

PNU-282987对颞叶癫痫模型大鼠认知功能的影响及机制[△]

李永格^{1*},周舒^{1,2},刘庆春¹,未小明¹,张冬¹,马凤巧¹(1.南阳医学高等专科学校基础医学部,河南南阳473000;2.昆明医科大学生物医学工程研究中心,昆明650000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)19-2350-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.19.09



摘要 目的 研究特异性 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nAChR)激动剂PNU-282987对颞叶癫痫(TLE)模型大鼠认知功能的影响及机制。方法 将60只大鼠随机分为对照组、模型组、PNU-282987组(3 mg/kg)和甲基牛扁亭(MLA)+PNU-282987组(6 mg/kg MLA+3 mg/kg PNU-282987),每组15只。除对照组之外,其余各组大鼠均制备TLE模型。造模成功后,各组大鼠腹腔注射相应药物或生理盐水,每天1次,连续2周。观察大鼠癫痫发作行为并进行评分,记录发作持续时间;检测大鼠认知功能;观察海马组织CA1区神经元病理学形态;检测海马组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)和IL-1 β 水平;检测海马组织中离子钙接头蛋白1(IBA-1)阳性表达和 $\alpha 7$ nAChR、核因子 κ B(NF- κ B)p65、磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)蛋白表达水平。结果 与模型组比较,PNU-282987组大鼠癫痫评分和发作持续时间,海马组织中IBA-1阳性细胞数量和TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平以及NF- κ B p65、p-NF- κ B p65蛋白表达水平均显著减少/降低($P < 0.05$);逃避潜伏期时间显著缩短($P < 0.05$),原平台象限停留时间及穿越平台次数均显著增加($P < 0.05$);海马组织CA1区神经元损伤明显减轻;海马组织中 $\alpha 7$ nAChR蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。与PNU-282987组比较,MLA+PNU-282987组大鼠上述指标均显著逆转($P < 0.05$)。结论 PNU-282987可改善TLE模型大鼠的认知功能障碍,其机制可能是通过激活 $\alpha 7$ nAChR/NF- κ B信号通路,抑制小胶质细胞介导的炎症反应,进而减轻海马神经元损伤。

关键词 PNU-282987;癫痫; $\alpha 7$ nAChR/NF- κ B信号通路;小胶质细胞;炎症反应

Effect and mechanism of PNU-282987 on cognitive function of temporal lobe epilepsy model rats

LI Yongge¹, ZHOU Shu^{1,2}, LIU Qingchun¹, WEI Xiaoming¹, ZHANG Dong¹, MA Fengqiao¹ (1. Dept. of Basic Medicine, Nanyang Medical College, Henan Nanyang 473000, China; 2. Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming 650000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effect and mechanism of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) agonists PNU-282987 on cognitive function in temporal lobe epilepsy (TLE) model rats. **METHODS** Sixty rats were randomly divided into control group, model group, PNU-282987 group (3 mg/kg) and methyllycaconitine (MLA)+PNU-282987 group (6 mg/kg MLA+3 mg/kg PNU-282987), with 15 rats in each group. Except for control group, the TLE model was established in the other groups. After the model was successfully established, each group was given relevant medicine or normal saline intraperitoneally, once a day, for two consecutive weeks. The epilepsy attack of rats was observed and scored, and the duration of seizures was recorded; the cognitive function of rats was detected; pathological morphology of neurons in CA1 region was observed; the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β in the hippocampus were detected; the positive expressions of ionized calcium-binding adapter molecule-1 (IBA-1), $\alpha 7$ nAChR, nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65, p-NF- κ B p65 in the hippocampus were detected. **RESULTS** Compared with model group, the score and duration of seizures, the number of IBA-1 positive cells, the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β , the expressions of NF- κ B p65 and p-NF- κ B p65 protein decreased significantly in the hippocampus ($P < 0.05$); the escape latency time was shortened significantly ($P < 0.05$), the time spent in the original platform quadrant and times of crossing the platform increased significantly ($P < 0.05$); neuronal damage in the CA1 region of the hippocampus was significantly reduced; the expression of $\alpha 7$ nAChR protein increased significantly in hippocampus ($P < 0.05$). Compared with PNU-282987 group, the above indexes of rats in MLA+PNU-282987 group were reversed significantly ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** PNU-282987 could improve cognitive dysfunction in TLE model rats, and its mechanism may be associated with inhibiting microglia-mediated inflammatory response through $\alpha 7$ nAChR/NF- κ B signaling pathway, thus reducing hippocampal neuronal damage.

