

拮抗 P2X7 受体在减轻子痫抽搐大鼠海马损伤中的作用

李晓晶^{1,2}, 李晓兰^{1,2}⁽¹⁾ 安徽医科大学第一附属医院妇产科, 合肥 230022;⁽²⁾ 国家卫生健康委配子及生殖道异常研究重点实验室, 合肥 230022)

摘要 **目的** 研究干预嘌呤能离子通道型受体 7(P2X7)受体可减轻子痫抽搐海马损伤的作用机制。**方法** SD 雌鼠 28 只按随机数字表法分为 4 组(每组 $n=7$),将雌雄鼠进行 2:1 合笼,第 2 天阴道涂片镜下观察到精子细胞记为妊娠第 0 天(GD0),通过 GD14 尾静脉注射 LPS、GD16~18 连续腹腔注射 PTZ 的方式制备子痫抽搐孕鼠模型。于 GD18 腹腔注射 PTZ 后立即腹腔注射 P2X7 抑制剂(A-438079)制备抑制剂组。即分组为:① 正常妊娠组(P 组);② 类子痫抽搐组(LPS+PTZ 组);③ P2X7 抑制剂组(LPS+PTZ+A-438079 组);④ 类子痫对照组(LPS+PTZ+NS 组)。根据 Racine 评分标准判断大鼠癫痫发作时等级以此评估各组孕鼠抽搐程度记录各期持续时间;Western blot 检测孕鼠海马 P2X7、NLRP3 蛋白表达水平;ELISA 测定孕鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、胎盘生长因子(PIGF)、可溶性 fms 样酪氨酸激酶 1(sFlt-1)炎症因子表达情况。**结果** LPS+PTZ 组、LPS+PTZ+NS 组大鼠与 P 组大鼠相比,抽搐行为学评分显著增高;LPS+PTZ 组、LPS+PTZ+NS 组大鼠与 LPS+PTZ+A-438079 组大鼠相比,1 期癫痫发作潜伏期、5 期癫痫发作潜伏期、1~4 期癫痫发作持续时间减少;5 期癫痫发作比率和 5 期癫痫发作持续时间均延长。Western blot 结果显示,与 LPS+PTZ 组和 LPS+PTZ+NS 组相比,LPS+PTZ+A-438079 组孕鼠海马 P2X7、NLRP3 表达升高。ELISA 结果显示,与 P 组相比,LPS+PTZ 组、LPS+PTZ+NS 组孕鼠血清炎症因子标志物 TNF- α 和 IL-1 β ;先兆子痫标志物 sFlt-1;PIGF 升高,而给予 P2X7 受体抑制剂后,各项指标均有所降低。**结论** 干预 P2X7 受体可能通过降低类子痫抽搐孕鼠的全身炎症反应,减轻神经海马损伤,提高抽搐阈值,抑制子痫抽搐的发生。

关键词 P2X7 受体;子痫抽搐;海马损伤;炎症;炎症因子**中图分类号** R 714.7**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1736-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.007

2024-08-07 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81801477)

作者简介:李晓晶,女,硕士研究生;

李晓兰,女,副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail: xia-olanli201410@163.com

子痫是子痫前期基础上发生的强直阵挛性或局灶性癫痫发作(除外其他原因)的妊娠期高血压疾病。在全球发病率约 1.6%~15.1%^[1]。该病的发病机制尚不明确,但目前有研究^[2]指出子痫患者明显的全身炎症可导致中枢神经系统局部炎症反应。

neurological score increased ($P<0.05$), the local infarction area appeared, the release of GDNF in peripheral and central system increased ($P<0.05$), and the microglia activation was induced by IS, and the expression of neurotoxic and neuroprotective phenotype genes increased significantly ($P<0.05$). Compared with the IS group, the neurological function score of the rats in the IS+Dex group significantly decreased ($P<0.05$), the local infarct area was significantly reduced ($P<0.05$), and the release of GDNF further increased ($P<0.05$). The expression of neurotoxic astrocyte phenotype genes significantly decreased ($P<0.05$), while the expression of neuroprotective astrocyte phenotype genes further increased ($P<0.05$). However, intervention with anti-GDNF antibody obviously reversed the therapeutic effect of Dex compared with the IS+Dex group. **Conclusion** Dex can inhibit the phenotype of neurotoxic astrocytes, increase the proportion of neuroprotective astrocytes, further promote the release of GDNF, and play an anti-ischemic stroke role.

