·研究原著·

# 癫痫持续状态下幼年癫痫大鼠海马区星形胶质细胞：大麻素2型受体调控MAPK通路的作用

曹庆隽，杨凤华，王　华(中国医科大学附属盛京医院小儿神经内科，辽宁省沈阳市　110004)

**DOI:**10.3969/j.issn.2095-4344.2868　**ORCID:** 0000-0001-5767-8662(曹庆隽)

文章快速阅读：

文章特点—

(1)星形胶质细胞和信号转导途径相互影响，在癫痫的发病中发挥重要作用；

(2)大麻素 2 型受体在癫痫中有一定作用，其可作用于海马区的星形胶质细胞，也可以作用 MAPK 通路中的 ERK、JNK 和 P38 分支通路；

(3)大麻素 2 型受体可以通过调控 MAPK 通路 ERK、p38、JNK 蛋白，从而影响大鼠海马区星形胶质细胞，来减轻癫痫持续状态后神经元及星形胶质细胞的损害。

实验动物及分组：
(1)健康雄性 SD 大鼠 40 只；
(2)随机分为 4 组：正常对照组、癫痫模型组、JWH133 组、AM630 组。

干预：
(1)正常对照组给予生理盐水；
(2)其他 3 组大鼠腹腔注射氯化锂和匹鲁卡品建立癫痫模型。
(3)JWH133 组癫痫终止后，每 6 h 腹腔注射 CB2R 激动剂 JWH133(1.5 mg/kg)；
(4)AM630 组癫痫终止后，每 6 h 先腹腔注射大麻素 2 型受体拮抗剂 AM630 (1 mg/kg)，15 min 后注射大麻素 2 型受体激动剂 JWH133 (1.5 mg/kg)。

取材及检测指标：
(1)发生癫痫持续状态后 24 h 取脑组织；
(2)采用免疫荧光检测海马组织 GFAP 与 p-ERK、p-p38、p-JNK 的共表达；
(3)Real-time PCR 检测海马组织 GFAP mRNA 的表达。

结论：
大麻素 2 型受体可以通过调控 MAPK 通路 ERK、p38、JNK 蛋白，从而影响癫痫持续状态下幼年癫痫大鼠海马区星形胶质细胞。

曹庆隽，女，1985 年生，山东省牟平县人，汉族，2016 年中国医科大学毕业，博士，主要从事儿科神经系统疾病的研究。

通讯作者：王华，博士，教授，博士生导师，主任医师，中国医科大学附属盛京医院小儿神经内科，辽宁省沈阳市　110004

文献标识码:B
投稿日期：2018-12-14
送审日期：2018-12-19
采用日期：2019-09-07
在线日期：2020-05-30

文题释义：

**癫痫持续状态：**指连续癫痫发作、持续时间超过 10−30 min 以上或每次癫痫发作间隔时间短、没有意识清醒期，或者是出现了短暂的意识清醒马上又出现二次发作。分型如下：①局灶性癫痫持续状态：意识清醒，仅局部某个部位抽动或者感觉异常，对人体的影响相对较小；②全面性癫痫持续状态：在发作期间意识完全丧失或稍有缓解马上又出现意识丧失，对人体损害较大，易引起脑组织大量的缺氧，严重时可以造成患者的死亡，应及早干预。

**丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)：**是众多信号蛋白的一种，其激活调控一系列细胞活动。活化的 MAPK 通过磷酸化核转录因子、细胞骨架蛋白及酶类等参与细胞增殖、分化、转化及凋亡的调节。

摘要

**背景：**星形胶质细胞增生是癫痫的重要形态学改变，增生的胶质细胞可产生细胞因子，继而激活 JAK/STAT 信号转导进一步促进胶质细胞的增生，从而影响癫痫的发生及复发，星形胶质细胞和信号转导途径相互影响，在癫痫的发病中发挥重要作用。

**目的：**探讨大麻素 2 型受体对癫痫持续状态幼年大鼠星形胶质细胞和 MAPK 通路 ERK、p38、JNK 蛋白激活的影响。

**方法：**健康雄性 SD 大鼠 40 只(18−21 d 龄)，随机分为 4 组：正常对照组、癫痫模型组、大麻素 2 型受体激动剂 JWH133 组、大麻素 2 型受体拮抗剂 AM630 组，正常对照组仅给予生理盐水，其他各组大鼠腹腔注射氯化锂和匹鲁卡品建立癫痫模型，并分别进行不同干预。发生癫痫持续状态后 24 h 取脑组织，采用免疫荧光检测海马组织 GFAP 与 p-ERK、p-p38、p-JNK 的共表达，Real-time PCR 检测海马组织 GFAP mRNA 的表达。

**结果与结论：**①癫痫模型组 GFAP/p-ERK、GFAP/p-p38 共表达较正常对照组增多($P < 0.05$)，JWH133 组较癫痫模型组减少($P < 0.05$)，AM630 组较 JWH133 组增多($P < 0.05$)；②癫痫模型组 GFAP/p-JNK 共表达较正常对照组减少($P < 0.05$)，JWH133 组较癫痫模型组增多($P < 0.05$)，AM630 组较 JWH133 组减少($P < 0.05$)；③癫痫模型组 GFAP 的 mRNA 表达较正常对照组减少($P < 0.05$)，JWH133 组较癫痫模型组有明显增多($P < 0.05$)，而 AM630 组 GFAP 的表达降低($P < 0.05$)；④结果表明，大麻素 2 型受体可以通过调控 MAPK 通路 ERK、p38、JNK 蛋白，从而影响癫痫持续状态下幼年癫痫大鼠海马区星形胶质细胞。

**关键词：**
*大麻素受体 2；癫痫持续状态；星形胶质细胞；通路；幼年大鼠；实验*
**中图分类号：**R459.9；R318；R742.1
**基金资助：**
*辽宁省科学技术计划(2014225007)，项目负责人：王华*

**缩略语：**
*大麻素 2 型受体：cannabinoid type 2 receptor，CB2R*

Cao Qingjun, MD, Department of Pediatric Neurology in Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Corresponding author: Wang Hua, MD, Professor, Doctoral supervisor, Chief physician, Department of Pediatric Neurology in Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

