

癫痫大鼠海马中表达生长抑素的 中间神经元轴突出芽的研究

易芳¹, 肖波², 姜婷², 龙莉莉², 梁静慧², 冯莉², 李国良²

(中南大学湘雅医院 1. 干部医疗科; 2. 神经内科, 长沙 410008)

[摘要] **目的:**探讨表达生长抑素(somatostatin, SS)的树突型中间神经元的轴突出芽。**方法:**6~8周龄健康雄性SD大鼠随机分为实验组(腹腔注射氯化锂+匹罗卡品)和对照组(腹腔注射氯化锂+生理盐水),注药后于1,7,15,30,60 d 5个时间点又随机分为5个亚组(A1~5亚组, B1~5亚组)。免疫组织化学方法检测各组海马不同区域不同时间点SS中间神经元的表达及其轴突出芽情况,结合神经元特异性核抗原(neuronal nuclei, NeuN)的免疫组织化学及其与SS的免疫荧光双标记,观察SS中间神经元的数目及其轴突出芽的动态变化。**结果:**癫痫持续状态(status epilepticus, SE)后60 d时CA1区SS神经元数目超过对照组($P < 0.01$),60 d时海马CA1区全层均可见大量增多的SS阳性纤维;SE后60 d CA1区的起始部位始层和辐状层NeuN阳性神经元数目超过正常;SE后15 d时与NeuN双标记的SS中间神经元在CA1区始层逐渐增多,60 d时CA1始层及辐状层可见增多的双标记SS中间神经元。**结论:**SE后60 d CA1区全层大量增多的SS阳性纤维来自于CA1区始层及辐状层增多的SS阳性中间神经元,这种病理性轴突出芽可能在颞叶癫痫的发生和慢性期自发作中发挥重要作用。

[关键词] 颞叶癫痫; 生长抑素; 中间神经元; 轴突出芽; 神经元特异性核抗原

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.12.009

Axonal sprouting of somatostatin positive interneurons in the hippocampus in epileptic rats

YI Fang¹, XIAO Bo², JIANG Ting², LONG Lili², LIANG Jinghui², FENG Li², LI Guoliang²

(1. Department of Gerontology; 2. Department of Neurology, Xiangya Hospital,

Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the axonal sprouting of somatostatin (SS) positive interneurons in temporal lobe epilepsy. **Methods** 6–8 week-old healthy male SD rats were divided randomly into an epileptic group (treated by lithium and pilocarpine intraperitoneal injection) and a control group (by lithium and normal sodium intraperitoneal injection). Each group was randomly divided into 5 subgroups at 1, 7, 15, 30, and 60 d after the injection. Immunohistochemistry method was used to detect the number changes of SS or neuronal nuclei (NeuN) positive neurons in different domains of the hippocampus at different time points in each group, and the coexpression of SS

收稿日期 (Date of reception) 2011-06-15

作者简介 (Biography) 易芳, 博士, 医师, 主要从事癫痫和神经退行性变的临床和基础研究。

通信作者 (Corresponding author) 易芳, E-mail: yvonne10812@yahoo.com.cn

基金项目 (Foundation items) 国家自然科学基金(81071048, 81000553); 湖南省科技厅计划项目(2011FJ3244)。 This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(81071048, 81000553) and Human Science and Technology Department Plans, P. R. China (2011FJ3244).

positive interneurons combined with NeuN was detected by double immunofluorescence to observe the dynamic changes and axonal sprouting of SS positive interneurons. **Results** The number of SS neurons in the experimental group exceeded that in the control group in the CA1 area at 60 d post-status epilepticus SE ($P < 0.01$), and numerous SS positive fibers were seen throughout the layers of the CA1 area at 60 d post-SE. NeuN positive neurons in the stratum oriens and stratum radiatum layers in the initiation site of the CA1 area were beyond normal at 60 d post-SE. The number of double labeled SS interneurons gradually rose at 15 d in stratum oriens of CA1, and even exceeded that of the controls in the stratum oriens and stratum radiatum layers of CA1 at 60 d. **Conclusion** The numerous SS positive fibers throughout the layers of the CA1 area at 60 d post-SE come from the increased interneurons in the stratum oriens and stratum radiatum layers of CA1 area. The pathological axonal sprouting may play an important role in the generation and compensation of temporal lobe epilepsy.

