



电子、语音版

·论著·

炎症小体激活小胶质细胞促进异常新生神经元形成 在锂-毛果芸香碱致病大鼠中的作用机制

周乐超¹, 刘远静¹, 陈良雄¹, 苏晓玲¹, 廖小红¹, 张治平²

1. 湖南省隆回县人民医院神经内科, 湖南 邵阳 422200

2. 中南大学湘雅医院神经外科, 湖南 长沙 410008

摘要:目的 在锂-毛果芸香碱(Lithium-Pilocarpine)致病大鼠模型中,检测炎症小体的激活,观察小胶质细胞的活化和异常新生神经元的形成,探索炎症小体激活小胶质细胞促进异常新生神经元形成在癫痫发生发展中的作用机制。方法 通过腹腔注射氯化锂和毛果芸香碱建立癫痫大鼠模型,将大鼠分为 Sham 组(生理盐水对照组, $n=12$)、Pilo 组(锂-毛果芸香碱致病组, $n=20$)和 Pilo+MCC950 组[锂-毛果芸香碱致病后给予核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体 3(NLRP3)抑制剂组, $n=20$],在急性期观察记录大鼠癫痫的行为学表现,通过病理切片确认脑组织损伤情况和细胞激活情况,借助分子检测确认炎症小体和其他分子的表达情况。采用体外细胞模型挽救实验验证炎症小体的作用。结果 Pilo 组大鼠有 6 只出现 V 级,5 只出现 IV 级,2 只出现 III 级的癫痫发作情况。相较之下, Pilo+MCC950 组大鼠则没有出现 V 级,6 只出现 IV 级,8 只出现 III 级,2 只出现 II 级的癫痫发作情况。Pilo 组强直挛缩发作的潜伏期短于 Pilo+MCC950 组, III 级以上癫痫发作的次数和持续时间大于 Pilo+MCC950 组。Pilo 组 NLRP3 和 pro-caspase-1 的含量、4 种促炎细胞因子的含量以及脑源性神经营养因子(BDNF)和细胞外调节蛋白激酶(ERK)均高于 Pilo+MCC950 组。免疫荧光检测显示, Pilo 组小胶质细胞大量活化,出现大量异常新生神经元。体外细胞实验后, ELISA 结果验证了炎症小体的作用。结论 在锂-毛果芸香碱致病大鼠模型中,炎症小体 NLRP3 接受外界炎症刺激而活化聚集,进而大量产生多种促炎细胞因子,使得小胶质细胞活化,分泌 BDNF 并激活 ERK 信号通路,调控异常新生神经元的形成和聚集等生物学行为,参与癫痫的发生发展。 [国际神经病学神经外科学杂志, 2024, 51(4): 28-35]

关键词:癫痫;炎症小体;炎症因子;小胶质细胞;新生神经元

中图分类号:R742.1

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2024.04.005

Mechanism of action of inflammasome in promoting the formation of abnormal neonatal neurons by activating microglial cells in rats with lithium-pilocarpine-induced epilepsy

ZHOU Lechao¹, LIU Yuanjing¹, CHEN Liangxiong¹, SU Xiaoling¹, LIAO Xiaohong¹, ZHANG Zhiping²

1. Department of Neurology, Longhui People's Hospital, Shaoyang, Hunan 422200, China

2. Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China

Corresponding author: ZHANG Zhiping, Email: drzhiping@csu.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate the activation of inflammasome and microglial cells and the formation of abnormal neonatal neurons in a rat model of lithium-pilocarpine-induced epilepsy, as well as the mechanism of action of inflammasome in the development and progression of epilepsy by activating microglial cells and promoting the formation of

基金项目:湖南省卫生健康委科研计划项目(202203073346)。

收稿日期:2024-06-09;修回日期:2024-08-09

作者简介:周乐超(1980—),男,副主任医师,本科,湖南省邵阳市隆回县人民医院神经内科,科室副主任,主要研究癫痫、脑血管病等疾病的诊断治疗及神经免疫,Email: 995400032@qq.com。

通信作者:张治平(1970—),男,副主任医师,博士,中南大学湘雅医院神经外科,主要从事神经外科临床与基础研究工作,Email: drzhiping@csu.edu.cn。

abnormal neonatal neurons. **Methods** Rats were given intraperitoneal injection of lithium and pilocarpine to establish a model of epilepsy. Rats were divided into Sham group (saline control group, $n=12$), Pilo group (lithium-pilocarpine epileptogenic group, $n=20$) and Pilo+MCC950 group (lithium-pilocarpine epileptogenic followed by administration of NLRP3 inhibitor group, $n=20$). The behavioral manifestations of epilepsy were observed in the acute stage; pathological sections were used to observe brain tissue injury and cell activation; molecular assays were used to measure the expression of inflammasome and other molecules; *in vitro* cell model rescue experiments were used to verify the effect of inflammasome.

