

# 癲癇大鼠模型中小胶质细胞激活的脑区特点

周艳杰 邱涛 胡露宇 方玉婷 肖哲曼

**【摘要】 目的** 探讨小胶质细胞在癲癇中的激活特点及其在癲癇中的作用。**方法** 将 12 只 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠随机分为对照组和癲癇组, 每组各 6 只; 癲癇组采用氯化锂-匹鲁卡品腹腔注射的方法造模, 对照组给予等量生理盐水; 癲癇发作 4 d 后取大鼠脑组织, 采用蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 和免疫组化的方法研究各组电离钙结合适配器分子-1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba1) + 小胶质细胞的表达情况。**结果** 与对照组大鼠模型相比, 癲癇组大鼠丘脑皮层环路 Iba1 的表达增加, 小胶质细胞的激活程度增加, 且小胶质细胞特异性地在梨状皮质、丘脑室旁核、丘脑外侧背核、腹外侧部分以及腹内侧丘脑核增生。**结论** 癲癇发作后小胶质细胞的激活和增生存在着明显的脑区选择性, 抑制丘脑皮层环路小胶质细胞的激活有望成为癲癇治疗的靶点。

**【关键词】** 癲癇 小胶质细胞 丘脑皮层环路 梨状皮质 丘脑室旁核

**【中图分类号】** R742.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2022)03-0262-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.03.014

**Characteristics of microglial activation in epileptic rat model** Zhou Yanjie, Qiu Tao, Hu Luyu, et al.  
Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

**【Abstract】 Objective** To investigate the activation characteristics and role of microglia in epilepsy. **Methods** 12 male SD rats were randomly divided into two groups equally as the control group and the epilepsy group. The epilepsy group was modeled with a lithium-pilocarpine intraperitoneal injection, and the control group was given the same amount of normal saline. Western blot and immunohistochemistry were used to study the expression of Iba1 + microglia in rats four days after an epileptic seizure. **Results** Compared with the control group, the expression of Iba1 in the thalamic cortical circuit and the activation degree of microglia were increased in the epileptic group, and microglia were specifically hyperplasia in the piriform cortex, paraventricular thalamic nucleus, lateral dorsal thalamic nucleus, ventrolateral part, and ventromedial thalamic nucleus. **Conclusion** The activation and proliferation of microglia after epileptic seizures were highly selective in brain regions. Inhibition of microglial activation in thalamic cortical circuitry was expected to target epilepsy treatment.

**【Key words】** Epilepsy Microglia Thalamus-cortex neural circuit Piriform cortex Paraventricular nucleus of thalam

癲癇是多种原因引起的脑部神经元高度同步化异常放电所致的临床综合征, 临床表现具有发作性、短暂性、重复性和刻板性的特点。最新的研究显示癲癇影响着全球 10% 的人, 给社会带来了极大的负担<sup>[1]</sup>。癲癇通常被认为与神经元的兴奋/抑制失衡有关, 其中主要与谷氨酸能信号传导的兴奋性神经递质增加和  $\gamma$ -氨基丁酸传导的抑制性神经递质减

少有关<sup>[2]</sup>。

尽管这一机制得到广泛认可, 但针对该机制的治疗性抗癲癇策略对很多患者来说是不够的<sup>[3]</sup>。近年来, 炎症和炎症介质的作用越来越受到重视, 成为了当前研究的重点之一<sup>[4]</sup>。小胶质细胞作为中枢神经系统的稳态调节器, 通过调节神经元活动和介导免疫炎症反应来参与癲癇的发生发展<sup>[5]</sup>。小胶质细胞在形态学和分子水平上的激活是其响应癲癇发生的主要标志<sup>[6]</sup>。明确小胶质细胞在癲癇中的激活特点对探究其在癲癇中的作用以及癲癇的临床治疗有着重要的指导意义, 但目前尚无文献系统地研究

小胶质细胞在癫痫中的脑区激活特点。本研究通过对癫痫大鼠模型的全脑区免疫组化染色,探讨了小胶质细胞在癫痫中的特点及可能作用,以期对癫痫的发病机制以及临床治疗提供一定的指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