Key words: temporal lobe epilepsy; somatostatin; interneuron; axonal sprouting; neuronal nuclei

难治性癫痫中以复杂部分性发作为主要表现的颞叶内侧癫痫最常见,但迄今为止发病机制仍不明确。海马兴奋性回路的增强和抑制性回路的减弱在颞叶癫痫发生中起着极为重要的作用^[1]。近年来,关于兴奋性回路的研究较多,而对于构成抑制性神经环路的 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)能中间神经元的研究则相对少见。

生长抑素(somatostatin, SS)中间神经元属于树突型GABA能中间神经元,主要与神经元树突形成突触连接^[2]。国外研究发现在电刺激模型^[3]及海人酸模型^[4]中海马门区均存在SS中间神经元的显著缺失,提示上述现象可能与颞叶癫痫的发生密切相关。但其在匹罗卡品致痫模型中的动态变化及慢性期的轴突出芽情况则知之甚少。本研究通过建立匹罗卡品致痫大鼠模型,在不同时间点检测SS中间神经元的动态变化及轴突出芽情况,结合神经元特异性核抗原(neuronal nuclei, NeuN)的免疫组织化学及其与SS的免疫荧光双标记,探讨SS中间神经元的动态变化及其轴突出芽现象。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

6~8周龄健康雄性Sprague Dawley大鼠(中南大学湘雅医学院实验动物中心提供),体质量(250 ± 20)g,90只,随机分为实验组(A组, $n = 55$)和对照组(B组, $n = 35$),每组腹腔注射药后于1,7,15,30,60d又随机分为5个亚组(A1~5亚组, $n = 11$; B1~5

亚组, $n = 7$)。

1.2 癫痫动物模型制作

实验组:腹腔注射氯化锂125 mg/kg,18~24h后腹腔注射匹罗卡品20 mg/kg,每30min可重复给予匹罗卡品10 mg/kg,痫性发作程度达Racine标准^[5]Ⅲ级及以上,并持续60min以上者为致痫成功;重复注射6次后仍未达到Ⅲ级的归于致痫失败,弃用。致痫成功后予以10%水合氯醛终止。急性诱发癫痫持续状态(status epilepticus, SE)后,每天观察动物行为,观察时间为8:00 am~12:00 pm。对照组:在与实验组相同的时间点腹腔注射氯化锂及生理盐水,注射后也立即观察大鼠的行为学变化。

1.3 灌注取材和冰冻切片

4%多聚甲醛对各时间点大鼠行灌注取材,取脑置4℃4%多聚甲醛固定过夜后,蔗糖过夜沉底。冰冻切片机(德国SLEE Technik公司)行16 μ m厚脑冠状连续切片,收集有海马的部分脑片于放置有0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)的24孔板中。剩余脑片及大鼠脑组织置于防冻液(50% 0.01 mol/L PBS,20%丙三醇,30%乙二醇)中,于-20℃冰箱保存备用。

1.4 免疫组织化学染色

0.01 mol/L PBS(pH值7.2~7.4)漂洗10min \times 6次;3%过氧化氢400 μ L/孔,室温下置于摇床30min以灭活内源性过氧化物酶;PBS漂洗;5%正常山羊血清+0.03%Trion-100溶液室温1h封闭抗原;1%小牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)稀释的一抗(兔抗大鼠SS多克隆抗体1:1500,