Results In the Pilo group, there were six rats with grade V seizures, five with grade IV seizures, and two with grade III seizures, while in the Pilo+MCC950 group, there were no rats with grade V seizures, and there were six rats with grade IV seizures, eight with grade III seizures, and two with grade II seizures. Compared with the Pilo+MCC950 group, the Pilo group had a significantly shorter latency period of myotonic seizures and significantly higher number and longer duration of grade \geq III seizure. The Pilo group had significantly higher levels of NLRP3, pro-caspase-1, four inflammatory cytokines, BDNF, and ERK than the Pilo+MCC950 group. Immunofluorescence assay showed the activation of a large number of microglial cells and the presence of a large number of abnormal neonatal neurons in the Pilo group. After *in vitro* cell experiments, the results of ELISA validated the role of inflammasome. **Conclusion** In the rat model of lithium-pilocarpine-induced epilepsy, inflammasome NLRP3 is activated by external inflammatory stimuli and then produces a large number of inflammatory cytokines, thereby activating microglial cells to secrete BDNF and activate the ERK signaling pathway, and thus it regulates the formation and aggregation of abnormal neonatal neurons and participates in the development and progression of epilepsy.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2024, 51(4): 28–35]

Keywords: epilepsy; inflammasome; inflammatory cytokines; microglial cells; neonatal neurons

癫痫是最常见的严重神经系统疾病之一,影响波及全球 7000 万人口左右^[1]。2021 年全球疾病负担调查报告指出,癫痫导致的伤残调整寿命年为 1440 万,占神经系统健康损失的 3.25%,占总体健康损失的 0.5%,给社会带来了较大负担^[2]。癫痫是由多种不同病因引起的脑部神经元异常高度同步化放电的发作性疾病,其频繁发作可导致神经元不可逆损伤^[3]。到目前为止,仍没有治疗方案可以有效地阻止或逆转癫痫的进展,患者的生命安全和生活质量受到了严重的威胁。近年来关于癫痫发病机制的研究有了一定的进展,但仍有过半的癫痫患者病因未知,进而治疗效果不理想,因此进一步探究癫痫的发病机制具有很大的意义。

海马齿状回的颗粒细胞下层(subgranular zone, SGZ)是新生神经元产生的主要部位之一,正常情况下 SGZ 区的神经干细胞(neural stem cell, NSC)大多处于静止状态^[4]。而锂-毛果芸香碱致痫动物模型显示癫痫持续状态(status epilepticus, SE)后 SGZ 区 NSC 分化能力增强,形成大量的神经前体细胞。这些前体细胞不断在向颗粒细胞层迁移并整合为新生颗粒细胞的同时,也异位迁移至门区和分子层形成异位的新生神经元^[5]。癫痫后的新生神经元具有不成熟的基底状树突,接受苔藓纤维终末的传入联系,呈现自发爆发性放电,可能是自发性痫性发作的结构基础。前期研究也发现抑制锂-毛果芸香碱致痫小鼠海马 SGZ 区新生神经元的数目和其异常的树突结

构,可以减轻自发性痫性发作的频率和严重程度。由此可见,新生神经元异常增殖、迁移、整合的过程是癫痫发生的重要原因。

炎症小体核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体 3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)是一种多分子蛋白质复合物,由 NLRP3 蛋白、适配器蛋白和 pro-caspase-1 组成,可对炎症刺激产生反应,识别损伤相关分子模式和/或病原体相关分子模式,招募含有 caspase 募集结构域的凋亡相关斑点样蛋白 ASC,切割 pro-caspase-1 使其激活成为 caspase-1,接着将无活性的 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 加工为有活性的促炎细胞因子^[6]。已有多项研究表明,癫痫发生与炎症小体 NLRP3 的表达增多有关:在红藻氨酸诱导的癫痫大鼠模型和电刺激诱导的持续性癫痫大鼠模型中,大鼠海马区炎症小体 NLRP3 表达增多^[7],抑制炎症小体 NLRP3 的表达可减少神经元损伤,减轻癫痫症状^[8]。所以我们继续深入研究炎症小体 NLRP3 促进异常新生神经元形成导致癫痫的机制,以期将其作为靶点应用于治疗。

小胶质细胞作为 SGZ 区神经干细胞微环境的重要组成部分,在癫痫过程中参与了对神经元损伤的持续反应和对高水平神经元放电或癫痫发作的动态反应^[9]。小胶质细胞可在炎症小体 NLRP3 的作用下被激活,产生信号转导级联介导分泌促炎细胞因子,进而发生表型转换,分

泌神经营养因子促进新生神经元生成,调节新生神经元增殖、迁移、整合等生物学行为,参与癫痫的发生发展^[10]。

我们的前期研究发现,炎症小体 NLRP3 在锂-毛果芸香碱诱导的癫痫急性期的大鼠模型中表达急剧增高,但是 NLRP3 在癫痫中的作用及其机制还未有相关报道。因此,我们设计并实施本实验,探索炎症小体 NLRP3 通过激活小胶质细胞促进异常新生神经元形成在癫痫的发生发展过程中的作用机制,从而为临床抗癫痫新药物的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 52 只雄性 SD 大鼠(体重 220 ~ 250 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司)。研究项目已通过湖南省隆回县人民医院医学伦理委员会的审查和批准(HYSC-2022-03)。