无特异病原体(Specific pathogen free, SPF)级成年雄性大鼠 12 只,体重( $220 \pm 30$ )g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号为 SCXK(湘)2019-0004。湿度( $60 \pm 5$ )%、温度( $22 \pm 2$ )℃、12 h 光照/12 h 黑暗条件下正常饮水摄食,适应性喂养 1 周。本研究实验动物遵循 ARRIVE 指南和巴塞尔宣言有关规定,经本院伦理委员会审核批准通过<sup>[7]</sup>。

### 1.2 药物和试剂

氯化锂(北京索莱宝科技有限公司,批号为 No1212C023),匹鲁卡品(美国 Cayman 公司,批号为 0545396-4),水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号为 20181120),硫酸阿托品注射液(华润双鹤药业有限公司,批号为 H11020766),多聚甲醛固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G1101-500ML),牛血清白蛋白(Bovine albumin, BSA)(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G5001-100G),曲拉通 X-100(Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether, Triton X-100)(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G5060-100ML),山羊源电离钙结合适配器分子-1(Ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba1)抗体(日本 woko 公司,货号为 01127991),辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的驴抗山羊 IgG(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 GB23404),3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(武汉 biosharp 公司,货号为 NoBL732A),苏木素染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号为 CR2012211),双辛酸(Bicinchoninic acid, BCA)蛋白水平检测试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G2026-200T);十二烷基硫酸钠-蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodiumdodecylsulfate- polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G2003-50T)。

### 1.3 主要仪器

RM2125 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);正置显微镜(日本 Olympus BX51)。酶标仪(Perkin El-

mer);凝胶成像系统、垂直电泳槽、垂直转膜槽(BIO-RAD);高速离心机(Eppendorf);电子天平(Sartorius)。

### 1.4 方法

1.4.1 动物分组、造模与给药 SD 大鼠随机分为对照组(Control group)和癫痫组[癫痫持续状态(Status epilepticus, SE)group],每组各 6 只。腹腔注射 1.25% 氯化锂(125/kg,溶于生理盐水)18 h 后,皮下注射阿托品(1 mg/kg,溶于生理盐水)以阻止外周胆碱能反应,再过 0.5 h 后腹腔注射 1% 匹鲁卡品(35 mg/kg,溶于生理盐水)诱发癫痫发作等级达到 Racine 4 级或以上者纳入;在癫痫达到最大发作级别 10 min 后腹腔注射 4% 水合氯醛中止癫痫发作;对照组各步骤给予等量生理盐水。

1.4.2 癫痫大鼠模型发作程度分级 癫痫发作程度采用改良 Racine 量表进行分级<sup>[8]</sup>。即 0 级为无发作;1 级为口周及面部肌肉抽搐;2 级为点头或频繁抖动;3 级为前肢阵挛;4 级为前肢阵挛伴后肢站立的全身强直性发作;5 级为前肢阵挛伴有站立并摔倒、翻滚的全身强直阵挛发作。

1.4.3 免疫组化 大鼠麻醉后用 4% 多聚甲醛心脏灌注固定,石蜡包埋后切 4  $\mu$ m 厚的切片,脱蜡、梯度脱水、微波加热修复后用 3% Triton X-100 通透 10 min,3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 30~45 min,4℃ 孵育山羊抗大鼠 Iba1 一抗(1:800)过夜;复温后室温孵育驴抗山羊二抗 1 h, DAB 显示 2~10 min,苏木素染核,自来水冲洗终止显色;封片后于正置显微镜下进行观察。

1.4.4 Western Blot 检测组织 Iba1 蛋白表达水平 大鼠脑组织加入到放射免疫共沉淀试验(Radio immunoprecipitation assay, RIAP)裂解液[含 1% 苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)和 co-cotail]中裂解,用匀浆机在冰上充分匀浆后在 4℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清置于新的 EP 管中,用 BCA 法测定蛋白水平;95℃ 水浴使蛋白变性,20  $\mu$ g 蛋白量上样,SDS-PAGE 胶电泳、湿法转聚偏氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 1 h 后滴加山羊抗大鼠 Iba1 抗体和 GAPDH 一抗后 4℃ 孵育过夜,洗膜后滴加 IgG 二抗室温孵育 1 h,洗膜后(10 min $\times$ 3 次)进行扫膜显色,并分析各组条带蛋白灰度值。

1.4.5 统计学处理 采用 Graph Pad Prism 8.0;计量资料以均数 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)描述;以  $P$

<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织不同部位小胶质细胞表达情况

Western Blot 显示,癫痫大鼠模型较对照组 Iba1 蛋白水平在皮层(cortex)、丘脑(thalamus)以及延髓(medulla)均显著升高( $P<0.05$ )(图 1)。

