

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.06.009

CTZ 慢性自发性癫痫模型 海马神经元中 γ -氨基丁酸变化

孔淑贞, 冯敏, 陈刚

重庆工商大学 环境与资源学院/重庆高校天然药物研究重点实验室, 重庆 400067

摘要: γ -氨基丁酸(Gamma-aminobutyricacid, GABA)是中枢神经系统中非常重要的一种抑制性神经递质,和受体结合后介导抑制性神经传导作用.通过侧脑室注射炭烯氯噻嗪(CTZ)诱发癫痫行为发作,并观察在慢性期内出现自发性癫痫发生,建立慢性癫痫动物模型.采用 Nissl 染色和免疫组化染色方法对海马 CA1 区和 CA3 区神经元数目和 GABA 表达情况进行了研究,发现 CTZ 慢性癫痫模型中海马 CA1 区和 CA3 区神经元数目无明显变化,但是神经元胞体和树突中 GABA 表达减少,说明抑制性神经元中 GABA 减少是 CTZ 慢性癫痫反复性癫痫行为发作的重要原因之一.

关键词: 炭烯氯噻嗪(CTZ); 癫痫; 海马; GABA

中图分类号: R742.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)06-0067-07

γ -氨基丁酸(Gamma-aminobutyricacid, GABA)是中枢神经系统中非常重要的一种抑制性神经递质, GABA 与受体结合后调节抑制性神经传递^[1-2].在癫痫发作中,兴奋性神经递质系统与抑制性神经递质系统平衡被打破,使脑内神经元兴奋性增加,从而导致放电频率增加、幅度增高以及同步化放电,造成癫痫疾病的发生^[3].

炭烯氯噻嗪(Cyclothiazide, CTZ)不仅可以阻滞兴奋性神经递质谷氨酸 AMPA 受体的去敏感化作用^[4-5],而且也会对抑制性神经递质 GABA 的释放和受体表达有减少作用^[6],因此 CTZ 癫痫模型的双机制特征使其优于其他癫痫动物模型^[7].前期研究已经发现 CTZ 慢性癫痫模型中海马结构 GABA 能神经元减少、GABA 的合成酶 GAD 和转运酶 GAT 都有明显减少^[8],但是对于海马神经元中 GABA 表达情况仍不清楚.本研究通过侧脑室注射 CTZ 建立慢性癫痫动物模型,研究 CTZ 慢性癫痫大鼠海马神经元中 GABA 的表达情况,进一步研究慢性自发性癫痫模型的发生发展机制.

1 材料与方法

1.1 实验动物

Sprague-Dawley 大鼠, 250~280 g, 由腾鑫生物技术公司购入. 标准动物房饲养, 温度 23~26 °C,

收稿日期: 2020-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81401082); 重庆市科委重点项目(cstc2015jcyjBX0031).

作者简介: 孔淑贞, 博士, 讲师, 主要从事癫痫疾病发病机制及治疗药物筛选的研究.

12 h; 12 h 昼夜循环光照, 自由饮食. 适应环境 1 周后进行实验.

1.2 CTZ 慢性癫痫大鼠模型建立

1.2.1 侧脑室内埋管

大鼠用 3% 戊巴比妥钠麻醉后, 剪掉头皮和脑膜, 双氧水处理颅骨, 以前囟为坐标原点, 在前囟后 0.3 mm, 中缝旁 1.3 mm 处钻孔, 将套管埋置进左侧脑室内(深 4.0 mm), 并用两颗螺丝和牙托粉进行固定. 埋管后恢复 1 周进行后续实验.

1.2.2 侧脑室注射

恢复 1 周后进行癫痫诱导及癫痫行为学观察实验. 18 只大鼠随机分为两组: CTZ 癫痫模型组 13 只和二甲亚砜(DMSO)对照组 5 只, 分别通过微量注射器在侧脑室内注射 CTZ 和 DMSO. 大鼠置于鼠笼内, 自由活动, 通过预埋置套管向侧脑室内注射 CTZ(0.25 μmol , 5 μL), 连续注射 3 d, 对照组大鼠侧脑室内连续 3 d 注射 DMSO 5 μL .

