

## 体外癫痫模型中低温阻断神经元细胞过度同步放电的机制研究

高 轩<sup>1</sup>, 黄金伟<sup>2</sup>, 刘 舒<sup>1</sup>, 李永秋<sup>1</sup>, 李洪亮<sup>3</sup>, 李莉萍<sup>4</sup>

(1. 唐山工人医院神经内科, 河北唐山 063000; 2. 唐山工人医院分院内科, 河北唐山 063000;

3 江苏省淮安市第三人民医院神经内科, 江苏淮安 223001; 4 北京宣武医院癫痫中心, 北京 100053)

**摘要:**目的 观察低温在治疗癫痫发生过程中的细胞学机制。方法 使用单-双-膜片钳技术, 对 4-氨基吡啶诱导的癫痫小鼠模型的海马和皮层神经元细胞进行穿孔, 分别记录不同温度下细胞的电生理变化。结果 持续低温能阻断 4-氨基吡啶诱导的海马神经元的持续性放电并增加输入电阻。通过双-膜片钳记录显示相距较远的 CA1 和 CA3 区域的锥体神经元有显著的同步性, 但锥体神经元和中间神经元间的同步性较弱。在 CA1 和 CA3 神经元中, 低温可以阻断节律性动作电位的放电行为, 并能破坏其同步性; 但在中间神经元中低温阻断节律性放电时并不会破坏动作电位。结论 低温对  $\gamma$ -氨基丁酸传导和分泌影响程度不同, 干扰了神经网络的同步放电, 从而阻断癫痫样放电。另外,  $\gamma$ -氨基丁酸释放导致的中间神经元动作电位持续放电, 也增强了低温的抗癫痫作用。

**关键词:** 低温; 癫痫;  $\gamma$ -氨基丁酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.18.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)18-2319-04

## Research on mechanisms of low temperature for blocking excessive synchronization discharge in vitro epilepsy model

Gao Xuan<sup>1</sup>, Huang Jinwei<sup>2</sup>, Liu Shu<sup>1</sup>, Li Yongqiu<sup>1</sup>, Li Hongliang<sup>3</sup>, Li Liping<sup>4</sup>

(1. Department of Neurology, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Department of

Internal Medicine, the Branch Hospital of Tangshan Worker's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China;

3. Department of Neurology, the Third People's Hospital of Huai'an City, Huai'an, Jiangsu 223001, China;

4. Department of Epilepsy Center, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100053 China)

**Abstract: Objective** To investigate the cytological mechanism of the low temperature for treating the epilepsy occurrence process. **Methods** The hippocampus and cortex neurons in the 4-aminopyridine induced mouse epilepsy model were performed the perforation by using the single-and dual-patch clamp technique and the electrophysiologic changes under different temperatures were recorded respectively. **Results** The continuous low temperature could block the continuous discharge of the hippocampus neurons induced by 4-aminopyridine and increase the input resistance. The dual-patch clamp recordings showed that the pyramidal neurons in the CA1 and CA3 regions far apart from each other had the significant synchronism, but the synchronism between the pyramidal neurons and interneurons was weaker. In CA1 and CA3 neurons, hypothermia could block the rhythmic action potential discharges and destroyed their synchronism; however, in blocking rhythmic discharges of interneurons, hypothermia did not destroy the action potentials. **Conclusion** Hypothermia affects  $\gamma$ -aminobutyric acid conduction and secretion to different degrees and interferes the synchronic discharge of neural network, thus blocks the epileptiform discharge. In addition, continuous discharge of interneurons action potentials induced by  $\gamma$ -aminobutyric acid release would enhance the antiepileptic effects of hypothermia.

**Key words:** hypothermia; epilepsy; gama-aminobutyric acid

低温疗法作为治疗婴儿围生期缺氧、缺血脑病的标准疗法, 在难治性癫痫中也得到了初步研究。治疗性低温不仅可以减少脑细胞凋亡和早期坏死的风险, 降低脑细胞的代谢速率, 减少一氧化碳和氧自由基的释放, 同时低温疗法可减少阵发性癫痫发作, 但不会引起大脑的急性或延迟损伤<sup>[1]</sup>。这些试验表明低温是一种除手术切除外治疗难治性局部癫痫的替代性疗法, 同时还可以避免手术切除带来的神经功能缺陷。但目前低温对癫痫样放电的细胞机制尚不清楚。Yang 等<sup>[2]</sup>指出快速低温可以减少突触前神经递质释放, 其中在海马培养物中, 瞬时受体电位通道 V(TRPV)-4 起着重要作用, 但目前国内研究较少, 也缺乏相关数据, 限制了低温疗法在治疗创伤性脑损伤、脑卒中和癫痫中的应用。为此本文研究了低温对体外癫痫模型的阻断机制, 检测了可能涉及到的 TRPV 通道, 传导或接受  $\gamma$ -氨基丁酸(GABAergic)中间神经元的选择性效应以及海马和海马外脑区域的网络同步性, 为临床低温治疗癫痫提供理论

