

· 论著 ·

低频率电刺激通过Ras同源基因/Rho相关蛋白激酶途径调节自噬对癫痫大鼠的作用研究

卢军 刘坤 匡卫平 邓兰秋子 李振光 王琴 曾其昌 黄亚辉 朱勇 彭琼

410007 长沙,湖南省脑科医院神经外科

通信作者:刘坤, Email: 13755087478@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2020.10.001

【摘要】 **目的** 探究低频率电刺激(LFS)对癫痫的作用及其可能的作用机制。**方法** 将60只SD大鼠按随机数字表法分为对照组、癫痫模型组、假刺激组和LFS治疗组,每组各15只。氯化锂-匹鲁卡品法建立癫痫大鼠模型。记录大鼠Racine评分和脑电图, Morris水迷宫实验检测大鼠空间学习记忆能力;苏木素-伊红(HE)染色和尼氏染色检测大鼠海马CA1区病理学变化;脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)染色检测大鼠海马神经细胞凋亡;Western blot检测大鼠海马Ras同源基因家族成员A(RhoA)、Rho相关蛋白激酶1(ROCK1)、ROCK2、自噬和凋亡相关蛋白表达;逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测大鼠海马RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA表达。**结果** 与对照组比较,癫痫模型组大鼠出现连续性棘波, Racine评分 $[(4.23 \pm 0.29)$ 分]、逃跑潜伏期 $[(49.36 \pm 4.69)$ s]、神经细胞凋亡率 $[(27.52 \pm 2.95)\%$] 和B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关X[Bax, (0.82 ± 0.07)]、裂解-caspase3 [c-caspase3, (1.70 ± 0.15)]、微管相关蛋白1A/1B轻链3B II /微管相关蛋白1A/1B轻链3B I [LC3 II /LC3 I, (5.20 ± 0.42)] 和Beclin1 (0.73 ± 0.05) 蛋白表达水平明显升高(均 $P < 0.05$), RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA和蛋白表达水平均明显升高(均 $P < 0.05$), 游泳距离 $[(240.68 \pm 22.91)$ cm]、平台停留时间 $[(39.89 \pm 2.20)$ s]、神经细胞数量 (17.13 ± 3.14) 、尼氏体数量 (6.75 ± 1.09) 以及Bcl-2 (0.24 ± 0.02) 和p62 (0.20 ± 0.02) 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与假刺激组比较, LFS治疗组大鼠波峰明显下降, Racine评分 $[(2.82 \pm 0.23)$ 分]、逃跑潜伏期 $[(34.83 \pm 3.85)$ s]、神经细胞凋亡率 $[(9.25 \pm 0.91)\%$]及Bax (0.43 ± 0.05) 、c-caspase3 (0.53 ± 0.02) 、LC3 II /LC3 I (1.17 ± 0.11) 和Beclin1 (0.36 ± 0.02) 蛋白表达水平明显降低(均 $P < 0.05$), RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA和蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$), 游泳距离 $[(284.21 \pm 22.36)$ cm]、平台停留时间 $[(46.85 \pm 2.93)$ s]、神经细胞数量 (47.00 ± 5.07) 、尼氏体数量 (33.75 ± 2.90) 和Bcl-2 (0.87 ± 0.07) 、p62 (0.96 ± 0.05) 蛋白表达水平明显升高(均 $P < 0.05$)。 **结论** LFS可能通过抑制Rho/ROCK途径调节自噬发挥抗癫痫作用。

【关键词】 癫痫; 低频率电刺激; 自噬; Rho/ROCK途径**基金项目:**湖南省自然科学基金(2020JJ8057)

Effect of LFS regulating autophagy on epileptic rats through Ras homologous gene/Rho-associated coiled-coil containing protein kinase pathway Lu Jun, Liu Kun, Kuang Weiping, Deng Lanqiu, Li Zhenguang, Wang Qin, Zeng Qichang, Huang Yahui, Zhu Yong, Peng Qiong
Department of Neurosurgery, Brain Hospital of Hunan Province, Changsha 410007, China
Corresponding author: Liu Kun, Email: 13755087478@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of low-frequency stimulation (LFS) on epilepsy and its possible mechanism. **Methods** A total of 60 SD rats were randomly divided into control group, epilepsy model group, sham stimulation group and LFS treatment group, with 15 rats in each group. A rat model of epilepsy was established by the method of lithium chloride and pilocarpine. The Racine score and electroencephalogram of rats were recorded. Morris water maze test was used to detect the spatial learning and memory ability of the rats; Hematoxylin eosin (HE) staining and Nissl staining were used to detect the pathological changes in the hippocampus CA1 area of the rats; TdT mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining was used to detect

