

环磷酸腺苷反应元件结合蛋白调控耐药性癫痫大鼠海马内源性神经营养因子的表达

李婧萱¹, 时黛¹, 伍国锋²<https://doi.org/10.12307/2023.847>

投稿日期: 2022-10-20

采用日期: 2022-11-30

修回日期: 2023-01-31

在线日期: 2023-02-14

中图分类号:

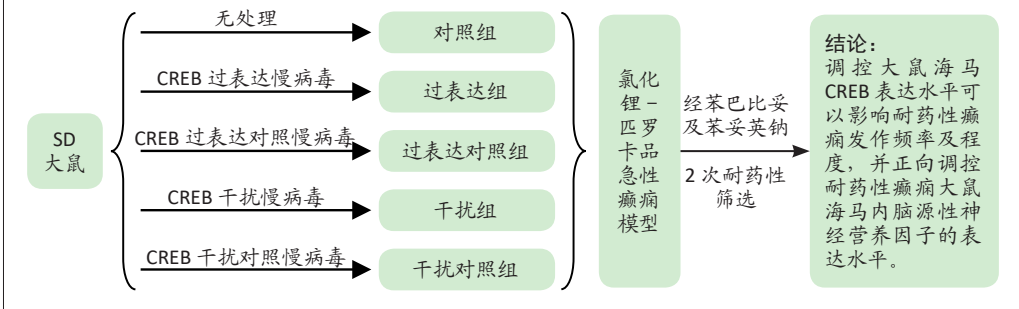
R459.9; R318; R363.2+1

文章编号:

2095-4344(2023)35-05659-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 大鼠海马 CREB 表达水平对耐药性癫痫形成过程及脑源性神经营养因子表达的影响



文题释义:

耐药性癫痫: 癫痫发作是指由于脑神经元超极化放电造成一过性大脑功能紊乱症状, 由已知或未知病因所引起, 以反复癫痫发作的倾向性和易感性为特点。癫痫患者经2种及2种以上规范的抗癫痫治疗方案后仍不能有效地控制癫痫发作, 被称为耐药性癫痫。

脑源性神经营养因子: 由1982年德国生物学家从猪脑提取液中获得, 是神经营养因子家族的一员。脑源性神经营养因子在脑组织中广泛存在, 但以海马组织和皮质含量最高。近年来研究发现, 脑源性神经营养因子与癫痫发病机制有密切的关系, 颞叶癫痫患者癫痫发作会导致脑源性神经营养因子表达增加, 可能促进海马齿状回苔藓纤维出芽, 构建了多突触环路, 导致神经元异常放电。

摘要

背景: 耐药性癫痫的形成机制尚不清楚, 其中环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein, CREB)及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)在耐药性癫痫形成过程中的作用已被广泛研究。

目的: 使用慢病毒转染法调控正常大鼠海马CREB表达水平, 探究其对耐药性癫痫形成过程及海马内BDNF表达的影响。

方法: 使用过表达慢病毒或干扰慢病毒调控大鼠海马中CREB表达水平, 检测病毒转染结果; 大鼠注射病毒7 d后构建氯化锂-匹罗卡品癫痫模型, 随后使用苯妥英钠和苯巴比妥进行耐药性筛选, 筛选出耐药性癫痫大鼠, 分为过表达组、过表达对照组、干扰组、干扰对照组, 观察筛药过程中大鼠癫痫发作次数变化, 使用蛋白质免疫印迹法及实时荧光定量PCR法检测大鼠海马中CREB及BDNF表达水平。

结果与结论: ①病毒转染后14 d, 大鼠海马区满布绿色荧光, 病毒转染水平较好; ②药筛前过表达组大鼠癫痫发作次数多于过表达对照组, 干扰组大鼠癫痫发作次数少于干扰对照组; 药筛后过表达组大鼠癫痫发作次数多于过表达对照组, 干扰组大鼠癫痫发作次数少于干扰对照组; ③过表达组大鼠CREB、BDNF表达水平高于过表达对照组, 同样干扰组大鼠CREB、BDNF水平低于干扰对照组; ④结果表明, 调控大鼠海马内CREB表达水平会影响大鼠癫痫发作及耐药性癫痫的形成, 通过调控CREB表达可能会对耐药性颞叶癫痫大鼠海马内BDNF表达水平产生影响。

关键词: 耐药性癫痫; 脑源性神经营养因子; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; CREB-BDNF-TrkB信号通路

Regulatory effects of cAMP response element-binding protein on hippocampal brain-derived neurotrophic factor level in a rat model of drug-resistant epilepsy

Li Jingxuan¹, Shi Dai¹, Wu Guofeng²

¹Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; ²Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Li Jingxuan, Master candidate, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Corresponding author: Wu Guofeng, MD, Professor, Chief physician, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: The formation mechanism of drug-resistant epilepsy is still unclear, and the role of cAMP response element-binding protein (CREB) and (brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the formation of drug-resistant epilepsy has been widely studied.

OBJECTIVE: To regulate the expression of CREB in the hippocampus of normal rats by lentivirus transfection and to explore its effect on the formation of drug-resistant epilepsy and the expression of BDNF in the hippocampus of rats.

