

低温抑制海马脑片 NMDAR1 过度激活的机制研究

王晓锋¹ 刘双喜² 曾庆淦¹ 曾玲² 钟玉石² 王三虎² 满荣勇²

1 广东省南方医科大学第三附属医院 广东 广州 510630; 2 湖南省怀化市第一人民医院 湖南 怀化 418000;

【摘要】目的：研究低温抑制癫痫发作的分子机制。方法：制作大鼠离体器官型海马脑片模型，并用谷氨酸诱导模拟缺血性损伤。观察组模型置于 33 ± 1 的环境中干预处理，对照组继续置于 37 的环境中，比较两组模型干预前后 CA1、CA3 区神经元死亡细胞百分比、场电位振幅和频率的变化、突触前膜神经递质释放量的改变和突触后膜 N-甲基-D-天冬氨酸受体 1 (NMDAR1) 表达量的变化。结果：观察组 CA1、CA3 区神经元在干预后 6h 死亡细胞比例达到峰值，此后逐渐回落，干预后各时间段的神经元死亡细胞比例均低于对照组 ($P < 0.05$)；观察组场电位振幅降低了 (22.13 ± 8.85)%，频率降低了 (79.14 ± 3.67)%，与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；观察组突触前神经递质 Glu 的释放量在干预后低于对照组 ($P < 0.05$)，GABA 的释放量在干预后高于对照组 ($P < 0.05$)；观察组 CA1、CA3 区 NMDAR1 蛋白水平低于对照组 ($P < 0.05$)。结论：轻度低温可通过抑制 NMDA 通路上神经递质的释放与受体的表达而发挥抗癫痫作用。

【关键词】低温；NMDAR1；癫痫

癫痫是一类脑部神经元异常过度超同步化放电产生的综合征，是神经内科常见疾病之一，据《全球癫痫报告》统计，2019 年，全球约有 5000 多万癫痫患者，其中约 40% 是脑梗死后引发的^[1]。脑梗死后，脑组织缺血缺氧，致使钠泵衰竭，大量钠离子内流破坏了细胞膜稳定性，加之兴奋性神经递质如谷氨酸、天冬氨酸大量合成并作用于突触后膜，致使细胞膜过度去极化，从而诱发病性放电^[2]。有研究表明，脑梗死后产生的兴奋性神经递质谷氨酸可通过与突触后膜的 N-甲基-D-天冬氨酸受体 1 (NMDAR1) 相结合介导钙离子内流，从而诱发癫痫^[3]。轻度低温治疗 ($33-35$) 是一种无创的、可运用于脑部缺血性损伤治疗的新技术，大量研究表明，该治疗方式可减轻缺血缺氧对脑部神经元的毒害，减少神经元的坏死，对梗死后癫痫的发生也有抑制作用^[4]。当前，各类研究对轻度低温通过何种途径发挥脑保护作用及抗癫痫作用的机制阐释得并不清晰。Julie·M.Ziobro 等人^[5]的研究中，利用谷氨酸的毒性作用，制备了器官型海马脑片缺血后症状性癫痫的模型，与动物模型一致性较好，是一种理想的研究路径。因此，本研究通过制作大鼠离体器官型海马脑片模型，探索低温对神经细胞的保护作用，以及低温对 NMDA 通路的影响，以揭示内在的分子机制，为临床治疗脑梗死并发癫痫患者提供参考。

1 材料和方法

1.1 器官型海马脑片模型的制备

将出生后 8 天的 40 只 Wister 雄性大鼠麻醉后断头，取出大脑，经背侧冠状面切取海马组织，切成 0.4mm 左右的切片，置于平衡盐溶液中。取每个海马的中间 5 片，置于 6 孔组织培养皿中，该培养皿中培养基组成为：25% 马血清、25% Hanks 平衡溶液 (HBSS)、1% 青霉素 - 链霉素、36

mmol/L 葡萄糖和 25mmol/L HEPES 缓冲液 (pH7.2)。培养箱环境设置为：温度 37 、5% $CO_2/95\%$ 空气的混合气体。培养 1 天后，换成不含抗生素的培养基，之后每周 2 次更换培养基。

