

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.03.005

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211227.1325.002.html>(2021-12-27)GSK-3 β 参与氯化锂修饰颅内感染后癫痫发作的可能机制李志民,曹 兴,余巨明[△],蒋国会

(川北医学院附属医院神经内科,四川南充 637000)

[摘要] **目的** 探究糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)是否参与氯化锂(LiCl)修饰颅内感染后癫痫发作的机制。**方法** 取大鼠 110 只,其中 5 只作为对照组(注射生理盐水),余下大鼠利用脂多糖(LPS)诱导颅内感染在此基础上,用毛果芸香碱(Pilo)致病实验大鼠。将实验大鼠进行分组:LPS 组,LPS-10、20、40、80 mg/kg LiCl 组,以及 LPS-丙戊酸(VPA)组和 LPS-Wortmannin(WT)组。分别注射 5 mL/kg 生理盐水,10、20、40、80 mg/kg LiCl,30 mg/kg VPA 和 0.6 μ g/kg WT,每 24 小时 1 次,连续 3 d 后用 ELISA 和 Western blot 分别检测各组海马组织白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-10 水平及 p-GSK-3 β 及 GSK-3 β 水平;免疫组织化学方法检测神经元及小胶质细胞;采用电生理评估致病大鼠的癫痫持续状态(SE)潜伏期及发作强度。**结果** 与对照组大鼠相比,LPS 组大鼠海马 GSK-3 β 的表达水平显著升高,但 p-GSK-3 β 的表达水平降低($P<0.05$)。同 LPS 组大鼠相比,小剂量(小于 40 mg/kg)LiCl 组及 LPS-VPA 组大鼠海马 CA1 区 ripple 振荡功率谱明显降低,但诱导 SE 的时间显著增加,SE 期 FRs 的功率谱密度均值降低;而 LPS-80 mg/kg LiCl 组及 LPS-WT 组则出现相反结果($P<0.05$)。同时与 LPS 组小鼠比较,LPS-小剂量 LiCl 组与 LPS-VPA 组小鼠海马 GSK-3 β /p-GSK-3 β 比值明显变小($P<0.05$),海马组织中 IL-1 β 、TNF- α 的表达水平明显降低($P<0.05$),IL-10 的表达水平明显升高($P<0.05$),且小胶质细胞激活较少($P<0.05$),并且海马 CA1 区神经元保存更为完整;而 LPS-80 mg/kg LiCl 组及 LPS-WT 组出现相反结果。**结论** LiCl 可能通过作用于 GSK-3 β 参与颅内感染模型大鼠的癫痫发作。

[关键词] 颅内感染;糖原合成激酶-3 β ;氯化锂;痫性发作;局部场电位**[中图法分类号]** R742**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)03-0379-10GSK-3 β may be involved in the mechanism of seizures
after lithium chloride modified intracranial infectionLI Zhimin, CAO Xing, YU Juming[△], JIANG Guohui(Department of Neurology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical
College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective** To explore whether glycogen synthesis kinase-3 β (GSK-3 β) is involved in the mechanism of lithium chloride (LiCl) modified epileptic seizures after the intracranial infection. **Methods** A total of 110 rats were used to establish the model of intracranial infection induced by lipopolysaccharide (LPS), dividing five of them into the control group. On the basis of the control group, the rest of the rats were treated with pilocarpine (Pilo) to induce epilepsy. The experimental rats were divided into the LPS group, LPS 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg and 80 mg/kg LiCl group, LPS-valproic acid (VPA) group and Wortmannin (WT) group. The rats in all the experimental groups were injected with 5 mL/kg saline once every 24 hours respectively. After continuous injection of saline for three days, ELISA and Western blot were used to detect the levels of interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-10 and p-GSK-3 β and GSK-3 β in the hippocampus of the rats in each group. Immunohistochemical methods were used to detect the neurons and microglia. Electrophysiology was used to estimate the latency and seizure intensity of status epilepticus in epileptic rats. **Results** Compared with that of the control group, the expression of GSK-3 β in the hippocampus of rats with intracranial infection significantly increased, but that of p-GSK-3 β decreased ($P<0.05$). Compared with those of the LPS group, the power spectrum of ripple oscillation in hippocampal CA1 region of low

dose (less than 40 mg/kg) LiCl group and LPS-VPA group significantly decreased, but the time of inducing status epilepticus (SE) significantly increased. The mean power spectral density of FRs in SE phase of the rats in those groups decreased while the opposite results were found in the LPS 80 mg/kg LiCl group and LPS-WT group ($P < 0.05$). Compared with those of the LPS group, the ratio of GSK-3 β /p-GSK-3 β in hippocampus of the LPS low dose LiCl group and LPS-VPA group decreased significantly ($P < 0.05$); the expression of IL-1 β and TNF- α in hippocampus decreased significantly ($P < 0.05$); the expression of IL-10 increased significantly ($P < 0.05$), and the activation of microglia decreased ($P < 0.05$). The neurons in CA1 region of hippocampus in those groups were more intact, while the opposite results were found in LPS 80 mg/kg LiCl group and LPS-WT group. **Conclusion** LiCl may be involved in epileptic seizures in rats with intracranial infection by acting on GSK-3 β .

[Key words] intracranial infection; GSK-3 β ; lithium salt; seizure; local field potential

癫痫是一种脑部神经元异常放电且反复发作作为特征的常见脑部疾病^[1], 目前还没有太多办法能够抑制癫痫的发生。颅内感染作为癫痫的重要病因^[2], 抑制颅内感染炎性环境从而抑制癫痫的发生无疑是研究的方向。虽然抗感染治疗能降低脑炎病死率, 但不能改变脑炎后形成癫痫的结果。目前亦推荐预防性抗癫痫治疗^[3-5]。尽管颅内感染是如何导致癫痫发作和癫痫形成的具体机制迄今还不十分清楚, 但推测可能与促炎细胞因子[白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α]、抗炎细胞因子(IL-10)失衡, 胶质细胞异常激活及神经元的变性坏死共同导致脑神经网络引起异常兴奋有关^[6-7]。

糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β) 是炎症 TLR4 信号通路的关键调节器, 抑制 GSK-3 β 可以达到明显抗炎作用, 而激活 GSK-3 β 则具有明显促炎作用^[8], 因而对维持机体炎症平衡起到至关重要的作用。它作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶功能并不单一。GSK-3 β 通过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶去磷酸化激活可导致细胞凋亡, 然而通过促进丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶磷酸化(P-GSK-3 β) 而达到细胞保护的作用, 均通过 p3K/Akt 通路影响 GSK-3 β 的活性^[9]。Wortmannin (WT) 抑制 p3K 使丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶去磷酸化而激活^[10], 因此被视为 GSK-3 β 的激动剂。氯化锂(LiCl) 和丙戊酸(VPA) 能使 GSK-3 β 磷酸化失活, 故被视为 GSK-3 β 的抑制剂。LiCl 在精神疾病中发挥了重要作用, 目前研究其在神经系统疾病如脑和脊髓损伤^[11] 及神经变性疾病如帕金森病^[12] 的治疗也发挥一定作用。然而, LiCl 对大鼠颅内感染及颅内感染后癫痫发作的影响还鲜见报道。本实验发现 LiCl 对癫痫发作的影响可能与剂量相关, 小剂量 LiCl (小于 40 mg/kg) 可能抑制癫痫发作, 而大剂量 LiCl (大于 60 mg/kg) 可促进癫痫的发作^[13]。本课题组前期实验得出 LiCl 对大鼠颅内感染后癫痫发作的影响具有剂量依赖效应, 但具体机制尚不清楚。因此本研究采用不同水平的 LiCl、VPA 及 WT 干预颅内感染模型大鼠, 通过免疫组织化学、Western blot、ELISA、电生理检测的方法, 探讨 GSK-3 β 在 LiCl 影响颅内感染大鼠癫痫发作的关系, 进