# Hippocampal astrocytes in juvenile rats with persistent epilepsy: the role of cannabinoid receptor type 2 in regulating MAPK pathway

Cao Qingjun, Yang Fenghua, Wang Hua (Department of Pediatric Neurology in Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China)

**Abstract**

**BACKGROUND:** Astrocyte proliferation is an important morphological change in epilepsy. Proliferated glial cells can produce cytokines, and in turn activates JAK/STAT signal transduction to promote glial cell proliferation, which affects the occurrence and recurrence of epilepsy. Astrocytes and signal transduction pathways interact with each other to play a role in the pathogenesis of epilepsy.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of cannabinoid receptor type 2 (CB2R) on the activation of ERK, p38, and JNK proteins in astrocytes and MAPK pathways in juvenile rats with persistent epilepsy.

**METHODS:** Forty healthy male Sprague-Dawley rats (18−21 days old) were randomly divided into four groups: normal control group, epilepsy model group, CB2R agonist JWH133 group, CB2R antagonist AM630 group. The normal control group was given only normal saline. In the other groups, rats were intraperitoneally injected with lithium chloride and pilocarpine to establish epilepsy models, and different interventions were performed. Twenty-four hours after the onset of epilepsy, brain tissues were taken. Co-expression of GFAP and p-ERK, p-p38, and p-JNK in hippocampal tissue was detected by immunofluorescence. Real-time PCR was used to detect the expression of GFAP mRNA in hippocampal tissue.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The co-expression of GFAP/p-ERK and GFAP/p-p38 was significantly higher in the epilepsy model group than the normal control group ($P < 0.05$), significantly lower in the JWH133 group than the epilepsy model group ($P < 0.05$), and significantly higher in the AM630 group than the JWH133 group ($P < 0.05$). The co-expression of GFAP/p-JNK was significantly lower in the epilepsy model group than in normal control group ($P < 0.05$), significantly higher in the JWH133 group than the epilepsy model group ($P < 0.05$), and significantly lower in the AM630 group than the JWH133 group ($P < 0.05$). The mRNA expression of GFAP was significantly decreased in the epilepsy model group compared with the normal control group ($P < 0.05$), significantly increased in the JWH133 group compared with the epilepsy model group ($P < 0.05$), and significantly reduced in the AM630 group compared with the JWH133 group ($P < 0.05$). Therefore, CB2R can regulate the expression of ERK, p38, JNK proteins in the MAPK pathway, thereby affecting astrocytes in the hippocampus of juvenile rats with persistent epilepsy.

**Key words:** cannabinoid receptor type 2; status epilepticus; astrocytes; MAPK pathway; juvenile rats; experiment

**Funding:** the Science and Technology Plan of Liaoning Province, No. 2014225007 (to WH)

## 0 引言 Introduction

颞叶癫痫是难治性癫痫最常见的类型，占癫痫总发病率的20%[1]，严重影响患者的学习、生活及家庭，成为神经系统疾病的一个顽疾。癫痫的发病机制十分复杂，至今未完全搞清楚，目前认为癫痫的发病机制与离子通道、神经递质、免疫、神经胶质细胞的改变有关[2]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases，MAPKs)是众多信号蛋白的一种，其激活调控一系列细胞活动。活化的MAPK通过磷酸化核转录因子、细胞骨架蛋白及酶类等参与细胞增殖、分化、转化及凋亡的调节[3-5]。MAPK通路包括4种下游途径：细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase，ERK)、c-Jun氨基酸末端激酶(c-Jun N-terminal kinase，JNK)、P38和ERK5/BMK1。大麻素2型受体(cannabinoid receptor type 2，CB2R)属于G蛋白偶联受体超家族，在中枢神经系统中有广泛的分布，比如大脑皮质、胼胝体、海马、基底节区、小脑。研究显示，CB2R在癫痫持续状态下幼年癫痫大鼠海马区呈现高表达，随癫痫发作后时间的延长达到高峰；CB2R通过调节PI3K/AKT通路增加“癫痫微环境”下星形胶质细胞增殖活性。由此可见，大麻素类物质对癫痫的发作有抑制作用，能够减轻癫痫对局部脑组织的损害。基于以上研究背景，该研究旨在通过检测MAPK通路中的不同蛋白来阐明CB2R对幼年大鼠癫痫持续状态后的作用，以此来研究CB2R对癫痫的意义。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年9月至2018年9月在中国医科大学附属盛京医院实验室完成。

1.3 材料 健康雄性SD大鼠40只，18−21 d龄，体质量30−50 g，购自辽宁长生生物有限公司，保持12 h/12 h明/暗周期，室温维持在22−24 ℃，自由进食和饮水。40只SD大鼠随机分为4组，每组10只：正常对照组、癫痫模型组、CB2R激动剂JWH133组和CB2R拮抗剂AM630组。

1.4 实验方法

1.4.1 癫痫动物模型建立 首先大鼠经腹腔注射氯化锂(3 mEq/kg，即127 mg/kg)，18−20 h后腹腔注射匹鲁卡品(30 mg/kg)，在注射匹鲁卡品前30 min腹腔注射溴化甲基东莨菪碱(1 mg/kg)以拮抗匹鲁卡品外周胆碱能反应，每30 min腹腔注射1次10 mg/kg匹鲁卡品，直到出现癫痫持续状态，每只大鼠匹鲁卡品注射剂量≤60 mg/kg。正常对照组以生理盐水代替氯化锂及匹鲁卡品，其他处理同上。观察大鼠腹腔注射匹鲁卡品后行为学变化，痫性发作等级评价标准采用Racine(1972年)分级标准：0级：无反应；Ⅰ级：耳面部肌肉抽搐；Ⅱ级：以点头或甩尾为主的肌肉抽搐；Ⅲ级：单侧肢体的阵挛及抽搐；Ⅳ级：双侧肢体阵挛或全身强直阵挛发作，伴有身体直立；Ⅴ级：抽搐，持续站立、身体背曲强直、跌倒。根据以上评价标准，经过Ⅳ级以上发作后进入惊厥持续状态认为造模成功，为减少动物死亡率，在癫痫持续状态后90 min给予地西泮(10 mg/kg)腹腔注射以终止癫痫持续状态，监测癫痫持续状态脑电图。

