

网络出版时间: 2019-1-11 14:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.004.html>

甘氨酸转运体 1 抑制剂 M22 对 癫痫小鼠认知障碍的改善作用研究

林力峰 梁 维 刘 洲 冼文川 钟望涛

摘要 目的 研究甘氨酸转运体 1 (GlyT1) 抑制剂 M22 对戊四氮 (PTZ) 诱导的癫痫小鼠认知功能障碍的改善作用。方法 按照体质量随机将筛选的 50 只 C57BL/6 小鼠分为 3 组: 空白对照组 (Control, $n = 10$), 模型组 (Model, $n = 20$), M22 组 (M22, $n = 20$)。空白对照组腹腔注射等量的生理盐水, 模型组和 M22 组小鼠腹腔注射 PTZ (30 mg/kg) 制备慢性点燃癫痫模型, 连续腹腔注射 PTZ 2 周时间, 并同时通过灌胃给予 M22 组小鼠 40 mg/(kg·d) 的 M22。2 周后采用 Morris 水迷宫实验对其学习记忆功能进行评价, 然后将小鼠处死, 对其海马进行 HE 染色, 并测定小鼠大脑皮层的凋亡相关蛋白, 对其神经元细胞的凋亡情况进行评价。结果 Morris 水迷宫实验结果显示癫痫发作导致了小鼠认知功能障碍, 而 M22 对其认知障碍具有改善作用; HE 染色结果显

示模型组小鼠神经元明显发生凋亡, 而 M22 具有保护作用。凋亡相关蛋白测定显示 M22 对于癫痫导致的神经元凋亡具有显著的保护作用。结论 甘氨酸转运体 1 抑制剂 M22 能够显著提高癫痫小鼠的学习、记忆能力, 抑制神经元细胞凋亡, 为癫痫或者难治性癫痫患者提供新的选择。

关键词 癫痫; 认知功能障碍; M22

中图分类号 R 332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)02-0182-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.004

癫痫是由于脑部神经元高度同步化异常放电而引起的慢性、反复发作的短暂性大脑兴奋-抑制功能失调综合征。其主要的临床特性是发作性、重复性、刻板性与短暂性^[1-3]; 有文献^[4]报道 30% ~ 40% 的癫痫患者均伴有不同程度的认知障碍。目前的抗癫痫药物均不能明显改善癫痫患者的认知功能损伤与多动障碍, 有些药物甚至能够加重患者的认知损伤, 并且加重多动障碍的发生^[5-6]。

甘氨酸作为脑内最为重要的兴奋性神经递质,

2018-08-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81400986); 湛江市非资助科技计划项目 (编号: 2017B01019)

作者单位: 广东医科大学附属医院神经内科 湛江 524001

作者简介: 林力峰, 女, 大学本科;

钟望涛, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: pediaty@163.com

IRF3 suppress the secretion of inflammatory cytokines in the hepatic stellate cell induced by LPS

Liu Yunjie¹, Cheng Wei², Li Li³, et al

(¹Pharmacy Intravenous Admixture Service, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Binhu Hospital, Hefei 230061; ²PLA 92752 Troops Health Team, Hefei 231600;

³School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of IRF3 on the secretion of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in hepatic stellate cells induced by LPS. **Methods** Transient transfection of plasmid pcDNA3-IRF3 into LX-2 of human hepatic stellate cells by liposome was used to detect the transfection efficiency, and the expression of inflammatory factor IL-6 and TNF- α was detected by Western blot and qRT-PCR. **Results** The results of qRT-PCR and Western blot showed that the expression of TNF- α and IL-6 in LX-2 cells stimulated with 2 μ g/ml LPS for 12 h was significantly lower than that in normal control group, while the expression of TNF- α and IL-6 increased significantly. However, after pcDNA3 was transfected into LX-2 cells for 12 h, the expression levels of inflammatory factors IL-6 and TNF- α in pcDNA3 transfected group were significantly inhibited in LX-2 cells compared with the control group. **Conclusion** IRF3 can inhibit the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in LX-2 induced by LPS.