而为颅内感染后癫痫的预防提供方向。

1 材料与方法

1.1 一般材料

选取 8~10 周龄约 200 g 的成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(均由川北医学院实验动物中心提供); LiCl、LPS(美国 Sigma 公司)、小胶质细胞抗体(IBA-1, 日本 Wako 公司)、毛果芸香碱(Pilo, 美国 Sigma 公司)、Wortmannin (美国 Abmole 公司)、抗-Phospho-GSK-3 α/β 抗体、抗-GSK-3 α/β 抗体(美国 R&D 公司)、IL-10、IL-1 β 、TNF- α 检测试剂盒(武汉博士德公司)、神经元特异性核蛋白抗体(NeuN, 美国 Millipore 公司)、 β -actin 多克隆抗体(北京中杉金桥公司)。川北医学院实验动物伦理委员会批准该实验。

1.2 方法

1.2.1 模型制备及分组

制备脂多糖(LPS)颅内感染大鼠模型^[14]: 在大鼠侧脑室(前囟后 0.8 mm, 旁开 1.3 mm, 入脑 3.5 mm) 采用注射 LPS 50 μ g, 建立大鼠颅内感染模型。对照组(5 只)给予侧脑室注射同体积生理盐水 5 mL/kg。观察记录实验鼠行为活动, 并于 24 h 检测实验鼠海马组织中炎症因子和 GSK-3 β 的水平。

侧脑室注射 LPS 诱导颅内感染大鼠 105 只, 然后将其均分为 LPS 组, LPS-10、20、40、80 mg/kg LiCl 组, 以及 LPS-VPA 组和 LPS-WT 组。对应分组分别进行腹腔注射生理盐水 5 mL/kg, LiCl 10、20、40、80 mg/kg, 以及 VPA 30 mg/kg 和 WT 0.6 μ g/kg^[15], LiCl < 40 mg/kg 时为 LPS-小剂量 LiCl 组。每 24 小时 1 次, 连续 3 d。

1.2.2 癫痫大鼠模型造模及其电生理检测^[16]

根据 3.3 mL/kg 的比例, 采用水平为 10% 水合氯醛对大鼠进行腹腔注射麻醉, 然后将其置于脑立体定位注射仪上。乙醇消毒后对大鼠进行备皮, 沿颅骨中缝剪开头皮后以 Bregma 十字缝为参照向左移 2.6 mm, 向后移 3.6 mm 为中点用颅骨钻开一边长为 3 mm 骨窗。在骨窗近鼻端钻 2 小孔并插入固定小螺栓用于连接参考电极。参照大鼠脑图谱, 以 Bregma 十字缝为参照向后 3.6 mm, 向左 2.6 mm 移

动 4×4 微阵列排列的 16 导微丝电极至左侧海马 CA1 区并用微推进器向下刺入脑中 3.5 mm, 然后连接相应电极。待大鼠麻醉苏醒后, 使用 16 导在体电生理记录仪(美国 Plexon 公司)和 OmniPlex[®] D 神经信号采集系统(美国 Plexon 公司)记录大鼠海马 CA1 区神经元的电活动信号。首先, 采集 15 min 大鼠清醒状态下的脑电信号作为基准线; 然后按照 360 mL/kg 的剂量腹腔注射毛果芸香碱诱发癫痫持续状态(SE)并记录 30 min。采用脑电分析系统(NeuroExplorer[®] v4.0)对实验大鼠脑电信号进行 ripples 振荡和 SE 海马局部场电位的 FRs 的功率谱密度均值。

1.2.3 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-10 水平检测

用水合氯醛(3.3 mL/kg, 腹腔注射)麻醉大鼠后断头取脑, 快速分离双侧海马组织(冰上操作)迅速放入匀浆管制作匀浆, 而后将匀浆液移入离心管, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。取上清液, 用 Bradford 法测定蛋白水平后分装于 0.5 mL 离心管。根据 ELISA 试剂盒说明书进行 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-10 检测。

1.2.4 p-GSK-3 β 和 GSK-3 β 水平检测^[16]

采用 Western blot 对 p-GSK-3 β 和 GSK-3 β 两个靶蛋白进行定量分析。将实验大鼠海马区提取的蛋白质裂解液用 10% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。然后, 采用半干式转印法将蛋白质条带转移至硝酸纤维素薄膜上。检测条件: 5% 脱脂牛奶, 室温封闭硝酸纤维素薄膜 2 h; 然后, 将封闭液更换为一抗溶液, 分别为 1:1 000 稀释的兔抗鼠的 p-GSK-3 β 多克隆抗体溶液、GSK-3 β 多克隆抗体溶液和 β -actin 多克隆抗体溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。次日, 回收一抗溶液, 并用 PBS 洗涤硝酸纤维素薄膜 3 次, 每次 5 min。然后, 室温用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 孵育 1.5 h。PBS 洗涤硝酸纤维素薄膜 3 次后, 用新鲜配制的化学发光显色剂对蛋白质条带进行显影。用 Image J 软件测定各蛋白质条带的灰度值, 以靶蛋白与内参蛋白 β -actin 的灰度值之比表示靶蛋白的相对表达水平。

1.2.5 神经元和小胶质细胞检测

采用水平为 10% 的水合氯醛, 按照 3.3 mL/kg 的剂量, 对大鼠实施腹腔注射麻醉。将小鼠固定后用生理盐水灌流大鼠洗涤血细胞。待右心耳流出液呈无色后再用 4% 多聚甲醛灌流大鼠。大鼠灌流完成后小心取出脑组织并置于 4% 多聚甲醛溶液中后固定 24 h。将后固定好的脑组织经脱水处理后, 用石蜡包埋并制作连续的冠状组织切片(每片 4 μm 厚)。海马区脑组织切片每间隔 4 张取 1 张进行免疫组织化学染色。使用小胶质细胞特异性抗体 IBA-1(1:200)检测活化的小胶质细胞; 用神经元特异性抗体 NeuN

(1:1 000)检测神经元细胞。所有组织切片均用苏木精进行复染。

参照 YANG 等^[17]的方法, 对免疫组织化学染色的脑组织切片进行阳性细胞计数。在 40 倍放大的显微镜视野下, 选取海马 CA1 及邻近皮质区中具有代表性的、非重叠区域($400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$)进行 NeuN⁺ 和 IBA-1⁺ 细胞计数。所有的细胞计数区域均由观察者预先设定, 并采用 Image-Pro Plus Media Cybernetics 系统对 NeuN⁺ 和 IBA-1⁺ 细胞自动计数。计数视野中, 只有形态结构完整, 细胞清晰可辨的 NeuN⁺ 和 IBA-1⁺ 细胞才会被计数。由于大鼠左、右大脑半球的细胞数目无明显差别, 故不特意区分左、右半球, 并将 Image-Pro Plus Media Cybernetics 系统获得的结果用于统计分析。

