

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.15.018

双特异性磷酸酶-1 对小胶质细胞极化及颞叶癫痫发作的影响^{*}张 靖¹, 张 宇¹, 任倩玉¹, 安志恒², 王丽敏^{1△}

1. 河北省张家口市第一医院神经内科, 河北张家口 075000; 2. 陆军第八十一集团军医院门诊部, 河北张家口 075000

摘 要:目的 探讨双特异性磷酸酶-1 (DUSP1) 对小胶质细胞极化及颞叶癫痫 (EP) 发作的影响。方法 采用慢病毒转染技术构建 DUSP1 正常表达组 (DUSP1^{normal} 组)、DUSP1 高表达组 (DUSP1^{over} 组)、DUSP1 低表达组 (DUSP1^{low} 组) 小鼠, 每组 12 只, 将这些小鼠又分为 DUSP1^{normal} + 对照 (Con) 组、DUSP1^{normal} + EP 组、DUSP1^{over} + Con 组、DUSP1^{over} + EP 组、DUSP1^{low} + Con 组和 DUSP1^{low} + EP 组, 每组 6 只。取 DUSP1^{normal} + EP 组、DUSP1^{over} + EP 组及 DUSP1^{low} + EP 组小鼠分别腹腔注射氯化锂溶液 (125 mg/kg)、硫酸阿托品溶液 (1 mg/mL) 及盐酸匹罗卡品溶液 (50 mg/kg), 构建颞叶 EP 模型。评估 EP 小鼠注射后 2 h 内 EP 发作等级, 记录达到 IV 级的时间为潜伏期。将 EP 小鼠处死, 取完整脑组织用于免疫荧光检测, 取颞叶组织用于炎症细胞因子、DUSP1 及小胶质细胞调控蛋白检测。结果 与 DUSP1^{normal} 组比较, DUSP1^{over} 组 DUSP1/ β -actin 及 DUSP1 mRNA 表达水平均升高, DUSP1^{low} 组 DUSP1/ β -actin 及 DUSP1 mRNA 表达水平均降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 DUSP1^{normal} + EP 组比较, DUSP1^{over} + EP 组小鼠 EP 发作达 IV 级潜伏期明显延长, DUSP1^{low} + EP 组小鼠 EP 发作达 IV 级潜伏期明显缩短, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 DUSP1^{normal} + Con 组比较, DUSP1^{normal} + EP 组小鼠颞叶组织中 M1 型小胶质细胞极化标志物 CD16、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β 及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 水平均升高, 炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 水平均升高, IL-10 水平降低, DUSP1 诱导小胶质细胞极化相关蛋白 p-胞外调节蛋白激酶 (ERK) 1/2、p-c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 和 p-p38 蛋白表达水平均升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 DUSP1^{normal} + EP 组比较, DUSP1^{over} + EP 组小鼠颞叶组织中 M1 型小胶质细胞极化标志物 CD16、TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS mRNA 水平均降低, M2 型小胶质细胞极化标志物 CD206、转化生长因子- β 、精氨酸酶 1 与几丁质酶样蛋白 mRNA 水平均升高, 炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 水平均降低, IL-10 水平升高, DUSP1 诱导小胶质细胞极化相关蛋白 p-ERK1/2、p-JNK 和 p-p38 蛋白表达水平均降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 DUSP1^{normal} + EP 组比较, DUSP1^{low} + EP 组小鼠颞叶组织中 M1 型小胶质细胞极化标志物 TNF- α 和 iNOS mRNA 水平均升高, 炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 水平均升高, IL-10 水平降低, DUSP1 诱导小胶质细胞极化相关蛋白 p-ERK1/2、p-JNK 和 p-p38 蛋白表达水平均升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 氯化锂溶液-盐酸匹罗卡品溶液点燃 EP 小鼠颞叶组织中 DUSP1 蛋白表达水平降低, 高表达 DUSP1 基因能够延长小鼠 EP 发作的潜伏期, 其机制可能涉及抑制 p-ERK1/2、p-JNK 和 p-p38 蛋白表达来调节小胶质细胞向 M2 型极化。

关键词: 双特异性磷酸酶-1; 小胶质细胞; 丝裂原激活蛋白激酶; 慢病毒载体; 炎症反应; 癫痫**中图分类号:** R742.1; R446.1**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2024)15-2230-07Effect of dual-specificity phosphatase-1 on microglial polarization and seizures in temporal lobe epilepsy^{*}ZHANG Jing¹, ZHANG Yu¹, REN Qianyu¹, AN Zhiheng², WANG Limin^{1△}