Key words IRF3; TNF- α ; hepatic stellate cells; LX-2 cells; inflammatory factor

可激活 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA) 进而联合作用于谷氨酸介导的神经传递。研究^[7-8]表明 NMDA 受体的激活, 对于学习记忆能力的维持以及长时程增强起着重要的作用。研究^[9-10]表明, 突触间隙的甘氨酸水平又受突触前膜的甘氨酸转运体 1 (glycine transporter 1, GlyT1) 调节, GlyT1 抑制剂又可以提高 NMDA 受体周围甘氨酸的浓度。因此可以间接通过抑制甘氨酸转运体活性来激活 NMDA 受体, 增强 NMDA 受体的活性。有研究^[11]显示在癫痫模型中 GlyT1 抑制剂 2,4-dichloro-N-{[4-(cyclopropylmethyl)-1-(ethylsulfonyl)piperidin-4-yl]methyl}benzamide (M22) 具有明显的抗惊厥作用, 并对于癫痫发作具有一定的治疗作用。该文主要探究 GlyT1 抑制剂 M22 对于癫痫小鼠的认知功能障碍的改善作用及其主要作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 M22 购自深圳 MedChemExpress 公司; 甘氨酸购自上海威奥生物科技有限公司; 实验所需的一抗、二抗与戊四氮 (pentylenetetrazole, PTZ) 均购自美国 Sigma 公司。

1.2 动物 实验动物为清洁级 C57BL/6 雄性小鼠 50 只 (动物购自南京大学-南京生物医药研究院), 体质量 25~30 g。动物饲养和实验场所为广东医科大学实验动物中心和广东医科大学神经病学研究所。小鼠的整体饲养在通风良好, 光照周期为 12 h 昼夜交替, 环境温度 (25 ± 1) °C, 湿度为 (50 ± 10) % 的恒定环境, 并可以自由饮水摄食。动物实验的所有操作在每天 9:00~17:00 期间进行。所有动物实验完全符合广东医科大学实验动物中心的动物伦理学条例。

1.3 癫痫模型的建立与动物分组 在分组前, 对实验动物进行 4 d 的水迷宫训练, 剔除存在学习记忆障碍的小鼠。然后将 50 只 C57BL/6 小鼠按照质量随机分为 3 组, 分别是空白对照组 (Control, $n=10$)、模型组 (Model, $n=20$)、M22 组 (M22, $n=20$)。空白对照组小鼠腹腔注射等量的生理盐水, 模型组和 M22 组小鼠则是经过腹腔注射 PTZ (30 mg/kg) 制备慢性点燃癫痫模型, 连续腹腔注射 PTZ 2 周时间, 并同时通过灌胃给予 M22 组小鼠 40 mg/(kg·d) 的 M22 [按照 0.1% (w/v) 的比例将 M22 均匀分散在羧甲基纤维素中]。参照癫痫发作 Racine 分级标准: 0 级: 无任何反应或表现出兴奋症状; I 级: 面部肌肉阵挛, 包括动须、

节奏性咀嚼、眨眼; II 级: 伴随 I 级症状, 并新添加节律性点头; III 级: 伴随 II 级症状, 并新添加肌阵挛、伴随身体直立; IV 级: 伴随 III 级症状, 并新添加后肢站立, 有强直阵挛发作; V 级: 伴随 IV 级症状, 并新添加失去体位控制、跌倒。在癫痫模型点燃过程中观察其癫痫发作情况; 当达到 III 级并持续 3 d 以上时, 则被认为癫痫模型已经完全点燃。

1.4 认知功能检测 利用水迷宫实验测试小鼠的学习记忆能力, 当连续给药 14 d 后开始利用 Morris 水迷宫实验进行检测。Morris 水迷宫实验水温控制在 (20 ± 0.5) °C, 加入二氧化钛使得池水变为不透明白色, 以遮盖实验小鼠在水中的嗅觉和视觉。Morris 水迷宫由一个圆柱型水池 (直径: 80 cm; 高: 70 cm) 和可移动站台组成 (直径: 8 cm)。实验时使得水面高于平台 1 cm。连续进行 4 d 训练, 每天开始时, 将小鼠从任意一个象限面向池壁放入水中, 每次让小鼠游泳 60 s 来寻找隐藏的站台。如果成功地找到站台, 则让小鼠在站台上停留 15 s; 如果 60 s 内未能成功找到站台, 则将小鼠牵引到站台上同样停留 15 s。第 5 天则进行测试, 去掉平台并记录小鼠在 60 s 内在目标象限的运动总路程、目标象限停留时间等指标。

1.5 海马 HE 染色观察 行为学测试以后, 立即将小鼠处死, 迅速取脑组织并采用 4% 的多聚甲醛进行固定, 常规石蜡包埋, 制成厚 3 μ m 的切片, 进行常规苏木精-伊红 (HE) 染色, 光学显微镜下观察海马细胞形态变化。