the apoptosis of hippocampal neurons; Western blot was used to detect the expression of RhoA, ROCK1, ROCK2, autophagy and apoptosis-related proteins in the hippocampus of the rats; Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression of RhoA, ROCK1 and ROCK2 in the hippocampus of the rats. **Results** Compared with the control group, rats in the epilepsy model group showed continuous spikes, Racine score (4.23 ± 0.29), escape latency [(49.36 ± 4.69) s], neuronal cell apoptosis rate [$(27.52 \pm 2.95)\%$], expression of B-lymphoma-2 (Bcl-2) related X [Bax, (0.82 ± 0.07)], c-caspase3 (1.70 ± 0.15), microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B II /microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B I [LC3 II /LC3 I, (5.20 ± 0.42)] and Beclin1 (0.73 ± 0.05) protein were significantly increased (all $P < 0.05$). Expression of RhoA, ROCK1 and ROCK2 mRNA and protein were significantly increased (all $P < 0.05$). Swimming distance [(240.68 ± 22.91) cm], platform residence time [(39.89 ± 2.20) s], number of neurons (17.13 ± 3.14), number of Nissl bodies (6.75 ± 1.09), protein expression of Bcl-2 (0.24 ± 0.02) and p62 (0.20 ± 0.02) were significantly reduced ($P < 0.05$); Compared with the sham stimulation group, the wave peak of the rats in the LFS treatment group was significantly decreased, Racine score (2.82 ± 0.23), escape latency [(34.83 ± 3.85) s], neuronal cell apoptosis rate [$(9.25 \pm 0.91)\%$], expression of Bax (0.43 ± 0.05), c-caspase3 (0.53 ± 0.02), LC3 II /LC3 I (1.17 ± 0.11) and Beclin1 (0.36 ± 0.02) protein were significantly reduced ($P < 0.05$). Expression of RhoA, ROCK1 and ROCK2 mRNA and protein were significantly reduced ($P < 0.05$). Swimming distance [(284.21 ± 22.36) cm], platform residence time [(46.85 ± 2.93) s], the number of neurons (47.00 ± 5.07), the number of Nissl bodies (33.75 ± 2.90), protein expression of Bcl-2 (0.87 ± 0.07) and p62 (0.96 ± 0.05) increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** LFS may regulate autophagy by inhibiting the Rho/ROCK pathway to play an anti-epileptic effect.

【Key words】 Epilepsy; Low frequency electrical stimulation; Autophagy; Rho/ROCK pathway

Fund program: Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ8057)

癫痫是由神经元异常放电引起的一种慢性脑功能临床综合征。癫痫是继卒中和阿尔茨海默病之后最常见的神经系统疾病,迄今为止全球有6 800多万癫痫患者,约占疾病总负担的0.5%,全球患病率在1.5%~14.0%^[1]。30%~40%的癫痫患者存在记忆障碍、注意力分散等认知功能障碍^[2]。尽管目前多数癫痫患者的癫痫发作经药物治疗可得到控制,但仍有20%~30%的患者对抗癫痫药物治疗反应差,癫痫发作难以控制,最终发展为难治性癫痫^[3]。因此亟需开发新的癫痫治疗策略,以改变癫痫疾病现状。目前,高频率的深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)已被用于帕金森病、强迫症、特发性震颤以及肌张力障碍等疾病的治疗。尽管高频率的DBS表现出了较好的应用前景,但仍存在一些问题,如干预靶点定位不够精确、可能引起不良反应和不适等^[4]。因此,安全性与可控性更好的低频率电刺激(low-frequency stimulation, LFS)逐渐引起了研究者的兴趣。已有研究表明,LFS具有显著的抗癫痫作用^[5],但其抗癫痫作用的确切机制尚不清楚。细胞自噬是一个保守的依赖溶酶体的降解途径。自噬对癫痫后脑发育过程中神经元的丢失起着潜在的作用^[6]。因此,本研究旨在探究LFS对癫痫大鼠自噬水平的影响及其可能的作用机制,以期为探明LFS对癫痫的作用机制及开发新的癫痫治疗策略提供新的科学资料。

一、材料与方法

1. 实验动物:60只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)清洁级健康雄性SD大鼠购自湖南省实验动物中心,饲养于标准动物房,昼夜交替(12 h/12 h),环境温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,提供充足饮水及饲料。本研究获得湖南省脑科医院动物伦理委员会审批通过(审批号: NK.No20180930c0421020)。