Bachem 公司;小鼠抗大鼠 NeuN 单克隆抗体 1:250, Chemicon 公司)4 ℃ 孵育过夜,37 ℃ 复温 1 h;PBS 漂洗 10 min × 6 次;1% BSA 稀释的二抗(羊抗兔及羊抗小鼠 IgG,均为 1:200 新鲜配置)室温 45 min;PBS 漂洗;AB 复合物室温孵育 30 min;PBS 漂洗后二氨基苯胺显色 5 min 左右,蒸馏水终止反应(该步在暗室中完成);显色完成后将脑片贴片于多聚赖氨酸处理过的载玻片,晾干、常规脱水、透明、封片。阴性对照采用 PBS 代替一抗,余同上述操作,结果为阴性。

1.5 免疫荧光双标

0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min × 6 次;10% 正常山羊血清 + 0.03% Trion-100 溶液室温 1 h 封闭抗原;分别滴加 1% BSA 稀释的 2 种一抗 SS + NeuN(兔抗大鼠 SS 多克隆抗体 1:1 500, Bachem 公司;小鼠抗大鼠 NeuN 单克隆抗体 1:250, Chemicon 公司)4 ℃ 孵育过夜,37 ℃ 复温 1 h;PBS 漂洗 10 min × 6 次;1% BSA 稀释的荧光二抗(Cy3 羊抗兔和 488 羊抗小鼠均为 1:100 新鲜配置)室温 2 h(该步及以下步骤均在暗室中完成);PBS 漂洗;将脑片贴片于多聚赖氨酸处理过的载玻片,晾干、甘油封片;激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS LSM 510)下观察。

1.6 细胞计数和统计学处理

用 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图象分析系统测定 SS 及 NeuN 阳性神经元数目,实验数据均用均

数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,成组设计多样本均数采用 SPSS12.0 软件单因素方差分析(ANOVA),实验组与对照组间比较用两样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 入组情况及行为学改变

实验组共 40 只大鼠致痫成功并入组,每个亚组 7~9 只,模型成功率为 72.7%。存活大鼠在 SE 后 15~30 d 后均出现自发发作;对照组大鼠均未见明显行为学变化。

2.2 SS 免疫组织化学染色结果

SE 后海马门区 SS 阳性神经元计数持续下降,7 d 时减至最低,15 d 后开始增加,但仍低于正常水平($P < 0.01$);SE 后 CA1 区 SS 神经元数目逐渐减少,7 d 时最低,15 d 后逐渐增多,30 和 60 d 时均超过正常水平,60 d 时 CA1 始层和辐状层可见增多的 SS 中间神经元($P < 0.01$,表 1,图 1);CA3 区 SS 阳性神经元 SE 后即逐渐减至最低,慢性期稍有恢复,但仍低于正常水平($P < 0.01$)。正常海马腔隙分子层和齿状回外分子层可见 SS 染色的纤维,SE 后消失,30 d 时又出现大量 SS 染色的纤维,并超过正常水平,SE 后 60 d 时海马 CA1 区全层均可见大量 SS 染色的纤维(图 1B)。

表 1 海马不同时间点不同部位 SS 阳性中间神经元数目($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Number of SS positive interneurons in different domains at different time points in the hippocampus ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	1 d	7 d	15 d	30 d	60 d	
CA1 区	对照组	35	8.50 ± 1.48	9.00 ± 1.30	8.60 ± 2.07	8.20 ± 1.35	8.40 ± 1.30
	实验组	40	3.90 ± 1.01 **	2.80 ± 0.99 **	9.00 ± 1.23	10.80 ± 2.01 *	12.60 ± 1.52 **
门区	对照组	35	36.20 ± 2.63	39.40 ± 3.21	35.90 ± 4.04	38.80 ± 2.70	37.00 ± 4.17
	实验组	40	20.80 ± 3.36 **	14.10 ± 3.58 **	19.60 ± 3.75 **	23.60 ± 4.23 **	25.50 ± 3.04 **
CA3 区	对照组	35	7.20 ± 1.57	6.90 ± 1.39	7.00 ± 0.89	6.50 ± 1.58	6.80 ± 1.32
	实验组	40	2.80 ± 1.55 **	2.30 ± 0.96 **	3.10 ± 1.03 **	3.50 ± 0.87 **	3.60 ± 0.75 **

