

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

探討一氧化氮在幼鼠熱性痙攣中所扮演的角色

Studies of nitric oxide in the development of fibrile seizure in neonatal rats

計畫編號：NSC 87-2314-B-041-014

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

主持人：林指宏 嘉南藥理學院 嬰幼兒保育系

一、中文摘要

兒童罹患熱性痙攣(febrile seizure)約有3-5%機率，而且其中約有1/3會再復發。雖然這是一個臨床常見的病症，然而我們對其相關之細胞和神經化學傳遞機轉所知相當有限。在眾多病因中，細菌感染和高燒一直被認為是主要的誘發因素。熱性痙攣與發燒和年齡有直接關連，長期研究發現熱性痙攣孩童或實驗動物其海馬迴容積或神經有明顯損傷現象，顯示熱性痙攣與海馬迴有直接關係。本實驗採用兩種不同之熱原(Lipopolysaccharide, LPS and interleukin-1 β , IL-1 β)分別誘導不同年齡層(5-15天)之幼鼠熱性痙攣現象。IL-1 β (1 μ g/kg)誘導5-6天、7-8天、9-10天、11-12天、15天、21天大之幼鼠不同程度的熱性痙攣現象，年齡愈大誘導時間愈長(8-40分鐘)，發作頻率愈少(40-0次/2小時內)。不同劑量之IL-1 β (1 ng/kg, 10 ng/kg, 100 ng/kg, 1 μ g/kg, 10 μ g/kg)分別對7-8天大之幼鼠誘導不同程度之熱性痙攣現象，劑量愈高誘導時間愈短、發作頻率愈多。而此一痙攣現象受NMDA

受體拮抗劑MK-801(10 mg/kg)和APV(10 mg/kg), NOS抑制劑L-NAME(100 mg/kg), GABA受體拮抗劑Diazepam(5 mg/kg)所減緩。但COX抑制劑Diclofenac(10 mg/kg)和Aspirin(10 mg/kg)反促使形成連續性痙攣現象，約30分鐘後導致實驗動物死亡，此一現象和對照組零死亡率有極明顯差異。採7-8天大幼鼠投與IL-1 β (10 μ g/kg)12小時後犧牲進行海馬迴神經細胞內電生理記錄，得到連續自發性放電之類癲癇興奮電位，顯示此一熱性痙攣模式亦影響到中樞神經活性。本研究之結果提供一合適之人體熱性痙攣現象之動物研究模式，將有助於日後對熱性痙攣的機制討模式。

關鍵詞：熱性痙攣、細菌內毒素、一氧化氮、海馬迴

Abstract

Seizures induced by fever are the most prevalent age-specific seizures in infants and young children. Whether they result in long-term sequelae such as

hippocampal neuronal loss and temporal lobe epilepsy is controversial. This study describes the establishment of a new animal model of febrile seizures using the infant rat. Febrile seizure was induced in pups by intraperitoneally administration of E. Coli lipopolysaccharide (1-10mg/kg) or administration of interleukin-1 β (1 ng-10 μ g/kg). The Pups seizures were determined by behavioral criteria such as scratching, face and body myoclonic twitches, forelimb clonus, chewing, tail-extensor, followed by tonic extensor or tonic-clonic convulsions, falling and rolling. Age-dependent (5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 15, 21 days old rats) manners of febrile seizures induced by interleukin-1 β (1 μ g/kg). In 7-8-old rats, the onset and tonic-clonic convulsions of interleukin-1 β -induced seizures varied markedly among individual animals. A dose-dependent febrile seizures induced by IL-1 β (1 ng-10 μ g/kg) were determined in 7-8-old rats. Twelve hours after IL-1 β (10 μ g/kg), the pups were decapitated and the hippocampal slices were prepared. Spontaneous epileptiform activity in hippocampal neurons were obtained by conventional intracellular recording techniques. MK-801 (a potent NMDA-receptor blocker, 10 mg/kg), APV (a NMDA-receptor blocker, 10 mg/kg), L-NAME (a NOS inhibitor, 100 mg/kg), or diazepam (a GABA-receptor blocker, 10 mg/kg) inhibited febrile seizures induced by IL-1 β (1 μ g/kg) when intraperitoneally 10 min before IL-

1 β injection. However, Diclofenac (a COX inhibitor, 10 mg/kg) and Aspirin (a COX inhibitor, 10 mg/kg) produced pups status seizures and death when intraperitoneally 10 min before IL-1 β injection. In summary, an infant rat paradigm pyrogens-induced seizures which is suitable for long-term studies is described. This model should be highly valuable for studying the mechanisms and sequelae of febrile seizures.