KEYWORDS PNU-282987; epilepsy; $\alpha 7$ nAChR/NF- κ B signaling pathway; microglia; inflammatory response

[△]基金项目 河南省科技发展计划项目(No.212102310837);河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(No.2018GGJS253);南阳科技计划项目(No.JCQY026)

* 第一作者 副教授,硕士。研究方向:癫痫发生机制与治疗。
E-mail:liyongge19810719@aliyun.com

癫痫是由脑神经元突发异常放电导致神经系统功能障碍的常见慢性脑部疾病。癫痫患者中有约30%~40%会发展成为药物难治性癫痫,临床上以颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy, TLE)最为常见^[1]。TLE易反复

发作,可引起海马神经元大量凋亡坏死,常伴随认知功能障碍,主要表现为患者学习记忆能力降低,严重威胁其身心健康^[2]。研究发现,神经炎症与癫痫的发生、发展以及认知功能障碍密切相关^[3]。小胶质细胞作为神经系统内参与调节神经炎症的关键免疫细胞,其过度激活会导致炎症因子的大量产生,引起中枢神经元损伤,是导致TLE的病理因素之一^[4]。因此,抑制小胶质细胞活化,减轻神经炎症导致的神经元损伤,可能成为TLE的治疗新策略。

胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway, CAP)可通过刺激迷走神经释放乙酰胆碱(acetylcholine, ACh),并与巨噬细胞等免疫细胞上的 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7$ nAChR)相结合来减轻机体炎症反应,是体内重要的神经免疫调节通路;其中, $\alpha 7$ nAChR是CAP的核心信号受体,除分布在外周组织器官外,海马小胶质细胞上也有大量分布^[5],激活 $\alpha 7$ nAChR能够抑制小胶质细胞的活化^[6]。核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是细胞内的信号分子, $\alpha 7$ nAChR被激活后,能够抑制NF- κ B的磷酸化和核迁移,降低促炎因子的表达^[7]。由此可知, $\alpha 7$ nAChR/NF- κ B信号通路具有调节小胶质细胞活化、抑制中枢炎症反应的作用。PNU-282987(分子式为 $C_{14}H_{17}ClN_2O$)是一种固态的、晶体状的高选择性 $\alpha 7$ nAChR激动剂,可作用于 $\alpha 7$ nAChR/NF- κ B信号通路,减轻阿尔茨海默病^[8]、脓毒症脑病^[9]等疾病的中枢炎症反应,保护神经元^[10],但其能否在TLE中发挥作用还未见相关报道。基于此,本研究首先建立TLE模型大鼠,考察PNU-282987对模型大鼠认知功能的影响,并基于 $\alpha 7$ nAChR/NF- κ B信号通路初探其作用机制,以期为TLE的治疗提供新思路与新靶点。

1 材料

1.1 实验动物

本研究所用动物为SPF级SD雄性大鼠,共60只,体重290~310 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0008。所有大鼠均于昼夜节律自然变化、室温23~25℃、相对湿度50%~60%的环境下饲养,自由摄食、饮水。本实验获得南阳医学高等专科学校伦理委员会批准,批准号为南阳医专动伦[2022]第005号。

1.2 主要药品与试剂

PNU-282987(批号M06398,纯度99.37%)购自北京百奥莱博科技有限公司;甲基牛扁亭(methyllycaconitine, MLA)($\alpha 7$ nAChR阻断剂,批号M-168,纯度99.03%)购自美国Sigma公司;氯化锂(批号L511)购自湖北威德利化学试剂有限公司;东莨菪碱(批号H32022184)购自徐州莱恩药业有限公司;毛果芸香碱(批号YJ102834)购自上海一基实业有限公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)和

IL-1 β 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为ml102828、ml002859、ml037373)购自上海酶联生物科技有限公司;RIPA蛋白裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、ECL显影液(批号分别为89900、NCI3225、32209)购自英潍捷基(上海)贸易有限公司;兔源 $\alpha 7$ nAChR多克隆抗体、小鼠源离子钙接头蛋白1(ionized calcium-binding adapter molecule-1, IBA-1)单克隆抗体(批号分别为ab10096、ab283319)购自英国Abcam公司;兔源NF- κ B p65多克隆抗体、兔源磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)多克隆抗体(批号分别为8242、3033)购自美国Cell Signaling公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(批号BA1055)购自武汉博士德生物工程有限公司;Alexa Fluor 594标记的羊抗小鼠IgG二抗(批号115-585-146)购自美国Jackson公司;尼氏染色试剂盒(批号C0117)购自上海碧云天生物技术有限公司等。

1.3 主要仪器

Morris水迷宫购自成都泰盟仪器有限公司;RT-6100型酶标仪购自美国Rayto公司;164-5070型蛋白电泳仪、Chemi XRS⁺型凝胶成像系统购自美国BioRad公司;EMUC7FC7型冷冻超薄切片机购自德国Leica公司;Axio Observe A1型倒置相差荧光显微镜购自德国Zeiss公司等。