1.4.2 造模后各组干预情况 正常对照组：正常大鼠腹腔注射生理盐水；癫痫模型组：腹腔注射氯化锂和匹鲁卡品

| 组织工程实验动物造模过程的相关问题 | |
|---|---|
| 造模目的： | 观察 CB2R 对幼年模型大鼠癫痫持续状态后的作用 |
| 选择动物的基本资料： | 健康雄性 SD 大鼠 40 只，18−21 d 龄，体质量 30−50 g，购自辽宁长生生物有限公司 |
| 模型与所研究疾病的关系： | 研究显示，CB2R 在癫痫持续状态下幼年癫痫大鼠海马区呈现高表达 |
| 造模技术描述： | 腹腔注射氯化锂和匹鲁卡品建立癫痫模型 |
| 动物数量及分组方法： | 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组，每组 10 只：正常对照组、癫痫模型组、CB2R 激动剂 JWH133 组和 CB2R 拮抗剂 AM630 组 |
| 造模成功评价指标： | 痫性发作等级评价标准采用 Racine(1972 年)分级标准，经过Ⅳ级以上发作后进入惊厥持续状态认为造模成功 |
| 造模后取材及观察指标： | 癫痫持续状态后 24 h 取大鼠脑海马组织，观察 CB2R 对癫痫发作的影响、CB2R 对大鼠海马星形胶质细胞 MAPK 通路的影响、癫痫幼年大鼠海马 GFAP mRNA 的动态表达 |
| 伦理委员会批准： | 该实验经过中国医科大学附属盛京医院动物实验伦理委员会批准，批准号为 2018PS201K |

造模，发生癫痫持续状态后24 h处死采集标本；JWH133组：腹腔注射氯化锂和匹鲁卡品造模，癫痫终止后，每6 h腹腔注射CB2R激动剂JWH133(参考剂量1.5 mg/kg)，发生癫痫持续状态后24 h处死采集标本；AM630组：模型+CB2R激动剂+CB2R拮抗剂：腹腔注射氯化锂和匹鲁卡品造模，癫痫终止后，每6 h先腹腔注射拮抗剂AM630(参考剂量1 mg/kg)，15 min后注射CB2R激动剂JWH133 (参考剂量1.5 mg/kg)，发生癫痫持续状态后24 h处死采集标本。

1.4.3 标本采集及制备 实验动物分别于癫痫持续状态后24 h处死。先将实验动物(每组10只)给予10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔麻醉，经左心室灌流(生理盐水和40 g/L多聚甲醛)后迅速开颅取脑，一部分脑组织于40 g/L多聚甲醛中低温避光固定，脱水、透明、浸蜡、包埋，制成5 μm厚的组织切片用于免疫荧光等检测，另一部分脑组织放入液氮速冻转至−80 ℃保存用于后续Real-time PCR检测。

1.4.4 免疫荧光检测大鼠脑海马组织中GFAP与p-ERK、p-p38、p-JNK的共表达 以GFAP来标记星形胶质细胞，应用免疫荧光方法对海马组织中星形胶质细胞进行鉴定。p-ERK、p-p38、p-JNK是GFAP通路中的主要3个通路分支，分别是ERK、p38、JNK的活化形式，所以检测p-ERK、p-p38、p-JNK的免疫荧光表达。

取出多聚甲醛固定的脑组织，进行石蜡包埋、切片、免疫荧光前准备，抗原热修复，体积分数为3%过氧化氢以及体积分数为5%−10%血清封闭非特异性抗体，一抗稀释浓度GFAP/p-P38(1∶50/1∶200)，GFAP/p-ERK1/2(1∶50/1∶50)，GFAP/p-JNK(1∶50/1∶100)。按照上述组合滴加抗体共同孵育，滴加至完全覆盖细胞，4 ℃孵育过夜，浸泡在PBS中5 min×3次，滴加荧光二抗，二者均用PBS(1∶200)稀释(以下操作注意避光)，滴加至完全覆盖组织，室温孵育90 min；浸泡在PBS中5 min×3次，滴加DAPI至完全覆盖组织以复染核，浸泡在PBS中5 min×3次，胶头滴管滴加半滴抗荧光淬灭剂，盖玻片封固。

随机选取5个视野，分别计数每个视野p-ERK、p-p38、p-JNK与GFAP共表达的星形胶质细胞数，并除以总GFAP阳性的细胞数，计算出双重荧光表达率，最后取平均值。

1.4.5 Real-time PCR检测大鼠脑海马组织中GFAP mRNA的表达 取出−80 ℃冷冻保存的幼年大鼠海马组织，在EP管中加入50 mg组织与1 mL Trizol，剪碎脑组织并用5 mL注射器抽打，提取细胞沉淀中的总RNA，紫外分光光度计测定总RNA的浓度和纯度，按Takara(RR047A)反转录试剂盒条件配20 μL体系进行反转录，取出标本，按Takara(RR047A)扩增试剂盒说明加入引物(Takara公司设计合成，见**表1**)及试剂配20 μL体系进行PCR扩增，反转录得到cDNA；新鲜稀释阳性模板，取不同梯度上机，得出RT-PCR标准曲线；上样，每个样本2个指标，每个指标3个重复孔。

