

论著·实验研究

无镁诱导神经元放电后细胞共培养微环境中 脑源性神经营养因子的变化

文香¹ 蒋莉^{1,2} 陈恒胜²

(重庆医科大学附属儿童医院1. 神经内科; 2. 神经电生理室, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

[摘要] 目的 无镁诱导体外培养神经元(neurons, N)放电, 研究放电后 N 和星形胶质细胞(astrocytes, AST)共培养体系中脑源性神经营养因子(BDNF)的改变并分析其主要来源。方法 以纯化的胎鼠海马 N 和新生鼠 AST 为研究对象, 按照是否经过短暂的无镁标准细胞外液处理诱导反复的自发性惊厥样放电, 分为 N 对照组、N 无镁组、N + AST 对照组和 N + AST 无镁组。ELISA 法测定惊厥后不同时间点细胞培养上清液中的 BDNF 含量。结果 N + AST 无镁组恢复正常培养后 48 h, AST 的体积增大, 突起及细胞数目增多。N 无镁组恢复正常培养后 72 h, 仍旧存在自发性“惊厥样放电”。N + AST 对照组在 24 h、48 h 细胞上清液中的 BDNF 浓度较 N 对照组同时点细胞上清液中 BDNF 升高($P < 0.05$)。N + AST 无镁组在 12 h、24 h、48 h 分泌的 BDNF 均较 N + AST 对照组相同时间点的 BDNF 升高, 尤其 12 h、24 h 升高明显($P < 0.01$); 而 N 无镁组在各个时间点 BDNF 含量也有升高, 但与 N 对照组比较, 差异无统计学意义。N + AST 无镁组在 24 h 分泌的 BDNF 较 N 无镁组同时点分泌的 BDNF 升高($P < 0.05$)。结论 N + AST 在正常培养情况下分泌的 BDNF 由 N 和 AST 共同参与, N 可能起主要分泌作用。短暂无镁处理的 N + AST, 经诱导放电后 BDNF 的分泌显著增多, 并且可能主要来自惊厥微环境活化的 AST。

[中国当代儿科杂志, 2012, 14(5): 375-379]

[关键词] 惊厥; 脑源性神经营养因子; 神经元; 星形胶质细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)05-0375-05

Level of brain-derived neurotrophic factor in the microenvironment of the neuron-astrocyte co-culture system by Mg^{2+} -free-induced seizure-like discharge

WEN Xiang, JIANG Li, CHEN Heng-Sheng. Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400014, China (Jiang L, Email: dr_jiangli@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the microenvironment of the neuron-astrocyte co-culture system by Mg^{2+} -free-induced seizure-like discharge and analyze the source of BDNF. **Methods** Hippocampal neurons (N) of fetal rats and astrocytes (AST) of neonatal rats were purified and divided into four groups, included control N (Con N) group, Mg^{2+} -free treated N (Mg^{2+} -free N) group, control N + AST co-culture (Con N + AST) group and Mg^{2+} -free treated N + AST co-culture (Mg^{2+} -free N + AST) group. The Mg^{2+} -free treated groups were exposed to Mg^{2+} -free media for 3 hrs to induce a repeated spontaneous seizure-like discharge. The level of BDNF in each group at different time points was measured using ELISA. **Results** The cellular morphous of AST changed in the Mg^{2+} -free N + AST group at 48 hrs. Neuronal epileptiform activity was observed in the Mg^{2+} -free media at 3 hrs, and continued to exist until the microenvironment returned to normal for 72 hrs. The BDNF level increased at 24 hrs and 48 hrs in the Con N + AST group compared with the control N group ($P < 0.05$). Compared with Con N + AST group, BDNF level increased at 12, 24 and 48 hrs in the Mg^{2+} -free N + AST group, especially at 12 and 24 hrs ($P < 0.01$). There were no significant differences in the level of BDNF between the Con and Mg^{2+} -free N groups. Compared with Mg^{2+} -free N group, BDNF level increased at 24 hrs in the Mg^{2+} -free N + AST group ($P < 0.05$). **Conclusions** The results of the experiment suggest that BDNF in the Con N + AST group might be excreted from both N and AST, but chiefly from N. Activated AST may be the main source for increasing BDNF in the Mg^{2+} -free N + AST group. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(5): 375-379]

