泳轨迹, 考察大鼠对原平台的记忆.

观察指标: 以搜索策略为观测指标. 搜寻策略(Search strategy): 大鼠搜寻站台的策略分直线式(straight)、趋向式(taxis)、随机式(random)和边缘式(marginal). 直线式指以入水点与站台 midpoint 连线为中轴线, 大鼠沿近似于直线的运动轨迹搜寻站台; 趋向式类似于直线式, 只是偏离上述的中轴线较多; 边缘式是以大鼠运动区域的中点为圆心, 取一定半径作圆, 大鼠的大部分运动轨迹均落在圆以外, 近似于大鼠沿池内壁做环绕站台的边缘运动; 随机式指不符合以上任何一种搜寻策略的运动方式. 从搜寻站台的效率看, 直线式>趋向式>随机式>边缘式.

3 组大鼠在 P27 始行第一次 Morris 水迷宫实验, 每天 2 次, 训练大鼠寻找水下平台, 每次随机选择入水象限, 连续 5 天. 最后一天去除平台再进行一次空间探索试验<sup>[9]</sup>.

**1.3.3 踏转轮运动训练.** 在 P51~P56 时, 将单次长程惊厥组和反复惊厥组动物置于转轮中, 转轮速度为 8~9 m/min, 每天训练一次, 每次训练 30 min, 连续 6 天; 将对照组动物同样置于转轮中, 速度为 0, 即转轮不转动, 放置时间与次数同上面两组<sup>[9]</sup>.

**1.3.4 第二、三次水迷宫实验.** 在 P58~P61、

P80~P82 再进行第二、三次水迷宫学习记忆实验, 操作方法同第一次水迷宫。

**1.3.5 石蜡标本制作.** 在生后 P82 大鼠用复合麻醉剂腹腔注射(3 ml/kg) 麻醉2 h后, 经左心室插管至主动脉, 用血管钳固定, 用小剪刀剪开右心室. 先灌流生理盐水50 ml, 再用4℃ 4% 多聚甲醛灌注50 ml缓慢灌流. 然后立即断头取脑. 脑组织在4% 多聚甲醛灌注固定24 h, 20%蔗糖溶液24 h, 取海马部分组织块. 室温下进行梯度乙醇脱水: 70%乙醇120 min, 80%乙醇180 min, 95%乙醇180 min, 95%乙醇840 min(过夜), 100%乙醇60 min, 100%乙醇60 min. 二甲苯透明, 石蜡包埋. 轮转式切片机切片, 切片厚度3  $\mu\text{m}$ .

**1.3.6 切片 mRNA 原位杂交步骤.** Dig- 标记的单核苷酸 CaMK II 探针序列为 5' AACCA GCAAG ATATA CAGGA TGACG CCACA GG 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地穿透细胞膜, 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37℃ 湿盒孵育2 h, 揭去盖玻片以0.2 $\times$ SSC室温洗3次, 每次洗涤5 min, 滴加杂交工作液覆盖组织37℃ 湿盒孵育4 h; 揭去盖玻片以2 $\times$ SSC 37℃ 洗3次, 每次洗涤5 min, 0.2 $\times$ SSC 37℃ 洗3次, 每次洗涤5 min, 0.1 mol 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 $\rightarrow$ 90%乙醇 $\rightarrow$ 二甲苯脱水, 每步须3~5 min, 中性树脂封片保留。

**1.3.7 图像分析.** 采用德国产 LEICA QWin 图像处理与分析系统对本标图像进行分析, 分别于每只大鼠切片中选取呈典型反应的2张切片, 检测其海马结构及海马齿状回CaMK II mRNA阳性反应的灰度值, 另外再测其周边背景灰度值, 2值相减后的平均值为其最终灰度值。

