

大鼠癫痫持续状态后海马神经传递环路 CB1R 表达特征

孟宪栋¹, 张海锋²

摘要: **目的** 探讨癫痫持续状态后不同时间点,大鼠海马各区 CB1R 表达变化。**方法** 使用氯化锂-匹罗卡品诱导大鼠癫痫持续状态(SE),分别于 SE 后 1 w、2 w、3 w、4 w,取大鼠海马切片,行大麻素 1 型受体(CB1R)免疫组化染色,测量 CA₁ 区放射层、CA₃ 区透明层,以及分子层 CB1R 平均光密度值(MIOD),所有数值进行统计学分析。同时取 SE 后 4 w 海马切片,行 NeuN 和 GFAP 染色,观察 SE 后 4 w,海马神经元和星形胶质细胞变化。**结果** 在 CA₁ 区放射层,SE 后各时间点 CB1R 表达均高于对照($P < 0.05$),CB1R 表达在 SE 后 4 w,高于 SE 后 1 w、2 w、3 w($P < 0.05$);在 CA₃ 区透明层,SE 后各时间点 CB1R 表达均高于对照($P < 0.05$),CB1R 表达在 SE 后 4 w,高于 SE 后 1 w($P < 0.05$);在海马分子层,SE 后各时间点 CB1R 表达均高于对照($P < 0.05$),但是 CB1R 表达在 SE 后 1 w、2 w、3 w、4 w 之间无统计学差异($P > 0.05$)。SE 后 4 w,CA₁ 区锥体细胞层神经明显丢失,并且星形胶质细胞增生肥大。**结论** 大鼠 SE 后 4W 具有硬化海马特征。SE 后大鼠 CA₁ 区放射层、CA₃ 区透明层,以及分子层 CB1R 表达增加,CA₁ 区放射层和 CA₃ 区透明层 CB1R 在 SE 后 4 w 增加最明显,分子层 CB1R 在 SE 后 1 w 增加且趋于稳定。

关键词: 癫痫; 大麻素 I 型受体; 海马; 硬化

中图分类号: R742.1 **文献标识码:** A

Expression characteristics of CB1R in hippocampal neurotransmission loop after status epilepticus in rats MENG Xiandong, ZHANG Haifeng. (Comprehensive Medical Department, The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes in CB1R expression in various regions of the hippocampus of rats at different time points after status epilepticus. **Methods** Use lithium chloride-pilocarpine to induce status epilepticus (SE) in rats. At 1 w, 2 w, 3 w, and 4 w after SE, rat hippocampal slices were taken, and the cannabinoid type 1 receptor (CB1R) immunohistochemical staining was performed to measure the CA₁ stratum radiatum, CA₃ stratum lucidum, and stratum moleculare CB1R mean integrated optical density value (MIOD), all values are statistically analyzed. At the same time, hippocampal slices were taken 4 w after SE and stained with NeuN and GFAP to observe the changes of hippocampal neurons and astrocytes. **Results** In the stratum radiatum of hippocampal CA₁ area, the expression of CB1R at each time point after SE was higher than that of the control ($P < 0.05$), and the expression of CB1R 4 w after SE was higher than 1 w, 2 w, 3 w after SE ($P < 0.05$); In the stratum lucidum of hippocampal CA₃ area, the expression of CB1R at each time point after SE was higher than that of the control ($P < 0.05$), and the expression of CB1R 4W after SE was higher than 1 w after SE ($P < 0.05$); In the hippocampus stratum moleculare, the expression of CB1R at each time point after SE was higher than that of the control ($P < 0.05$), but the expression of CB1R was not statistically different between 1 w, 2 w, 3 w, and 4 w after SE ($P > 0.05$). Neurons in the stratum pyramidale of the hippocampal CA₁ area were significantly lost, and astrocytes proliferated and enlarged 4 w after SE. **Conclusion** Rats had the characteristics of sclerotic hippocampus at 4 w after SE. After SE, the expression of CB1R in stratum radiatum of CA₁ area, stratum lucidum of CA₃ area, and stratum moleculare of the rat hippocampus increased. In the CA₁ area's stratum radiatum and CA₃ area's stratum lucidum CB1R increased most significantly at 4 w after SE. The stratum moleculare CB1R increased at 1 w after SE and the increase was not obvious later.