1.3 统计学处理

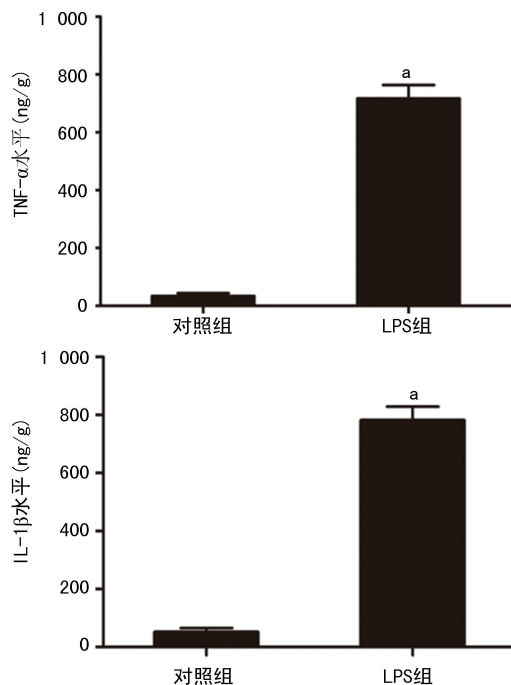
实验数据均采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间的差异比较采用成组设计 t 检验验证, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 颅内感染大鼠模型中海马 GSK-3 β 和 p-GSK-3 β 的变化

2.1.1 LPS 颅内感染大鼠模型

相比对照组大鼠而言, LPS 组活动明显减少、食物摄入量降低、饮水量增加、体温上升明显。在 LPS 组的海马组织中存在明显的促炎性细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 的水平增高, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1。



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 1 LPS 导致大鼠海马组织中 IL-1 β 和 TNF- α 水平的变化

2.1.2 大鼠海马组织中 GSK-3β 和 p-GSK-3β 的表达

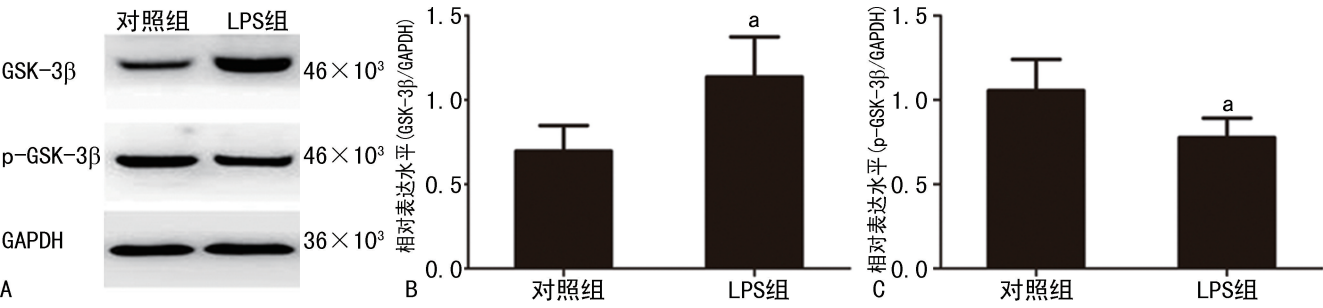
Western blot 分析表明 LPS 组的大鼠海马组织中 GSK-3β 水平较对照组升高($P<0.05$),而 p-GSK-3β 水平却明显比对照组降低,见图 2。

2.2 不同干预对颅内感染模型大鼠各种检测指标的影响

2.2.1 炎症因子在不同干预处理组中的表达

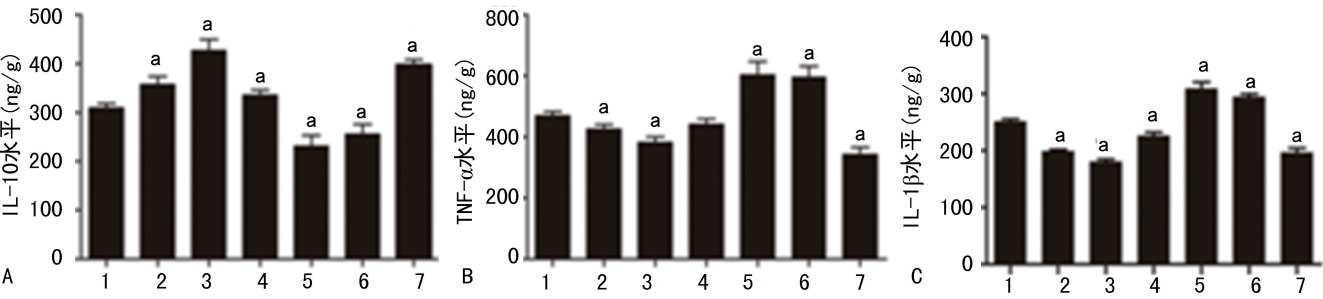
与 LPS 组相比 LPS-小剂量 LiCl 组及 LPS-VPA

组的海马组织中 IL-10 的表达水平明显升高($P<0.05$)。LPS-80 mg/kg LiCl 组和 LPS-WT 组的海马组织中 IL-10 的表达水平明显降低($P<0.05$),见图 3A。LPS-小剂量 LiCl 组、LPS-VPA 组的海马组织中 IL-1β 和 TNF-α 的表达水平明显降低($P<0.05$),LPS-80 mg/kg LiCl 组及 LPS-WT 组的海马组织中 IL-1β 和 TNF-α 的表达水平明显升高($P<0.05$),见图 3B、C。



A: Western blot 检测; B: GSK-3β 相对表达水平; C: p-GSK-3β 相对表达水平; ^a: $P<0.05$, 与对照组比较。

图 2 对照组和 LPS 组大鼠海马组织中 GSK-3β 和 p-GSK-3β 的表达差异



A: IL-10; B: TNF-α; C: IL-1β; 1: LPS 组; 2~5: 分别为 LPS-10、20、40、80 mg/kg LiCl 组; 6: LPS-VPA 组; 7: LPS-WT 组; ^a: $P<0.05$, 与 LPS 组比较。

图 3 各组大鼠海马组织中炎症因子表达变化 ($n=5$)

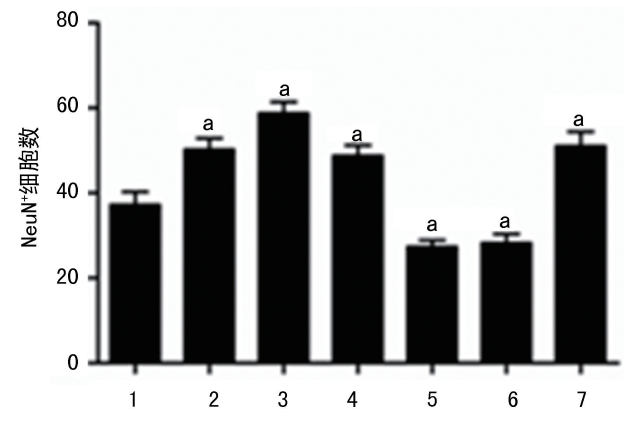
2.2.2 不同干预对颅内感染大鼠模型海马 CA1 区神经元的影响

LPS-小剂量 LiCl 组和 LPS-VPA 组的海马 CA1 区神经元形态结构比 LPS 组的更为完整,排列也更整齐而致密,细胞核脱失少、染色较深。小剂量 LiCl 干预组和 LPS-VPA 组的海马 CA1 区神经元数量与 LPS 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。LPS-80 mg/kg LiCl 组及 LPS-WT 组的海马 CA1 区神经元形态结构的损坏比 LPS 组更为严重,神经元排列松散、散乱,细胞核脱失严重、着色较浅。海马 CA1 区神经元数量与 LPS-80 mg/kg LiCl 组、LPS-WT 组和 LPS 组之间差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4、5。