Key words: Seizure; Brain-derived neurotrophic factor; Neuron; Astrocyte

[收稿日期] 2012-01-09; [修回日期] 2012-03-20
[资金资助] 国家自然科学基金(No. 30672217)。
[作者简介] 文香, 女, 硕士研究生。
[通信作者] 蒋莉, 教授。

长时程惊厥和惊厥持续状态发作后,易导致以选择性海马神经元死亡为特征的惊厥性脑损伤^[1-2]。同时,脑内也将出现一系列代偿反应,如脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)浓度升高。BDNF是神经营养因子家族的重要成员之一,具有刺激和促进神经元生长、维持神经元存活和正常生理功能的作用^[3-4],同时也能促进损伤后神经元的再生,参与突触间神经递质的传递和突触重建^[5-6]。因此,明确惊厥的脑组织病灶中,BDNF主要来自哪种细胞,从而针对性调控脑内BDNF的浓度,有望成为保护惊厥性脑损伤的一种有效途径。为此,本研究采用1995年Sombati的经无镁细胞外液培养的原代海马神经元,并诱导其产生反复自发性惊厥样放电作为体外模型^[7],对惊厥后细胞培养微环境中BDNF的分泌情况及其主要来源进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级成年Wistar大鼠购自第三军医大学大坪医院实验动物中心,按雌雄比为2:1合笼,以检测到阴栓之日起为孕1 d,实验采用清洁级孕16~17 d的Wistar胎鼠8只及清洁级出生24 h以内的Wistar新生鼠5只,雌雄不限。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12培养基(Gibco公司);优质胎牛血清(Bioind公司);胰蛋白酶、B27培养基添加剂(Gibco公司);L-谷氨酰胺(Hyclone公司);HEPES、小鼠抗大鼠单克隆抗 β -微管蛋白III(Tuj-1)抗体、小鼠抗大鼠单克隆抗纤维酸性蛋白(GFAP)抗体(Sigma公司);山羊抗小鼠IgG荧光素(FITC)(北京中杉生物公司);大鼠BDNF酶联免疫检测试剂盒(R&D分装);免疫组化试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);台盼蓝、多聚赖氨酸(进口分装)。

1.1.3 主要试剂配制 DMEM/F12(1:1)培养液:DMEM/F12(1:1)干粉、HEPES 1.0 g、青霉素10万U、链霉素100 mg,定容至1000 mL, pH值为7.2,0.2 μ m除菌滤器过滤。DMEM/F12(1:1)无血清培养液为含2% B27、0.5 μ mol/L L-谷氨酰胺的DMEM/F12(1:1)培养液。DMEM/F12(1:1)种植培养液为含10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1)无血清培养液。标准细胞外液(mmol/L):内含物质比为NaCl 145、KCl 2.5、CaCl₂ 2、MgCl₂ 1、HEPES 10、D-glucose 10、甘氨酸 0.001, pH值为7.3,用蔗糖调