Keywords : febrile seizure, endotoxin, nitric oxide, hippocampus

二、緣由與目的

根據 NIH 於 1980 年指出「凡 3 個月嬰兒至 5 歲的孩童在無明顯腦部感染，因發燒(fever)而引起痙攣現象，即可稱之為熱性痙攣 (febrile seizure)」。熱性痙攣是臨床最為常見的癲癇發作(seizure)病例，約佔孩童人口群 3-5%，其再發率(recurrent)更高達 30% 以上，當中約有 2-3% 患者日後將演變成為癲癇(epilepsy)病患。高燒(higher body temperature)是誘導熱性痙攣的主要誘因，其中以病毒性或葛蘭氏陰性菌感染病症 (viral or Gram negative bacterial illness)

最近我們研究更發現細菌內毒素 (bacterial endotoxin, lipopolysaccharide; LPS) 及 interleukin-1 β 能經由兔腦 OVLT 地區活化誘導型一氧化氮合成酵素(inducible nitric oxide synthase; iNOS) 蛋白質的新生作用，進而合成及釋放一氧化氮 (nitric oxide; NO) 並藉由活化 eicosanoid system 改變體溫恆定之設定點溫度，進而引起發燒現象，此一結果顯示 LPS 及 EPs 在腦內

可經由大量合成 NO 以媒介病態生理之發現象。

臨床研究發現熱性痙攣之幼童常有海馬迴容積狹小及體內熱原和前列腺素製造量偏升結果，在熱性痙攣動物研究模式中，雖然所謂幼齡型熱性痙攣研究模式不斷被開發出，然而高死亡率、痙攣行為模式不明、非由體內自行衍生(如利用熱空氣、熱水、紅外燈加熱)，與實際人體熱性痙攣模式有極大差異，因此重新確立熱原在熱性痙攣誘發時的角色，和建立一更合適之熱性痙攣動物研究模式是有確實的必要性。

三、結果與討論

熱原性熱性痙攣動物模式的建立

(A) Age-dependent febrile seizures

將新生之 SD 純種大白鼠之新生幼鼠以出生天數分成六組，分別為 5-6 天、7-8 天、9-10 天、11-12 天、15-16 天、21 天。分別以公斤體重為單位，採腹腔注射方式注入 LPS (10 mg/kg) 或 IL-1 β (1 μ g/kg)。觀察熱性痙攣發生的動物行為，包含有(1)後腳搔癢、(2)臉頰和全身肌肉痙攣抽搐、(3)前腳腳指緊縮、(4)嘴部嚼咬、(5)尾巴舉高，進而誘導(6)全身肌肉強直痙攣現象，並(7)跌落在地上翻滾。其中以 IL-1 β 誘導之熱性痙攣最為典型，由於新生幼鼠偶而也伴隨肌肉抽搐現象，為求精準統計，本實驗記錄之熱性痙攣發生起始時間和在注射藥物後 2 小時內發作頻率以上述(6)、(7)項主。分別為：

- (1) 5-6 天幼鼠(onset, 9±2 min; frequency, 55±11);
- (2) 7-8 天幼鼠(onset, 12±2 min;

- frequency, 38±9);
- (3) 9-10 天幼鼠(onset, 18±3 min; frequency, 29±4);
 - (4) 11-12 天幼鼠(onset, 25±4 min; frequency, 10±8);
 - (5) 15 天幼鼠(onset, 35±12 min; frequency, 5±5);
 - (6) 21 天幼鼠：無符合之行為。
- (B) Dose-dependent febrile seizures**
- 將 7-8 天幼鼠每 8 隻分成一組，分別由腹腔注射不同劑量之 IL-1 β (1 ng/kg; 10 ng/kg; 100 ng/kg; 1 μ g/kg; 10 μ g/kg)。並記錄發作時間和頻率如下：
- (1) IL-1 β (1 ng/kg): (onset, 18±3 min; frequency, 12±4)
 - (2) IL-1 β (10 ng/kg): (onset, 16±3 min; frequency, 17±7)
 - (3) IL-1 β (100 ng/kg): (onset, 15±4 min; frequency, 28±6)
 - (4) IL-1 β (1 μ g/kg): (onset, 12±2 min; frequency, 38±9)
 - (5) IL-1 β (10 μ g/kg): (onset, 10±3 min; frequency, 40±4)

由熱原直接誘導新生老鼠熱性痙攣的動物研究模式符合人體熱性痙攣發生的年齡，並呈現年齡分層及劑量依賴效應，是本研究模式一大特色，零死亡率更是目前各實驗室所開發之熱性痙攣動物模式先例（其他實驗室開發的模式如利用熱空氣提昇體溫；紅外燈直接照射誘導；熱水直接潑灑等方法都具高死亡率和行為表現不明顯，且其生理病理機制偏屬於熱衰竭動物模式），而且本研究模式之動物行為表現皆符合癲癇典型之行為表現，應是一值得廣的熱性痙攣動物研究模式。

藥物對熱性痙攣動物的影響

選擇 7-8 天新生幼鼠於 IL-1 β (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 誘導動物熱性痙攣前 10 分鐘分別事先投與下列藥物。並記錄發作時間和頻率如下：