**表 1 引物序列**

Table 1 Primer sequences

| 基因 | 引物序列 |
|---|---|
| β-actin | F：5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3' |
| | R：5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3' |
| GFAP | F：5'-TAG GAG TGG TAG GGC AGA CTT G -3' |
| | R：5'-GCA ACC AGG AAT AGA CCT TCA CAA-3' |

1.5 主要观察指标 ①CB2R对癫痫发作的影响；②CB2R对大鼠海马星形胶质细胞MAPK通路的影响；③癫痫幼年大鼠海马GFAP mRNA的动态表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 12.0软件进行分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两组均值比较在方差齐时用$t$ 检验，若方差不齐用$K$个样本独立检验，$P < 0.05$为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 癫痫模型的建立 每只幼年大鼠均在匹鲁卡品注射后8−20 min出现临床症状，从最开始有立毛、流泪等外周胆碱症状，随之出现了少动、凝视、眨眼、面部痉挛、点头样动作、单侧肢体及双侧肢体抽搐、双下肢强直、躯干背曲强直、站立、跌倒或反转，呈现强直−阵挛持续状态，在10−40 min均已经达到Ⅳ级。

癫痫发作达到持续状态共30只幼鼠，24 h内有频繁发作，发作后精神状态差、食欲减退、活动减少，部分幼年大鼠24 h后仍有间断发作，持续时间逐渐减少，可自行缓解，发作形式同急性期。

2.2 CB2R减轻癫痫发作 因为各组均在发生癫痫持续状态24 h后处死大鼠，在应用地西泮终止惊厥持续状态后，癫痫模型组、JWH133组、AM630组有短时间的惊厥终止，

但在惊厥持续状态后24 h内仍有间断惊厥发作，并且每组均有大鼠可达Ⅳ级、Ⅴ级。癫痫模型组、JWH133组、AM630组惊厥持续状态终止后仍可达Ⅳ级、Ⅴ级的比率分别为40%(4/10)，20%(2/10)，50%(5/10)，各组再次达到Ⅳ级、Ⅴ级的持续时间不等，组内差异较大，无明显规律。癫痫模型组、JWH133组、AM630组在大鼠未发作阶段均精神状态差、食欲减退、活动减少。正常对照组大鼠正常饮食活动，无一例惊厥发作。

2.3 CB2R对大鼠海马星形胶质细胞MAPK通路的影响

2.3.1 GFAP+p-ERK荧光显示结果 见**图1**。癫痫模型组匹鲁卡品致幼年大鼠癫痫持续状态后，其GFAP+p-ERK共表达较正常对照组海马区CA1、CA3和DG区有明显的增加，以CA1区较明显($P < 0.05$)，而JWH133组较癫痫模型组有所减少($P < 0.05$)，JWH133组与正常对照组相差不多；AM630组在经过激动剂JWH133和拮抗剂AM630处理后，GFAP+p-ERK共表达较JWH133组有明显增多($P < 0.05$)，并且较癫痫模型组也有所增加，双重荧光比值分析见**表2**和**图2**。

**表 2 CA1 区免疫双重荧光检测 GFAP 与 p-ERK、p-p38、p-JNK 共表达荧光比值** ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Fluorescence ratio of co-expression of GFAP and p-ERK, p-p38, and p-JNK in CA1 detected by immunofluorescence

| 双荧光 | 正常对照组 | 癫痫模型组 | JWH133 组 | AM630 组 |
|---|---|---|---|---|
| GFAP/p-ERK | 0.363±0.021 | 0.565±0.121 | 0.271±0.073 | 0.623±0.110 |
| GFAP/p-p38 | 0.226±0.034 | 0.412±0.087 | 0.193±0.021 | 0.326±0.056 |
| GFAP/p-JNK | 0.428±0.085 | 0.167±0.042 | 0.330±0.045 | 0.205±0.064 |

2.3.2 GFAP+p-p38荧光显示结果 见**图3**。癫痫模型组匹鲁卡品致幼年大鼠癫痫持续状态后，其GFAP+p-p38共表达较正常对照组海马区CA1、CA3和DG区有明显增加，以CA1区较明显，而JWH133组较癫痫模型组有所减少，JWH133组与正常对照组相差不多；AM630组在经过激动剂JWH133和拮抗剂AM630处理后，GFAP+p-p38共表达较JWH133组有明显增多，并且较癫痫模型组也有所增加，双重荧光比值分析见表2和**图4**。

2.3.3 GFAP+p-JNK荧光显示结果 见**图5**。正常对照组GFAP+p-JNK存在共表达，癫痫模型组匹鲁卡品致幼年大鼠癫痫持续状态后，其GFAP+p-JNK共表达较正常对照组海马区CA1、CA3和DG区有减弱，而JWH133组较癫痫模型组有增强，AM630组在经过激动剂JWH133和拮抗剂AM630处理后，GFAP+p-JNK共表达减弱，与单纯癫痫模型组无明显差异，可见通过调节CB2R会影响JNK在匹鲁卡品致幼年大鼠癫痫持续状态后的海马区表达，见表2和**图6**。

2.4 癫痫幼年大鼠海马GFAP mRNA的动态表达 癫痫模型组GFAP的mRNA表达较正常对照组减少，JWH133组较癫痫模型组有明显增多，而AM630组GFAP的表达降低，见**图7**。