1.2 谷氨酸损伤

海马脑片培养 3 周后，将培养基换成 3.5mmol/L 的谷氨酸培养基，置于培养箱中培养 35 分钟，取出切片，用 HBSS 洗涤 2 次，置于之前的培养基中继续培养 24 小时。

1.3 低温干预处理

将 40 只大鼠培养的切片模型随机分为观察组和对照组两组各 20 份。对照组继续在温度为 37 的培养箱中培养 2 小时，观察组置于温度为 33 ± 1 左右的培养箱中培养 2 小时。处理完毕后，测量分析各项数据。

1.4 死亡神经元测定

使用二乙酸荧光素 (FDA) - 碘化丙啶 (PI) 分子荧光法评估 CA1、CA3 区神经元在干预前 1 小时、干预后 6 小时、24 小时、72 小时神经元死亡细胞比例。FDA 可用于细胞活力的测定，在 490-500nm 波长的激发光下呈绿色荧光。PI 可用于标记死亡细胞或细胞膜不完整的细胞，可在 546nm 波长的激发紫外光下观察到。使用 Leica 荧光显微镜，取每只大鼠的 1 张切片，在高倍镜 (400 倍) 下选取切片 CA1、CA3 区的 2 个部位进行观察。神经元死亡细胞比例等于 PI 标记的细胞数除以 PI 标记的细胞数与 FDA 标记的细胞数之和。

1.5 场电位记录

取两组的切片培养物，使用人工脑脊液灌注 (5ml/min)，人工脑脊液组成为 120mmol/L NaCl、3.5mmol/L KCl、1mmol/L $MgSO_4$ 、2.5mmol/L $CaCl_2$ 、1.25mmol/L NaH_2PO_4 、26mmol/L $NaHCO_3$ 、10mmol/L 葡萄糖和 95% $O_2-5\%$ CO_2 ，调节 pH 至 7.4，渗透压至 310mOsm。使用倒置显微镜观

察细胞。从硅硼酸盐毛细玻璃管中拉出 2-5M 电阻的膜片电极，用以下溶液填充膜片钳：145mmol/LK- 葡萄糖酸盐、1mmol/LMgCl₂、1.1mmol/LLEGTA、4mmol/LNaATP、15mmol/L 磷酸肌酸、10mmol/LHepes，调节 pH 至 7.2，渗透压至 295mOsm。使用 EPC-9 型膜片钳放大器及其配套软件 PULSE/PULSEFIT 记录数据。记录两组海马切片在不同的温度环境中 CA1、CA3 区域锥体神经元的膜片钳数据变化。

1.6 突触前神经递质测定

使用高效液相色谱法—质谱检测法测定两组切片培养物干预前及干预后的突触前神经递质谷氨酸 (Glu)、- 氨基丁酸 (GABA) 释放量的变化^[6]。使用 Thermo Ultimate 3000 超高效液相色谱仪检测系统和 Thermo Q Exactive 高分辨质谱仪。两组各取 10 份干预前及干预后 24 小时的海马脑片切片培养物，剪碎，置入研磨管中，加入缓冲液，经多次离心提纯后得到纯化的神经突触体。将纯化的样品置入 1.5mL 的 EP 管中，用萃取液稀释后进行均质化处理，并进一步衍生化处理，得到最终样品上机测定。

1.7 NMDAR1 蛋白水平测定

使用免疫组化染色测定 NMDAR1 蛋白水平。两组各取 10 份干预前及干预后 24 小时的海马脑片切片培养物，制作石蜡切片，按照免疫组化染色步骤进行 NMDAR1 染色，使用 Leica DM2500 显微镜及其图像分析软件在高倍视野下测定 CA1、CA3 区各 3 个区域的累计光密度值，计算两组的平均光密度值。平均光密度值 = 累计光密度值 / 观察面积。