Key words: Epilepsy; Cannabinoid type I receptor; Hippocampus; Sclerosis

大麻素 I 型受体(CB1R)在中枢神经系统广泛分布,主要存在于兴奋性和抑制性突触终末,内源性大麻素(endocannabinoids, EC)在神经元活动加强时,可以在突触后神经元合成、释放,抑制谷氨酸和 GABA 释放^[1],对神经传导进行调控。近年来,

收稿日期:2021-03-20;修订日期:2021-05-04

基金项目:甘肃省自然科学基金项目(No. 145RJZA039)

作者单位:(1. 中国人民解放军联勤保障部队第 940 医院综合内科,甘肃兰州 730050;2. 空军军医大学神经科学研究所,陕西西安 710032)

通讯作者:孟宪栋, E-mail: MengxdLZ@163.com

CB1R 介导的信号机制被认为在控制癫痫急性发作上发挥重要作用^[2,3],因此推测 CB1R 可能与癫痫发生有关,并且在癫痫发生中对 CB1R 表达进行了探讨。海马内部存在由内嗅区-齿状回-CA₃ 区-CA₁ 区-下托皮质-内嗅区的单向神经传递环路^[4],SE 后海马神经传递闭合环路上 CB1R 表达特征未见报道。因此,我们对大鼠 SE 后,海马神经传递闭合环路上 CB1R 进行光密度测定,观察各区域 CB1R 表达的时空特征,探讨 CB1R 在癫痫发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 3 月龄 SD 大鼠(空军军医大学动物实验中心),清洁级,不限雌雄,实验获空军军医大学动物伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 CB1R 抗体(Abcam),GFAP 抗体(Sigma),NeuN 抗体(Sigma)。

1.1.3 主要仪器 冰冻切片机(Leica),正置显微镜(Olympus)。

1.2 方法

1.2.1 氯化锂-匹罗卡品建立慢性癫痫模型

SD 大鼠随机分成实验组和对照组,建立氯化锂-匹罗卡品癫痫模型。给大鼠腹腔注射氯化锂(127 mg/kg),18~20 h 后,甲溴东莨菪碱(1 mg/kg)腹腔注射,30 min 后,腹腔注射匹罗卡品(30 mg/kg),对发作进行分级^[5]: I 级:肢体和面部自动症; II 级:点头和咀嚼; III 级:前肢痉挛; IV 级:伴直立的前肢痉挛; V 级:摔倒。 \geq IV 级判定为癫痫持续状态(status epilepticus,SE),发作持续 1 h,腹腔注射地西洋(10 mg/kg)终止。依据 SE 后不同时间点,分为 SE1 w、2 w、3 w、4 w,每组 4 只,各时间点设立对照组,对照大鼠腹腔注射 0.9% NaCl 溶液,其他操作与实验组相同。

1.2.2 海马组织标本制备 SE 后 1 w、2 w、3 w、4 w 组 SD 大鼠以及对照组大鼠,进行 10% 水合氯醛麻醉,灌注固定。生理盐水灌注 1 min,然后 4% 多聚甲醛固定液灌注固定 30 min,30% 蔗糖溶液后固定,4 ℃ 过夜。行脑冠状切片,片厚 12 μ m 固定于载玻片。将所有切片行 CB1R/NeuN/GFAP 免疫组化染色。

1.2.3 海马 CB1R、NeuN、GFAP 免疫组化检测

血清封闭液封闭切片 2 h,加一抗兔抗大鼠 CB1R 抗体(1: 300),4 ℃ 过夜。PBS 洗片,加生物素化抗

兔抗体(1: 300),室温 3 h,加链霉素-生物素-过氧化氢酶复合物,4 ℃ 过夜,DAB 显色。脱水、封片,Olympus 正置显微镜观察、拍照。神经元染色加一抗小鼠抗 NeuN 单抗(1: 500)孵育,二抗为生物素化羊抗小鼠 IgG(1: 300)。星形胶质细胞染色加一抗小鼠抗 GFAP 单抗(1: 2000),二抗为生物素化羊抗小鼠 IgG(1: 300)。

1.2.4 免疫组化定量分析 每只大鼠海马取 4 张冠状切片行 CB1R 定量分析。在 CA₁ 区放射层、CA₃ 区透明层,以及齿状回分子层,利用 Image-Pro Plus 软件进行 CB1R 染色光密度测量,并计算分析区域平均光密度(MIOD)。