Key words dexmedetomidine; astrocytes; polarization; GDNF; ischemic stroke**Fund program** Natural Science Foundation of Ningxia (No. 2021AAC03331)**Corresponding author** Wang Hui, E-mail: Annahuihui88@outlook.com

嘌呤能离子通道型受体 7 (purinergic ion channel receptor, P2X7) 是一种三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 门控的阳离子通道, 主要在小胶质细胞上表达^[3]。P2X7 作为关键炎症开关, 介导 NLRP3 复合体的激活并切割 caspase-1, 引起 IL-1 β 的分泌, 并释放到细胞外发挥炎症作用^[4]。研究^[5]指出神经元损伤释放的 ATP 可以使小胶质细胞表面的 P2X7 通道除极并释放大量炎症因子, 引起神经元兴奋性升高, 促进癫痫的发生。既往研究^[6]表明类子痫大鼠脑组织中, 星型胶质细胞和小胶质细胞损伤明显。研究^[7]指出在发生子痫时, 母体中合成的细胞外 ATP 通过产生促炎分子, 使其进入母体循环, 导致妊娠期持续的促炎状态, 这暗示 P2X7 可能在子痫的发病机制中发挥作用。既往运用脂多糖内毒素 (lipopolysaccharide endotoxin, LPS) 与戊四氮 (pentylene tetrazol, PTZ) 联合诱导建立了可靠的类子痫模型大鼠^[8], 实验通过该动物模型, 探讨拮抗 P2X7 在保护子痫抽搐大鼠海马损伤中的作用及其调节机制, 以期为后续的药物研究探寻重要的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8~9 周龄、达到性成熟的健康清洁级 SD 雌性大鼠 30 只, 雄性大鼠 6 只, 购自北京维通利华动物中心, 体质量 160~180 g。实验动物生产许可证号: SCXK (浙) 2019-0001, 伦理批号: LLSC20221094。严格按照安徽医科大学生物医学伦理委员会基本要求开展实验。实验前大鼠在标准实验室条件下饲养 1 周。

1.2 药物与试剂 LPS、PTZ 购自美国 Sigma Aldrich 公司; A-438079 购自英国 Tocris Bioscience, Bristol 公司; 兔多克隆 P2X7 抗体购自英国 Abcam 公司; 兔多克隆 NLRP3 抗体购自美国 Affinity Biosciences 公司; 鼠多克隆 β -actin 抗体、山羊抗鼠/兔通用型二抗购自北京中杉金桥公司; ELISA 试剂盒 TNF- α (货号: E-EL-R2856)、ELISA 试剂盒 IL-1 β (货号: E-EL-R0012c)、ELISA 试剂盒 PIGF (货号: E-EL-M3091) 购自美国 Elabscience 公司; ELISA 试剂盒 sFlt-1 (货号: SP39956) 购自武汉赛培生物公司。

1.3 实验仪器 垂直电泳、转膜槽购自美国 Bio-Rad 公司; 多样品组织研磨仪购自上海鑫翁科学仪器有限公司; 电子天平购自上海仪分科学仪器有限公司; 高速低温离心机购自美国 Beckman 公司; 制冰机购自日本 SUNYO 公司; 全自动酶标分析仪购