1.8 统计学分析

使用 SPSS22.0 软件进行数据分析。其中，计量资料符合正态分布时用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间对比行 t 检验。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 比较两组海马脑片模型干预前后 CA1、CA3 区神经元死亡细胞百分比

对照组 CA1、CA3 区神经元随着时间推移，死亡细胞比例逐渐升高；观察组 CA1、CA3 区神经元在干预后 6h 死亡细胞比例达到峰值，此后逐渐回落。对比两组干预后各时间段的神经元死亡细胞比例，观察组均低于对照组，差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 1、表 2、图 1、图 2。

表 1 两组海马脑片模型干预前后 CA1 区神经元死亡细胞百分比比较

组别	干预前 1h	干预后		
		6h	24h	72h
对照组 CA1	10.87 ± 2.86	27.69 ± 2.55	20.47 ± 2.11	18.36 ± 1.83
观察组 CA1	10.64 ± 2.93	31.26 ± 2.13	37.01 ± 2.24	48.18 ± 2.62
t 值	0.251	4.805	24.671	41.729
P 值	0.402	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表 2 两组海马脑片模型干预前后 CA3 区神经元死亡细胞百分比比较

组别	干预前 1h	干预后		
		6h	24h	72h
对照组 CA3	15.21 ± 3.11	46.05 ± 4.38	53.47 ± 3.84	57.64 ± 4.90
观察组 CA3	15.06 ± 3.15	34.26 ± 4.51	30.16 ± 5.01	21.55 ± 3.86
t 值	0.152	8.387	16.515	25.875
P 值	0.440	< 0.001	< 0.001	< 0.001

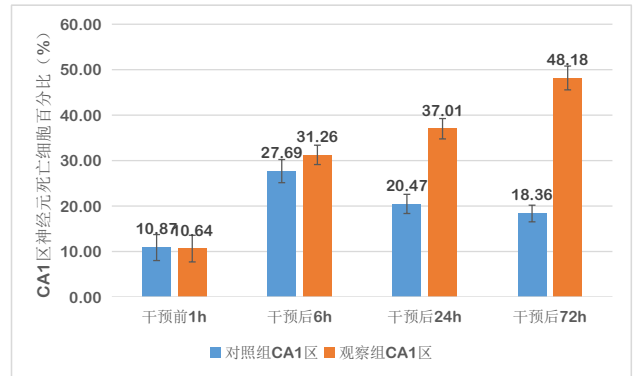


图 1 两组海马脑片模型干预前后 CA1 区神经元死亡细胞百分比

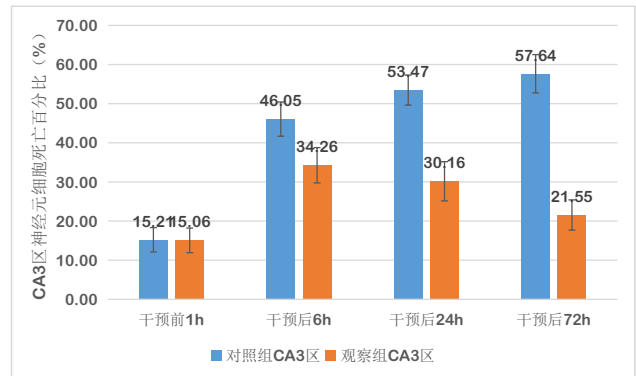


图 2 两组海马脑片模型干预前后 CA3 区神经元死亡细胞百分比

2.2 比较两组海马脑片模型干预前后场电位振幅、频率变化

轻度低温干预降低了癫痫发作时场电位的振幅和频率，在低温干预 2 小时的过程中，场电位振幅降低了 (22.13 ± 8.85) %，频率降低 (79.14 ± 3.67) %，与对照组相比差异有统计学意义 (P < 0.05)。见图 3、图 4。

