

难治性癫痫神经网络学说研究进展

潘楠楠 郑乃智

癫痫是神经内科常见病,是由多种原因诱发的脑部神经元异常同步放电所致。大部分癫痫患者在接受合理的抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs)治疗后,其病情可以得到控制,但仍有约 30% 的癫痫患者表现为对各种 AEDs 不敏感,仍有反复的癫痫发作,称之为难治性癫痫(refractory epilepsy, RE)。

关于 RE 发病机制的研究是近年的热点所在。大脑神经元内异常突触联系形成,兴奋性神经环路的建立和抑制性中间神经元的缺失等病理改变都与 RE 存在关联性。尤其是苔藓纤维出芽(mossy fiber sprouting, MFS)受到特别重视。

一、苔藓纤维出芽(MFS)

齿状回(dentate gyrus, DG)颗粒细胞的轴突(苔藓纤维)可投射到齿状回门区的中间神经元和海马 CA3 区的锥体细胞树突。正常情况下,苔藓纤维只能投射到同一片层的门区和海马 CA3 区,既不会返折入齿状回的分子层,也不会纵伸到邻近的片层。大量的 RE 患者病灶标本和动物实验表明,在癫痫灶内存在 MFS。Buckmaster 等^[1]用 Timm 染色法标记苔藓纤维,发现齿状回颗粒层和分子层内存在大量的苔藓纤维投射。

1. MFS 与 RE 的关系:生理情况下,苔藓纤维与其他神经元形成很少的突触联系,以单突触多见。而 MFS 则与脑内其他神经元形成回返的,兴奋性多突触联系^[2]。这种异常的多突触联系在大脑局部形成兴奋性环路,可以诱导自发性痫性发作^[3]。2005 年 Santhakumar 等^[4]用电脑模拟 MFS 功能,发现只要存在很少数量的 MFS,即可大大提高痫性发作的敏感度。Smith 等通过观察毛果芸香碱诱导大鼠癫痫发作模型,发现在癫痫发作 8 周后,海马内分子层出现 MFS,且 MFS 与癫痫再次发作有关。通过研究电刺激癫痫大鼠模型发现,在海马区存在 MFS 的大鼠,能自发出现癫痫反复发作,且发作逐渐增强。正常大脑齿状回能阻止癫痫放电由内嗅皮质向海马的传导,而

MFS 则促进海马产生回返性兴奋,并降低齿状回颗粒细胞同步放电的阈值,提高癫痫产生和传播的敏感度^[5]。MFS 将齿状回由癫痫放电的“过滤器”变成了“发生器”(generator)。因此,有专家提出,阻断 MFS 的产生,应该能够减少癫痫的再次发作。2009 年 Buckmaster 等^[1]发现将雷帕霉素(rapamycin)注入齿状回后能抑制 mTOR(mammalian target of rapamycin)信号通道,并抑制 MFS。Zeng 等^[6]通过研究红藻氨酸诱导的大鼠模型,发现将雷帕霉素注入大鼠齿状回以后,其 MFS 和癫痫发作频率显著减少。

2. 影响 MFS 的相关因素:MFS 的产生机制相当复杂,其确切机制尚不明确。目前认为,神经元缺失和癫痫发作是促使 MFS 形成的两大因素。另有一些研究发现,即刻早期基因、轴突导向因子、神经营养因子等也与 MFS 有关。(1)神经元缺失与 MFS 的关系:神经元缺失被认为是 MFS 的重要诱导因素。电刺激或化学药物诱导大鼠癫痫持续状态后,发现其海马 CA3 区锥体细胞缺失^[7]。CA3 区锥体细胞缺失使原来与它们形成突触联系的苔藓纤维断离,从而促使苔藓纤维异常出芽——回返到内分子层或延伸到不同纵向板层,形成异常的突触联系。研究具有抗红藻氨酸盐所致神经元死亡的突变鼠发现,在用红藻氨酸盐诱导癫痫发作后,与非抗红藻氨酸盐癫痫大鼠模型相比,其海马区不会出现 MFS。癫痫发作所致的神经元缺失还与年龄有关,在幼鼠的癫痫模型中,没有发现海马和杏仁核神经元的缺失,这可以解释脑发育状态对不同伤害刺激具有选择性易感性,以及癫痫发作类型年龄相关性。(2)即刻早期基因(immediate early genes, IEGs)与 MFS 的关系:IEGs 可以反映神经元的活动,在正常的突触形成和突触发生时都能发现 IEGs。一些 IEGs,包括 Fos、Jun、Egr1、Egr4、Homer1、Nurr77 和 Arc,在颞叶癫痫动物模型中表达增加^[8]。IEGs 与转录因子的磷酸化有关,如 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)等。磷酸化的转录因子被激活,随后进入细胞核,启动二次反应基因,参与突触的重塑^[8]。在大量癫痫动物模型中发现 IEGs 表达增加,