1.2.5 免疫组化定量分析 使用 SPSS 16.0 进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 的方式进行表示,方差分析比较两组数据之间的差异,多组两两比较使用 SNK 法。设定当 $P < 0.05$ 为存在统计学差异。

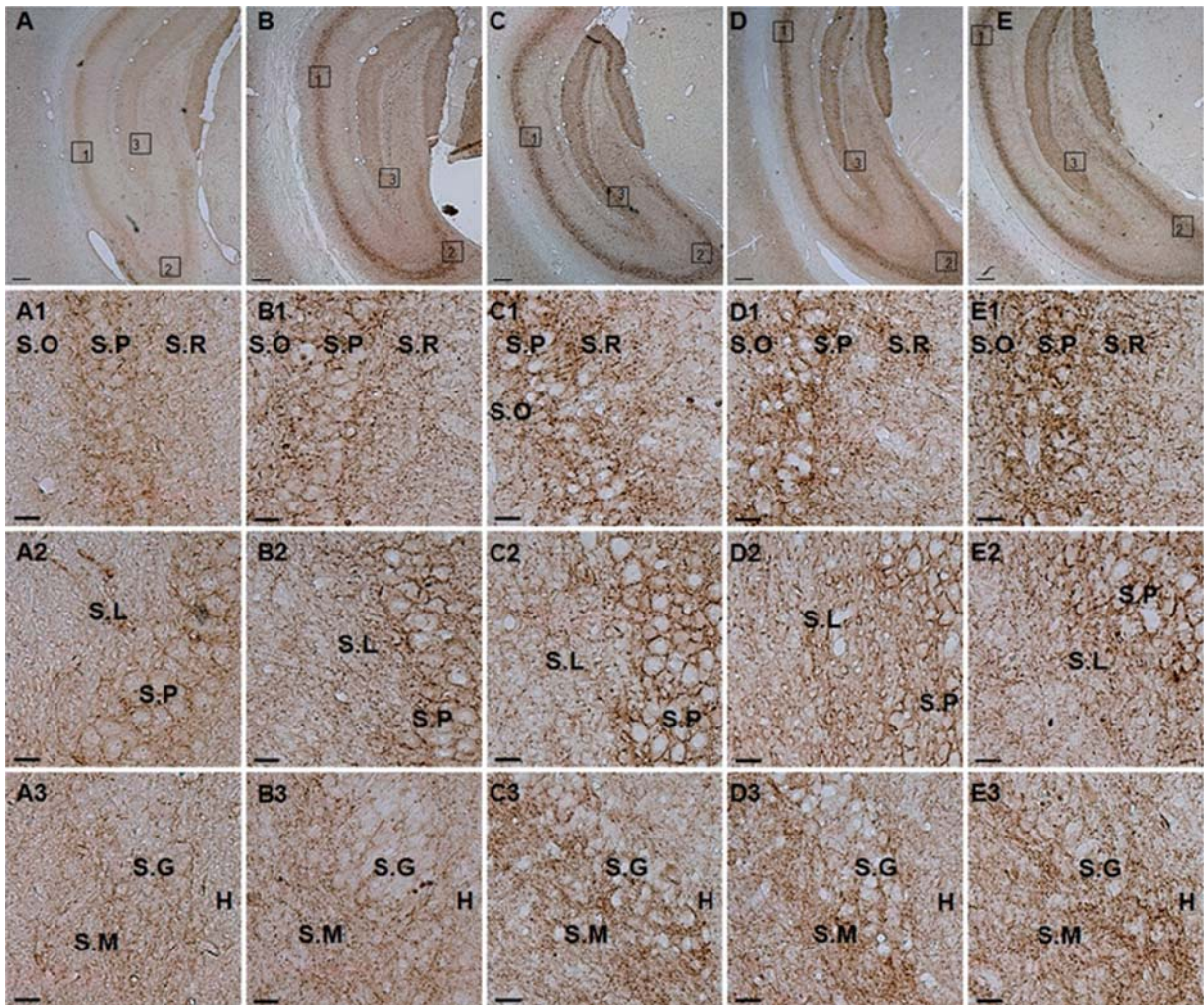
2 结果

2.1 SE 后不同时间点大鼠海马 CB1R 表达

在对照组和 SE 后不同时间点,海马 CB1R 呈点、线状分布,考虑与 CB1R 在抑制性突触前膜和轴突末端分布有关(见图 1)。在 CA₁ 区放射层(S. R),测量各时间点 MIOD,CB1R 表达均高于对照($P < 0.05$),且 CB1R 表达在 SE 后 4 w(0.0311 ± 0.00451),高于 SE 后 1 w(0.0205 ± 0.00102)、2 w(0.0229 ± 0.00219)、3 w(0.0209 ± 0.00209)($P < 0.05$)(见图 2A);在 CA₃ 区透明层,SE 后各时间点 CB1R 表达均高于对照($P < 0.05$),CB1R 表达在 SE 后 4 w(0.0279 ± 0.00252),高于 SE 后 1 w(0.0194 ± 0.00385)($P < 0.05$)(见图 2B);在海马分子层,SE 后各时间点 CB1R 表达均高于对照($P < 0.05$),但是 CB1R 表达在 SE 后 1 w(0.0276 ± 0.00413)、2 w(0.0326 ± 0.00264)、3 w(0.0321 ± 0.00380)、4 w(0.0334 ± 0.00427)之间无统计学差异($P > 0.05$)(见图 2C)。