2. 主要试剂:氯化锂购自上海化冉实业有限公司;东莨菪碱购自成都普瑞法科技开发有限公司;匹鲁卡品购自上海迈瑞尔化学技术有限公司;尼氏染色液购自上海碧云天生物技术有限公司;脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal- deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)染色试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;裂解caspase-3(cleaved caspase-3, c-caspase3)、Rho相关蛋白激酶1(Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1, ROCK1)和ROCK2抗体购自英国Abcam; B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X(Bcl-2-Associated X, Bax)、微管相关蛋白1A/1B轻链3B(microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, LC3B)、Beclin1和泛素结合蛋白p62(ubiquitin-binding protein p62, p62)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; Ras同源基因家族成员A(Ras homolog gene family member A, RhoA)和甘油醛-3-磷酸脱氢

酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自北京义翘神州生物技术有限公司; SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒购自宝日生物技术(北京)有限公司。

3. 动物分组及模型建立: 采用随机数字法将60只大鼠分为对照组、癫痫模型组、假刺激组和LFS治疗组, 每组各15只。参考文献[7]进行癫痫大鼠模型的建立。癫痫模型组、假刺激组和LFS治疗组大鼠腹腔注射1.5 mol/L氯化锂, 剂量127.17 mg/kg; 18 h后注射0.25 mg/ml东莨菪碱, 剂量1 mg/kg; 之后每隔30 min注射7.5 mg/ml的匹鲁卡品, 剂量10 mg/kg, 重复3次。采用Racine评分记录每只大鼠的发作级别(表1)^[8]。大鼠急性期出现IV级以上的癫痫发作且经过1周恢复后持续监测大鼠行为学表现。出现静息期癫痫发作的大鼠用Alpha-Lab 4通道信号采集及处理系统进行脑电图监测, 若出现痫样放电则为慢性癫痫大鼠模型构建成功。对照组于相同时刻注射等量生理盐水。

表1 Racine 分级标准

级别	症状
0	行为正常, 无抽搐
I	面部阵挛抽搐
II	面部阵挛抽搐+节律性点头
III	面部阵挛抽搐+节律性点头+单侧前肢阵挛
IV	面部阵挛抽搐+节律性点头+单侧前肢阵挛+后肢站立
V	面部阵挛抽搐+节律性点头+单侧前肢阵挛+后肢站立+跌倒

4. LFS对癫痫大鼠模型海马刺激: Alpha-Lab 4通道信号采集及处理系统记录大鼠脑电活动, 直到实验结束。癫痫发作30 d后用A-M SYSTEMS 2100刺激器给大鼠以持续的电刺激, 刺激参数^[7]: 脉冲双向方波, 累计时间30 min, 波宽1 ms, 强度100 μ A, 频率1 Hz, 每天固定时间刺激1次, 连续2周。假刺激组大鼠以相同时间和频率给予LFS假刺激(无电流)。

5. Morris水迷宫实验检测大鼠空间学习记忆能力: 参考文献[9], 采用Morris水迷宫试验检测大鼠空间学习记忆能力。圆形水池直径为160 cm、高50 cm、水深30 cm, 水温(24 \pm 2) $^{\circ}$ C。池内圆形平台直径12 cm, 置于水下1 cm处。将水池分为4个象限, 平台位于第3象限。选取4个进入位点, 将大鼠放入池内。记录大鼠从下水到找到平台所花费的时间[逃跑潜伏期(s)]、游泳速度(cm/s)、游泳距离(cm)和平台停留时间(s)。如大鼠在90 s内未能找到平台, 则将大鼠放置于平台10 s。在LFS治疗1周后, 按照

以上步骤训练所有大鼠, 2次/d, 持续7 d, 最后1次LFS治疗后24 h进行正式试验。

6. 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色检测大鼠海马CA1区病理组织学变化: 各组大鼠最后1次LFS刺激24 h后, 麻醉后取脑。海马CA1区组织4%多聚甲醛4 $^{\circ}$ C固定过夜, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋、切片, 片厚5 μ m。石蜡切片常规二甲苯、乙醇脱蜡至水, 苏木素染色10 min, 0.7%盐酸乙醇分化数秒, 流水洗涤后, 伊红液浸染3 min。梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。切片于光学显微镜下放大观察分析。

7. 尼氏染色检测大鼠海马CA1区神经细胞形态变化: 大鼠海马CA1区石蜡切片常规二甲苯、乙醇脱蜡至水, 1%焦油紫染色30 min, 蒸馏水清洗。95%酒精分化30 s, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明。中性树胶封片。尼氏体呈紫色, 细胞核呈淡紫色。

8. TUNEL染色检测大鼠海马神经细胞凋亡: 大鼠石蜡切片常规二甲苯、乙醇脱蜡至水。proteinase K工作液处理组织30 min, 切片经磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)漂洗后晾干。加50 μ l TUNEL反应液, 于37 $^{\circ}$ C条件下, 在暗湿盒中反应1 h。切片经PBS漂洗后, 加50 μ l converter-POD, 于37 $^{\circ}$ C条件下, 在暗湿盒中反应30 min。切片经PBS漂洗后, 加100 μ l 二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)底物反应10 min。PBS漂洗后, 用苏木素复染数秒, 随后立即用流水冲洗。梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。光学显微镜观察凋亡细胞并拍照。

