

脑内糖原磷酸化酶抑制剂对大鼠急性癫痫发作神经炎症及记忆减退的改善作用*

邓筱悦^{1,2}, 帅念念¹, 刘时彦¹, 侯立力², 田绍文^{1,3Δ}

(1. 桂林医学院基础医学院广西脑与认知神经科学重点实验室, 广西 桂林 541199; 2. 南华大学附属南华医院麻醉科, 湖南 衡阳 421002; 3. 南华大学衡阳医学院生理学教研室, 湖南 衡阳 421001)

【摘要】 目的: 探讨脑内糖原磷酸化酶(GP)的抑制剂1,4-二脱氧-1,4-亚氨基-D-阿拉伯糖醇(DAB)对戊四氮(PTZ)致病模型大鼠急性发作、神经炎症及记忆减退的改善作用。**方法:** 实验一,将大鼠随机分为2组即Vehicle组($n=5$)与PTZ组($n=5$),腹腔注射生理盐水或PTZ(70 mg/kg)后30 min,取海马组织,Western blot检测GP表达水平,比色法检测乳酸水平。实验二,将大鼠随机分为4组即Vehicle+Vehicle组($n=18$)、DAB+Vehicle组($n=18$)、Vehicle+PTZ组($n=19$)与DAB+PTZ组($n=18$)。侧脑室注射PBS或DAB(50 μ g/2 μ l)后15 min,腹腔注射生理盐水或PTZ(70 mg/kg)。行为学与Racine评分评价急性发作程度,Western blot检测海马组织目标蛋白水平,新物体识别记忆测试评价记忆能力。**结果:** ①与Vehicle组比较,PTZ组海马组织GP表达水平与乳酸水平均显著升高($P<0.01$)。②与Vehicle+PTZ组比较,DAB+PTZ组肌阵挛潜伏期、前肢阵挛潜伏期、全身阵挛潜伏期均显著升高($P<0.01$),而全身阵挛持续时间、癫痫发作程度则显著降低($P<0.01$)。③与Vehicle+Vehicle组比较,Vehicle+PTZ组海马组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IBA-1、GFAP表达水平均显著上升($P<0.01$),而新物体识别测试中辨别指数则显著降低($P<0.01$);与Vehicle+PTZ组比较,DAB+PTZ组海马组织IL-1 β 、TNF- α 、IBA-1、GFAP表达水平均显著降低($P<0.01$),而辨别指数则显著升高($P<0.01$)。此外,各组大鼠对两物体总探究时间无显著性组间差异($P>0.05$);PTZ注射后48 h各组大鼠自发活动能力无显著性组间差异($P>0.05$)。**结论:** DAB改善PTZ诱导大鼠急性发作、神经炎症及记忆减退,提示DAB具有潜在的抗癫痫临床应用前景。

【关键词】 癫痫; 星形胶质细胞; 糖原磷酸化酶; DAB; 乳酸; 大鼠

【中图分类号】 R742.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-022-007

【DOI】 10.12047/j.cjap.6283.2022.076

Glycogen phosphorylase inhibitor ameliorates pentylenetetrazole-induced acute seizure, neuroinflammation and memory impairment in rats*

DENG Xiao-yue^{1,2}, SHUAI Nian-nian¹, LIU Shi-yan¹, HOU Li-li², TIAN Shao-wen^{1,3Δ}

(1. Guangxi Key Laboratory of Brain and Cognitive Neuroscience, Faculty of Basic Medical Sciences, Guilin Medical University, Guilin 541199;

2. Department of Anesthesiology, Nanhua Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421002;

3. Department of Physiology, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang 421001, China)

【ABSTRACT】 Objective: In the present study, we determined whether the glycogen phosphorylase(GP) inhibitor 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB) ameliorates pentylenetetrazole (PTZ)-induced acute seizure, neuroinflammation and memory impairment in rats. **Methods:** In experiment 1, rats were randomly divided into the Vehicle ($n=5$) and PTZ ($n=5$) groups, and received intraperitoneal injection of saline or PTZ (70 mg/kg), respectively. Hippocampal tissues were collected 30 min after drug injection. Western blot was used to examine the levels of GP expression. Colorimetric assay was used to determine the levels of lactate. In experiment 2, rats were randomly divided into the Vehicle+Vehicle ($n=18$), DAB+Vehicle ($n=18$), Vehicle+PTZ ($n=19$) and DAB+PTZ ($n=18$) groups. Rats received intracerebroventricular injection of PBS or DAB (50 μ g/2 μ l) 15 min before receiving intraperitoneal injection of saline or PTZ (70 mg/kg). Behavioural assays and the Racine scale were used to evaluate seizure severity. Western blot was used to examine the levels of targeted protein of hippocampal tissues. Novel object recognition test was used to assess memory performance. **Results:** ① Compared with the Vehicle group, the levels of GP and lactate in the hippocampal tissues of the PTZ group were increased significantly (both $P<0.01$). ② Compared with the Vehicle+PTZ group, in the DAB+PTZ group, the levels of myoclonic body jerk latency, forelimb clonus latency and tonic-clonic seizure latency were increased significantly (all $P<0.01$), while the duration of seizure and seizure scores were decreased significantly (both $P<0.01$). ③ Compared with the Vehicle+Vehicle group, in the Vehicle+PTZ group, the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IBA-1 and GFAP in the hippocampal tissues were increased significantly (all $P<0.01$), and the discrimination index in the novel object recognition test was decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the Vehicle+PTZ group, in the DAB+PTZ group, the levels of IL-1 β , TNF- α , IBA-1 and GFAP in the hippocampal tissues were de-