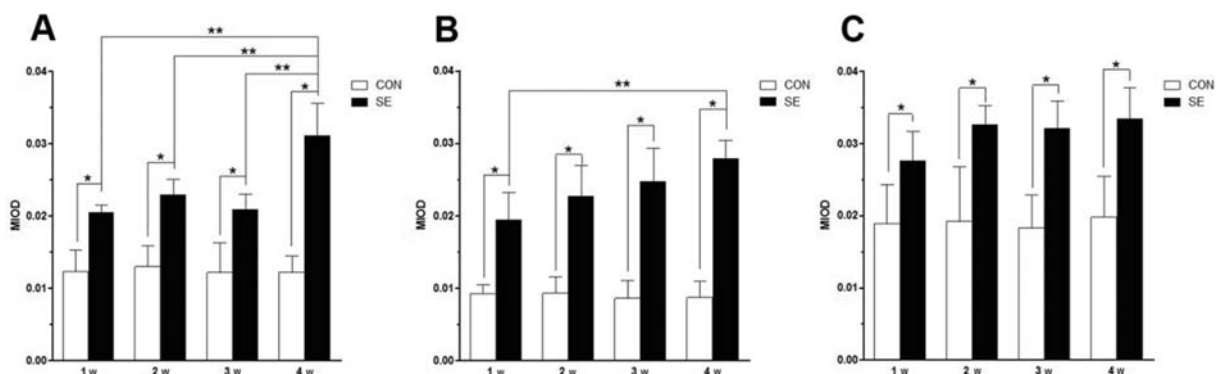
2.2 大鼠 SE 后 4W 海马神经元和星形胶质细胞变化特征

SE 后 4 w,海马锥体细胞层神经元排列紊乱,密度明显降低(见图 3),星形胶质细胞增生肥大(见图 4),因此,本研究建立的癫痫模型,具备海马硬化的两个基本特征,即神经元的大量丢失和星形胶质细胞增生、肥大^[6]。



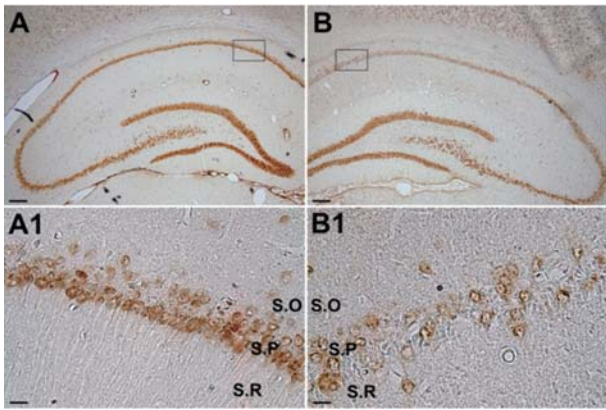
A:对照大鼠海马,A中1位于CA₁区,2位于CA₃区,3位于齿状回,A1、A2、A3为图A中1、2、3区域放大;B:SE后1w大鼠海马,B中1位于CA₁区,2位于CA₃区,3位于齿状回,B1、B2、B3为图B中1、2、3区域放大;C:SE后2w大鼠海马,C中1位于CA₁区,2位于CA₃区,3位于齿状回,C1、C2、C3为图C中1、2、3区域放大;D:SE后3w大鼠海马,D中1位于CA₁区,2位于CA₃区,3位于齿状回,D1、D2、D3为图D中1、2、3区域放大;E:SE后4w大鼠海马,E中1位于CA₁区,2位于CA₃区,3位于齿状回,E1、E2、E3为图E中1、2、3区域放大。S. O:始层;S. P:锥体细胞层;S. R:放射层;S. L:透明层;S. M:分子层;S. G:颗粒细胞层;H:门区。图标=200(A、B、C、D、E) μm;图标=20(A1~A3、B1~B3、C1~C3、D1~D3、E1~E3) μm