9. Western blot检测大鼠海马RhoA、ROCK1、ROCK2、自噬和凋亡相关蛋白表达: 各组大鼠最后1次LFS刺激24 h后, 麻醉后取海马组织, 海马组织剪碎后加入放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液裂解, 离心取上清, 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定上清液的蛋白浓度。取30 μ g蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离, 湿转法将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。10%脱脂奶粉室温封闭3 h, Bcl-2抗体(1:2 000)、Bax抗体(1:2 000)、c-caspase3抗体(1:2 000)、LC3抗体(1:1 000)、Beclin1抗体(1:2 000)、p62抗体(1:2 000)、RhoA抗体(1:1 000)、ROCK1抗体(1:1 000)、ROCK2抗体(1:2 000)和GAPDH抗体(1:5 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗(1:5 000)室

温孵育1 h。电化学发光(electro-chemiluminescence, ECL)发光液显色,暗室曝光。

10. 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测大鼠海马 RhoA、ROCK1 和 ROCK2 mRNA 表达: 取海马组织, Trizol 法提取组织总 RNA, 随后测定各样品 RNA 浓度, RNA 逆转录合成 cDNA。RhoA、ROCK1 和 ROCK2 以 GAPDH 为内参, 按照 SYBR[®] RPremix Ex TaqTM II 试剂盒说明书进行 RT-PCR 实验, 实验所需引物序列见表 2。反应条件: 95 °C、30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、34 s, 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 RhoA、ROCK1 和 ROCK2 mRNA 表达。

表 2 逆转录聚合酶链反应所需引物序列

基因名称	引物序列
RhoA-上游引物	5' -AGAGGTGTATGTGCCACAGTGT-3'
RhoA-下游引物	5' -AGGCGATCATAATCTTCCTGCCCA-3'
ROCK1-上游引物	5' -AACATGCTGCTGGATAAATCTGG-3'
ROCK1-下游引物	5' -TGTATCACATCCTACCATGCCT-3'
ROCK2-上游引物	5' -TGGGCGAGAATGTGATTGGT-3'
ROCK2-下游引物	5' -TCCAAGTCGTACCTCCCTGT-3'
GAPDH-上游引物	5' -CAGCAATGCATCCTGCACC-3'
GAPDH-下游引物	5' -TGGACTGTGTCATGAGCCC-3'

注: RhoA Ras 同源基因家族成员 A; ROCK Rho 相关蛋白激酶; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

11. 统计学方法: 采用 SPSS 19.0 软件进行数据的统计分析, 正态分布的计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 若组间差异有统计学意义, 则采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠 Racine 评分及空间学习记忆能力的比较: 对照组、癫痫模型组、假刺激组和 LFS 治疗组 Racine 评分分别为 0、(4.23 ± 0.29)、(4.31 ± 0.37)、(2.82 ± 0.23) 分, 4 组评分差异有统计学意义 ($F =$

417.085, $P < 0.01$)。与对照组比较, 癫痫模型组大鼠出现连续性棘波, Racine 评分和逃跑潜伏期明显升高 (均 $P < 0.05$), 游泳距离和平台停留时间明显降低 (均 $P < 0.05$), 游泳速度差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与假刺激组比较, LFS 治疗组大鼠波峰明显下降, Racine 评分和逃跑潜伏期明显降低 (均 $P < 0.05$), 游泳距离和平台停留时间明显升高 (均 $P < 0.05$), 游泳速度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1, 2 (见本期封二) 和表 3。

2. 各组大鼠 CA1 区神经元的变化: 对照组大鼠海马 CA1 区神经细胞排列整齐, 无明显病理学变化, 与对照组比较, 癫痫模型组大鼠海马 CA1 区神经细胞排列紊乱, 核固缩, 神经细胞数量明显降低 ($P < 0.05$), 尼氏体数量明显降低 ($P < 0.05$); 与假刺激组比较, LFS 治疗组大鼠 CA1 区神经细胞排列趋于整齐, 细胞形态趋于正常化, 神经细胞数量和尼氏体数量明显升高 (均 $P < 0.05$)。见图 3, 4 (见本期封二) 和表 4。

3. 各组大鼠海马神经元细胞凋亡的变化: 与对照组比较, 癫痫模型组大鼠海马神经元细胞凋亡率、Bax 和 c-caspase3 蛋白表达水平明显升高 (均 $P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); 与假刺激组比较, LFS 治疗组大鼠海马神经细胞凋亡率、Bax 和 c-caspase3 蛋白表达水平明显降低 (均 $P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。见图 5 (见本期封二)、6 和表 5。