creased significantly (all, $P < 0.01$), while the discrimination index in the novel object recognition test was increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** DAB ameliorates PTZ-induced seizure, neuroinflammation and memory impairment in rats, suggesting that DAB may serve as a novel agent for potential clinical treatment of epilepsy.

[KEY WORDS] epilepsy; astrocyte; glycogen phosphorylase; DAB; lactate; rat

癫痫是一种常见的慢性神经系统疾病,其显著特征在于脑神经网络的过度兴奋与同步化导致患者具有持续性的癫痫发作趋向,并常伴随生理、认知、心理及社会问题^[1]。据世卫组织(WHO)2019年报告,全球癫痫患者人数约有5千万,给个人、家庭和社会带来沉重负担^[2]。近年来,尽管有多种新型抗癫痫药物应用于临床治疗,但药物抵抗型癫痫的比率依然保持在30%~40%的高水平^[3]。此外,约30%~40%的患者出现药物副作用^[4]。因此,从新的角度理解癫痫的病理机制与寻找新的治疗靶点具有重要意义。

癫痫发作是一个高耗能过程,从细胞能量稳态的角度阐明癫痫发生发展的病理机制正日益受到关注^[5]。在生理状态下,神经元主要依赖葡萄糖作为能量底物。在癫痫发作状态下,则需要进一步动员星形胶质细胞生成乳酸,乳酸经星形胶质细胞-神经元穿梭途径进入神经元并经氧化代谢产生ATP;高水平的ATP不仅为神经元活动供能,也通过调节ATP依赖的钾通道增加神经元兴奋性,进而参与癫痫发作状态下神经网络的过度兴奋与同步化过程^[5,6]。因此,靶向乳酸生成、释放与代谢可能是一个有效的抗癫痫新策略。

有研究报道,靶向乳酸脱氢酶,或通过2-脱氧-D-葡萄糖、果糖-1,6-二磷酸抑制糖酵解可有效缓解癫痫发作症状^[7-9]。糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, GP)是动员星形胶质细胞糖原分解生成乳酸的关键酶^[6]。目前有关靶向GP改善癫痫发作的研究鲜有报道。本研究基于戊四氮(Pentylenetetrazole, PTZ)诱导大鼠急性发作模型,探讨GP抑制剂1,4-二脱氧-1,4-亚氨基-D-阿拉伯糖醇(1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, DAB)对急性发作、神经炎症及记忆减退的改善作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性SD大鼠(280~300 g)购自长沙市天勤生物技术有限公司(湖南长沙)。大鼠单笼饲养,自由摄食与饮水,饲养环境保持恒温(25℃)及12 h光照/黑暗循环周期(光照期:07:00-19:00)。实验开始前,动物至少适应环境1周,在此期间每天轻微抚摸大鼠5 min 以使其适应实验操作人员。动物使用与实验程序经南华大学实验动物使用伦理委员会批准,并严格遵照美国NIH制定的关于实验动物照料与使用指南。

1.2 药品与抗体

DAB购自美国Santa Cruz公司;PTZ与血管紧张素II购自美国Sigma公司。GFAP蛋白一抗购自中国Aladdin公司,其余蛋白一抗(包括GP、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IBA-1、 β -actin)均购自美国Proteintech公司。乳酸检测试剂盒购自美国Sigma公司。

1.3 实验分组

1.3.1 评估PTZ诱导急性发作时海马组织GP与乳酸水平的变化 成年雄性SD大鼠,随机分为2组即Vehicle组($n=5$)与PTZ组($n=5$)。腹腔注射生理盐水或PTZ(70 mg/kg)后30 min,将大鼠断头处死,冰上分离海马组织。部分组织行Western blot检测GP蛋白表达水平;部分组织采用比色法检测乳酸水平。