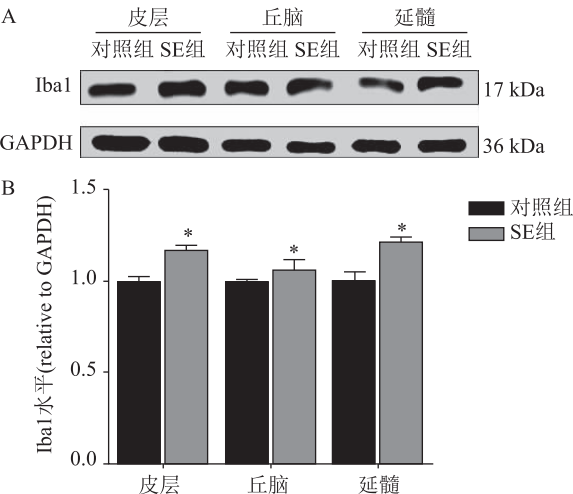


图 1 脑组织各部位 Iba1 表达水平 与对照组比较,\*  $P<0.05$

2.2 癫痫大鼠模型中小胶质细胞特异性募集脑区

2.2.1 梨状皮质 免疫组化显示,相较于对照组大鼠,癫痫大鼠模型梨状皮质(Piriform cortex,PC)小胶质细胞数量增加了 1 倍多( $P<0.5$ );同时小胶质细胞胞体增大,分支缩短,分支数量增加,呈现为阿米巴样的激活态(图 2)。

2.2.2 丘脑室旁核 与对照组大鼠相比,癫痫组大鼠模型在丘脑室旁核(Paraventricular nucleus of thalamus,PV)同样存在小胶质细胞的特异性增生和激活(图 2)。统计分析显示该部位癫痫大鼠模型小胶质细胞数量约为对照组大鼠小胶质细胞数量的 3 倍(图 2)。

2.2.3 丘脑外侧背核,腹外侧部分 在毗邻海马 CA3 区的丘脑外侧背核、腹外侧部分(Lateral dorsal nucleus of thalamus,ventral part,LDVL)癫痫大鼠模型的小胶质细胞同样存在特异性地增生和激活。小胶质细胞数量较对照组也显著增加(图 2)。

2.2.4 腹内侧丘脑核 癫痫大鼠腹内侧丘脑核(Ventromedial thalamic nucleus,VM)小胶质细胞数量显著多于对照组大鼠,且该部位相较于周围其他部位,小胶质细胞呈现出明显的聚集状态。