1.1.2 细胞 BV-2(小鼠小胶质细胞), CL-0493, 购自武汉普诺赛生物科技公司; SH-SY5Y(人神经母细胞瘤细胞), CL-0208, 购自武汉普诺赛生物科技公司。

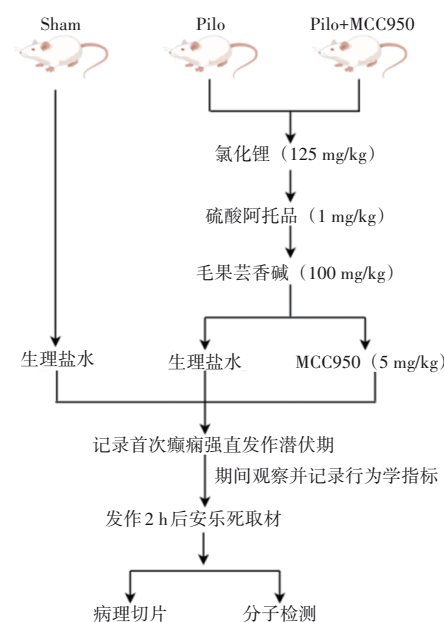
1.1.3 试剂 NLRP3 抑制剂 MCC950 (CP-456773, CRID3), CAS 号: 210826-40-7, MedChemExpress, 中国。NLRP3 激动剂 MSU (Monosodium urate), CAS 号: 1198-77-2, 思天德生物, 中国。

1.2 实验分组

1.2.1 动物实验 参照既往文献制作癫痫大鼠模型^[11], 选用改良后的锂-毛果芸香碱模型来减少毛果芸香碱的使用剂量进而降低实验动物的死亡率。模型组大鼠腹腔注射 (intraperitoneal injection, IP) 氯化锂 (125 mg/kg), 观察没有异常情况出现, 20 h 后腹腔注射硫酸阿托品 (1 mg/kg) 来预防周围胆碱能反应, 30 min 后腹腔注射毛果芸香碱 (100 mg/kg), 待其发作持续 2 h 后过量麻醉安乐死, 取脑组织行切片及分子检测。对照组仅注射等量生理盐水。抑制剂组同时腹腔注射 MCC950 (5 mg/kg) 来抑制炎症小体 NLRP3。

利用随机数表法将 52 只雄性 SD 大鼠分为 3 组, 分别为 Sham 组(生理盐水对照组, $n=12$)、Pilo 组(锂-毛果芸香碱致痫组, $n=20$) 和 Pilo+MCC950 组(锂-毛果芸香碱致痫后给予 NLRP3 抑制剂组, $n=20$)。按照上述方法制作动物模型后, 在出现强直发作的 2 h 内观察并记录其行为学变化(具体见下文)。随后采用过量麻醉法安乐死, 立即取材进行后续实验检测。考虑到改良后的锂-毛果芸香碱致痫大鼠仍然具有较高的死亡率, 为保证有足够的大鼠存活到急性期实验结束, 在造模时增加了模型组和抑制剂组的大鼠数量, 造模结果详见结果部分。最终保证每组大鼠有 12 只以上存活, 6 只用于病理切片, 6 只用于分子检测, 其余均安乐死(图 1)。

1.2.2 细胞实验 BV-2 细胞培养在 90% DMEM 高糖培



进行TUNEL染色,观察脑组织海马各个区域的细胞凋亡情况。

1.3.4 免疫荧光染色观察离子化钙结合衔接分子1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba1)和神经元细胞核(neuronal nuclei, NeuN)的表达情况 大鼠脑组织切片后进行免疫荧光染色,一抗为抗Iba1(1:200, Abcam, 中国)、抗NeuN(1:200, Abcam, 中国)。然后用相应的二抗(1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)孵育切片。观察Iba1和NeuN的表达情况,进而判断小胶质细胞的活化情况和新生神经元的形成情况。

1.3.5 Western blotting检测相关分子 采用一抗为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(Ab8245, Abcam, 中国), NLRP3 (Ab214185, Abcam, 中国), 胱天蛋白酶原-1(pro-caspase-1)(MBS668014, MyBioSource, 美国), 脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)(Ab108319, Abcam, 中国), 细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)(Ab54230, Abcam, 中国)。然后相应二抗孵育,检测蛋白表达情况。

1.3.6 ELISA检测相关分子 用ELISA试剂盒检测NLRP3(MA34877, BMASAY)、pro-caspase-1(D721050, Sangon biotech)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1beta, IL-1 β)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(EPXR450-12171-901, Thermo Fisher Scientific)、BDNF(EEL088, Thermo Fisher Scientific)、ERK(85-86013-11, Thermo Fisher Scientific)、NeuN(JOTEK1594Ra, Jotbody)的表达情况。

1.4 统计学方法

使用GraphPad Prism 8进行统计分析并绘制条形图,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;通过 t 检验对两组计量资料进行比较,通过Mann Whitney检验对两组等级资料进行比较,通过 χ^2 检验对两组计数资料进行比较,通过单因素方差分析(ANOVA)对多组进行比较,然后对多重比较进行事后Bonferroni-Dunn校正。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组行为学观测、海马各区的病理损伤及凋亡情况