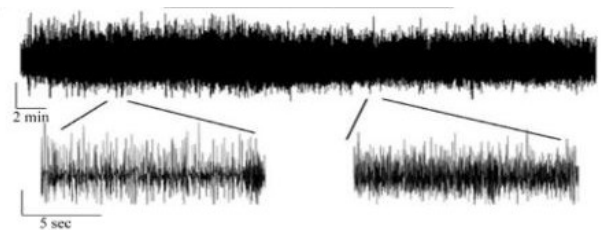


图 3 对照组干预 2 小时的场电位

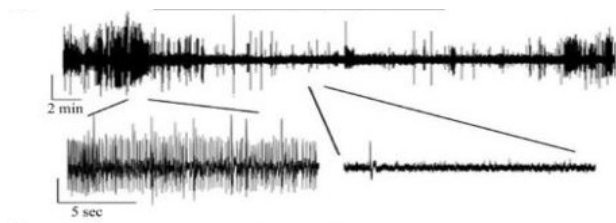


图 4 观察组干预 2 小时的场电位

2.3 比较两组海马脑片模型干预前后突触前神经递质 Glu、GABA 释放量的变化

观察组突触前神经递质 Glu 的释放量在干预后明显降低，与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；观察组突触前神经递质 GABA 的释放量在干预后明显升高，与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 5、图 6。

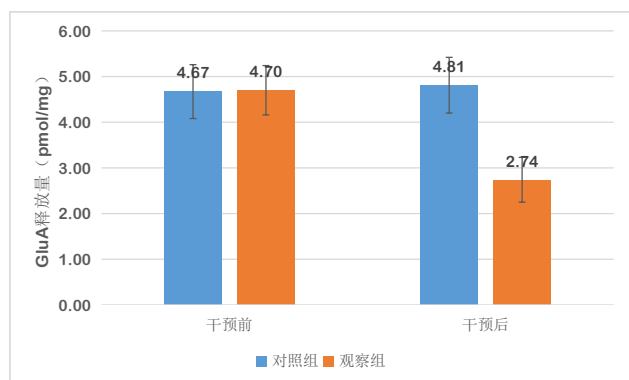


图 5 两组海马脑片模型干预前后突触前神经递质 Glu 释放量

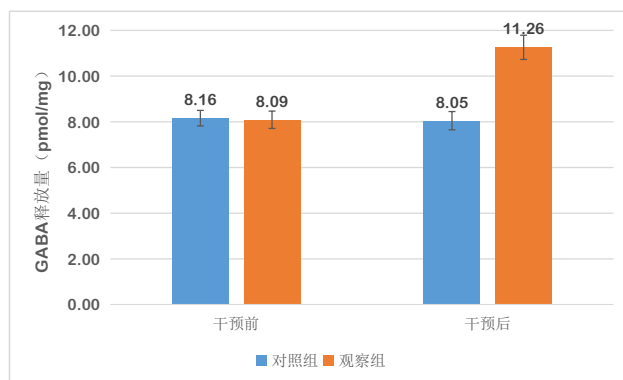


图 6 两组海马脑片模型干预前后突触前神经递质 GABA 释放量

2.4 比较两组海马脑片模型干预前后 CA1 区、CA3 区 NMDAR1 光密度值变化

观察组 CA1 区、CA3 区 NMDAR1 光密度值在干预后均明显降低，与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 7、图 8、图 9、图 10、图 11、图 12。