1. Department of Neurology, the First Hospital of Zhangjiakou, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;

2. Department of Outpatient, the 81st Group Army Hospital, Zhangjiakou, Hebei 075000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of dual-specificity phosphatase-1 (DUSP1) on microglia polarization and seizures in temporal lobe epilepsy (EP). **Methods** Lentivirus transfection technology was used to construct DUSP1 normal expression group (DUSP1^{normal} group), DUSP1 high expression group (DUSP1^{over} group), and DUSP1 low expression group (DUSP1^{low} group), with 12 mice in each group. These mice were divided into DUSP1^{normal} + control (Con) group, DUSP1^{normal} + EP group, DUSP1^{over} + Con group, DUSP1^{over} + EP group, DUSP1^{low} + Con group and DUSP1^{low} + EP group, with 6 mice in each group. The mice in the DUSP1^{normal} + EP, DUSP1^{over} + EP, and DUSP1^{low} + EP groups were intraperitoneally injected with lithium chlo-

^{*} 基金项目: 张家口市重点研发计划项目 (1921091D)。

作者简介: 张靖, 女, 副主任医师, 主要从事帕金森病、脑血管病及癫痫方面的研究。△ 通信作者, E-mail: kxmmwlm@163.com。

ride solution (125 mg/kg), atropine sulfate solution (1 mg/mL), and pilocarpine hydrochloride solution (50 mg/kg) respectively, to establish a model of EP in the temporal lobe. The EP seizure grade of EP mice within 2 h after injection was evaluated, and the time to reach grade IV was recorded as the latency period. The EP mice were sacrificed, and the intact brain tissues were collected for immunofluorescence detection, and the temporal lobe tissues were collected for the detection of inflammatory cytokines, DUSP1, and microglia regulatory proteins. **Results** Compared with the DUSP1^{normal} group, the expression levels of DUSP/β-actin and DUSP1 mRNA in the DUSP1^{over} group were significantly increased, while the expression levels of DUSP/β-actin and DUSP1 mRNA in the DUSP1^{low} group were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the DUSP1^{normal} + EP group, the DUSP1^{over} + EP group had a significantly longer latency to grade IV EP attack, and the DUSP1^{low} + EP group had a significantly shorter latency to grade IV EP attack ($P < 0.05$). Compared with the DUSP1^{normal} + Con group, the mRNA levels of M1 microglial polarization markers CD16, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-1β and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the temporal lobe of the DUSP1^{normal} + EP group were increased, the levels of inflammatory cytokines (TNF-α and IL-6) were increased, the level of IL-10 was decreased, and the expression levels of microglia induced polarization protein p-extracellular regulated protein kinase (ERK) 1/2, p-c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p-p38 were increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the DUSP1^{normal} + EP group, the mRNA levels of M1 microglial polarization markers CD16, TNF-α, IL-1β and iNOS in the temporal lobe of the DUSP1^{over} + EP group were decreased, the mRNA levels of M2 microglial polarization markers CD206, transforming growth factor-β, arginase 1 and Ym1 were increased, and the levels of TNF-α and IL-6 were decreased, the level of IL-10 was increased, and the expression levels of microglia induced polarization protein p-ERK1/2, p-JNK and p-p38 proteins were decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the DUSP1^{normal} + EP group, the mRNA levels of M1 microglia polarization markers TNF-α and iNOS in the temporal lobe tissues of the DUSP1^{low} + EP group were increased, the levels of inflammatory cytokines TNF-α and IL-6 were increased, and the level of IL-10 was decreased. DUSP1 microglia induced polarization protein p-ERK1/2, p-p38 lightning and the JNK protein expression levels were elevated, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of DUSP1 protein is decreased in the temporal lobe of lithium-pilocarpine induced EP mice. High expression of DUSP1 gene can prolong the latency of EP in mice, and the mechanism may be related to the inhibition of p-ERK1/2, p-JNK and p-p38 protein expression to regulate the polarization of microglia to M2 type.