2 方法

2.1 分组、给药与造模

大鼠适应性饲养2周后开始实验。将大鼠随机分为对照组、模型组、PNU-282987组和MLA+PNU-282987组,每组15只。除对照组外,其余各组大鼠均复制TLE模型,具体参考文献[11]方法:先腹腔注射氯化锂(127 mg/kg)24 h后,再腹腔注射东莨菪碱(1 mg/kg)以阻断腹腔注射毛果芸香碱的外周胆碱能效应;注射东莨菪碱30 min后,腹腔注射毛果芸香碱(35 mg/kg)。观察大鼠癫痫发作情况,按照Racine标准判断癫痫发作程度,当其发生癫痫的级别超过IV级,持续时间超过1 h时,表明造模成功。随即给药,其中,PNU-282987组大鼠腹腔注射3 mg/kg PNU-282987^[10](临用时以生理盐水溶解);MLA+PNU-282987组大鼠先腹腔注射6 mg/kg MLA(剂量根据前期预实验结果设置,临用时以生理盐水溶解)阻断 $\alpha 7$ nAChR,30 min后再腹腔注射3 mg/kg PNU-282987;对照组与模型组大鼠腹腔注射等量生理盐水。腹腔注射时间统一在每天上午9:00,每天1次,连续2周。

2.2 大鼠癫痫发作行为观察

连续给药2周后,观察大鼠癫痫发作行为并根据Racine标准对其进行评分,记录大鼠癫痫发作持续时间。

2.3 大鼠认知功能检测

末次给药后的第2天,采用Morris水迷宫实验检测各组大鼠认知水平,整个测试时间为6 d,每天测试2次。其中,第1~5天为定位航行实验:将大鼠分别从4个不同象限面向池壁放入水中,记录其在60 s内从入水到找

到逃生平台所需要的时间,即逃避潜伏期;若在60 s内没有找到平台,逃避潜伏期时间记为60 s。将大鼠放在逃生平台上停留20 s,增加大鼠对逃生平台的记忆力,然后进行下一象限测试。实验第6天进行空间探索实验:将逃生平台撤掉,将大鼠从逃生平台所在对面对象限放入水池,自由游泳60 s,记录大鼠在平台象限停留的时间以及穿越平台的次数。

2.4 大鼠海马组织CA1区神经元病理学形态观察

采用Nissl染色法进行观察。Morris水迷宫实验结束后,每组随机选择5只大鼠麻醉并采用左心室灌注,断头取全脑,于4%多聚甲醛溶液中固定12 h;经脱水、包埋、切片后,取部分切片(剩余部分进行IBA-1阳性表达的检测)进行Nissl染色;以95%乙醇脱水,二甲苯透明5 min,封片;采用光学显微镜观察大鼠海马组织CA1区神经元的病理学形态。

2.5 大鼠海马组织中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平的检测

采用ELISA法进行检测。每组随机选择5只大鼠立即断头处死,快速取脑组织并分离两侧海马,用冰生理盐水冲洗表面,称取海马组织质量;用剪刀将海马组织剪碎,加入RIPA裂解液,并使用超声研磨机磨碎,以15 000 r/min离心15 min,吸取上清液。严格参照ELISA试剂盒说明书方法检测大鼠海马组织中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平。

2.6 大鼠海马组织中IBA-1阳性表达细胞的检测

采用免疫荧光染色法进行检测。选取“2.4”项下的冰冻切片,室温下放置30 min,以PBS缓冲液洗3遍(每次5 min),滴加封闭液(5%BSA+0.3%TritonX-100),在37 °C恒温培养箱中孵育1 h;甩去多余封闭液,滴加IBA-1一抗(稀释度为1:500),于4 °C孵育过夜;以PBS洗涤3次(每次5 min)并吸干液体,滴加Alexa Fluor 594标记的二抗(稀释度为1:200),室温下孵育1 h;以PBS避光冲洗3次(每次5 min),滴加DAPI复染细胞核后室温下避光孵育10 min,冲洗后用抗荧光淬灭剂封片;采用倒置相差荧光显微镜观察并采集图像,通过图像分析软件计数每平方毫米中的IBA-1阳性细胞数量。

2.7 大鼠海马组织中 α 7nAChR/NF- κ B信号通路相关蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。每组随机选择5只大鼠,按“2.5”项下方法收集大鼠海马组织的上清液,按BCA法计算上清液中的蛋白浓度;在等量目标蛋白中加入缓冲液,煮沸,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,加入封闭液在4 °C下封闭过夜;加入 α 7nAChR、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65一抗(稀释度分别为1:500、1:1 000、1:500),于4 °C下孵育过夜;以TBST缓冲液洗膜,加入二抗(稀释度为1:5 000),常温下孵育50 min;以TBST缓冲液洗膜,ECL发光液显影,成像,使用Quantity One软件对目的蛋白的灰度值进行分析,并计算目的蛋白灰度值与内参蛋白(GAPDH)灰度值的比值,以表示目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 PNU-282987对TLE模型大鼠癫痫发作行为的影响

