

低频率电刺激通过调控 Rho/ROCK/NF- κ B 途径 对癫痫大鼠作用的研究

邓兰秋子, 匡卫平, 李振光, 刘坤, 王琴, 曾其昌, 黄亚辉, 彭琼, 朱勇, 卢军
湖南中医药大学临床医学院(湖南省脑科医院)神经外科, 湖南 长沙 410007

摘要:目的 探究低频率电刺激(LFS)对癫痫的作用及其可能的作用机制。方法 将60只SD大鼠随机分为对照组、癫痫模型组、假刺激组和LFS治疗组,每组15只。记录大鼠Racine评分和脑电图, Morris水迷宫实验检测大鼠空间学习记忆能力; HE染色和尼氏染色检测大鼠海马CA1区病理学变化; TUNEL染色检测大鼠海马神经元细胞凋亡; ELISA检测大鼠血清TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平; Western blotting检测大鼠海马RhoA、ROCK1、ROCK2、p65、p-p65和凋亡相关基因蛋白表达; RT-PCR检测大鼠海马RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA表达。结果 癫痫模型组大鼠出现了连续性棘波。癫痫模型组大鼠的Racine评分; 神经元细胞凋亡率; Bax、c-caspase3和p-p65/p65蛋白表达; RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA和蛋白表达; 血清TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平较对照组升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。癫痫模型组大鼠的空间学习记忆能力、神经元数量、尼氏体数量、Bcl-2蛋白表达较对照组降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。LFS治疗组大鼠波峰下降。LFS治疗组大鼠的Racine评分; 神经元细胞凋亡率; Bax、c-caspase3和p-p65/p65蛋白表达; RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA和蛋白表达; 血清TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平较假刺激组降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。LFS治疗组大鼠的空间学习记忆能力、神经元数量、尼氏体数量和Bcl-2蛋白表达较假刺激组升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 LFS可能通过抑制Rho/ROCK/NF- κ B途径来抑制炎症产生, 从而发挥抗癫痫作用。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(3): 273-279]

关键词: 癫痫; 低频率电刺激; Rho/ROCK途径; NF- κ B途径; 大鼠

中图分类号: R742.1

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.03.012

Effect of low-frequency stimulation on epileptic rats by regulating the Rho/ROCK/NF- κ B pathway

DENG Lan-Qiu, KUANG Wei-Ping, LI Zhen-Guang, LIU Kun, WANG Qin, ZENG Qi-Chang, HUANG Ya-Hui, PENG Qiong, ZHU Yong, LU Jun

Department of Neurosurgery, Hunan Brain Hospital, Changsha, Hunan 410007, China

Corresponding author: LU Jun, Email: t18992273@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of low-frequency stimulation (LFS) on epilepsy and its possible mechanism. **Methods** A total of 60 Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group ($n=15$), epilepsy model group ($n=15$), sham stimulation group ($n=15$), and LFS treatment group ($n=15$). The Racine scores and electroencephalograms of the rats were recorded. The Morris water maze test was used to test the spatial learning and memory ability of the rats; hematoxylin-eosin staining and Nissl staining were used to detect the pathological changes in the hippocampal CA1 region of the rats; TUNEL staining was used to determine the apoptosis of rat hippocampal neurons; enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in rat serum; Western blot was used to determine the expression of RhoA, ROCK1, ROCK2, p65, p-p65, and apoptosis-related proteins in rat hippocampus; reverse transcription polymerase chain reaction was used to measure the expression of RhoA, ROCK1, and ROCK2 mRNA in rat hippocampus.

收稿日期: 2020-12-11; 修回日期: 2021-04-07

作者简介: 邓兰秋子(1995-), 女, 医师, 硕士在读, 主要从事癫痫的诊疗研究。

通信作者: 卢军(1976-), 男, 土家族, 主任医师, 硕士, 主要从事癫痫的诊疗研究。Email: t18992273@163.com。

Results Compared with the control group, the rats in the epilepsy model group showed continuous spike waves and had significantly higher Racine score, neuronal apoptosis rate, expression of Bax, c-caspase3, and p-p65/p65 proteins, as well as RhoA, ROCK1, and ROCK2 mRNA and proteins, and levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in serum ($P<0.05$), and had significantly lower spatial learning and memory ability, number of neurons, number of Nissl bodies, and expression of Bcl-2 protein ($P<0.05$). Compared with the sham stimulation group, the rats in the LFS treatment group had significantly lower wave crest, Racine score, neuronal apoptosis rate, expression of Bax, c-caspase3, and p-p65/p65 proteins, as well as RhoA, ROCK1, and ROCK2 mRNA and proteins, and levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in serum ($P<0.05$), and had significantly higher spatial learning and memory ability, number of neurons, number of Nissl bodies, and expression of Bcl-2 protein ($P<0.05$). **Conclusions** LFS may inhibit inflammation by inhibiting the Rho/ROCK/NF- κ B pathway, thereby playing a protective role in epileptic rats. [Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(3): 273-279]