2.2.3 不同干预对颅内感染大鼠模型海马 CA1 区小胶质细胞的影响

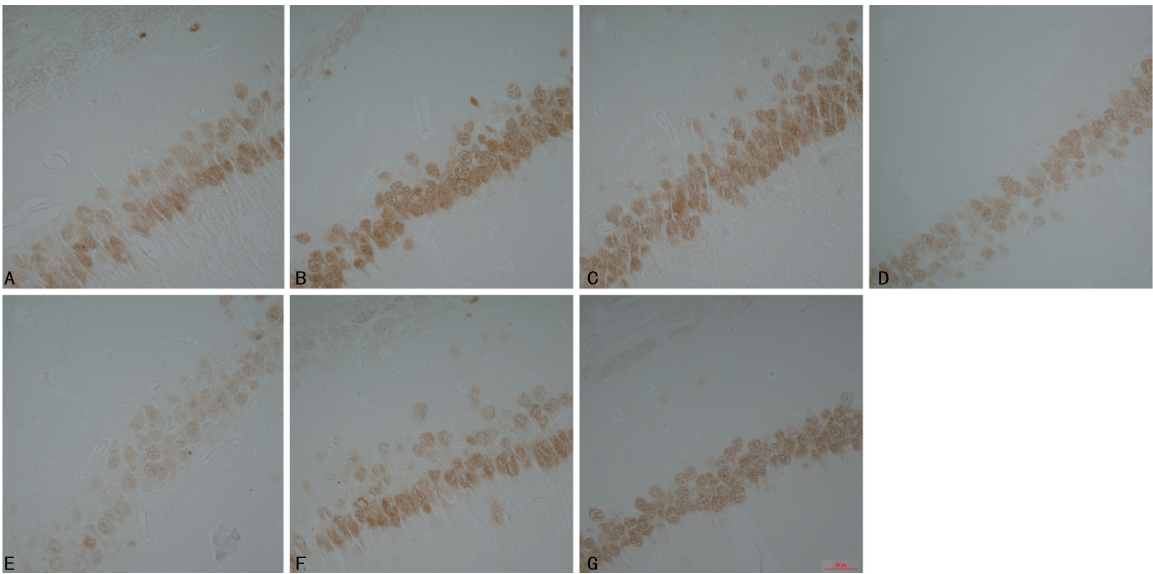
LPS-小剂量 LiCl 组和 LPS-VPA 组的海马 CA1 区小胶质细胞的激活比 LPS 明显要少($P<0.05$);而 LPS-80 mg/kg LiCl 组和 LPS-WT 组的海马 CA1 区

小胶质细胞的激活比 LPS 组显著增多($P<0.05$),见图 6、7。



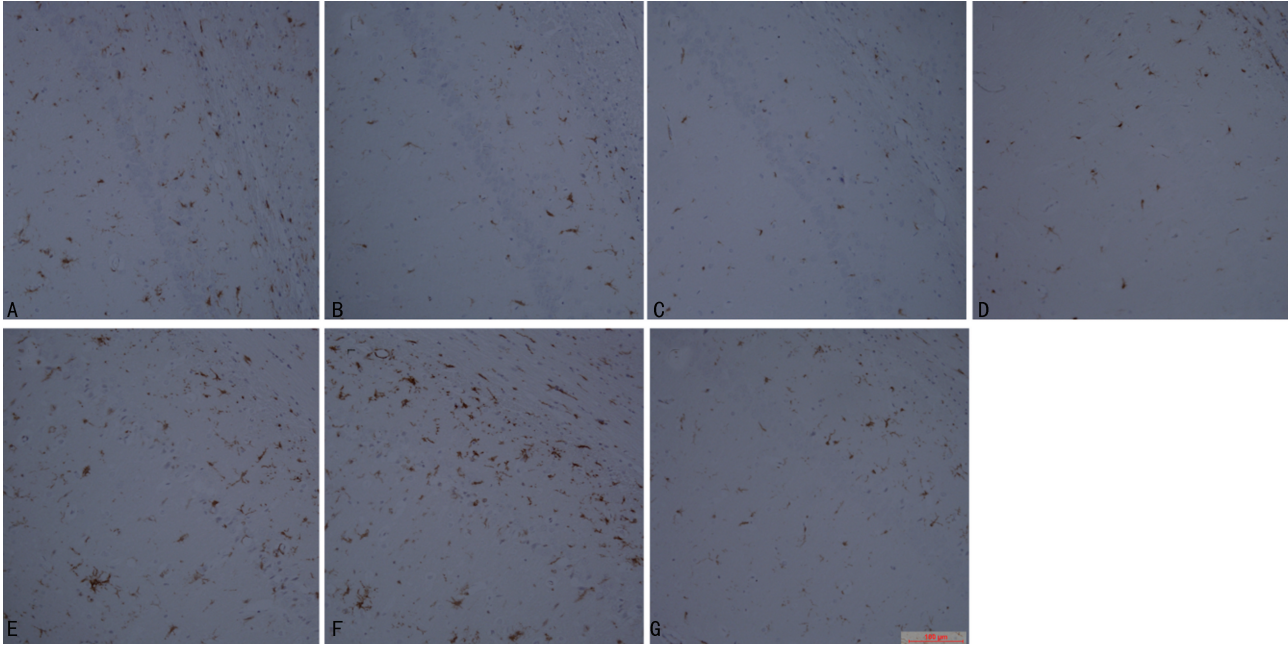
1: LPS 组; 2~5: 分别为 LPS-10、20、40、80 mg/kg LiCl 组; 5: LPS-VPA 组; 6: LPS-WT 组; ^a: $P<0.05$, 与 LPS 组比较。

图 4 各组大鼠海马 CA1 区中预先设定区域内的 NeuN⁺ 细胞定量分析 ($n=5$)



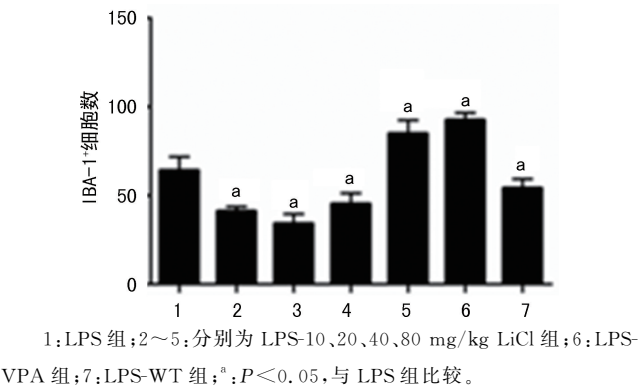
A:LPS 组;B~E:分别为 LPS-10、20、40、80 mg/kg LiCl 组;F:LPS-WT 组;G:LPS-VPA 组。

图 5 不同干预对小鼠海马 CA1 区中 NeuN⁺ 细胞的影响(标尺 = 50 μm)



A:LPS 组;B~E:分别为 LPS-10、20、40、80 mg/kg LiCl 组;F:LPS-WT 组;G:LPS-VPA 组。

图 6 不同干预对小鼠海马 CA1 区中 IBA-1⁺ 细胞的影响(标尺 = 100 μm)