Sham组没有出现癫痫的情况。在急性期内,Pilo组20只大鼠有7只死亡,剩余13只存活至实验结束;Pilo+MCC950组20只大鼠有4只死亡,剩余16只存活至实验结束。根据Racine分级评定,Pilo组大鼠有6只出现V级,5只出现IV级,2只出现III级的癫痫发作情况。相较之下,Pilo+MCC950组大鼠则没有出现V级,6只出现IV级,8只出现III级,2只出现II级的癫痫发作情况

(图2A, $U=35.000$, $P=0.001$)。记录给药后到第一次强直痉挛发作的潜伏期,Pilo组短于Pilo+MCC950组(图2B, $t=13.850$, $P<0.001$)。整个急性实验期间III级以上癫痫发作的次数和持续时间比较,Pilo组大于Pilo+MCC950组(图2C, $\chi^2=8.011$, $P=0.156$;图2D, $t=9.676$, $P<0.001$)。

HE染色观察海马各区的病理损伤情况,Sham组基本正常,Pilo组神经元肿胀变性,染色不均匀,锥体细胞大量丢失,而Pilo+MCC950组病变较轻(图2E)。

TUNEL染色情况,可见Sham组细胞少见凋亡,Pilo组细胞凋亡明显,而Pilo+MCC950组则凋亡程度较轻(图2F)。Western blotting检测炎症小体NLRP3和其主要成分pro-caspase-1的含量,结果表明Pilo组NLRP3和pro-caspase-1的含量最高,Pilo+MCC950组高于Sham组但低于Pilo组(图2G;2H, $F=186.000$, $P<0.001$;2I, $F=30.410$, $P<0.001$)。

2.2 多种促炎细胞因子及Iba1检测情况

3组4种促炎细胞因子(IL-1 β 、IL-6、IL-18和TNF- α)比较,差异有统计学意义(图3A, $F=30.700$, $P<0.001$;3B, $F=317.100$, $P<0.001$;3C, $F=218.700$, $P<0.001$;3D, $F=35.030$, $P<0.001$),其中,Pilo组的含量均高于Pilo+MCC950组。

免疫荧光检测Iba1,结果表明Pilo组小胶质细胞大量活化(图3E)。

2.3 BDNF、ERK和NeuN表达情况

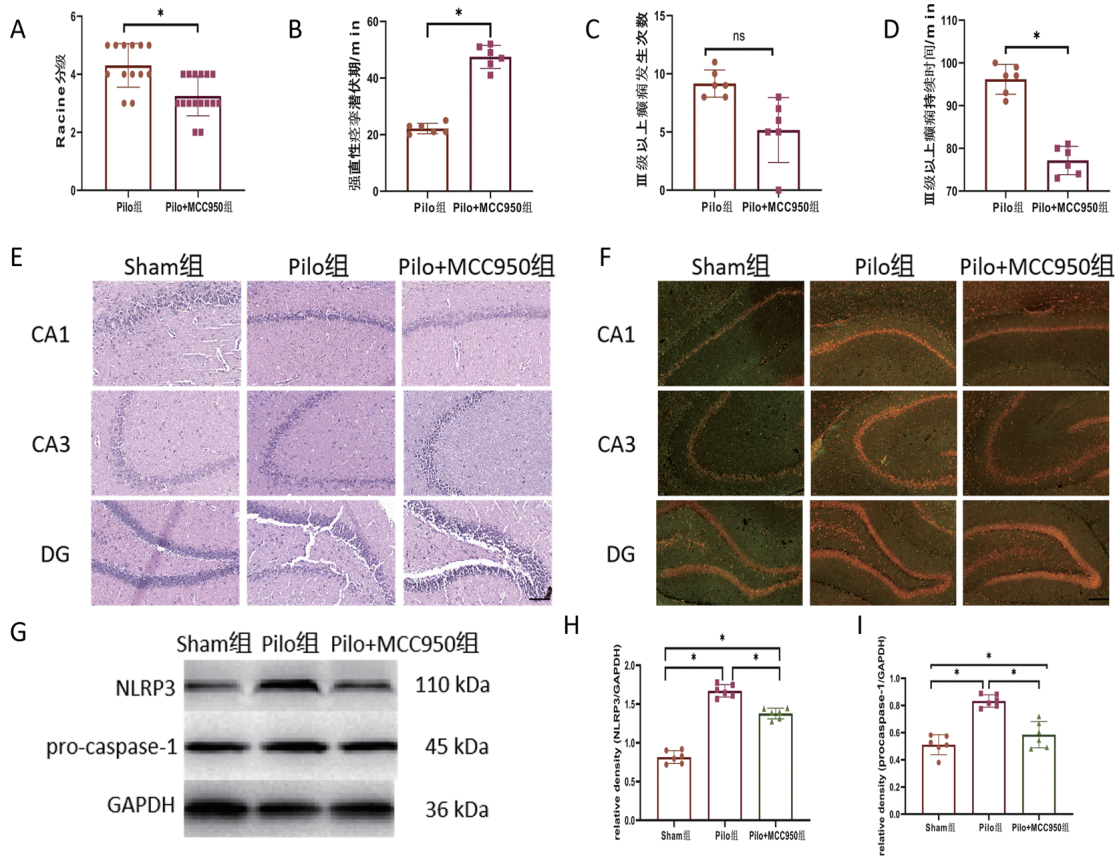
三组BDNF和ERK的表达水平比较,差异有统计学意义(图4A;4B, $F=83.980$, $P<0.001$;4C, $F=146.000$, $P<0.001$),其中,Pilo组的BDNF和ERK上调最多。免疫荧光检测NeuN表达情况,结果表明Pilo组出现大量异常新生神经元(图4D)。