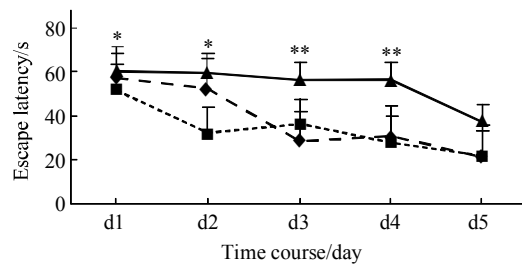
**1.3.8 统计学处理.** 数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示, 原位杂交灰度数值用SAS软件按完全随机成组设计资料进行方差分析, 多个样本均数间两两比较采用 $t$ 检验, 搜寻策略数值采用RIDIT分析.  $P < 0.05$  表示差异具

有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 第一次水迷宫 (P27~P31)

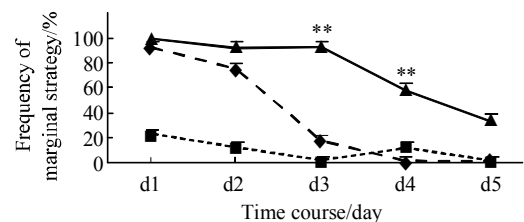
各组潜伏期均有逐渐缩短趋势, 但RS组第1天~第4天潜伏期明显高于对照组, 具有显著性差异, 说明学习能力受损比较明显. 但第5天就已接近正常水平, 说明通过学习训练, 可以有所进步(图1).



**Fig. 1 The latency for rats finding the platform in the first Morris water maze test**

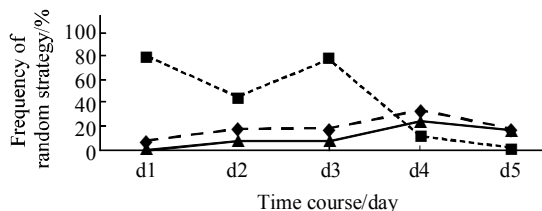
The latencies of the RS group were significantly longer than those of control and SS groups in d1~d4. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . ◆—◆: Control; ■—■: SS; ▲—▲: RS.

从5天的搜寻策略来看, 第1、2天各组以边缘式和随机式搜寻为主(尽管SS组第1、2天边缘式较RS组和对照组少, 但随机式较2组高, 3组之间边缘式和随机式总的比例并无显著性差异, 图2~3), 之后随着边缘式和随机式搜寻比例均逐渐减少, 趋向式和直线式逐渐增多, 在最后一天(d5)各组均以直线式为主(图2~5). RS组第3天~第4天边缘式搜寻比例明显高于对照组, 具有统计学意义( $P < 0.01$ , 图2), 到第5天接近正常水平; RS组第3天~第4天趋向式搜寻比例仍明显低于对照组, 具有统计学意义( $P < 0.01$ , 图4). 各组直线式搜寻比例在第1~3天有波动, 但第4~5天趋向一致, 无显著性差异(图5).



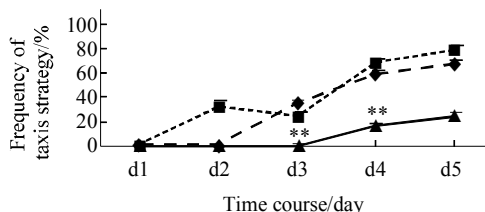
**Fig. 2 Marginal searching strategy in the first Morris water-maze test**

There was a decreasing trend of marginal strategy in three groups, but the frequency of marginal strategy was higher and the frequency of taxis strategy was lower in RS group than that in SS and control group in the third and fourth day. \*\* $P < 0.01$ . ◆—◆: Control; ■—■: SS; ▲—▲: RS.



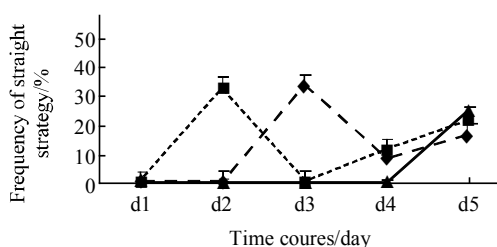
**Fig. 3 Random searching strategy in the first Morris water-maze test**

There was an increasing trend of random strategy in RS and control groups. Although the frequency of random strategy of SS group in d1 ~ d3 were higher than that of RS and control, but the total frequency of marginal plus random among three groups were not significantly different ( $P > 0.05$ ). ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.