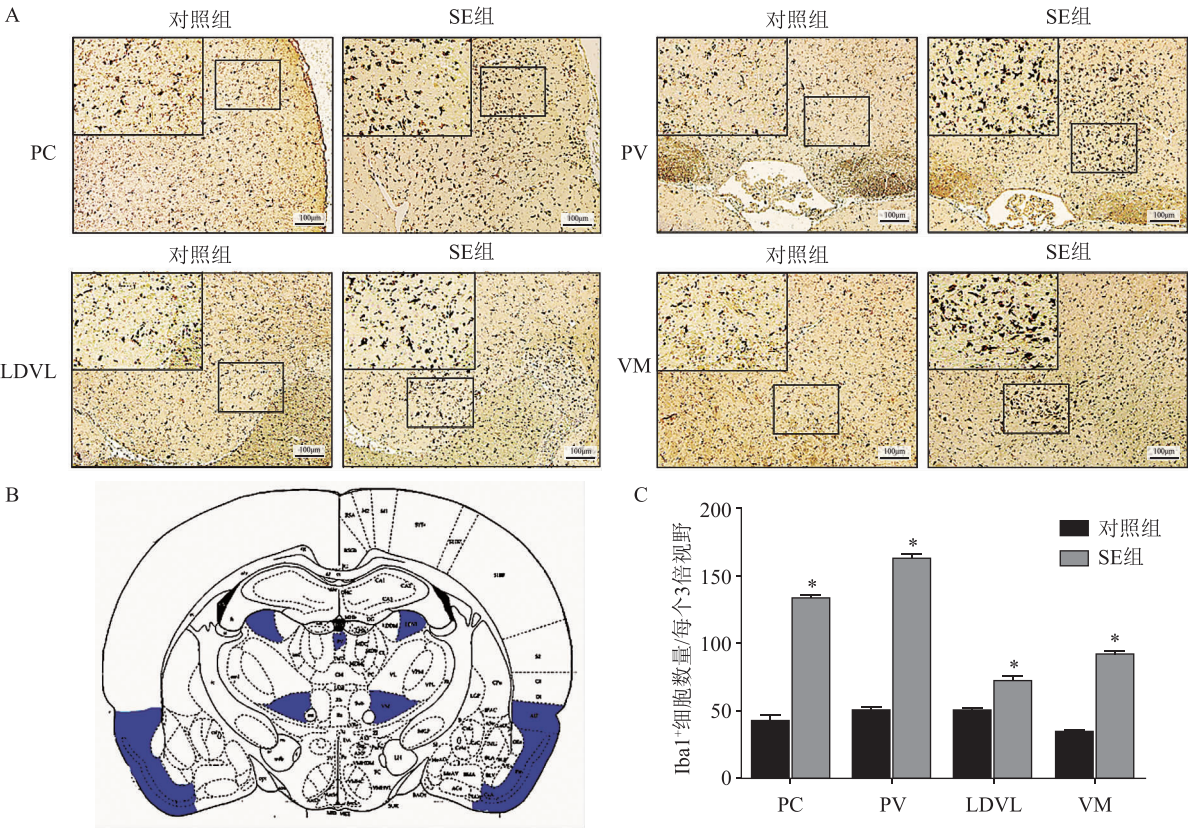


图 2 癫痫组和对照组大鼠中不同脑区小胶质细胞的表达情况 与对照组比较,\*  $P<0.05$

### 3 讨论

Iba1(Ionized calcium binding adaptor molecule 1)最早于 1996 年被发现,是一种高度保守的胞质钙结合蛋白,主要参与细胞运动和吞噬作用,是小胶质细胞的标志物之一,广泛用于人和动物中小胶质细胞的结构研究<sup>[9]</sup>。因此,本研究选择 Iba1 作为小胶质细胞的生物标志物探究小胶质细胞在癫痫大鼠模型中的脑区激活特点。

氯化锂-匹鲁卡品癫痫大鼠模型的全脑区切片及免疫组化染色显示,小胶质细胞在癫痫发生后被广泛激活,在形态学上表现为胞体增大,突触分支缩短,分支数量增加。与本研究结果相符的是有研究在可引发癫痫的局灶性皮质发育不良患者的尸检脑组织中观察到小胶质细胞的免疫反应性增加<sup>[10]</sup>。持续的小胶质细胞反应性已经被认为是癫痫的临床特征之一<sup>[6]</sup>。在动物模型中红藻氨酸诱发的癫痫小鼠模型中也发现海马小胶质细胞数量的延迟增加<sup>[11]</sup>。目前研究认为这是初始癫痫发作后小胶质细胞对神经元损伤的继发性反应<sup>[6]</sup>。

癫痫发作后小胶质细胞的激活进一步加剧了癫痫发作<sup>[12]</sup>。目前认为这主要与以下几点有关:1)小胶质细胞有可能在癫痫发作后引发脑部炎症,通过分泌炎症细胞因子直接或间接增加神经元活动<sup>[13]</sup>;2)癫痫发作后小胶质细胞调节异常神经发生,活化的小胶质细胞不仅吞噬了凋亡细胞,而且吞噬了新生成的活细胞,加重了癫痫发作后神经元的损伤<sup>[14]</sup>;3)小胶质细胞可以通过癫痫中的突触吞噬作用来直接调节突触结构<sup>[15]</sup>。

本研究发现小胶质细胞在癫痫发作后除了广泛激活之一特点之外,还在丘脑皮层环路存在特异性募集。参照第 3 版大鼠脑图谱,本研究显示小胶质细胞特异性募集的具体部位是梨状皮质、丘脑室旁核、丘脑外侧背核、腹外侧部分以及腹内侧丘脑核(图 2)。与本研究相符的是一项关于癫痫突发意外死亡的尸检报告显示 Iba1 标记的小胶质细胞存在着明显的区域特异性,以内侧丘脑和颞上回的标记最高<sup>[16]</sup>。