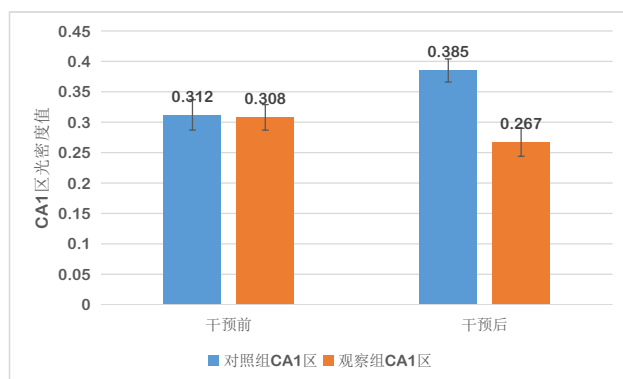


图 7 两组海马脑片模型干预前后 CA1 区 NMDAR1 光密度值

表 3 两组海马脑片模型干预前后突触前神经递质 Glu、GABA 释放量的比较

组别	Glu (pmol/mg)				GABA (pmol/mg)			
	干预前	干预后	t 值	P 值	干预前	干预后	t 值	P 值
对照组	4.67 ± 0.59	4.81 ± 0.61	0.738	0.233	8.16 ± 0.34	8.05 ± 0.40	0.937	0.177
观察组	4.70 ± 0.54	2.74 ± 0.49	12.021	< 0.001	8.09 ± 0.38	11.26 ± 0.53	21.738	< 0.001
t 值	0.168	11.831			0.614	21.620		
P 值	0.434	< 0.001			0.271	< 0.001		

表 4 两组海马脑片模型干预前后 CA1 区、CA3 区 NMDAR1 光密度值比较

组别	CA1 区				CA3 区			
	干预前	干预后	t 值	P 值	干预前	干预后	t 值	P 值
对照组	0.312 ± 0.025	0.385 ± 0.019	10.397	< 0.001	0.387 ± 0.017	0.452 ± 0.025	9.615	< 0.001
观察组	0.308 ± 0.021	0.267 ± 0.023	5.887	< 0.001	0.39 ± 0.020	0.291 ± 0.028	12.867	< 0.001
t 值	0.548	17.689			0.511	19.182		
P 值	0.293	< 0.001			0.306	< 0.001		