1:LPS 组;2~5:分别为 LPS-10、20、40、80 mg/kg LiCl 组;6:LPS-VPA 组;7:LPS-WT 组;^a: $P<0.05$,与 LPS 组比较。

图 7 不同干预大鼠模型海马 CA1 区中预先设定区域内的 IBA-1⁺ 细胞定量分析($n=5$)

2.2.4 不同干预对颅内感染模型大鼠癫痫发作的

影响

比较各干预组和 LPS 组的基础脑电信号、痫性首次发作和 SE 潜伏期、SE 期的局部场电位变化。(1)不同干预对海马局部场电位 ripples 振荡功率的影响:LPS-小剂量 LiCl 组和 LPS-VPA 组的海马 CA1 区的 ripples 振荡功率与 LPS 组相比,明显降低($P<0.05$)。LPS-80 mg/kg LiCl 组和 LPS-WT 组的海马 CA1 区的 ripples 振荡功率与 LPS 组相比,显著升高($P<0.05$),见图 8。(2)不同干预对颅内感染模型大鼠 SE 潜伏期的影响:LPS-小剂量 LiCl 组和 LPS-VPA 组的 SE 潜伏期与 LPS 组相比明显延长($P<0.05$),LPS-80 mg/kg LiCl 组和 LPS-WT 组的 SE 潜伏期与 LPS 组相比明显缩短($P<0.05$)。LPS-小剂量

LiCl 组和 LPS-VPA 组的癫痫发作频谱能量与 LPS 组相比明显降低($P<0.05$),LPS-80 mg/kg LiCl 组和 LPS-WT 组的癫痫发作频谱能量与 LPS 对照组相比显著升高($P<0.05$),见图 9、10。(3)不同干预对颅内感染模型大鼠 SE 期 FRs 的功率谱密度均值的影响:LPS-小剂量 LiCl 组和 LPS-VPA 组的海马区 SE 期 FRs 的功率谱密度均值与 LPS 组相比明显降低($P<0.05$),LPS-80 mg/kg LiCl 干预组和 LPS-WT 组的海马区 SE 期 FRs 的功率谱密度均值与 LPS 组相比明显升高($P<0.05$),见图 11、12。

2.2.5 不同干预对颅内感染模型大鼠海马组织中 GSK-3β 和 p-GSK-3β 的影响

Western blot 分析显示,LPS-小剂量 LiCl 组和 LPS-VPA 组海马组织中 GSK-3β/p-GSK-3β 的比值

与 LPS 组相比明显变小($P<0.05$)。LPS-80 mg/kg LiCl 组和 LPS-WT 组海马组织中 GSK-3β/p-GSK-3β 的比值与 LPS 组相比明显增大($P<0.05$),见图 13。

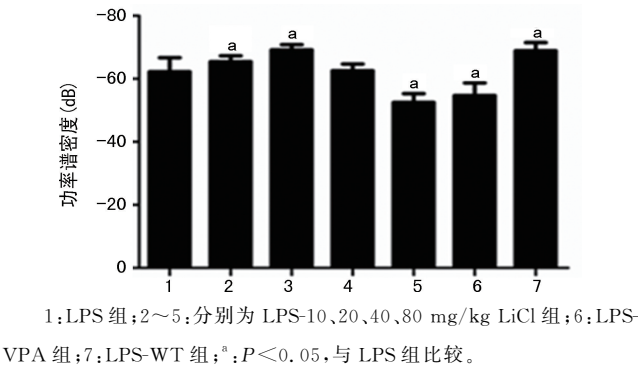
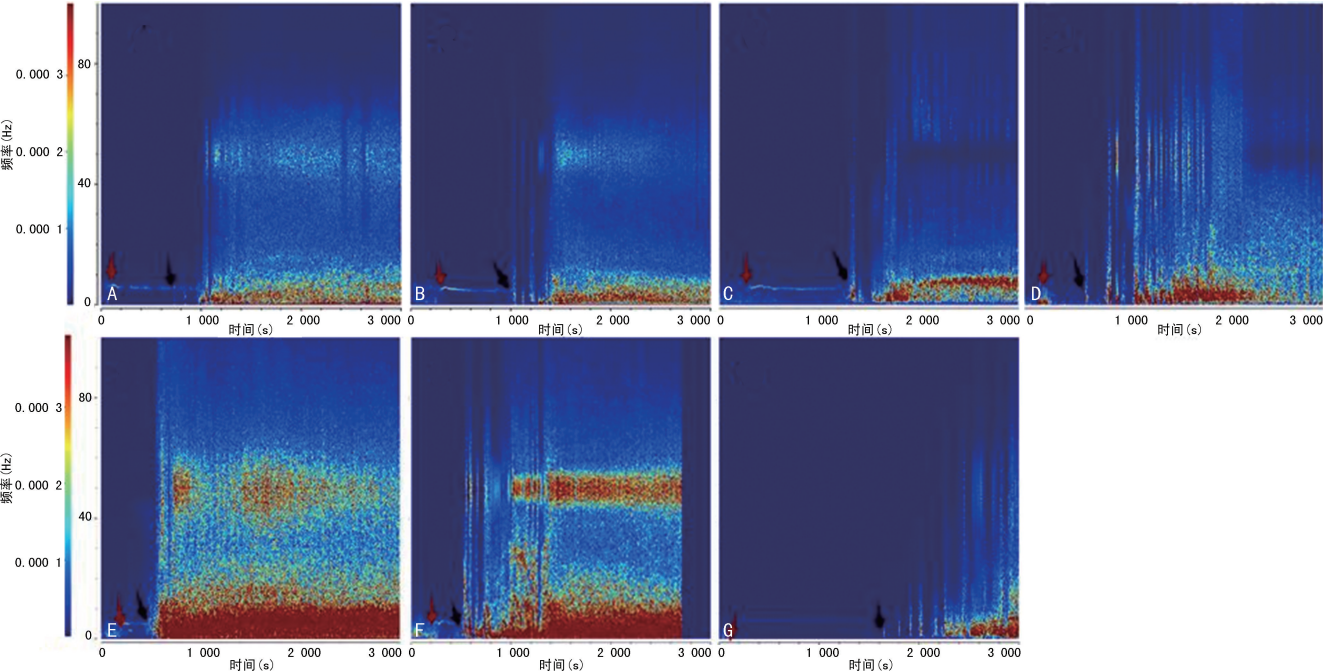


图 8 不同干预对海马区 ripples 振荡的影响($n=5$)



A:LPS 组;B~E:分别为 LPS-10、20、40、80 mg/kg LiCl 组;F:LPS-WT 组;G:LPS-VPA 组。深红色箭头指示了腹腔注射毛果芸香碱的起始时间,黑色箭头指示了模型大鼠进入 SE 的起始时间。癫痫发作频谱图的横坐标代表时间(s),纵坐标代表癫痫发作频率(Hz),左侧彩色条带为频谱能量示例,频谱能量较高的以红色表示,频谱能量较低的则以蓝色表示。

图 9 不同干预对毛果芸香碱诱导颅内感染模型大鼠癫痫发作频谱的影响

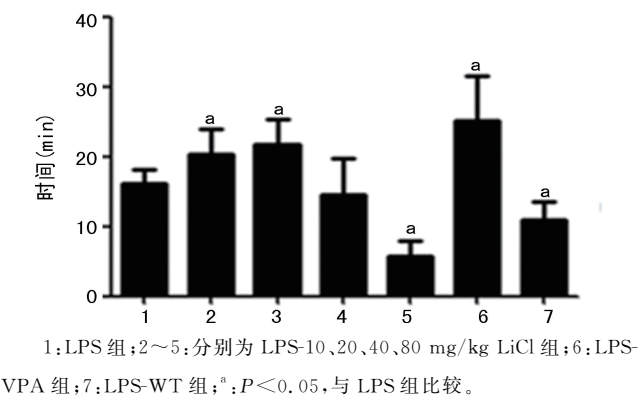


图 10 不同干预组对 SE 潜伏期的影响($n=5$)