节渗透压至325 mmol/L。无镁细胞外液为不含MgCl₂的标准细胞外液。

1.2 方法

1.2.1 胎鼠大脑海马神经元的体外分离培养及鉴定 (1)胎鼠大脑海马神经元原代培养:取孕16~17 d Wistar胎鼠8只,解剖显微镜下钝性分离海马,剔除脑膜,将海马剪成1 mm³小块,0.25% (g/mL)胰蛋白酶消化,200目不锈钢筛网过滤,收集滤液,台盼蓝染色,血球计数板计数,用种植培养液以 6×10^5 个/mL密度种植到多聚赖氨酸处理过的6孔培养板中,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,24 h后全量换为无血清培养液,每3 d无血清培养基半量换液。(2)胎鼠大脑海马原代神经元免疫组化和免疫荧光鉴定:取培养7 d的细胞爬片5张,用神经元特异性的Tuj-1抗体,参照免疫组化试剂盒操作步骤进行免疫组化实验;另取5张培养7 d的细胞爬片,用小鼠抗大鼠单克隆Tuj-1抗体结合山羊抗小鼠FITC行免疫荧光实验。

1.2.2 新生鼠星形胶质细胞的体外分离培养及鉴定 (1)新生鼠星形胶质细胞原代培养:取出生24 h内的Wistar新生鼠5只大脑皮层,同前操作制成单细胞混悬液,用种植培养液以 1×10^6 个/mL密度种植于多聚赖氨酸包被过的培养瓶中,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱,30 min后反转培养瓶,将细胞悬液种植于另一培养瓶中,利用差速贴壁法初步纯化细胞,3~5 d半量换液,待细胞出现分层生长后,采用震荡法即37 $^{\circ}$ C、180转5 h纯化,弃悬液,0.25%胰蛋白酶消化后传代,第2~3代细胞用于实验。(2)新生鼠星形胶质细胞免疫组化和免疫荧光鉴定:采用星形胶质细胞特异的GFAP抗体,进行免疫组化和免疫荧光染色。

1.2.3 实验分组 本实验共分为4组:神经元对照组(N对照组),神经元无镁组(N无镁组),神经元和星形胶质细胞共培养对照组(N+AST对照组),神经元和星形胶质细胞共培养无镁组(N+AST无镁组)。N对照组和N无镁组均取培养至第10天的海马神经元。将纯化的第3代星形胶质细胞以 2×10^5 个/mL密度接种于培养7 d、密度为 6×10^5 个/mL的神经元细胞层上,用种植培养液共同培养3 d用于实验,此时显微镜下计数星形胶质细胞占全细胞百分比为45%;N+AST无镁组采用无镁细胞外液培养上述混合细胞3 h诱导惊厥模型,后恢复正常培养基;N+AST对照组以含镁细胞外液代替无镁液3 h,后恢复正常培养基。

1.2.4 无镁诱导惊厥模型的建立及全细胞记录

培养至第10天的N和N+AST对照组,去除培养基,用无镁细胞外液培养3h后,换为正常培养基继续培养。隔天采用Multiclamp-700B膜片钳系统进行全细胞模式的电流钳记录。经拉制仪(MODEL P-97, SUTTER INS TRUMENT CO.)拉制抛光后的记录电极口径约为1 μm ,充满电极内液后形成3~5 M Ω 的阻抗。当记录电极与细胞之间形成稳定的高阻抗封接后,气压打孔破膜,形成全细胞钳制,即形成膜片钳全细胞记录状态。

1.2.5 ELISA法检测培养上清液中BDNF的浓度

各组分别收集造模后6h、12h、24h、48h、72h细胞上清液,1500g、20min离心,吸取上清液分装,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用,每组每个时间点重复实验6次。按照ELISA检测试剂盒说明书进行实验并设置复孔。酶标仪检测后按照标准曲线测算浓度。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间与组内比较采用方差分析或秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞形态观察及鉴定

2.1.1 原代培养胎鼠大海马N的鉴定 倒置显微镜下观察,刚种植的N呈圆形、椭圆形,胞体圆润透亮,折光性好,体积小,分布均匀。种植2h后,有部分细胞已贴壁,贴壁细胞周围有光晕,仍呈圆形或椭圆形。24h后,所有细胞几乎均贴壁,大部分细胞伸出突起,似蝌蚪状,但细胞间罕见连接。培养3d后,胞体相对变大,多呈三角形和纺锤状,突起增粗、增长,以双极突起多见,也可见多极突起,部分突起相互连接,形成网络状(图1A)。培养7d时,神经细胞突起间网络连接更致密。用N特异性Tuj-1抗体对培养第7天N进行免疫组化和免疫荧光染色,显示绝大多数细胞为Tuj-1阳性,说明培养的细胞是N(图1B~C)。显微镜下计算培养7d的N平均纯度达90%。

