

低剂量伽玛刀照射对癫痫大鼠皮层及海马神经细胞内游离 Ca^{2+} 水平的影响

尹 昱¹, 王晓晗¹, 王贺波¹, 孙增鑫¹, 董长征¹, 李文玲², 赵文清¹, 赵振彪¹

摘要 目的 观察癫痫大鼠皮层及海马神经细胞内游离 Ca^{2+} 水平及低剂量伽玛刀照射对其的影响。方法 选取 Wistar 大鼠 32 只, 随机均分为 4 组: 正常对照组、伽玛刀对照组、戊四氮(PTZ)致痫组、PTZ 致痫 + 伽玛刀组。采用连续腹腔注射 PTZ 溶液制备癫痫大鼠模型, 应用 Leksell 伽玛刀系统对大鼠进行低剂量伽玛刀照射 12 周, 照射靶区为大鼠额叶皮层, 后断头留取额叶及海马组织, 制备神经元细胞悬液, 应用共聚焦显微镜检测神经细胞内的游离 Ca^{2+} 水平。结果 与正常对照组相比, PTZ 致痫组额叶及海马神经细胞内的 Ca^{2+} 荧光强度升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 PTZ 致痫组相比, PTZ 致痫 + 伽玛刀组神经细胞内的 Ca^{2+} 荧光强度降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 伽玛刀对照组与正常对照组相比, 神经细胞内的 Ca^{2+} 轻度升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 癫痫大鼠额叶皮层及海马神经细胞内 Ca^{2+} 水平升高可能是癫痫发病的重要机制之一; 低剂量伽玛刀照射可能通过调节神经细胞内钙稳态而发挥抗癫痫和改善认知的作用。

关键词 伽玛刀; 癫痫; 戊四氮; 认知功能; Ca^{2+}

中图分类号 R 742.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)05-0698-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.009

目前关于伽玛刀照射作为开颅手术治疗癫痫的替代方案的研究日益增多^[1-2]。临床研究^[3-4]显示低剂量伽玛刀可控制难治性癫痫患者的痫性发作, 并可保护该类患者的认知功能, 但作用机制仍不十分明确。目前认为钙离子与学习、记忆等认知功能密切相关, 而研究^[5]显示钙稳态失调还可诱发病性发作, 当细胞内的钙浓度超过正常水平, 但剂量未达到产生兴奋毒性的程度时, 钙浓度异常升高可能引起神经细胞异常放电进而导致癫痫。低剂量伽玛刀

是否通过影响神经细胞内 Ca^{2+} 浓度水平而发挥抗癫痫和保护认知的作用, 有待进一步深入探讨。现利用激光共聚焦显微镜检测戊四氮(pentylenetetrazole, PTZ)致痫大鼠额叶及海马神经细胞内游离 Ca^{2+} 水平, 并观察低剂量伽玛刀对其的影响, 以期伽玛刀治疗癫痫提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与癫痫模型制备 选取清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 32 只, 由河北医科大学实验动物中心提供, 起始体质量 180 ~ 220 g, 均在同一实验室按清洁级大鼠要求饲养, 22 ~ 25℃ 环境温度, 12 h 光亮/黑暗条件, 自由进食水。根据大鼠是否应用 PTZ 致痫及接受低剂量伽玛刀照射, 随机均分为 4 组: 正常对照组、伽玛刀对照组、PTZ 致痫组、PTZ 致痫 + 伽玛刀组。采用腹腔连续注射 PTZ 溶液(Sigma 公司, 美国) (35 mg/kg) 制备癫痫大鼠模型, 每 24 h 注射 1 次, 连续注射 4 周, 每次注射后观察大鼠出现痫性发作的表现。采用修正 Racine VI 级评价标准对大鼠癫痫发作情况进行评定^[6]。在大鼠 4 周连续应用 PTZ 期间内, 如 IV 级以上的癫痫发作连续出现 3 次, 即被视为癫痫模型制备成功, 并用于后续的实验, 此后仍每周腹腔注射 1 次相同剂量的 PTZ 以维持发作。正常对照组大鼠腹腔注射同等容量的生理盐水; 伽玛刀对照组仅给予伽玛刀照射; PTZ 致痫组大鼠由 PTZ 制备癫痫模型; PTZ 致痫 + 伽玛刀组大鼠经 PTZ 制备癫痫模型后再接受低剂量伽玛刀照射。