与同一时间点同一部位对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

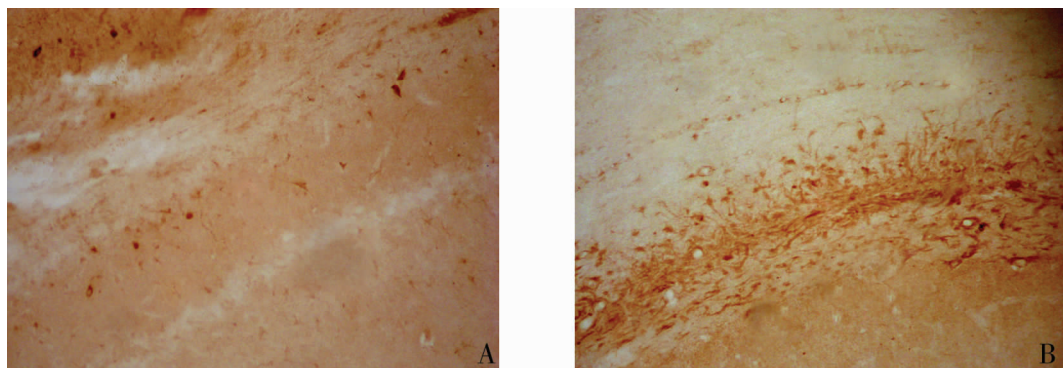


图 1 SS 免疫组织化学染色 (×100)。 A: 对照组海马 CA1 区可见少量 SS 阳性中间神经元; B: 实验组 SE 后 60 d 海马 CA1 区 SS 阳性中间神经元数超过对照组, CA1 区全层可见大量 SS 阳性纤维。

Fig. 1 Immunohistochemistry of SS (×100). A: A few SS positive neurons can be seen in CA1 area of hippocampus in control group; B: SS positive neurons in CA1 area in the experiment group increase at 60 d after SE, and a amount of the increased neurophils also can be seen in all layers.

2.3 NeuN 免疫组织化学染色结果

实验组 SE 后海马各层均有不同程度的神经元缺失。与对照组相比, SE 后 7 d CA1 区锥体细胞层、CA3 区锥体细胞层、门区神经元显著减少 ($P < 0.01$)。与对照组相比 (图 2A), SE 后 60 d CA1 区锥体细胞基本消失 (图 2B), CA3 区锥体细胞和门区

神经元亦显著减少 ($P < 0.01$), 齿状回颗粒细胞丢失相对较少 ($P < 0.05$); 但在 CA1 区的起始部位始层和辐状层 NeuN 免疫阳性神经元数目增加甚至超过正常, 神经元形态各异, 排列不齐 ($P < 0.01$, 表 2~4, 图 2C)。

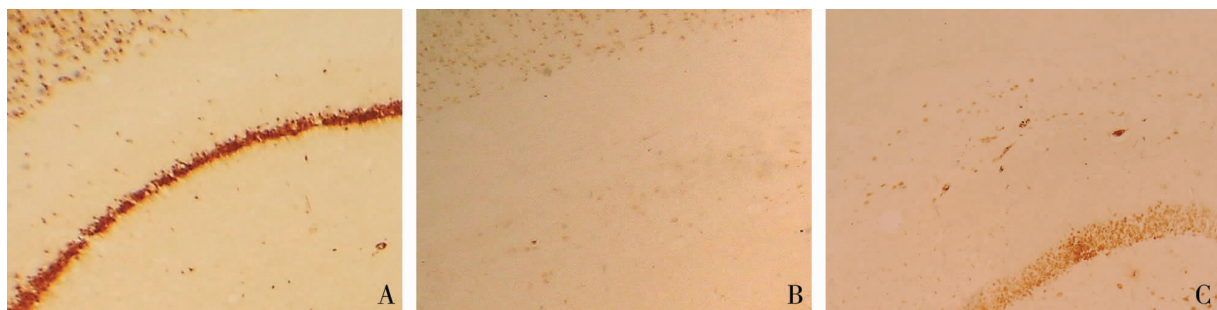


图 2 NeuN 免疫组织化学染色 (×100)。 A: 对照组海马 CA1 区锥体细胞层的细胞排列整齐、清晰; B: 实验组 SE 后 60 d 海马 CA1 区锥体细胞基本消失; C: 实验组 SE 后 60 d 海马 CA1 区起始部位始层及辐状层 NeuN 阳性神经元明显增多, 超过对照组。