1.3.2 评估DAB对PTZ诱导急性发作、海马神经炎症及记忆减退的改善作用 成年雄性SD大鼠,麻醉后行侧脑室置管术,术后恢复1周。大鼠随机分为4组:(1) Vehicle+Vehicle组($n=18$);(2) DAB+Vehicle组($n=18$);(3) Vehicle+PTZ组($n=19$);(4) DAB+PTZ组($n=18$)。大鼠首先经侧脑室微量注射PBS或DAB(50 μ g/2 μ l),15 min后经腹腔注射生理盐水或PTZ(70 mg/kg);DAB的剂量参考以前的研究^[10]。PTZ注射后立即将大鼠放入一个透明的观察笼内,视频采集系统记录大鼠30 min内的行为表现。分析大鼠肌阵挛潜伏期、前肢阵挛潜伏期、全身阵挛潜伏期、全身阵挛持续时间;同时采用Racine评分标准对发作程度进行评分。实验分2个批次完成:(1)在第1个批次中,大鼠依

*【基金项目】国家自然科学基金项目(32160197);广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA159001)

【收稿日期】2022-02-14【修回日期】2022-08-18

Δ 【通讯作者】Tel: 15240782684; E-mail: 47089887@qq.com

照上述分组分为4组,每组大鼠数量(N)分别为9只、9只、10只及9只。药物注射完成后,视频采集系统记录大鼠30 min内的行为表现,以评价急性发作情况。PTZ注射后1 d,将各组部分大鼠(N=4)断头并分离海马组织,-80℃保存。行Western blot检测IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IBA-1及GFAP蛋白表达水平,以评价海马神经炎症反应。(2)在第2个批次中,大鼠依照上述分组分为4组,每组大鼠数量(N)均为9只。大鼠依照上述分组注射药物之后,立即放回鼠笼。在PTZ注射后1~4 d,分别行新物体识别记忆任务的习惯化(同时行自发活动检测)、训练与测试程序。实验流程的时间线见图1。

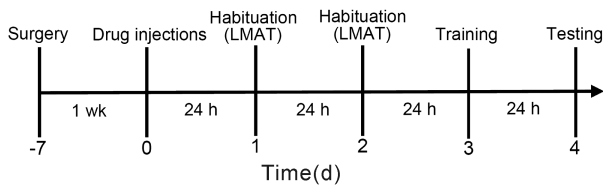


Fig. 1 Schematic of the experimental design showing the timeline of surgery, drug injections and novel object recognition test. Rats received intracerebroventricular injection of PBS or DAB 15 min before receiving intraperitoneal injection of saline or pentylenetetrazole on day 0. Novel object recognition test task involved three phases: habituation (day 1 and 2), training (day 3) and testing (day 4). Locomotor activity test (LMAT) was conducted on day 1 and 2

1.4 侧脑室置管术与微量注射

大鼠侧脑室置管术参照以前的研究^[11]。大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠(美国Sigma公司),待完全麻醉后将其头部固定于脑立体定位仪上。暴露头部皮肤并清理干净颅骨表面各种组织。所有大鼠均左侧侧脑室置管,以前囟点为原点,置管位置坐标为AP:-1.0 mm;ML:-2.0 mm;DV:-4.0 mm。先用颅骨钻在目标位点钻孔并放置导管(中国瑞沃德,型号62001);随后在导管附近区域植入3颗眼科螺丝钉;最后用牙科水泥固定导管。手术完成后48 h,侧脑室注射血管紧张素II(100 ng/2 μ l),称量大鼠在注射后30 min内的饮水量,若饮水量大于5 ml,则判断为侧脑室置管的位置正确。在非注射期间,将导管帽(中国瑞沃德,型号62101)插入导管,并拧紧以密封导管。在注射期间,将大鼠用毛巾轻微束缚;先将导管帽取出,再插入注射内管(中国瑞沃德,型号62201),注射内管通过细微PE管与微量注射泵相连。注射速度控制为0.5 μ l/min,注射完成后原位留针5 min。

1.5 大鼠急性发作模型建立与评分

经腹腔注射PTZ(70 mg/kg)建立大鼠急性发作

模型^[12]。PTZ注射后立即将大鼠放入一个透明的观察笼内,利用视频采集系统记录大鼠30 min内的行为表现。分析大鼠肌阵挛潜伏期、前肢阵挛潜伏期、全身阵挛潜伏期、全身阵挛持续时间。同时采用Racine评分标准对发作程度进行评分,评分标准为:(1)0级:无发作;(2)1级:出现节律性耳、口角或面部部位肌肉抽搐;(3)2级:出现更严重的局部抽搐波;(4)3级:出现前肢阵挛发作,但不伴直立位跌倒;(5)4级:出现全身强直阵挛发作,同时伴直立或侧卧位跌倒;(6)5级:出现全身强直阵挛发作,同时伴仰卧位跌倒;(7)6级:死亡。若未观察到大鼠急性发作,则肌阵挛潜伏期、前肢阵挛潜伏期、全身阵挛潜伏期、全身阵挛持续时间以及癫痫评分均为零。

