

幼年大鼠青霉素点燃后慢性认知功能 缺陷的分子机制研究*

倪 宏^{1)**} 姜玉武²⁾ 丁美丽¹⁾ 王浙东¹⁾ 陶陆阳¹⁾ 吴希如²⁾

(¹⁾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; ²⁾北京大学第一医院儿科神经组, 北京 100034)

摘要 在建立发育期大鼠青霉素点燃模型的基础上, 探讨点燃后至成年期不同发育阶段空间学习记忆能力改变, 以及对海马记忆分子钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II α (CaMK II α)、突触可塑性相关基因 3 (PRG-3)、抗惊厥脑肠肽胆囊收缩素 (CCK)、锌离子转运体 1 (ZnT-1) 和 3 (ZnT-3) 表达的远期影响。生后 29 天 (P29) 的 SD 大鼠随机分为青霉素点燃模型组 (RS 组, $n=39$) 及生理盐水对照组 (NS 组, $n=21$)。RS 组隔日腹腔注射青霉素, 按体重 5.60×10^6 U/kg, 连续 6 次, NS 组以同样方法腹腔注射生理盐水。于末次惊厥后 1.5、3、6 和 12 h 透射电镜观察海马凋亡及自噬, 于末次惊厥后 1 h 进行脑电记录, 于末次惊厥后 24 h 原位末端标记调亡法 (TUNNEL) 检测海马调亡细胞。分别于 P51~P56、P81~P84、P92~P95 进行 3 次 Morris 水迷宫实验, 检测大鼠的学习记忆能力。最后, 采用 Timm 染色观察海马苔藓纤维发芽, 实时定量 RT-PCR 测定海马 CaMK II α 、PRG-3、CCK、ZnT-1 和 ZnT-3 的表达。结果如下: a. 电镜显示末次惊厥后 1.5~12 h 可见大鼠海马本部神经元内溶酶体被激活, 自噬小体形成, 12 h 自噬和调亡同时存在; TUNNEL 显示调亡细胞明显增多 ($P < 0.05$)。b. RS 组末次惊厥后 3~5 min 脑电图记录显示额叶丛集放电, 棘波和尖波阵发。c. Morris 水迷宫实验显示, 第 1 次测试各组逃避潜伏期均呈逐渐下降趋势, 但 RS 组第 5 天潜伏期明显高于 NS 组, 具有显著性差异 ($P < 0.05$), RS 组第 2 次水迷宫测试中第 1 天潜伏期明显高于 NS 组, 具有统计学意义, 第 3 次水迷宫第 2 天的潜伏期仍明显高于 NS 组, 具有统计学意义。d. 在 Morris 水迷宫搜寻策略分析中采用秩和检验, 第 1 次水迷宫对照组在第 4 天和第 5 天成绩明显优于 RS 组, 具有统计学意义 ($P < 0.01$), 第 2 次和第 3 次水迷宫中对照组 3 天成绩均明显优于 RS 组, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。e. Morris 记忆实验显示: 3 次记忆测试平台象限路径与总路径之比, RS 组 3 次记忆测试均明显低于 NS 组, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。f. Timm 染色显示, RS 组海马齿状回内分子层和 CA3 区锥体细胞层可见明显异常增生苔藓纤维, 对照组未见发芽。g. 在实时定量 RT-PCR 试验中, 方差分析显示 RS 组海马 CaMK II α 和 ZnT-1 表达明显低于 NS 组 ($P < 0.05$), 聚类分析和相关分析表明, NS 组 CaMK II α 、PRG-3、CCK、ZnT-3 这 4 个基因具有共聚特征, 并且各个基因之间具有显著相关性, 而 RS 组仅海马 CaMK II α 和 ZnT-1 具有明显的共聚现象且呈正相关。本研究表明, 幼年大鼠青霉素点燃后不仅能够造成海马神经元早期损伤 (包括自噬和调亡增加), 而且产生远期的学习和记忆功能损害, 并可能与海马记忆分子 CaMK II 及 ZnT-1 表达下调有关。

关键词 青霉素点燃, 癫痫模型, 认知障碍, 分子机制, CaMK II α , ZnT, CCK, PRG-3

学科分类号 R493, R741, R322.81

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00576

发育期癫痫有 20%~40% 出现运动发育落后 (残障、脑性瘫痪), 约 33.3% 有智力障碍 (智障), 主要表现为记忆力减退、学习困难, 严重影响患儿的身心健康成长^[1,2]。深入探讨发育期严重惊厥对脑功能的远期不良影响及其分子机制是下一步合理干预的基础, 因此成为神经科学和儿科临床研究的热点。

癫痫发病机制复杂。虽然谷氨酸及 γ -氨基丁酸等神经递质及受体异常、CA3 区钙离子超载及遗传因素等被认为是主要的发病机制, 但海马突触

可塑性改变, 特别是苔藓纤维再生性发芽对认知损伤亦发挥关键作用^[3~5]。本研究以突触可塑性相关分子为研究对象, 假设该类分子参与发育期惊厥性

* 国家自然科学基金资助项目 (30470555, 30571909, 30870808, 30872666), 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) 和江苏省高校自然科学基金资助项目 (07KJB320103)。

** 通讯联系人。

Tel: 0512-67787306, E-mail: nhdoctor@163.com

收稿日期: 2008-09-18, 接受日期: 2008-11-07

认知损伤的病理生理过程, 探讨其在海马的表达特点和相互关系, 以期寻找认知损伤的关键分子提供线索.

钙 / 钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II α (CaMK II α) 特异性存在于突触前膜, 与记忆调控密切相关, 被称为记忆分子. 突触可塑性相关基因 3 (PRG-3) 是调控突触发育的关键分子之一. 抗惊厥脑肠肽胆囊收缩素 (CCK) 是脑内含量最高的神经肽. 锌离子转运体 1 (ZnT-1) 和 3 (ZnT-3) 是调节苔藓纤维锌离子转运的主要分子. 对这 5 种分子在发育期惊厥性脑认知损伤中相互关系的研究尚未有报道.

目前, 发育期惊厥动物建模主要针对兴奋性谷氨酸受体, 是模拟临床惊厥发作的模型, 尚不能完全体现癫痫自发性点燃的特点. 青霉素是经典的致痫剂, 主要针对抑制性 γ -氨基丁酸起作用, 已在成年动物中作为化学点燃药物使用. 由于发育期脑的特殊性, 即抑制性 γ -氨基丁酸受体的发育迟于兴奋性谷氨酸受体, 青霉素能否用于发育期点燃模型的制作尚无研究报道. 本研究力图通过对不同发育时间的观察, 结合电生理及病理手段, 确定青霉

素能否诱发点燃及其时间. 在此基础上, 我们将进一步揭示发育期青霉素点燃模型对认知功能和海马突触可塑性相关分子表达的远期影响.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物. 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 52 只, 日龄 21 天, 重 60~70 g, 清洁级, 浙江省医学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK2003-0001. 避强光, 12 h 昼夜循环, 避噪音, 单笼, 自由进食和饮水条件下饲养.