**Fig. 4 Taxis searching strategy in the first Morris water-maze test**

There was an increasing trend of taxis strategy in three groups, but the frequency of taxis strategy was lower in RS group than that in SS and control group in the third and fourth day.  $**P < 0.01$ . ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.

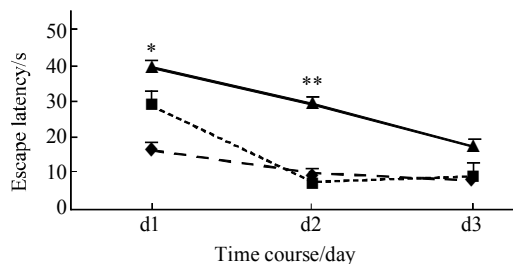


**Fig. 5 Straight searching strategy in the first Morris water-maze test**

Although there was a fluctuation of straight strategy in SS and control groups in d1 ~ d3, the straight strategy in all three groups showed an increasing tendency in d4 ~ d5. ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.

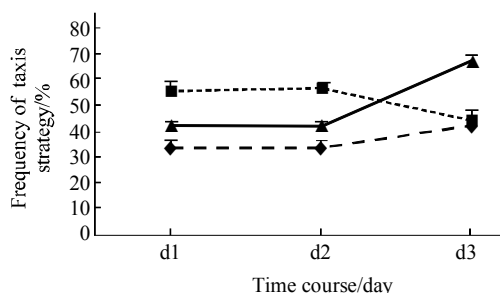
**2.2 第二次水迷宫 (P58~P61)**

本次各组潜伏期均较第一次明显缩短. 但RS组第1天~第2天潜伏期明显高于对照组, 具有显著性差异(图6). 从搜寻策略来看, 基本以趋向式和直线式2种策略为主, 3组趋向式和直线式搜寻比例无统计学意义(图7, 8).



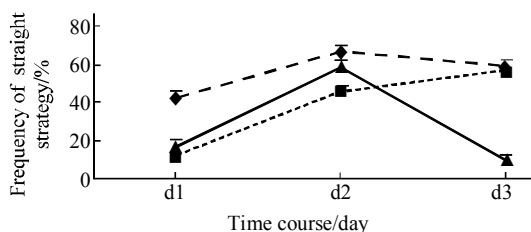
**Fig. 6 The latency for rats finding the platform in the second Morris water-maze test**

The latencies of the RS group were significantly longer than those of control and SS groups in d1 ~ d2.  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ . ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.



**Fig. 7 Taxis searching strategy in the second Morris water-maze test**

The frequency of taxis strategy among three groups in d1 ~ d3 was not significantly different. ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.

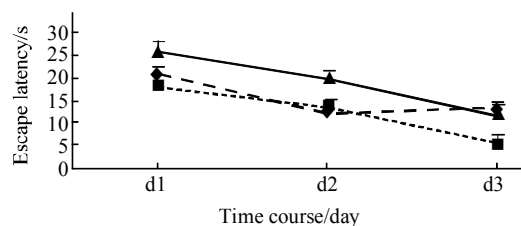


**Fig. 8 Straight searching strategy in the second Morris water-maze test**

The frequency of straight strategy among three groups in d1 ~ d3 was not significantly different. ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.

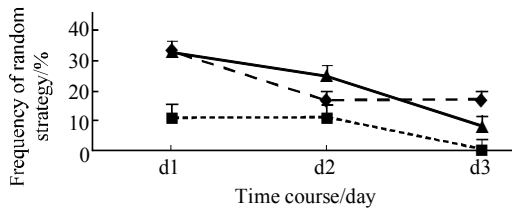
**2.3 第三次水迷宫 (P80~P82)**

3组的逃避潜伏期和搜寻策略无显著性差异, 但是从数值来看, 各组直线式搜寻比例有增多趋势(图9~12).