Key words: dual-specificity phosphatase-1; microglia; mitogen-activated protein kinase; lentiviral vector; inflammatory response; epilepsy

神经炎症反应在癫痫(EP)发展中起重要作用,小胶质细胞是中枢神经系统中巨噬细胞样免疫细胞,是炎症因子释放主体^[1]。体内研究表明,抑制过度激活的小胶质细胞可以减轻 EP^[2],表明小胶质细胞可能是对抗 EP 的潜在治疗靶点。小胶质细胞可以通过极化方式转化为促炎表型 M1 型或抗炎表型 M2 型。M1 型加重神经毒性,而 M2 型发挥神经保护作用。因此,将小胶质细胞从 M1 型转化至 M2 型可能是治疗 EP 发作的一种有前途的策略。双特异性磷酸酶-1 (DUSP1)可以发挥苏氨酸和酪氨酸残基去磷酸化作用,是丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号通路的关键负调控因子^[3]。因此,DUSP1 通过调节 MAPK 信号通路参与细胞生理活动、神经元轴突发育、神经保护和炎症反应。有研究报道表明,DUSP1 与抑郁、焦虑和亨廷顿病等中枢神经活动异常相关^[4-6]。因此,本研究拟通过构建高表达或低表达 DUSP1 蛋白小鼠模型,探究 DUSP1 对小鼠 EP 发作的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与来源 C57BL/6 小鼠 36 只,雄性,无特定病原体(SPF)级,4 周龄,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2021-0011。小鼠入组后饲养于 SPF 动物房中,饲养过程保证充足的饲料与水源,控制室内温度(24 ± 2)℃,湿度(40 ± 10)%,维持 12 h/12 h 光照循环。实验动物伦理审批号为 2023-KY-024。

1.2 实验材料 anti-DUSP1、anti-胞外调节蛋白激酶(ERK)1/2、anti-p-ERK1/2、anti-c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、anti-p-JNK、anti-p38 MAPK、anti-p-p38、anti-β-actin、辣根过氧化物酶(HRP) Goat anti-rat IgG (H + L)、HRP Goat anti-rabbit IgG (H + L); RNA 提取试剂盒;实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂盒;肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6、IL-10 ELISA 试剂盒。

1.3 实验动物分组 将小鼠分为对照(Con)组和 EP

组。颞叶 EP 模型构建前 24 h 取小鼠侧脑室分别注射携带乱序对照基因、DUSP1 基因和 DUSP1 siRNA 基因的慢病毒载体(2×10^9 TU/mL), 剂量: $5\text{ }\mu\text{L}$, 坐标: 以前囟为原点, 前后 -0.8 mm , 坐标 -1.5 mm , 深度 -4.5 mm 。通过慢病毒转染技术分别构建 DUSP1 正常表达组(DUSP1^{normal} 组)、DUSP1 高表达组(DUSP1^{over} 组)和 DUSP1 低表达组(DUSP1^{low} 组)小鼠, 每组 12 只, 将这些小鼠又分为 DUSP1^{normal} + Con 组、DUSP1^{normal} + EP 组、DUSP1^{over} + Con 组、DUSP1^{over} + EP 组、DUSP1^{low} + Con 组、DUSP1^{low} + EP 组, 每组 6 只。携带乱序对照基因、DUSP1 基因和 DUSP1 siRNA 基因的慢病毒载体由广州锐博生物科技有限公司构建。为验证慢病毒载体转染效果, 本研究另选取 12 只小鼠, 分别注射基因载体, 通过 Western blot 试验及 RT-qPCR 检测 DUSP1/ β -actin 及 DUSP1 mRNA 表达水平。

1.4 颞叶 EP 模型构建 取 DUSP1^{normal} + EP 组、DUSP1^{over} + EP 组及 DUSP1^{low} + EP 组小鼠禁食 12 h, 腹腔注射氯化锂溶液(125 mg/kg), 20 h 后, 腹腔注射硫酸阿托品溶液(1 mg/mL), 30 min 后, 腹腔注射盐酸匹罗卡品溶液(50 mg/kg), 诱导颞叶 EP 发作, 持续观察小鼠颞叶 EP 发作情况。参考 Racine 分级^[7] 标准记录小鼠注射完盐酸匹罗卡品溶液至 EP IV 级发作时的潜伏期, 若小鼠 2 h 时内 EP 发作未达到 IV 级, 则记录小鼠 EP 发作潜伏期为 120 min。EP 发作评估 Racine 分级标准: 0 级表现为无抽搐发作; I 级表现为面部和嘴抽动; II 级表现为频繁点头运动; III 级表现为单侧前肢阵挛; IV 级表现为双侧前肢抽搐、时常身体立起; V 级表现为全面性强直-阵挛发作、即身

体背曲强直和跌倒。取 DUSP1^{normal} + Con 组、DUSP1^{over} + Con 组及 DUSP1^{low} + Con 组小鼠, 开展与 EP 模型构建相同操作, 但注射溶液更换为生理盐水。