METHODS: Lentivirus overexpression or interfering was used to regulate the expression level of CREB in the hippocampus of rats and detect the virus transfection results. Lithium-pilocarpine induced epilepsy models were established in rats 7 days after lentivirus injection. Sodium phenytoin and phenobarbital were then used for resistance selection. Drug-resistant epileptic rats were screened and divided into overexpression group, overexpression control group,

¹贵州医科大学, 贵州省贵阳市 550004; ²贵州医科大学附属医院, 贵州省贵阳市 550004

第一作者: 李婧萱, 女, 1998年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 贵州医科大学在读硕士, 主要从事癫痫病研究。

通讯作者: 伍国锋, 博士, 教授, 主任医师, 贵州医科大学附属医院, 贵州省贵阳市 550004

<https://orcid.org/0000-0002-2586-7861> (李婧萱)

基金资助: 贵州医科大学附属医院国家自然科学基金(NSFC)面上基金培育计划项目(gyfynsc-2021-8), 项目负责人: 伍国锋

引用本文: 李婧萱, 时黛, 伍国锋. 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白调控耐药性癫痫大鼠海马内源性神经营养因子的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(35):5659-5664.



interference group and interference control group. The frequency of epileptic seizures during the screening process was observed and the expression levels of CREB and BDNF in the hippocampus of rats were measured by western blot and real-time fluorescence quantitative PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Fourteen days after virus transfection, the hippocampus of rats was covered with green fluorescence, indicating that the virus transfection level was good. The frequency of epileptic seizures in the overexpression group was higher than that in the overexpression control group and the frequency of epileptic seizures in the interference group was lower than that in the interference control group. The expression levels of CREB and BDNF in the overexpression group were higher than those in the overexpression control group, while the expression levels of CREB and BDNF in the interference group were lower than those in the interference control group. These results indicate that the regulation of CREB expression level in the hippocampus of rats can affect epileptic seizures and formation of drug-resistant epilepsy in rats, and regulating CREB expression may affect the expression level of BDNF in the hippocampus of rats with drug-resistant temporal lobe epilepsy.

Key words: drug-resistant epilepsy; brain-derived neurotrophic factor; cAMP response element-binding protein; CREB-BDNF-TrkB signaling pathway

Funding: National Natural Science Foundation of China (General Program), No. gyfynsf-2021-8 (to WGF)

How to cite this article: LI JX, SHI D, WU GF. Regulatory effects of cAMP response element-binding protein on hippocampal brain-derived neurotrophic factor level in a rat model of drug-resistant epilepsy. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(35):5659-5664.

0 引言 Introduction

癫痫是神经系统最常见疾病之一，以大脑神经元异常过度放电导致的短暂大脑功能障碍为特征。世界范围内有 7 000 多万癫痫患者，癫痫已成为继头痛之后的神经系统第二大疾病^[1]。癫痫是一种复杂的神经系统综合征，其发生机制是脑神经元过度兴奋和异常放电，临床主要表现为突发性意识障碍暨抽搐^[2-3]。虽然许多癫痫患者经过目前的抗癫痫药物正规治疗可以获得缓解，但依然有 20%–30% 的癫痫患者对药物治疗不敏感，发展为耐药性癫痫^[4]。耐药性癫痫定义为癫痫患者对 2 种可以耐受、适当选择的抗癫痫药物方案（无论是单一治疗还是联合治疗）进行充分治疗仍然失败，不能实现癫痫发作停止 12 个月以上的目标（所有类型的癫痫发作），或无癫痫发作的时间未能超过治疗开始前间歇期的 3 倍^[5]。随着时间推移，耐药性癫痫的发病率逐年升高，耐药性癫痫患者过早死亡、受伤、心理社会功能障碍和生活质量降低的风险增加^[6-7]，临床上迫切需要找到新的抗癫痫药物作用靶点^[8-9]。

目前 γ -氨基丁酸能传递受损被认为是耐药性癫痫产生机制之一，人们希望探究其受损机制继而找到治疗耐药性癫痫的新途径^[10-11]。在耐药性癫痫患者及动物模型中均检测到其上游转录因子环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate, cAMP）反应元件结合蛋白（cAMP response element-binding protein, CREB）的靶基因表达水平明显增强^[12-13]。迄今为止，多种 CREB 靶基因已被证明与耐药性癫痫密切相关^[14]，包括 γ -氨基丁酸、脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor, BDNF）、环氧化酶 2 和 NMDA 受体 2B 亚基（NMDA receptor 2B, NR2B）^[15]。虽然现今 γ -氨基丁酸被研究者们广泛认为是癫痫患者产生耐药性的主要机制，但也有不少研究表明 BDNF 在耐药性癫痫中的作用不可忽视^[16-18]。研究认为 CREB-BDNF-TrkB 信号通路可能在耐药性癫痫发生发展中起重要作用^[19-20]。

该研究为进一步探讨 CREB 与 BDNF 在耐药性癫痫发生发展中的作用，通过注射 CREB 过表达及 CREB 干扰慢病毒调控大鼠海马组织 CREB 表达水平，探究 CREB-BDNF-TrkB 信号通路对耐药性癫痫形成过程的影响，为耐药性癫痫的临床治疗及药物开发提供新思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组对照动物学体内实验，组间均数比较方差齐时采用成组 t 检验，方差不齐时采用校正 t 检验；不符