## 3 讨论 Discussion

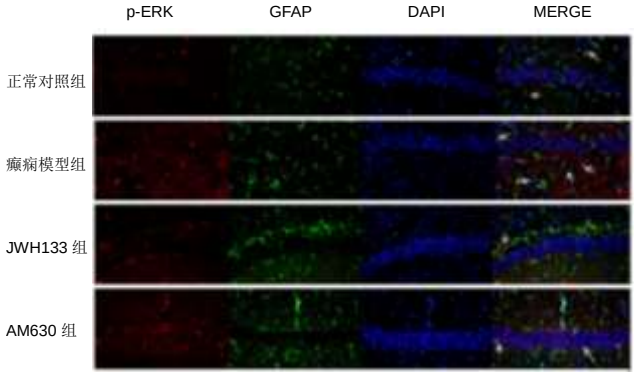
颞叶癫痫是难治性癫痫最常见的类型，占癫痫总发病率20%[1-6]，严重影响患者的学习、生活及家庭，成为神经系统疾病的一个顽疾。在儿童期可发病的癫痫疾病中，颞叶癫痫对抗癫痫药物不敏感，使患儿的癫痫发作控制不良，对其神经系统的正常发育产生较严重的影响，故应当积极控制在儿童期发作的颞叶癫痫，以减少对患儿生长发育的不良影响。

癫痫的发病机制十分复杂，至今未完全搞清楚，目前认为癫痫的发病机制与离子通道、神经递质、免疫、神经胶质细胞的改变有关[7-12]。该实验应用匹鲁卡品致癫痫持续状态模型，该模型较点燃模型及海人酸致痫大鼠模型在行为、脑电图、病理等特性上与人类颞叶癫痫有很高的相似性[13-20]，在此基础上研究CB2R对幼年大鼠发生癫痫持续状态的作用，以及对癫痫持续状态海马组织中星形胶质细胞和MAPK信号通路的影响。

在匹鲁卡品诱导持续状态癫痫模型组幼年大鼠，给予地西泮注射终止其惊厥持续状态后仍有间断的Ⅳ级、Ⅴ级惊厥发作，而在给予CB2R激动剂JWH133后，其再次发生Ⅳ级、Ⅴ级惊厥的频率较癫痫模型组有明显减少($P < 0.05$)，而这种保护作用在给予CB2R拮抗剂AM630后被明显抑制，JWH133组与AM630组再次发生Ⅳ级、Ⅴ级惊厥的概率也有明显差异($P < 0.05$)，可见激活CB2R可以减轻癫痫大鼠的临床发作，而抑制CB2R后大鼠癫痫发作加重，可见调控CB2R可以影响癫痫的发作。

在既往的研究中多针对神经元的活性和增殖情况，对于星形胶质细胞的研究较少，虽然癫痫的发生是因为大脑神经元异常放电所引起的，但是作为中枢神经系统中数量最多、体积最大的星形胶质细胞在癫痫发生中的作用也是至关重要的[21-28]。既往认为星形胶质细胞主要是对神经元提供营养和支持作用。现在随着研究的深入，发现星形胶质细胞可以通过调动离子和神经递质来作用于神经元，例如星形胶质细胞调控信号通路、谷氨酸受体、水和钾、钙离子代谢、缝隙连接和炎症免疫反应，这些作用都与癫痫的发病密切相关[29-34]。现在对癫痫的信号通路研究较为广泛，如MAPK、NF-κB、mTOR、Wnt等[33-37]，该实验主要对MAPK通路进行研究。

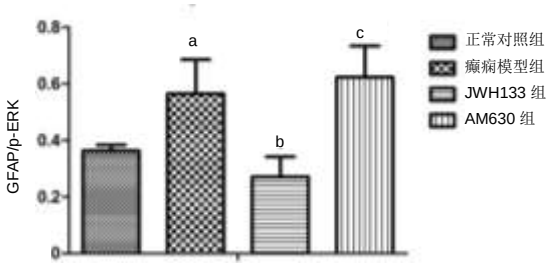
MAPKs是众多信号蛋白的一种，其激活调控一系列细胞活动。活化的MAPK通过磷酸化核转录因子、细胞骨架蛋白及酶类等参与细胞增殖、分化、转化及凋亡的调节[14-22]。MAPK 信号转导是以三级激酶级联的方式进行的，首先MAPK激酶的激酶(mitogen-activated protein kinase kinase kinase，MAKKK)受有丝分裂原刺激磷酸化而激活，在此基础上MAPKKK 转而磷酸化激活MAPK激酶(mitogen-activated protein kinase kinase，MAPKK)，最后由MAPKK磷酸化激活MAPK，使其活化进而转入核内。MAPK通路包括4种下游途径：ERK、JNK、P38和ERK5/BMK1。XU等[38]通过对脊髓基因的扩增、表达分析，




图注：箭头所示为海马星形胶质细胞。癫痫模型组 GFAP+p-ERK 共表达较正常对照组增多，而 JWH133 组较癫痫模型组有所减少，AM630 组在经过激动剂 JWH133 和拮抗剂 AM630 处理后，GFAP+p-ERK 共表达较 JWH133 组有明显增多，并且较癫痫模型组也有所增加

**图 1　CA1 区免疫双重荧光检测 GFAP 与 p-ERK 共表达(红：p-ERK；绿：GFAP，×400)**

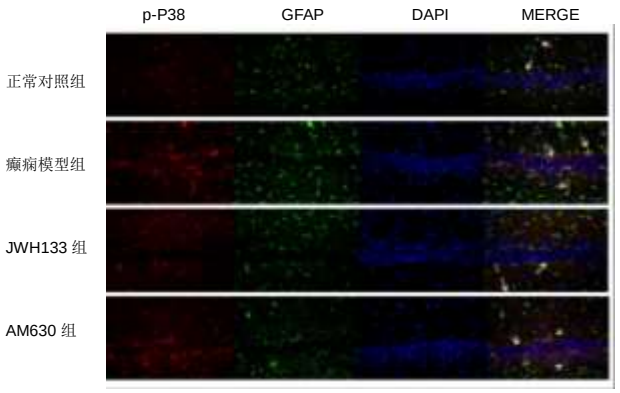
Figure 1　Co-expression of GFAP and p-ERK in CA1 region detected by double immunofluorescence staining (red: p-ERK; green: GFAP, ×400)