1.2.3 癫痫行为观察

在给药后, 每天给实验动物注射 CTZ 和 DMSO 后 3 h 观察动物行为并记录, 按照 Racine 评分标准对癫痫发作程度将其行为分为 0-V 级:

0 级: 无任何异常行为, 自然状态;

I 级: 咀嚼、眨眼、立须、耳动、流涎、面部抽搐;

II 级: 点头运动、湿狗样抖动、颈部抽搐;

III 级: 单侧肢体抽搐;

IV 级: 双侧肢体抽搐的同时伴随出现站立、全身僵直;

V 级: 在 IV 的基础上失去平衡, 出现摔倒、身体完全强直.

大鼠的癫痫行为评分达到了 IV 级及以上, 可认为是构建癫痫模型成功^[9]. 成功的癫痫动物模型, 进一步通过录像记录实验动物注射 CTZ 或 DMSO 后 6 个月内慢性癫痫行为的发作情况, 其情况按照上述 Racine 评分标准进行记录分组.

1.3 组织学染色

在行为学实验结束后, 所有实验动物在 3% 戊巴比妥钠麻醉后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水快速灌注冲出血液, 4% 多聚甲醛灌注进行内固定, 之后断头取脑组织. 4% 多聚甲醛后固定 24 h, 梯度酒精脱水后, 石蜡包埋, 进行石蜡切片, 厚度为 6 μm , 每只大鼠间隔取 4~6 片进行后续染色.

1.3.1 Nissl 染色

切片进入梯度酒精脱蜡后, 蒸馏水润洗 5 min, 0.1% 硫堇溶液染色 10 min, 蒸馏水快速润洗几秒钟, 95% 盐酸酒精分色 2~10 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片.

1.3.2 免疫组化染色

二甲苯 10 min, 梯度酒精脱蜡, 蒸馏水 10 min, TBS 缓冲液润洗 5 min, 3% 双氧水消除内源性过氧化物酶活性, 0.125% 的胰蛋白酶修复抗原活性, 山羊血清封闭, 加一抗 anti-GABA(Abcam, 浓度为 1:100)置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜. 次日, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(SP-9001, 北京中杉金桥生物技术公司)37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱内孵育 1 h, 最后 DAB 显色. 在每两个过程中间均使用 TBS 缓冲液润洗 5 min, 各 3 次. 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片.

1.3.3 图片分析

每只大鼠取 4~6 片染色切片使用 Nikon 显微镜在 200 倍明场视野下拍照, 对 Nissl 染色和免疫组化图片中海马 CA1 和 CA3 区中全部阳性神经元进行细胞计数和神经元胞体染色进行光密度分析, 取每张切片

平均值代表该大鼠海马中阳性神经元的分布情况。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS 13.0 进行统计分析, 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, DMSO 和 CTZ 之间的差异采用独立样本 t 检验。 $p < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 CTZ 癫痫模型建立

5 只 DMSO 对照组大鼠只有洗脸等正常行为, 无异常行为出现。 13 只 CTZ 癫痫模型组大鼠在注射 CTZ 后全部出现 IV 级及以上行为, 癫痫模型建立成功。 之后 6 个月观察期中, 10 只大鼠出现自发性癫痫行为, 其中 6 只达到 IV 级及以上行为。 根据 Racine 分级法, 大鼠的癫痫行为评分达到 IV 级及以上, 可认为是构建癫痫模型成功^[9]。 因此在 13 只 CTZ 急性癫痫模型中, 其中 6 只出现了 IV 级及以上癫痫行为的 CTZ 癫痫动物达到了慢性自发性癫痫模型标准, 确定为慢性自发性癫痫动物模型, 成功率为 46% (图 1)。 本文使用 6 只出现自发性癫痫行为发作的 CTZ 癫痫大鼠和 5 只 DMSO 对照组大鼠进行后续组织学染色研究。