合正态分布的计量资料采用 Wilcoxon 秩和检验。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 6 月至 2022 年 6 月在贵州医科大学临床医学院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选取 SPF 级成年雄性健康 SD 大鼠共 120 只，6–8 周龄，体质量 200–250 g，由贵州医科大学实验动物中心提供，动物许可证号：SCXK(黔)2018-0001。实验方案经贵州医科大学动物实验伦理委员会批准（No.2101479）。将动物置于实验室 1 周适应环境，单笼喂养，自由进食和饮水，室温 21–25 °C，自然采光，大鼠实验前禁食 10 h。实验均在上午 9 时开始，实验时保持安静。

1.3.2 主要试剂及仪器 氯化锂（美国 Sigma 公司）；匹罗卡品（国药集团化学试剂有限公司）；苯妥英钠（新亚药业有限公司）；苯巴比妥钠（新亚药业有限公司）；CREB 过表达慢病毒（吉凯基因公司）；CREB 干扰慢病毒（吉凯基因公司）；CREB 一抗（武汉 Proteintech 公司）；BDNF 一抗（武汉 Proteintech 公司）；GAPDH 一抗（武汉 Proteintech 公司）；羊抗兔 IgG HRP 二抗（武汉 Proteintech 公司）；十二烷基硫酸钠（美国 Sigma 公司）；PVDF 转移膜（美国 Millipore 公司）；化学发光试剂（美国 Millipore 公司）；Trizol 试剂盒（美国 Invitrogen 公司）；SYBR Green PCR 试剂盒（KM4101 美国 KAPA Biosystems 公司）；反转录试剂盒（日本 TAKARA 公司）；超净工作台（苏州金净净化设备公司）；–80 °C 冰箱（德国 Eppendorf 公司）；荧光显微镜（日本 Olympus 公司）；荧光 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）；微量加样器（Thermo Fisher）。

1.4 实验方法

1.4.1 CREB 调控慢病毒构建及包装 CREB 过表达慢病毒、CREB ShRNA 干扰慢病毒及其相应对照慢病毒均由上海吉凯基因公司构建、包装及鉴定。CREB 过表达慢病毒为使用引物（序列：5'-GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG ACC ATG GAC TCT GGA GCA G-3' 和 5'-TCC TTG TAG TCC ATA CCA TCT GAC TTG TGG CAG TAA AGG-3'）克隆出大鼠 CREB1 基因 cDNA 序列插入到 GV358 载体中构建、扩增、包装而成，CREB 过表达对照慢病毒为使用 GV358 空载体包装而成。CREB 干扰慢病毒以 GV248 载体为基础，使用 ShRNA 序列 5'-GGG CCT GCA GAC ATT AAC CAT-3'、5'-GTG CCC AGC AAC CAA GTT GTT-3'、5'-CAA AAC ATT GAT TGA GGA GCT-3'，对照插入序列为 5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3'。

1.4.2 双侧海马 CA3 区注入调控 CREB 的慢病毒 腹腔注射乌拉坦 (6 mL/kg) 麻醉至大鼠角膜反射消失后固定于脑立体定位仪上, 使用体积分数为 75% 乙醇消毒局部皮肤, 正中切口 1 cm, 暴露颅骨及前囟, 剥离骨面, 止血清创。注射位置: 右侧海马 CA3 区坐标为前囟向后 2.64 mm、矢状缝线向右侧 2.0 mm 和硬膜向下 4.0 mm; 左侧海马 CA3 区坐标为前囟向后 2.64 mm、矢状缝线向左侧 2.0 mm 和硬膜向下 4.0 mm。使用微量注射器抽取 5 μ L 过表达 CREB 慢病毒或过表达 CREB 对照慢病毒或干扰 CREB 慢病毒或干扰 CREB 对照慢病毒, 注射到大鼠双侧海马 CA3 区, 针头垂直进入, 缓慢推注, 速度为 0.1 μ L/min, 注射完毕后留针 6 min。术后给予皮下补液 10–15 mL 生理盐水, 连续 3 d 腹腔注射青霉素 4×10^4 U/kg 预防感染, 恢复 7 d 后进行后续实验。

1.4.3 氯化锂-匹罗卡品化学点燃模型的制备 上述大鼠注射 4 种病毒 7 d 后, 给予 125 mg/kg 氯化锂腹腔注射, 18–24 h 后给予 1 mg/kg 阿托品腹腔注射, 30 min 后再给予 20 mg/kg 匹罗卡品腹腔注射。匹罗卡品给药后 30 min 内观察大鼠是否出现凝视、点头、前肢阵挛、站立和跌倒等癫痫发作表现。根据 Racines 分级法对大鼠癫痫发作程度进行分级^[21], 将出现 IV 级及 IV 级以上癫痫发作视为出现癫痫持续状态。若 30 min 后无癫痫发作则追加 5 mg/kg 匹罗卡品, 直至大鼠出现 IV 级及 IV 级以上癫痫发作, 视为急性癫痫模型造模成功。待癫痫持续状态 60 min 后给予 10% 水合氯醛 350 mg/kg 终止发作。