自郑州安图实验仪器有限公司。

1.4 模型制作与分组 大鼠适应性饲养 1 周后, 于晚 8 点将雌雄大鼠按照 2:1 合笼, 次日早 7 点对合笼的雌鼠进行阴道涂片, 在光学显微镜下发现精子细胞即定为妊娠, 并记为妊娠第 0 天 (GD0)。妊娠 SD 大鼠随机分为 4 组 (每组 $n=7$): ① 正常妊娠组 (P 组); ② 类子痫组 (LPS + PTZ 组); ③ P2X7 抑制剂组 (LPS + PTZ + A-438079 组); ④ 类子痫对照组 (LPS + PTZ + NS 组)。于 GD14 天腹腔注射戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉孕鼠后, 尾静脉缓慢注射低剂量 LPS (1.0 μ g/kg, 2 ml/h), 于 GD16-18 连续腹腔注射 PTZ (40 mg/kg) 制备类子痫抽搐大鼠模型; 于 GD18 天腹腔注射 PTZ 后立即腹腔注射 P2X7 抑制剂 (A-438079, 50 mg/kg) 制备抑制剂组; 对照组则同时间同剂量腹腔注射生理盐水。

1.5 取材与指标检测

1.5.1 取材 于 GD20 天孕鼠腹腔注射戊巴比妥钠, 麻醉后经腹主动脉穿刺取血 5~8 ml, 静置 (30 min, 4 $^{\circ}$ C) 离心 (200 r/min, 15 min) 后放于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用, 过量麻醉致死并在冰上快速取海马组织, 放于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5.2 观察各组大鼠癫痫发作情况 该研究通过监测各组大鼠 D16~18 注射 PTZ 后癫痫发作的持续时间和强度, 根据 Racine 评分标准^[9]判断孕鼠癫痫发作时等级: 0 级, 无反应; I 级, 出现咀嚼、面部胡须节律性抽搐等症状; II 级, 出现咀嚼、点头样症状伴随更为严重的面部抽搐等症状; III 级, 出现前肢单侧阵挛或不伴直立; IV 级, 出现双侧前肢阵挛伴随直立; V 级, 出现全身强直性阵挛发作、直立或跌倒; VI 级, 死亡。记录各组大鼠抽搐行为学评分和潜伏期至第 1 期癫痫发作时间、潜伏期至第 5 期癫痫发作时间、第 5 期癫痫发作的持续时间、1-4 期癫痫发作的持续时间。

1.5.3 Western blot 检测相关蛋白表达 采用 Western blot 检测大鼠海马组织 P2X7、NLRP3 表达。于孕鼠 GD20 天腹腔注射戊巴比妥钠, 麻醉过量致死, 立即取出海马组织。随后将组织分别分装到 1.5 ml EP 管存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中待用。将 RIPA: 磷酸酶抑制剂: PMSF, 按照 97:2:1 的比例配成裂解液, 冰上解冻海马组织后称重, 按照 1 mg/18 μ l 加入裂解液及两颗小钢珠。置于冷冻研磨仪 65 Hz 研磨 3 min。随后将蛋白匀浆吸取至 1.5 ml EP 管并放置于冰上继续裂解 30 min。将蛋白匀浆放至低温高速离心机调节转速为 12 000 r/min 离心 15

min,吸取上清液,用 BCA 方法测定浓度。按照蛋白 5 × Loading Buffer 比例为4:1混合,100 ℃孵育 10 min。配制 SDS-PAGE 凝胶,按照等体积上样,低电压 80 V,电泳 60 min,待 marker 分离后,调至高压 120 V,电泳 70 min。PVDF 膜泡于甲醇活化后,以 230 mA 恒流转膜 100 min。放入 5%脱脂牛奶,慢摇床上室温封闭 90 min。PVDF 膜放在提前稀释好的一抗溶液内(根据不同抗体 P2X7 1:1 000;NL-RP3 1:1 000; β -actin 1:1 000),置于 4 ℃过夜。加入 TBST 稀释的二抗溶液(根据不同抗体来源:山羊抗鼠 1:10 000,山羊抗兔 1:5 000),在室温下孵育 90 min。用 TBST 10 min/次,3 次清洗后,避光条件下,使 ECL 显影液与膜接触,使膜发光、显影,后采用凝胶图像分析系统采集图像,并用 Image J 软件对目的条带进行灰度扫描、分析。