1.6 新物体识别记忆任务

新颖物体识别记忆任务参照我们以前的研究^[11]。实验装置为新物体识别视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司)。行为程序包括习惯化、训练与测试三个阶段,持续4 d。在习惯化阶段(第1日与第2日),将大鼠放入检测箱内以适应箱内环境,5 min后取出放回鼠笼;24 h后重复习惯化1次。在每次习惯化期间,记录分析大鼠在5 min内穿越地板的格子数以评价大鼠自发活动能力。在训练阶段(第3日),将两个相同的A物体放入检测箱内,随后将大鼠放入箱内自由探究10 min后取出。分别记录大鼠对两个A物体的探究时间,计算大鼠对两物体的总探究时间,以评价大鼠的探究动机。在测试阶段(第4日),用一个B物体(新物体)随机替换一个A物体(旧物体),随后将大鼠放入箱内自由探究5 min后取出。分别记录大鼠对A物体与B物体的探究时间,计算大鼠对两物体的总探究时间以评价探究动机;并计算辨别指数以评价记忆能力,计算公式为:辨别指数=(探究新物体的时间-探究旧物体的时间)/(探究新物体的时间+探究旧物体的时间) \times 100%。

1.7 比色法检测海马组织乳酸水平

大鼠断头后于冰上迅速分离海马组织。按照乳酸检测试剂盒说明书检测乳酸水平。

1.8 Western blot检测蛋白表达水平

Western blot方法检测海马GP、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IBA-1及GFAP蛋白表达水平。大鼠断头后于冰上迅速分离海马组织,-80℃保存。剪取0.025 g海马组织,将组织预冷、研磨、裂解、离心,取上清。按照BCA蛋白定量试剂盒使用说明操作,测定蛋白浓度。根据蛋白定量的结果,上样、电泳,待样品蛋

白经分离后,经转移至 PVDF 膜上,随后染色、冲洗、封闭。加一抗 4℃ 孵育过夜,孵育过后用 PBS 缓冲液清洗。加二抗室温孵育 90 min,再用 PBS 缓冲液冲洗。ECL 法显色,β-actin 作为内参蛋白。采用显影仪(德国 Analytik Jena 公司)自带的 VisionWorks 软件分析目的蛋白与内参蛋白条带的灰度值。

1.9 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Sigma Stat for windows 软件进行统计分析。若数据符合正态分布且方差齐则采用单因素方差分析(one-way ANOVA);否则采用 Kruskal-Wallis one-way ANOVA by ranks 分析。多重组间两两比较采用 SNK 检验。在急性发作评价实验中,由于 Vehicle+Vehicle 组与 DAB+Vehicle 组大鼠未见急性发作,故仅对 Vehicle+PTZ 组与 DAB+PTZ 组的数据进行统计分析。

2 结果

2.1 PTZ 对海马组织 GP 表达水平与乳酸水平的影响

与 Vehicle 组(0.112 ± 0.006)比较,PTZ 组(0.234 ± 0.017)海马组织 GP 蛋白表达水平显著性升高($P < 0.01$)。此外,与 Vehicle 组(1.342 ± 0.063 mmol/g)比较,PTZ 组(2.212 ± 0.089)海马组织乳酸水平亦显著性升高($P < 0.01$,图 2)。表明 PTZ 诱导的急性发作伴随大鼠海马组织 GP 蛋白表达水平与乳酸水平的快速上调。

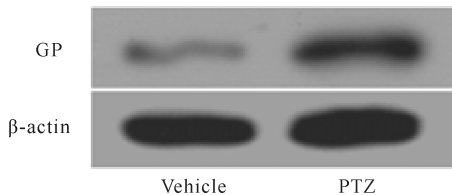


Fig. 2 Effects of pentylenetetrazole (PTZ) treatment on glycogen phosphorylase (GP) expression level in the hippocampal tissues

2.2 DAB 对 PTZ 诱导急性发作的影响

与 Vehicle+PTZ 组比较,DAB+PTZ 组肌阵挛潜伏期、前肢阵挛潜伏期、全身阵挛潜伏期均显著升高($P < 0.01$),而全身阵挛持续时间、癫痫发作程度(癫痫评分)则显著降低($P < 0.01$,表 1)。上述结果表明,DAB 预处理可延缓 PTZ 诱导的发作潜伏期、缩短发作的持续时间、降低发作程度。