Keywords: epilepsy; low frequency electrical stimulation; Rho/ROCK pathway; NF- κ B pathway; rat

癫痫是一种常见的慢性神经系统疾病,以反复发作作为特征。全世界约有7000万癫痫患者^[1]。反复癫痫发作对癫痫患者的情绪、行为、个性、认知、运动和睡眠都有负面影响,甚至会增加患者的死亡率^[2]。现有抗癫痫药物的临床疗效有限,因此急需开发新的癫痫治疗策略,以改变癫痫疾病现状。目前,高频率的深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)已被用于临床上治疗耐药性癫痫^[3]。但高频率电刺激(high-frequency stimulation, HFS)存在组织损伤、治疗效果不稳定等问题^[3],所以安全性与可控性更好的低频率电刺激(low-frequency stimulation, LFS)逐渐引起了研究者的注意。已有研究表明,LFS灶点部位能抑制成年及未成年大鼠杏仁核点燃癫痫的形成过程^[4]。另有研究表明,Rho/ROCK信号通路参与癫痫后脑损伤的病理过程,是预防或逆转癫痫所致脑损伤的潜在治疗靶点^[5]。此外,Rho/ROCK通路的磷酸化可诱导NF- κ B通路的活化^[6]。目前关于LFS对癫痫的作用机制尚不明确。因此,本研究旨在探究LFS是否通过调控Rho/ROCK/NF- κ B信号通路影响癫痫疾病进展,以期了解LFS对癫痫的作用机制,为开发新的癫痫治疗策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60只SPF清洁级健康雄性SD大鼠,7周龄,体重210~230 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物合格证编号:430047019010713。所有大鼠饲养于湖南中医药大学动物实验中心,昼夜交替(12 h/12 h),环境温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,提供充足饮水及饲料。

1.2 主要试剂

氯化锂购自上海化冉实业有限公司;东莨菪碱购自成都普瑞法科技开发有限公司;匹鲁卡品购自上海迈瑞尔化学技术有限公司;尼氏染色液购自上海碧云天生物技术有限公司;TUNEL染色试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;c-caspase3、ROCK1、ROCK2、p-p65和p65抗体购自英国Abcam;Bcl-2和Bax抗体购自武汉三鹰生物

技术有限公司;RhoA和GAPDH抗体购自北京义翘神州生物技术有限公司;SYBR Premix Ex TaqTM II试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司;TNF- α 、IL-6和IL-1 β ELISA检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 动物分组及模型建立

用随机数字法将60只大鼠分为对照组、癫痫模型组、假刺激组和LFS治疗组,每组15只。

根据参考文献^[7],复制癫痫大鼠模型。癫痫模型组、假刺激组和LFS治疗组大鼠腹腔注射1.5 mol/L氯化锂,剂量127.17 mg/kg;18 h后注射0.25 mg/mL东莨菪碱,剂量1 mg/kg;之后每隔30 min注射7.5 mg/mL的匹鲁卡品,剂量10 mg/kg,重复3次;对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水。

采用Racine评分记录每只大鼠的发作级别(表1)。大鼠急性期出现Ⅳ级以上的癫痫发作,且经过1周恢复后,持续监测大鼠行为学表现。出现静息期癫痫发作的大鼠用Alpha-Lab 4通道信号采集及处理系统进行脑电图监测,若出现痫样放电则为慢性癫痫大鼠模型复制成功。

表1 Racine分级标准

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

1.4 LFS对癫痫大鼠模型海马刺激

Alpha-Lab 4通道信号采集及处理系统记录大鼠脑电活动,直到实验结束。癫痫发作30 d后用A-M SYSTEMS 2100刺激器给大鼠以持续的电刺激,刺激参数参照参考文献^[8]:脉冲双向方波,累计时间30 min,波宽1 ms,强度100 μ A,频率1 Hz,每天固定时间刺激1次,连续2周。假刺激组大