1.1.2 主要试剂.

注射用青霉素 G, 80 $\times$ 10⁴ U/支 (华北制药股份有限公司); 戊二醛、多聚甲醛、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、Tris、氯化钠、氢氧化钠、蔗糖、水合氯醛、戊巴比妥钠、苦味酸、二甲苯、葡萄糖、枸橼酸三钠、柠檬酸等 (中国医药集团上海化学试剂公司).

5 种基因引物探针由上海生工生物工程有限公司合成, 序列如表 1 所示.

Table 1 The information of the five oligonucleotide probes

Gene GenBank number	Species	Primer sequence	Size/bp	No. of cycles
ZnT-3 NM_001013243	Rat	F: 5' TGGGCGCTGACGCTTACT 3'	63	45
		R: 5' GTCAGCCGTGGAGTCAATAGC 3'		
		probe: 5' FAM-ACCACGTTGCCTCCGCACACCT-TAMRAM 3'		
ZnT-1 NM_022853	Rat	F: 5' CGTTGTGTGAATGCCTTGGT 3'	72	45
		R: 5' GGGTTCACACAAAAGTCGTCCTTC 3'		
		probe: 5' FAM-TTCTACTTTTCCTGGAAGGGTTGTA-TAMRAM 3'		
Camk II α NM_012920	Rat	F: 5' CGAGGGCCTGGACTTTCA 3'	66	45
		R: 5' TGCACGGGCTTGCTGTT 3'		
		probe: 5' FAM-CGATTCTATTTTGAAAACCTGTGGTCCCG-TAMRAM 3'		
Prg-3 AF541280	Rat	F: 5' TTGTTGCGGATCTGACCTAACA 3'	73	45
		R: 5' AGCGAGGGTCGCATGCT 3'		
		probe: 5' FAM-AACAATGGCAAAAAGTCATTCCCGT-TAMRAM 3'		
CCK NM_012829	Rat	F: 5' CAGCAGCCGTTGGAAACC 3'	67	45
		R: 5' GACACACGCCGCACTTCA 3'		
		probe: 5' FAM-CAGCTGACTCCGCATCCGAAGAT-TAMRAM 3'		

1.2 实验方法

1.2.1 建立青霉素诱发发育期大鼠点燃模型. 大鼠随机分为生理盐水对照组 (NS 组) 21 只及青霉素点燃模型组 (RS 组) 39 只. 大鼠 29 日龄时开始, 体重 100~110 g, 用 2 ml 生理盐水稀释 2 支青霉素 G (配成浓度 57 $\times$ 10⁴ U/ml), 39 只模型组大鼠隔日腹腔注射青霉素 5.60 $\times$ 10⁶ U/kg, 连续 6 次, 对照组按

同样方法给予相应剂量生理盐水. 各组均于注射青霉素后连续观察 2.5~6 h.

1.2.2 行为观察及分级. 观察每次大鼠腹腔注射致痫剂青霉素后癫痫发作的潜伏期、发作频率、发作强度、持续时间及发作级别. 发作分级参照 Racine 的分级标准^[9]. 0 级: 脑电图有癫痫放电但无惊厥发作; I 级: 嘴角或面部节律性抽动; II 级: 点头

或甩尾; III级: 单个肢体抽动; IV级: 多个肢体抽动; V级: 全面性强直和阵挛发作.

1.2.3 脑电图观察记录. 在最后一次腹腔注射致病剂青霉素之前用复合麻醉剂(水合氯醛 4.25%, 硫酸镁 2.12%, 戊巴比妥钠 0.9%) 3 ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 固定于脑立体定位仪上, 剪除大鼠顶部毛发, 75%的酒精消毒, 沿头顶正中中线切开头皮, 用头皮拉钩将左右侧头皮拉开, 充分暴露颅骨及前卤. 用 30%的双氧水充分擦拭颅骨表面, 腐蚀颅骨上腱膜及颅骨外膜, 清晰显示前卤及冠状缝. 取两根针灸毫针作为记录电极分别插入左右额叶, 三维坐标为: $x=1.0$ mm, $y=\pm 4.0$ mm, $z=-1.0$ mm. 用 502 胶水及牙科水泥固定电极. 以数字脑电图仪的 F1, F2 电极夹于左右耳作为参考电极, 以数字脑电图仪的 C3, C4 电极分别夹于固定好的两个记录电极(两根针灸毫针), 开始进行脑电记录, 持续记录 6 h, 期间根据大鼠反应补充麻醉剂.

1.2.4 电镜取材固定、样本制备和观察. 大鼠分为 5 个实验组, 每组 2 只: 生理盐水对照组、末次注射青霉素后 1.5、3、6 和 12 h 组. 用含 0.5%戊二醛的 4%多聚甲醛经心脏灌流固定, 灌流完毕后快速取脑, 在冰上切开鼠脑, 暴露并切取大鼠左侧海马本部 CA3 区, 切成约 1 mm³ 大小的组织块, 迅速入预冷的 4%戊二醛, 4℃ 保存. 4%戊二醛及 1%锇酸双重固定. 丙酮逐级脱水, 树脂包埋. LKB-1 型切片机做超薄切片, 厚度为 50 nm. 枸橼酸铅染色. Philips CM120 透射电镜观察大鼠海马本部 CA3 区锥体神经元的超微结构并拍摄片.

1.2.5 Tunnel 凋亡检测. NS 组和 RS 组各 5 只大鼠. 于末次惊厥后 24 h 取脑. 脑组织在 4% PFA 固定 24 h 后, 浸泡在 20%蔗糖溶液中 24 h, 取出后切取海马部分组织块, 室温下进行梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 轮转式切片机切片, 切片厚度 3 μ m. 按照文献 [7] 及 Boehringer Mannheim 公司试剂盒说明进行 Tunnel 凋亡检测, 光镜下分析结果.

1.2.6 红外摄像数控分析 Morris 水迷宫实验.

水迷宫由圆形水池(直径 120 cm, 高 50 cm)、图像采集系统(摄像头)、操作系统(微机及软件)组成. 圆形水池被通过圆心的两条假想的垂线划分为 4 个象限, 并在池壁外侧相应处标记. 在其中一个象限的正中水域内放置高 30 cm 圆形透明平台, 平台隐于水面下 1~2 cm 处, 水温保持于(25 $\pm$ 1)℃.