Fig. 2 Immunohistochemistry of NeuN (×100). A: Pyramidal layer of the CA1 area of hippocampus in control group. The neurons are well-arranged; B: Pyramidal layer of the CA1 area of hippocampus in the experiment group is almost disappeared at 60 d after SE; C: NeuN positive neurons are beyond normal in the stratum oriens and stratum radiatum in the initiation site of CA1 area in the experiment group at 60 d after SE.

表2 不同时间点海马 CA1 区 NeuN 免疫阳性神经元计数($\bar{x} \pm s$)Tab. 2 Number of NeuN positive interneurons at different time points in CA1 area of the hippocampus ($\bar{x} \pm s$)

	组别	<i>n</i>	1 d	7 d	15 d	30 d	60 d
始层	对照组	35	51 ± 10	55 ± 11	56 ± 9	48 ± 8	55 ± 10
	实验组	40	38 ± 9 *	36 ± 6 **	24 ± 7 **	52 ± 5	78 ± 4 **
锥体细胞层	对照组	35	2 040 ± 273	2 026 ± 260	2 012 ± 249	2 037 ± 278	2 042 ± 267
	实验组	40	1 816 ± 193	889 ± 172 **	660 ± 92 **	388 ± 30 **	163 ± 10 **
辐状层及腔隙分子层	对照组	35	77 ± 16	79 ± 12	74 ± 11	80 ± 15	76 ± 15
	实验组	40	58 ± 11 *	60 ± 12 *	58 ± 9 *	82 ± 7	90 ± 5 **

与同一时间点同一部位对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表3 不同时间点齿状回 NeuN 免疫阳性神经元计数($\bar{x} \pm s$)Tab. 3 Number of NeuN positive interneurons at different time points in dentate gyrus ($\bar{x} \pm s$)

	组别	<i>n</i>	1 d	7 d	15 d	30 d	60 d
颗粒细胞层	对照组	35	3 502 ± 197	3 513 ± 186	3 497 ± 179	3 509 ± 190	3 512 ± 187
	实验组	40	3 415 ± 140	3 316 ± 123	3 240 ± 169 *	3 247 ± 110 *	3 178 ± 152 *
门区	对照组	35	595 ± 91	599 ± 92	586 ± 86	590 ± 89	602 ± 101
	实验组	40	30 ± 16 **	31 ± 14 **	37 ± 10 **	40 ± 8 **	44 ± 11 **
外分子层	对照组	35	22 ± 5	20 ± 7	24 ± 6	21 ± 4	19 ± 5
	实验组	40	23 ± 4	27 ± 9	32 ± 12	14 ± 3	16 ± 7

与同一时间点同一部位对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表4 不同时间点海马 CA3 区 NeuN 免疫阳性神经元计数($\bar{x} \pm s$)Tab. 4 Number of NeuN positive interneurons at different time points in CA3 area of the hippocampus ($\bar{x} \pm s$)

	组别	<i>n</i>	1 d	7 d	15 d	30 d	60 d
始层	对照组	35	32 ± 7	36 ± 6	31 ± 4	35 ± 6	34 ± 5
	实验组	40	22 ± 6	24 ± 6	16 ± 5 *	10 ± 2 **	10 ± 3 **
锥体细胞层	对照组	35	1 169 ± 143	1 175 ± 148	1 164 ± 135	1 162 ± 140	1 176 ± 139
	实验组	40	603 ± 41 **	495 ± 61 **	320 ± 50 **	332 ± 36 **	317 ± 40 **
辐状层及腔隙分子层	对照组	35	55 ± 12	58 ± 16	53 ± 14	50 ± 12	56 ± 13
	实验组	40	87 ± 14 *	30 ± 8 *	52 ± 10	38 ± 9	34 ± 5