2.1.2 原代及传代培养的新生鼠AST的形态观察和鉴定

倒置显微镜下观察,刚种植的AST呈圆形,胞体圆润透亮,折光性好。2h后部分细胞已贴壁,培养24h后所有细胞均已贴壁,细胞周围光晕明显,胞体增大,稍扁平,有数个突起形成。培养3~

4d后,细胞数量增多,胞体扁平,突起增长并出现连接(图1D)。培养到第10天时,突起间网络连接更致密,细胞出现分层生长。第3代细胞用AST特异性GFAP抗体进行免疫组化和免疫荧光染色,显示绝大多数细胞为GFAP阳性,说明培养的细胞是AST(图1E~F)。显微镜下计算第3代AST的平均纯度达95%。

2.1.3 无镁处理后N及AST的形态观察

N+AST组经无镁细胞外液培养后48h,倒置显微镜下见N细胞间网络连接依然丰富,胞体大,形态没有明显的变化;AST的体积有增大,突起也增多(图1G),显微镜下计数AST占总培养细胞数目百分比为57%,较N+AST对照组50%有所增高。

2.2 无镁诱导后N全细胞记录

无镁细胞外液处理前,能够记录到N($n=10$)自发的兴奋性突触后电位(EPSP)和每分钟15次左右的动作电位(AP)(图2A)。经无镁细胞外液处理并恢复正常培养基培养24h后,85%的N($n=20$)能够记录到5~17Hz,波幅为20~60mV的阵发性持续棘波样爆发和阵发性去极化样偏移(paroxysmal depolarizing shifts, PDSs)样发作(图2B)。在无镁细胞外液处理后72h,仍然有75%的N($n=20$)能够记录到阵发性持续棘波样爆发和PDSs(图2C),从而确定无镁诱导N惊厥样放电模型成功建立。

2.3 无镁诱导培养体系中BDNF的变化

研究结果显示,无镁细胞外液诱导的N+AST共培养体系反复自发性惊厥样放电后,N+AST无镁组细胞培养上清液中BDNF的含量在12h已明显高于N+AST对照组($P < 0.01$),至24h达高峰($P < 0.01$),48h开始下降,72h显著下降,与峰值相比差异有统计学意义($P < 0.01$);随培养时间的延长,N+AST对照组中BDNF含量呈先升后降的波动趋势,24h达峰值,与6h相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图3。

无镁细胞外液诱导的N反复自发性惊厥样放电后,N无镁组细胞培养上清液中BDNF的含量从6h开始较N对照组各个时间点均有升高,但是幅度较小且差异无统计学意义;N无镁组各个时间点BDNF升高的幅度差异亦无统计学意义;N对照组各个时间点BDNF含量趋于稳定。N无镁组24hBDNF含量低于N+AST无镁组,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。N+AST对照组24h和48hBDNF含量较N对照组相同时间点显著升高($P < 0.05$)。见图3。