作者单位:266011 青岛大学医学院附属青岛市立医院神经科

通讯作者:郑乃智,电子信箱:zhengnaizhi2007@126.com

包括缺氧和毛果芸香碱诱导的癫痫持续状态动物模型。Watanabe 等观察 *fos* 野生型 (+/+), 纯合子型 (-/-), 杂合子型 (+/-) 癫痫小鼠, 发现纯合子型 (-/-) 小鼠 MFS 低于野生型 (+/+), 而杂合子型 (+/-) MFS 表达居中。(3) 神经营养因子与 MFS 的关系: 神经营养因子 (neurotrophic factors, NTFs) 包括神经生长因子 (NGF), 脑源性神经营养因子 (BDNF) 和成纤维细胞生长因子 (FGF) 等。在出生早期, NTFs 和它们的受体在脑内大量表达, 参与正常突触的形成^[9]。癫痫发作早期即可引起 NTFs (如 BDNF mRNA 和蛋白) 在边缘系统的表达。NTFs 受体属于 Trk 家族, 尤其是 TrkB, 在致痫灶内表达增加。TrkB 可以活化信号转导, 包括丝氨酸 - 苏氨酸激酶, 胞外信号调节激酶和磷脂酶 C 等, 在癫痫发作后突触重建中发挥作用。研究发现, 癫痫所致脑损伤后 NGF 表达增加与 MFS 出现在时间上一致。关于 BDNF 与 MFS 的关系尚存在分歧。还需要进一步的实验证明, 即癫痫发作不同时期, BDNF 作用可能不同, 甚至相反, 但在癫痫发作后期, BDNF 过度表达与癫痫病灶内异常突触形成有关。(4) 轴突导向分子与 MFS 的关系: 在中枢神经系统内, 神经元轴突的生长, 分布受到严格的控制。轴突导向分子 (guidance molecule) 通过接触吸引, 接触排斥, 化学吸引和化学排斥 4 种机制参与轴突生长。目前已知的轴突导向分子有: ephrins, netrins, slits 和脑信号蛋白 (semaphorins, Sema)。其中 Sema 在 MFS 形成中发挥重要作用。Sema 可分为 8 个亚群, 分别是 Sema1 - Sema7 和 semaV。Sema 属于分泌型蛋白, 通过化学排斥限制轴突的延伸。Sema3A 由内嗅皮质的星形胶质细胞产生, 被分泌进入齿状回分子层后, 形成阻挡苔藓纤维延伸到内分子层的屏障。采用电刺激诱导小鼠癫痫持续状态后, 可见内嗅皮质 Sema3A mRNA 表达减少, 同时粗大的苔藓纤维延伸至内分子层。(5) 谷氨酸受体与 MFS 的关系: 谷氨酸是中枢神经系统的重要兴奋性神经递质。谷氨酸受体可以分为 AMPA 受体, NMDA 受体和 Kainate 受体 3 种。在癫痫发作过程中, 神经元异常兴奋, 大量兴奋性神经递质释放, 可以影响谷氨酸受体, 激活其介导的信号通路。目前认为谷氨酸受体亚单位改变可能与苔藓纤维侧支出芽并返折入齿状回内分子层有关。

二、颗粒细胞移行障碍

大量实验证明, RE 患者, 尤其是颞叶癫痫的 RE 患者, 其分化成熟的颗粒细胞不能移行到颗粒层, 而

是滞留在齿状回的门区^[10]。更为重要的是, 停留在门区的颗粒细胞与颗粒层的颗粒细胞具有相同的神经元特性, 能与颗粒层建立突触联系^[11]。门区异常颗粒细胞 (hilar ectopic granule cells, HEGCs) 也接受穿通通路的刺激。但是, 与颗粒层颗粒细胞明显不同, HEGCs 能与其他神经元建立异常的突触联系。目前认为, HEGCs 参与构成兴奋性神经环路, 是 RE 异常神经网络的组成部分^[12]。