与同一时间点同一部位对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.4 免疫荧光双标结果

通过 NeuN 与 SS 进行免疫荧光双标可以明确 SS 染色纤维的来源。激光共聚焦扫描显微镜结果显示, Cy3 标记的 SS 阳性细胞受 543 nm 波长激光激发后呈红色, Alexa Fluor 488 标记的 NeuN 阳性神经元受 488 nm 波长激光激发后呈绿色, 双重染色的呈黄色, 提示被双标记的 SS 中间神经元(图 3A)箭

头所示, 对照组和实验组各时期均可见双标记的 SS 中间神经元, 在门区 7 d 时减至最低(图 3B); CA1 区始层在 SE 后 15 d 逐渐增多, 30 和 60 d 时均超过正常水平, 60 d 时 CA1 始层和辐状层可见增多的 SS 中间神经元(图 3C, 3D); CA3 区 SE 后即逐渐减至最低, 慢性期始层的 SS 神经元逐渐恢复。

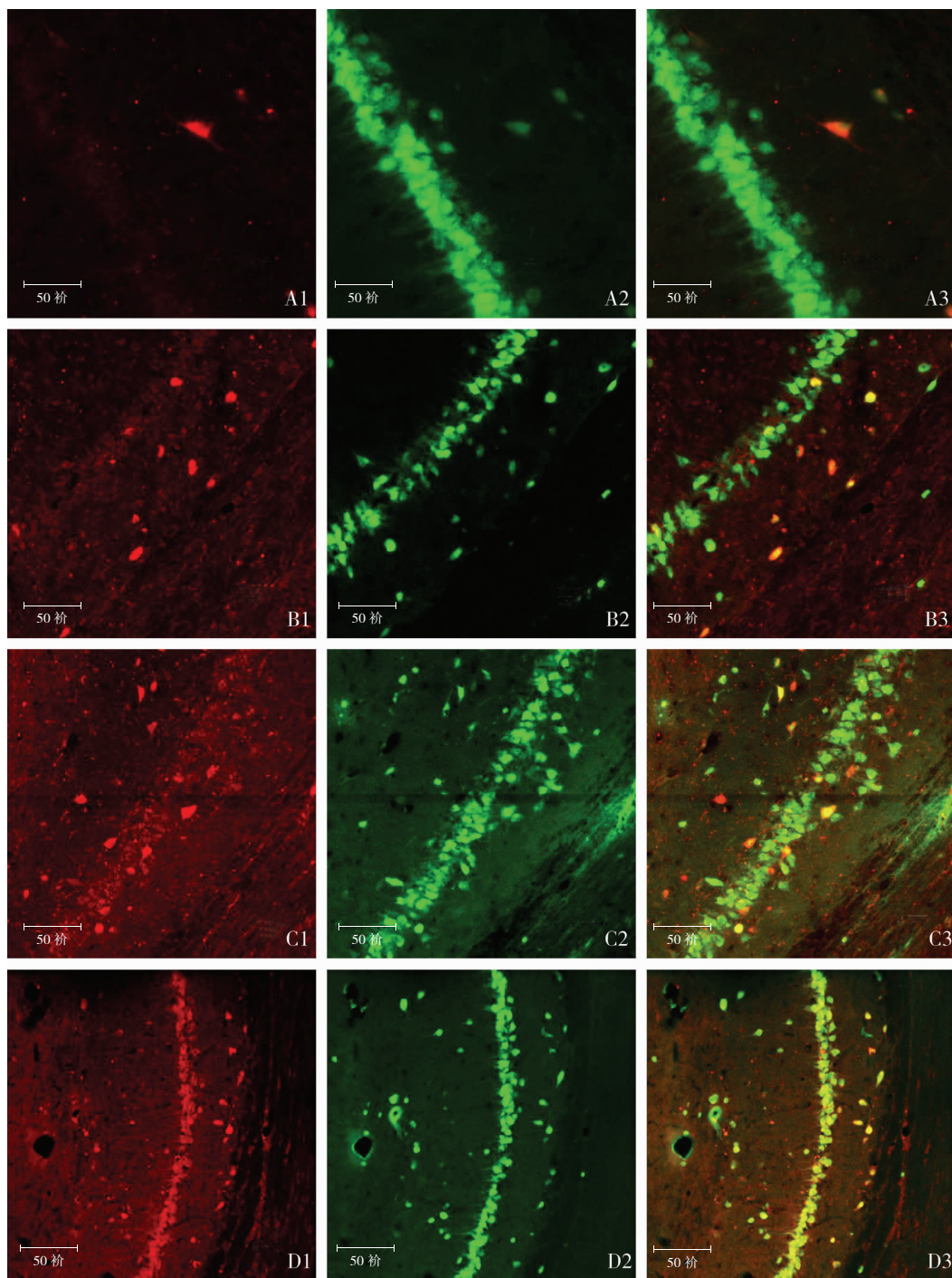


图 3 SS 和 NeuN 免疫荧光双标记 (A: $\times 500$, B ~ D: $\times 200$)。A1 ~ A3: 正常大鼠海马 CA1 区 SS 和 NeuN 双标记的中间神经元; B1 ~ B3: 实验组 SE 后 7 d 海马 CA1 区双标记的 SS 中间神经元数目减至最低; C1 ~ C3: 实验组 SE 后 30 d 海马 CA1 区始层双标记的 SS 中间神经元逐渐增多, 超过正常水平; D1 ~ D3: 实验组 SE 后 60 d 海马 CA1 区始层和辐状层均可见增多的 SS 中间神经元; A1 ~ D1: SS 荧光标记; A2 ~ D2: NeuN 荧光标记 (主要标记细胞核); A3 ~ D3: SS 荧光标记和 NeuN 荧光标记叠加成像, 双重染色呈黄色。

Fig. 3 Double immunofluorescence of NeuN and SS (A: $\times 500$, B - D: $\times 200$). A1 - A3: Double labeled SS interneurons in control group; B1 - B3: Number of double labeled SS interneurons decrease to minimum at 7 d in the CA1 area in the experment