依据。

## 1 材料与方法

**1.1 海马切片的制备** 从产后 14~27 d 的 C57BL/6 J 小鼠中制备包含海马和邻近皮层部分的皮层脑切片(250~300  $\mu$ m), 切片包含了海马、丘脑、内嗅皮质和新皮质, 在 37  $^{\circ}$ C 恢复 30 min 并持续灌注卡波金(5 mL/min)人工脑脊液(aCSF)[内含 NaCl(120 mmol)、KCl(3.1 mmol)、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(1.25 mmol)、NaHCO<sub>3</sub>(26 mmol)、葡萄糖(5.0 mmol)、MgCl<sub>2</sub>(1.0 mmol)和 CaCl<sub>2</sub>(2.0 mmol), 渗透压 305 mOsm, pH 7.4]。开始试验后, 在不同温度下将切片浸入 aCSF 中。使用红外线微分干涉差垂直显微镜(E600FN Nikon, Tokyo Japan)观察细胞。使用以下试剂填充膜片钳: K-葡萄糖酸盐(145)、EGTA(1.1)、MgATP(5.0  $\mu$ mol), 用 HEPES-KOH(10)调至 pH 7.2, 渗透压 295 mOsm。海马细胞的原代培养按参考文献[2]描述的方法制备。

**1.2 膜片钳记录** 从扁平玻璃毛细管(PA)中拉出膜片电极(5~7 MΩ)(PP-83; Narishige, Tokyo, Japan)。膜片钳放大器(Axopatch 1D; Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA)使用 2 kHz 低通量贝塞尔滤波器过滤当前和电压信号并外接 Digidata 1322A 数据获取系统和 pCLAMP 10 软件(Molecular Devices)。同时使用两个膜片钳放大器(Axopatch 1D)对整个细胞的电压和电流钳进行双重记录。通过解剖学定位和测定动作电位鉴定锥体神经元或 GABAergic 中间神经元。在细胞外通过填充了 aCSF 的玻璃微喷嘴(端电阻, 2~5 MΩ)记录自发癫痫样放电。时域响应包括时域兴奋性突触后电势和群体峰电位。记录海马 CA1-3 区域锥体层的自发放电, 比较基础水平和不同低温下 CA1/2 和 CA3 区的细胞和不同亚区的中间神经元的膜片钳数据。

**1.3 多电极微阵记录** 在海马和皮层中通过 60 通道穿孔多电极微阵(MEA)(Multichannel Systems, Reutlingen, Germany)进行同时时域记录<sup>[4]</sup>。使用 MCRack(多通道系统, Reutlingen, Germany)和 MEA 工具进行离线数据分析和绘图。使用 Spike2 version 7.04 软件(Cambridge Electronic Design Ltd, Cambridge, UK)分析每个通道的峰电位。根据峰度曲线分析放电, 根据定量分析结果考察不同细胞类型的低温效应。

**1.4 体外模型癫痫发作的诱导** 将海马区域 CA3 或 CA1/2 细胞转移到 50 μM 4-AP 的细胞灌注培养基中培养, 观察用药后的细胞自发癫痫样放电。主要试验药物为荷包牡丹碱(25 μM), 钠离子通道阻断剂河豚毒素(TTX, 0.5~1.0 μmol), 2-氨基-3-(5-甲基-3-氧-1,2-恶唑-4-yl)丙酸(AMPA)受体拮抗剂 NBQX(5 μmol), 甘氨酸受体拮抗剂士的宁(5 μmol), γ-氨基丁酸(GABA)类似物和选择性 GABA<sub>A</sub> 受体激动剂加波沙朵(10 μmol), 瞬时受体电位(TRP)通道激动剂薄荷脑和辣椒素(12.5 μmol), 以及拮抗剂抗辣椒碱(10 μmol)和钆红(RR, 0.1、1.0、10.0 μmol); 使用乙醇溶解 TRPV4 拮抗剂 4α-佛波酯-12,13-二奎酸(4α-PDD, 20 μmol, Sigma)稀释比例为 1:1 000。所有药物均购自 Sigma 公司。