1. 颗粒细胞移行障碍的相关因素: 癫痫发作引起颗粒细胞移行障碍的机制还不明确。最近有研究表明, 癫痫长期反复发作可以引起颗粒细胞的前体细胞移入门区, 并参与 HEGCs 形成^[13]。(1) reelin 与颗粒细胞移行障碍的关系: reelin 是一种神经元移行导向因子, 能够介导颗粒细胞在分化成熟的过程中向颗粒层迁移, 并维护颗粒层的完整性。reelin 主要表达在齿状回颗粒层, 其位于门区中间神经元的一个特殊亚群易受癫痫发作影响。Gong 等^[14]发现, 在毛果芸香碱诱导大鼠癫痫持续状态后, 其齿状回颗粒层内 reelin 表达显著降低。在 RE 患者手术切除的脑标本中, 发现 reelin 在海马区表达减少, 并认为与海马区颗粒细胞分散有关。大量研究支持 reelin 基因表达受 DNA 甲基化的调节。研究发现 RE 患者手术切除标本中, 海马区的 reelin 基因甲基化程度显著高于对照组, 且海马区颗粒细胞分散程度增加^[15]。(2) 颗粒细胞移行障碍相关的其他因素: γ -氨基丁酸 (GABA) 的丢失可能与颗粒细胞移行障碍有关。GABA 能刺激齿状回颗粒细胞分化, 并能防止成神经细胞迁移到其他脑区。在癫痫发作过程中, 作为抑制性神经递质的 GABA 减少, 其上述功能减弱, 会间接促进 HEGCs 的形成。BDNF 也参与 HEGCs 的形成, 在癫痫发作后, 可以观察到 BDNF 表达增加。Scharfman 等^[16]发现, BDNF 可以刺激齿状回颗粒层神经发生, 并诱导异常颗粒细胞出现, 与前述 BDNF 与 MFS 相关一致。

2. 颗粒细胞移行障碍与 RE 的关系: 虽然 HEGCs 与齿状回颗粒层的颗粒细胞具有相同的神经元结构, 但 HEGCs 能发出异常突触, 参与兴奋性神经环路的形成, 与 RE 有关。2003 年 Scharfman 等^[17]观察培养的海马切片, 发现 HEGCs 接受刺激后, 产生兴奋性突触后电位 (EPSP), 并能够把兴奋传入齿状回。与颗粒层颗粒细胞接受来自穿通通路的单突触联系不同, HEGCs 接受来自穿通通路的多突触联系。另外, HEGCs 还与海马 CA3 区的锥体细胞建立兴奋性突触

联系。海马锥体细胞伸出轴索侧支到门区,与 HEGCs 形成突触^[18]。海马 CA3 区锥体细胞之间存在回返性突触,癫痫发作诱导的 MFS 也与 CA3 区锥体细胞形成突触。HEGCs 接受锥体细胞轴索侧支,同时又与颗粒细胞存在突触联系,这就构成了回返性的兴奋性神经通路。在海马起源的兴奋经过这个环路,不断放大,最终引起癫痫发作,并扩散到其他脑区^[18]。

三、抑制性神经环路的形成

在海马区,来自嗅脑皮质的刺激经过穿通通路传入颗粒细胞的同时,也传到门区的苔藓细胞和齿状回的篮状细胞。苔藓细胞是谷氨酸能神经元,而齿状回的篮状细胞是 GABA 能神经元,苔藓细胞和篮状细胞都可以通过前馈抑制影响颗粒细胞。除了前馈抑制外,篮状细胞还可以通过反馈抑制影响颗粒细胞的兴奋性。外伤所诱导颞叶癫痫大鼠模型显示,海马区篮状细胞减少,伴有颗粒细胞兴奋性异常增高。

在苔藓细胞丢失的基础上,还有一个“篮状细胞静止学说”。正常情况下,篮状细胞对颗粒细胞反馈抑制的信号来自苔藓细胞。当苔藓细胞丢失时,篮状细胞也失去了抑制颗粒细胞的功能。但是也有研究者发现,苔藓细胞可以直接影响颗粒细胞的兴奋性,不需要通过篮状细胞。