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的	建立耐药性癫痫动物模型
研究问题借鉴已有参考文献 [22]	氯化锂-匹罗卡品化学点燃模型建立大鼠耐药性癫痫模型
标准动物模型造模	性癫痫模型
选择动物的条件	健康 6–8 周龄, 体质量为 (200 \pm 50) g 的成年雄性健康 SD 大鼠, SPF 级
模型与所研究疾病的关系	采用氯化锂-匹罗卡品化学点燃法造模, 转入慢性癫痫期后筛选出耐药性癫痫大鼠以模拟人类耐药性癫痫
动物来源及品系	SD 大鼠购于贵州医科大学实验动物中心
造模技术描述	注射病毒 7 d 后, 给予 125 mg/kg 氯化锂腹腔注射, 18–24 h 后给予 1 mg/kg 阿托品腹腔注射, 30 min 后再给予 20 mg/kg 匹罗卡品腹腔注射。匹罗卡品给药后 30 min 内观察大鼠是否出现凝视、点头、前肢阵挛、站立和跌倒等癫痫发作表现。根据 Racines 分级法对大鼠癫痫发作程度进行分级, 将出现 IV 级及 IV 级以上癫痫发作视为出现癫痫持续状态, 作为癫痫模型造模成功的标志
动物数量及分组方法	120 只大鼠根据注射慢病毒种类分为对照组、过表达组、过表达对照组、干扰组、干扰对照组, 其中对照组 12 只, 干扰组 54 只, 其余每组 18 只
造模成功评价指标	出现 IV 级及 IV 级以上癫痫发作视为造模成功
造模后实验观察指标	不同组大鼠点燃比例; 药筛前后大鼠癫痫发作次数; qRT-PCR 检测大鼠海马组织 CREB、BDNF mRNA 的相对表达量
造模后动物处理	取出大鼠海马组织低温保存或固定后备用
伦理委员会批准	实验方案经贵州医科大学动物伦理委员会批准, 批准号: 2101479

1.4.4 筛选耐药性癫痫大鼠

(1) 2 周后大鼠癫痫模型进入慢性期。慢性期开始对大鼠进行 2 周 24 h 不间断视频监控, 记录大鼠癫痫发作情况。

(2) 2 周记录结束后, 若记录期间未出现 3 次 III 级及 III 级以上自发性癫痫发作则认为造模失败, 弃去不用。对记录期间有 3 次 III 级以上癫痫发作的大鼠进行耐药性筛选。选用苯巴比妥及苯妥英钠 2 种药物对大鼠进行耐药性筛选^[23]。首剂给予苯巴比妥 25 mg/kg 腹腔注射, 此后每次腹腔注射苯巴比妥 30 mg/kg, 每日 1 次, 连续注射 2 周。

(3) 记录注射苯巴比妥 2 周期间大鼠的癫痫发作次数, 将每只大鼠注射苯巴比妥期间平均每周发作频率与第 3, 4 周平均每周发作频率进行比较。若苯巴比妥用药后大鼠每周发作频率减少 $\geq 50\%$ 则为对苯巴比妥敏感, 即药敏性癫痫大鼠; 若发作频率减少 $< 50\%$, 则继续给予苯妥英钠治疗。首剂予苯妥英钠 75 mg/kg 腹腔注射, 此后每次腹腔注射 50 mg/kg, 每日 2 次, 连续注射 2 周。

(4) 将每只大鼠注射苯妥英钠期间平均每周发作频率与第 5, 6 周平均每周发作频率进行比较。若苯妥英钠用药后每周发作频率减少 $\geq 50\%$ 为对苯妥英钠敏感, 也同样归为药敏性癫痫大鼠。若发作减少仍 $\leq 50\%$, 则视为对 2 种药物耐药, 即为耐药性癫痫大鼠。根据注射于海马组织中调控病毒种类, 将筛选出的耐药性癫痫大鼠分为过表达组、过表达对照组、干扰组及干扰对照组。

造模时间流程见图 1。

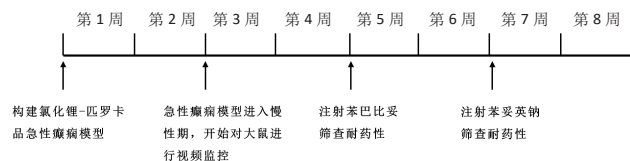


图 1 | 造模时间流程图

Figure 1 | Flow chart of modeling

1.4.5 取材 造模成功大鼠腹腔注射麻醉处死后取出大鼠海马组织, 千分之一天平称质量后切取海马组织, 将样本保存于 -80°C 超低温冰箱中备用。

1.4.6 病毒注射结果检测 病毒注射 2 周后取出大鼠大脑组织, 每组 3 只, 经快速冰冻切片后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达水平。

1.4.7 实时荧光定量 PCR 验证相关基因表达 标本于 -80°C 冰箱中保存, 取约 100 mg 组织于冰上, 在 1 mL 预冷的 Trizol 中充分研磨, 匀浆液小心倒入 1.5 mL EP 管中, 加入 250 μ L 三氯甲烷, 充分混匀, 冰上静置 5 min。将混合液置于离心机中 4°C , 10 000 \times g 离心 10 min, 加入 20 μ L DEPC 处理水, 充分溶解 RNA。将提取后 RNA 置于 -80°C 冰箱中保存。将制备好的 cDNA 样本进行 PCR 扩增。反应条件为预变性 95°C 5 min, 变性 95°C 10 s, 联合退火/延伸 60°C 30 s, 40 个循环。引物由四维加生物科技 (武汉) 有限公司合成, 引物序列见表 1。将结果标准化为内参 GAPDH 的表达, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 CREB, BDNF mRNA 相对表达量。

表 1 | qRT-PCR 的引物序列

Table 1 | Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列 (5'-3')
CREB	上游: CAT TGC CCC TGG AGT TGT TAT
	下游: CTC TTG CTG CTT CCC TGT TCT T
BDNF	上游: GCA GGG GCA TAG ACA AAA
	下游: CGC CAG CCA ATT CTC TT
GAPDH	上游: GCA TCT TCT TGT GCA GTG CC
	下游: ACC AGC TTC CCA TTC TCA GC