越来越多的研究表明梨状皮质(Piriform cortex, PC)是癫痫发作起始、传播的关键部位。最近一项关于杏仁核点燃的癫痫大鼠模型也表明诱发癫痫后大鼠梨状皮质神经元的基础放电率明显高于未点燃的大鼠,并且大多数点燃的大鼠在梨状皮质中

出现了发作间期尖峰<sup>[17]</sup>。此外,癫痫患者的功能成像也显示梨状皮质可能有助于癫痫发作调节,并且它可能是神经外科或靶向药物癫痫治疗的 1 个有吸引力的目标,梨状皮层切除的程度是术后癫痫再发与否的预后因素之一<sup>[18]</sup>。由于梨状皮质是前脑区域最敏感的结构,在癫痫发作的早期就被激活<sup>[19]</sup>,本研究推测小胶质细胞在梨状皮质的激活和募集对癫痫的启动至关重要。最近许多动物实验表明左乙拉西坦、贯叶金丝桃素等药物通过抑制梨状皮质小胶质细胞的激活,减少了癫痫发作后白细胞介素 1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )等炎症因子的表达,缓解了癫痫发作。

丘脑作为大脑的重要结构之一,通过广泛的神经网络连接来参与中枢神经系统中信息的传递,在癫痫的发生中有着重要的作用<sup>[20]</sup>。丘脑前核的深部脑刺激广泛用于癫痫的临床治疗<sup>[21]</sup>。最近一项癫痫患儿的功能核磁共振研究显示与健康儿童相比,癫痫儿童丘脑内的水扩散显著升高<sup>[22]</sup>。这都表明丘脑参与了癫痫的发病。丘脑室旁核和腹内侧丘脑核都在丘脑中线附近(图 2),一项使用  $\gamma$ -羟基丁酸诱导的全身性失神癫痫大鼠模型的研究显示外侧缰核(Hemisphere lateral habenula, LHb)、丘脑室旁核、菱形丘脑核和丘脑的椎板内核中原癌基因蛋白(Fos proto-oncogene, fos)大量表达,这表明 LHb 和中线以及椎板内丘脑核很可能参与失神发作的病理生理学<sup>[23]</sup>。随着光遗传学和化学遗传学的发展,丘脑中线在癫痫中的作用的研究越来越多<sup>[24]</sup>。Wicker 等人研究发现中线和椎板内丘脑的化学遗传沉默可以阻止杏仁核点燃的癫痫发作<sup>[25]</sup>。小胶质细胞在丘脑室旁核和腹内侧丘脑核的特异性聚集与癫痫发作后的传播密不可分<sup>[16]</sup>。一项红藻氨酸诱发的癫痫大鼠模型显示癫痫发作后 Iba1 阳性的小胶质细胞数量及其介导的 IL-1 $\beta$  在丘脑中线的水平显著增加或增高。这表明小胶质细胞介导的神经炎症可能参与了癫痫发生中的区域脑病理变化。

另 1 个小胶质细胞显著聚集的部位是丘脑外侧背核的腹外侧部分(图 2)。该部位在癫痫中的研究也日益增多。临床认为丘脑外侧核是边缘癫痫回路中的关键节点,刺激该部位能有效地抑制癫痫发作<sup>[26]</sup>。在出生 12 d 的 Wistar 大鼠中诱导癫痫发作后在丘脑内侧核和外侧背侧核中始终可见退化的神经元<sup>[27]</sup>。小胶质细胞在该部位的特异性聚集可能与癫痫神经元的活动变化以及神经元的损伤有关。

综上所述,本研究通过构建氯化锂-匹鲁卡品癫痫大鼠模型,并通过免疫组织化学的方法对 Iba1 阳性的小胶质细胞特异性染色,系统地探讨了小胶质细胞在癫痫发作大鼠模型中的脑区激活特点。本研究发现,癫痫发作后脑组织中小胶质细胞存在广泛的激活,且特异性地聚集在梨状皮质、丘脑室旁核、丘脑外侧背核、腹外侧部分以及腹内侧丘脑核,这与小胶质细胞对癫痫发作后神经元活动的调节及炎症反应的发生密不可分。本研究为癫痫的机制研究和临床治疗提供了一定的指导意义。