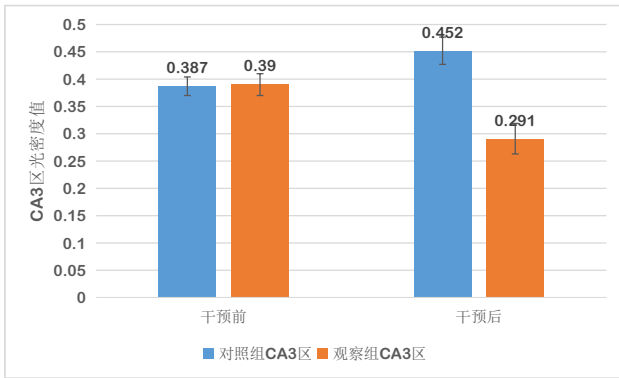


图 8 两组海马脑片模型干预前后 CA3 区 NMDAR1 光密度值



图 9 对照组 CA1 区干预前后 NMDAR1 表达 (400 倍)
注：左图干预前、右图为干预后

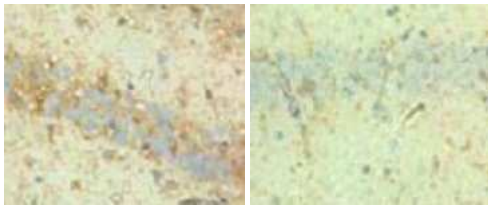


图 10 观察组 CA1 区干预前后 NMDAR1 表达 (400 倍)
注：左图干预前、右图为干预后



图 11 对照组 CA3 区干预前后 NMDAR1 表达 (400 倍)
注：左图干预前、右图为干预后

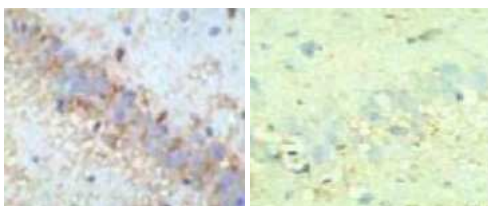


图 12 观察组 CA3 区干预前后 NMDAR1 表达 (400 倍)
注：左图干预前、右图为干预后

3 讨论

脑缺血是诱发癫痫的一大因素，脑梗后患者癫痫的发

生率较高，有研究显示，对于 60 岁以上的新发癫痫病例，45% 与脑血管病变相关。脑梗后，神经元经历了缺血再灌注损伤，大量自由基的产生破坏了细胞结构，进一步加重细胞损伤，细胞内离子通道开放关闭功能失常，极易发生自发性放电而诱发癫痫^[7]。NMDA 受体是一类离子型谷氨酸受体，主要分布于神经元细胞膜表面，海马组织分布密度最高，NMDAR1 是构成该受体的基本亚单位^[8]。大量研究表明，谷氨酸与 NMDAR 结合后可以介导癫痫的发生，并且导致神经元的损伤。在一项大鼠癫痫模型的研究中，诱发癫痫后导致了海马及颞叶皮质中 NMDAR1 蛋白表达上调，这一现象在海马 CA3 区和齿状回尤其明显，进而推测 NMDAR1 参与了癫痫的发生^[9]。有研究显示^[10]，癫痫持续状态时，神经元细胞死亡数量与持续时间呈正相关，而当使用 NMDA 受体拮抗剂时，细胞死亡比例减少，伴随细胞外钙离子浓度将低，由此引出，癫痫持续状态时细胞死亡与 NMDA 通路介导的钙离子外流有关。针对癫痫持续状态，除药物治疗外，临床上多辅以低温治疗。轻度低温治疗因其所降的温度低，发挥脑保护作用的同时，产生的并发症相对较少较轻，应用价值较高^[11]。部分研究显示^[12]，轻度低温可通过抑制 Na-K-ATP 酶影响神经细胞的兴奋性而控制癫痫。也有动物模型研究表示^[13]，轻度低温可改变突触间兴奋性与抑制性神经递质如谷氨酸、-氨基丁酸的释放影响细胞的信号转导，从而降低神经元兴奋性，改善癫痫持续状态。

本研究中，我们制备了大鼠器官型海马脑片模型，并用谷氨酸溶液诱导模拟缺血性损伤，从而诱发病理性放电。从表 1 和表 2 可以看出，在缺血性损伤后采取轻度低温干预可以降低神经元死亡细胞比例，起到脑保护作用。结合以往的研究报道，该作用的发生机制可能有以下几个方面：缺血性损伤后，大量自由基如超氧阴离子、羟自由基、一氧化氮等生成，攻击细胞线粒体、DNA 等，导致神经元细胞损伤或死亡，轻度低温可以抑制自由基的产生而发挥神经元保护作用^[14]；细胞凋亡与是多基因共同调控的结果，如 Bcl-2 家族、caspase 家族以及原癌基因及抑癌基因，轻度低温时，caspase-3 的表达减少，Bcl-2 表达增加，引起胶质纤维酸性蛋白上调，抑制了细胞凋亡，从而发挥脑保护作用^[15]；轻度低温治疗可抑制炎症细胞的黏附、聚集，减少脑缺血后引发的炎症因子的释放，如 IL-2、IL-2、IL-6、TNF-，阻断炎症级联反应，从而保护脑组织^[16]。从图 1 和图 2 可以看出，轻度低温确实可以抑制脑缺血后诱发的癫痫性放电，这对指导临床治疗有参考价值。黄亮^[17]在研究中提出，轻度低温可以抑制突触前膜兴奋性神经递质的释放，抑制神经细胞兴奋传导，阻止细胞外钙离子浓度的升高而终止癫痫。为探索低温抑制癫痫的具体机制，结合各项临床研究与猜想，我们研究了 NMDA 通路上神经递质与受体的表达情况，结果显示，轻度低温干预可抑制突触前膜兴奋性神经递质 Glu 的释放，促进突触前膜抑制性神经递质 GABA 的释放，

且突触后膜 NMDAR1 的表达下调,从而推断,轻度低温通过抑制 NMDA 通路的过度激活而起到抗癫痫作用。

轻度低温可减轻脑缺血后神经元的损伤,抑制神经元自发性放电,具有良好的脑保护作用,其抗癫痫作用可能是通过抑制 NMDA 通路上突触前神经递质 Glu 的释放与突触后受体 NMDAR1 的表达而实现的。