对照组大鼠无癫痫发作。与对照组比较,模型组大鼠癫痫评分及发作持续时间均显著增加($P<0.05$);与模型组比较,PNU-282987组大鼠上述指标均显著减少($P<0.05$);与PNU-282987组比较,MLA+PNU-282987组大鼠上述指标均显著增加($P<0.05$),且与模型组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠癫痫发作行为和空间探索实验结果($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	癫痫评分/分	癫痫发作持续时间/s	原平台象限停留时间/s	穿过平台次数/次
对照组	0	0	48.76 \pm 5.14	7.26 \pm 0.74
模型组	4.25 \pm 0.48 ^a	146.38 \pm 17.36 ^a	25.19 \pm 3.12 ^a	1.96 \pm 0.13 ^a
PNU-282987组	1.37 \pm 0.23 ^b	80.19 \pm 10.12 ^b	37.23 \pm 3.36 ^b	5.21 \pm 0.48 ^b
MLA+PNU-282987组	4.02 \pm 0.41 ^c	140.25 \pm 15.23 ^c	29.33 \pm 2.82 ^c	2.26 \pm 0.32 ^c

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与PNU-282987组比较, $P<0.05$ 。

3.2 PNU-282987对TLE模型大鼠认知功能的影响

与对照组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.05$),原平台象限停留时间及穿越平台次数均显著减少($P<0.05$);与模型组比较,PNU-282987组大鼠逃避潜伏期时间显著缩短($P<0.05$),原平台象限停留时间及穿越平台次数均显著增加($P<0.05$);与PNU-282987组比较,MLA+PNU-282987组大鼠逃避潜伏期时间显著延长($P<0.05$),原平台象限停留时间及穿越平台次数均显著减少($P<0.05$),且与模型组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表1、表2。

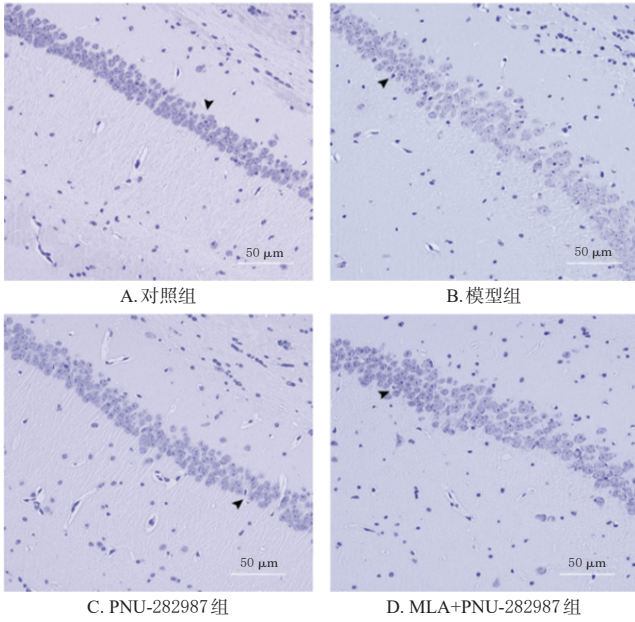
表2 各组大鼠逃避潜伏期的检测结果($\bar{x} \pm s, n=15, s$)

组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
对照组	40.97 \pm 4.37	35.74 \pm 3.84	30.64 \pm 2.75	21.68 \pm 3.11	15.26 \pm 1.62
模型组	59.38 \pm 6.14 ^a	52.03 \pm 6.68 ^a	45.16 \pm 8.39 ^a	36.09 \pm 6.57 ^a	30.64 \pm 4.43 ^a
PNU-282987组	50.28 \pm 4.89 ^b	42.30 \pm 4.17 ^b	36.13 \pm 3.29 ^b	27.42 \pm 2.35 ^b	20.22 \pm 2.71 ^b
MLA+PNU-282987组	57.29 \pm 5.36 ^c	51.68 \pm 5.01 ^c	40.81 \pm 4.27 ^c	33.28 \pm 3.16 ^c	28.15 \pm 2.54 ^c