4. 各组大鼠海马自噬水平的变化: 与对照组比较, 癫痫模型组大鼠海马 LC3 II / LC3 I 和 Beclin1 蛋白表达水平明显升高 (均 $P < 0.05$), p62 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与假刺激组比较, LFS 治疗组大鼠海马 LC3 II / LC3 I 和 Beclin1 蛋白表达水平明显降低 (均 $P < 0.05$), p62 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图 7 和表 6。

5. 各组大鼠 Rho/ROCK 通路相关基因的表达: 与对照组比较, 癫痫模型组大鼠海马 RhoA、ROCK1

表 3 各组大鼠逃跑潜伏期、游泳速度、游泳距离和平台停留时间的比较 ($\bar{x} \pm s$)

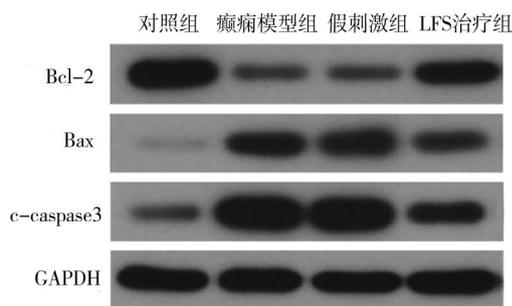
组别	只数	逃跑潜伏期(s)	游泳速度(cm/s)	游泳距离(cm)	平台停留时间(s)
对照组	12	20.39 ± 2.80	21.96 ± 1.34	346.80 ± 25.17	51.29 ± 2.12
癫痫模型组	12	49.36 ± 4.69 ^a	19.87 ± 2.14	240.68 ± 22.91 ^a	39.89 ± 2.20 ^a
假刺激组	12	48.15 ± 5.15	19.10 ± 2.11	231.99 ± 18.93	39.14 ± 3.63
LFS 治疗组	12	34.83 ± 3.85 ^b	21.82 ± 1.21	284.21 ± 22.36 ^b	46.85 ± 2.93 ^b
<i>F</i> 值		72.337	0.028	38.250	30.491
<i>P</i> 值		< 0.01	0.897	< 0.01	< 0.01

注: LFS 低频率电刺激; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与假刺激组比较, ^b $P < 0.05$

表4 各组大鼠海马CA1区神经细胞数量和尼氏体数量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本	神经细胞数量	尼氏体数量
对照组	8	73.50 ± 5.57	42.63 ± 4.55
癫痫模型组	8	17.13 ± 3.14 ^a	6.75 ± 1.09 ^a
假刺激组	8	18.63 ± 3.64	7.50 ± 2.12
LFS治疗组	8	47.00 ± 5.07 ^b	33.75 ± 2.90 ^b
F值		251.078	268.959
P值		< 0.01	< 0.01

注: LFS 低频率电刺激; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与假刺激组比较, ^b $P < 0.05$



注: LFS 低频率电刺激; Bcl-2 B淋巴细胞瘤-2; Bax Bcl-2相关X; c-caspase3 裂解 caspase-3; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图6 Western blot 检测各组大鼠凋亡相关蛋白的表达

和 ROCK2 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高(均 $P < 0.05$); 与假刺激组比较, LFS 治疗组大鼠海马 RhoA、ROCK1 和 ROCK2 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$)。见图 8 和表 7, 8。

讨 论

癫痫是一种严重的慢性神经系统疾病, 以慢性 and 自发性癫痫为特征。2017年, 癫痫被世界卫生组织列为神经系统五大难治性疾病之一^[10]。癫痫表现为不可预测和反复发作, 扰乱正常的大脑功能。癫痫患者的死亡风险比普通人群高 2 ~ 3 倍^[11]。据报道, 大多数癫痫患者存在一种或多种行为或认知共病, 包括抑郁和记忆力衰退^[12]。因此, 为改善癫痫疾病