鼠以相同时间和频率给予LFS假刺激(无电流)。

1.5 Morris水迷宫实验检测大鼠空间学习记忆能力

圆形水池直径为160 cm、高50 cm、水深30 cm,水温(24±2)℃。池内圆形平台直径12 cm,置于水下1 cm处。将水池分为4个象限,平台位于第3象限。选取4个进入位点,将大鼠放入池内。记录大鼠的逃跑潜伏期(s)(从下水到找到平台所花费的时间)、游泳速度(cm/s)、游泳距离(cm)和平台停留时间(s)。如大鼠在90 s内未能找到平台,则将大鼠放置于平台10 s。在LFS治疗1周后,按照以上步骤训练所有大鼠,2次/d,持续7 d,最后一次LFS治疗后24 h进行正式实验。

1.6 HE染色检测大鼠海马CA1区病理组织学变化

各组大鼠最后一次LFS刺激24 h后,麻醉后取脑。海马CA1区组织4%多聚甲醛4℃固定过夜,乙醇梯度脱水,石蜡包埋、切片,片厚5 μm。石蜡切片常规二甲苯、乙醇脱蜡至水,苏木素染色10 min,0.7%盐酸乙醇分化数秒,流水洗涤后,伊红液浸染3 min。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。切片于光学显微镜下放大观察分析。

1.7 尼氏染色检测大鼠海马CA1区神经元细胞形态变化

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

1.8 TUNEL染色检测大鼠海马神经元细胞凋亡

大鼠石蜡切片常规二甲苯、乙醇脱蜡至水。按照TUNEL染色试剂盒说明书进行TUNEL染色操作。随后用苏木素复染数秒,随后立即用流水冲洗。梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。光学显微镜观察凋亡细胞并拍照。

1.9 ELISA检测大鼠血清TNF-α、IL-6和IL-1β水平

各组大鼠最后一次LFS刺激24 h后,尾静脉取血,收集血清。按照ELISA试剂盒说明书所示,检测各组大鼠血清中TNF-α、IL-6和IL-1β水平。

1.10 Western blotting检测大鼠海马RhoA、ROCK1、ROCK2、p-p65、p65和凋亡相关基因蛋白表达

各组大鼠最后一次LFS刺激24 h后,麻醉后取海马组织。RIPA裂解液裂解组织,离心取上清并测定其蛋白浓度。取30 μg蛋白进行SDS-PAGE分离,湿转法将蛋白转至PVDF膜上。10%脱脂奶粉室温封闭3 h,Bcl-2抗体(1:2 000)、Bax抗体(1:2 000)、c-caspase3抗体(1:2 000)、p65抗体(1:2 000)、p-p65抗体(1:2 000)、RhoA抗体(1:1 000)、ROCK1抗体(1:1 000)、ROCK2抗体(1:2 000)和GAPDH抗体(1:5 000)4℃孵育过夜,HRP标记二抗(1:5 000)室温孵育1 h。ECL发光液显色,暗室曝光。

1.11 RT-PCR检测大鼠海马RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA表达

取海马组织,Trizol法提取组织总RNA,随后将RNA逆转录合成cDNA。RhoA、ROCK1和ROCK2以GAPDH为内参,按照SYBRPremix Ex Taq™ II试剂盒说明书进行RT-PCR实验,实验所需引物序列见表2。反应条件:95℃、30 s;95℃、5 s,60℃、34 s,40个循环。采用2^{-ΔΔCt}法计算RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA表达。

表2 RT-PCR所需引物序列

基因名称	方向	引物序列
RhoA	正向	5'-AGAGGTGTATGTGCCACACTGTT-3'
	反向	5'-AGGCGATCATAATCTTCCTGCCCA-3'
ROCK1	正向	5'-AACATGCTGCTGGATAAATCTGG-3'
	反向	5'-TGTATCACATCGTACCATGCCT-3'
ROCK2	正向	5'-TGGGCGAGAATGTGATTGGT-3'
	反向	5'-TCCAAGTCGTACCTCCCTGT-3'
GAPDH	正向	5'-CAGCAATGCATCTCGACC-3'
	反向	5'-TGGACTGTGCTCATGAGCCC-3'

1.12 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行数据的统计分析。检测所得数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,若组间差异有统计学意义,则采用LSD-*t*检验。以双侧 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠Racine评分及空间学习记忆能力的比较