group. C1 - C3: Number of double labeled SS interneurons gradually raise at 30 d in the stratum oriens of CA1 in the experment group; D1 - D3: Double labeled SS interneurons are beyond normal in the stratum oriens and stratum radiatum of CA1 area at 60 d after SE in the experment group. A1 - D1: Immunofluorescence of SS; A2 - D2: Immunofluorescence of NeuN; A3 - D3: Image overlaid by immunofluorescence of SS and NeuN, double staining presents yellow.

3 讨 论

SS 属于树突型抑制性中间神经元,主要支配齿状回和海马回主细胞(颗粒细胞和锥体细胞)的远端树突^[6]。国内外已有的研究发现:痫性发作早期 GABA 能中间神经元的脱失以表达 SS 的神经元脱失最为显著,但关于痫性发作慢性期 GABA 能中间神经元数目变化的研究较少,结果不一。NeuN 是神经元的一种敏感、特异的标志物^[7]。本研究海马 NeuN 免疫组织化学结果显示:致痫后 CA1 和 CA3 区锥体细胞和门区神经元大量减少,齿状回颗粒细胞部分减少,CA3 区辐状层及腔隙分子层神经元改变不明显,CA1 区始层和辐状层神经元数目则增加,提示致痫后海马硬化及非主细胞部分增多。进一步将 NeuN 与 SS 中间神经元进行双重标记,可以更清楚地揭示中间神经元的变化。本研究发现 SE 后慢性期 CA1 区树突型中间神经元逐渐增加,60 d 时 CA1 区始层和辐状层可见大量增多的 SS 中间神经元,与 NeuN 免疫组织化学提示的 CA1 区非主细胞增多相吻合。SS 免疫阳性神经元主要支配齿状回和海马回主细胞(颗粒细胞和锥体细胞)的远端树突^[6],慢性期海马 CA1 区 SS 中间神经元增多可能导致 CA 区树突型抑制增加,降低锥体细胞兴奋性。同时发现在门区和海马 CA3 区均存在 SS 中间神经元早期缺失和慢性期部分恢复的类似现象,这与 Sun 等^[3]在电刺激模型中的研究结果相似,提示树突型中间神经元在癫痫发生和慢性自发发作中均可能起到重要作用。