表注: CREB 为环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; BDNF 为脑源性神经营养因子

1.4.8 蛋白质免疫印迹实验 将提取出的海马组织蛋白用 12% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白样品, 然后转移到 PVDF 膜上, 加入 CREB(1 : 1 000), BDNF(1 : 1 000), GAPDH(1 : 500) 一抗孵育后, 将膜暴露于二抗 (1 : 10 000) 中, 以 GAPDH 作为内参, 计算 CREB、BDNF 的相对灰度值。

1.5 主要观察指标 ①大鼠点燃比例; ②药筛前后大鼠癫痫发作次数; ③慢病毒转染效率; ④大鼠海马组织 CREB、BDNF mRNA 的表达水平。

1.6 统计学分析 所有实验数据采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较方差齐时采用成组 *t* 检验, 方差不齐时采用校正 *t* 检验; 不符合正态分布的计量资料采用 Wilcoxon 秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过贵州医科大学公共卫生学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 急性癫痫模型建立 选取 120 只健康雄性 SD 大鼠, 其中 12 只作为对照组, 其余 108 只大鼠进行慢病毒转染, 注射过表达慢病毒 18 只, 注射干扰慢病毒 54 只, 注射过表达对照慢病毒 18 只, 注射干扰对照慢病毒 18 只。经点燃后共有 59 只大鼠进入慢性癫痫期, 视为造模成功并统计每组大鼠诱导成功率 (诱导成功数 / 每组总数)。结果显示, 注射过表达慢病毒的大鼠诱导成功率高于过表达对照组, 而注射干扰慢病毒的大鼠相比于干扰对照组更难诱导为急性癫痫模型, 见表 2。

表 2 | 大鼠诱导成功率及耐药比率

Table 2 | Induction success rate and drug resistance ratio in rats

组别	诱导成功率 (%)	耐药比率 (%)
过表达组	88.24	50.00
过表达对照组	77.78	33.33
干扰组	35.29	21.43
干扰对照组	72.22	30.00

表注: 诱导成功率 = 诱导成功数 / 每组总数; 耐药比率 = 耐药大鼠数 / 每组总数

2.2 耐药性癫痫模型建立 注射过表达慢病毒的大鼠共有 10 只成为慢性癫痫模型, 最终筛选出 5 只耐药性癫痫大鼠, 5 只药物敏感性癫痫大鼠; 注射过表达对照慢病毒的大鼠共 9 只成为慢性癫痫模型, 最终筛选出 3 只耐药性癫痫大鼠, 6 只药物敏感性癫痫大鼠; 注射干扰慢病毒的大鼠共 14 只成为慢性癫痫模型, 最终筛选出 3 只耐药性癫痫大鼠, 11 只药

物敏感性癫痫大鼠; 注射干扰对照慢病毒的大鼠共 10 只成为慢性癫痫模型, 最终筛选出 3 只耐药性癫痫大鼠, 7 只药物敏感性癫痫大鼠。结果分析, 注射过表达慢病毒的大鼠耐药比率高于过表达对照组, 而注射干扰慢病毒的大鼠耐药比率低于干扰对照组, 见表 2。

2.3 病毒注射结果 慢病毒转染后, 镜下观察注射不同慢病毒大鼠的海马组织表达绿色荧光, 提示各组大鼠慢病毒转染大鼠海马组织成功, 慢病毒转染有效调控大鼠海马组织 CREB 表达, 见图 2。

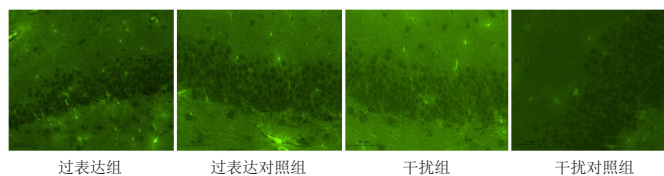


图 2 | 注射环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (CREB) 慢病毒后镜下观察海马组织转染水平 (标尺为 50 μm)

Figure 2 | Microscopic observation of hippocampal tissue transfection levels after injection of cAMP response element-binding protein lentivirus (scale bar=50 μm)

2.4 耐药性癫痫大鼠药筛前后癫痫发作次数 药筛前及药筛后过表达组大鼠 III 级及以上癫痫发作次数均较过表达对照组明显增加; 药筛前干扰组大鼠 III 级及以上癫痫发作次数较干扰对照组明显减少; 药筛后干扰组大鼠 III 级及以上癫痫发作次数较干扰对照组明显减少; 以上结果提示上调大鼠海马组织 CREB 表达水平可增加癫痫发作频率, 干扰 CREB 表达可降低癫痫发作频率, 见表 3。

表 3 | 各组大鼠癫痫发作次数

($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 | Frequency of seizures in rats

组别	筛药前 III 级及以上发作次数	筛药后 III 级及以上发作次数
过表达组	13.22±1.83 ^a	12.78±1.39 ^a
过表达对照组	9.22±0.69	5.78±1.26
干扰组	5.67±1.15 ^b	3.56±0.77 ^b
干扰对照组	8.45±0.69	6.78±1.07

表注: 与过表达对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与干扰对照组相比, ^b $P < 0.01$