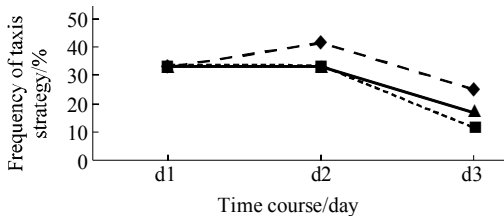
**Fig. 9 The latency for rats finding the platform in the third Morris water-maze test**

The latencies among three groups in d1 ~ d3 were not significantly different in the third maze test. ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.



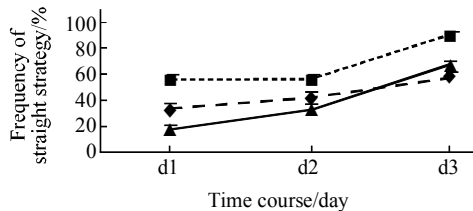
**Fig. 10 Random searching strategy in the third Morris water-maze test**

The frequency of random strategy among three groups in d1 ~ d3 was not significantly different. ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.



**Fig. 11 Taxis searching strategy in the third Morris water-maze test**

The frequency of taxis strategy among three groups in d1 ~ d3 was not significantly different. ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.



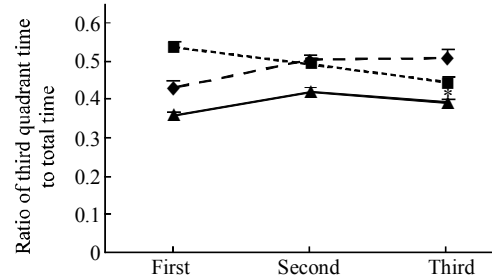
**Fig. 12 Straight searching strategy in the third Morris water-maze test**

The frequency of straight strategy among three groups in d1 ~ d3 was not significantly different. ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.

**2.4 3次记忆实验的比较**

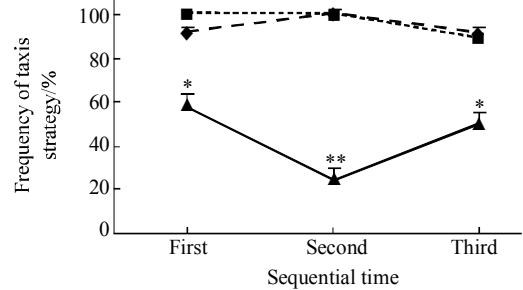
从原平台象限游泳距离与总距离的比值看, 第一和第二次迷宫实验3组之间差异无显著性, 第三次RS组明显低, 差异具有显著性(图13). 从趋向式搜寻策略来看, RS组的搜寻策略最差, 1~3天趋向式搜寻比例均明显低于对照组, 有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 14, 15).

以上说明, 通过学习干预训练, 最后RS组的学习能力好转了. 但是记忆能力还是较差, 说明对记忆干预较差.



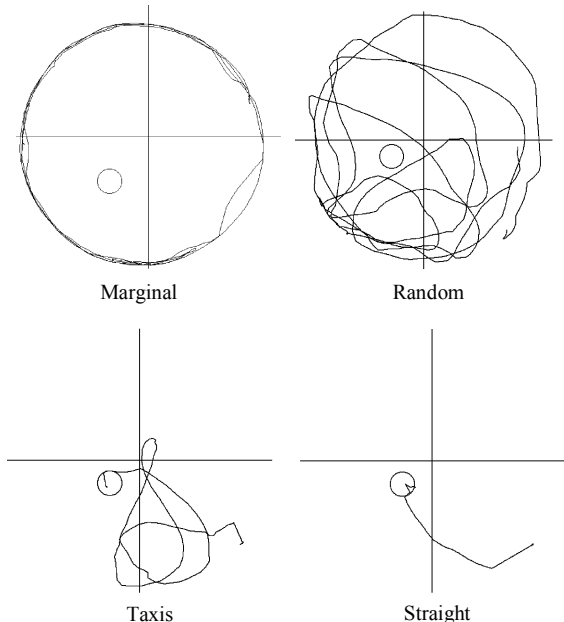
**Fig. 13 Spatial probe test**

In the three memory tests, as for the distance ratio in between the origin platform quadrant to total distance, the ratio of RS group in the third test was significantly lower than that of control.  $*P < 0.05$ . ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.