1.5.4 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 严格按照 ELISA 检测步骤进行,检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 、sFlt-1、PlGF 含量。首先在实验前进行试剂回温;将 SD 大鼠血清静置 10 ~ 20 min,离心 (2 000 ~ 3 000 r/min, 20 min),取上清液。设置标准品孔、空白孔及样品孔,并分别进行加样;加样后用封板膜封板,置于 37 ℃恒温箱孵育 90 min;甩尽孔内液体,不用洗涤,加入生物素化抗体工作液,在酶标板上覆膜 37 ℃恒温箱孵育 60 min;甩尽孔内液体后加洗涤液浸泡 1 min,重复洗板 3 次;加入酶结合物工作液,在酶标板上覆膜 37 ℃恒温箱孵育 30 min;洗板 5 次方法同前;每孔加入底物溶液,酶标板上覆膜,37 ℃避光孵育 15 min,当标准孔出现明显梯度时即可终止。立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的吸光度值 (OD 值)。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析。所有数据进行方差齐性和正态分布检验,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用 One-way ANOVA,其中两两比较采用 LSD-*t* 法,以 $P < 0.05$ 表示

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠建模后行为学表现及相关评分 造模过程中,P 组均无癫痫行为表现;LPS + PTZ 组、LPS + PTZ + NS 组大鼠可见不同程度的癫痫发作,出现面部抽动,头颈右偏,绕尾打转,单侧或双侧的前肢抖动和持续性点头,全身强直性阵挛发作;发作间期大鼠出现进食饮水减少,极易激惹,LPS + PTZ + A-438079 组大鼠经药物干预后癫痫发作平均时间减短,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),见表 1,发作程度减轻,抽搐行为学评分降低,差异有统计学意义 ($P < 0.001$, $P < 0.01$),见图 1。即表明抑制 P2X7 可提高子痫抽搐阈值,减轻抽搐严重程度。

2.2 各组大鼠海马 P2X7、NLRP3 蛋白表达含量

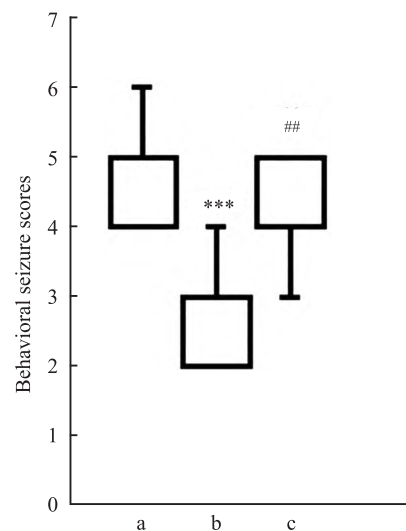


图 1 抽搐行为学评分

Fig. 1 Tic behavioral score

a: LPS + PTZ group; b: LPS + PTZ + A-438079 group; c: LPS + PTZ + NS group; *** $P < 0.001$ vs LPS + PTZ group; ## $P < 0.01$ vs LPS + PTZ + A-438079 group.

表 1 三组大鼠癫痫发作时间汇总 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The seizure time of three groups of rats was summarized ($\bar{x} \pm s$)

group	n	Latency to stage	Latency to stage	Duration of stage	Duration of
		1 seizures (s)	5 seizures (s)	5 seizures (s)	stage 1 - 4 seizures (s)
LPS + PTZ	7	68.8 ± 7.9	285.8 ± 40.3	40.4 ± 6.7	572.3 ± 160.4
LPS + PTZ + A-438079	7	178.6 ± 13.2 * *	318.2 ± 32.5	27.2 ± 2.7 *	560.3 ± 32.3
LPS + PTZ + NS	7	69.4 ± 6.8	290.4 ± 34.9	38.6 ± 7.1	580.4 ± 140.2

* $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ vs LPS + PTZ group.