2.5 RT-qPCR 检测各组耐药性癫痫大鼠 CREB、BDNF mRNA 表达 过表达组大鼠 CREB、BDNF mRNA 的相对表达量均高于过表达对照组, 同时干扰组大鼠 CREB、BDNF mRNA 的相对表达量均低于干扰对照组, 差异均有显著性意义 ($P < 0.01$)。这表明增高大鼠海马 CREB 表达后, BDNF mRNA 表达水平也相应增高; 干扰大鼠海马 CREB 表达后, BDNF mRNA 表达水平可能降低, 见表 4。

表 4 | 各组大鼠海马组织 CREB、BDNF mRNA 相对表达量

($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 | Relative expression levels of CREB and BDNF mRNA in the hippocampus of rats

组别	CREB	BDNF
对照组	1±0	1±0
过表达组	2.06±0.08 ^a	7.07±0.94 ^a
过表达对照组	1.37±0.05	3.90±0.72
干扰组	0.77±0.06 ^b	1.93±0.36 ^b
干扰对照组	1.59±0.09	4.21±0.27

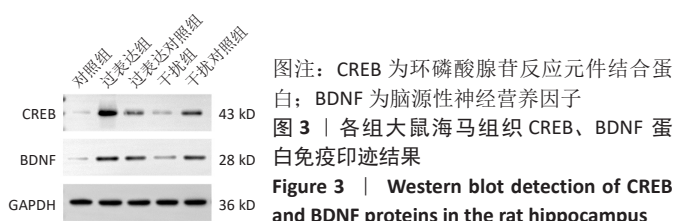
表注: 与过表达对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与干扰对照组相比, ^b $P < 0.01$ 。CREB: 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; BDNF: 脑源性神经营养因子

2.6 Western blot 检测各组耐药性癫痫大鼠 CREB、BDNF 蛋白表达水平 与 PCR 结果一致, 过表达组大鼠海马组织 CREB、BDNF 蛋白水平高于过表达对照组, 而干扰组大鼠海马组织 CREB、BDNF 蛋白表达量低于干扰对照组, 见表 5, 图 3。

表 5 | 各组大鼠海马组织 CREB、BDNF 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 5 | CREB and BDNF protein levels in the hippocampal of rats

组别	CREB/GAPDH	BDNF/GAPDH
对照组	0.06±0.03	0.12±0.02
过表达组	0.73±0.07 ^a	0.89±0.05 ^a
过表达对照组	0.33±0.21	0.44±0.16
干扰组	0.26±0.09 ^b	0.21±0.08 ^b
干扰对照组	0.44±0.23	0.46±0.15

表注: 与过表达对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与干扰对照组相比, ^b $P < 0.01$ 。CREB: 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; BDNF: 脑源性神经营养因子



3 讨论 Discussion

有实验将 CREB 基因敲除小鼠诱导成为癫痫持续状态后, 与野生型小鼠相比, 其在毛果芸香碱诱导癫痫持续状态后自发癫痫发作减少约 50%, 需要更多电刺激才能点燃使其出现 V 级发作, 同时发现 CREB 基因敲除小鼠海马和皮质中 BDNF mRNA 差异上调, 这可能导致了癫痫严重程度差异 [24-25]。当 CREB 活动抑制时会缩短癫痫持续状态的持续时间, 并降低慢性癫痫患者的癫痫发作率。CREB 作为关键转录因子, 研究者们将其用于肿瘤靶向治疗中, 可靶向抑制肿瘤生长, 但尚未有研究将其用于治疗耐药性癫痫, 原因在于目前耐药性癫痫机制尚不完全清楚, 调控 CREB 对于耐药性癫痫形成机制的研究较少, 基础资料尚不完全 [26-27]。为探究 CREB 在耐药性癫痫中的作用, 该实验预期使用慢病毒调控正常大鼠脑内过表达 CREB 或干扰 CREB 水平, 从而研究其对耐药性癫痫形成过程的影响。

该研究选用慢病毒转染的方式调控大鼠脑内 CREB 的表达水平, 使用慢病毒携带荧光目的基因检测慢病毒转染水平, 注射慢病毒 7 d 后观察到大鼠海马组织满布绿色荧光, 证明慢病毒转染成功。使用氯化锂-匹罗卡品化学点燃模型从而诱发癫痫的发生, 利用此方法造模发作阶段性明显, 行为学表现规律、造模稳定、死亡率低, 适宜大规模造模。在癫痫发作急性期后, 大鼠将转入慢性癫痫期, 使用苯巴比妥和苯妥英钠 2 种药物筛选出耐药性癫痫模型。在筛选过程中记录大鼠癫痫发作次数, 结果发现过表达组大鼠癫痫发作次数及频率高于过表达对照组, 而干扰组大鼠癫痫发作次数及频率低于干扰对照组。这表明在耐药性癫痫形成过程中, 过表达脑内 CREB 水平会增加耐药性癫痫大鼠癫痫发作次数及频率,

干扰脑内 CREB 表达水平会减少耐药性癫痫大鼠癫痫发作次数及频率, 这一发现可能为耐药性癫痫治疗开辟新道路。

课题组前期实验发现, 耐药性癫痫大鼠海马组织 CREB 表达水平显著升高 [28]。有研究在啮齿动物癫痫模型和患有可治疗和耐药性癫痫的人类中均发现 CREB 磷酸化增加。在耐药性癫痫患者癫痫发作区域观察到 CREB 磷酸化增加和 CREB 调节转录增加, 高于可治疗癫痫对照组 [29]。这些结果提示 CREB 作为关键的转录因子, 可能在耐药性癫痫的发生发展过程中起关键作用。