2.4 体外细胞挽救实验情况

培养后收集BV-2细胞,裂解后进行ELISA检测NLRP3和pro-caspase-1的含量,结果表明,各组NLRP3和pro-caspase-1的含量比较,差异有统计学意义(图5A, $F=195.600$, $P<0.001$;5B, $F=325.700$, $P<0.001$),其中,Pilo组NLRP3和pro-caspase-1的含量均最高,Pilo+MCC950组高于Sham组但低于Pilo组,Pilo+MCC950+MSU组高于Pilo+MCC950组但低于Pilo组。

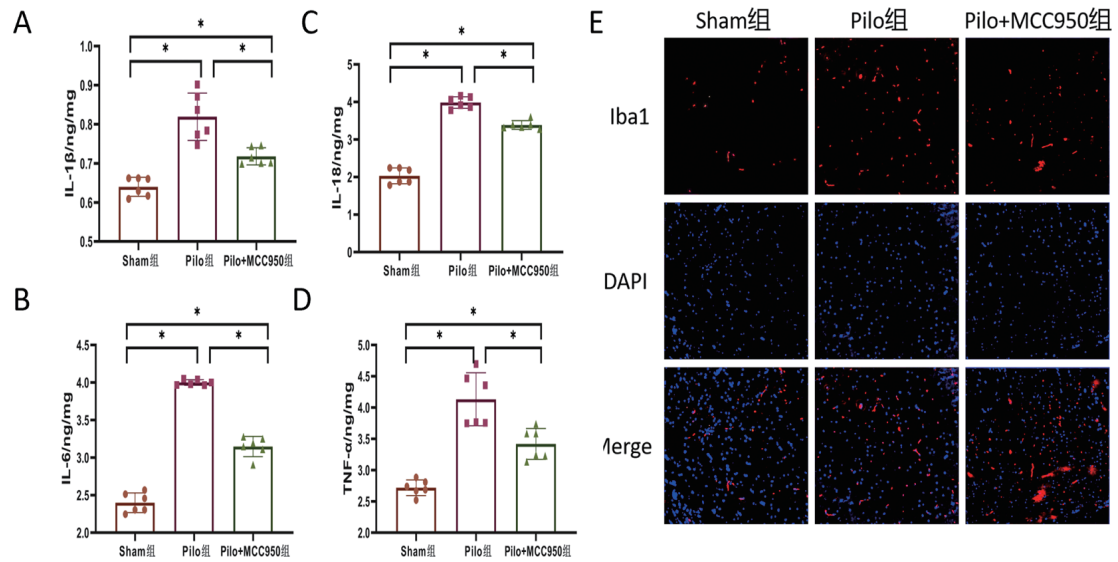
各组细胞培养液ELISA检测结果表明,各组4种促炎细胞因子含量比较,差异有统计学意义(图5C, $F=256.700$, $P<0.001$;5D, $F=341.600$, $P<0.001$;5E, $F=435.500$, $P<0.001$;5F, $F=495.300$, $P<0.001$),其中,Pilo组4种促炎细胞因子的含量均高于Pilo+MCC950组,Pilo+MCC950+MSU组介于两者之间,同时也测定了BDNF的含量,结果同上(图5G, $F=325.300$, $P<0.001$)。

各组BV-2细胞的培养液,作为条件培养液来培养



A: Racine 分级; B: 强直性痉挛潜伏期; C: Ⅲ级以上癫痫发作次数; D: Ⅲ级以上癫痫持续时间; E: HE 染色图像; F: TUNEL 染色图像; G~I: Western blotting 检测 NLRP3 和 pro-caspase-1; *表示组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

图2 毛果芸香碱导致大鼠急性癫痫发作与炎症小体 NLRP3 的激活

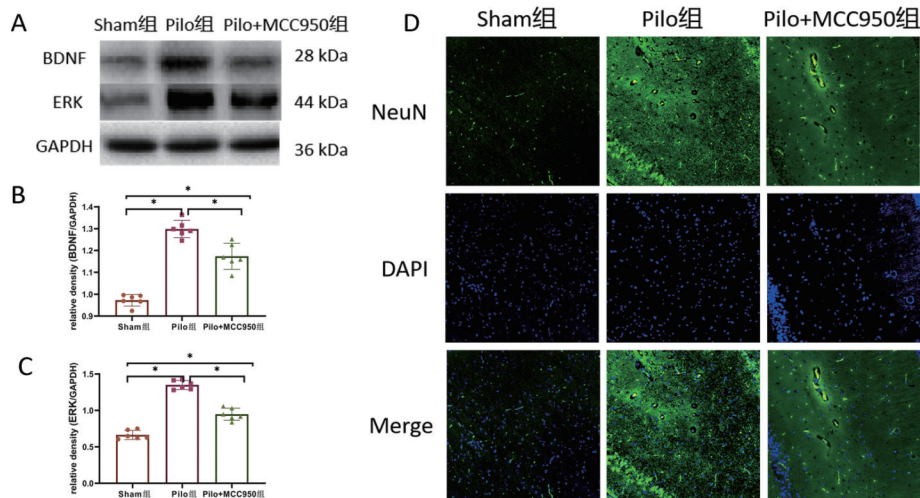


A~D: ELISA 检测促炎细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α); E: 免疫荧光染色图像; *表示组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