Morris 水迷宫实验程序: a. 定位航行实验

(place navigation test, PNT). 实验分三阶段: 第一阶段, 大鼠 51 日龄时开始, 历时 5 天, 每天下午进行两次实验, 分别以两个象限为入水点, 两次间隔时间 2 h. 图像采集系统及分析系统自动记录保存大鼠的运动轨迹, 找到平台的潜伏期(escape latency)、游泳距离及搜寻策略等信息. 系统设定 60 s 为最长潜伏期, 如果 60 s 大鼠仍找不到平台系统自动结束并将潜伏期记录为 60 s, 操作者将大鼠引至平台上休息 10 s. 2 h 后进行下一次实验. 第二和第三阶段分别从 81 日龄和 92 日龄时开始, 由于有第一阶段训练的基础, 所以在此两个阶段各历时 3 天即已达到学会标准(60 s 大鼠找到平台). b. 空间探索实验(spatial probe test, SPT). 完成定位航行实验后撤离平台, 选定与平台象限相对的象限的中点为入水点, 记录大鼠在 60 s 内平台象限游泳距离与总距离之比.

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.

将大鼠头部用染发剂染黑, 并用苦味酸进行编号. 分别于 P51~P56、P81~P84、P92~P95 进行 3 次 Morris 水迷宫实验记录大鼠找到平台的时间(searching platform latency, SPL)即逃避潜伏期(escape latency). P56、P84 和 P95 时进行记忆实验.

1.2.7 Timm 染色. 随机从两组中分别选取 4 只大鼠于第 3 次水迷宫测试后(P95)行灌注取材. 复合麻醉剂(0.3 ml/kg)麻醉, 依次快速灌注生理盐水 50 ml、0.375%硫化钠(0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制) 25 ml、4%多聚甲醛(0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制) 10 ml、0.375%硫化钠(0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制) 20 ml. 断头取脑, 将标本置于含 0.375%硫化钠的 4%多聚甲醛溶液中固定 7 日后, 于恒冷冰冻切片机中作冠状切片, 切片厚度 30 μ m. 将切片浸入孵育液中(50%阿拉伯胶 60 ml, 10 ml 枸橼酸缓冲液, 5.67%对苯二酚 30 ml, 17%硝酸银 0.5 ml)暗室染色 40~60 min, 清水冲洗 10 min, 常规梯度酒精

脱水、二甲苯透明, 中性树脂封片。

1.2.8 荧光实时定量 (real-time) RT-PCR. 于第 3 次水迷宫测试后(P95)进行, 按照 Livak 等^[8]的方法具体操作. a. 比较基因扩增效率: 选取 cDNA 样品模板进行 5 倍梯度稀释, 目的基因与 β -actin 分别进行实时定量 RT-PCR 反应, 得到荧光曲线, 通过 cDNA 浓度梯度的对数值对 ΔCT 值作图比较两基因扩增效率. b. 反应体系及条件: 反应体系均为 25 μ l, 其中 cDNA 模板 2.0 μ l、Universal PCR Master Mix(ABI 公司, 美国) 12.5 μ l、基因上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ l、探针(10 μ mol/L)0.3 μ l, 双蒸水 9.2 μ l. 在 DNA Engine Op ticon™ 2 (MJ Research 公司)中进行扩增反应. 反应条件为: 52℃ 2 min, 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 15 s, 60℃ 60 s, 重复 45 个循环。

1.3 数据处理

SAS 8.0 软件对结果进行分析. 迷宫数据、Tunnel 结果及采用 $2^{-\Delta CT}$ 法处理的 RT-PCR 数据采用 ANOVA 进行两组间显著性检验. 采用聚类分析(cluster analysis)和相关分析对 $2^{-\Delta CT}$ 法处理的 RT-PCR 数据进行类别和相关性分析. 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示. $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 行为观察

大鼠腹腔注射生理盐水后无明显反应, 大鼠腹

腔注射青霉素后, 约 1~5 min 出现尾部翘起, 随后两前肢前伸、俯卧、缄默、静止不动, 约经历 5~15 min 的潜伏期后出现呼吸急促(约 60 次/min)、节率性咀嚼或颜面部抽动, 进而出现节律性点头伴尖叫, 很快出现前肢或后肢抽动、后肢惊跳及双前肢抬起伴阵挛, 进而出现向上窜跳、四肢及全身强直, 最后跌倒伴全身抽动, 常伴小便失禁. 致病大鼠平均每隔 2~5 min 即发作一次, 每次持续时间约 30~60 s, 发作程度及频率在给药后约 0.5 h 达到高峰, 约每隔 1~2 min 发作一次, 每次持续 30~60 s. 2 h 以后发作次数逐渐减少, 4 h 后发作基本停止. 模型组 6 次腹腔注射青霉素致惊厥发作的潜伏期逐渐缩短, 发作平均级别逐渐增高. 其中 3 只大鼠在第 2 次腹腔注射青霉素后未出现任何反应便很快死亡, 推测原因可能是体质较差不能耐受. 其中 7 只在 6 次造模中腹腔注射青霉素后出现 V 级惊厥发作, 因癫痫持续状态而死亡. 根据 Racine 的标准, 其余 29 只大鼠连续 5 次出现 III 级及 III 级以上惊厥发作, 故认为完全点燃。

2.2 脑电图观察

正常大鼠脑电图以 7~9 Hz 的 α 波为主, 无明显阵发性节律出现, 波幅 $< 50 \mu$ V(图 1a). 腹腔注射生理盐水后脑电活动无明显改变. 模型组大鼠腹腔注射青霉素后, 全部大鼠 3~10 min 就出现痫样放电, 多表现为尖波、棘慢波、棘波、尖慢波. 痫样波开始散在出现, 以后成节律性表现, 频率、波

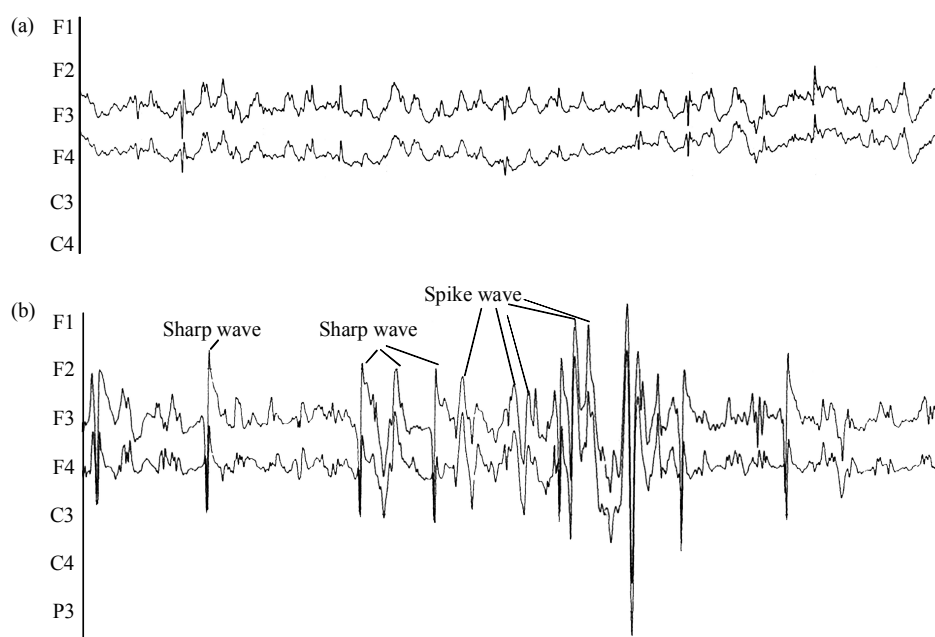


Fig. 1 Example of penicillin-induced epileptiform activity recorded in frontal lobe by electro-corticogram

(a) Control. (b) Vertex sharp transient wave (spike wave) and sharp wave were soon detected just in a few minutes after the last seizure in RS group by electrocorticogram.