Western blot 结果显示,与 P 组相比,LPS + PTZ 组 P2X7、NLRP3 蛋白表达水平均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$);而 LPS + PTZ + A-438079 组上述蛋白表达水平显著低于该组,差异有统计学意义($P < 0.001$),见图 2。上述结果表明 P2X7 在海马内激活并参与了子痫抽搐的发生,激活下游 NLRP3 炎症小体,诱发炎症反应。

2.3 各组大鼠血清子痫标志物及炎症因子指标含量 ELISA 结果显示,与 P 组相比,LPS + PTZ 组 TNF- α 、IL-1 β 、sFlt-1 均升高,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$);而给予 P2X7 抑制剂后,LPS + PTZ + A-438079 组与 LPS + PTZ 组相比, TNF- α 、IL-1 β 、sFlt-1、PIGF 均有所下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明,抑制 P2X7 后,可以减轻母体全身炎症的发生,从而表明 P2X7 参与子痫全身炎症的发生。见图 3。

3 讨论

正常的妊娠是轻度的全身炎症反应,该炎症反应在子痫前期中被“放大”,导致单核细胞、粒细胞和内皮细胞的损伤,进而引发母体炎症^[10]。而全身炎症则可破坏脑内环境稳态,引起局部神经炎症,降低抽搐阈值,“点燃”子痫抽搐发作。当子痫发生时,母体血压升高突破了自身调节阈值,使脑血流量增加,改变血脑屏障通透性,神经胶质细胞激活,进而使神经元异常兴奋^[11]。因此,降低全身和局部神经炎症反应可能会提高子痫抽搐阈值,有效地抑制子痫抽搐的发生。

P2X7 在多种免疫细胞中表达,其 P2X7 的激活可以引起并加重炎症反应过程^[12]。P2X7 在细胞处于炎症、低氧或损伤状态时,通过激活 NLRP3 炎症小体,影响 IL-1 β 、IL-18 等多种炎症因子的释放,从

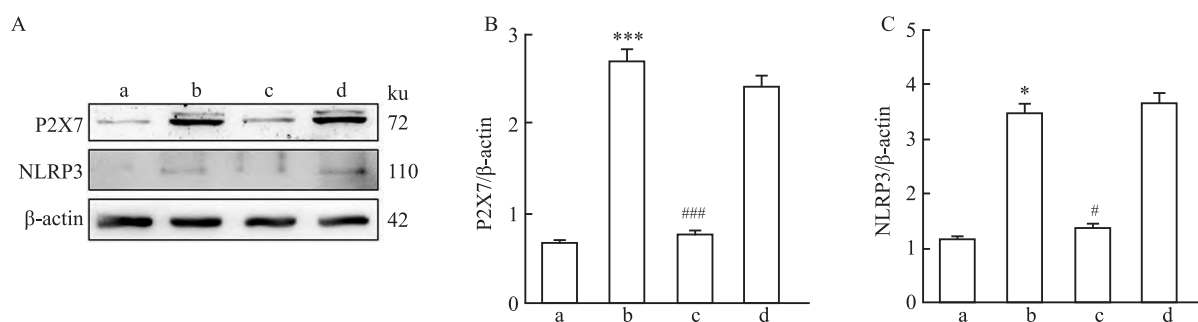


图2 癫痫大鼠海马 P2X7、NLRP3 蛋白表达

Fig. 2 Expression of P2X7 and NLRP3 proteins in hippocampus of epileptic rats

A: Protein expression electrophoretic map; B: Quantitative analysis of P2X7 protein relative expression; C: Quantitative analysis of NLRP3 protein relative expression; a: P group; b: LPS + PTZ group; c: LPS + PTZ + A-438079 group; d: LPS + PTZ + NS group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs P group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs LPS + PTZ group.