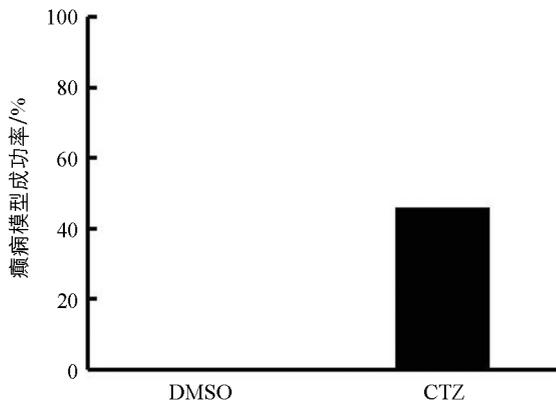


图 1 慢性期 CTZ 慢性癫痫动物模型成功率

2.2 CTZ 慢性癫痫大鼠模型海马中神经元无明显变化

Nissl 染色是神经元染色常用的一种方法, 通过 Nissl 染色可以对神经元结构及神经元数目进行检测^[10]。 实验结果显示, 海马结构中 DMSO 对照组和 CTZ 慢性癫痫模型组 CA1 和 CA3 区锥体神经元被染成紫色 (图 2)。 两组神经元分布相似, CA1 区锥体神经元 3 到 4 排, CA3 区锥体神经元 4 到 5 排, 排列整齐, 仅少量神经元结构异常。 对 CA1 区和 CA3 区 Nissl 染色神经元进行计数, DMSO 对照组海马 CA1 区和 CA3 区神经元数目分别为 331.04 ± 29.38 和 169.73 ± 7.21 , CTZ 慢性癫痫模型组海马 CA1 区和 CA3 区神经元数目分别为 325.94 ± 38.42 和 163.87 ± 29.73 , 两组神经元数目差异无统计学意义 (图 3), CTZ 慢性癫痫模型海马 CA1 区和 CA3 区并无明显神经元损伤和死亡。 在既往研究中, KA 致病模型等模型动物海马中会出现大量的神经元凋亡^[11, 12], 但 CTZ 慢性癫痫模型尽管在慢性期出现了自发性癫痫发作, 但海马神经元并未出现明显的损伤和死亡, 因此癫痫疾病发生机制不仅和神经元损伤、死亡相关, 还与其他机制有关。

2.3 CTZ 慢性癫痫大鼠模型海马神经元中 GABA 减少

GABA 能神经元是海马结构中非常重要的抑制性神经元, 可以释放抑制性神经递质 GABA 调节海马神经元兴奋性的发生。 GABA 释放到突触间隙后, 与突触后受体结合介导抑制性调节, 因此海马神经元中 GABA 含量对于抑制性调节有着至关重要的作用^[13]。 图 4 免疫组化染色显示, DMSO 对照组大鼠海马 CA1 和 CA3 区 GABA 阳性神经元被染成棕色, 主要分布在海马锥体细胞层, 锥体细胞层各层中均有 GABA 阳性神经元分布。 棕色的 GABA 免疫阳性颗粒主要分布在锥体神经元细胞浆中, 说明在 GABA 能神经元内大量的 GABA 分泌储存在胞浆中。 在 DMSO 对照组大鼠海马 CA1 和 CA3 区, GABA 阳性染色除了分布在神经元细胞浆中之外, 分子层突起内也有大量的 GABA 阳性染色, 棕色染色的突起呈平行分布在分子层内。 CTZ 慢性癫痫大鼠模型海马 CA1 和 CA3 区也有大量 GABA 免疫阳性神经元存在, GABA 免疫阳性颗粒主要分布于神经元的胞浆内, 但与 DMSO 对照组相比染色较浅, 而且分子层内

突起无棕色 GABA 免疫阳性颗粒分布,说明 CTZ 慢性癫痫模型海马 CA1 和 CA3 区神经元胞浆和神经元突起内 GABA 含量下降.