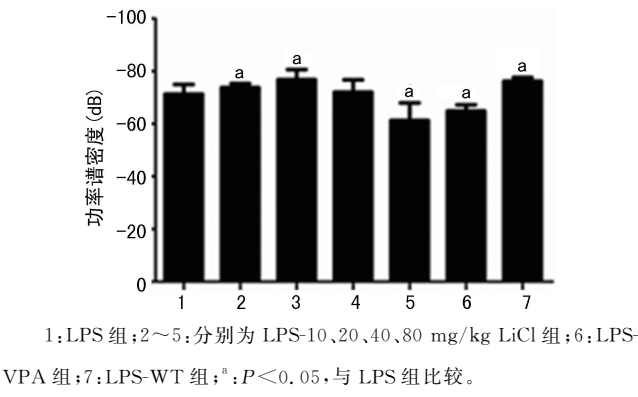
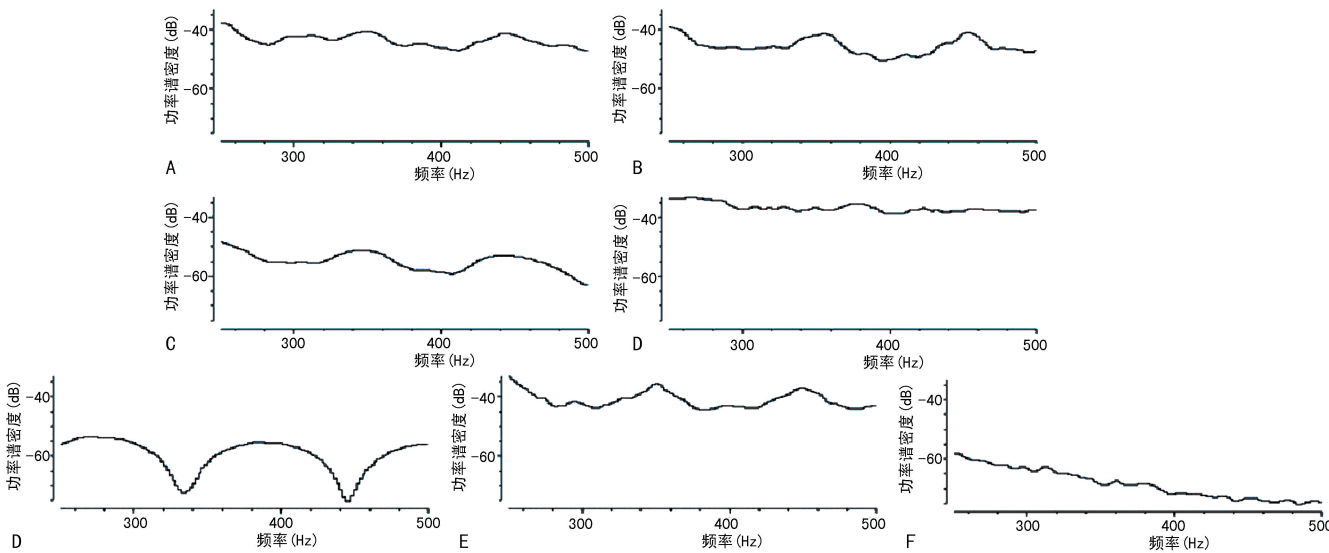
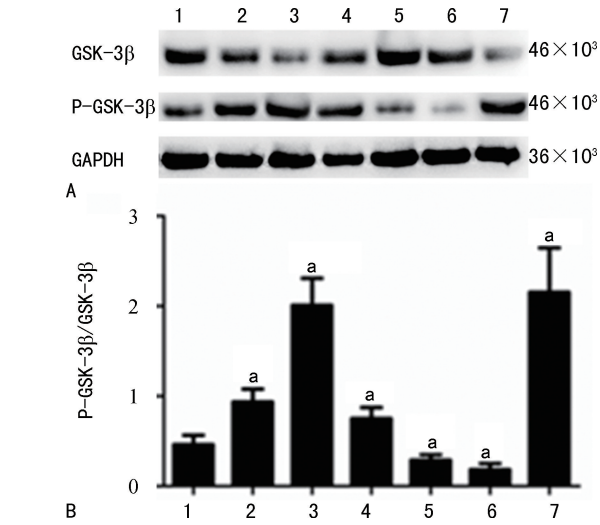


图 11 各组小鼠海马场电位中 250~500 Hz 的 FRs 的功率谱密度的变化



A: LPS 组; B~E: 分别为 LPS-10、20、40、80 mg/kg LiCl 干预组; F: LPS-WT 组; G: LPS-VPA 组。

图 12 不同干预对海马场电位中 250~500 Hz 的 FRs 的功率谱密度均值变化趋势



1: LPS 组; 2~5: 分别为 LPS-10、20、40、80 mg/kg LiCl 组; 6: LPS-VPA 组; 7: LPS-WT 组; ^a: $P < 0.05$, 与 LPS 组比较。

图 13 不同干预对小鼠海马组织 GSK-3β 和 p-GSK-3β 的影响 ($n=5$)

3 讨 论

本实验采用不同剂量的 LiCl 干预颅内感染大鼠, 电生理研究结果海马局部场电位 (LFPs) 显示小剂量 LiCl 干预后延长了毛果芸香碱诱发颅内感染大鼠癫痫发作的潜伏期, 降低了 SE 期的快速高频振荡 (FRs) 功率谱密度均值, 大剂量 LiCl 干预后则结果相反, 由此得出小剂量 LiCl 降低了颅内感染后癫痫发作的易感性及减轻癫痫发作程度, LiCl 对大鼠颅内感染后癫痫发作差异性影响的机制目前尚不十分清楚。尽管有证据表明感染所致的血脑屏障通透性增加、胶质细胞活化增殖、炎性介质大量释放、神经元兴奋性改变及变性坏死等一系列病理生理改变, 均可能参与了颅内感染后痫性发作和癫痫形成的过程^[11-13]。本实验也得出小剂量 LiCl 干预后减少了颅内感染大鼠海马小胶质细

胞的活化, 降低了海马促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 水平, 增加了抗炎细胞因子 IL-10 水平, 减轻了海马神经元的变性坏死。而大剂量 LiCl 干预后则结果相反。