幅逐渐增高, 20~30 min 后脑电图上出现阵发性长时程高波幅多棘波, 成密集放电, 1 h 达高峰(图 1b), 以后渐下降, 大鼠停止抽动后 6 h, 脑电记录还可记录到痫样放电。

2.3 透射电镜观察结果

生理盐水对照组海马本部 CA3 区锥体神经元核膜完整, 染色质结构正常, 胞质中细胞器形态正常, 未见自噬小体(图 2a), 模型组末次惊厥后 1.5 h, 海马神经元胞浆内质网扩张, 可见“C”形

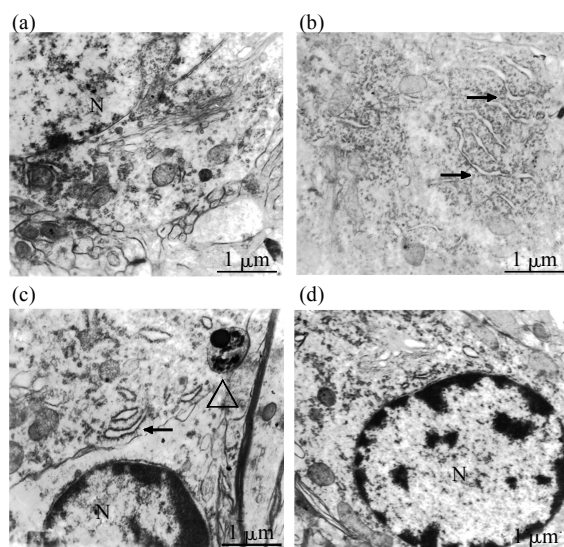


Fig. 2 Example of transmission electron microscopy (TEM) in hippocampal neurons

In the hippocampal neurons of the controls (a), chromatin and cytoplasmic organoids showed eumorphism with nuclear membrane integrity; 1.5 h after the last penicillin-induced recurrent seizures, “C” - morphous double membrane structure of dilated endocytosplasmic reticulum (arrows) could be observed (b); 3 h after the last seizures, autophagosome appeared (c, arrowhead) with manifest dilated endocytosplasmic reticulum; 6~12 h after the last seizures, the hippocampal neurons showed apoptotic feature such as nuclear chromatinic pyknosis and verge-aggregation(d).

的双层膜结构形成(图 2b), 3 h 时, 线粒体肿胀, 出现自噬小体, 溶酶体数目增多, 并可见自噬囊泡吞噬脂滴和线粒体(图 2c), 6 h 和 12 h, 自噬小体和次级溶酶体数目显著增多, 线粒体嵴断裂, 肿胀变形, 细胞核染色质固缩边集, 呈现凋亡的超微结构特征(图 2d)。

2.4 Tunnel 染色

典型的凋亡细胞核呈规则圆形固缩, 棕褐色, 致密染色。NS 组海马本部锥体神经元凋亡数目 (6.0 ± 4.7 , 图 3a) 明显低于 RS 组 (16.2 ± 6.5 , $t = 3.29$, $P = 0.0072$, 图 3b), 具有统计学意义。

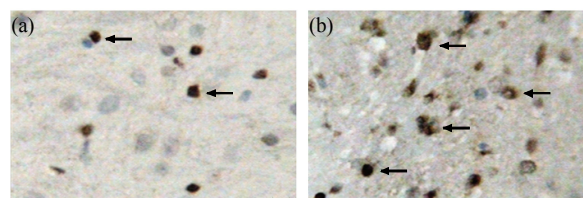


Fig. 3 Example of *in situ* end labeling (Tunnel) in hippocampus

In the rat with a history of recurrent developmental seizures, there is increased apoptotic neurons (arrows) in hippocampus (b) compared to the controls (a). DAB colouration (palm tree and brown); enlargement factor: $\times 400$.

2.5 Morris 水迷宫

2.5.1 逃避潜伏期. 第 1 次定位航行实验(place navigation test, PNT)1~5 天潜伏期 NS 组和 RS 组均呈逐渐下降趋势, 但 RS 组第 5 天潜伏期明显高于 NS 组, 具有显著性差异($t = 3.14$, $P = 0.014 < 0.05$); 第 2 次 PNT 测试中第 1 天和第 3 次 PNT 测试中第 2 天的潜伏期值 RS 组仍明显高于 NS 组, 具有统计学意义($P < 0.05$, 图 4)。

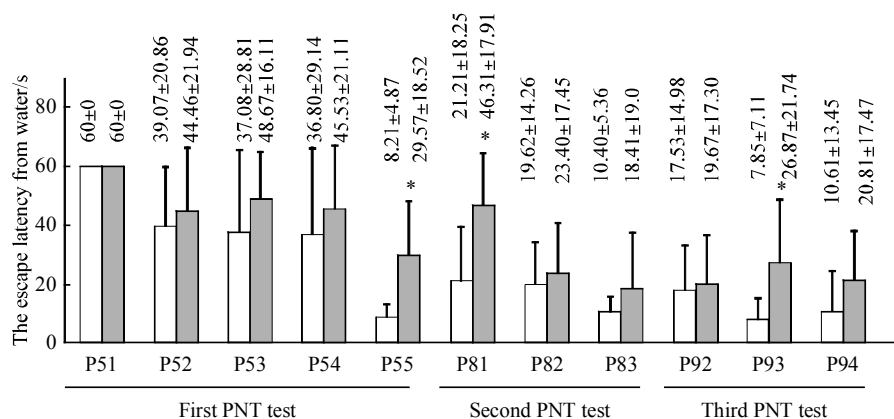


Fig. 4 The latency for rats finding the platform in the three PNT tests

The escape latencies from the water maze were significantly longer in rats of RS group than that of the control at d5 of the first PNT test, at d1 of the second PNT test, and at d2 of the third PNT test. * $P < 0.05$. □: Control group; ■: Recurrent-seizure group; P: Postnatal day.

2.5.2 搜寻策略分析. 搜寻策略是反应空间学习能力的新指标. a. 第 1 次水迷宫: 从 5 天的搜寻策略来看, 各组边缘式搜寻比例均呈逐渐减少趋势; 另一方面, 各组趋向式和直线式搜寻比例均呈逐渐增加趋势, 至第 5 天各组趋于一致. 采用秩和检验显示对照组在第 4 天和第 5 天成绩明显优于 RS 组, 具有统计学意义($P < 0.01$). b. 第 2 次和第 3

次水迷宫: 对照组 3 天成绩均明显优于 RS 组, 具有统计学意义($P < 0.01$ or 0.05), 如表 2 所示.