**1.5 统计学处理** 应用 Clampfit 10 软件进行数据分析并制图。每 5 s 检测 1 次当前脉冲, 检测重复注射 240 ms-25 pA 的膜输入电阻。对 17 只小鼠的 20 CA3 和 17 CA1/CA2 细胞进行膜片钳记录, 使用配对或独立样本 *t* 检验进行统计学比较。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 低温终止癫痫样放电的细胞机制** 在使用 4-AP 时记录小鼠海马切片膜片钳信号, 包括了 CA1/CA2、CA3 锥体神经元和定位到接近锥体层的视觉识别中间神经元。低温阻断了 4-AP 诱导的锥体神经元自发动作电位放电的发生(图 1A)。在所有类型的细胞中, 低温可以通过去极化(CA1/CA2 中 *n*=9/12)或超极化(CA3 中 *n*=4/6)诱导动作电位的阻断。多数 CA1/CA2 神经元中记录的电压钳膜去极化与内向电流有关, 而多数 CA3 神经元中超极化与外向电流有关(图 1B)。TTX 能抑制 CA1/CA2 和 CA3 神经元快速低温诱导的去极化。但 CA3 神经元中常出现的去极化是 TTX 非敏感的(*n*=4)(图 2A)。研究 TTX 及相应超极化和去极化电流注入, 由于电压更高, 因此通过显著提高膜输入电阻获得低温效应(85%±15%, *n*=5)(图 2B)。输入电阻升高, 提示低温能阻断高温时(>30 °C)活化的热敏 TRPV4 离子通道。

**2.2 TRPV4 拮抗剂对海马神经元细胞电流的作用** 在 34 °C (40±7)pA 时比在 22 °C (240±55)pA 时, 4α-PDD(20 μmol)

诱导海马神经元细胞培养物产生的内向电流显著减小(图 3A), 在 32 °C 和 20 °C 时 4α-PDD(20 μM)均不能诱导 CA3 锥体神经元切片(*n*=3)产生电流(图 3B)。在 CA3 神经元的记录得到相似的结果, 薄荷脑(TRPM8 通道选择性拮抗剂)无法改变静息膜电位, 输入电阻和低温去极化效应存在的情况下, 32 °C 时电压钳位为 -60 mV(*n*=3)。在试验中, 本研究使用突触后通道阻断剂混合物(NBQX、荷包牡丹碱、和士的宁)。使用这些混合物后, 3 个浓度的 RR(0.1、1.0 和 10.0 μmol)都不能在电压 -60 mV, 32 °C 改变 CA3 神经元膜电阻或阻断低温作用(图 3C)。