与对照组相比,癫痫模型组大鼠出现连续性棘波;Racine评分和逃跑潜伏期升高($P < 0.05$);游泳距离和平台停留时间降低($P < 0.05$);游泳速度差异无统计学意义($P > 0.05$)。与假刺激组相比,LFS治疗组大鼠波峰下降;Racine评分和逃跑潜伏期降低($P < 0.05$);游泳距离和平台停留时间升高($P < 0.05$);游泳速度差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1、图2、表3和表4。

2.2 各组大鼠CA1区神经元的变化

与对照组相比,癫痫模型组大鼠海马CA1区神经元细胞排列紊乱、核固缩、神经元数量降低($P < 0.05$);尼氏体数量降低($P < 0.05$)。与假刺激组相比,LFS治疗组大鼠CA1区神经元细胞排列趋于整齐、细胞形态趋于正常化,神经元数量和尼氏体数量升高($P < 0.05$)。见图3、图4和表5。

2.3 各组大鼠海马神经元细胞凋亡的变化

与对照组相比,癫痫模型组大鼠海马神经元细胞凋亡率、Bax和c-caspase3蛋白表达升高($P < 0.05$),Bcl-2蛋白表达降低($P < 0.05$);与假刺激组相比,LFS治疗组大鼠海马神经元细胞凋亡率、Bax和c-caspase3蛋白表达降低($P < 0.05$),Bcl-2蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。见图5、图6和表6。

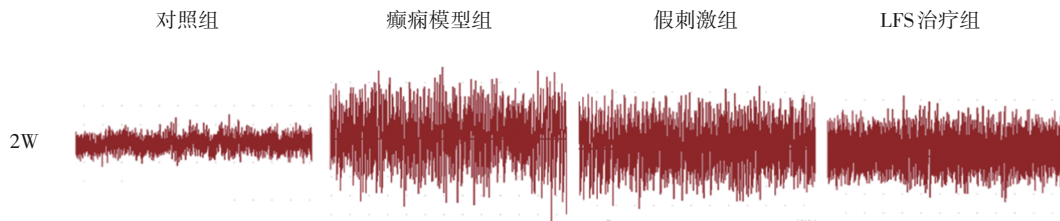


图1 各组大鼠脑电图检测

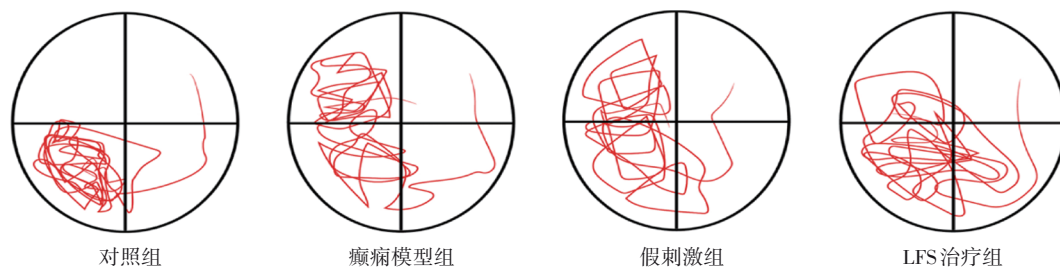


图2 各组大鼠游泳路线图

表3 各组大鼠Racine评分的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Racine 评分
对照组	0
癫痫模型组	4.23±0.29 ^①
假刺激组	4.31±0.37
LFS 治疗组	2.82±0.23 ^②
F 值	482.8
P 值	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与假刺激组比较, $P < 0.05$ 表4 各组大鼠逃跑潜伏期、游泳速度、游泳距离和平台停留时间的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	逃跑潜伏期 /s	游泳速度/ (cm/s)	游泳距离 /cm	平台停留 时间/s
对照组	20.39±2.80	21.96±1.34	346.80±25.17	51.29±2.12
癫痫模型组	49.36±4.69 ^①	19.87±2.14	240.68±22.91 ^①	39.89±2.20 ^①
假刺激组	48.15±5.15	19.10±2.11	231.99±18.93	39.14±3.63
LFS 治疗组	34.83±3.85 ^②	21.82±1.21	284.21±22.36 ^②	46.85±2.93 ^②
F 值	86.5	5.2	44.3	34.2
P 值	0.000	0.053	0.000	0.000