图1 SE后不同时间大鼠海马CB1R表达



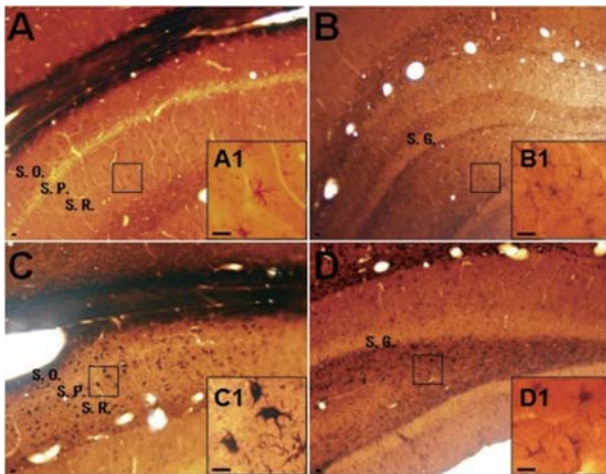
A:对照(CON)和SE后1w、2w、3w、4w,CA₁区放射层(S. R)CB1R平均光密度(MIOD)比较;B:对照(CON)和SE后1w、2w、3w、4w,CA₃区透明层(S. L)MIOD比较;C:对照(CON)和SE后1w、2w、3w、4w,分子层(S. M)MIOD比较;数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。* $P < 0.05$ 表示和对照组比较具有统计学差异,** $P < 0.05$ 表示多重组间比较具有统计学差异

图2 SE后不同时间大鼠海马CB1R平均光密度比较



A:对照大鼠海马 NeuN 表达,A1 为图 A 中矩形框内区域放大。B:SE 后 4W 大鼠海马 NeuN 表达,B1 为图 B 中矩形框内区域放大。S. O:始层;S. P:锥体细胞层;S. R:放射层。图标 =200 (A,B) μm;图标 =20 (A1,B1) μm

图3 SE 后 4 w 大鼠海马 NeuN 表达



A:对照大鼠 CA₁ 区放射层 GFAP 表达,A1 为图 A 中矩形框内区域放大。B:对照大鼠海马 CA₄ 区 GFAP 表达,B1 为图 B 中矩形框内区域放大。C:SE 后 4 w 大鼠 CA₁ 区放射层 GFAP 表达,C1 为图 C 中矩形框内区域放大。D:SE 后 4 w 大鼠海马 CA₄ 区 GFAP 表达,D1 为图 D 中矩形框内区域放大。S. O:始层;S. P:锥体细胞层;S. R:放射层;S. G:颗粒细胞层。图标 =200 (A,B) μm;图标 =20 (A1,B1) μm

图4 SE 后 4W 大鼠海马 GFAP 表达

3 讨论

CB1R 位于神经元轴突和突触终末,内源性大麻素在神经传递增强时合成增加,绑定突触前膜 CB1R,抑制神经传导^[7]。兴奋性神经递质和抑制性神经递质的平衡决定神经网络的兴奋性,CB1R 激活对二者释放皆有抑制作用,因此,CB1R 信号通路对神经网络的影响,是由不同细胞上 CB1R 活化的综合效果决定。此外存在 CB1R 的非逆行调控,例如星形胶质细胞以及线粒体 CB1R 信号通路,使内源性大麻素信号传导复杂化^[8]。大麻素受体在海马中