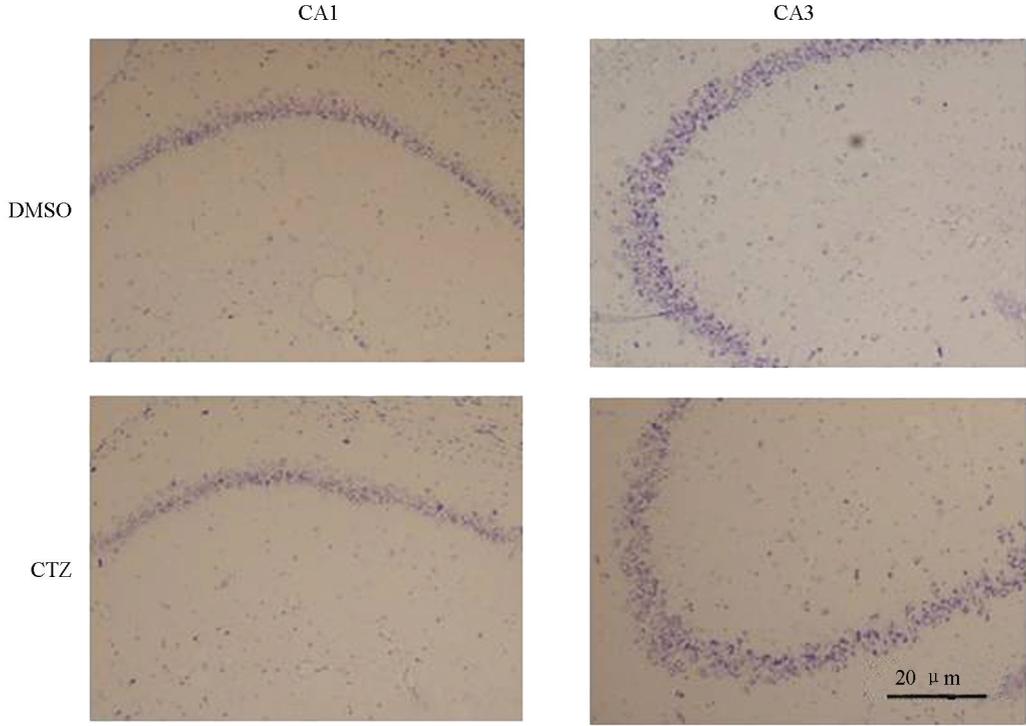


图 2 CTZ 慢性癫痫模型海马 Nissl 染色

对海马 CA1 和 CA3 区 GABA 免疫阳性染色进行光密度分析(图 5),结果显示,DMSO 对照组大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经元胞体 GABA 免疫阳性光密度分别为 661.40 ± 17.65 和 625.07 ± 7.39 ,说明在 DMSO 对照组大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经元胞体内有大量的 GABA 分布.对 CTZ 慢性癫痫模型大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经元胞体进行 GABA 免疫阳性光密度分析后结果分别为 424.48 ± 45.10 和 361.82 ± 51.30 ,与 DMSO 对照组大鼠相比下降了 35.82% 和 42.12%,两组差异有统计学意义($p < 0.05$).通过光密度分析可以看出,CTZ 慢性癫痫模型中海马 CA1 和 CA3 区神经元胞体内 GABA 含量急剧下降.

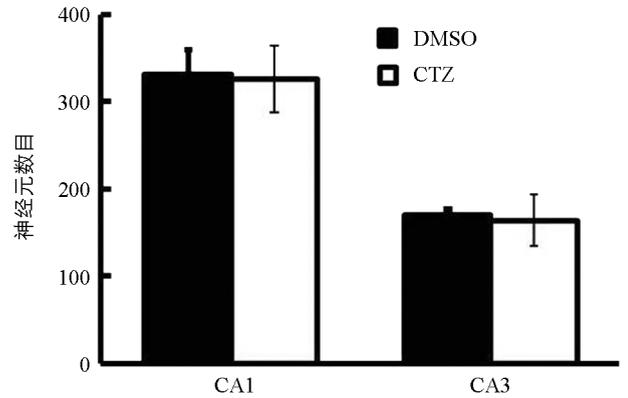


图 3 CTZ 慢性癫痫模型海马神经元统计图(Nissl 染色)

3 讨论与结论

在中枢神经系统中,兴奋性神经递质系统和抑制性神经递质系统处于平衡状态,共同调节大脑的兴奋性传递等活动.一旦兴奋性神经递质系统功能增强或者抑制性神经递质系统功能下降,都会引起平衡打破,大脑内兴奋性增强,引起癫痫的发生.在抑制性神经元中,20%~30%的抑制性神经元是 GABA 能神经元^[14],其轴突末端可以通过谷氨酸脱羧酶将兴奋性神经递质谷氨酸脱羧形成抑制性神经递质 GABA^[15].GABA 释放到突触间隙后,突触后受体结合增加突触后神经元 Cl^- 的通透性诱发抑制性突触后电位,或者

与 G 蛋白偶联受体结合介导抑制性神经传导作用^[16]. 因此, 当大脑内 GABA 含量减少或者受体表达下调, 都可能造成兴奋性神经递质系统占优势导致神经元放电增加, 引起癫痫发生.