2.5.3 三次空间探索实验(spatial probe test, SPT) 的比较. 从原平台象限游泳距离与总距离比值看, RS 组 3 次均明显低于 NS 组, 有显著性差异($P < 0.05$, 图 5).

Table 2 The frequency of the four searching strategy by nonparametric Kruskal-Wallis test

Water maze	Group	Frequency of the four searching strategy/%					Kruskal-Wallis test	
		Straight	Taxis	Random	Marginal	Total	χ^2 value	<i>P</i> value
First maze								
d1	Cont	0	0	7.1	92.9	100	1.7318	0.1882
	Rs	0	6.25	18.8	74.95	100		
d2	Cont	0	0	50	50	100	0.2515	0.616
	Rs	6.25	12.5	12.5	68.75	100		
d3	Cont	7.14	42.9	28.6	21.36	100	2.2717	0.1318
	Rs	6.25	12.5	43.8	37.45	100		
d4	Cont	50	21.4	28.6	0	100	9.6621	0.0019**
	Rs	12.5	6.25	43.8	37.45	100		
d5	Cont	78.6	21.4	0	0	100	16.49	0.0001**
	Rs	12.5	12.5	56.3	18.7	100		
Second maze								
d1	Cont	14.3	50	35.7	0	100	5.512	0.0189*
	Rs	0	25	68.8	6.2	100		
d2	Cont	35.7	50	14.3	0	100	8.0468	0.0046**
	Rs	6.25	31.25	56.25	6.25	100		
d3	Cont	64.3	35.7	0	0	100	5.9711	0.0145*
	Rs	31.25	25	43.75	0	100		
Third maze								
d1	Cont	42.9	35.7	21.4	0	100	6.518	0.0107*
	Rs	12.5	18.8	68.7	0	100		
d2	Cont	78.6	14.3	7.1	0	100	10.5667	0.0012**
	Rs	18.75	31.25	50	0	100		
d3	Cont	78.6	14.3	7.1	0	100	7.483	0.0062**
	Rs	31.25	18.75	50	0	100		

Compared with the control, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

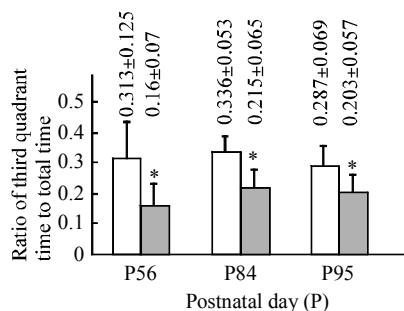


Fig. 5 Spatial probe test

In the three memory tests, as for the value of distance in origin platform quadrant to total distance, the RS group seemed worse than the NS group in the three spatial probe tests. * $P < 0.05$. □: Control group; ■: Recurrent-seizure group.

2.6 Timm 染色结果

RS 组海马齿状回内分子层和 CA3 区锥体细胞层可见明显异常增生苔藓纤维, 对照组未见发芽, 如图 6 所示.

2.7 实时定量 RT-PCR

2.7.1 基因扩增效率. 反应结束后仪器自动显示各基因与 β -actin 的实时荧光曲线, 通过 cDNA 浓度的对数值对 ΔCT 值(目的基因与内参基因 CT 值之差)作图, 所得各基因直线斜率绝对值均小于 0.1, 说明目标基因和内参基因扩增效率相同, 实验结果可应用 $2^{-\Delta CT}$ 法进行定量分析, 如图 7 所示(ZnT-1 为例).

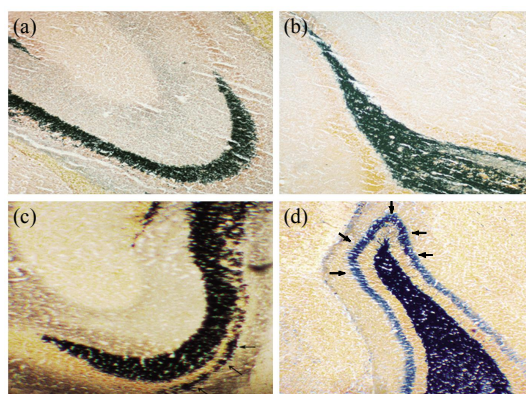


Fig. 6 Example of mossy fiber sprouting in control rats(a, b) and rats with penicillin-induced recurrent seizures (c, d)

In the rat with a history of recurrent developmental seizures, there is increased Timm staining (arrows) in the stratum pyramidale of CA3 (c) compared to the controls (a). Increased Timm staining was also greater in the inner molecular layer of the dentate granular cell layer (arrows) in the rats with developmental seizures (d) compared to the controls (b). Scale bar=100 μ m.

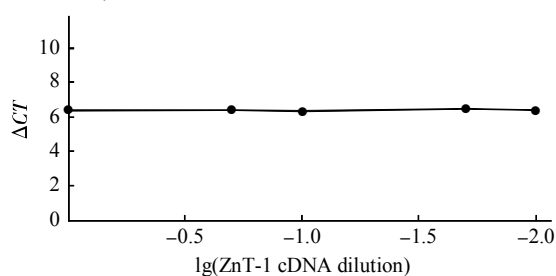


Fig. 7 The comparison of gene amplification efficiency between objective genes (ZnT1 as example) and β -actin

The slope rate is 0.006 33, $P < 0.1$, indicating that gene amplification efficiency between the two genes is identical; coefficient correlation is 0.095 8, $P = 0.878\ 2 > 0.05$, indicating no dependability between the two genes. $y = 0.006\ 33x + 6.344\ 9$; $r = 0.095\ 8$, $P = 0.878\ 2 > 0.05$.

2.7.2 方差分析显示 RS 组海马 CaMK II α 和 ZnT-1 表达明显低于 NS 组, 而 CCK、PRG-3 和 ZnT-3 两组之间无显著性差异($P < 0.05$, 图 8).

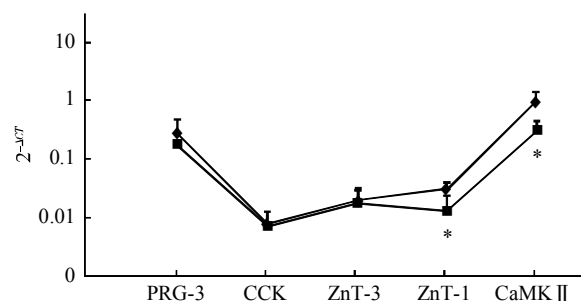


Fig. 8 Analysis of relative gene expressions data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta CT}$ method

Real time RT-PCR analysis showed decreased expression of CaMK II α and ZnT-1 in hippocampus of RS group than that in control group. $*P < 0.05$. $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: Control group; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: Recurrent-seizure group.