图注：与正常对照组比较，$^{a}P < 0.05$；与癫痫模型组比较，$^{b}P < 0.05$，与 JWH133 组比较，$^{c}P < 0.05$

**图 2　CA1 区免疫双重荧光检测 GFAP 与 p-ERK 共表达**

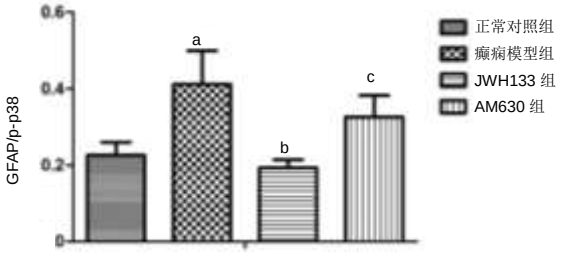
Figure 2　Co-expression of GFAP and p-ERK in CA1 region detected by double immunofluorescence staining




图注：箭头所示为海马星形胶质细胞。癫痫模型组 GFAP+p-p38 共表达较正常对照组增加，JWH133 组较癫痫模型组有所减少，AM630 组在经过激动剂 JWH133 和拮抗剂 AM630 处理后，GFAP+p-p38 共表达较 JWH133 组有明显增多，并且较癫痫模型组也有所增加

**图 3　CA1 区免疫双重荧光检测 GFAP 与 p-p38 共表达(红：p-p38；绿：GFAP，×400)**

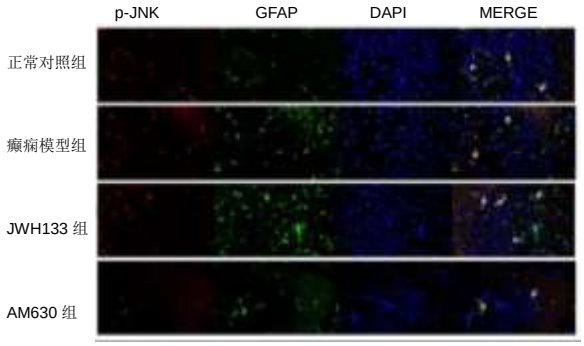
Figure 3　Co-expression of GFAP and p-p38 in CA1 region detected by double immunofluorescence staining (red: p-p38; green: GFAP, ×400)




图注：与正常对照组比较，$^{a}P < 0.05$；与癫痫模型组比较，$^{b}P < 0.05$；与 JWH133 组比较，$^{c}P < 0.05$

**图 4　CA1 区免疫双重荧光检测 GFAP 与 p-p38 共表达**

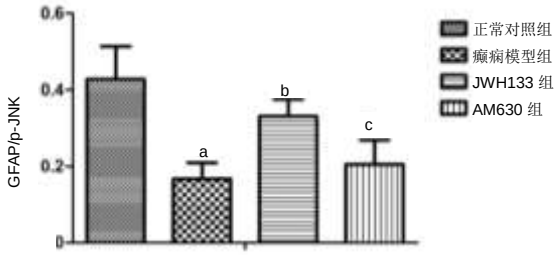
Figure 4　Co-expression of GFAP and p-p38 in CA1 region detected by double immunofluorescence staining




图注：箭头所示为海马星形胶质细胞。正常对照组 GFAP+p-JNK 共表达非常少，癫痫模型组较正常对照组有少许减弱，而 JWH133 组较癫痫模型组略有增强，但较正常对照组变化不大，AM630 组在经过激动剂 JWH133 和拮抗剂 AM630 处理后，GFAP+p-JNK 共表达近乎消失

**图 5　CA1 区免疫双重荧光检测 GFAP 与 p-JNK 共表达(红：p-JNK；绿：GFAP，×400)**

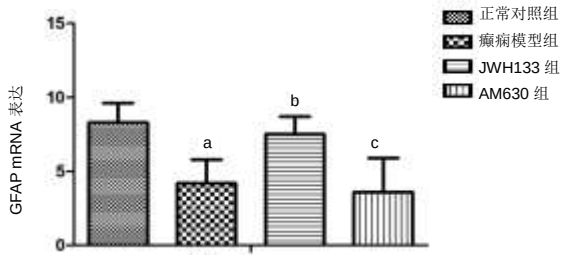
Figure 5　Co-expression of GFAP and p-JNK in CA1 region detected by double immunofluorescence staining (red: p-JNK; green: GFAP, ×400)




图注：与正常对照组比较，$^{a}P < 0.05$；与癫痫模型组比较，$^{b}P < 0.05$；与 JWH133 组比较，$^{c}P < 0.05$

**图 6　CA1 区免疫双重荧光检测 GFAP 与 p-JNK 共表达**

Figure 6　Co-expression of GFAP and p-JNK in CA1 region detected by immunofluorescence




图注：与正常对照组比较，$^{a}P < 0.05$；与癫痫模型组比较，$^{b}P < 0.05$；与 JWH133 组比较，$^{c}P < 0.05$

**图 7　各组大鼠大脑海马组织 GFAP mRNA 的表达**

Figure 7　GFAP mRNA expression in the hippocampus of rats

显示CB2R激活可以通过MAPK途径对紫杉醇导致的神经病理改变起到保护作用。BALENQA等[39]通过对人类特殊易感细胞HEK293细胞进行实验，发现CB2R可以激活ERK1/ERK2信号通路。SU等[40]发现CB受体激动剂WIN55、212-2和脂肪酸酰胺水解酶抑制剂URB597对慢性低灌注导致的神经元凋亡有抑制作用，是通过抑制c-Jun N端激酶信号通路而实现的。WANG等[41]在实验性膀胱炎中发现有CB2R的激活，是通过MAPK通路而实现的，其中ERK1/2、p38和JNK均有参与，但是3条通路之间的交叉并未提及。该实验通过检测MAPK通路中的不同蛋白来阐明CB2R对幼年大鼠癫痫持续状态后的作用，以此来研究CB2R对癫痫的意义。