1.6 凋亡相关蛋白测定 采用 Western blot 法测定 Bcl-2、Bax 和细胞色素 C (Cytochrome C, CytC) 等凋亡相关蛋白的含量表达。低温条件下取大鼠皮层脑组织, 称重后液氮匀浆。4 °C 条件裂解 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液; 采用 BCA 法测定皮层组织的蛋白含量。采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳; 冰浴条件下转膜 2 h; 采用 TBST 反复漂洗 3 次; 置于平摇床内, 37 °C 条件下封闭孵育 1 h; 再用 TBST 漂洗 3 次加入 I 抗后 4 °C 孵育过夜; 采用 TBST 漂洗 3 次后; 加入荧光 II 抗置于 37 °C 平摇床孵育 1 h; 再一次 TBST 反复漂洗 3 次。然后进行凝胶图像, 并对数据处理系统分析。

1.7 脑皮质 GFAP 和 FGF-2 蛋白表达的测定 Western blot 法检测脑组织的胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 和成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2) 的蛋白表达量。具体步骤如上所述。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,多组比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水迷宫实验结果 Model 组较 Control 组潜伏期显著延长 ($P < 0.05$),表明癫痫发作造成了实验小鼠的学习认知功能发生障碍;当给予 M22 后,M22 组与 Model 组相比潜伏期显著降低 ($P < 0.05$),明显恢复到 Control 组水平,表明 M22 对于癫痫导致的认知功能障碍有显著的改善作用。此外,Model 组与 Control 组相比,穿越站台次数与目标象限活动时间都明显缩短 ($P < 0.05$),当给予 M22 后 M22 组较 Model 组的穿越站台次数与目标象限活动路程均明显恢复到 Control 组水平。见图 1。

2.2 海马 HE 染色观察 海马组织 HE 染色结果:Control 组小鼠海马神经元细胞形态完整,边缘清晰,细胞核结构清晰并呈现圆形,染色质分布均匀;Model 组小鼠海马神经元细胞则出现细胞形态模型不清,结构出现不完整,海马神经元出现不同程度的凋亡,染色质凝聚,细胞核轮廓消失;当给予 M22 后,小鼠海马神经元细胞则出现恢复到 Control 组的水平,表明 M22 具有神经保护作用,能够抑制神经元的凋亡,保护神经元细胞免受损伤。见图 2。

2.3 大脑皮层凋亡相关蛋白表达量的测定 通过

Western blot 检测小鼠大脑皮层凋亡相关蛋白的表达量,见图 3。Model 组小鼠大脑皮层的 Bcl-2/Bax 的比值较 Control 组显著降低,当给予 M22 后,癫痫小鼠的 Bcl-2/Bax 的比值显著升高;此外,Model 组小鼠大脑皮层的 CytC 蛋白表达量较 Control 组显著升高,当给予 M22 后,癫痫小鼠的 CytC 蛋白表达量显著降低;以上结果均表明癫痫会加速神经元凋亡,而 M22 具有神经保护作用。

2.4 大脑皮层 GFAP 和 FGF-2 蛋白表达量的测定

GFAP 和 FGF-2 蛋白的表达见图 4:Model 组小鼠大脑皮层的 GFAP 蛋白含量较 Control 组显著升高;当给予 M22 时,小鼠大脑皮层的 GFAP 蛋白含量显著回调。此外,Model 组小鼠大脑皮层的 FGF-2 蛋白含量较 Control 组显著降低;当给予 M22 时,小鼠大脑皮层的 FGF-2 蛋白含量显著升高。

3 讨论

癫痫是一种常见的神经系统疾病,病因复杂;但是反复的癫痫发作可导致大脑功能损伤,尤其易导致认知功能障碍。在癫痫患者中,认知功能损伤的发生率大约在 30% ~ 40%。此外,在癫痫疾病相关研究中,PTZ 可诱导动物产生和人类癫痫患者相似的行为学和神经病理学改变,且 PTZ 并不具有神经毒性作用,因此被广泛用于抗癫痫药物研究及其相关发病机制研究^[3]。