2.7.3 聚类分析和相关分析表明, NS 组 CaMK II α 、PRG-3、CCK、ZnT-3 4 个基因具有共聚特征, 并且彼此之间具有显著相关性, 而 ZnT-1 与其他基因之间无明显相关性, RS 组海马 CaMK II α 和 ZnT-1、PRG-3 和 CCK 具有明显的共聚现象, 且 CaMK II α 和 ZnT-1 呈显著正相关, PRG-3 和 CCK 近似正相关, 其余之间无明显相关性(表 3).

Table 3 Correlation and regression analysis of the expressions of the five genes by quantitative RT-PCR

The compared two genes	Control		RS group	
	r	P	r	P
CaMK- II and ZnT-1	0.495	0.317	0.954	0.003**
CaMK- II and ZnT-3	0.976	0.000 8**	0.408	0.421
CaMK- II and PRG-3	0.980	0.000 6**	0.227	0.664
CaMK- II and CCK	0.927	0.007**	0.406	0.423
ZnT-1 and ZnT-3	0.34	0.509	0.357	0.486
ZnT-1 and PRG-3	0.449	0.370	0.344	0.503
ZnT-1 and CCK	0.180	0.732	0.214	0.683
ZnT-3 and PRG-3	0.985	0.000 3**	0.147	0.780
ZnT-3 and CCK	0.965	0.001**	0.309	0.551
PRG-3 and CCK	0.945	0.004**	0.761	0.078

Correlation and regression analysis demonstrated positive linear correlation among CaMK II α , CCK, PRG-3 and ZnT-3 in NS group and between CaMK II α and ZnT-1 in RS group. ** $P < 0.01$.

3 讨 论

本研究主要结果: a. 发育期青霉素诱发点燃模型的建立. b. 探讨该模型对认知功能的远期影响. c. 分析对相关分子表达的远期影响. 分别讨论如下:

3.1 发育期青霉素诱发点燃模型的建立

癫痫的各种动物模型可大致分为惊厥模型和点燃动物模型两类, 前者如红藻氨酸、三氟乙醚诱发的惊厥模型等, 后者主要指杏仁核电点燃模型和化学点燃模型. 化学点燃模型与脑内电点燃不同, 不直接造成脑组织外伤, 且实验设备要求简单、结果稳定, 可较好地模拟临床患者的癫痫发作, 但目前化学点燃模型不多, 且主要应用于成年动物. 青霉素是 GABA_A-benzodiazepine 受体的拮抗剂, 引起抑制性突触活动减弱或兴奋性突触活动增强, 从而导致神经元兴奋性增高, 产生阵发性去极化漂移(paroxymal depolarizationshifts, PDS), 改变了神经网络的兴奋-抑制平衡, 导致痫性电活动产生, 目前已经成功应用于成年动物点燃癫痫, 是一种急性全面性癫痫模型^[9~11]. 但由于发育期脑的特殊性, 即抑制性 γ -氨基丁酸受体的发育迟于兴奋性谷氨酸受体, 因此尚不清楚青霉素能否用于发育期点燃模型的制作, 经检索国内外文献尚无相关研究报道. 本实验中通过预实验发现, 腹腔注射青霉素剂量较成年动物高(成年大鼠腹腔注射青霉素诱发癫痫的剂量一般为 3.00×10^6 U/kg 左右), 为 5.60×10^6 U/kg, 并且需隔日注射, 方能使绝大多数大鼠存活而不会抽搐致死, 进一步验证了发育期大脑抑制性 GABA 能系统发育落后于兴奋性系统发育的特点. 脑电图记录显示, 注射青霉素后, 全部大鼠 3~10 min 就出现痫样放电, 20~30 min 后脑电图上出现阵发性长时程高波幅多棘波, 成密集放电, 1 h 达高峰, 大鼠停止抽动后 6 h, 脑电记录还可记录到痫样放电, 故认为完全点燃.

我们进一步采用电镜结合 Tunnel 方法探讨点燃后海马神经元存活情况. Tunnel 染色显示末次惊厥后 24 h 海马凋亡神经元明显增加; 透射电镜发现, 青霉素诱发育期反复点燃后 1.5 h 可见海马神经元胞浆内质网扩张, 出现“C”形的双层膜结构, 3 h 出现自噬小体, 内质网扩张明显, 6~12 h 神经元细胞核染色质固缩边集, 出现了凋亡特征. 说明点燃后海马神经元出现了自噬和凋亡的损伤特征, 并且自噬出现在神经元凋亡之前. 这与我们课

题组新近在成年大鼠红藻氨酸损伤纹状体模型中的发现类似^[12], 提示自噬途径参与点燃后神经元凋亡的发生.

海马苔藓纤维(hippocampal mossy fiber, MF)再生性发芽是癫痫特征性病理表现. 本研究通过 Timm 染色发现, RS 组海马 CA3 区锥体细胞层和齿状回内分子层中存在明显发芽, 从而进一步证明, 我们建立的青霉素诱发育期大鼠反复点燃模型其病理学改变、行为学特点及脑电生理变化与人类全面性癫痫发作的临床表现、反复发作的病程、脑电活动和病理改变相一致, 是一种可靠的全面性癫痫点燃模型.

3.2 青霉素诱发育期大鼠点燃模型对认知功能的远期影响

学习记忆有不同的类型及神经生物学基础. 目前研究最多的是空间辨别性学习记忆. 空间辨别性学习记忆是联合型学习中的操作式条件反射, 其中空间学习能力反应的是神经系统有关部位暂时联系的建立, 而空间探索实验则代表对记忆痕迹的保存与恢复. Morris 水迷宫是目前最适于建立空间辨别性学习记忆的动物模型. 成年大鼠癫痫持续状态后会造成学习和记忆功能的损害, 然而发育期惊厥是否造成认知功能的远期损害尚存争议. 我们既往的工作在发育期热性惊厥、电惊厥及化学药物惊厥动物模型方面做了大量工作. 例如, 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^[13, 14]. 由于三氟乙醚是一种作用广泛的脑兴奋剂, 研究时无法区分是通过 NMDAR 抑或 GABA-R 亚型起主要作用, 从而制约了有关针对受体水平的机理研究. 本研究在上述工作基础上采用青霉素诱发点燃模型, 因为研究表明, 青霉素能抑制 GABA 能神经元, 引起抑制性突触活动减弱或兴奋性突触活动增强, 从而导致神经元兴奋性增高. 因此, 通过采用青霉素诱发点燃模型, 有助于进一步了解脑内 GABA 能神经元活动下降所致惊厥活动对认知功能的远期影响, 目前尚缺乏这方面的研究.