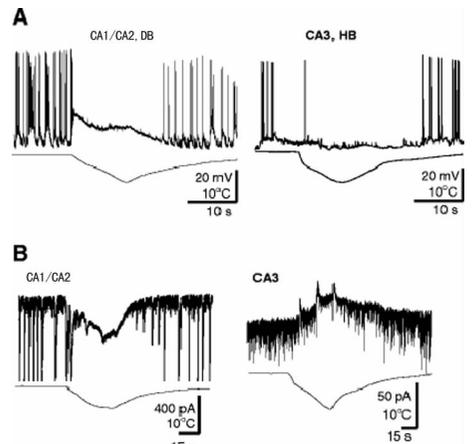


图 1 4-AP 诱导的海马 CA1/CA2 与 CA3A 神经元细胞在快速低温状态下自发电位放电电流图

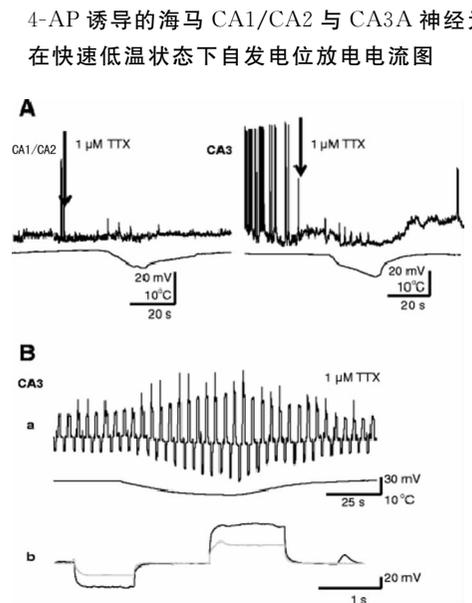
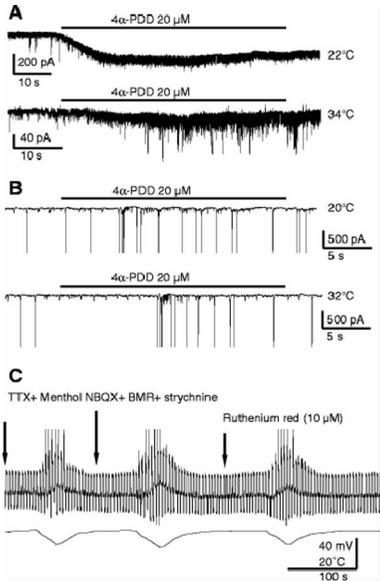


图 2 TTX 诱导的海马 CA1/CA2 与 CA3A 神经元细胞在快速低温状态下自发电位放电电流图

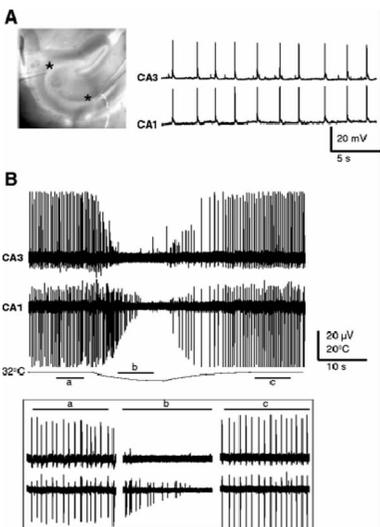
**2.3 温度对海马网络同步性的影响** 利用双重膜片钳对切片进行细胞内和细胞外同步海马神经元记录和时域记录(*n*=18)。使用 4-AP 后的显示锥体细胞和同时记录的 CA1 和 CA3 细胞的细胞内(图 4A)和细胞外(图 4B)发现记录数据的同步性等级存在差异(*n*=5)。如图 4B 所示, 低温能可逆地阻断这种同步性, 而快速低温会抑制 CA3 锥体细胞自发放电, 位于 CA3 锥体层边缘的中间神经元只表现出活性降低却没有完

全阻断放电活性。在 10 个相似的配对中都出现了这种对于低温的应答,并且通过 pMEA 记录数据对其进行比较。如图 4B 所示,基础记录数据显示出在 40% 的配对(CA1 锥体神经元和定位在辐射层中间神经元同时记录数据)中锥体细胞和中间神经元表现出显著的动作电位放电的同步性。所有病例中,低温均能对锥体细胞和中间神经元产生明显的差异效应。在锥体神经元中,低温会在静息后产生动作电位放电的提高,但在中间神经元中动作电位始终保持不变(图 4Bb)。在复温后一段时间动作电位保持去同步性(图 4Bc)。最终两种细胞动作电位完全恢复(图 4Bd)。



A: 海马神经元膜片电位为 -60 mV, 使用 20 μmol 的 4α-PDD 后引出内向电流; B: 对海马切片 4α-PDD 无法诱导出电流; C: 薄荷脑对 CA3 神经元的静息电位, 输入电阻和低温效果无影响。

图 3 TRPV4 诱导的海马 CA1/CA2 与 CA3A 神经元细胞快速低温状态自发电位放电电流图



A: 左右两侧的双膜片钳; B: 同时对细胞外进行刺激发现 CA1 和 CA3 细胞同步变化; C: 低温可破坏这种同步性变化。

图 4 快速低温状态下海马 CA1/CA2 与 CA3A 神经元细胞内外同步自发电位放电电流图

使用重复去极化脉冲, 结果发现中间神经元的基础放电率显著高于锥体细胞 [(32.0 ± 3.4) Hz, (6.0 ± 1.0) Hz, P = 0.003]; 在未使用 4-AP 时, 低温能显著降低锥体细胞的放电

速率 (P = 0.013), 但不会显著降低中间神经元的放电速率。使用 pMEA 同时记录定位在不同海马核外皮层区域 (8 个切片, 4 只小鼠) 的电极测得的局部时域电位。这些记录数据提示使用 4-AP 过程中发作期间放电同步进行。相反, 皮层电极显示海马区域并不会出现发作样持续放电。而且, 单个电极记录了皮层和海马多单位放电 (与 4-AP 诱导的癫痫样放电不同步) 的长脉冲。低温对于皮层和海马癫痫样和单位放电的作用不同。低温会阻断海马和发作样皮层活性, 但不会影响持续放电的多单位活性。