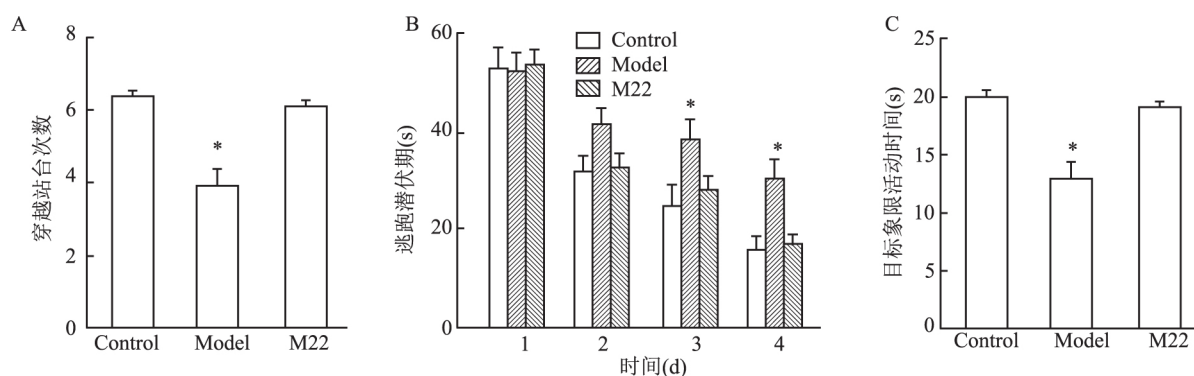


图1 水迷宫实验结果

A: 穿越站台次数; B: 逃跑潜伏期; C: 目标象限活动时间; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