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与PNU-282987组比较, $P<0.05$ 。

3.3 PNU-282987对TLE模型大鼠海马组织CA1区神经元病理学形态的影响

对照组大鼠海马组织细胞质中尼氏小体丰富且神经元排列整齐,形态完整。模型组大鼠海马组织细胞质中尼氏小体明显减少且神经元排列紊乱,部分细胞水肿,呈现空泡变性坏死,细胞结构不完整。经PNU-282987处理后,大鼠海马组织细胞质中尼氏小体明显增多,神经元排列致密,空泡变性坏死减少,损伤程度明显减轻。经MLA阻断 α 7nAChR后,PNU-282987对癫痫大鼠海马神经元的保护作用被逆转。结果见图1。



注:箭头所指为尼氏小体。

图1 各组大鼠海马组织CA1区神经元的Nissl染色图

3.4 PNU-282987对TLE模型大鼠海马组织中炎症因子水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠海马组织中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,PNU-282987组大鼠海马组织中上述指标水平均显著降低($P < 0.05$);与PNU-282987组比较,MLA+PNU-282987

组上述指标水平均显著升高($P < 0.05$),且与模型组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表3。

表3 各组大鼠海马组织中炎症因子水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5, \text{pg/mL}$)

组别	TNF- α	IL-6	IL-1 β
对照组	48.26 \pm 5.14	40.13 \pm 4.21	30.08 \pm 2.76
模型组	115.16 \pm 10.53 ^a	84.35 \pm 7.99 ^a	108.56 \pm 9.16 ^a
PNU-282987组	79.58 \pm 6.89 ^b	68.71 \pm 6.75 ^b	61.74 \pm 5.48 ^b
MLA+PNU-282987组	110.25 \pm 10.53 ^c	80.11 \pm 7.84 ^c	107.65 \pm 9.39 ^c

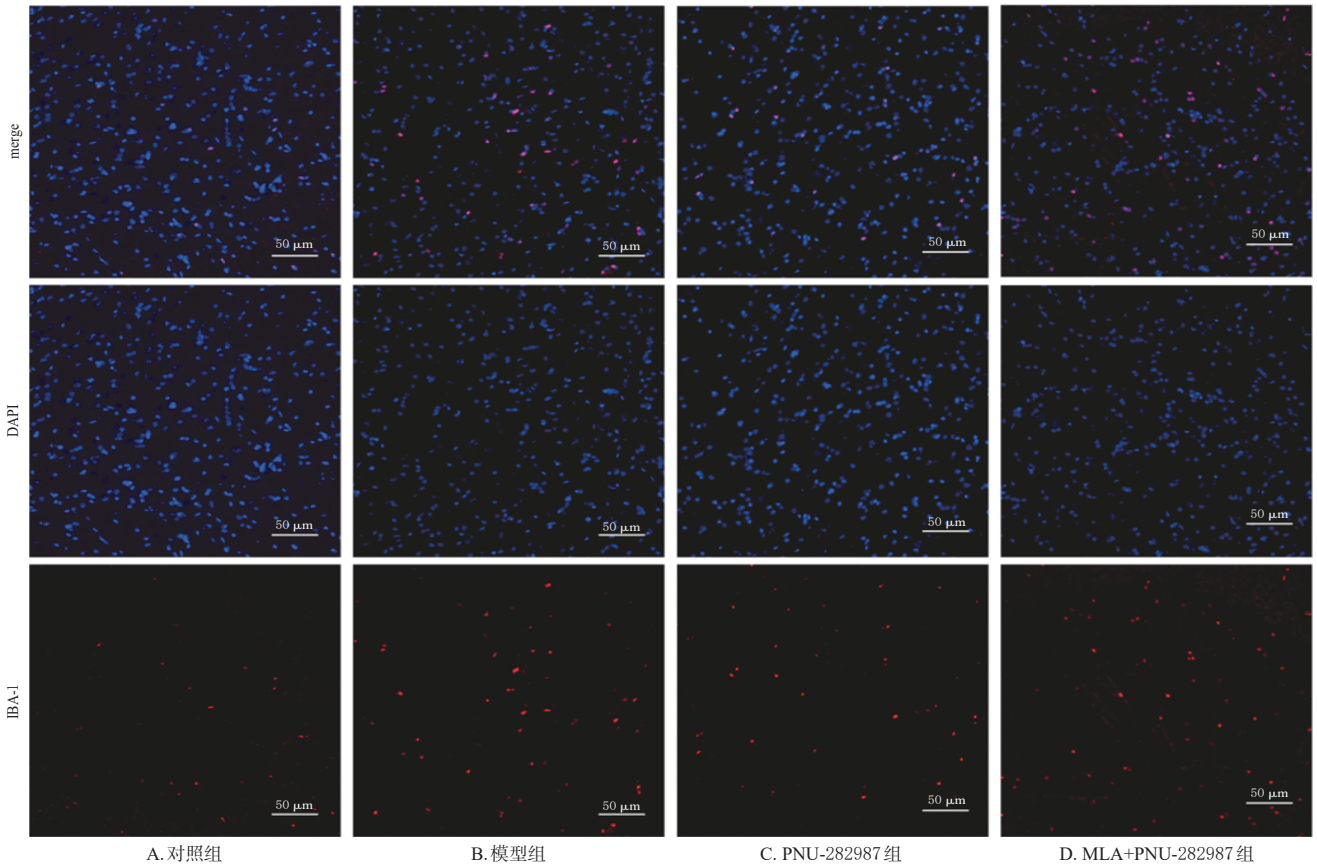
a:与对照组比较, $P < 0.05$;b:与模型组比较, $P < 0.05$;c:与PNU-282987组比较, $P < 0.05$ 。