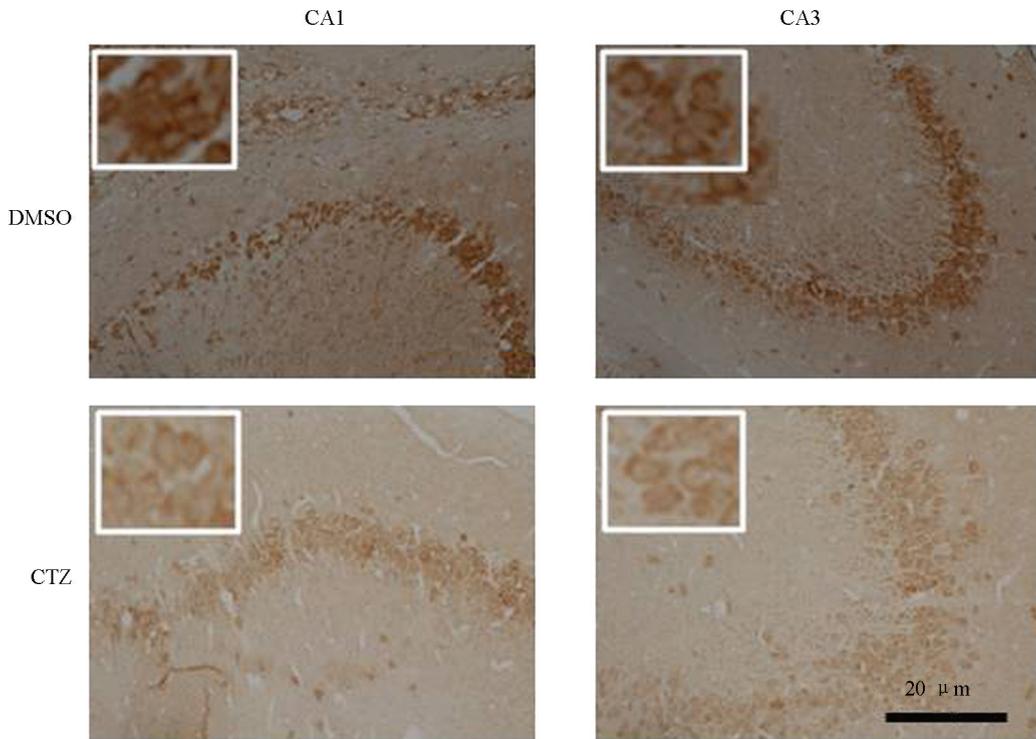


图 4 CTZ 慢性癫痫模型海马 GABA 神经元免疫组化染色

本研究结果显示, CTZ 慢性癫痫模型组海马 CA1 区和 CA3 区 Nissl 染色神经元与 DMSO 对照组相比差异无统计学意义, 说明 CTZ 慢性癫痫组神经元并未出现明显的损伤或死亡等情况, 因此 CTZ 慢性癫痫模型组癫痫行为发生并非是由海马内神经元损伤或神经元丢失所致, 很可能和神经元释放神经递质及受体的改变有关. 通过免疫组化染色发现, CTZ 慢性癫痫模型组大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经元胞体和树突内 GABA 含量明显下降, 分别下降了 35.82% 和 42.12%, 因此会造成其介导的抑制功能大幅度下降, 引起 CTZ 慢性癫痫模型慢性期明显的癫痫行为反复性发作.