**Fig. 14 Spatial probe test**

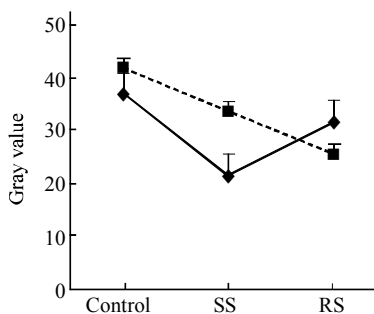
The frequency of taxis strategy was much lower in RS group than that in control and SS groups in the three memory tests.  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ . ◆◆: Control; ■■■: SS; ▲—▲: RS.



**Fig. 15 The four kinds of searching strategy**

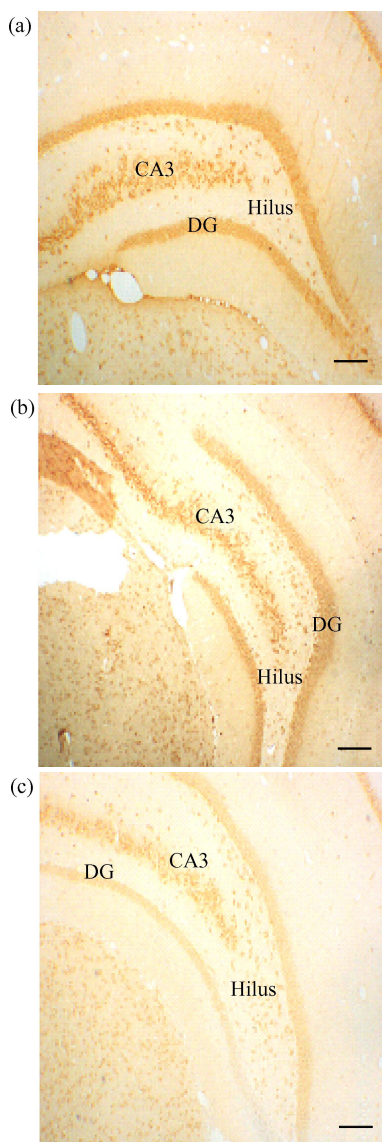
**2.5 CaMK II 原位杂交结果**

CaMK II mRNA 阳性神经元呈棕黄色, 分布于海马各区. 灰度分析显示, RS组在齿状回和门区表达明显低于对照组, 有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而在CA3未见明显差异(图16, 17).



**Fig. 16 The gray values of CaMKII mRNA in hippocampus**

The gray values of CaMK II mRNA in CA3, Hilus and dentate subfields by *in situ* hybridization showed significantly lower level of CaMK II mRNA in Hilus and dentate of RS group than that of control. \* $P < 0.05$ . ◆—◆: CA3; ■—■: Hilus+dentate.



**Fig. 17 Photomicrographs of coronal hippocampal sections**

*In situ* hybridization showing the changes of CaMK II mRNA in CA3, Hilus and dentate subfields of hippocampus. (a) Control group. (b) SS group. (c) RS group. Calibration bars: 200  $\mu$ m.

### 3 讨 论

本研究的主要发现：a. 发育期反复惊厥能造成学习和记忆功能的远期不良影响；b. 新生儿单次长程惊厥对学习和记忆功能无明显影响；c. 运动训练能明显改善反复惊厥组的学习能力，但对记忆能力影响不明显；d. 发育期反复惊厥后海马齿状回和门区记忆分子CaMK II 表达下调。