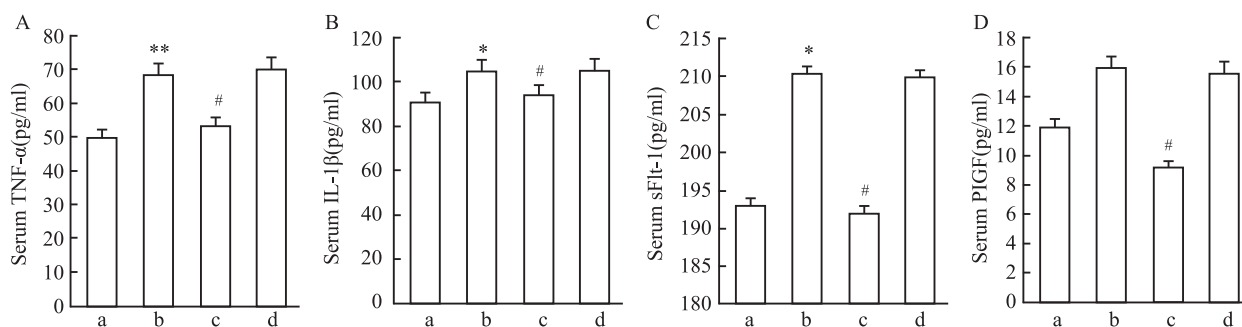


图3 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、sFlt-1、PIGF 含量

Fig. 3 Concentration of TNF- α , IL-1 β , sFlt-1 and PIGF in serum of rats

A: Serum TNF- α content of rats in each group; B: Serum IL-1 β content of rats in each group; C: Serum sFlt-1 content of rats in each group; D: Serum PIGF content of rats in each group; a: P group; b: LPS + PTZ group; c: LPS + PTZ + A-438079 group; d: LPS + PTZ + NS group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs P group; # $P < 0.05$ vs LPS + PTZ group.

而参与多种炎症性疾病的发展^[13]。P2X7 的活化可使 NLRP3 炎症小体中 NLRP3 和 caspase-1 激活,进而增加血清炎症因子 IL-1 β 、IL-18 等的释放加重靶器官的损伤。NLRP3 炎症小体的异常活化和调控机制与多种炎症性疾病的发生发展密切相关^[14]。NLRP3 炎症小体是 NLR 炎症通路中的重要组成部分, caspase-1 前体在 ASC 斑点上活化为 caspase-1 后,能使 IL-1 β 、IL-18 等多种炎症因子进一步活化,同时 NLRP3 炎症小体还可以瀑布级联式损害作用于靶器官^[15]。许多研究^[16]利用实验动物模型和检测人体组织发现, P2X7 参与了中枢神经系统多种慢性疾病的发病,且小胶质细胞与神经系统疾病的发生密切相关,例如癫痫和阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)。P2X7 也在与 AD 相关的神经炎症中起作用,并且发现在 AD 患者大脑中的 A β 斑块区域中发现小胶质细胞 P2X7 上调^[17]。

目前有研究^[18]指出 P2X7 可作为癫痫疾病的潜在治疗靶点。但 P2X7 在子痫抽搐中的作用还未见报道,在全身炎症导致神经炎症的条件下该受体在大脑内如何发挥作用仍不清楚。该研究结果也显示, LPS + PTZ 组、LPS + PTZ + NS 组孕鼠海马组织 P2X7、NLRP3 蛋白显著升高,提示炎症反应参与了子痫抽搐的发展。而在给予 P2X7 抑制剂后,上述指标显著降低,说明通过调控 P2X7/NLRP3 信号通路,可以减轻或缓解子痫抽搐的发生或反复发生。与 LPS + PTZ 组和 LPS + PTZ + NS 组相比, LPS + PTZ + A-43807 组大鼠血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达水平均显著下降,说明可能通过抑制大鼠海马 P2X7 的激活,减少炎症因子的表达,从而发挥对中枢神经系统的保护作用。但由于子痫的发病机制复杂,可能涉及多条 P2X7/NLRP3 下游信号通路,尤其信号通路之间又存在交互作用,因此关于子痫抽搐的发生与 P2X7 的相关联系该课题组将进一步深入研究,关于子痫的发生机制也有待进一步研究。