CREB 家族转录因子与共激活因子 CBP 一起是 BDNF-TrkB 信号转导依赖的主要调控因子 [30]。BDNF 作为一种广泛表达的神经营养因子, 其在癫痫发生和发展中的作用不可忽视 [31-33]。在成人大脑中, BDNF 的主要功能是促进突触传递、增强突触可塑性、促进突触生长, BDNF 信号通过其跨膜受体 TrkB 在神经元存活、分化和突触可塑性中具有重要作用 [34]。BDNF 信号传导参与海马颗粒神经元的神经发生和树突形成, BDNF 可以激活 TrkB 受体和下游 MAPK 信号通路来调节自身 mRNA 的表达, 研究已证实 CREB 家族转录因子与共激活因子 CBP/p300 是 TrkB 信号转导后 BDNF 基因表达的主要调控因子, 而 CREB 本身只与 BDNF 启动子 IV 直接结合, 在响应 BDNF-TrkB 信号时被磷酸化, 并通过招募 CBP 激活 BDNF 启动子 IV 的转录 [35]。早期的研究表明, 癫痫发作显著增加了与边缘癫痫相关大脑区域的 BDNF 表达 [36]。TrkB 在癫痫发作后也会增加, 其模式类似 BDNF 水平的变化, 放大的 BDNF 水平导致进一步的高兴奋性和癫痫活动, 继而导致耐药性癫痫的产生 [37-38]。BDNF 在成人大脑中过度激活 TrkB 受体被认为是长时间癫痫发作后癫痫发生的必要条件。实验动物和颞叶癫痫患者癫痫发作后 BDNF 和 TrkB 均上调 [39-40]。还有研究表明, 体内输注 BDNF 可增加兴奋性, 可能诱发癫痫发作。BDNF 还可导致 γ -氨基丁酸能传递和钾 (K^+)/氯 (Cl^-) 共体的减少 [41]。

该研究使用脑立体定位微量注射慢病毒的方法调控大鼠海马组织 CREB, 过表达慢病毒使大鼠脑内 CREB 表达水平增高和干扰慢病毒干扰 CREB 表达后, 进一步研究耐药性癫痫大鼠海马组织中 CREB 及 BDNF 蛋白表达水平的变化, 过表达组耐药性癫痫大鼠海马组织 CREB 表达量增多, 多于过表达对照组, 而干扰组耐药性癫痫大鼠海马组织 CREB 表达量减少, 低于干扰对照组, 在阻断 CREB 表达后, BDNF 表达量有所减少, 过表达 CREB 后, BDNF 表达量也相应升高。这说明阻断 CREB 表达后, 可导致 BDNF 表达受抑制, 可以推断在耐药性癫痫发生过程中 CREB-BDNF-TrkB 信号通路可能发挥一些关键作用。

作者贡献: 实验设计由伍国锋、李婧莹完成, 实验实施由所有作者共同完成, 资料收集由李婧莹完成, 实验评估由所有作者共同完成。

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中不存在利益冲突。

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。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写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。