本研究首先确定大鼠侧脑室注射 LPS 24 h 后, 大鼠活动明显减少、食物摄入量降低、饮水量增加、体温上升明显, 且海马促炎细胞因子显著增高, 表明成功诱导大鼠颅内感染, 并发现大鼠感染后脑内海马 GSK-3 β 水平有升高及 p-GSK-3 β 水平降低变化, 因此推测大鼠颅内炎症严重程度可能与 GSK-3 β 的活性有关。在 LPS 致大鼠颅内感染的基础上, 采用 GSK-3 β 间接抑制剂 VPA (30 mg/kg) 和 GSK-3 β 激动剂 WT (0.6 μ g/kg) 分别干预颅内感染模型大鼠后, Western blot 结果显示 VPA 与小剂量 LiCl 干预后均使颅内感染大鼠海马中 p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值明显变大 ($P < 0.05$), WT、与大剂量 LiCl 干预后均使颅内感染大鼠海马 p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值明显变小 ($P < 0.05$), p-GSK-3 β 与 GSK-3 β 的比值大小体现 GSK-3 β 活性的高低。因此 VPA 与小剂量 LiCl 干预后抑制了颅内感染模型大鼠海马 GSK-3 β 活性, WT、与大剂量 LiCl 干预后则增加了颅内感染模型大鼠海马 GSK-3 β 活性。研究证实抑制 GSK-3 β 可有效减轻外周和中枢神经系统的炎症^[18], 而激活 GSK-3 β 可间接诱导 IL-6、TNF- α 的产生来促进 CD11b 表达而加重炎症^[19]。本实验结果小剂量 LiCl 与 VPA 减少了海马 CA1 小胶质细胞的激活, 同时海马促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 分泌减少, 抗炎细胞因子 IL-10 分泌增加, 而大剂量 LiCl 与 WT 干预后则得出相反的结果, YU 等^[20]发现 LiCl 通过促进 GSK-3 β 的磷酸化而抑制 GSK-3 β 的活性来实现抑制神经炎症作用。本实验表明 LiCl 对颅内炎症影响的差异可能是通过调节 GSK-3 β 的活性来实现的。

LiCl 和 VPA 作为膜稳定剂,对多种中枢神经系统疾病具有抗炎及神经保护作用,LiCl 通过调节 GSK-3 β 的活性来直接影响颅内感染后癫痫的发作,还是通过调节 GSK-3 β 的活性来调控颅内炎症从而间接影响颅内感染后癫痫的发作,目前尚不清楚。但 LiCl 在其他神经系统疾病的研究中发现,LiCl 主要通过抑制 GSK-3 β 的活性来发挥神经保护。众多研究发现通过调节 GSK-3 β 途径亦发挥神经保护作用^[21-22]。本实验和其他研究均发现 LPS 诱发颅内感染大鼠的海马总 GSK-3 β 水平增加^[23]。LPS 诱发颅内感染大鼠癫痫发作的敏感性显著增加。推测 GSK-3 β 可能与癫痫发作的敏感性有关。本实验发现小剂量 LiCl 与 VPA 干预后明显延长了颅内感染后 SE 潜伏期,而大剂量 LiCl 与 WT 干预后明显缩短了颅内感染后 SE 潜伏期,这种结果可能与 LiCl 参与调节 GSK-3 β 的活性有关。研究表明毛果芸香碱诱导癫痫发作后海马的 GSK-3 β 的水平增加,因此 GSK-3 β 与癫痫的发作可能直接相关^[24]。本研究利用的 GSK-3 β 抑制剂 VPA 干预,结果与小剂量 LiCl 干预相同,均降低了痫性发作的敏感性。而利用 GSK-3 β 的激动剂,结果与小剂量 LiCl 干预结果相反,与大剂量 LiCl 干预结果相同,增加了痫性发作的敏感性。本实验结果显示 LPS 诱发的颅内感染大鼠海马的 GSK-3 β 水平增高,p-GSK-3 β 的水平降低。GREEN 等^[23]用 LPS 刺激体外培养的星形胶质细胞和小胶细胞发现细胞 GSK-3 β 水平较未刺激组明显增加,而 p-GSK-3 β 水平较未刺激组明显减少,因而证明了炎症提高了 GSK-3 β 的表达活性,同样用 LiCl 和 LPS 同时干预发现 LPS-LiCl 组较 LPS 组 GSK-3 β 的表达活性明显降低,而 p-GSK-3 β 的表达活性相反,表明 GSK-3 β 与炎症直接相关。然而在红藻氨酸诱导癫痫模型的研究中敲出多巴胺 D2 受体(D2R)基因的小鼠,意外发现其海马中 GSK-3 β 显著活化,增加了红藻氨酸对小鼠的兴奋毒性,促进了海马神经元的凋亡,增加了小鼠对红藻氨酸诱发癫痫的敏感性;然而使 GSK-3 β 磷酸化后,明显减轻了红藻氨酸对海马神经元兴奋毒性,减少了海马细胞的凋亡和坏死^[25]。提示 GSK-3 β 通过影响海马神经元兴奋毒性及变性坏死导致癫痫发作。然而本研究发现小剂量 LiCl 和 VPA 干预后海马局部场电位功率谱密度值 ripples 振荡功率谱较 LPS 组明显降低,且海马神经元凋亡和坏死较少,而大剂量 LiCl 和 WT 干预则出现相反的结果。海马局部场电位 ripples 振荡功率谱可能与癫痫发作相关^[26],其功率谱密度值的高低则代表作海马神经元的兴奋性。因此小剂量 LiCl 降低了颅内感染大鼠海马神经元兴奋性,而大剂量 LiCl 和 WT 则作用相反。似乎也验证

了通过调节 GSK-3 β 活性而影响神经网络的兴奋性。虽然有报道红藻氨酸诱发癫痫 24 h 后海马中的 GSK-3 β 的活化明显^[27]。但也有报道称颞叶癫痫患者海马组织中的 p-GSK-3 β 明显高于没有癫痫的患者,但 GSK-3 β 水平轻微增高^[28]。GSK-3 β 仅是 WNT 信号通路的一部分,有研究发现癫痫后 GSK-3 β 的活化改变可独立于 WNT 途径^[25];也有学者认为 GSK-3 β 是通过多因素多途径共同作用于兴奋性神经递质如谷氨酸释放影响癫痫发作^[28]。近年研究发现洛伐他汀通过抑制 GSK-3 β 的活性,成功的减少了癫痫大鼠海马齿状回(DG)苔藓纤维发芽(MFS)^[24],DG 中的 MFS 是反复自发性发作的发作频率和颞叶癫痫的严重性高度相关的重要指标^[29-31]。因此抑制 GSK-3 β 的活性可以减轻癫痫的发作程度和脑损伤。已有研究报道 FRs 可作为癫痫发作的严重程度的标志^[32-34],且与神经元变性丢失相关^[35]。本实验发现 LPS-小剂量 LiCl 组及 LPS-VPA 组 SE 期 FRs 的功率谱密度均值较 LPS 组比较明显降低($P<0.05$),因此可以得出小剂量 LiCl 及 VPA 减轻了颅内感染模型大鼠的癫痫发作程度和神经元的变性丢失。因此 GSK-3 β 并非直接影响 LiCl 对颅内感染后癫痫的发作。而是小剂量 LiCl 抑制颅内感染大鼠海马组织中 GSK-3 β 的表达,抑制炎症因子,减轻组织病理损伤,延长脑炎后癫痫放电潜伏期,降低海马神经元兴奋性,提高癫痫发作阈值,降低脑炎后癫痫发作的敏感性,减轻癫痫发作程度;大剂量 LiCl 则结果相反。提示 GSK-3 β 可能参与 LiCl 修饰颅内感染后癫痫发作的机制。

综上所述,LiCl 可能通过影响 GSK-3 β 活性,从而影响胶质细胞的活化和炎性细胞因子的分泌,进一步影响神经元的变性,最后影响神经元的异常放电,达到影响颅内感染后癫痫的发作。因此调控 GSK-3 β 的活性可望成为改善颅内感染后癫痫的发作治疗靶点。

参考文献

[1] NGUGI A K, BOTTOMLEY C, KLEINSC HMIDT I, et al. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(5):883-890.