2.3 DAB 对 PTZ 诱导的海马组织神经炎症的影响

与 Vehicle+Vehicle 组比较,Vehicle+PTZ 组海马组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、IBA-1 及 GFAP 蛋白表达

水平均显著升高($P < 0.01$),表明 PTZ 通过上调海马组织的促炎因子水平(IL-1β、IL-6、TNF-α)与胶质细胞激活水平(IBA-1 与 GFAP)诱导神经炎症反应。与 Vehicle+PTZ 组比较,DAB+PTZ 组海马组织 IL-1β、TNF-α、IBA-1 及 GFAP 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),而 IL-6 蛋白表达水平则呈现降低趋势($P = 0.094$),表明 DAB 预处理改善 PTZ 诱导的海马组织神经炎症反应。此外,与 Vehicle+Vehicle 组比较,DAB+Vehicle 组海马组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、IBA-1 及 GFAP 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05, P < 0.01$,图 3,表 2),表明单独给予 DAB 处理可诱导大鼠海马组织的轻度神经炎症反应。

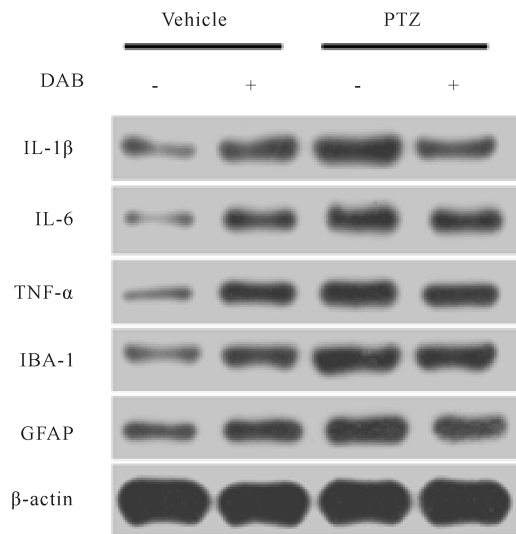


Fig. 3 Effects of 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB) pretreatment on pentylenetetrazole (PTZ)-induced neuroinflammation in the hippocampal tissues

2.4 DAB 对 PTZ 诱导的新物体识别记忆减退的影响

在新物体识别记忆任务中,无论是在训练阶段还是测试阶段,4 组大鼠对两个物体的总探究时间均无显著性组间差异($P > 0.05$),表明先前的药物处理并不影响大鼠在训练阶段与测试阶段对物体的探究动机。在测试阶段,与 Vehicle+Vehicle 组比较,Vehicle+PTZ 组辨别指数显著降低($P < 0.01$),表明 PTZ 诱导新物体识别记忆减退。与 Vehicle+PTZ 组比较,DAB+PTZ 组辨别指数显著升高($P < 0.01$),表明 DAB 预处理改善 PTZ 诱导的新物体识别记忆减退。此外,Vehicle+Vehicle 组与 DAB+Vehicle 组的辨别指数并无显著性组间差异($P > 0.05$,表 3),表明单独给予 DAB 处理并不影响大鼠新物体识别记忆能力。

自发活动测试结果见表 3,2 次自发活动测试分别在 PTZ 注射后 1 d 与 2 d 进行。在第 1 次测试中,

与 Vehicle+Vehicle 组比较, Vehicle+PTZ 组与 DAB+PTZ 组大鼠穿越格子数均显著降低 ($P < 0.01$), 且该 2 组大鼠穿越格子数无显著差异 ($P > 0.05$), 表明 PTZ 注射诱导大鼠自发活动能力受损, DAB 预处理

并不影响 PTZ 对大鼠自发活动能力的减退作用。在第 2 次测试中, 4 组大鼠穿越格子数无显著差异 ($P > 0.05$), 表明 PTZ 注射后 2 d, 大鼠受损的自发活动能力已经恢复至正常水平。

Tab. 1 Effects of DAB pretreatment on PTZ-induced seizure in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Group	Myoclonic body jerk latency (s)	Forelimb clonus latency (s)	Tonic-clonic seizure latency (s)	Duration of seizure (s)	Seizure scores
Vehicle+PTZ	48.70±4.60	59.80±5.52	56.30±5.51	16.50±2.87	5.10±0.10
DAB+PTZ	113.33±23.58**	658.00±238.21**	657.88±238.15**	8.22±1.89*	3.77±0.36**

DAB: 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol; PTZ: Pentylentetrazole