3.5 PNU-282987对TLE模型大鼠海马组织中IBA-1阳性表达细胞的影响

与对照组[(10.36 \pm 2.97)个/ mm^2]比较,模型组大鼠海马组织中IBA-1阳性细胞数量[(56.89 \pm 8.32)个/ mm^2]显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,PNU-282987组大鼠海马组织中IBA-1阳性细胞数量[(23.18 \pm 1.97)个/ mm^2]显著降低($P < 0.05$);与PNU-282987组比较,MLA+PNU-282987组大鼠海马组织中IBA-1阳性细胞数量[(52.12 \pm 7.14)个/ mm^2]显著增加($P < 0.05$),且与模型组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图2。

3.6 PNU-282987对TLE模型大鼠海马组织中 $\alpha 7\text{nAChR}$ /NF- κB 信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠海马组织中 $\alpha 7\text{nAChR}$ 表达水平显著降低,NF- κB p65、p-NF- κB p65表达水平



注:红色荧光表示IBA-1;蓝色荧光表示DAPI;merge表示IBA-1+DAPI;标尺为50 μm 。

图2 各组大鼠海马组织中IBA-1阳性表达细胞的荧光图

显著升高($P<0.05$);与模型组比较,PNU-282987组大鼠海马组织中上述指标表达水平均显著逆转($P<0.05$);与PNU-282987组比较,MLA+PNU-282987组大鼠海马组织中上述指标表达水平均显著逆转($P<0.05$),且与模型组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见图3、图4。

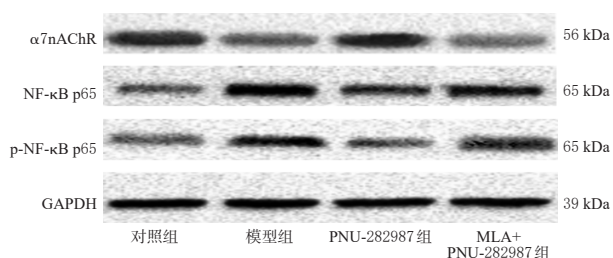


图3 各组大鼠海马组织中 $\alpha 7nAChR/NF-\kappa B$ 信号通路相关蛋白表达的电泳图

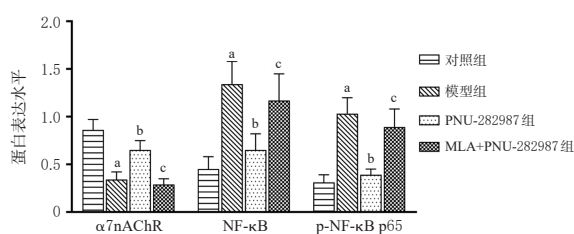


图4 各组大鼠海马组织中 $\alpha 7nAChR/NF-\kappa B$ 信号通路相关蛋白表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

4 讨论

TLE为成年人中发病率最高的一种癫痫,占难治性癫痫的一半以上^[12]。TLE患者通常伴有严重的认知功能障碍,临床上首选抗癫痫药物治疗^[13]。但传统药物只能控制癫痫发作症状,且伴有严重的副作用,因此,积极开发治疗新药非常重要。神经炎症反应可能与癫痫的发病机制之间存在复杂的网络关系^[4],寻找靶向神经炎症通路的药物可为癫痫的治疗提供新方法。

小胶质细胞作为神经系统的主要免疫效应细胞,其介导的神经炎症反应在癫痫的发展中起关键作用^[14]。有文献指出,继发性癫痫患者中活化小胶质细胞数量明显增加^[15],并且癫痫发作持续时间以及频率与小胶质细胞的活化程度明显相关^[16]。活化的小胶质细胞有M1和M2两种表型,其中M1型小胶质细胞主要分泌TNF- α 、IL-6等促炎因子,促进神经炎症反应,加重神经损伤;M2型小胶质细胞主要分泌IL-10、转化生长因子 β 等抗炎因子,抑制神经炎症反应,发挥神经保护作用^[17]。 $\alpha 7nAChR$ 为烟碱受体中的一种亚型,是由5个 $\alpha 7$ 亚基构成的同源多聚体,在海马小胶质细胞上有大量分布^[6]。活化的 $\alpha 7nAChR$ 可减轻小胶质细胞在脑组织中引起的炎症反应及神经损伤^[18],因此,本研究以特异性 $\alpha 7nAChR$ 激动剂PNU-282987干预TLE模型大鼠,并通过观察大鼠癫痫发作以及Morris水迷宫实验对PNU-282987的药效进