现状, 寻找新的治疗策略迫在眉睫。

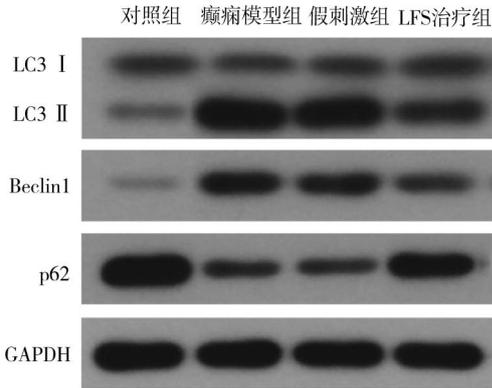
DBS 常规刺激频率是 130 ~ 185 Hz, 但是根据症状可以使用更高频率 > 185 Hz 或者使用低频 60 ~ 80 Hz。DBS 能够通过改善特定的功能环路、诱发神经元再生及神经突触的重塑等方面对神经系统进行调节^[13]。而相对较低的 DBS 强度(仅为海马最大诱发电位强度的 1.8%) 可防止健康大鼠意外惊厥的发生^[14]。LFS 可减弱癫痫大鼠海马脑片兴奋性突触和抑制性突触长时程增强(LTP) 诱导, 并使兴奋性突触、抑制性突触和基因表达的阈值强度恢复到与对照相似的水平, 在癫痫大鼠中发挥治疗作用^[15]。有研究对麻醉大鼠海马 CA1 区 Schaffer 侧支给予不同频率(10 ~ 100 Hz) 的 1 min 顺行刺激脉冲串, 结果表明, 只有在较低频率(10、20 Hz) 的刺激下, 锥体细胞的放电才会被刺激激活的中间神经细胞抑制。在较高频率(50、100 Hz) 刺激时, 中间神经细胞的抑制作用减弱^[16]。本研究结果显示, LFS 可改善大鼠癫痫症状, 降低逃跑潜伏期和海马神经细胞凋亡, 提高游泳距离、平台停留时间、神经细胞数量和尼氏体数量, 该研究结果表明, LFS 在癫痫大鼠海马神经细胞中发挥保护作用, 并可提高大鼠空间学习记忆能力。

自噬是一种自我防御的过程。在正常情况下, 自噬系统被抑制到一个基本水平。然而, 在病理条件下, 包括受损细胞器和错误折叠的蛋白质在内的细胞质成分被传递到双膜自噬体中, 然后与溶酶体融合, 诱导自噬降解^[17]。已有研究揭示了自噬与癫痫之间的联系, 自噬促进遗传性癫痫, 而癫痫反过来诱导自噬^[18]。Rho/ROCK 信号通路广泛的神经发育、神经精神病和神经退行性疾病有关, 包括智力障碍、自闭症谱系障碍、精神分裂症、抑郁症、肌萎缩侧索硬化症、帕金森病、癫痫和阿尔茨海默病^[19]。雷帕霉素是哺乳动物自噬体形成和各种信号通路调控自噬活性的关键^[20]。Rho 家族小分子鸟苷三磷酸酶(small molecule guanosine triphosphatase of Rho

表5 各组大鼠海马神经元细胞凋亡率和凋亡相关蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本	细胞凋亡率(%)	Bcl-2 蛋白表达	Bax 蛋白表达	c-caspase3 蛋白表达
对照组	8	4.63 ± 0.25	1.57 ± 0.13	0.10 ± 0.01	0.23 ± 0.01
癫痫模型组	8	27.52 ± 2.95 ^a	0.24 ± 0.02 ^a	0.82 ± 0.07 ^a	1.70 ± 0.15 ^a
假刺激组	8	28.48 ± 3.15	0.25 ± 0.02	0.78 ± 0.06	1.74 ± 0.11
LFS 治疗组	8	9.25 ± 0.91 ^b	0.87 ± 0.07 ^b	0.43 ± 0.05 ^b	0.53 ± 0.02 ^b
F 值		248.386	576.779	342.820	553.284
P 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: LFS 低频率电刺激; Bcl-2 B淋巴细胞瘤-2; Bax Bcl-2相关X; c-caspase3 裂解 caspase-3; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与假刺激组比较, ^b $P < 0.05$



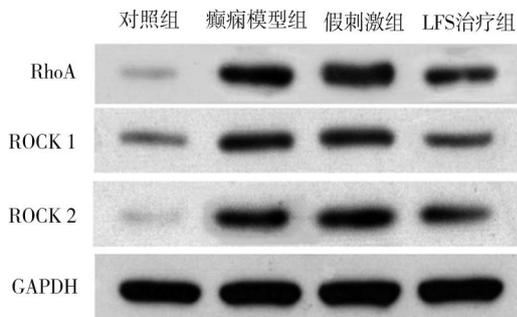
注: LFS 低频率电刺激; LC3 微管相关蛋白1A/1B轻链3B; p62 泛素结合蛋白p62; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图7 Western blot检测各组大鼠LC3 II/LC3 I、Beclin1和p62蛋白表达

表6 各组大鼠LC3 II/LC3 I、Beclin1和p62蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本	LC3 II/LC3 I	Beclin1	p62
对照组	8	0.46 ± 0.03	0.14 ± 0.02	1.44 ± 0.11
癫痫模型组	8	5.20 ± 0.42 ^a	0.73 ± 0.05 ^a	0.20 ± 0.02 ^a
假刺激组	8	5.11 ± 0.37	0.71 ± 0.04	0.22 ± 0.01
LFS治疗组	8	1.17 ± 0.11 ^b	0.36 ± 0.02 ^b	0.96 ± 0.05 ^b
F值		623.873	515.923	802.381
P值		< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: LFS 低频率电刺激; LC3 微管相关蛋白1A/1B轻链3B; p62 泛素结合蛋白p62; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与假刺激组比较, ^b $P < 0.05$