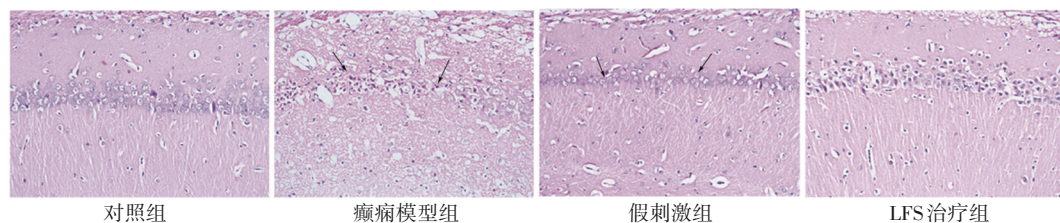
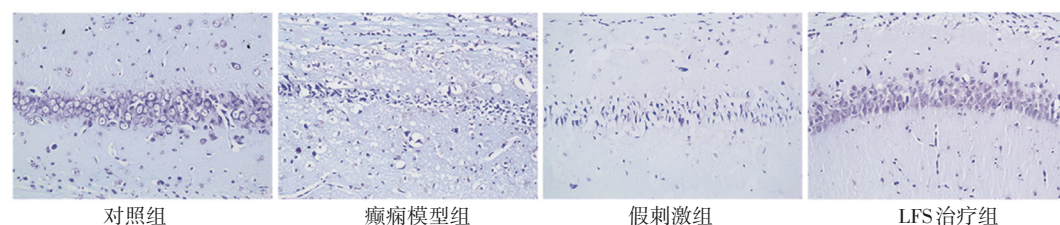
注:①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与假刺激组比较, $P < 0.05$ 图3 HE 染色检测各组大鼠海马 CA1 区神经元病理组织学变化($\times 200$), 黑色箭头代表神经元病理学变化图4 尼氏染色检测各组大鼠海马 CA1 区神经元细胞形态的改变($\times 200$)

表5 各组大鼠海马CA1区神经元数量和尼氏体数量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	神经元数量	尼氏体数量
对照组	73.50±5.57	42.63±4.55
癫痫模型组	17.13±3.14 ^①	6.75±1.09 ^①
假刺激组	18.63±3.64	7.50±2.12
LFS治疗组	47.00±5.07 ^②	33.75±2.90 ^②
F值	286.3	309.8
P值	0.000	0.000

 注:①与对照组比较, $P<0.05$;②与假刺激组比较, $P<0.05$

 表6 各组大鼠海马神经元细胞凋亡率和凋亡相关蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率(%)	Bcl-2蛋白	Bax蛋白	c-caspase3蛋白
对照组	4.63±0.25	1.57±0.13	0.10±0.01	0.23±0.01
癫痫模型组	27.52±2.95 ^①	0.24±0.02 ^①	0.82±0.07 ^①	1.70±0.15 ^①
假刺激组	28.48±3.15	0.25±0.02	0.78±0.06	1.74±0.11
LFS治疗组	9.25±0.91 ^②	0.87±0.07 ^②	0.43±0.05 ^②	0.53±0.02 ^②
F值	217.6	526.3	251.6	401.9
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

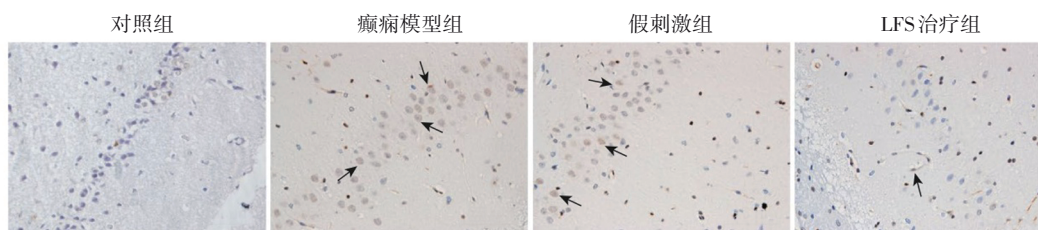
 注:①与对照组比较, $P<0.05$;②与假刺激组比较, $P<0.05$


图5 各组大鼠海马神经元细胞凋亡情况(TUNEL,×400),黑色箭头示阳性表达

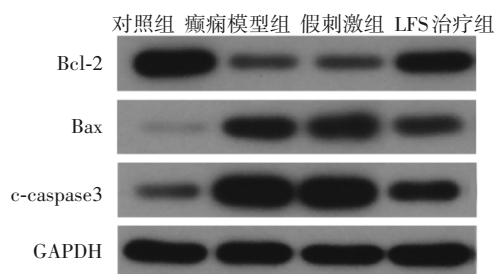


图6 Western blotting检测各组大鼠凋亡相关蛋白的表达

2.4 各组大鼠血清炎症因子水平的比较

与对照组相比,癫痫模型组大鼠血清TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平升高($P<0.05$)。与假刺激组相比,LFS治疗组大鼠血清TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平降低($P<0.05$)。见表7。