行评价。结果显示,PNU-282987可抑制模型大鼠癫痫发作并改善其学习记忆水平,但该作用能够被MLA所逆转,说明PNU-282987发挥作用的机制与 $\alpha 7nAChR$ 有关。

海马是研究癫痫伴随学习记忆障碍最合适的脑区^[19]。一方面,海马与癫痫的发生、发展紧密联系,尤其是CA1区、CA3区是癫痫研究的常见区域^[20]。另一方面,海马又是大脑中负责长期学习记忆能力、空间定位等认知功能的区域^[21]。反复的癫痫发作会导致海马受损,降低海马信息处理的突触可塑性,引起长期记忆功能障碍^[22]。本研究结果显示,以PNU-282987干预后,大鼠海马神经元损伤程度明显减轻,这说明PNU-282987对TLE模型大鼠海马神经元具有保护作用。为进一步分析PNU-282987是否通过逆转小胶质细胞激活来减轻中枢炎症反应,本研究还检测了小胶质细胞标志蛋白IBA-1(其表达量直接反映小胶质细胞的活化程度^[23])以及炎症因子的表达。结果显示,经PNU-282987干预后,TLE模型大鼠海马组织中IBA1、TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的表达均降低,并且该作用被MLA逆转,这说明PNU-282987可通过激活 $\alpha 7nAChR$,抑制小胶质细胞激活,进而减轻TLE模型大鼠海马组织内的炎症反应。

$\alpha 7nAChR$ 活化后的抗炎作用与NF- κB 密切相关,NF- κB 作为一种细胞内广泛表达的转录调节因子,其激活是炎症反应复杂细胞因子网络中的关键环节^[24]。Lei等^[25]研究发现 $\alpha 7nAChR$ 介导的CAP分子机制主要归因于NF- κB 转录。因此,CAP将通过 $\alpha 7nAChR$ 介导细胞内信号通路抑制NF- κB 核移位,减少细胞因子的表达,达到抗炎作用^[26]。本研究结果显示,以PNU-282987干预后,模型大鼠海马组织中 $\alpha 7nAChR$ 表达升高,NF- κB 表达降低,且该作用可被MLA逆转,这说明PNU-282987可通过激活海马组织中小胶质细胞上的 $\alpha 7nAChR$,下调NF- κB 表达。

综上所述,PNU-282987可改善TLE模型大鼠的认知功能障碍,其机制可能是通过激活 $\alpha 7nAChR/NF-\kappa B$ 信号通路,抑制小胶质细胞介导的炎症反应,进而减轻海马神经元损伤。

参考文献

- [1] SCHMIDT D, LÖSCHER W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms[J]. *Epilepsia*, 2005, 46(6): 858-877.
- [2] ABRAHAMS S, MORRIS R G, POLKEY C E, et al. Hippocampal involvement in spatial and working memory: a structural MRI analysis of patients with unilateral mesial temporal lobe sclerosis[J]. *Brain Cogn*, 1999, 41(1): 39-65.
- [3] 张菲菲. 癫痫发作与炎症反应的关系及对大鼠认知功能的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2017.
ZHANG F F. The relationship between epileptic seizures and inflammatory reaction and its influence on cognitive function in rats[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2017.
- [4] 杨峰彪, 张祎年. 小胶质细胞在癫痫中作用的研究进展