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the Vehicle+PTZ group

Tab. 2 Effects of DAB pretreatment on PTZ-induced neuroinflammation in the hippocampal tissues ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Group	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IBA-1	GFAP
Vehicle+Vehicle	0.075±0.010	0.055±0.011	0.078±0.013	0.080±0.01	0.073±0.013
DAB+Vehicle	0.085±0.032*	0.110±0.010*	0.148±0.024*	0.197±0.008**	0.153±0.026*
Vehicle+PTZ	0.310±0.037**	0.180±0.011**	0.283±0.017**	0.327±0.015**	0.360±0.011**
DAB+PTZ	0.145±0.014##	0.140±0.010	0.207±0.006#	0.240±0.025#	0.242±0.015##

DAB: 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol; PTZ: Pentylentetrazole

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the Vehicle+Vehicle group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs the Vehicle+PTZ group

Tab. 3 Effects of DAB pretreatment on PTZ-induced memory impairment in the novel object recognition test ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Group	Exploration time during the training session (s)	Exploration time during the testing session (s)	Discrimination index (%)	Crossings during the session 1	Crossings during the session 2
Vehicle+Vehicle	62.78±4.77	34.00±5.05	27.39±3.36	69.56±5.44	63.00±6.31
DAB+Vehicle	66.77±6.63	40.56±4.71	22.52±4.06	62.89±6.26	55.89±3.35
Vehicle+PTZ	66.75±5.92	34.78±2.05	-7.10±5.01**	27.44±2.76**	62.78±2.55
DAB+PTZ	68.78±2.95	42.11±3.96	15.36±4.22##	32.45±4.05**	55.00±4.76

DAB: 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol; PTZ: Pentylentetrazole

** $P < 0.01$ vs the Vehicle+Vehicle group; ## $P < 0.01$ vs the Vehicle+PTZ group

3 讨论

本研究基于 PTZ 诱导大鼠急性发作模型, 评价 GP 抑制剂 DAB 对急性发作神经炎症及记忆减退的影响。我们发现, PTZ 快速上调大鼠海马组织 GP 与乳酸水平, DAB 预处理改善 PTZ 诱导的急性发作、海马组织神经炎症反应及新物体识别记忆减退。

GP 是动员糖原分解的关键酶, 主要负责将星形胶质细胞糖原催化生成葡萄糖-1-磷酸, 随后经多级酶促代谢反应生成与释放乳酸。最近有研究报道, 在癫痫诱导过程中, 海马星形胶质细胞出现活化增生^[13], 且海马组织乳酸脱氢酶 A (催化丙酮酸转变为乳酸的关键酶) 与乳酸水平显著增加^[14]。本研究结果显示, 在 PTZ 诱导大鼠急性发作模型中, 海马组织 GP 蛋白表达水平与乳酸水平亦显著增加。这些变化提示, 星形胶质细胞糖原源性乳酸的上调可能在癫痫发生发展中起着重要作用。

星形胶质细胞以葡萄糖或糖原为底物经一系列酶促催化生成并释放乳酸, 乳酸通过为神经元供能与增加神经元兴奋性参与癫痫发作过程^[5,6]。有研

究报道, 抑制乳酸脱氢酶或抑制糖酵解可有效缓解癫痫发作症状^[7-9]。然而, 这些干预措施有一个明显的不足即缺乏对靶细胞的选择性, 从而导致在抑制星形胶质细胞源性乳酸生成的同时也损伤神经元的糖代谢。脑内糖原主要储存于星形胶质细胞, DAB 是一种有效的 GP 抑制剂, 可选择性抑制星形胶质细胞糖原源性乳酸生成, 已广泛应用于阐明星形胶质细胞糖原源性乳酸参与学习记忆、药物成瘾、耗竭状态脑力维持等方面的研究^[10,15,16]。为探讨 DAB 对急性发作的影响, 本研究采用侧脑室微量注射的方法给予 DAB 预处理, 结果显示, DAB 预处理不仅延缓 PTZ 诱导的急性发作的潜伏期, 且能缩短发作的持续时间与发作程度。这些结果表明, DAB 可改善 PTZ 诱导的急性发作, 其机制可能与 DAB 抑制星形胶质细胞糖原源性乳酸生成, 进而减少神经元供能降低神经元兴奋性有关。

动物与临床研究表明, 神经炎症与癫痫之间存在一种相互强化的正向反馈联系^[17-19]。一方面, 局部或系统性神经炎症反应失调将导致异常的神经连接与神经网络过度兴奋, 进而介导癫痫的发生发展。