新生儿三氟乙醚吸入性惊厥具有惊厥诱发迅速明确、死亡率低等特点，是研究临床新生儿期惊厥的理想动物模型。Liu等<sup>[6]</sup>发现发育期反复三氟乙醚惊厥导致成年时学习记忆受损和惊厥阈降低。Sogawa等<sup>[7]</sup>通过生后9天内一连串三氟乙醚惊厥后的研究也发现，数周后大鼠的视觉-空间学习记忆能力受损和惊厥阈的下降。我们在国内率先开展了新生儿三氟乙醚诱发惊厥的系列基础研究，结果表明，在一系列新生儿惊厥后，成年期发生了认知缺损并且伴有脑内形态学和NABA/GABA受体基因表达的改变<sup>[3,4]</sup>。本实验的结果与以往的国内外研究相一致，但是我们增加了学习记忆的多个测量时间，对发育期惊厥造成的认知损害进行了动态观察，弥补了国内外研究的空白。本实验表明，发育期反复惊厥可造成严重的远期学习记忆损害，并且早在发育期27天(P27)就已出现了认知损害。

以往研究认为，单次长程惊厥对学习记忆无影响，这与本研究结果相一致，也进一步说明我们模型建立的成功。

干预模型较多的都是药物干预，有复方丹参、川芎嗪、鱼肝油或抗癫痫药戊巴比妥、妥泰等<sup>[8,9]</sup>，这些只针对减少惊厥的发生，保护急性期发作的脑损伤，而对发育期反复惊厥所致认知功能损害，目前仍无理想的非药物干预手段。但是近年来在成年期动物研究中发现，运动训练可以影响脑的可塑性，改善脑损伤引起的认知缺陷。江山等<sup>[10]</sup>报道行为训练能够显著增强成年大鼠海马梗死后齿状回区多聚唾液酸神经细胞粘附分子(PSANCAM)表达，增强神经干细胞的迁移能力，促进神经功能恢复。谭来勋等<sup>[11]</sup>报道，运动训练可促进脑梗死成年大鼠梗死周遍区域突触重建及功能恢复，使星形胶质细胞活性增强并促进胆固醇分泌。杜厚伟等<sup>[12]</sup>发现，运动训练可刺激脑缺血成年大鼠脑组织中IL-10生成，并促进功能康复。Arida等<sup>[13]</sup>发现，剧烈运动训练，包括主动的和被动的，都能增加癫痫大鼠的海马可塑性改变，只是这些变化只发生在癫痫的早



期阶段. Setkowicz等<sup>[14]</sup>通过大鼠踏转轮和游泳训练的研究, 发现运动训练能降低惊厥易感性. 他们的运动干预训练先于惊厥模型的制作, 转轮的转速达12~18 m/min, 持续14~20 min, 连续45天. 由于我们进行的是发育期惊厥的早期干预, 运动训练时大鼠仍处于发育期, 因而我们采取较小的转速, 以减少运动应激造成的脑损伤. 本研究踏转轮训练转速8~9 m/min, 每天持续30 min, 连续6天. 研究表明, 运动训练对发育中惊厥所产生的学习损害有一定的干预效果, 但对记忆能力的效果不明显.

为了进一步探讨运动训练对发育期惊厥所致学习记忆损害的分子机制, 我们研究了海马部分的CaMK II表达情况. CaMK II即钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II, CaMK II), 位于突触后致密斑(postsynaptic density, PSD), 为PSD的主要成分. CaMK II是脑内含量最丰富的激酶之一, 尤其在海马中表达丰富. 它占脑内总蛋白的0.5%~1.0%, 海马蛋白的2%, 在调节神经兴奋性和神经功能方面起重要作用. 海马内CaMK II与学习记忆功能关系密切, 它在神经递质的合成与释放、骨架蛋白磷酸化、突触可塑性、基因表达、脑内葡萄糖代谢等方面有着重要的生物学作用, 是神经信息传导通路中的重要因子<sup>[15~18]</sup>. 在Ca<sup>2+</sup>、CaM作用下自身磷酸化激活后能较长时间保持不依赖Ca<sup>2+</sup>的激酶活性, 在细胞内Ca<sup>2+</sup>水平恢复正常后仍自动维持磷酸化状态, 从而记住曾发生过的强直刺激及其所引起的短暂的细胞内Ca<sup>2+</sup>升高, 海马LTP产生后, CaMK II大量增加, 因而被称为记忆分子. 根据CaMK II灰度测定结果, 我们发现, 反复惊厥组海马齿状回和门区CaMK II灰度较对照组明显减低, 具有统计学意义. 结合行为学测定结果, 说明发育期反复惊厥可造成海马齿状回和门区CaMK II表达下调, 并可能与行为学的变化有关.