 表7 各组大鼠血清炎症因子水平的比较 [pg/mL; ($\bar{x} \pm s$)]

组别	TNF- α	IL-6	IL-1 β
对照组	135.27±14.58	153.39±17.85	84.24±8.74
癫痫模型组	273.82±28.24 ^①	368.21±35.62 ^①	188.05±20.26 ^①
假刺激组	275.64±27.17	373.14±30.29	190.27±23.19
LFS治疗组	182.05±20.02 ^②	204.48±21.54 ^②	124.35±10.44 ^②
F值	72.3	136.8	75.4
P值	0.000	0.000	0.000

 注:①与对照组比较, $P<0.05$;②与假刺激组比较, $P<0.05$

2.5 各组大鼠Rho/ROCK通路相关基因的表达

与对照组相比,癫痫模型组大鼠海马RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA和蛋白表达均升高($P<0.05$)。与假刺激组相比,LFS治疗组大鼠海马RhoA、ROCK1和ROCK2 mRNA表达和蛋白表达均降低($P<0.05$)。见图7、表8

和表9。

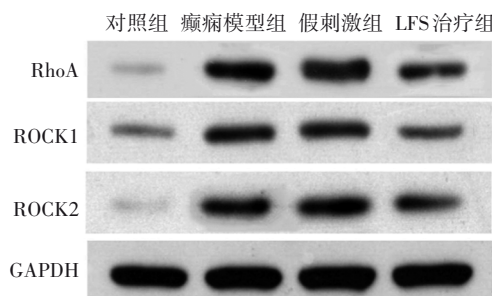


图7 Western blotting检测各组大鼠RhoA、ROCK1和ROCK2蛋白表达

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

组别	RhoA mRNA	ROCK1 mRNA	ROCK2 mRNA
对照组	1.00±0.08	1.00±0.06	1.00±0.08
癫痫模型组	2.36±0.18 ^①	2.08±0.16 ^①	2.66±0.20 ^①
假刺激组	2.39±0.16	2.13±0.20	2.55±0.10
LFS治疗组	1.51±0.09 ^②	1.28±0.09 ^②	1.67±0.13 ^②
F值	190.0	140.7	274.6
P值	0.000	0.000	0.000

 注:①与对照组比较, $P<0.05$;②与假刺激组比较, $P<0.05$

 表9 各组大鼠RhoA、ROCK1和ROCK2蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	RhoA蛋白	ROCK1蛋白	ROCK2蛋白
对照组	0.12±0.01	0.21±0.01	0.10±0.00
癫痫模型组	0.82±0.05 ^①	0.69±0.04 ^①	0.70±0.07 ^①
假刺激组	0.85±0.08	0.70±0.07	0.71±0.06
LFS治疗组	0.42±0.03 ^②	0.33±0.02 ^②	0.36±0.02 ^②
F值	418.7	277.9	343.9
P值	0.000	0.000	0.000

 注:①与对照组比较, $P<0.05$;②与假刺激组比较, $P<0.05$

2.6 各组大鼠NF- κ B通路相关基因的表达

与对照组相比,癫痫模型组大鼠海马p-p65/p65蛋白表达升高($P<0.05$)。与假刺激组相比,LFS治疗组大鼠海马p-p65/p65蛋白表达降低($P<0.05$)。见图8和表10。

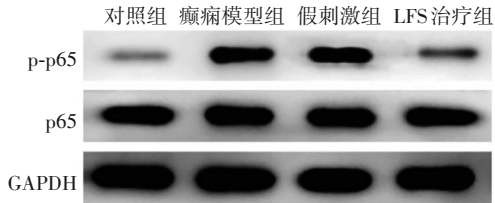


图8 Western blotting检测各组大鼠p-p65和p65蛋白表达

表10 各组大鼠p-p65/p65蛋白表达水平的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	p-p65/p65 蛋白表达
对照组	0.15 \pm 0.01
癫痫模型组	0.69 \pm 0.07 ^①
假刺激组	0.72 \pm 0.07
LFS治疗组	0.24 \pm 0.02 ^②
F值	287.1
P值	<0.001