大量研究表明 GABA 能神经元的轴突出芽主要发生在齿状回颗粒细胞的树突区域^[8];早期在对匹罗卡品致痫模型的研究中发现:辐状层和腔隙-分子层谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)免疫反应性均增强^[9],提示 GABA 能回路的重组也可能发生在海马 CA1 区,在人类颞叶癫痫组织中亦发现 CA1 区钙结合蛋白(calbindin, CB)树突型中间神经元接受更多对称性树突的突触连接^[10]。因而匹罗卡品模型中辐状层和腔隙-分子层 GAD 免疫反应性的增加即可能间接反映了 CB 中间神经元的轴突出芽。对于 SS 中间神经元的研究尚缺乏动物模型中间神经元突触重建的证据。本研究通过 SS 免疫组织化学发现:SE 后 60 d 海马 CA1 区全层出现大量增加的 SS 染色的纤维,以 CA1 区起始部明显,进一步行荧光双标显示,SE 后 60 d CA1 区始层和辐状层双重标记的中间神经元明显增加,从而提示这些大量增多的 SS 染色阳性纤维即来自于此,SS 中间神经元在海马 CA1 区存在异常的抑制性回路

重组,它们是癫痫海马 SS 中间神经元在长期自发发作的病理情况下轴突出芽异常增强的结果。

CA1 区树突型中间神经元异常出芽的阳性纤维可能通过支配锥体细胞的树突区域并降低其兴奋性,亦可能支配其它抑制性中间神经元的树突,使去抑制增强,反而增加锥体细胞的兴奋性^[2,6]。然而,抑制性中间神经元轴突出芽所致的功能结果相当复杂,它究竟在颞叶癫痫的发生和自发发作中起到怎样的作用目前仍不清楚。因此,海马神经元轴突出芽与颞叶癫痫的关系还需结合电生理等进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Andre V, Marescaux C, Nehlig A, et al. Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy [J]. *Hippocampus*, 2001, 11 (4): 452-468.
- [2] Bausch S B. Axonal sprouting of GABAergic interneurons in temporal lobe epilepsy [J]. *Epilepsy Behav*, 2005, 7 (3): 390-400.
- [3] Sun C S, Mchedlishvili Z, Bertram E H, et al. Selective loss of dentate hilar interneurons contributes to reduced synaptic inhibition of granule cells in an electrical stimulation-based animal model of temporal lobe epilepsy [J]. *J Comp Neurol*, 2007, 500(5):876-893.
- [4] Shetty A K, Hattiangady B, Rao M S. Vulnerability of hippocampal GABAergic interneurons to kainate-induced excitotoxic injury during old age [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13 (8B): 2408-2423.
- [5] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation II motor seizure [J]. *Electroencephogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 781-794.
- [6] Magloczky Z, Freund T F. Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus [J]. *Trends Neurosci*, 2005, 28(6): 334-340.
- [7] Wolf H K, Busleui R, Schmidt K R, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology [J]. *J Histochem Cytochem*, 1996, 44(10):1167-1171.
- [8] Kobayashi M, Buckmaster P S. Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(6):2440-2452.
- [9] Houser C R, Esclapez M. Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures [J]. *Epilepsy Res*, 1996, 26(1):207-218.
- [10] Wittner L, Eross L, Szabo Z, et al. Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy [J]. *Neuroscience*, 2002, 115 (3):961-978.