综上所述, 本研究表明, 新生儿反复长程惊厥能够对学习和记忆功能产生远期的损害, 可能与海马记忆分子CaMK II表达下调有关, 而单次长程惊厥对学习记忆无明显影响. 早期运动训练能够明显改善反复惊厥所致的学习能力损害, 但对记忆能力效果仍较差.

**致谢** 本研究得到苏州大学神经生物学教研室蒋星红、龚珊等老师的大力支持和帮助, 特此致谢!

### 参考文献

- Scher S. Neonatal seizures and brain damage. *Pediatr Neurol*, 2003, **29** (5): 381~390
- Scher M S, Aso K, Beggarly M E, *et al.* Electrographic seizures in preterm and full term neonates clinical correlates, associated brain lesions and risk for neurological sequelae. *Pediatrics*, 1993, **91** (1): 128~134
- Ni H, Jiang Y W, Bo T, *et al.* Long-term effects of neonatal seizures on subsequent NMDA-1 and GABA-A- $\alpha$ 1 receptor expression in hippocampus of the Wistar rat. *Neurosci Lett*, 2004, **368** (3): 254~257
- Ni H, Jiang Y W, Wu X R, *et al.* C-Fos, N-methyl-D-aspartate receptor 2C, GABA-A-1 immunoreactivity, seizure latency and neuronal injury following single or recurrent neonatal seizures in hippocampus of Wistar rat. *Neurosci Lett*, 2005, **380** (1-2): 149~154
- Xu W P, Shan L D, Gong S, *et al.* Forced running enhances neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult rats and improves learning ability. *Acta Physiologica Sin*, 2006, **58** (5): 415~420
- Liu Z, Yang Y, Silveira D C, *et al.* Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neurosci*, 1999, **92** (4): 1443~1454
- Sogawa Y, Monokoshi M, Silveira D C, *et al.* Timing of cognitive deficits following neonatal seizures: relationship to histological changes in the hippocampus. *Dev Brain Res*, 2001, **131** (1-2): 73~83
- Chen C C, Chaung H C, Chung M Y, *et al.* Menhaden fish oil improves spatial memory in rat pups following recurrent pentylenetetrazole-induced seizures. *Epilepsy & Behavior*, 2006, **8** (3): 516~521
- Lai MC, Holmes GL, Lee d KH, *et al.* Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats: The role of corticosterone. *Epilepsy Research*, 2006, **68** (2): 123~136
- 江山, 李玲, 袁华, 等. 行为学训练对大鼠海马梗死后齿状回区神经干细胞迁移能力的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, **28** (8): 510~514  
Jiang S, Li L, Yuan H, *et al.* Chinese of Journal of Physical Medicine and Rehabilitation, 2006, **28** (8): 510~514
- 谭来勋, 孙圣刚, 张双国. 运动训练诱发大鼠脑梗死周边区域神经突触变化的机制. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, **28** (7): 433~436  
Tang L X, Sun S G, Zhang S G. Chinese of Journal of Physical Medicine and Rehabilitation, 2006, **28**(8):436
- 杜厚伟, 刘楠, 陈荣华, 等. 康复训练对脑缺血大鼠神经功能恢复和脑组织中白介素10含量变化的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, **28** (3):149~152  
Du H W, Liu N, Chen R H, *et al.* Chinese of Journal of Physical Medicine and Rehabilitation, 2006, **28** (3):149~152
- Arida R M, Scorza C A, Scorza F A, *et al.* Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2007, **31** (4): 814~822
- Setkowicz Z, Mazur A. Physical training decreases susceptibility to subsequent pilocarpine-induced seizures in the rat. *Epilepsy Research*, 2006, **71** (2~3): 142~148
- Mizuno K, Giese K P. Hippocampus-dependent memory formation:

- do memory type-specific mechanisms exist?. J Pharmacol Sci, 2005, **98** (3): 191~197
- 16 Li L, Sengupta A, Haque N, *et al.* Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tauand associated neurodegenemtion. FEBS Lett, 2004, **566** (1~3): 261~269
- 17 Zhu G, Okada M, Yoshida S. Pharmacological discrimination of protein kinase associated exocytosis mechanisms between dopamine and 3,4-dihydroxyphenyla-lanine in rat striatum using in vwo microdialysis. Neurosci Lett, 2004, **363** (3): 120~124
- 18 Lin K F, Chang R C, Suen K C. Modulation of calcium / calmodulin kinase- II provides partial neuroprotection against beta-amyloid peptidetoxicity. Eur J Neurosci, 2004, **19** (8): 2047~2055

## Long-term Effects of Neonatal Seizures and Exercise on Learning, Memory and CaMK II Expression in Hippocampus\*

NI Hong<sup>1)\*\*</sup>, JIANG Yu-Wu<sup>2)</sup>, TAO Lu-Yang<sup>1)</sup>, LOU Jiang-Yan<sup>1)</sup>, WANG Zhe-Dong<sup>1)</sup>, WU Xi-Ru<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Neurology Laboratory, The Children Hospital Affiliated to Suzhou University; Laboratory of Aging and Nervous Diseases, Suzhou University, Suzhou 215003, China; <sup>2)</sup> Department of Pediatrics, First Hospital Affiliated to Peking University. Beijing 100034, China)

**Abstract** Despite the clinical and experimental concerns about the deleterious effects of neonatal seizures on brain development, the underlying mechanism of seizure-induced brain damage is still not clear. Moreover, early therapeutic intervention studies are also less available. For this reason, the study was performed to explore the long-term effects of neonatal seizures and physical exercise on learning, memory and the expression of calcium/calmodulin- dependent protein kinase II (CaMK II). Twelve neonatal rats for each group were assigned: the single- seizure group (SS), the recurrent-seizure group (RS) and the control group. The volatile agent flurothyl was used to induce 30 min seizure attack. At postnatal day 6(P6), the single seizures induced only once and recurrent seizures induced once per day for consecutive 6 days. Control rats were placed into the container for an equal amount of time to their counterpart without exposure to flurothyl. Morris water-maze test were performed at P27~P31, P58~P61 and P80~P82, meanwhile at P51~P56, the RS and SS groups were submitted to forced running exercise. *In situ* hybridization method was used to detect the expression of CaMK II mRNA in hippocampus. The results are as follows: (1) Escape latency. In the first two Morris water-maze tests, there was a decreasing trend of escape latency in three groups, and the escape latency of RS group was much longer than that of control group. After physical exercise, in the last Morris water-maze tests, the difference of escape latency in three groups is not significant. (2) Searching strategy. In the first Morris water-maze test, there was a decreasing trend of marginal strategy and an increasing trend of taxis strategy in three groups, but the frequency of marginal strategy was higher and the frequency of taxis strategy was lower in RS group than that in SS and control group in the third and fourth day ( $P < 0.01$ ). However, there were no significant differences among three groups in the second and third Morris water-maze test. (3) Memory test. In the three memory tests, as for the distance ratioin between the origin platform quadrant to total distance, the RS group was the worst. The frequency of taxis strategy was much lower in RS group than that in SS and control groups in the first to third day ( $P < 0.01$ ). (4) *In situ* hybridization detection showed that the expression of CaMK II mRNA in dentate gyrus and hilus was much lower in RS group than that in SS and control groups ( $P < 0.01$ ). It was concluded that recurrent but not single prolonged seizures could cause long-term effects on learning and memory, which may be associated with the down-regulated expression of CaMK II mRNA in hippocampus. Physical exercise improved the learning capacity of RS group but with no effect on memory capacity of RS group.

**Key words** seizure, Morris water-maze, physical exercise, CaMK II

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30470555), The Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2007509) and The Natural Science Foundation of Colleges and Universities of Jiangsu Province (07KJB320103).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-512-67786601, E-mail: nhdoctor@163.com

Received: June 6, 2007 Accepted: July 2, 2007