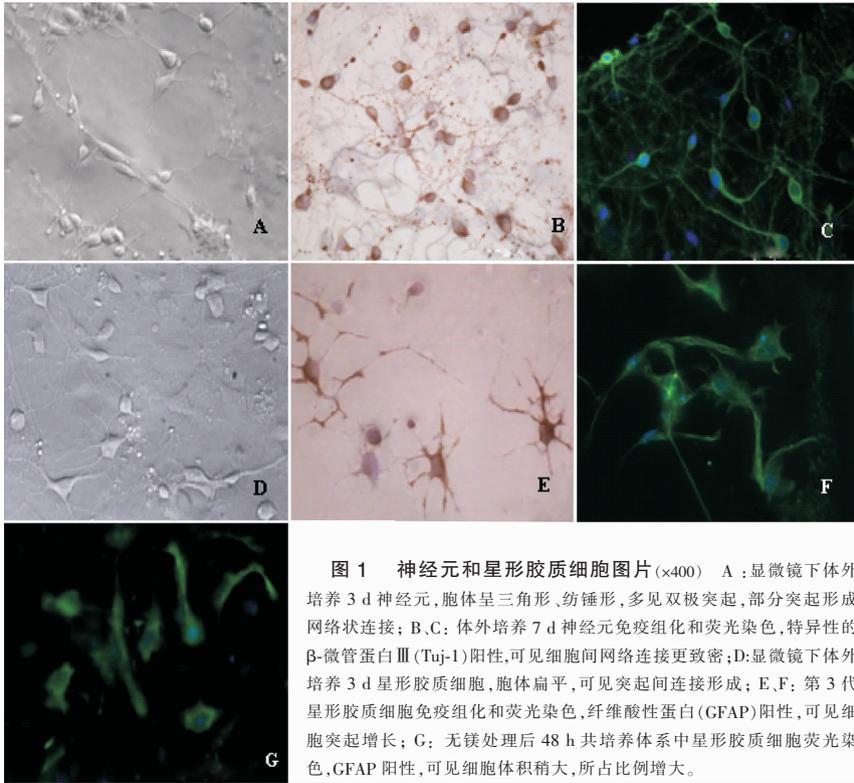


图1 神经元和星形胶质细胞图片($\times 400$) A:显微镜下体外培养3 d 神经元,胞体呈三角形、纺锤形,多见双极突起,部分突起形成网状连接; B,C: 体外培养7 d 神经元免疫组化和荧光染色,特异性的 β -微管蛋白 III (Tuj-1) 阳性,可见细胞间网络连接更致密; D:显微镜下体外培养3 d 星形胶质细胞,胞体扁平,可见突起间连接形成; E,F: 第3代星形胶质细胞免疫组化和荧光染色,纤维酸性蛋白(GFAP)阳性,可见细胞突起增长; G: 无镁处理后48 h 共培养体系中星形胶质细胞荧光染色,GFAP 阳性,可见细胞体积稍大,所占比例增大。

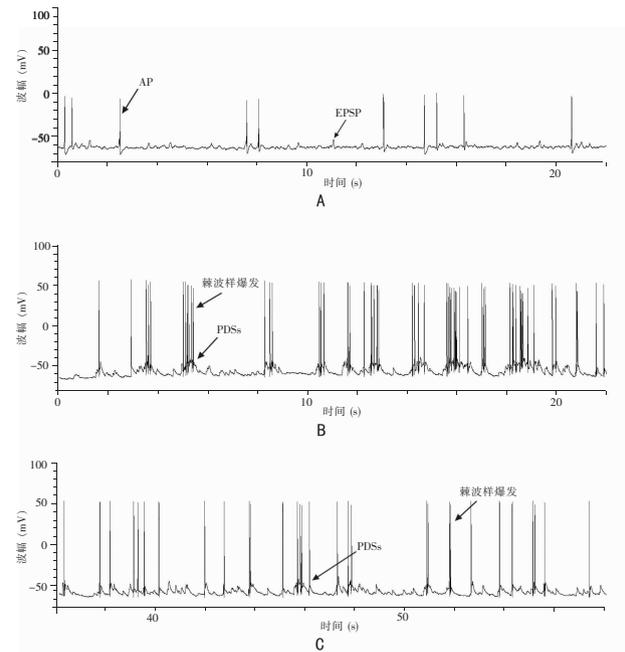


图2 无镁诱导体外培养海马神经元惊厥样放电图片(全细胞记录) A:体外培养10 d 海马神经元,每分钟有15次左右的自发性动作电位(AP)发放,并记录到频繁的兴奋性突触后电位(EPSP); B:无镁处理后恢复正常细胞外液24 h 海马神经元可见5~17 Hz,波幅为20~60 mV 的阵发性棘波样爆发,以及频繁的去极化偏移(PDSs); C:无镁处理后恢复正常细胞外液72 h 海马神经元,记录到阵发性持续棘波样爆发和PDSs。