### 3 讨论

本研究观察了低温对神经元活性及其细胞核网络机制的影响, 结果发现在 CA1 和 CA3 锥体细胞内电流钳记录数据显示低温可诱导去极化或超极化, 阻断动作电位放电。而阻断海马锥体神经元的动作电位可以引起去极化或超极化, 在存在 TTX 的情况下, 降温只能引起超极化导致外向电流, 增加了由神经元复温引起的内向电流的可能性。应答超极化和去极化电流注入能显著提高膜输入电阻, 这也进一步证实了这一结论。由于 TRPV4 能在原代培养的海马神经元中表达并被较高温度 (>30 °C) 所激活, 因此这种阳离子通道能够作为一种介导低温效应的理想候选物。但其选择性激动剂 4α-PDD 无法在低温切片中诱导电流, 这就提示 TRPV4 通道的表达受到培养温度的限制。试验中辣椒素激动剂或辣椒碱拮抗剂无法在 32 °C 时使 CA3 神经元产生电流, 因此本研究的结果排除了其 TRPV1 激活的可能性。同样, TRPM8 通道涉及到此过程的可能性也被排除, 因为该通道低温激活的阈值为 25 °C。钉红的结果进一步提供证据推翻了热敏 TRP 通道参与癫痫样放电的可能性, 因为钉红不能改变海马神经元中的低温效应。在所有检测神经元中常见的低温效应是膜输入电阻升高。而关于温度改变膜结构的问题还有待阐明。在使用 4-AP 时双重膜片钳记录数据的结果显示远距离的 CA1 和 CA3 锥体神经元之间具有较高的同步性, 而锥体神经元和中间神经元间的同步性较小。在低温时, 会破坏 CA1 和 CA3 锥体神经元的动作电位放电的同步性和节律性。同时, 降温会阻断中间神经元的节律性放电, 但不会影响动作电位放电。在低温过程中这种去同步效应不会持续, 但在所有细胞类型中复温都不会使这种效应逆转。由于在没有使用 4-AP 时也会出现去极化电流输入, 因此低温对于锥体神经元和中间神经元间动作电位放电的差异效应并非 4-AP 所引起 [3-5]。pMEA 记录数据还揭示了低温可逆地阻断 4-AP 诱导的海马和皮层位点的癫痫样放电, 许多放电速率较高的细胞受到低温的不同影响。与应答低温终止癫痫样放电的效应不同, 本研究推测的快速峰值中间神经元的频率没有明显降低 [5], 与膜片钳记录结果一致, 这就说明中间神经元和锥体神经元存在不同的温度阈值。低温对于锥体细胞和中间神经元的优势效应的机制可能与这些神经元中内源性动作电位放电机制的差异、电压门控离子通道变化和这些细胞的突触传入有关。试验中在自发突触活性下, 即使没有使用 4-AP, 也会出现低温的差异效应, 这表明中间神经元的独特峰值特性可能是这其中的关键。国外一些新的数据也显示海马中间神经元能大量表达电压门控钠离子通道 NaV1.1 亚基变异体, 而锥体神经元表达 NaV1.6 亚基 [6-7]。对这些不同通道的温度敏感性都有详细的生物物理学研究 [8]。GABAergic 神经元在大脑不同的网络中通过同步化神经网络起到抗癫痫作用。因此, 这种现象提高低温快速中间神经元同步放电降低的可能

性,可能是低温通过干扰海马中不同细胞和网络的正常同步性起到抗癫痫活性的机制之一,而且中间神经元动作电位持续放电可能通过 GABA 的释放起到额外的抗癫痫作用,并且低温能使阶段性抑制性突触电流的阻断作用延长。高温引起临床条件下癫痫的效应已经明确。在一定程度上,GABAA 介导的抑制性突触电流对温度变化十分敏感<sup>[9]</sup>,低温通过降低突触电荷转移在突触起惊厥剂的作用。虽然对于儿童发热性癫痫的确切的机制尚未阐明<sup>[2]</sup>,但它与涉及 GABAA  $\gamma 2$  亚基的突变引起的温度依赖的突触效应改变有关<sup>[10]</sup>。本研究观察到的中间神经元低温的不同效应提示低温的抗癫痫效应很可能是由 GABA 受体所介导的<sup>[11]</sup>。