高度表达,慢性应激会调节海马 CB1 受体的表达和内源性大麻素水平^[9]。大麻二酚等多种 CB1R 激动剂具有抗痫作用^[10],纯化的植物性大麻二酚用于治疗小儿难治性癫痫^[11],CB1R 阻断剂可以导致癫痫发作^[12]。CB1R 激活后的信号通路与癫痫急性发作的终止密切相关,癫痫持续状态后 CB1R 表达发生改变,CB1R 的这种抗痫作用是否会发生改变呢? SE 后大鼠海马 CB1R 表达增加^[2]。人脑海马对照研究显示,癫痫患者 CB1RmRNA 下调,硬化海马始层、锥体细胞层、放射层、分子层 CB1R 表达下降^[13]。我们认为,这种下调可能与海马硬化晚期,神经元细胞大量死亡导致突触密度减低有关。

除了 SE 后 CB1R 变化之外,EC 的变化也对 CB1R 信号通路产生影响。大鼠 SE 后海马 2-AG、AEA 产生增加。然而,癫痫患者脑脊液 AEA 浓度较对照下降^[14]。癫痫发生过程中,EC 如何变化? 研究结果不甚一致,说明 EC 在癫痫发生的不同阶段存在波动,提示 EC 调控具有复杂性。EC 降解酶抑制剂及合成酶抑制剂对癫痫发生的作用尚不清楚。CB1R 阻断剂利莫那班可以防止大鼠脑外伤后期神经网络兴奋性增高^[15]。CB1R 阻断剂阻止热性惊厥导致后期边缘系统兴奋性增强^[12]。大麻二酚可有效调节癫痫持续状态(SE)诱发的癫痫^[16]。内源性大麻素系统激活不能阻止 SE 后癫痫发生^[17]。这些关于癫痫发生的研究结果本身存在矛盾,并且与 CB1R 激动剂阻断癫痫急性发作不全一致,提示 CB1R 调控的复杂性,以及其在控制癫痫急性发作和阻断癫痫发生中,所发挥的作用不同。探讨 CB1R 在癫痫发生中分布的变化,为其所产生功能改变奠定形态学基础。

在海马内部存在一个由内嗅区-齿状回-CA₃ 区-CA₁ 区-下托皮质-内嗅区的单向神经传递环路。研究显示 SE 后海马 CB1R 表达增加,但是尚未见关于海马单向神经传递环路 CB1R 动态变化的定量分析。海马神经元突触密集,尤其 CA₁ 区,多种突触传递最终经 CA₁ 区传出海马,其突触的可塑性,因此具有致病性^[18]。放射层内锥体细胞的顶树突有规则的伸展以及与其连接的轴突相互交织,包含来自 CA₃ 区的 Schaffer 侧支。齿状回分子层含有从内嗅区来的海马传入纤维,从邻近神经元发来的轴突,以及颗粒细胞的树突。苔藓纤维是齿状回颗粒细胞轴突,主要在 CA₃ 区锥体细胞顶树突起始段之间穿行,与之形成大量的突触,形成了 CA₃ 区特有的透明层。因此,我们选取 CA₁ 区放射层、CA₃ 区透明层,以及分子层等突触传递密集的区域作为观察对象,定量