图3 炎症小体 NLRP3 产生多种促炎细胞因子激活小胶质细胞

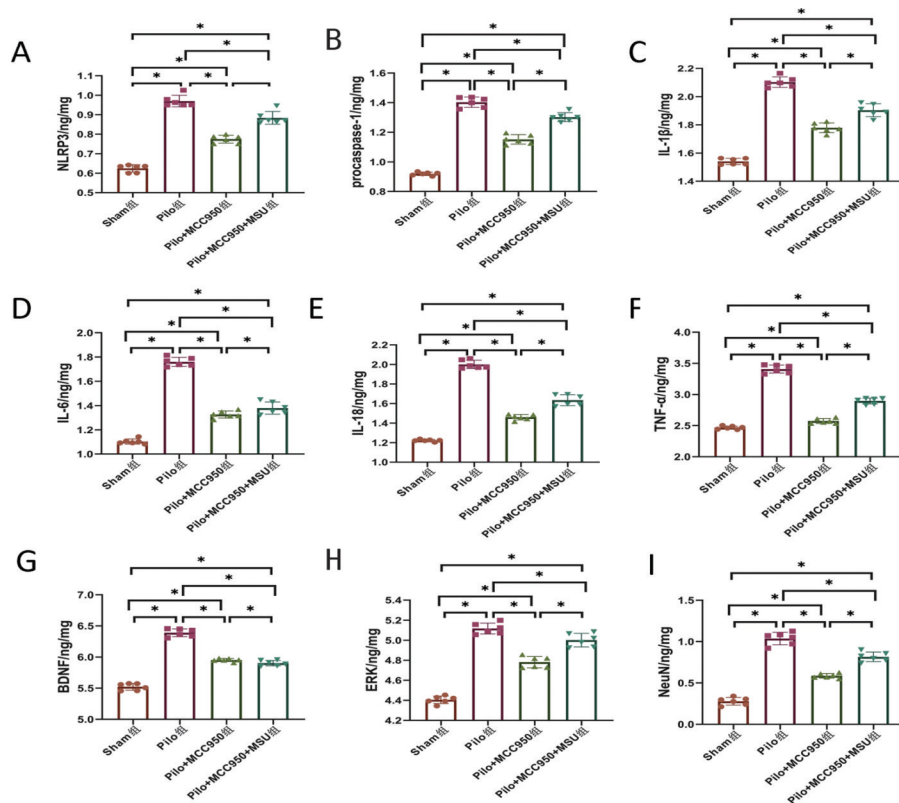
SH-SY5Y 细胞, 收集各组细胞, 裂解后进行 ELISA 检测 ERK 信号通路的表达情况, 各组 ERK 表达水平比较, 差异有统计学意义 (图 5H, $F=193.400$, $P < 0.001$), 其中, Pilo

组高于 Pilo+MCC950 组, Pilo+MCC950+MSU 组介于两者之间, 然后检测神经元的标志物 NeuN, 结果同上 (图 5I, $F=210.700$, $P < 0.001$)。



A~C:BDNF和ERK表达水平(Western blotting); D:NeuN表达情况(免疫荧光染色);*表示组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

图4 BDNF、ERK和NeuN表达情况



A~I:ELISA检测各分子含量;*表示组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

图5 体外细胞挽救实验验证炎症小体NLRP3在锂-毛果芸香碱致痫大鼠中的作用

3 讨论

癫痫作为一种影响较广泛、危害较严重的神经系统疾病,在当前的临床治疗中效果不佳,需要反复长期用药,既存在药物耐受性的问题,也存在药物毒性的问题,患者获利不佳^[13]。更严重者则需要外科手术控制,手术创伤与术后恢复又是一大问题^[14]。基于此种情况,深入研究并理解癫痫的发病机制显得至关重要,寻找更准确

更深入的靶点分子,将对进一步开发有关药物提供新的见解。目前对于癫痫的发病机制有着很多的认识,有着重于研究各种类型的离子通道在癫痫中的作用^[15],也有从神经化学的角度探讨各类神经递质的角色^[16],还有从遗传角度探讨基因对癫痫的影响^[17]。有单方面的研究认为,某些种类细胞起到关键作用^[18-19],也有从交互的角度分析细胞及其周围微环境的共同作用^[20]。不过殊途同