注: LFS 低频率电刺激; RhoA Ras同源基因家族成员A; ROCK Rho相关蛋白激酶; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图8 Western blot检测各组大鼠RhoA、ROCK1和ROCK2蛋白表达

family, Rho-GTPase)可通过氨基酸信号通路调节雷帕霉素复合物1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1): Rho-GTPase可以与ROCK结合,通过诱导构象改变解除C端介导的自动抑制从而暴露激酶结构域,来增强ROCK的催化活性,抑制mTORC1活性,上调自噬水平^[21]。已有研究表明,抑制ROCK的表达可导致快速老化小鼠自噬水平降低,防止突触丢失,改善认知功能^[22]。本研究结果显示,

表7 各组大鼠RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本	RhoA	ROCK1	ROCK2
对照组	8	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.08
癫痫模型组	8	2.36 ± 0.18 ^a	2.08 ± 0.16 ^a	2.66 ± 0.20 ^a
假刺激组	8	2.39 ± 0.16	2.13 ± 0.20	2.55 ± 0.10
LFS治疗组	8	1.51 ± 0.09 ^b	1.28 ± 0.09 ^b	1.67 ± 0.13 ^b
F值		204.002	130.693	275.579
P值		< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: LFS 低频率电刺激; RhoA Ras同源基因家族成员A; ROCK Rho相关蛋白激酶; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与假刺激组比较, ^b $P < 0.05$

表8 各组大鼠RhoA、ROCK1和ROCK2蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本	RhoA	ROCK1	ROCK2
对照组	8	0.12 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.10 ± 0.00
癫痫模型组	8	0.82 ± 0.05 ^a	0.69 ± 0.04 ^a	0.70 ± 0.07 ^a
假刺激组	8	0.85 ± 0.08	0.70 ± 0.07	0.71 ± 0.06
LFS治疗组	8	0.42 ± 0.03 ^b	0.33 ± 0.02 ^b	0.36 ± 0.02 ^b
F值		409.195	329.838	305.195
P值		< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: LFS 低频率电刺激; RhoA Ras同源基因家族成员A; ROCK Rho相关蛋白激酶; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与假刺激组比较, ^b $P < 0.05$

癫痫大鼠海马中LC3 II/LC3 I和Beclin1表达水平升高,而p62表达水平降低,而LFS治疗后可下调癫痫大鼠海马中LC3 II/LC3 I和Beclin1表达水平,上调p62表达水平。进一步实验结果显示,癫痫大鼠海马RhoA、ROCK1和ROCK2表达水平上调,而LFS治疗后可下调RhoA、ROCK1和ROCK2表达水平。该研究结果表明,LFS可能通过抑制Rho/ROCK通路从而抑制癫痫大鼠海马自噬。

综上所述,本研究结果表明,LFS可抑制癫痫大鼠海马自噬,改善大鼠癫痫症状,该作用可能是通过抑制Rho/ROCK信号通路的激活实现的。该结果为明确LFS在癫痫中的作用机制及开发癫痫新的治疗策略提供了理论依据。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计、论文撰写、获取资助为卢军; 研究实施、资料收集为卢军、刘坤、匡卫平、邓兰秋子、李振光; 数据搜集、数据整理、数据分析为王琴、曾其昌; 数据解释为黄亚辉、朱勇、彭琼

参 考 文 献

[1] Yuen AWC, Keezer MR, Sander JW. Epilepsy is a neurological and a systemic disorder[J]. Epilepsy Behav, 2018, 78(2): 57-61. DOI: 10.1016/j.yebeh.2017.10.010.