[2] HOCKER S, TATUM W O, LAROCHE S, et al. Refractory and super-refractory status epilepticus--an update[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2014, 14(6):452.

[3] MISRA U K, TAN C T, KALITA J. Viral encephalitis and epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2008, 49

- (6):13-18.
- [4] SOLOMON T, MICHAEL B D, SMITH P E, et al. Management of suspected viral encephalitis in adults--Association of British Neurologists and British Infection Association National Guidelines [J]. *J Infect*, 2012, 64(4):347-373.
- [5] KNEEN R, MICHAEL B D, MENSON E, et al. Management of suspected viral encephalitis in children - Association of British Neurologists and British Paediatric Allergy, Immunology and Infection Group National guidelines[J]. *J Infect*, 2012, 64(5):449-477.
- [6] VEZZANI A, BALOSSO S, RAVIZZA T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy [J]. *Brain Behav Immun*, 2008, 22(6):797-803.
- [7] CAMPBELL I L, ABRAHAM C R, MASLIAH E, et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(21):10061-10065.
- [8] MARTIN M, REHANI K, JOPE R S, et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(8):777-784.
- [9] GRIMES C A, JOPE R S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 beta in cellular signaling[J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 65(4):391-426.
- [10] NISHIHARA M, MIURA T, MIKI T, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43(5):564-570.
- [11] DUO Z, HE X J. Advances in mechanisms of treatment for spinal cord injury with lithium [J]. *Zhongguo Gu Shang*, 2015, 28(7):679-682.
- [12] LAZZARA C A, KIM Y H. Potential application of Lithium in Parkinson's and other neurodegenerative diseases[J]. *Front Neurosci*, 2015, 9:403.
- [13] JIANG G, PU T, LI Z, et al. Lithium affects rat hippocampal electrophysiology and epileptic seizures in a dose dependent manner[J]. *Epilepsy Res*, 2018, 146:112-120.
- [14] 曹兴, 李志民, 蒲圣雄, 等. CX3CL1-CX3CR1 对颅内感染大鼠痫性发作敏感性及脑损伤的影响 [J]. *中国临床神经科学*, 2020, 28(2):121-131.
- [15] KIM S J, LI M, JEONG C W, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea catechin, protects the heart against regional ischemia - reperfusion injuries through activation of RISK survival pathways in rats[J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(8):1079-1085.
- [16] DAVIS R, DALMAU J. Autoimmunity, seizures, and status epilepticus [J]. *Epilepsia*, 2013, 54(Suppl 6):46-49.
- [17] YANG D, LI Q, FANG L, et al. Reduced neurogenesis and pre-synaptic dysfunction in the olfactory bulb of a rat model of depression[J]. *Neuroscience*, 2011, 192:609-618.
- [18] BEUREL E. Regulation by glycogen synthase kinase-3 of inflammation and T cells in CNS diseases[J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 4:18.
- [19] ROY A, FUNG Y K, LIU X, et al. Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21):14971-14980.
- [20] YU F, WANG Z, TCHANTCHOU F, et al. Lithium ameliorates neurodegeneration, suppresses neuroinflammation, and improves behavioral performance in a mouse model of traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(2):362-374.
- [21] WU H, LU D, JIANG H, et al. Increase in phosphorylation of Akt and its downstream signaling targets and suppression of apoptosis by simvastatin after traumatic brain injury[J]. *J Neurosurg*, 2008, 109(4):691-698.
- [22] WU H, LU D, JIANG H, et al. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2008, 25(2):130-139.
- [23] GREEN H F, NOLAN Y M. GSK-3 mediates the release of IL-1 β , TNF- α and IL-10 from cortical glia[J]. *Neurochem Int*, 2012, 61(5):666-671.
- [24] LEE C Y, JAW T, TSENG H C, et al. Lovastatin modulates glycogen synthase kinase-3 β path-

- way and inhibits mossy fiber sprouting after pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38789.
- [25] DUNLEAVY M, PROVENZANO G, HENSHALL D C, et al. Kainic acid-induced seizures modulate Akt (SER473) phosphorylation in the hippocampus of dopamine D2 receptor knockout mice [J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 49(1): 202-210.
- [26] WEISS S A, OROSZ I, SALAMON N, et al. Ripples on spikes show increased phase-amplitude coupling in mesial temporal lobe epilepsy seizure-onset zones [J]. *Epilepsia*, 2016, 57(11): 1916-1930.
- [27] TRIPATHI P P, SANTORUFO G, BRILLI E, et al. Kainic acid-induced seizures activate GSK-3 β in the hippocampus of D2R^{-/-} mice [J]. *Neuroreport*, 2010, 21(12): 846-850.
- [28] LEWERENZ J, BAXTER P, KASSUBEK R, et al. Phosphoinositide 3-kinases upregulate system xc(-) via eukaryotic initiation factor 2 α and activating transcription factor 4-a pathway active in glioblastomas and epilepsy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(18): 2907-2922.
- [29] SUTULA T. Seizure-Induced axonal sprouting: assessing connections between injury, local circuits, and epileptogenesis [J]. *Epilepsy Curr*, 2002, 2(3): 86-91.
- [30] NADLER J V. The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain [J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(11): 1649-1658.
- [31] FENG L, MOLNÁR P, NADLER J V. Short-term frequency-dependent plasticity at recurrent mossy fiber synapses of the epileptic brain [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(12): 5381-5390.
- [32] JACOBS J, LEVAN P, CHANDER R, et al. Interictal high-frequency oscillations (80 — 500 Hz) are an indicator of seizure onset areas Independent of spikes in the human epileptic brain [J]. *Epilepsia*, 2008, 49(11): 1893-1907.
- [33] BAJORAT R, WILDE M, SELLMANN T, et al. Seizure frequency in pilocarpine-treated rats is Independent of circadian rhythm [J]. *Epilepsia*, 2011, 52(9): e118-e122.
- [34] KERBER K, LEVAN P, DÜMPPELMANN M, et al. High frequency oscillations Mirror disease activity in patients with focal cortical dysplasia [J]. *Epilepsia*, 2013, 54(8): 1428-1436.
- [35] JIRUSKA P, FINNERTY G T, POWELL A D, et al. Epileptic high-frequency network activity in a model of non-lesional temporal lobe epilepsy [J]. *Brain*, 2010, 133(Pt 5): 1380-1390.
- (收稿日期: 2021-05-08 修回日期: 2021-10-10)
- (下转第 378 页)
- [15] WANG Z, GUO J, HAN X, et al. Metformin represses the pathophysiology of AAA by suppressing the activation of PI3K/AKT/mTOR/autophagy pathway in ApoE(-/-) mice [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9: 68.
- [16] LI S, SHI Y, LIU P, et al. Metformin inhibits intracranial aneurysm formation and progression by regulating vascular smooth muscle cell phenotype switching via the AMPK/ACC pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 191.
- [17] LINDEMAN J H, MATSUMURA J S. Pharmacologic management of aneurysms [J]. *Circ Res*, 2019, 124(4): 631-646.
- [18] VAN DIERENDONCK X, DE LA ROSA R M, GEORGIADI A, et al. HILPDA uncouples lipid droplet accumulation in adipose tissue macrophages from inflammation and metabolic dysregulation [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(6): 1811-1822. e6.
- (收稿日期: 2021-04-10 修回日期: 2021-10-15)