另一方面,急性癫痫发作造成神经元损伤,释放 ATP、谷氨酸及 ROS 等化学物质,后者激活小胶质细胞与星形胶质细胞释放多种促炎因子,进而触发下游炎症介质级联反应。在本研究中,DAB 显著衰减 PTZ 诱导的促炎因子水平(IL-1 β 、TNF- α)与胶质细胞激活水平(IBA-1、GFAP)的升高,表明 DAB 可改善 PTZ 诱导的神经炎症反应,其机制可能与 DAB 抑制星形胶质细胞糖原源性乳酸生成,继而降低神经元能量供给与兴奋性,最终减少神经元损伤相关。此外,本研究还发现单独给予 DAB 处理可诱导大鼠海马组织的轻度神经炎症反应,其机制并不清楚。糖原合成酶激酶-3(GSK-3)不仅通过磷酸化糖原合酶降低糖原合成,而且通过作用于多种底物触发神经炎症反应^[20]。DAB 可能通过抑制糖原分解造成糖原蓄积,进而负反馈上调 GSK-3 表达水平介导其促炎效应。

癫痫患者常出现认知功能减退性(包括记忆缺陷)共病,且长期服用某些抗癫痫药物会加重认知功能受损^[21]。因此寻找既能抗癫痫又能改善认知功能的潜在治疗药物具有重要意义。在 PTZ 诱导的急慢性癫痫模型中,模型动物在多种记忆测试范式中(如被动回避测试、Morris 水迷宫、Y 迷宫测试及新物体识别测试等)均可观察到记忆减退现象^[22]。在本研究中,采用新物体识别测试评估 DAB 对 PTZ 诱导记忆减退的影响。结果显示 DAB 显著性逆转 PTZ 诱导的大鼠辨别指数的降低,而不影响大鼠在训练阶段与测试阶段对两物体总探究时间。此外,尽管 PTZ 造成大鼠早期自发活动能力受损,但该损伤效应在第 2 次训练阶段即已恢复正常。上述结果表明,DAB 预处理可改善 PTZ 诱导的记忆减退,这种改善作用并非源于大鼠对物体探究动机或自发活动能力的改变。由于神经炎症反应常导致记忆能力减退^[22,23],因此 DAB 对记忆减退的改善作用可能与其改善神经炎症过程密切相关。

目前抗癫痫药物主要以神经元为中心设计研发,本研究从 DAB 抑制星形胶质细胞糖原源性乳酸生成的角度,初步证实 DAB 可改善 PTZ 诱导的急性发作、神经炎症及记忆减退,显示较好的潜在临床应用前景。后续研究需要基于慢性癫痫模型,进一步证实其改善效应并阐明其作用的神经分子机制。

【参考文献】

[1] Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, *et al.* Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the In-

ternational League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) [J]. *Epilepsia*, 2005, 46(4): 470-472.

- [2] Guekht A, Brodie M, Secco M, *et al.* The road to a World Health Organization global action plan on epilepsy and other neurological disorders [J]. *Epilepsia*, 2021, 62(5): 1057-1063.
- [3] Nababout R, Kuchenbuch M. Impact of predictive, preventive and precision medicine strategies in epilepsy [J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16(12): 674-688.
- [4] Devinsky O, Vezzani A, O'Brien TJ, *et al.* Epilepsy [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018;4:18024.
- [5] Boison D, Steinhauser C. Epilepsy and astrocyte energy metabolism [J]. *Glia*, 2018, 66(6): 1235-1243.
- [6] Magistretti PJ, Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19(4): 235-249.
- [7] Sada N, Lee S, Katsu T, *et al.* Epilepsy treatment. Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy [J]. *Science*, 2015, 347(6228): 1362-1367.
- [8] Garriga-Canut M, Schoenike B, Qazi R, *et al.* 2-Deoxy-D-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(11): 1382-1387.
- [9] Lian XY, Khan FA, Stringer JL. Fructose-1,6-bisphosphate has anticonvulsant activity in models of acute seizures in adult rats [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(44): 12007-12011.
- [10] Matsui T, Omuro H, Liu YF, *et al.* Astrocytic glycogen-derived lactate fuels the brain during exhaustive exercise to maintain endurance capacity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(24): 6358-6363.
- [11] Li E, Deng H, Wang B, *et al.* Apelin-13 exerts antidepressant-like and recognition memory improving activities in stressed rats [J]. *Eur Neuropsychopharm*, 2016, 26(3): 420-430.
- [12] Erdogan MA, Yusuf D, Erdogan A, *et al.* Levodropropizine suppresses seizure activity in rats with pentylenetetrazol-induced epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2019, 150: 32-37.
- [13] 董媛媛,王琳,褚旭,等. 鞘氨醇激酶 1 和 1-磷酸鞘氨醇受体 2 在癫痫大鼠海马组织中表达的变化 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(4): 308-311.
- [14] Sada N, Suto S, Suzuki M, *et al.* Upregulation of lactate dehydrogenase A in a chronic model of temporal lobe epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2020, 61(5): e37-e42.