GFAP作为星形胶质细胞特异性的表达蛋白，Real-time PCR结果显示：癫痫模型组较正常对照组GFAP mRNA表达减少，考虑在癫痫持续状态后24 h处死大鼠，星形胶质细胞仍处于缺血缺氧状态，故GFAP表达减少，而JWH133能够减少癫痫持续状态对星形胶质细胞的损害，然而通过何种作用机制来保护AST，需要进一步研究。实验以GFAP与MAPK通路中ERK、JNK和P38活化后的形式，即p-ERK、p-JNK和p-p38进行双标检测。GFAP与p-ERK双标在CA1、CA3、DG区均有共同表达，癫痫模型组较正常对照组增多，说明癫痫持续状态后可以促使星形胶质细胞内的ERK激活，使其磷酸化，继续进行下一步通路的传递，而JWH133组GFAP与p-ERK的共表达较癫痫模型组有所减少，但在AM630组中共表达再次增多，说明应用CB2R选择性激动剂JWH133可以抑制星形胶质细胞中ERK的活化，而这种作用可以被CB2R抑制剂AM630所减弱，CB2R可以对癫痫持续状态后的星形胶质细胞的ERK进行调控；而同样在GFAP与p-p38的共表达中，癫痫模型组较正常对照组明显增多，说明星形胶质细胞内的p38激活，而这种激活却在应用JWH133后有所缓解，在AM630组中再次增多，可见CB2R同样可以作用星形胶质细胞中的p38通道；但是在p-JNK与GFAP的共表达中，却没有得到与GFAP与p-ERK和p-p38共表达相类似的结果。癫痫模型组中p-JNK与GFAP表达较正常对照组有所减少，JWH133组较癫痫模型组增多，而AM630组再次减少，说明在癫痫持续状态后MAPK通路中的JNK被抑制，但是在JWH133的作用下却可以引起JNK的活化增多，使用AM630后进一步抑制其活化作用。整体可见CB2R在癫痫中有一定作用，其可作用于海马区的星形胶质细胞，并且可以作用MAPK通路中的ERK、JNK和P38分支通路。

实验在成功应用匹鲁卡品诱导癫痫持续状态后，应用CB2R选择性激动剂JWH133及抑制剂AM630，观察癫痫持续状态发作后的癫痫发作强度。所有动物均在癫痫持续状态后24 h处死，癫痫本身除了惊厥急性期对大鼠有影响，并且随着年龄增长，对大鼠的认知及行为也均有影响，所以在以后的研究中要对大鼠的生长进行一个动态监测，同时检测不同时间段MAPK通路中一系列蛋白表达变化情况。MAPK通路非常复杂，最重要的3条通路分别是ERK、p38和JNK，而通路中各蛋白之间的相互作用非常复杂，该研究只针对通路中的3个主要蛋白进行研究，但是也只对蛋白的激活做了检测，并未对蛋白通路阻断后星形胶质细胞的变化及CB2R的激活进行研究。癫痫持续状态后急性期有MAPK通路中3个分支通路的改变，分别是ERK、p38和JNK与星形胶质细胞间的共表达，发现癫痫持续状态后急性期海马组织中p-ERK、p-p38激活状态与星形胶质细胞共表达明显增加，增加CB2R的活性可以抑制星形胶质细胞中p-ERK、p-p38激活，而p-JNK在癫痫持续状态后的表达有所减少，增加CB2R的活性却能够促进星形胶质细胞中p-JNK激活。该实验是应用动物标本进行研究，为明确星形胶质细胞的作用与影响因素，将在细胞层面进行深一层次研究。

*作者贡献*：实验设计、实施均为曹庆隽，实验评估为杨凤华、王华。

*经费支持*：该文章接受了“辽宁省科学技术计划(2014225007)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

*利益冲突*：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

*机构伦理问题*：实验方案经中国医科大学附属盛京医院动物实验伦理委员会批准，批准号为 2018PS201K。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

*写作指南*：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

*文章查重*：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

*文章外审*：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

*生物统计学声明*：文章统计学方法已经通过中国医科大学附属第一医院生物统计学专家审核。

*文章版权*：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

*开放获取声明*：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

[1] DANZER SC. Contributions of Adult-Generated Granule Cells to Hippocampal Pathology in Temporal Lobe Epilepsy: A Neuronal Bestiary. Brain Plast. 2018;3(2):169-181.

[2] MOSHÉ SL, PERUCCA E, RYVLIN P, et al. Epilepsy: new advances. Lancet. 2015;385(9971):884-898.

[3] CHO CH. New mechanism for glutamate hypothesis in epilepsy. Front Cell Neurosci. 2013;7:127.

[4] LIANG J, CHAO D, SANDHU HK, et al. δ-Opioid receptors up-regulate excitatory amino acid transporters in mouse astrocytes. Br J Pharmacol. 2014;171(23):5417-5430.