1.2 低剂量伽玛刀照射 PTZ 连续注射 4 周, 癫痫模型制备成功后, 应用 Leksell 伽玛刀系统(ELEKTA, 瑞典)对实验大鼠进行单次低剂量伽玛刀照射, 实验大鼠麻醉后(腹腔注射水合氯醛 35 mg/kg)固定在动物架上, 再将其置于伽玛刀的 Leksell 框架上, 应用核磁共振仪(Signa 1.5T)对大鼠进行定位扫描, 以大鼠双侧额叶为照射靶区, 并根据核磁图像在 Gamma Plan 系统上确定双侧额叶的坐标轴, 以 50% 等剂量线包围靶区, 边缘剂量为 15 Gy, 用 4 mm

2020-01-15 接收

基金项目: 河北省自然科学基金(编号: C2007000947); 河北省医学科学研究重点课题计划项目(编号: 20120009)

作者单位: ¹ 河北省人民医院康复医学科, 石家庄 050051

² 河北医科大学第二医院, 石家庄 050000

作者简介: 尹 昱, 副主任医师, 副教授, 博士;

赵振彪, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhaozhenbiao99@163.com

表1 两组大鼠不同时间点痫性发作程度的比较(n)

组别	1周		2周		4周		6周		8周		10周		12周	
	轻度	重度	轻度	重度	轻度	重度	轻度	重度	轻度	重度	轻度	重度	轻度	重度
PTZ 致病组	0	6	1	5	2	4	2	4	1	5	2	4	0	6
PTZ 致病 + 伽玛刀组	1	5	1	5	2	4	2	4	3	3	4	2	5*	1*

与 PTZ 致病组比较: * $P < 0.05$

准直器进行照射^[3]。

1.3 激光共聚焦扫描显微镜检测 各组大鼠分别于伽玛刀照射后 12 周常规断头迅速取脑,在低温操作台上分离出额叶及海马组织。经 DMEM 培养基漂洗,用 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 恒温消化 30 min,再经 DMEM 培养基漂洗终止消化反应。后用不同口径的玻璃吸管将脑组织轻柔吹打成单细胞悬液。悬液经滤网过滤后,加入钙离子荧光探针 Fluo-3/AM (Biotium 公司,美国)(含 0.1% F-127),终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。再将细胞悬液避光孵育 30 min(37 °C),用 DMEM 培养基漂洗 2~3 次。在载玻片上滴一定量的细胞悬液,待细胞贴壁后,再将其放置于激光共聚焦显微镜(Leica,德国)的载物台上。先在低倍镜($\times 10$)下找到悬液中的神经细胞,再在高倍镜($\times 20$)下选取不同视野的神经细胞进行扫描。发射光为 530 nm,激发光为 488 nm。以荧光强度最强的扫描层面为标准值,每个样本取 20 个神经细胞,取其平均值作为每样本的 Ca^{2+} 荧光像素值。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 21 统计分析软件进行数据处理,计数资料采用 Fisher's 确切概率法检验;计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析(ANOVA),进一步两组间比较采用 SNK 法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癫痫大鼠模型制备情况 实验大鼠于腹腔注射 PTZ 3~6 次后出现痫性发作,如头面部抽动、四肢抽动及阵挛、全身肌阵挛发作、跌倒及周身翻滚等。每次于注射后 3~5 min 出现,随着注射次数增加,发作程度逐渐加重。每次发作持续 40~60 min 后逐渐缓解。16 只大鼠中共有 12 只模型制备成功,于注射 12~16 次后连续出现 3 次 IV 级以上的痫性发作,成功率为 75%。