与兴奋性神经环路相比,抑制性神经环路还有待完善。抑制性神经环路与 RE 的关系尚待更多的实验证据支持,尤其是其在 RE 中的作用机制更需要进一步的研究。无论如何,这将为我们进一步了解 RE 发病机制开启一个新的方向。综上所述,RE 是脑神经元异常放电所致,异常突触和神经网络形成造成 AEDs 敏感度降低,是 RE 产生和持续存在的基础。进一步研究神经网络在 RE 中的作用,对最终攻克 RE,改善癫痫患者生活质量具有重要意义。

参考文献

- 1 Buckmaster PS, Ingram EA, Wen X. Inhibition of the mammalian target of rapamycin signaling pathway suppresses dentate granule cell axon sprouting in a rodent model of temporal lobe epilepsy[J]. *Neurosci*, 2009, 29(25): 8259 - 8269
- 2 Chen LL, Feng HF, Mao XX, *et al.* One hour of pilocarpine - induced status epilepticus is sufficient to develop chronic epilepsy in mice, and is associated with mossy fiber sprouting but not neuronal death[J]. *Neurosci Bull*, 2013, 29(3): 295 - 302
- 3 França KL, Guimarães de Almeida AC, Infantes AF, *et al.* Enhanced synaptic connectivity in the dentate gyrus during epileptiform activity:

- network simulation[J]. *Comput Intell Neurosci*, 2013, Epub 2013 Feb 4
- 4 Santhakumar V, Aradi I, Soltesz I. Role of mossy fiber sprouting and mossy cell loss in hyperexcitability: a network model of the dentate gyrus incorporating cell types and axonal topography[J]. *Neurophysiol*, 2005, 93(1): 437 - 453
- 5 Acharya MM, Hattiangady B, Shetty AK. Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy[J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 84(4): 363 - 404
- 6 Zeng LH, Rensing NR, Wong M. The mammalian target of rapamycin signaling pathway mediates epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy[J]. *Neurosci*, 2009, 29(21): 6964 - 6972
- 7 Rakhade SN. Early alterations of AMPA receptors mediate synaptic potentiation induced by neonatal seizures[J]. *Neurosci*, 2008, 28(32): 7979 - 7990
- 8 Rakhade SN, Jensen FE. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms[J]. *Nat Rev Neurol*, 2009, 5(7): 380 - 391
- 9 Greer PL, Greenberg ME. From synapse to nucleus: calcium - dependent gene transcription in the control of synapse development and function[J]. *Neuron*, 2008, 59(6): 846 - 860
- 10 Chen J, Quan QY, Yang F, *et al.* Effects of lamotrigine and topiramate on hippocampal neurogenesis in experimental temporal - lobe epilepsy[J]. *Brain Res*, 2010, 1313(2): 270 - 282
- 11 Jakubs K, Nanobashvili A, Bonde S, *et al.* Environment matters: synaptic properties of neurons born in the epileptic adult brain develop to reduce excitability[J]. *Neuron*, 2006, 52(6): 1047 - 1059
- 12 Shapiro LA, Ribak CE, Jessberger S. Structural changes for adult - born dentate granule cells after status epilepticus[J]. *Epilepsia*, 2008, 49(Suppl. 5): 13 - 18
- 13 Parent JM, Von Dem BN, Lowenstein DH. Prolonged seizures recruit caudal subventricular zone glial progenitors into the injured hippocampus[J]. *Hippocampus*, 2006, 16(3): 321 - 328
- 14 Gong C, Wang TS, Huang HS, *et al.* Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus[J]. *Neurosci*, 2007, 27(8): 1803 - 1811
- 15 Levenson JM. The role of reelin in adult synaptic function and the genetic and epigenetic regulation of the reelin gene[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779(8): 422 - 431
- 16 Scharfman HE, Goodman J, Macleod A, *et al.* Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats[J]. *Exp Neurol*, 2005, 192(2): 348 - 356
- 17 Scharfman HE, Sollas AL, Berger RE, *et al.* Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure - induced mossy fiber sprouting[J]. *Neurophysiol*, 2003, 90(4): 2536 - 2547
- 18 Myers CE, Scharfman HE. Pattern separation in the dentate gyrus: a role for the CA3 backprojection[J]. *Hippocampus*, 2011, 21(11): 1190 - 1215

(收稿日期: 2013 - 03 - 31)

(修回日期: 2013 - 04 - 08)