低温治疗主要通过干扰海马中不同细胞和网络的正常同步性起到抗癫痫活性,从而阻断体外模型的癫痫样放电。需要指出的是,尽管目前有大量的体外和体内数据,但低温设备作为癫痫和其他神经病变的治疗手段进入临床阶段仍受到诸多技术问题的限制,今后的进一步研究还需要一种安全有效的传热和散热方式,以探究人体内的低温治疗细胞机制,推动低温疗法应用于临床试验。

#### 参考文献:

- [1] Gancia P, Pomero G. Brain cooling therapy[J]. *Minerva Pediatr*, 2010, 62(3 suppl 1): 173-175.
- [2] Yang XF, Ouyang Y, Kennedy BR, et al. Cooling blocks rat hippocampal neurotransmission by a presynaptic mechanism: observations using 2-photon microscopy[J]. *J Physiol*, 2005, 567(Pt1): 215-224.
- [3] Pak DT, Yang S, Rudolph-Correia S, et al. Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP[J]. *Neuron*, 2001, 31(2): 289-303.
- [4] Gonzalez-Sulser A, Wang J, Motamedi GK, et al. The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a per-

forated multi-electrode array [J]. *Neuropharmacology*, 2011, 60(7/8): 1142-53.

- [5] Andersson DA, Nash M, Bevan S. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(12): 3347-3355.
- [6] Jiruska P, Csicsvari J, Powell AD, et al. High-frequency network activity, global increase in neuronal activity, and synchrony expansion precede epileptic seizures in vitro [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(16): 5690-5701.
- [7] Qu L, Leung LS. Effects of temperature elevation on neuronal inhibition in hippocampal neurons of immature and mature rats [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(12): 2773-2785.
- [8] Hill EL, Hosie S, Mulligan RS, et al. Temperature elevation increases GABA(A)-mediated cortical inhibition in a mouse model of genetic epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2011, 52(11): 179-184.
- [9] Motamedi GK, Salazar P, Smith EL, et al. Termination of epileptiform activity by cooling in rat hippocampal slice epilepsy models [J]. *Epilepsy Res*, 2006, 70(2/3): 200-210.
- [10] Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A, et al. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4 [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(7): 1566-1575.
- [11] Ziburkus J, Cressman JR, Barreto E, et al. Interneuron and pyramidal cell interplay during in vitro seizure-like events [J]. *J Neurophysiol*, 2006, 95(6): 3948-3954.

(收稿日期:2014-01-24 修回日期:2014-03-18)

(上接第 2318 页)

能否直接抑制 HSC 的活化,或者生姜醇提取物能通过哪些间接途径抑制 HSC 的活化? 则有待后续进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, et al. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(167): 167sr1.
- [2] Tacke F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012, 5(Suppl 1 Proceedings of Fibroproliferative disorders: from biochemical analysis to targeted therapies Petro E Petrides and David Brenner): S27.
- [3] 张红霞,王军. 生姜醇提取物药理学研究进展 [J]. *中医研究*, 2008, 21(3): 60-62.
- [4] Kubra IR, Rao LJ. An impression on current developments in the technology, chemistry, and biological activities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) [J]. *Crit Rev*

*Food Sci Nutr*, 2012, 52(8): 651-688.

- [5] 邓立明,彭成江,齐波,等. 生姜醇提取物对家兔肝脏缺血-再灌注损伤的保护作用 [J]. *大理学院学报*, 2008, 7(10): 10-13.
- [6] 秦燕,刘仁贵,苏娟,等. 生姜醇提取物抗大鼠肝纤维化的实验研究 [J]. *广东医学*, 2012, 33(24): 3710-3712.
- [7] Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis [J]. *Curr Opin Gastroentero*, 2009, 25(3): 223-229.
- [8] Latella G, Vetuschi A, Sferra R, et al. Targeted disruption of Smad3 confers resistance to the development of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in mice [J]. *Liver Int*, 2009, 29(7): 997-1009.
- [9] 吴丽,郑仕中,潘苏华,等. 免疫细胞对肝纤维化发展的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(12): 1557-1560.
- [10] 王军,张红霞,贾士奇,等. 生姜对全脑缺血再灌注大鼠脑组织炎症细胞因子和黏附分子含量的影响 [J]. *医药论坛杂志*, 2011, 32(15): 12-14, 18.

(收稿日期:2014-01-08 修回日期:2014-03-10)