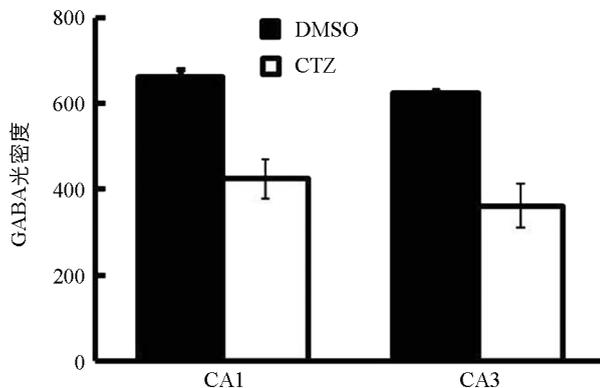


图 5 CTZ 慢性癫痫模型海马 GABA 神经元免疫组化染色光密度统计图

海马神经元中 GABA 的减少可能与谷氨酸脱羧酶含量或功能下降有关. 谷氨酸脱羧酶将兴奋性神经递质谷氨酸脱羧形成抑制神经递质 GABA. 谷氨酸脱羧酶含量减少或者功能下降, 造成其脱羧过程效率降低, 引起 GABA 合成减少. 既往研究中发现, CTZ 慢性癫痫模型中 GAD 阳性神经元明显减少, GAD 含量降低^[7]. 由于海马 CA1 区和 CA3 区 GAD 含量减少, 造成了 CTZ 慢性癫痫模型大鼠海马内神经元 GABA 合成大幅度减少, 与受体结合下降, 造成突触后抑制功能下降, 兴奋性神经递质系统功能占优势, 海马内神经元兴奋性增加, 造成慢性期 CTZ 慢性癫痫模型大鼠自发性、反复性癫痫行为发作.

本研究通过侧脑室注射 CTZ 诱发癫痫行为发作, 并观察慢性期内大鼠出现自发性癫痫行为发作, 建立

慢性癫痫动物模型。采用 Nissl 染色和免疫组化染色方法对海马 CA1 区和 CA3 区神经元数目和 GABA 表达情况进行了研究,发现 CTZ 慢性癫痫模型中 GABA 表达减少可能是造成自发性癫痫发作的重要原因之一。在治疗癫痫的药物研究中,有多种药物是通过调节 GABA 递质系统的作用而发挥作用,如苯二氮卓类和巴比妥类药物通过延长氯离子通道开放时间增强 GABA 的抑制作用^[17],地塞米松可以通过调节基因转录增加 GABA 合成^[18],褪黑素对 GABA 有正向调节作用^[19],丙戊酸钠通过 GABA 通路上调抑制性神经元功能^[20],通过增加神经元 GABA 合成或释放,增加 GABA 与受体结合增强抑制性调节作用,减轻或阻止癫痫的发生,对癫痫疾病进行治疗。因此 CTZ 癫痫模型中 GABA 递质系统功能受损,尤其是 GABA 含量减少,对于促进 GABA 合成和释放药物的开发为治疗癫痫提供了重要的理论依据。

参考文献:

- [1] 王 军,李承宗,龙 浩,等. 颞叶癫痫动物模型研究进展 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2019, 45(1): 60-64.
- [2] 沈 强,潘 科,郑文佳,等. 厌氧/好氧处理对茶叶中 GABA 含量富集及其品质的影响研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(9): 146-152.
- [3] ALBRECHT J, SIDORYK-WEGRZYNOWICZ M, ZIELINSKA M, et al. Roles of Glutamine in Neurotransmission [J]. *Neuron Glia Biology*, 2010, 6(4): 263-276.
- [4] MENNERICK S, ZORUMSKI C F. Presynaptic Influence on the Time Course of Fast Excitatory Synaptic Currents in Cultured Hippocampal Cells [J]. *J Neurosci*, 1995, 15: 3178-3192.
- [5] ISHIKAWA T, TAKAHASHI T. Mechanisms Underlying Presynaptic Facilitatory Effect of Cyclothiazide at the Calyx of Held of Juvenile Rats [J]. *The Journal of Physiology*, 2001, 533(2): 423-431.
- [6] DENG L B, GONG C. Cyclothiazide Potently Inhibits Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptors in Addition to Enhancing Glutamate Responses [J]. *PNAS*, 2003, 100: 13025-13029.
- [7] KONG S, QIAN B, LIU J, et al. Cyclothiazide Induces Seizure Behavior in Freely Moving Rats [J]. *Brain Res*, 2010, 1355: 207-213.
- [8] KONG S Z, CHENG Z H, LIU J H, et al. Downregulated GABA and BDNF-TRKB Pathway in Chronic Cyclothiazide Seizure Model [J]. *Neural Plasticity*, 2014(3): 310146.
- [9] RACINE R J. Modification of Seizure Activity by Electrical Stimulation. II. Motor Seizure [J]. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1972, 32(3): 281-294.
- [10] CHEN Q, HE S, HU X L, et al. Differential Roles of NR2A and NR2B-containing NMDA Receptors in Activity-dependent Brain-derived Neurotrophic Factor Gene Regulation and Limbic Epileptogenesis [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2007, 27(3): 542-552.
- [11] JIN G, ZHU M D, YU H J. Pathogenesis of Epilepsy [J]. *Journal of Shenyang Medical College*, 2012, 14(2): 111-113.
- [12] NESE D, FIGEN S, YASEMIN Ö, et al. Cell Death and Survival Mechanisms are Concomitantly Active in the Hippocampus of Patients with Mesial Temporal Sclerosis [J]. *Neuroscience*, 2013, 237: 56-65.
- [13] SIEGHART W, SPERK G. Subunit Composition, Distribution and Function of GABA(A) Receptor Subtypes [J]. *Curr Top Med Chem*, 2002, 2(8): 795-816.
- [14] 王 坤,苏海涛,宋金东,等. 神经肽 Y 对海人酸致痫大鼠中 GABA_B 受体的影响 [J]. *贵州医药*, 2017, 41(1): 14-16.
- [15] HOUSER C R, ESCLAPEZ M. Downregulation of the $\alpha 5$ Subunit of the GABA(A) Receptor in the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy [J]. *Hippocampus*, 2003, 13(5): 633-645.
- [16] 扶 宇,李经纶,王本瀚,等. 癫痫生物标志物的研究进展 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2018, 23(5): 376-378.

- [17] WAN J, CHAO L, LEE A C, et al. Higher Expression of ER-CC1 maybe Associated with Resistance to Adjuvant Platin-Num-Based Chemotherapy in Gastric Cancer [J]. *Cancer Invest*, 2017, 35(2): 85-91.
- [18] CITRARO R, LEO A, CONSTANTINI A, et al. MTOR Pathway Inhibition as a New Therapeutic Strategy in Epilepsy and Epileptogenesis [J]. *Pharmacological Research*, 2016, 107: 333-343.
- [19] PETKOVA Z, TCHEKALAROVA J, PECHLIVANOVA D, et al. Treatment with Melatonin after Status Epilepticus Attenuates Seizure Activity and Neuronal Damage but does not Prevent the Disturbance in Diurnal Rhythms and Behavioral Alterations in Spontaneously Hypertensive Rats in Kainate Model of Temporal Lobe Epilepsy [J]. *Epilepsy & Behavior*, 2014, 31: 198-208.
- [20] 曾春梅, 雷丹青, 孙兰凤, 等. 致痫大鼠海马谷氨酸及 γ -氨基丁酸在痫性发作后含量变化规律 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(11): 1571-1574, 1588.

Changes in GABA in the Hippocampal Neurons of a Chronic Cyclothiazide Chronical Seizure Model

KONG Shu-zhen, FENG Min, CHEN Gang

College of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University /

Key Laboratory of Natural Medicine Research of Chongqing Education Commission, Chongqing 400067, China

Abstract: Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an important inhibitive neurotransmitter in the central nervous system, and mediates the inhibitive neurotransmission when bound with the receptors. In this study, CTZ (cyclothiazide) was injected into the left lateral ventricle to induce recurrent seizure behavior and to build a chronic CTZ seizure model. Nissl staining and immunohistochemistry staining were used to detect hippocampal neuron number and GABA expression in CA1 and CA3 of the chronic CTZ seizure model. The results showed that the number of neurons in CA1 and CA3 of the model little changed as compared with that of the DMSO control group, but GABA expression of soma and dendrite decreased significantly in them. All the above results demonstrated that decreased GABA in the inhibitive neurons is one of the most important reasons for recurrent seizure behavior of the chronic CTZ seizure model.

Key words: Cyclothiazide; seizure behavior; hippocampus; GABA

责任编辑 周仁惠