为揭示青霉素点燃后不同发育阶段认知功能变化, 我们利用红外摄像数码 Morris 水迷宫技术, 不仅分析了逃避潜伏期, 还细致探讨了搜寻策略的各个指标, 并且增加了 1 月龄和 3 月龄之间的两个观测点即 1.5 月龄(P51~P56, 相当于青春期前)和 2.5 月龄(P81~P84, 相当于青春期后), 弥补了国

内外研究的不足。结果表明,在第1次迷宫测试的第1到第3天,两组无论从逃避潜伏期还是策略指标来看都无显著差异,说明在训练开始阶段,模型组与对照组在学习能力上无明显差距,但第4天对对照组搜寻策略成绩明显优于RS组,第5天逃避潜伏期和搜寻策略两项指标均反应RS组空间学习能力较对照组差,表明发育期青霉素反复点燃能较早产生学习功能的损害(青春前期)。在随后2次水迷宫测试中,对照组3天的搜寻策略成绩均明显优于RS组,同时第2次水迷宫第1天和第3次水迷宫第2天的逃避潜伏期亦明显高于对照组,进一步证明,尽管经历一系列水迷宫学习训练,点燃组的学习能力改善仍不明显,也提示搜寻策略分析能更早地揭示认知损伤。此外,本实验还通过分析原平台象限游泳距离与总距离的比值,探讨记忆功能的变化,发现RS组3次迷宫测试均明显低于对照组,有显著性差异,表明发育期青霉素反复点燃亦能造成记忆功能的长期损害。

3.3 发育期点燃对海马相关分子表达的远期影响

空间学习记忆的解剖学定位于海马,其相关的分子机制是神经科学研究的热点。O'Keefe等^[15]用电生理学方法记录到大鼠在空间学习记忆过程中,海马各区均有明显的单细胞放电现象,说明空间学习记忆的中枢位于海马。空间学习记忆与突触可塑性,钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶II(CaMK II),苔藓纤维发芽等有关。

a. CaMK II是一种钙依赖性蛋白激酶,在脑组织中含量特别高,占海马蛋白含量的2%,是突触后致密物(PSD)的主要成分,其家族包含有28个亚单位,主要来自4个基因(α 、 δ 、 γ 、 β),其中 α 亚单位仅在脑细胞中表达。CaMK II尤其是 α 亚单位在海马突触修饰中发挥的关键作用受到广泛认可。最近有学者通过实验观察学习训练引发的突触可塑性改变时发现, CaMK II尤其是 α 亚单位参与突触修饰的晚期阶段,主要参与突触前群的修饰^[16]。CaMK II亚单位的变异严重影响LTP的产生,会导致学习能力的丧失, CaMK II的药源性或基因性损害均可使LTP及学习功能受损。

我们新近研究发现,大鼠新生期三氟乙醚诱发的反复长程惊厥能够学习和记忆功能产生远期的损害,并造成海马CaMK II表达下调,推测CaMK II的失活可能是反复癫痫发作致认知损害的机制之一^[17]。本实验采用荧光实时定量RT-PCR方法测定海马CaMK II α 的表达,结果显示,模型组

CaMK II α 的表达较对照组明显下降,具有统计学意义,说明发育期大鼠反复惊厥可使CaMK II的表达下调。结合认知功能的测定结果,我们推测CaMK II表达下调参与远期认知损害的分子机制。

b. 海马苔藓纤维通路(mossy fiber, MF)在认知功能调节中具有重要意义。惊厥可致MF再生性发芽(sprouting),是认知功能损伤的病理生理基础之一。Zn²⁺转运体3(ZnT3)被证实负责MS通路中将Zn²⁺转运入突触前膜囊泡内, Zn²⁺转运体1(ZnT1)则承担将Zn²⁺转出细胞外的功能^[3]。我们在热性惊厥模型中证实,海马ZnT1和ZnT3在惊厥的早期表达增高^[18],但惊厥是否会造成其表达的远期变化尚不清楚。本研究发现, ZnT1出现了远期的表达下调,而ZnT3表达则无明显改变。进一步采用聚类和相关分析表明,在点燃组大鼠海马中ZnT1与CaMK II α 表达特征非常相似,呈明显共聚特点,具有显著正相关性,而在对照组两者无明显共聚及相关特点。说明海马ZnT1与CaMK II α 共同参与发育期点燃后认知功能损伤的分子机制,并存在协调作用。

最近报道一类突触可塑性调节分子(PGR)参与惊厥后海马MF发芽的调节,主要包括PRG-1和PRG-3^[19]。此外,应用差异显示RT-PCR方法(DDRT-PCR)亦发现抗惊厥神经肽CCK是海马损伤后突触再生的关键分子^[20]。本研究中虽然未发现PRG-3和CCK表达出现远期改变,但仍然通过聚类和相关分析发现两者不论在对照组还是点燃组均存在共聚特征和正相关,提示PRG-3和CCK在海马突触可塑性的生理和病理调节中均发挥协同作用,两者的内在因果联系值得进一步探讨。

另外有趣的发现是,虽然ZnT-3和ZnT-1同属锌离子转运体家族,但与其他基因的关系截然不同。在正常组中ZnT-3与PRG-3、CCK和CaMK II α 之间呈共聚和正相关特点,而ZnT-1与上述基因则无明显相关性,表明正常情况下ZnT-3与PRG-3、CCK、CaMK II α 在海马突触可塑性调节中具有协同作用,而在发育期点燃等病理因素影响下, ZnT1与CaMK II α 协同性表达下调,而ZnT-3则失去与其他基因的共聚和相关性,说明海马相关基因表达发生了类和量的变化。提示有必要进一步采用基因组学和蛋白质组学技术从更广的范围认识和鉴别与发育期点燃所致认知损害有关的基因和蛋白质,为下一步干预研究提供依据。