注:①与对照组比较, $P<0.05$;②与假刺激组比较, $P<0.05$

3 讨论

颞叶癫痫是最常见的癫痫形式,颞叶癫痫患者较常人更易出现焦虑情绪,且可能伴随着认知功能障碍^[9],其中超过30%的癫痫患者患有耐药癫痫(drug-resistant epilepsy, DRE)^[10]。此外,DRE更有可能导致儿童严重的认知延迟和不良的社会心理结果。儿童癫痫的死亡率远高于成人癫痫^[11]。因此,开发新的癫痫临床治疗策略刻不容缓。

DBS的频率通常分为高频(HFS,>100 Hz,大多为130或150 Hz)和低频(LFS,<100 Hz,主要为60或80 Hz)。DBS通过高频或低频电刺激可抑制异常电活动的神经元,在调控患者运动障碍和精神障碍等方面已经得到了很好的临床应用^[12]。已有研究证明,低频或高频DBS治疗对降低晚期帕金森病患者的异动指数具有有利作用,与高频刺激相比,低频刺激可使运动控制性能得到更大的改善^[13]。LFS可在帕金森病中发挥治疗作用^[14]。给予内侧隔核LFS刺激能够明显抑制局灶性癫痫发作,改善慢性癫痫后受损的新事物识别的认知功能^[15]。本研究结果显示,LFS治疗可改善大鼠癫痫症状,降低逃跑潜伏期,提高游泳距离、平台停留时间、神经元数量和尼氏体数量。本研究结果表明,LFS在癫痫大鼠海马神经元中发挥保护作用,并可提高大鼠空间学习记忆能力。

Rho/ROCK信号在各种肌动蛋白细胞骨架相关的细胞功能中发挥重要作用^[16]。已有研究表明,ROCK信号与中枢神经系统炎症性脱髓鞘、退行性变和神经元可塑

性(包括轴突发生、突触可塑性和生长锥动力学)有关^[17]。Rho/ROCK信号可能参与失神性癫痫的病理生理过程。ROCK抑制剂可以抑制失神性癫痫发作的持续时间和频率^[18]。本研究结果显示,癫痫大鼠海马中RhoA、ROCK1和ROCK2的表达升高,神经元细胞凋亡率升高,LFS可抑制RhoA、ROCK1和ROCK2的表达和神经元细胞凋亡。本研究结果表明,LFS可能通过抑制癫痫大鼠中Rho/ROCK信号通路的激活抑制神经元细胞凋亡。

NF- κ B是调节炎症基因表达的重要转录因子。NF- κ B的激活导致炎症介质的产生,包括IL-1 β 、IL-6和TNF- α ^[19]。在癫痫中,NF- κ B信号通路的激活可导致癫痫发作潜伏期缩短,神经元损伤加重,抑制NF- κ B通路活化可抑制癫痫的发生发展^[20]。抑制NF- κ B信号通路活化可降低癫痫发作频率,改善癫痫诱导的认知功能障碍,对海马神经元发挥保护作用^[21]。已有研究表明,Rho/ROCK信号通路的激活可调节NF- κ B信号通路,上调IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平,促进氧化应激、炎症和神经元细胞凋亡,导致大鼠认知障碍^[22-23]。本研究结果显示,癫痫大鼠海马中p65磷酸化水平升高,IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平升高。LFS治疗可抑制NF- κ B通路活化,以及炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平。本研究结果表明,LFS可能通过抑制癫痫大鼠中Rho/ROCK信号通路,进一步抑制NF- κ B通路的激活,从而在癫痫大鼠中发挥保护作用。

综上所述,本研究结果表明,LFS可改善大鼠癫痫症状,抑制癫痫大鼠炎症产生和神经元细胞凋亡,以上作用可能是通过抑制Rho/ROCK/NF- κ B信号通路的激活实现的。本研究为明确LFS在癫痫中的作用机制及开发新的临床治疗策略提供了科学依据。