4 结论

【参考文献】

- [1] 张慧如,陈永明.卒中后癫痫发作及其发病机制的研究进展[J].中国脑血管病杂志,2020,17(02):86-91.
- [2] Soo Young Kwon,Ahmed Z.Obeidat,Padmini Sekar,et al. Risk factors for seizures after intracerebral hemorrhage:Ethnic/Racial Variations of Intracerebral Hemorrhage (ERICH) Study[J].Clinical Neurology and Neurosurgery,2020(02):192.
- [3] 刘熙.N-甲基-D-天冬氨酸受体在癫痫轴突损害中的作用及其分子机制研究[D].重庆医科大学,2017.
- [4] 杨国帅,周小艳,周治平等.亚低温对全脑缺血性癫痫大鼠认知功能和海马 synapsin 表达及突触超微结构的影响[J].实用医学杂志,2015,31(14):2261-2264.
- [5] Ziobro JM, Deshpande LS, DeLorenzon RJ.Organotypic hippocampal slice culture model of excitotoxic injury induced spontaneous recurrent epileptiform discharges[J].Bain Res,2011,(1371):110-120.
- [6] 赵芳,李强,梁梅丽,等.超高效液相色谱-串联质谱法快速测定大鼠血清中8种神经递质[J].分析化学,2018,46(01):121-128.
- [7] 黄越.脑梗继发性癫痫的因素与监测[J].现代预防医学,2011,38(21):4553-4554.
- [8] Bowers M Scott,Cacheaux Luisa P,Sahu Srishti U,et al.NYX-2925 induces metabotropic N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) signaling that enhances synaptic NMDAR and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor[J].Journal of neurochemistry,2020,152(5):523-541.
- [9] Zan Wang,Hongyu Jiang,Suisheng Wu,et al.N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 protein expression in the hippocampus and temporal cortex of kainic acid-induced epilepsy rats[J].Neural Regeneration Research,2010,5(14):1045-1049.
- [10] O. E. Zubareva, A. A. Kovalenko, V. B. Karyakin, et al.Changes in the Expression of Genes of the Glutamate Transporter and Subunits of the NMDA and AMPA Receptors in the Rat Amygdala in the Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy[J].Neurochemical Journal, 2018,Vol.12(3):222-227
- [11] Chen Hanbing,Wu Fei,Yang Penglei,Shao Jun,Chen Qihong,Zheng Ruiqiang.A meta-analysis of the effects of therapeutic hypothermia in adult patients with traumatic brain injury.[J].Critical care (London,England),2019,23(1):289-301.
- [12] Motamedi Gholam K,Lesser Ronald P,Vicini Stefano.Therapeutic brain hypothermia, its mechanisms of action, and its prospects as a treatment for epilepsy.[J].Epilepsia,2013,54(6):959-970.
- [13] Yang X-F, Ouyang Y, Kennedy BR, et al.Cooling blocks rat hippocampal neurotransmission by a presynaptic mechanism:observations using 2-photon microscopy[J].Physiol,2005(567):215-224
- [14] Jagdish Sokhi,Ugan Reddy. Therapeutic hypothermia and acute brain injury[J].Anaesthesia and Intensive Care Medicine,2019(21):12-17.
- [15] 丁力.亚低温治疗对心肺复苏后鼠脑组织凋亡相关蛋白和胶质纤维酸性蛋白的作用[D].苏州:苏州大学,2016.
- [16] 程馨.不同方式亚低温治疗对急性重症缺血性脑卒中脑保护作用的研究[D].内蒙古:内蒙古医科大学,2019.
- [17] 黄亮.亚低温处理对红藻氨酸致癫痫持续状态大鼠海马 HSP27、HSP70 表达的影响[D].桂林:桂林医学院,2015.

【作者简介】

1. 王晓锋(1979.11-),男,汉族,河南济源,副主任医师,博士研究生,主要从事神经重症方向的研究。
2. 满荣勇(1973.02-),男,苗族,湖南麻阳,副主任医师,博士研究生,主要从事神经免疫方向的研究。

【基金项目】

湖南省自然科学基金项目(2016JJ6108)