综上所述,该研究通过子痫抽搐动物模型,表明海马组织内活化的 P2X7/NLRP3 信号通路通过活化炎症因子释放 TNF- α 、IL-1 β 等因子加重了外周炎症和局部神经炎症反应,引起类子痫抽搐。通过抑制 P2X7,可以减轻神经系统炎症反应,提高抽搐阈值,缓解抽搐程度,延长抽搐发生潜伏期,抑制子痫抽搐的发生,从而对母体起到保护作用,该研究结果可能为开发缓解和预防子痫相关疾病的药物提供潜在新策略。

参考文献

- [1] Fishel Bartal M, Sibai B M. Eclampsia in the 21st century[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2022, 226(2s): S1237 - 53. doi:10.1016/j.ajog.2020.09.037.
- [2] Ijomone O K, Shallie P, Naicker T. Changes in the structure and function of the brain years after Pre-eclampsia[J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 47: 49 - 54. doi:10.1016/j.arr.2018.06.006.
- [3] Illes P. P2X7 receptors amplify CNS damage in neurodegenerative diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 5996. doi:10.3390/ijms21175996.
- [4] Di Virgilio F, Ben D D, Sarti A C, et al. The P2X7 receptor in infection and inflammation[J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 15 - 31. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.020.
- [5] Thawkar B S, Kaur G. Inhibitors of NF- κ B and P2X7/NLRP3/caspase 1 pathway in microglia: novel therapeutic opportunities in neuroinflammation induced early-stage Alzheimer's disease[J]. *J Neuroimmunol*, 2019, 326: 62 - 74. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.11.010.
- [6] Li X, Liu H, Yang Y. Magnesium sulfate attenuates brain edema by lowering AQP4 expression and inhibits Glia-mediated neuroinflammation in a rodent model of eclampsia[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 364: 403 - 12. doi:10.1016/j.bbr.2017.12.031.
- [7] Fodor P, White B, Khan R. Inflammation-the role of ATP in pre-eclampsia[J]. *Microcirculation*, 2020, 27(1): e12585. doi:10.1111/micc.12585.
- [8] Huang Q, Liu L, Hu B, et al. Decreased seizure threshold in an eclampsia-like model induced in pregnant rats with lipopolysaccharide and pentylene tetrazol treatments[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89333. doi:10.1371/journal.pone.0089333.
- [9] Chindo B A, Schröder H, Becker A. Methanol extract of *Ficus platyphylla* ameliorates seizure severity, cognitive deficit and neuronal cell loss in pentylene tetrazole-kindled mice[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(1): 86 - 93. doi:10.1016/j.phymed.2014.10.005.
- [10] Maher G M, McCarthy F P, McCarthy C M, et al. A perspective on pre-eclampsia and neurodevelopmental outcomes in the offspring: does maternal inflammation play a role? [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2019, 77: 69 - 76. doi:10.1016/j.ijdevneu.2018.10.004.
- [11] Spradley F T. Targeting inflammation to reduce seizure severity in an experimental model of eclampsia[J]. *Hypertens Res*, 2020, 43: 350 - 3. doi:10.1038/s41440-019-0317-4.
- [12] Franco M, Bautista-Pérez R, Cano-Martínez A, et al. Physio-pathological implications of P2X1 and P2X7 receptors in regulation of glomerular hemodynamics in angiotensin II-induced hypertension[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(1): F9 - 19. doi:10.1152/ajprenal.00663.2016.
- [13] Teixeira J M, Parada C A, Tambeli C H. A cyclic pathway of P2 $\times$ 7, bradykinin, and dopamine receptor activation induces a sustained articular hyperalgesia in the knee joint of rats[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(4): 301 - 14. doi:10.1007/s00011-017-