归,都将回归于神经元高度同步化的异常放电这一癫痫的本质变化上。

而异常放电的解剖基础,则要归功于异常新生神经元。在海马齿状回的颗粒细胞下层(SGZ),正常情况下SGZ区的神经干细胞(NSC)/多能神经干细胞(neural progenitor cell, NPC)大多处于静止状态。而锂-毛果芸香碱致痫动物模型显示癫痫持续状态(status epilepticus, SE)后SGZ区NSC/NPC分化能力增强,形成大量的神经前体细胞,这些前体细胞不断在向颗粒细胞层迁移并整合为新生颗粒细胞的同时,也异位迁移至门区和分子层形成异位的新生神经元。而癫痫后的新生神经元与正常产生的神经元有所不同,具有不成熟的基底状树突,接受苔藓纤维终末的传入联系,呈现自发爆发性放电,可能是自发性痫性发作的结构基础^[21]。因此异常新生神经元形成、增殖、迁移、整合的过程是颞叶癫痫发生的重要原因,也将作为癫痫研究的重要方向。

于是哪些分子能导致或者是促进异常新生神经元的增殖、迁移、形成等生物学过程,就成了研究的热点。经过先前研究和前期的预实验,笔者发现炎症小体NLRP3在锂-毛果芸香碱致痫大鼠中出现高表达的情况^[22-23]。NLRP3是一种多蛋白复合物,在缺乏外界炎症刺激的情况下,NLRP3蛋白与凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)之间的相互作用被抑制,导致其处于一种尚未组装的状态,这种机制保证其只有在适当情况下才能发挥作用。炎症刺激造成的损伤会通过多种途径激活NLRP3炎症小体,这些途径包括损伤相关分子模式和/或病原体相关分子模式,会借助多种膜上蛋白向细胞内转导信号。在NLRP3炎症小体被激活后,NLRP3蛋白和ASC之间的吡喃结构域相互作用,随后ASC的半胱天冬酶募集结构域与pro-caspase-1上的CARD结构域结合,使NLRP3炎症小体组装完成,caspase-1被切割活化发挥生物学作用,将无活性的促炎细胞因子转变为有活性的促炎细胞因子。NLRP3通过级联反应促进小胶质细胞炎症反应的加剧,进而改变SGZ区神经干细胞的微环境,受到周围微环境

变化的影响,神经干细胞出现异常的增殖分化,就会导致神经元的异常形成。

随着近年来对大脑免疫细胞的研究不断深入,小胶质细胞作为脑内免疫细胞之一的同时,也是神经胶质细胞之一,参与了神经元周围微环境的组成,在各类神经系统疾病的发生发展中都占有不可或缺的地位。其在癫痫中的作用,也随着全世界科学家的不断努力而逐渐明了^[24]。因此将目光聚焦于小胶质细胞,会对进一步理解癫痫的发生机制具有一定的帮助。生理状态下的小胶质细胞,主要负责稳定神经元,而在病理状态下则会随着时间迁移出现不同的作用,急性期以M1型为主促进炎症进展,慢性期以M2为主抵抗炎症进展^[25]。因此小胶质细胞的作用是复杂的,需要深入地细致分析。小胶质细胞在受到外界炎症因素的刺激后,胞内的炎症小体NLRP3激活,进一步促进了促炎细胞因子的产生与分泌,这将使其活化进而在急性期发挥促炎作用,影响细胞微环境。

过度活化的小胶质细胞又是如何影响异常新生神经元,根据对小胶质细胞产生的物质进行分析,神经营养因子之一的BDNF可能在其中起到作用^[26],实验结果也证明,BDNF确实促进了异常新生神经元的形成,并且通过ERK信号通路^[27]。不过BDNF主要由M2型的小胶质细胞产生,这是否意味着在癫痫的发展过程中,小胶质细胞出现了表型的转化。正如前文所说,小胶质细胞的作用是具有时空复杂性,这需要后续实验进一步验证,当前实验只能说明小胶质细胞被外界炎症刺激激活后,产生BDNF通过ERK信号通路作用于细胞微环境,调控异常新生神经元的形成(图6)。

本研究认为,在锂-毛果芸香碱致痫大鼠模型中,炎症小体NLRP3接受外界炎症刺激而活化聚集,进而大量产生多种促炎细胞因子,使得小胶质细胞活化,分泌BDNF并且激活ERK信号通路,调控异常新生神经元的形成和聚集等生物学行为,参与癫痫的发生发展,以炎症小体NLRP3作为靶点开发药物,将有助于癫痫的治疗。