[5] BIZIÈRE K, CHAMBON JP. Animal models of epilepsy and experimental seizures. Rev Neurol(Paris). 1987;143(5): 329-340.
[6] JANSZKY J, TÉNYI D, BÓNÉ B. Valproate in the treatment of epilepsy and status epilepticus. Ideggyogy Sz. 2017;70(7-8): 258-264.
[7] MASLIAH-PLANCHON J, GARINET S, PASMANT E. RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action. Oncotarget. 2016;7(25):38892-38907.
[8] LAKE D, CORRÊA SA, MÜLLER J. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. Cell Mol Life Sci. 2016;73(23):4397-4413.
[9] RAUCH N, RUKHLENKO OS, KOLCH W, et al. MAPK kinase signalling dynamics regulate cell fate decisions and drug resistance. Curr Opin Struct Biol. 2016;41:151-158.
[10] FISHER RS. Animal models of the epilepsies. Brain Res Brain Res Rev. 1989;14(3):245-278.
[11] BRODIE MJ, ELDER AT, KWAN P. Epilepsy in later life. Lancet Neurol. 2009;8(11):1019-1030.
[12] LAZAROWSKI A, CZORNYJ L. Potential role of multidrug resistant proteins in refractory epilepsy and antiepileptic drugs interactions. Drug Metabol Drug Interact. 2011;26(1):21-26.
[13] MINJAREZ B, CAMARENA HO, HARAMATI J, et al. Behavioral changes in models of chemoconvulsant-induced epilepsy: A review. Neurosci Biobehav Rev. 2017;83:373-380.
[14] LEE M, CHOI BY, SUH SW. Unexpected Effects of Acetylcholine Precursors on Pilocarpine Seizure- Induced Neuronal Death. Curr Neuropharmacol. 2018;16(1):51-58.
[15] KANDRATAVICIUS L, BALISTA PA, LOPES-AGUIAR C, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. Neuropsychiatr Dis Treat. 2014;10:1693-1705.
[16] SAUVANT C, NOWAK M, WIRTH C, et al. Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38. Int J Cancer. 2008;123(11):2532-2542.
[17] COPPOLA G, AURICCHIO G, FEDERICO R, et al. Lamotrigine versus valproic acid as first-line monotherapy in newly diagnosed typical absence seizures: an open-label, randomized, parallel-group study. Epilepsia. 2004;45(9): 1049-1053.
[18] REGESTA G, TANGANELLI P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. Epilepsy Res.1999;34(2-3): 109-122.
[19] BORST P, EVERS R, KOOL M, et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. J Natl Cancer Inst. 2000;92(16):1295-1302.
[20] CÁRCEL-TRULLOLS J, KOVÁCS AD, PEARCE DA. Cell biology of the NCL proteins: What they do and don't do. Biochim Biophys Acta. 2015;1852(10 Pt B):2242-2255.
[21] EID T, LEE TW, PATRYLO P, et al. Astrocytes and Glutamine Synthetase in Epileptogenesis. J Neurosci Res. 2019;97(11): 1345-1362.
[22] KOZELA E, JUKNAT A, VOGEL Z. Modulation of Astrocyte Activity by Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid. Int J Mol Sci. 2017;18(8): E1669.
[23] WIXEY JA, CHAND KK, COLDITZ PB, et al. Review: Neuroinflammation in intrauterine growth restriction. Placenta. 2017;54:117-124.
[24] NAVARRO G, BORROTO-ESCUELA DO, FUXE K, et al. Purinergic signaling in Parkinson's disease. Relevance for treatment. Neuropharmacology. 2016;104:161-168.
[25] MILOSO M, SCUTERI A, FOUDAH D, et al. MAPKs as mediators of cell fate determination: an approach to neurodegenerative diseases. Curr Med Chem. 2008;15(6): 538-548.
[26] ZIEMBA BP, BURKE JE, MASSON G, et al. Regulation of PI3K by PKC and MARCKS: Single-Molecule Analysis of a Reconstituted Signaling Pathway. Biophys J. 2016;110(8): 1811-1825.
[27] KANNER AM, MEADOR KJ. Remember…there is more to epilepsy than seizures! Neurology. 2015;85(13):1094-1095.
[28] MAC TL, TRAN DS, QUET F, et al. Epidemiology, aetiology, and clinical management of epilepsy in Asia: a systematic review. Lancet Neurol. 2007;6(6):533-543.
[29] HUANG Y, LIU X, LIAO Y, et al. MiR-181a influences the cognitive function of epileptic rats induced by pentylenetetrazol. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(10):12861-12868.
[30] ZHANG C, HOU D, FENG X. Mir-181b Functions as Anti-Apoptotic Gene in Post-Status Epilepticus via Modulation of Nrarp and Notch Signaling Pathway. Ann Clin Lab Sci. 2015;45(5):550-555.
[31] YU PM, DING D, ZHU GX, et al. International Bureau for Epilepsy survey of children, teenagers, and young people with epilepsy: data in China. Epilepsy Behav. 2009;16(1):99-104.
[32] SRIVASTAVA A, DIXIT AB, BANERJEE J, et al. Role of inflammation and its miRNA based regulation in epilepsy: Implications for therapy. Clin Chim Acta. 2016;452:1-9.
[33] ZHENG H, TANG R, YAO Y, et al. MiR-219 Protects Against Seizure in the Kainic Acid Model of Epilepsy. Mol Neurobiol. 2016;53(1):1-7.
[34] CUI L, TAO H, WANG Y, et al. A functional polymorphism of the microRNA-146a gene is associated with susceptibility to drug-resistant epilepsy and seizures frequency. Seizure. 2015; 27:60-65.
[35] LORIGADOS PEDRE L, MORALES CHACÓN LM, OROZCO SUÁREZ S, et al. Inflammatory mediators in epilepsy. Curr Pharm Des. 2013;19(38):6766-6772.
[36] CHEN Y, LIU T, LANGFORD P, et al. Haemophilus parasuis induces activation of NF-κB and MAP kinase signaling pathways mediated by toll-like receptors. Mol Immunol. 2015; 65(2):360-366.
[37] OHNO Y. Astrocytic Kir4.1 potassium channels as a novel therapeutic target for epilepsy and mood disorders. Neural Regen Res. 2018;13(4):651-652.
[38] XU JJ, DIAZ P, BIE B, et al. Spinal gene expression profiling and pathways analysis of a CB2 agonist (MDA7)-targeted prevention of paclitaxel-induced neuropathy. Neuroscience. 2014;260:185-194.
[39] BALENGA NA, MARTÍNEZ-PINILLA E, KARGL J, et al. Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB2 receptors modulates signalling. Br J Pharmacol.2014;171(23): 5387-5406.
[40] SU SH, WU YF, LIN Q, et al. Cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 suppress chronic cerebral hypoperfusion-induced neuronal apoptosis by inhibiting c-Jun N-terminal kinase signaling. Neuroscience. 2015;301:563-575.
[41] WANG ZY, WANG P, BJORLING DE. Activation of cannabinoid receptor 2 inhibits experimental cystitis. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013;304(10):R846-853.