- [4] Lee JY, Kim HS, Choi HY, *et al.* Fluoxetine inhibits matrix metalloprotease activation and prevents disruption of blood-spinal cord barrier after spinal cord injury [J]. *Brain*, 2012, 135(Pt 8): 2375-2389.
- [5] 袁前发, 何 珏, 徐志忠, 等. 重复经颅磁刺激联合低剂量氟西汀对 CUMS 抑郁小鼠的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(6): 650-653.
- [6] Harmer CJ, Mackay CE, Reid CB, *et al.* Antidepressant drug treatment modifies the neural processing of nonconscious threat cues [J]. *Biol Psychiat*, 2006, 59(9): 816-820.
- [7] Kishi T, Yoshimura R, Kitajima T, *et al.* SIRT1 gene is associated with major depressive disorder in the Japanese population [J]. *J Affect Disord*, 2010, 126(1-2): 167-173.
- [8] Abe N, Uchida S, Otsuki K, *et al.* Altered sirtuin deacetylase gene expression in patients with a mood disorder [J]. *J Psychiat Res*, 2011, 45(8): 1106-1112.
- [9] Abe-Higuchi N, Uchida S, Yamagata H, *et al.* Hippocampal Sirtuin 1 signaling mediates depression-like behavior [J]. *Biol Psychiat*, 2016, 80(11): 815-826.
- [10] 王 乐, 李碧蓉, 肖志勇, 等. 二氢杨梅素改善慢性社会挫败应激小鼠认知与情感障碍 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(6): 496-500.
- [11] Lei Y, Wang J, Wang D, *et al.* SIRT1 in forebrain excitatory neurons produces sexually dimorphic effects on depression-related behaviors and modulates neuronal excitability and synaptic transmission in the medial prefrontal cortex [J]. *Mol Psychiat*, 2020, 25(5): 1094-1111.
- [12] McGrory CL, Ryan KM, Kolshus E, *et al.* Peripheral blood SIRT1 mRNA levels in depression and treatment with electroconvulsive therapy [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2018, 28(9): 1015-1023.
- [13] Xu L, Xu S, Lin L, *et al.* High-fat diet mediates anxiolytic-like behaviors in a time-dependent manner through the regulation of SIRT1 in the brain [J]. *Neuroscience*, 2018, 372(13): 237-245.
- [14] Sun YM, Shen Y, Huang H, *et al.* Downregulated SIRT1 in the CeA is involved in chronic pain-depression comorbidity [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 174: 339-348.
- [15] Zhou C, Wu Y, Ding X, *et al.* SIRT1 decreases emotional pain vulnerability with associated CaMKII α deacetylation in central amygdala [J]. *J Neurosci*, 2020, 40(11): 2332-2342.
- [16] Solís-Bravo MA, Flores-Rodríguez Y, Tapia-Guillen LG, *et al.* Are tattoos an indicator of severity of non-suicidal self-injury behavior in adolescents? [J]. *Psychiat Invest*, 2019, 16(7): 504-512.
- [17] Yu H, Zhang F, Guan X. Baicalin reverse depressive-like behaviors through regulation SIRT1-NF- κ B signaling pathway in olfactory bulbectomized rats [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(5): 1480-1489.

(上接第 22 页)

- [15] Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, *et al.* Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 810-823.
- [16] Zhang Y, Xue Y, Meng S, *et al.* Inhibition of lactate transport erases drug memory and prevents drug relapse [J]. *Biol Psychiat*, 2016, 79(11): 928-939.
- [17] Rana A, Musto AE. The role of inflammation in the development of epilepsy [J]. *J Neuroinflamm*, 2018, 15(1): 144.
- [18] Dupuis N, Auvin S. Inflammation and epilepsy in the developing brain: clinical and experimental evidence [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(2): 141-151.
- [19] Sanz P, Garcia-Gimeno MA. Reactive glia inflammatory signaling pathways and epilepsy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4096.
- [20] McCallum RT, Perreault ML. Glycogen synthase kinase-3; a focal point for advancing pathogenic inflammation in depression [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2270.
- [21] Helmstaedter C, Witt JA. Epilepsy and cognition-A bidirectional relationship? [J]. *Seizure*, 2017, 49: 83-89.
- [22] Alachkar A, Ojha SK, Sadeq A, *et al.* Experimental models for the discovery of novel anticonvulsant drugs: Focus on pentylentetrazole-induced seizures and associated memory deficits [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(15): 1693-1711.
- [23] 孙 杨, 赵 灿, 刘媛媛, 等. 辣木叶对糖尿病大鼠认知功能及海马神经细胞凋亡的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(6): 638-643.