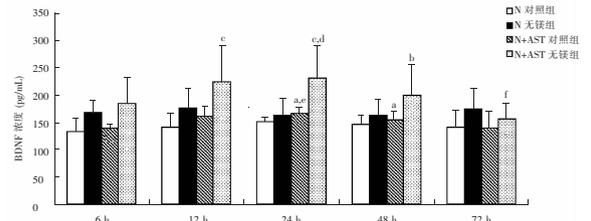


图3 不同条件下各组上清液中 BDNF 的动态变化 ($n = 6$) a:与相同时间点 N 对照组比较, $P < 0.05$; b:与相同时间点 N + AST 对照组比较, $P < 0.05$; c:与相同时间点 N + AST 对照组比较, $P < 0.01$; d:与相同时间点 N 无镁组比较, $P < 0.05$; e:与同组 6 h 比较, $P < 0.05$; f:与同组 24 h 比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

惊厥是多种病因引起的大脑皮层 N 异常超同步放电所致的发作性脑功能紊乱,反复频繁惊厥发作或长时程惊厥发作将产生以选择性海马 N 死亡为主的脑损伤^[2],以及异常的神经发生和持续的神经重组,导致神经环路异常,增加惊厥发作易感性,促使发作更加频繁,进而加重脑损伤^[8]。有研究提示,在惊厥后放电病灶周围 AST 呈反应性增生,病灶局部 BDNF 的表达呈现明显变化^[9-10]。但是,迄今为止 BDNF 的来源及其在惊厥性脑损伤中的作用尚存在很大争议^[11-12]。

为排除体内众多因素影响,本实验模拟脑内惊厥微环境,采用原代培养大鼠海马 N 并以无镁细胞

外液诱发反复惊厥样放电为体外模型^[7,13],探讨体外N异常放电后,N、N+AST共培养不同状况下,培养上清液中BDNF的变化,进一步分析BDNF分泌规律及其来源。在前期的预实验中,我们分别设置了N组、AST组、N+AST组以及各组的无镁处理组,但是在对AST进行无镁细胞外液处理后,经全细胞膜片钳检测,发现只能记录到钾电流、微量钠电流及微量的钙电流,与对照组AST记录相同,证实无镁细胞外液对单纯的AST电生理功能没有影响,所以在后续的实验中,去掉了AST对照组和AST无镁组。本研究发现在体外培养的N在无镁细胞外液处理后72h,仍旧能够记录到频繁的阵发性持续性棘波样爆发和PDSs,说明利用无镁细胞外液诱发的细胞惊厥模型是种有效而稳定的放电模型,为研究惊厥微环境中BDNF变化提供可靠的模型来源。

在本研究中,无镁条件下体外培养N自发性放电后6h起,培养上清液中BDNF含量较同时间点对照组有上升趋势,提示惊厥发作后,N可合成和分泌BDNF;而N+AST无镁组在神经元放电后6h、12h、24h和48h时间点上BDNF含量均明显高于N无镁组,提示惊厥后N+AST共培养体系能显著促进BDNF的合成和分泌,而共培养体系惊厥微环境中升高的BDNF主要来源于何种细胞尚不明确。