- [J]. 中国临床神经外科杂志, 2021, 26(9): 729-731.
 YANG F B, ZHANG Y N. Research progress on the role of microglia in epilepsy[J]. Chin J Clin Neurosurg, 2021, 26(9): 729-731.
- [5] KALKMAN H O, FEUERBACH D. Modulatory effects of $\alpha 7$ nAChRs on the immune system and its relevance for CNS disorders[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(13): 2511-2530.
- [6] 蒋永莹, 李霖, 沈卫星, 等. 乙酰胆碱通过作用于 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体抑制大鼠小胶质细胞炎症反应[J]. 生理学报, 2018, 70(1): 33-39.
 JIANG Y Y, LI L, SHEN W X, et al. Acetylcholine suppresses microglial inflammatory response in rats via acting on microglial $\alpha 7$ nAChR[J]. Acta Physiol Sin, 2018, 70(1): 33-39.
- [7] HAN Z Y, SHEN F X, HE Y, et al. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor reduces ischemic stroke injury through reduction of pro-inflammatory macrophages and oxidative stress[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105711.
- [8] WANG X L, DENG Y X, GAO Y M, et al. Activation of $\alpha 7$ nAChR by PNU-282987 improves synaptic and cognitive functions through restoring the expression of synaptic-associated proteins and the CaM-CaMK II -CREB signaling pathway[J]. Aging, 2020, 12(1): 543-570.
- [9] 薛萍. $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱能受体通过 JAK2/STAT3 通路激活脑内抗炎性小胶质细胞对脓毒症脑病大鼠的脑保护作用及机制研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2021.
 XUE P. Effect of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholinergic receptor on polarization anti-inflammatory microglia via JAK2/STAT3 pathway in septic encephalopathy rats and its mechanism[D]. Qingdao: Qingdao University, 2021.
- [10] AMARAL C L D, MARTINS Í C A, VERAS A C C, et al. Activation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor prevents against microglial-induced inflammation and insulin resistance in hypothalamic neuronal cells[J]. Cells, 2022, 11(14): 2195.
- [11] 王芳, 侯自立, 韩冰, 等. 桑椹花青素-3-葡萄糖苷对癫痫模型小鼠的保护作用及海马 BDNF/TrkB 通路的影响[J]. 中国药房, 2020, 31(3): 335-339.
 WANG F, HOU Z L, HAN B, et al. Study on protection effect of mulberry anthocyanin-3 glucoside on epilepsy model mice and the effect of hippocampal BDNF/TrkB pathway[J]. China Pharm, 2020, 31(3): 335-339.
- [12] OLBRICH A, URAK L, GRÖPPEL G, et al. Semiology of temporal lobe epilepsy in children and adolescents in lateralizing the seizure onset zone[J]. Epilepsy Res, 2002, 48(1/2): 103-110.
- [13] 朱丹. 癫痫的诊断与治疗: 临床实践与思考[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 120.
 ZHU D. Diagnosis and treatment of epilepsy[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2017: 120.
- [14] YANKAM N J, COSTES N, BOUILLOT C, et al. Quantitative longitudinal imaging of activated microglia as a marker of inflammation in the pilocarpine rat model of epilepsy using [11 C]- (R)-PK11195 PET and MRI[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(4): 1251-1263.
- [15] THERAJARAN P, HAMILTON J A, O'BRIEN T J, et al. Microglial polarization in posttraumatic epilepsy: potential mechanism and treatment opportunity[J]. Epilepsia, 2020, 61(2): 203-215.
- [16] BOER K, SPLIET W G, VAN RIJEN P C, et al. Evidence of activated microglia in focal cortical dysplasia[J]. J Neuroimmunol, 2006, 173(1/2): 188-195.
- [17] TANG Y, LE W D. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2): 1181-1194.
- [18] LIU J, LI C Y, PENG H W, et al. Electroacupuncture attenuates learning and memory impairment via activation of $\alpha 7$ nAChR-mediated anti-inflammatory activity in focal cerebral ischemia/reperfusion injured rats[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(2): 939-946.
- [19] ZHAO Q P, YIN C Y, YUAN Y, et al. Down-regulation of miR-145 improves learning and memory abilities in epileptic rats by regulating hippocampal neuron apoptosis[J]. World Neurosurg, 2019, 122: e1432-e1438.
- [20] LEE I, YOGANARASIMHA D, RAO G, et al. Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3[J]. Nature, 2004, 430(6998): 456-459.
- [21] BARAM T Z, DONATO F, HOLMES G L. Construction and disruption of spatial memory networks during development[J]. Learn Mem, 2019, 26(7): 206-218.
- [22] MÁTYÁS A, BORBÉLY E, MIHÁLY A. Hippocampal sclerosis in pilocarpine epilepsy: survival of peptide-containing neurons and learning and memory disturbances in the adult NMRI strain mouse[J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 204.
- [23] AHMED Z, SHAW G, SHARMA V P, et al. Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry[J]. J Histochem Cytochem, 2007, 55(7): 687-700.
- [24] LAWRENCE T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a001651.
- [25] LEI W, DUAN Z J. Advances in the treatment of cholinergic anti-inflammatory pathways in gastrointestinal diseases by electrical stimulation of vagus nerve[J]. Digestion, 2021, 102(2): 128-138.
- [26] ZHENG L M, SHI L, ZHOU Z Y, et al. Placental expression of AChE, $\alpha 7$ nAChR and NF- κ B in patients with preeclampsia[J]. Ginekol Pol, 2018, 89(5): 249-255.

(收稿日期: 2023-03-30 修回日期: 2023-08-13)

(编辑: 唐晓莲)