- (1) Saline (0.1 ml): (onset, 10±5 min; frequency, 39±7)
- (2) MK-801 (10 mg/kg): (onset, 22±8 min; frequency, 16±7)
- (3) APV (10 mg/kg): (onset, 26±12 min; frequency, 20±13)
- (4) L-NAME (100 mg/kg): (onset, 38±6 min; frequency, 6±5)
- (5) Diazepam (5 mg/kg): (onset, 32±8 min; frequency, 6±9)

此結果顯示經由熱原誘導的熱性痙攣可受傳統之抗痙攣劑所緩和，而一氧化氮的產生目前普遍被認與癲癇形成有關，East 和 Garthwaite 發現 7-9 天幼鼠在海馬迴一氧化氮的製造能力是成鼠的 25 倍，Vasconcelos 最近發現 Pentylenetetrazole 誘導的癲癇和十天大的幼鼠一氧化氮的產生有關。由此推測一氧化氮的產生應和熱性痙攣的生有關。

前列腺素對熱性痙攣動物的影響

選擇 7-8 天新生幼鼠於 IL-1 β (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 誘導動物熱性痙攣前 10 分鐘分別事先投與 Diclofenac (10 mg/kg) 或 Aspirin (10 mg/kg)。結果造成動連續性痙攣發作，所有事先處理 Diclofenac 或 Aspirin 的動物全都死亡，和對照組相較下(非連續性發作，死亡率零)抑制前列腺素在腦內合成量將促使熱性痙攣更為嚴重化。早期學者研究亦發現熱性痙攣幼童腦內前列腺素有升高趨勢，亦發現前列腺素有抗痙作用，因

此，利用 Aspirin 等解熱劑來防止或企圖治療熱性痙攣的用法有待更進一步研究加以釐清。

細胞內電生理記錄法

將 7-8 天注射 IL-1 β (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 之幼鼠於 12 小時後將其犧牲後進行腦切片，實施海馬迴單一神經細胞內記錄法發現神經活性呈現自動性癲癇樣放電現象，但對於未施打藥物之同齡幼鼠的海馬迴神經直接灌流 IL-1 β (10 ng/ml) 反造成神經抑制作用，此一結果可能代表(1) 海馬迴神經可能不是主要誘發病症的原始位置或(2) 在體位模式可能有些神經路徑被切除。不論如何此一結果已證實 IL-1 β 誘導的熱性痙攣模式和中樞神經之不正常放電有關，而詳細機制仍待進一步實驗研究。

綜合本實驗結果證實熱性痙攣可能與體內熱原生成有關，本研究同時建立一優秀的動物研究模式，此一模式與動物年齡有關，如同人類熱性痙攣模式，而且死亡率為零，是本結果一大特點，將可用於長久之追蹤研究以了解熱性痙攣產生的詳細機制，和研究與癲癇形成的關係。

四、成果自評

本研究計畫將深入探討熱原在誘發熱性痙攣的重要性及熱性痙攣現象時中樞神經的變化機制。實驗針對新生老鼠，在接受 LPS 或 IL-1 β 注射後，腦內癲癇敏感地區海馬迴和熱性痙攣誘發之關係，並採用活體評估和體外神經細胞電位記錄加以深入研究，有助於了解細菌性感染或發燒所誘發的幼兒熱性痙攣時，其腦神經所產生之

變化。

本研究建立一新的熱性痙攣長期之實驗動物研究模式，將有助於了解熱性痙攣發生的生理病理之神經機轉，結果可提供幼兒保健預防醫學之參考。

五、參考文獻

1. East, S.J. & Garthwaite, J. (1991). NMDA receptor activation in rat hippocampal induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci. Lett.* 123:17-9.
2. Toth, Z., Yan, X.X., Haftoglu, S., Ribak, C.E. & Baram, T.Z. (1998). Seizure-induced neuronal injury: Vulnerability to febrile seizures in an immature rat model. *J. Neurosci.* 18(11): 4285-94.
3. Vasconcelos, A.P., Marescaux, C. & Nehlig, A. (1998). Age-dependent regulation of seizure activity by nitric oxide in the developing rat. *Develop. Brain Res.* 107:315-9.
4. BERG, AT., SHINNAR, S., HAUSER, WA., ALEMANY, M., SHAPIRO, ED., SALOMON, ME. & CRAIN, EF. (1992). A prospective study of recurrent febrile seizures *N. Eng. J. Med.* 327.1122-7, 1992.
5. LIN, J.H. & LIN, M.T. (1996). Nitric oxide synthase-cyclooxygenase pathways in organum vasculosum laminae terminalis may mediate pyrogenic fever in rabbits. *Br. J. Pharmacol.*, 118, 179-185.
6. RANTALA, H., UHARI M. & HIETALA J. (1995). Factors triggering the first febrile seizure. *Acta Paediatrica.*, 84, 407-10.