### 参 考 文 献

- [1] Definition FE, Classification. Pathophysiology, and epidemiology[J]. *Semin Neurol*, 2020, 40(6): 617-623.
- [2] Righes MJ, Vendramin PM, Calcagnotto ME. GABAergic interneurons in epilepsy: More than a simple change in inhibition[J]. *Epilepsy Behav*, 2021, 121(Pt B): 106935.
- [3] Kwan P, Brodie MJ. Refractory epilepsy: mechanisms and solutions[J]. *Expert Rev Neurother*, 2006, 6(3): 397-406.
- [4] Tan TH, Perucca P, O'Brien TJ, et al. Inflammation, ictogenesis, and epileptogenesis: An exploration through human disease[J]. *Epilepsia*, 2021, 62(2): 303-324.
- [5] Hiragi T, Ikegaya Y, Koyama R. Microglia after Seizures and in Epilepsy[J]. *Cells*, 2018, 7(4): 26.
- [6] Eyo UB, Murugan M, Wu LJ. Microglia-Neuron communication in epilepsy[J]. *Glia*, 2017, 65(1): 5-18.
- [7] Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research[J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(6): e1000412.
- [8] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure[J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294.
- [9] Hendrickx AE, Van Eden CG, Schuurman KG, et al. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology [J]. *Journal of neuroimmunology*, 2017, 309(7): 12-22.
- [10] Boer K, Spliet WG, Van RP, et al. Evidence of activated microglia in focal cortical dysplasia[J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 173(1/2): 188-195.
- [11] Avignone E, Ulmann L, Levavasseur F, et al. Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(37): 9133-9144.
- [12] Kinoshita S, Koyama R. Pro- and anti-epileptic roles of microglia[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(7): 1369-1371.
- [13] Corvace F, Faustmann TJ, Faustmann PM, et al. Anti-inflammatory properties of lacosamide in an astrocyte-microglia co-culture model of inflammation [J]. *European journal of pharmacology*, 2021: 174696.
- [14] Victor TR, Tsirka SE. Microglial contributions to aberrant neurogenesis and pathophysiology of epilepsy[J]. *Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2020, 7(2): 234-247.
- [15] Andoh M, Ikegaya Y, Koyama R. Synaptic pruning by microglia in epilepsy[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(12): 2170.
- [16] Somani A, El-Hachami H, Patodia S, et al. Regional microglial populations in central autonomic brain regions in SUDEP [J]. *Epilepsia*, 2021, 62(6): 1318-1328.
- [17] Cheng H, Wang Y, Chen J, et al. The piriform cortex in epilepsy: What we learn from the kindling model[J]. *Exp Neurol*, 2020, 324(37): 113137.
- [18] Koepp M, Galovic M. Functional imaging of the piriform cortex in focal epilepsy[J]. *Exp Neurol*, 2020, 330(5): 113305.
- [19] Löscher W, Ebert U. The role of the piriform cortex in kindling[J]. *Prog Neurobiol*, 1996, 50(5/6): 427-481.
- [20] Williams D. The thalamus and epilepsy[J]. *Brain*, 1965, 88(3): 539-556.
- [21] Salanova V. Deep brain stimulation for epilepsy[J]. *Epilepsy Behav*, 2018, 88S(4): 21-24.
- [22] Maceachern SJ, Santoro JD, Hahn KJ, et al. Children with epilepsy demonstrate macro- and microstructural changes in the thalamus, putamen, and amygdala[J]. *Neuroradiology*, 2020, 62(3): 389-397.
- [23] Zhang X, Ju G, Le Gal La Salle G. Fos expression in GHB-induced generalized absence epilepsy in the thalamus of the rat [J]. *Neuroreport*, 1991, 2(8): 469-472.
- [24] Wicker E, Forcelli PA. Optogenetic activation of the reticular nucleus of the thalamus attenuates limbic seizures via inhibition of the midline thalamus[J]. *Epilepsia*, 2021, 62(9): 2283-2296.
- [25] Wicker E, Forcelli PA. Chemogenetic silencing of the midline and intralaminar thalamus blocks amygdala-kindled seizures [J]. *Exp Neurol*, 2016, 283(Pt A): 404-412.
- [26] Zhang DX, Bertram EH. Suppressing limbic seizures by stimulating medial dorsal thalamic nucleus: factors for efficacy[J]. *Epilepsia*, 2015, 56(3): 479-488.
- [27] Druga R, Mares P, Otáhal J, et al. Degenerative neuronal changes in the rat thalamus induced by status epilepticus at different developmental stages[J]. *Epilepsy Res*, 2005, 63(1): 43-65.

(2021-12-28 收稿)