- [2] Lhatoo SD, Bernasconi N, Blumcke I, et al. Big data in epilepsy: clinical and research considerations. Report from the Epilepsy Big Data Task Force of the International League Against Epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2020, 36(2): 273-281. DOI: 10.1111/epi.16633.
- [3] Pitkänen A, Henshall DC, Cross JH, et al. Advancing research toward faster diagnosis, better treatment, and end of stigma in epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2019, 60(1): 1281-1292. DOI: 10.1111/epi.16091.
- [4] Dougherty DD. Deep brain stimulation: clinical applications[J]. *Psychiatr Clin North Am*, 2018, 41(5): 385-394. DOI: 10.1016/j.psc.2018.04.004.
- [5] Wang Y, Liang J, Xu CL, et al. Low-frequency stimulation in anterior nucleus of thalamus alleviates kainate-induced chronic epilepsy and modulates the hippocampal EEG rhythm[J]. *Exp Neurol*, 2016, 276(3): 22-30. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.11.014.
- [6] Li QR, Han Y, Du JB, et al. Alterations of apoptosis and autophagy in developing brain of rats with epilepsy: changes in LC3, P62, Beclin-1 and Bcl-2 levels[J]. *Neurosci Res*, 2018, 130(1): 47-55. DOI: 10.1016/j.neures.2017.08.004.
- [7] 高晨, 白洁, 雷鹏, 等. 低氧预处理对氯化锂-匹鲁卡品致痫大鼠的保护作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(1): 111-115. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2018.01.037.
Gao C, Bai J, Lei P, et al. The protective effect of hypoxia preconditioning on epilepsy induced by lithium-pilocarpine in rats[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2018, 35(1): 111-115.
- [8] 金绍静, 马巍, 张淑红, 等. miR34 a在戊四氮致癫痫大鼠中通过下调Bcl-2导致神经元凋亡[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2018, 35(7): 617-621. DOI: 10.19845/j.cnki.zfysjbjzz.2018.07.009.
Jin SJ, Ma W, Zhang SH, et al. MiR34a induces neuronal apoptosis by downregulating Bcl-2 in rats with epilepsy induced by PTZ[J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2018, 35(7): 617-621.
- [9] 杨征, 王峰, 孙涛, 等. Pur α 蛋白对锂-匹罗卡品致癫痫大鼠海马神经元凋亡及学习记忆的影响[J]. *中华神经外科杂志*, 2017, 33(4): 403-407. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2017.04.020.
Yang Z, Wang F, Sun T, et al. The effect of Puro α on hippocampal neuronal apoptosis and learning and memory in the rat epilepsy model induced by lithium-pilocarpine[J]. *Chinese Journal of Neurosurgery*, 2017, 33(4): 403-407.
- [10] GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(7): 459-480. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30499-X.
- [11] Manford M. Recent advances in epilepsy[J]. *J Neurol*, 2017, 264(8): 1811-1824. DOI: 10.1007/s00415-017-8394-2.
- [12] Beghi E. Social functions and socioeconomic vulnerability in epilepsy[J]. *Epilepsy Behav*, 2019, 100(5): 106-113. DOI: 10.1016/j.yebeh.2019.05.051.
- [13] Lee DJ, Lozano CS, Dallapiazza RF, et al. Current and future directions of deep brain stimulation for neurological and psychiatric disorders[J]. *J Neurosurg*, 2019, 131(3): 333-342. DOI: 10.3171/2019.4.JNS181761.
- [14] Sprengers M, Raedt R, Larsen LE, et al. Deep brain stimulation reduces evoked potentials with a dual time course in freely moving rats: Potential neurophysiological basis for intermittent as an alternative to continuous stimulation[J]. *Epilepsia*, 2020, 61(4): 903-913. DOI: 10.1111/epi.16498.
- [15] Ghafouri S, Fathollahi Y, Semnanian S, et al. Deep brain stimulation restores the glutamatergic and GABAergic synaptic transmission and plasticity to normal levels in kindled rats[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): 224-234. DOI: 10.1371/journal.pone.0224834.
- [16] Qiu C, Feng ZY, Zheng LP, et al. Frequency-dependent inhibition induced by stimulations in rat hippocampus[J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2018, 2018(6): 2182-2185. DOI: 10.1109/EMBC.2018.8512613.
- [17] Yu L, Chen Y, Toozee SA. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 207-215. DOI: 10.1080/15548627.2017.1378838.
- [18] Limanaqi F, Biagioni F, Busceti CL, et al. mTOR-related cell-clearing systems in epileptic seizures, an update[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 361-372. DOI: 10.3390/ijms21051642.
- [19] Mulherkar S, Toliai KF. RhoA-ROCK signaling as a therapeutic target in traumatic brain injury[J]. *Cell*, 2020, 9(3): 57-66. DOI: 10.3390/cells9010245.
- [20] Switon K, Kotulska K, Januszkaminska A, et al. Molecular neurobiology of mTOR[J]. *Neuroscience*, 2017, 13(2): 112-153. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.017.
- [21] Kataura T, Tashiro E, Nishikawa S, et al. A chemical genomics-aggrephagy integrated method studying functional analysis of autophagy inducers[J]. *Autophagy*, 2020, 35(2): 1-17. DOI: 10.1080/15548627.2020.1794590.
- [22] Chen YB, Wei G, Nie H, et al. β -Asarone prevents autophagy and synaptic loss by reducing ROCK expression in asenescence-accelerated prone 8 mice[J]. *Brain Res*, 2014, 1552(5): 41-54. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.01.005.

(收稿日期: 2020-08-31)

(本文编辑: 赵金鑫)