参 考 文 献

- [1] THIJS RD, SURGES R, O'BRIEN TJ, et al. Epilepsy in adults [J]. Lancet, 2019, 393(10172): 689-701.
- [2] FIEST KM, SAURO KM, WIEBE S, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies[J]. Neurology, 2017, 88(3): 296-303.
- [3] LOZANO AM, LIPSMAN N, BERGMAN H, et al. Deep brain stimulation: current challenges and future directions[J]. Nat Rev Neurol, 2019, 15(3): 148-160.
- [4] COTA VR, DRABOWSKI BM, DE OLIVEIRA JC, et al. The epileptic amygdala: toward the development of a neural prosthesis by temporally coded electrical stimulation[J]. J Neurosci Res, 2016, 94(6): 463-485.
- [5] SONG XJ, HE R, HAN W, et al. Protective effects of the ROCK inhibitor fasudil against cognitive dysfunction following status epilepticus in male rats[J]. J Neurosci Res, 2019, 97(4): 506-519.
- [6] CHEN JY, PETERS A, PAPKE CL, et al. Loss of smooth muscle α -actin leads to NF- κ B - dependent increased sensitivity to an-

- giotensin II in smooth muscle cells and aortic enlargement[J]. *Circ Res*, 2017, 120(12): 1903-1915.
- [7] 高晨,白洁,雷鹏,等. 低氧预处理对氯化锂-匹鲁卡品致痫大鼠的保护作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(1): 111-115.
- [8] ESMAEILPOUR K, SHEIBANI V, SHABANI M, et al. Low frequency electrical stimulation has time dependent improving effect on kindling-induced impairment in long-term potentiation in rats[J]. *Brain Res*, 2017, 1668: 20-27.
- [9] 陈雅瑜,龙莉莉,杨晓燕,等. 颞叶癫痫患者情绪及认知功能研究[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2018, 45(2): 105-109.
- [10] KALILANI L, SUN XZ, PELGRIMS B, et al. The epidemiology of drug-resistant epilepsy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Epilepsia*, 2018, 59(12): 2179-2193.
- [11] DWIVEDI R, RAMANUJAM B, CHANDRA PS, et al. Surgery for drug-resistant epilepsy in children[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(17): 1639-1647.
- [12] ASHKAN K, ROGERS P, BERGMAN H, et al. Insights into the mechanisms of deep brain stimulation[J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(9): 548-554.
- [13] KOBAN O, YILDIAGOREN MT, ARAS M, et al. The effect of subthalamic nucleus - deep brain stimulation and different stimulation frequencies on cerebral hemodynamics in Parkinson's disease: a transcranial doppler study[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2020, 193: 105778.
- [14] SU DN, CHEN HM, HU WL, et al. Frequency-dependent effects of subthalamic deep brain stimulation on motor symptoms in Parkinson's disease: a meta-analysis of controlled trials[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14456.
- [15] 沈雅婷. 低频电刺激内侧隔核对海人藻酸诱导的癫痫模型的作用研究[D]. 杭州:浙江大学, 2019.
- [16] CHONG CM, AI NN, LEE SM. ROCK in CNS: different roles of isoforms and therapeutic target for neurodegenerative disorders [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(4): 455-462.
- [17] YAN YQ, YU JZ, GAO Y, et al. Therapeutic potentials of the Rho kinase inhibitor fasudil in experimental autoimmune encephalomyelitis and the related mechanisms[J]. *Metab Brain Dis*, 2019, 34(2): 377-384.
- [18] ÇARÇAK N, YAVUZ M, ERYİĞİT KARAMAHMUTOĞLU T, et al. Suppressive effect of Rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil on spike-and-wave discharges in genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS) [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2018, 391(11): 1275-1283.
- [19] MITCHELL JP, CARMODY RJ. NF- κ B and the transcriptional control of inflammation[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 335: 41-84.
- [20] LIU AH, WU YT, WANG YP. MicroRNA-129-5p inhibits the development of autoimmune encephalomyelitis-related epilepsy by targeting HMGB1 through the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Brain Res Bull*, 2017, 132: 139-149.
- [21] QU ZZ, JIA LJ, XIE T, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects against lithium-pilocarpine-induced epilepsy by inhibiting the toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1749-1758.
- [22] ZHU LP, CHEN T, CHANG XY, et al. Salidroside ameliorates arthritis-induced brain cognition deficits by regulating Rho/ROCK/NF- κ B pathway[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 103: 134-142.
- [23] HAO XZ, YUAN J, DONG HX. Salidroside prevents diabetes-induced cognitive impairment via regulating the Rho pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 678-684.

责任编辑:龚学民