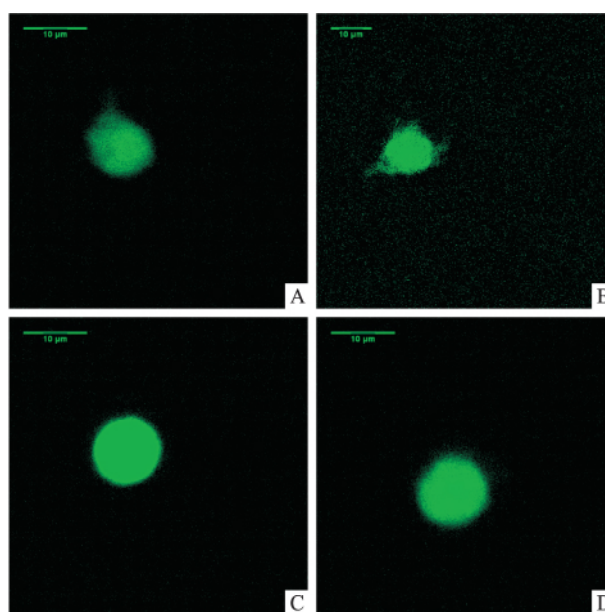
2.2 各组大鼠癫痫发作情况 对照组及伽玛刀对照组大鼠行为正常,无痫性发作。PTZ 致病组大鼠连续注射 4 周 PTZ 后每周再次注射时,绝大部分可出现 IV 级以上发作。PTZ 致病 + 伽玛刀组大鼠经低剂量伽玛刀照射后,随时间的延长,每周再次注射

PTZ,发作程度逐渐减轻。实验将 I~III 级发作定为轻度,IV~V 级定为重度,于照射后第 12 周,两组大鼠发作差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.3 各组大鼠额叶皮层及海马神经细胞内 Ca^{2+} 水平 共聚焦显微镜检测结果显示,与正常对照组相比,伽玛刀对照组大鼠额叶及海马神经细胞内的 Ca^{2+} 荧光强度轻度升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);PTZ 致病组较正常对照组升高;PTZ 致病 + 伽玛刀组较 PTZ 致病组降低,差异有统计学意义($F_{\text{皮层}} = 20.936$ 、 $F_{\text{海马}} = 26.189$, $P < 0.001$)。见表 2 和图 1、2。

表2 各组大鼠皮层及海马神经元内 Ca^{2+} 荧光像素值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	皮层	海马
正常对照($n=8$)	86.63 $\pm$ 11.69	83.38 $\pm$ 10.84
伽玛刀对照($n=8$)	93.63 $\pm$ 13.11	90.38 $\pm$ 8.90
PTZ 致病($n=6$)	136.33 $\pm$ 12.63*	128.67 $\pm$ 10.52*
PTZ 致病 + 伽玛刀($n=6$)	115.17 $\pm$ 13.83 ^Δ	107.50 $\pm$ 10.78 ^Δ

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与 PTZ 致病组比较: ^Δ $P < 0.05$ 图1 各组大鼠皮层神经元内 Ca^{2+} 荧光强度