本研究发现在正常的N+AST共培养体系中,与N对照组相比,24h、48hBDNF分泌量虽然增加,但是增加的绝对值却较小,提示正常情况下共培养的AST对N分泌的BDNF无明显影响;而N+AST共培养体系经无镁处理后48h,该培养体系中的AST细胞体积增大,突起增多并且细胞数目由45%增加到57%,较N+AST对照组50%有所增高,提示AST呈激活状态^[14]。有研究表明,反复自发的N放电能够通过细胞间增多的缝隙连接,使得N和AST之间信息传递更为广泛,能够快速地将兴奋性冲动传递到AST,促使其转化为激活状态^[15],发挥合成BDNF和保护N的功能^[16]。因此,无镁处理后N+AST共培养体系微环境中BDNF含量的增高,应该部分来源于激活的AST;同时该惊厥微环境中的BDNF也应该与惊厥后活化的AST对N的保护并维持N分泌BDNF有关。因此,惊厥后早期AST的增生反应,可能通过不同方式对N有一定保护作用。然而,惊厥后期过度的AST增生,可导致神经细胞外的 Na^+/K^+ 浓度平衡失调,使神经细胞的兴奋阈值降低,促使惊厥的发生^[17]。

本研究提示,惊厥后不仅应该促进N存活、减少N损伤,同时应该在惊厥不同时期合理调控AST

的增殖、调节微环境中BDNF的适当变化,才能更有效预防和治疗惊厥性脑损伤。

[参 考 文 献]

- [1] Lado FA, Laureta EC, Moshé SL. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain[J]. *Epileptic Disord*, 2002, 4(2): 83-97.
- [2] 蒋莉,蔡方成,李欣,张晓萍. 惊厥持续状态中大鼠脑内神经元死亡的年龄特征[J]. *中华儿科杂志*, 2002, 40(9): 545-549.
- [3] Chen K, Henry RA, Hughes SM, Connor B. Creating a neurogenic environment; the role of BDNF and FGF2[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 36(1): 108-120.
- [4] Paradiso B, Marconi P, Zucchini S, Berto E, Binaschi A, Bozac A, et al. Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(17): 7191-7196.
- [5] Bartkowska K, Turlejski K, Djavadian RL. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system[J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2010, 70(4): 454-467.
- [6] Danzer SC, Crooks KR, Lo DC, McNamara JO. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(22): 9754-9763.
- [7] Sombati S, Delorenzo RJ. Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture[J]. *J Neurophysiol*, 1995, 73(4): 1706-1711.
- [8] Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy [J]. *Lancet Neurol*, 2002, 1(3): 173-181.
- [9] Poulsen FR, Jahnsen H, Blaabjerg M, Zimmer J. Pilocarpine-induced seizure-like activity with increased BDNF and neuropeptide Y expression in organotypic hippocampal slice cultures[J]. *Brain Res*, 2002, 950(1-2): 103-118.
- [10] 胡越,蒋莉,张晓萍. 持续惊厥后海马神经营养因子表达及其影响因素[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(16): 1663-1666.
- [11] Tongiorgi E, Domenici L, Simonato M. What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development[J]. *Mol Neurobiol*, 2006, 33(1): 17-32.
- [12] Koyama R, Ikegaya Y. To BDNF or not to BDNF; that is the epileptic hippocampus[J]. *Neuroscientist*, 2005, 11(4): 282-287.
- [13] Jessberger S, Römer B, Babu H, Kempermann G. Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells[J]. *Exp Neurol*, 2005, 196(2): 342-351.
- [14] Schröder W, Hinterkeuser S, Seifert G, Schramm J, Jabs R, Wilkin GP, et al. Functional and molecular properties of human astrocytes in acute hippocampal slices obtained from patients with temporal lobe epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2000, 41 (Suppl 6): S181-S184.
- [15] Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT, Van Bockstaele EJ. Functional coupling between neurons and glia[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(11): 4091-4098.
- [16] Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1997, 75(10-11): 1149-1163.
- [17] Simonato M, Tongiorgi E, Kokaia M. Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(12): 631-638.

(本 文 编 辑 : 万 静)