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

参 考 文 献

- Rennie J M, Boylan G B. Neonatal seizures and their treatment. *Curr Opin Neuro*, 2003, **16**(2): 177~181
- Scher S. Neonatal seizures and brain damage. *Pediatr Neurol*, 2003, **29**(3): 381~390
- Ni H. Seizure-induced brain injury in brain development and Zn²⁺ metastasis in hippocampus. *Prog Physiol Sci*, 2006, **37**(4): 331~334
- Ho M T, Pelkev K A, Topolnik L, *et al.* Developmental expression of Ca²⁺-permeable receptors underlies depolarization-induced long-term depression at mossy fiber CA3 pyramid synapses. *J Neurosci*, 2007, **27**(43): 11651~11662
- Terashima A, Pelkey K A, Rah J C, *et al.* An essential role for PICK1 in NMDA receptor-dependent bidirectional synaptic plasticity. *Neuron*, 2008, **57**(6): 872~882
- Racine R J, Steingart M, Mc Intyre D C. Development of kindling-prone and kindling-resistant rats: selective breeding and electrophysiological studies. *Epilepsy Res*, 1999, **35**(3): 183~195
- Turkyilmaz C, Turkeyilmaz Z, Atalay Y, *et al.* Magnesium pre-treatment reduces neuronal apoptosis in newborn rats in hypoxia-ischemia. *Brain Res*, 2002, **955**(1~2): 133~137
- Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 2001, **25**(4): 402~408
- Bosnak M, Ayyildiz M, Yildirim M, *et al.* The role of nitric oxide in the anticonvulsant effects of pyridoxine on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Epilepsy Res*, 2007, **76**(1): 49~59
- Yildirim M, Maranqoz C. Anticonvulsant effects of melatonin on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Brain Res*, 2006, **1099**(1): 183~188
- Ayyildiz M, Coskun S, Yildirim M, *et al.* The effects of ascorbic acid on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Epilepsia*, 2007, **48**(7): 1388~1395
- Wang Y, Han R, Qin Z H, *et al.* An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist. *Autophagy*, 2008, **4**(2): 214~226
- Ni H, Jiang Y W, Bo T, *et al.* Long-term effects of neonatal seizures on subsequent NMDA-1 and GABA-A-α1 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 immuno-reactivity, seizure latency and neuronal injury following single or recurrent neonatal seizures in hippocampus of Wistar rat. *Neurosci Lett*, 2005, **380**(1~2): 149~154
- O'Keefe J, Squeakman A. Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Exp Brain Res*, 1987, **68**(1): 1~27
- Skibinska-kijek A, Radwanska A. Calcium/calmodulin dependent protein kinase II in learning-dependent plasticity of mouse somatosensory cortex. *Neurosci*, 2008, **151**: 750~757
- 倪 宏, 姜玉武, 吴希如, 等. 新生期反复惊厥对认知和海CaMK II表达的远期影响及干预研究. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(1): 97~104
- Ni H, Jiang Y W, Wu X R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(1): 97~104
- 倪 宏, 水泉祥, 吴希如, 等. 热惊厥幼龄大鼠脑内 FOS, heat stress protein-70 蛋白及 Zinc transporter 3 mRNA 表达. *中华急诊医学杂志*, 2008, **17**(1): 41~44
- Ni H, Shui Q X, Wu X R, *et al.* *Chin J Emerg Med*, 2008, **17**(1): 41~44
- Savaskan N E, Brauer A U. Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the plasticity-related gene family. *Eur J Neurosci*, 2004, **19**(1): 212~220
- Brauer A U, Savaskan N E, Plaschke M, *et al.* Cholecystokinin expression after hippocampal deafferentation: molecular evidence revealed by differential display-reverse transcription- polymerase chain reaction. *Neurosci*, 2003, **121**(1): 111~121

Long-term Effects of Penicillin-induced Developmental Kindling on Cognitive Deficit and Related Gene Expressions in Hippocampus*

NI Hong^{1)**}, JIANG Yu-Wu²⁾, DING Mei-Li¹⁾, WANG Zhe-Dong¹⁾, TAO Lu-Yang¹⁾, WU Xi-Ru²⁾

⁽¹⁾ Neurology Laboratory, Soochow University Affiliated Children's Hospital,

Laboratory of Aging and Nervous Diseases, Soochow University, Suzhou 215003, China;

⁽²⁾ Department of Pediatrics, First Hospital Affiliated to Peking University, Beijing 100034, China)

Abstract Epilepsy in children is associated with a broad spectrum of cognitive deficits, which is associated with hippocampal mossy fiber sprouting. The underlying molecular mechanisms involved in mossy fiber sprouting in hippocampus following developmental seizures are not completely known. The timing of cognitive dysfunction

and the relation of this cognitive impairment to calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK- II), plasticity related gene 3 (PRG-3), cholecystokinin (CCK), zinc transporter 1 and 3 (ZnT-1 and ZnT-3) in hippocampus were studied. A seizure was induced by penicillin quaque die alterna in Sprague-Dawley rats from postnatal day 29 (P29). Rats were assigned into the recurrent seizure group (RS, seizures were induced in eleven consecutive days, $n=39$) and the control group (NS, $n=21$). At 1.5 h, 3 h, 6 h and 12 h after the last seizure, apoptosis and autophagy were detected by transmission electronmicro-scopy (TEM) or *in situ* end labeling (TUNNEL). Electro-corticogram was observed after the last seizure. During P51 to P56, P81 to P84 and P92 to P95, the rats were tested for spatial learning and memory abilities with automatic Morris water maze task. On P95, mossy fiber sprouting and gene expressions in hippocampus were determined subsequently by Timm staining and real time RT-PCR methods. The results are as follows: a. TEM revealed the formation of autophagosomes and apoptosis in hippocampus after kindling. In the hippocampal neurons of the controls, chromatin and cytoplasmic organoids showed eumorphism with nuclear membrane integrity; 1.5 h after the last penicillin-induced recurrent seizures, "C"-morphous double membrane structure of dilated endocyttoplasmic reticulum could be observed; 3 h after the last seizures, autophagosome appeared with manifest dilated endocyttoplasmic reticulum; 6~12 h after the last seizures, the hippocampal neurons showed apoptotic feature such as nuclear chromatinic pyknosis and verge-aggregation. TUNNEL staining also showed elevated number of apoptosis neurons in hippocampus of RS group ($P < 0.05$). b. Vertex sharp transient wave and sharp wave were soon detected just in a few minutes after the last seizure in RS group by Electro-corticogram. c. Escape latency. The escape latencies from the water maze were significantly longer in rats of RS group than that of the control at d5 of the first test, at d1 of the second test, and at d2 of the third test. d. Strategy analysis. RIDIT analysis showed that the scores were much worse in rats of RS group than that of the control at d4 and d5 of the first test. Moreover, the scores were much worse in rats of RS group than that of the control at the whole three days of both the second and third maze tests. e. Memory test. As for the value of distance in origin platform quadrant to total distance, the RS group seemed worse than the NS group in three maze tests ($P < 0.05$). f. Aberrant mossy fiber sprouting was seen in the inner molecular layer of the granule cells and the stratum pyramidale of CA3 subfield in RS group. g. Real time RT-PCR analysis showed decreased expression of CaMK II α and ZnT-1 in hippocampus of RS group than that in control group. Moreover, the four genes (CaMK II α , PRG-3, CCK and ZnT-3) in NS group and the two genes (CaMK II α and ZnT-1) in RS group showed copolymerization characteristic by cluster analysis. In addition, correlation and regression analysis demonstrated positive linear correlation among CaMK II α , CCK, PRG-3 and ZnT-3 in NS group and between CaMK II α and ZnT-1 in RS group. It was concluded that recurrent developmental kindling induced by penicillin could cause not only autophagy and apoptosis in the earlier stage of brain damage, but also have long-term effects on cognitive function and hippocampal mossy fiber sprouting which may be associated with the down-regulated expression of CaMK II α and ZnT-1 in hippocampus.

Key words penicillin-induced kindling, epilepsy, cognitive deficit, molecular mechanisms, CaMK II α , ZnT, CCK, PRG-3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00576

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30470555, 30571909, 30870808, 30872666), The Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (BK2007509), The Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institute of China (07KJB320103).

**Corresponding author.

Tel: 86-512-67787306, E-mail: nhdoctor@163.com

Received: September 18, 2008 Accepted: November 7, 2008