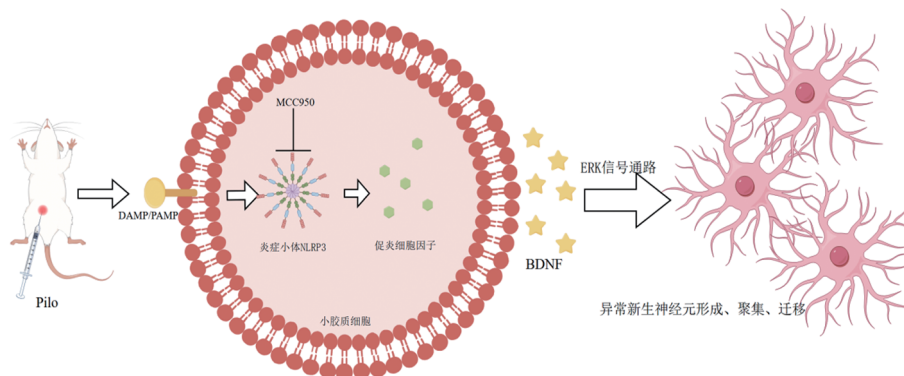


图6 假说示意图

参 考 文 献

- [1] THIJS RD, SURGES R, O'BRIEN TJ, et al. Epilepsy in adults[J]. *Lancet*, 2019, 393(10172): 689-701.
- [2] Institute for Health Metrics and Evaluation. Global burden of disease study 2021 (GBD 2021) demographics 1950-2021[EB/OL]. [2024]. <https://ghdx.healthdata.org/record/ihme-data/global-burden-disease-study-2021-gbd-2021-demographics-1950-2021>.
- [3] FALCO-WALTER J. Epilepsy-definition, classification, pathophysiology, and epidemiology[J]. *Semin Neurol*, 2020, 40(6): 617-623.
- [4] AMANOLLAHI M, JAMEIE M, HEIDARI A, et al. The dialogue between neuroinflammation and adult neurogenesis: mechanisms involved and alterations in neurological diseases[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(2): 923-959.
- [5] 龙莉莉, 肖波, 宋延民, 等. 毛果芸香碱致痫大鼠的海马PV中间神经元数目变化及其轴突出芽[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2011, 37(1): 15-19.
- [6] FU JN, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.
- [7] HE QC, JIANG LF, MAN SS, et al. Curcumin reduces neuronal loss and inhibits the NLRP3 inflammasome activation in an epileptic rat model[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2018, 15(3): 186-192.
- [8] MENG XF, TAN L, TAN MS, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome provides neuroprotection in rats following amygdala kindling-induced status epilepticus[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 212.
- [9] MORIN-BUREAU M, MILIOR G, ROYER J, et al. Microglial phenotypes in the human epileptic temporal lobe[J]. *Brain*, 2018, 141(12): 3343-3360.
- [10] ZHANG JQ, RONG PJ, ZHANG LJ, et al. IL4-driven microglia modulate stress resilience through BDNF-dependent neurogenesis[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(12): eabb9888.
- [11] 梁静静. 阿米洛利对毛果芸香碱大鼠癫痫模型的抗癫痫作用及其机制[D]. 武汉: 武汉大学, 2016.
- [12] 胡月. 藏红花酸通过TLR4/NF- κ B/NLRP3通路抑制海人酸诱导的小胶质细胞活化的研究[D]. 大连: 大连大学, 2022.
- [13] MANFORD M. Recent advances in epilepsy[J]. *J Neurol*, 2017, 264(8): 1811-1824.
- [14] GALAN FN, BEIER AD, SHETH RD. Advances in epilepsy surgery[J]. *Pediatr Neurol*, 2021, 122: 89-97.
- [15] 高琴琴. 毛果芸香碱癫痫模型中大鼠海马和内嗅皮层区TREK-2钾通道的表达变化及意义[D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [16] AKYUZ E, POLAT AK, EROGLU E, et al. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: an updated review[J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118826.
- [17] SYMONDS JD, ZUBERI SM, JOHNSON MR. Advances in epilepsy gene discovery and implications for epilepsy diagnosis and treatment[J]. *Curr Opin Neurol*, 2017, 30(2): 193-199.
- [18] VEZZANI A, RAVIZZA T, BEDNER P, et al. Astrocytes in the initiation and progression of epilepsy[J]. *Nat Rev Neurol*, 2022, 18(12): 707-722.
- [19] YU C, DENG XJ, XU D. Microglia in epilepsy[J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 185: 106249.
- [20] PURNELL BS, ALVES M, BOISON D. Astrocyte-neuron circuits in epilepsy[J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 179: 106058.
- [21] 陈露. 探讨DISC1蛋白通过Reelin信号通路对癫痫小鼠海马区新生神经元迁移的调控作用[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2021.
- [22] CHEN J, GAO Y, LIU N, et al. Mechanism of NLRP3 inflammasome in epilepsy and related therapeutic agents[J]. *Neuroscience*, 2024, 546: 157-177.
- [23] HONG YR, WEI CC, FU MY, et al. MCC950 alleviates seizure severity and angiogenesis by inhibiting NLRP3/IL-1 β signaling pathway-mediated pyroptosis in mouse model of epilepsy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 126: 111236.
- [24] PATEL DC, TEWARI BP, CHAUNSALI L, et al. Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(5): 282-297.
- [25] KINOSHITA S, KOYAMA R. Pro- and anti-epileptic roles of microglia[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(7): 1369-1371.
- [26] PROWSE N, HAYLEY S. Microglia and BDNF at the crossroads of stressor related disorders: towards a unique trophic phenotype[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 131: 135-163.
- [27] YAO W, CAO QQ, LUO SL, et al. Microglial ERK-NRBP1-CREB-BDNF signaling in sustained antidepressant actions of (R)-ketamine[J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(3): 1618-1629.

责任编辑:王荣兵