4 参考文献 References

- [1] FALCO-WALTER JJ, SCHEFFER IE, FISHER RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2018;139:73-79.
- [2] FISHER RS, ACEVEDO C, ARZIMANOGLU A, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 2014;55(4):475-482.
- [3] BERETTA S, CARONE D, ZANCHI C, et al. Long-term applicability of the new ILAE definition of epilepsy. Results from the PRO-LONG study. *Epilepsia.* 2017;58(9):1518-1523.
- [4] 陈佳, 吴逊. 难治性癫痫诊疗新思路 [J]. *中华医学杂志*, 2010,90(9): 643-645.
- [5] CHOW J, JENSEN M, AMINI H, et al. Dissecting the genetic basis of comorbid epilepsy phenotypes in neurodevelopmental disorders. *Genome Med.* 2019;11(1):65.
- [6] KALILANI L, SUN X, PELGRIMS B, et al. The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia.* 2018;59(12):2179-2193.
- [7] KATYAYAN A, DIAZ-MEDINA G. Epilepsy: Epileptic Syndromes and Treatment. *Neurol Clin.* 2021;39(3):779-795.
- [8] YU J, SWIETEK B, PRODDUTUR A, et al. Dentate cannabinoid-sensitive interneurons undergo unique and selective strengthening of mutual synaptic inhibition in experimental epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2016;89: 23-35.
- [9] BALESTRINI S, SISODIYA SM. Pharmacogenomics in epilepsy. *Neurosci Lett.* 2018;667:27-39.
- [10] ARAIN FM, BOYD KL, GALLAGHER MJ. Decreased viability and absence-like epilepsy in mice lacking or deficient in the GABAA receptor $\alpha 1$ subunit. *Epilepsia.* 2012;53(8):e161-e165.
- [11] RAOL YH, LUND IV, BANDYOPADHYAY S, et al. Enhancing GABA(A) receptor alpha 1 subunit levels in hippocampal dentate gyrus inhibits epilepsy development in an animal model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci.* 2006;26(44):11342-11346.
- [12] SAURA CA, CARDINAUX JR. Emerging Roles of CREB-Regulated Transcription Coactivators in Brain Physiology and Pathology. *Trends Neurosci.* 2017;40(12):720-733.
- [13] GUO J, WANG H, WANG Q, et al. Expression of p-CREB and activity-dependent miR-132 in temporal lobe epilepsy. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(5):1297-1306.
- [14] PULIMOOD NS, RODRIGUES WDS JUNIOR, ATKINSON DA, et al. The Role of CREB, SRF, and MEF2 in Activity-Dependent Neuronal Plasticity in the Visual Cortex. *J Neurosci.* 2017;37(28):6628-6637.
- [15] ZHU X, DUBEY D, BERMUDEZ C, et al. Suppressing cAMP response element-binding protein transcription shortens the duration of status epilepticus and decreases the number of spontaneous seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsia.* 2015;56(12):1870-1878.
- [16] IUGHETTI L, LUCACCIONI L, FUGETTO F, et al. Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review. *Neuropeptides.* 2018;72:23-29.
- [17] SONG M, MARTINOWICH K, LEE FS. BDNF at the synapse: why location matters. *Mol Psychiatry.* 2017;22(10):1370-1375.
- [18] DIENI CV, PANICHI R, AIMONE JB, et al. Low excitatory innervation balances high intrinsic excitability of immature dentate neurons. *Nat Commun.* 2016;7:11313.
- [19] HEINRICH C, LÄHTEINEN S, SUZUKI F, et al. Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2011;42(1):35-47.
- [20] SHARMA P, KUMAR A, SINGH D. Dietary Flavonoids Interaction with CREB-BDNF Pathway: An Unconventional Approach for Comprehensive Management of Epilepsy. *Curr Neuropharmacol.* 2019;17(12): 1158-1175.
- [21] RACINE RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: cortical areas. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1975;38(1):1-12.
- [22] SUTULA T, CASCINO G, CAVAZOS J, et al. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol.* 1989;26(3):321-330.
- [23] LÖSCHER W, BRANDT C. High seizure frequency prior to antiepileptic treatment is a predictor of pharmacoresistant epilepsy in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2010;51(1):89-97.
- [24] ZHU X, HAN X, BLENDY JA, et al. Decreased CREB levels suppress epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2012;45(1):253-263.
- [25] YU Y, JIANG J. COX-2/PGE2 axis regulates hippocampal BDNF/TrkB signaling via EP2 receptor after prolonged seizures. *Epilepsia Open.* 2020;5(3):418-431.
- [26] ZHANG H, KONG Q, WANG J, et al. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol.* 2020;9(1):32.
- [27] MCTAGUE A, HOWELL KB, CROSS JH, et al. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol.* 2016;15(3):304-316.
- [28] WU G, LIU Z, WANG L, et al. Hippocampal Low-Frequency Stimulation Decreased cAMP Response Element-Binding Protein and Increased GABAA Receptor Subunit $\alpha 1$ in Amygdala-Kindled Pharmacoresistant Epileptic Rats. *Neuropsychiatry.* 2017;7(6):983-993.
- [29] MERTZ C, KRARUP S, JENSEN CD, et al. Aspects of cAMP Signaling in Epileptogenesis and Seizures and Its Potential as Drug Target. *Neurochem Res.* 2020;45(6):1247-1255.
- [30] LIN TW, HARWARD SC, HUANG YZ, et al. Targeting BDNF/TrkB pathways for preventing or suppressing epilepsy. *Neuropharmacology.* 2020; 167:107734107734.
- [31] HU Y, RUSSEK SJ. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *Neurochem.* 2008;105(1):1-17.
- [32] BINDER DK. The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system. *Adv Exp Med Biol.* 2004;548:34-56.
- [33] BINDER DK, SCHARFMAN HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors.* 2004;22(3):123-131.
- [34] ESVALD EE, TUVIKENE J, SIRP A, et al. CREB Family Transcription Factors Are Major Mediators of BDNF Transcriptional Autoregulation in Cortical Neurons. *Neurosci.* 2020;40(7):1405-1426.
- [35] RAFA-ZABŁOCKA K, KREINER G, BAGIŃSKA M, et al. Selective Depletion of CREB in Serotonergic Neurons Affects the Upregulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Evoked by Chronic Fluoxetine Treatments. *Front Neurosci.* 2018;9(12):637-637.
- [36] FALCICCHIA C, PAOLONE G, EMERICH DF, et al. Seizure-Suppressant and Neuroprotective Effects of Encapsulated BDNF-Producing Cells in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;5(9):211-224.
- [37] LAI HC, CHANG QY, HSIEH CL. Signal Transduction Pathways of Acupuncture for Treating Some Nervous System Diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019;2019:2909632.
- [38] YEH CM, HUANG CC, HSU KS. Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF. *J Physiol.* 2012;590(4):991-1010.
- [39] KLEIN KM, PENDZIWIAT M, COHEN R, et al. Autosomal dominant epilepsy with auditory features: a new LGI1 family including a phenocopy with cortical dysplasia. *Neurol.* 2016;263(1):11-16.
- [40] GORSKI JA, ZEILER SR, TAMOWSKI S, et al. Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci.* 2003;23(17):6856-6865.
- [41] LUCARINI N, VERROTTI A, NAPOLIONI V, et al. Genetic polymorphisms and idiopathic generalized epilepsies. *Pediatr Neurol.* 2007;37:157-164.

(责任编辑: MZH, ZN, ZJP)