- 1122–7.
- [14] Sharma A, Tate M, Mathew G, et al. Oxidative stress and NLRP3-inflammasome activity as significant drivers of diabetic cardiovascular complications: therapeutic implications[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 114. doi:10.3389/fphys.2018.00114.
- [15] Wang C, Gao Y, Zhang Z, et al. Ursolic acid protects chondrocytes, exhibits anti-inflammatory properties *via* regulation of the NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway and ameliorates osteoarthritis[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2020, 130: 110568. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110568.
- [16] Zhang X, Wang M, Feng B, et al. Seizures in PPT1 knock-in mice are associated with inflammatory activation of microglia[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (10): 5586. doi: 10.3390/ijms23105586.
- [17] Gu B J, Wiley J S. P2X7 as a scavenger receptor for innate phagocytosis in the brain [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175 (22): 4195–208. doi:10.1111/bph.14470.
- [18] Andrejew R, Oliveira-Giacomelli á, Ribeiro D E, et al. The P2X7 receptor: central hub of brain diseases[J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 124. doi:10.3389/fnmol.2020.00124.

Role of antagonistic P2X7 receptor in reducing hippocampal damage in epileptic rats

Li Xiaojing^{1,2}, Li Xiaolan^{1,2}

(¹*Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

²*NHC Key Laboratory of Study on Abnormal Gametes and Reproductive Tract, Hefei 230022*)

Abstract Objective To investigate the mechanism of purinergic ion channel receptor 7 (P2X7) intervention in reducing hippocampal damage in epileptic convulsions. **Methods** A total of 28 SD female rats were divided into 4 groups ($n=7$ in each group) according to random number table method. The male and female rats were combined with 2 : 1 cage. The sperm cells observed by vaginal smear on day 2 were marked as day 0 of pregnancy (GD0), and the model of epileptic pregnant mice was prepared by injecting LPS into the tail vein of GD14 and PTZ into the abdomen continuously on GD16–18. The inhibitor group was prepared by intraperitoneal injection of P2X7 inhibitor (A-438079) immediately after intraperitoneal injection of PTZ in GD18. They were divided into: ① normal pregnancy group (P group); ② Epilepsy group (LPS + PTZ group); ③ P2X7 inhibitor group (LPS + PTZ + A-438079 group); ④ Eclampsia control group (LPS + PTZ + NS group). Racine scoring criteria were used to determine the grade of epileptic seizure in rats to evaluate the degree of epileptic seizure in each group and record the duration of each phase. The expression levels of P2X7 and NLRP3 in the hippocampus of pregnant mice were detected by Western blot. The expression of TNF- α , IL-1 β , PIGF and sFlt-1 inflammatory factors in serum of pregnant mice was determined by ELISA. **Results** The tic behavioral scores of rats in LPS + PTZ group and LPS + PTZ + NS group were significantly higher than those in P group. Compared with LPS + PTZ + A-438079 group, LPS + PTZ + NS group and LPS + PTZ + NS group, the first stage of seizure latency, the fifth stage of seizure latency and the duration of 1–4 stages of seizure decreased. Both the rate of stage 5 seizures and the duration of stage 5 seizures were prolonged. Western blot results showed that compared with LPS + PTZ group and LPS + PTZ + NS group, the expressions of P2X7 and NLRP3 in hippocampus of pregnant rats in LPS + PTZ + A-438079 group increased. ELISA results showed that compared with P group, serum inflammatory factor markers tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-1 β were detected in LPS + PTZ and LPS + PTZ + NS groups. Soluble FMS-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1), a marker of preeclampsia; placental growth factor (PIGF) increased, while P2X7 receptor inhibitors were used to reduce all indicators. **Conclusion** Intervention of P2X7 receptor may reduce the systemic inflammatory response of epileptic pregnant mice, reduce neurohippocampal damage, increase the convulsive threshold, and inhibit the occurrence of epileptic convulsions.

Key words P2X7 receptor; convulsive eclampsia; hippocampus injury; inflammation; inflammatory factor

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 81801477)

Corresponding author Li Xiaolan, E-mail: xiaolanli201410@163.com