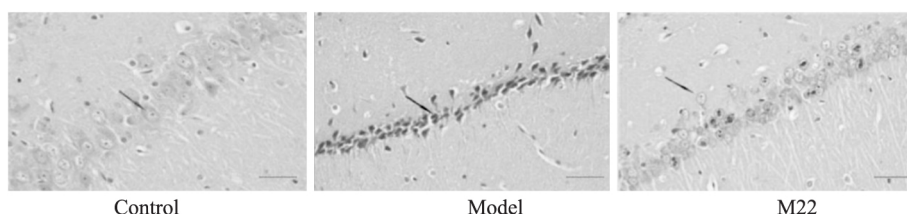


图2 海马组织 HE 染色 ×50

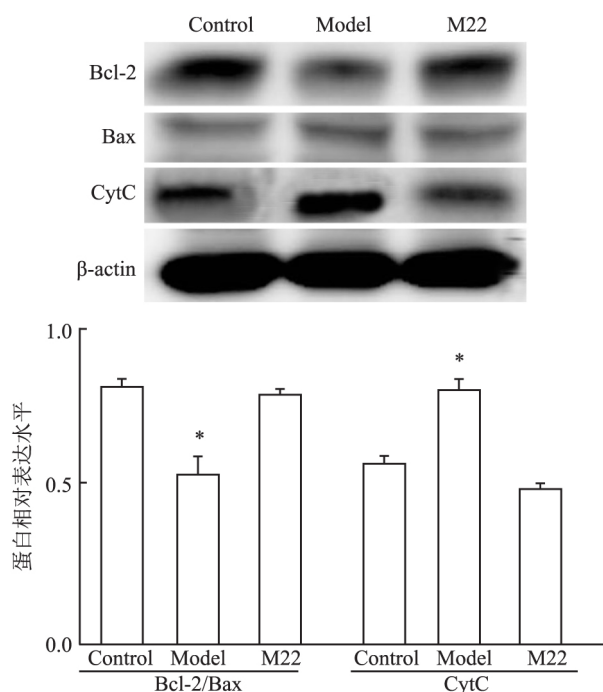


图3 小鼠大脑皮层凋亡相关蛋白的测定与 Control 组比较: * $P < 0.05$

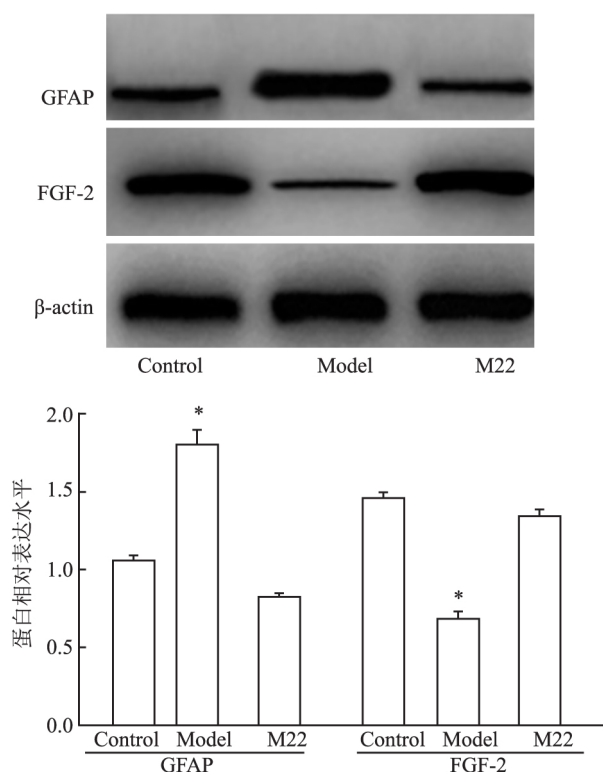


图4 大鼠皮层 GFAP 和 FGF-2 蛋白表达的测定与 Control 组比较: * $P < 0.05$

目前,在动物学习记忆能力评价中常用的实验是 Morris 水迷宫实验^[12],因此本文在评价 PTZ 诱导的癫痫小鼠的认知功能是采用 Morris 水迷宫实验进

行评价,结果表明 PTZ 导致的癫痫小鼠的潜伏期较 Control 组显著增加,而穿越平台次数和目标象限停留时间均显著降低,表明 PTZ 导致的癫痫小鼠的认知功能显著降低。当给予 PTZ 导致的癫痫小鼠 M22 后,其 Morris 水迷宫实验相关评价指标显著回调到 Control 组水平,表明 M22 对于 PTZ 导致的癫痫小鼠的认知功能障碍具有显著的改善作用。

研究^[13]表明癫痫发作后,可导致海马神经元凋亡、坏死;而海马神经元与学习认知功能具有显著的相关性,海马神经元的损伤可能是其发生认知功能障碍的主要原因。因此,本文对其海马组织进行 HE 染色观察,结果显示 Model 组小鼠的海马神经元细胞出现大量坏死,当给予 M22 后,其神经元坏死减少,表明 M22 具有神经保护作用。为了进一步评价神经元的凋亡情况,对其大脑皮层的相关凋亡蛋白进行测定,结果表明 Model 组小鼠大脑皮层的 Bcl-2/Bax 的比值较 Control 组显著降低,而 CytC 蛋白表达量较 Control 组显著升高,当给予 M22 后,癫痫小鼠的 Bcl-2/Bax 的比值与 CytC 蛋白表达量均显著回调;以上结果均表明癫痫会加速神经元凋亡,而 M22 具有神经保护作用。

此外,星型胶质细胞对于脑部环境起着重要的控制作用,对于胞外钾离子和谷氨酸的堆积有着重要的调控作用。GFAP 是星型胶质细胞激活的特异性标志物。星型胶质细胞激活表明神经细胞受到损伤,因此 GFAP 经常作为评价脑损伤的一个重要指标^[14]。本研究测定了大鼠皮层组织的 GFAP 蛋白量的表达,结果显示 Model 组 GFAP 蛋白表达量较 Control 组显著升高,当给予 M22 后,其表达量显著降低,表明 M22 具有神经保护作用。此外,FGF-2 为一种抑制细胞凋亡蛋白^[15],在 Model 组显著降低,当给予 M22 后显著回调,表明 M22 可抑制细胞凋亡,具有神经保护作用。

综上所述,甘氨酸转运体 1 抑制剂 M22 可以改善癫痫小鼠认知功能障碍,提高癫痫小鼠的学习、记忆能力,抑制神经元细胞凋亡,为癫痫或者难治性癫痫患者提供新的选择。

参考文献

- [1] 韩晓伟,段茂海,陈远寿,等. 外源性硫化氢改善癫痫大鼠脑认知功能障碍[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(13): 1269-72.
- [2] Fares R P, Belmeguenai A, Sanchez P E, et al. Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats

- [J]. *PLoS One* ,2013 ,8(1) : e53888.
- [3] Xiao Y W , Wang R , Ma X T , et al. Cognitive impairment and spontaneous epilepsy in rats with malformations of cortical development[J]. *Seizure* ,2015 ,33: 29–34.
- [4] Zhen J L , Chang Y N , Qu Z Z , et al. Luteolin rescues pentylene-tetrazole-induced cognitive impairment in epileptic rats by reducing oxidative stress and activating PKA/CREB/BDNF signaling [J]. *Epilepsy Behavior* ,2016 ,57(Pt A) :177–84.
- [5] Zhao J , Tao H , Xian W , et al. A highly selective inhibitor of glycine transporter-1 elevates the threshold for maximal electroshock-induced tonic seizure in mice [J]. *Biol Pharm Bull* ,2016 ,39(2) :174.
- [6] Alabri M , Alasmi A , Alshukairi A , et al. Frequency of obstructive sleep apnea syndrome among patients with epilepsy attending a tertiary neurology clinic [J]. *Oman Med J* ,2015 ,30(1) :31–5.
- [7] Peng W , Hong S , Min Z , et al. Effect of sodium valproate on cognitive function and hippocampus of rats after convulsive status epilepticus [J]. *Med Sci Monit* ,2016 ,22:5197–205.
- [8] Liu D S , Pan X D , Zhang J , et al. APOE4 enhances age-dependent decline in cognitive function by down-regulating an NMDA receptor pathway in EFAD-Tg mice [J]. *Mol Neurodegener* ,2015 ,10:7.
- [9] Xu M H , Wang X T. NMDA-type glutamate receptor and cognitive disorder in epilepsy [J]. *Med Recapitulate* ,2007 ,37(4) :52–7.
- [10] Chaki S , Shimazaki T , Karasawa J , et al. Efficacy of a glycine transporter 1 inhibitor TASP0315003 in animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia [J]. *Psychopharmacology* ,2015 ,232(15) :2849–61.
- [11] Shen H Y , Vliet E V , Bright K A , et al. Glycine transporter 1 is a target for the treatment of epilepsy [J]. *Neuropharmacology* ,2015 ,99:554–65.
- [12] Barry J M , Tian C , Spinella A , et al. Spatial cognition following early-life seizures in rats: performance deficits are dependent on task demands [J]. *Epilepsy Behav* ,2016 ,60:1–6.
- [13] Aliparasti M R , Alipour M R , Almasi S , et al. Ghrelin administration increases the Bax/Bcl-2 gene expression ratio in the heart of chronic hypoxic rats [J]. *Adv Pharm Bull* ,2015 ,5(2) :195–9.
- [14] Bercum F M , Rodgers K M , Benison A M , et al. Maternal stress combined with terbutaline leads to comorbid autistic-like behavior and epilepsy in a rat model [J]. *J Neurosci* ,2015 ,35(48) :15894–902.
- [14] Paradiso B , Zucchini S , Su T , et al. Localized overexpression of FGF-2 and BDNF in hippocampus reduces mossy fiber sprouting and spontaneous seizures up to 4 weeks after pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *Epilepsia* ,2011 ,52(3) :572–8.

Effects of glycine transporter 1 inhibitor M22 on cognitive impairment in epileptic mice

Lin Lifeng , Liang Wei , Liu Zhou , et al

(Dept of Neurology ,The Affiliated Hospital of Guangdong Medical University ,Zhanjiang 524001)

Abstract Objective To study the effects of glycine transporter 1 (GlyT1) inhibitor M22 on cognitive impairment in epileptic mice induced by amyl four nitrogen. **Methods** According to the weight ,50 C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: blank control group (Control , $n = 10$) , model group (Model , $n = 20$) , M22 group (M22 , $n = 20$). Chronic ignited epilepsy model were prepared by intraperitoneal injection of PTZ (30 mg/kg) in model group and M22 mice , while the control group was injected saline , continuous intraperitoneal injection of four nitrogen for 2 weeks and at the same time by intragastric administration of M22 mice 40 mg/(kg · d) M22. After two weeks , the learning and memory function was evaluated by Morris water maze test. Then the mice were sacrificed and their hippocampus were stained with HE staining , and the apoptosis related proteins in the cerebral cortex of mice were measured , and the apoptosis of neurons was evaluated. **Results** The results of Morris water maze test showed that epileptic seizures induced cognitive impairment in mice , while M22 could improve their cognitive impairment. HE staining showed that neurons in the model group were obviously apoptosis , while M22 exerted protective effect. Apoptosis related protein assay showed that M22 had a significant protective effect on the neuronal apoptosis induced by epilepsy. **Conclusion** Glycine transporter 1 inhibitor M22 can significantly improve the learning and memory ability of epileptic mice , inhibit neuronal apoptosis , and provide new options for patients with epilepsy or intractable epilepsy.

Key words epilepsy; cognitive dysfunction; M22