A: 正常对照组; B: 伽玛刀对照组; C: PTZ 致病组; D: PTZ 致病 + 伽玛刀组

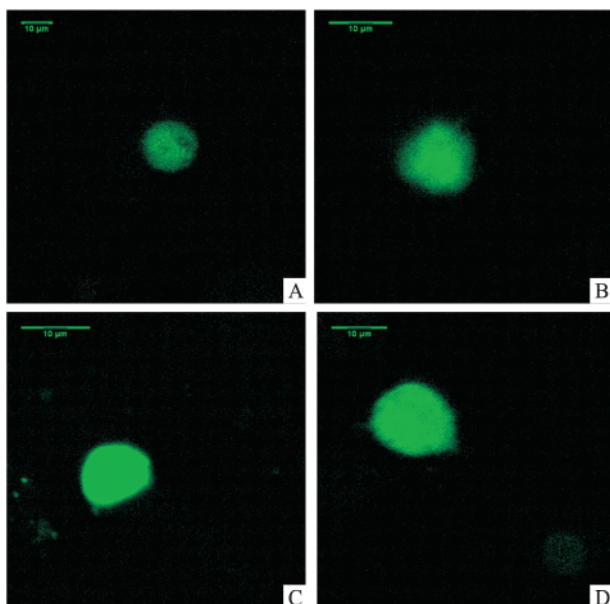


图2 各组大鼠海马神经元内 Ca^{2+} 荧光强度

A: 正常对照组; B: 伽玛刀对照组; C: PTZ 致病组; D: PTZ 致病 + 伽玛刀组

3 讨论

Ca^{2+} 广泛分布于机体细胞与体液当中,作为细胞内最重要的第二信使,在信号转导中发挥着重要作用,参与多种生理功能的调节。正常生理状态下,神经细胞外的 Ca^{2+} 浓度约为细胞内的 2 万倍,细胞可通过多种调控机制维持细胞内的钙稳态,如细胞内钙库摄取及释放, Ca^{2+} 跨膜转运等。目前研究^[7]表明, Ca^{2+} 在各种神经退行性疾病的病理过程中起着至关重要的作用,细胞内钙稳态失衡是癫痫发生的触发因素。关于神经细胞内钙稳态失衡影响癫痫发病的实验证据日益增多^[8]。癫痫发作时大脑神经细胞内的 Ca^{2+} 急剧升高超过阈值,神经细胞受到损伤或异常放电,可能是癫痫发生的直接原因。Raze et al^[9] 研究发现慢性癫痫大鼠海马神经元内 Ca^{2+} 浓度升高,并且在致病后 1 年神经元内 Ca^{2+} 浓度仍维持较高水平。Pal et al^[10] 将海马神经元在无 Mg^{2+} 培养液中培养 3 h,发现神经元内的 Ca^{2+} 水平显著升高,并出现痫性放电。Ghotbeddin et al^[11] 应用膜片钳实验表明,杏仁核点燃可增强电压门控 Ca^{2+} 通道电流,而 T 型 Ca^{2+} 通道的选择性阻断可抑制杏仁核点燃的进展^[12]。以上研究显示无论离体还是在体的痫性神经元均存在钙稳态的变化。本研究显示,致病大鼠额叶皮层及海马的神经细胞内 Ca^{2+} 浓度明显升高,与近年来的文献报道一致。

目前大量资料表明, Ca^{2+} 作为神经细胞内的重要信使与学习记忆密切相关, Ca^{2+} 内流入突触后膜是触发形成 LTP 的必要条件之一。本研究表明 PTZ 致病大鼠额叶皮层及海马神经细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,而癫痫大鼠学习和记忆受损^[3],提示钙稳态失衡与癫痫大鼠的认知障碍密切相关。课题组前期研究^[13]还显示,PTZ 致病大鼠脑组织 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体亚基 1、NMDA 受体 2A 及 NMDA 受体 2B 过度表达,故推测皮层和海马组织 NMDA 受体活性增强,可能是导致癫痫大鼠神经细胞内游离 Ca^{2+} 水平升高的重要机制。

近年来研究^[14]已证实伽玛刀照射可有效地控制颞叶癫痫的癫痫发作,并对该类患者的认知功能、心理、情绪没有明显影响。目前认为低照射剂量 (边缘剂量 10 ~ 20 Gy) 在不损害正常神经元的同时可提高癫痫灶的阈值,产生抗痫作用^[15]。但其生物学作用机制仍不明确。本研究结果显示,边缘剂量 15 Gy 的伽玛刀照射可显著降低癫痫大鼠皮层和海马神经细胞内 Ca^{2+} 水平,而对正常脑组织影响较小,提示低剂量伽玛刀可能是通过调节神经细胞钙稳态而起抗癫痫作用的。然而,伽玛刀照射对神经细胞内 Ca^{2+} 的调控机制尚不清楚。目前研究集中在电离辐射对 Ca^{2+} 异化扩散和细胞膜的 Ca^{2+} 通道的影响。结合课题组前期的研究结果,低剂量伽玛刀照射后神经细胞内 Ca^{2+} 浓度降低可能与癫痫病灶 NMDA 受体活性减低有关,具体机制有待进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Jehi L. How can we guide patient choice between "Minimally Invasive" radiosurgery versus resective epilepsy surgery [J]. Epilepsy Curr 2018, 18(6): 367-8.
- [2] Bosröm J P, Delev D, Quesada C et al. Low-dose radiosurgery or hypofractionated stereotactic radiotherapy as treatment option in refractory epilepsy due to epileptogenic lesions in eloquent areas-preliminary report of feasibility and safety [J]. Seizure 2016, 36: 57-62.
- [3] 尹昱, 赵文清, 李文玲, 等. 低剂量伽玛刀照射对癫痫模型大鼠癫痫发作及认知功能的影响 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2010, 36(8): 480-4.
- [4] 梁传栋, 刘娜, 曹红旭, 等. 伽玛刀对药物难治性癫痫病人认知功能的影响 [J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2014, 19(7): 300-2.
- [5] Delorenzo R J, Sun D A, Deshpande L S. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction

- and maintenance of epilepsy [J]. *Pharmacol Ther* 2005 ,105 (3): 229 – 66.
- [6] Mortazavi F ,Ericson M ,Story D et al. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats [J]. *Epilepsy Behav* 2005 ,7(4): 629 – 38.
- [7] Xu J H ,Tang F R. Voltage-dependent calcium channels ,calcium binding proteins and their interaction in the pathological process of epilepsy [J]. *Int J Mol Sci* 2018 ,19(9): E2735.
- [8] Ren X Q ,Ma R ,Yang C Q ,et al. Kangxian capsules: Effects on convulsive injuries ,N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor sub-unit expression ,and free Ca^{2+} concentration in a rat hippocampal neuron epileptic discharge model [J]. *Seizure* 2016 ,40: 27 – 32.
- [9] Raze M ,Pal S ,Rafiq A et al. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy [J]. *Brain Res* 2001 ,903(1–2): 1 – 12.
- [10] Pal S ,Sun D ,Limbrick D et al. Epileptogenesis induces long-term alterations in intracellular calcium release and sequestration mechanisms in the hippocampal neuronal culture model of epilepsy [J]. *Cell Calcium* 2001 ,30(4): 285 – 96.
- [11] Ghotbeddin Z ,Heysieattalab S ,Borjkhani M et al. Ca^{2+} channels involvement in low-frequency stimulation mediated suppression of intrinsic excitability of hippocampal CA1 pyramidal cells in a rat amygdala kindling model [J]. *Neuroscience* 2019 ,406: 234 – 48.
- [12] Casillas-Espinosa P M ,Hicks A ,Jeffreys A ,et al. Z944 ,a novel selective T-type calcium channel antagonist delays the progression of seizures in the amygdala kindling model [J]. *PLoS One* 2015 ,10(8): e0130012.
- [13] 李卫泊 ,尹 昱 ,梁传栋 等. 低剂量伽玛刀照射对癫痫大鼠皮层及海马 NMDA 受体亚基表达的影响 [J]. *中国神经精神疾病杂志* 2019 ,45(7): 416 – 21.
- [14] Quigg M ,Broshek D K ,Barbaro N M ,et al. Neuropsychological outcomes after gamma knife radiosurgery for mesial temporal lobe epilepsy: a prospective multicenter study [J]. *Epilepsia* 2011 ,52(5): 909 – 16.
- [15] Kwon K H ,Lee J I ,Hong S C ,et al. Gamma knife radiosurgery for epilepsy related to dysembryoplastic neuroepithelial tumor [J]. *Stereotact Funct Neurosurg* 2006 ,84(5–6): 243 – 7.

Effects of low dose gamma knife irradiation on cytoplasmic calcium level of neurons in cortex and hippocampus of epileptic rats

Yin Yu ,Wang Xiaohan ,Wang Hebo ,et al

(*Dept of Rehabilitation Medicine ,Hebei General Hospital ,Shijiazhuang 050051*)

Abstract Objective To observe the level of intracellular free Ca^{2+} in cortex and hippocampus of epileptic rats and the effect of low dose gamma knife irradiation on it. **Methods** 32 Wistar rats were randomly divided into four groups: ① Normal control group; ② gamma knife(GK) control group; ③ pentylenetetrazole(PTZ) group; ④ PTZ + GK group. Epileptic rat model was prepared by continuous intraperitoneal injection of PTZ. Leksell gamma knife system was used to irradiate rats with low dose gamma knife for 12 weeks. The target area was bilateral frontal lobe. On the 12th week after gamma knife irradiation ,the brains of rats were decapitated and neurons of frontal lobe and hippocampus were acutely isolated. The neuron cell suspension was prepared ,and then laser scanning confocal microscopy (LSCM) was used to detect the level of free Ca^{2+} in nerve cells. **Results** Compared with the normal control group ,the fluorescence intensity of Ca^{2+} in cortex and hippocampal neurons of PTZ group increased significantly ($P < 0.05$) . Compared with PTZ group ,the fluorescence intensity of Ca^{2+} in neurons of PTZ + GK group decreased markedly ($P < 0.05$) . The fluorescence intensity of Ca^{2+} in neurons of GS control group was slightly higher than that of normal control group ,but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$) . **Conclusion** The increased Ca^{2+} level of neurons in frontal cortex and hippocampus may be one of the important mechanisms of epilepsy. Low dose of gamma knife irradiation may play a role of anti-epileptic and improve cognitive function by affecting intracellular calcium homeostasis.

Key words gamma knife; epilepsy; pentylenetetrazole; cognitive function; Ca^{2+}