分析其 CB1R 的动态变化,探讨 SE 后海马 CB1R 改变在癫痫发生中的作用。我们发现本研究中所建立的癫痫模型,SE 后 4 w,出现明显的海马硬化特征,表现为神经元的大量丢失和星形胶质细胞增生。在海马硬化形成过程中,我们对海马各区进行 CB1R 表达进行定量分析,发现在 CA₁ 区放射层,SE 后各时间点 CB1R 表达均高于对照,CB1R 表达在 SE 后 4W 明显增高,高于 SE 后 1 w、2 w、3 w,在 CA₃ 区透明层,SE 后各时间点 CB1R 表达均高于对照,CB1R 表达在 SE 后 4 w,高于 SE 后 1 w,在海马分子层,SE 后各时间点 CB1R 表达均高于对照,但是 CB1R 表达在 SE 后 1 w、2 w、3 w、4 w 之间无统计学差异。这些结果提示,在 SE 后海马内部单向信息传递环路中,CB1R 均出现不同程度增加,但是以齿状回分子层 CB1R 表达增加最早,且以后数周变化不大,CA₃ 区透明层在 SE 后,CB1R 表达增加,随后增加缓慢,在 SE 后 4 w 达到高峰,而 CA₁ 区放射层,在 SE 后 CB1R 表达增加,此后 2~3 w 变化不大,在 SE 后 4 w CB1R 明显增加。说明从齿状回-CA₃ 区-CA₁ 区的信息传递环路中,在 SE 后 CB1R 增加,但是会出现增加延迟,齿状回分子层变化最早,CA₁ 区放射层变化最晚。有学者在颞叶癫痫患者硬化海马中,发现神经元胞体周围出现表达 CB1R 的 GABA 能抑制性神经元出芽,认为这种增强的抑制信号可能会增加锥体细胞同步性,有助于癫痫发生和间期放电^[19]。在本研究中,我们发现放射层和锥体细胞交界区,CB1R 阳性表达明显增强,无论是对照还是 SE 后各时间点,提示 CB1R 阳性突触大量位于锥体细胞胞体周围。海马大麻素敏感细胞信号是导致网络振荡可能原因,与癫痫发生密切相关^[20]。SE 后传导环路 CB1R 在时间上增加的并不同步,对癫痫的发生有何影响尚不清楚,但是这种非同步性变化,与生理状态下 CB1R 分布不同,提示其在癫痫形成过程中,海马 CB1R 对神经传递的调节平衡发生改变,这种变化对于癫痫发生的意义值得进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Lu HC, Mackie K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System[J]. *Biol Psychiatry*, 2016, 79(7):516-525.
- [2] Wallace MJ, Blair RE, Falenski KW, et al. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(1):129-137.
- [3] Monory K, Massa F, Egertová M, et al. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus[J]. *Neuron*, 2006, 51(4):455-466.
- [4] Knowles WD. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation[J]. *J Clin Neurophysiol*, 1992, 9(2):252-263.
- [5] Meng XD, Wei D, Li J, et al. Astrocytic Expression of Cannabinoid Type 1 Receptor in Rat and Human Sclerotic Hippocampi[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6):2825-2837.
- [6] Alonso-Nanclares L, DeFelipe J. Alterations of the microvascular network in the sclerotic hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy[J]. *Epilepsy Behav*, 2014, 38(9):48-52.
- [7] Katona I, Freund TF. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9):923-930.
- [8] Araque A, Castillo PE, Manzoni OJ, et al. Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 124(9):13-24.
- [9] Scarante FF, Vila-Verde C, Detoni VL, et al. Cannabinoid Modulation of the Stressed Hippocampus[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10(12):411.
- [10] Chayasirisobhon S. Cannabis and Neuropsychiatric Disorders: An Updated Review[J]. *Acta Neurol Taiwan*, 2019, 28(2):27-39.
- [11] Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders[J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16(1):9-29.
- [12] Chen K, Neu A, Howard AL, et al. Prevention of plasticity of endocannabinoid signaling inhibits persistent limbic hyperexcitability caused by developmental seizures[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(1):46-58.
- [13] Maglóczy Z, Tóth K, Karlócai R, et al. Dynamic changes of CB1-receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(Suppl 3):115-120.
- [14] Marsicano G, Goodenough S, Monory K, et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity[J]. *Science*, 2003, 302(5642):84-88.
- [15] Echevoyen J, Armstrong C, Morgan RJ, et al. Single application of a CB1 receptor antagonist rapidly following head injury prevents long-term hyperexcitability in a rat model[J]. *Epilepsy Res*, 2009, 85(1):123-127.
- [16] Upadhy D, Castro OW, Upadhy R, et al. Prospects of Cannabidiol for Easing Status Epilepticus-Induced Epileptogenesis and Related Comorbidities[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(8):6956-6964.
- [17] Suleymanova EM, Borisova MA, Vinogradova LV. Early endocannabinoid system activation attenuates behavioral impairments induced by initial impact but does not prevent epileptogenesis in lithium-pilocarpine status epilepticus model[J]. *Epilepsy Behav*, 2019, 92(3):71-78.
- [18] Samat HB, Flores-Samat L. Might the olfactory bulb be an origin of olfactory auras in focal epilepsy[J]. *Epileptic Disord*, 2016, 18(4):344-355.
- [19] Wittner L, Maglóczy Z. Synaptic Reorganization of the Perisomatic Inhibitory Network in Hippocampi of Temporal Lobe Epileptic Patients[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:7154295.
- [20] Lupica CR, Hu Y, Devinsky O, et al. Cannabinoids as hippocampal network administrators[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 124(9):25-37.