1.5 Western blot 试验 取小鼠大脑颞叶组织, 加入裂解液匀浆成单细胞溶液, 静置 30 min。以 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 检测各组蛋白水平, 加入上样缓冲液, 煮沸制备成样品。开展十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将凝胶上蛋白条带湿法转移至聚偏二氟乙烯膜上, 4% 胎牛血清封闭抗原, 加入不同水平第一抗体(anti-DUSP1、anti-p-ERK1/2、anti-ERK1/2、anti-p-JNK、anti-JNK、anti-p-p38、anti-p38、anti- β -actin), 孵育 12 h。洗净第一抗体后, 加入 HRP 标记的第二抗体[Goat anti-rat IgG(H+L)、Goat anti-rabbit IgG(H+L)], 孵育 2 h。洗净第二抗体, 滴加显色液, 在化学发光成像仪下显影获得各个蛋白条带。

1.6 RT-qPCR 取小鼠大脑颞叶组织, 放入液氮中碾碎, 加入 Trizol 试剂混匀、振荡并静置 10 min。加入氯仿, 混匀、振荡并静置 5 min。以 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上层水相, 加入等体积乙醇混匀、振荡并静置 5 min, 以 12 000 r/min 离心 15 min, 收集总 RNA 沉淀, 加入适量焦碳酸二乙酯水溶解沉淀。取样品检测 RNA 纯度、水平与完整性。将总 RNA 反转录为环状 DNA(cDNA)。最后取 cDNA 进行 RT-qPCR, 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 预变性, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s 45 个循环, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min 退火。定量分析以 GAPDH 基因表达为内参, 结果以 Ct 值表示, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因相对表达水平。引物序列由广州锐博生物科技有限公司提供, 见表 1。

表 1 基因引物序列

名称	序列(5'-3')	
DUSP1	正向: AGTGAAGGACTGGCGGGAGGA	反向: TACAACAGAATAAATTATGACGT
CD16	正向: TTTGGACACCCAGATGTTTCAG	反向: GTCTTCCTTGAGCACCTGGATC
TNF- α	正向: TACTGAACCTCGGGGTGATTGGTCC	反向: CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC
IL-1 β	正向: CCAGCAGGTTATCATCATCATCC	反向: CTCGCAGCAGCACATCAAC
iNOS	正向: ACAACAGGAACCTACCAGCTCA	反向: GATGTTGTAGCGCTGTGTGTCA
CD206	正向: CTTCGGGCCTTTGGAATAAT	反向: CTTCGGGCCTTTGGAATAAT
TGF- β	正向: GACCGCAACAACGCCATCTA	反向: GGCGTATCAGTGGGGGTCAG
Arg1	正向: AGACAGCAGAGGAGGTGAAGAG	反向: CGAAGCAAGCCAAGGTTAAAGC
Ym1	正向: CATTCAAGTCAGTTATCAGATTCC	反向: AGTGAGTAGCAGCCTTGG
GAPDH	正向: TGAACGGAAGCTCACTGG	反向: TCCACCACCTGTTGCTGTA

注: TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ; IL-1 β 为白细胞介素-1 β ; iNOS 为诱导型氧化氮合酶; CD206 为甘露糖受体; TGF- β 为转化生长因子- β ; Arg1 为精氨酸酶 1; Ym1 为几丁质酶样蛋白。

1.7 炎症细胞因子检测 将小鼠处死, 取大脑颞叶组织, 加入磷酸盐缓冲液, 匀浆、振荡、静置, 以 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液用于炎症细胞因子水

平检测。取 ELISA 试剂盒中预包被抗体样品板, 分别加入不同水平标准品与待测样品, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h; 清洗样品孔, 加入一抗稀释液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h; 清洗样品

孔,加入二抗稀释液,37℃孵育2h;清洗样品孔,加入底物显色,约5min终止显色反应。酶标仪450nm波长处检查各孔吸光度值,通过标准品孔吸光度值计算出水平一吸光度值的标准曲线,根据标准曲线计算出各个样品中不同炎症细胞因子水平。

1.8 统计学处理 采用SPSS23.0统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3组DUSP1/ β -actin和DUSP1 mRNA表达水平比较 与DUSP1^{normal}组比较,DUSP1^{over}组小鼠颞叶组织中DUSP1/ β -actin及DUSP1 mRNA表达水平均明显升高,而DUSP1^{low}组小鼠颞叶组织中DUSP1/ β -actin及DUSP1 mRNA表达水平均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图1、表2。

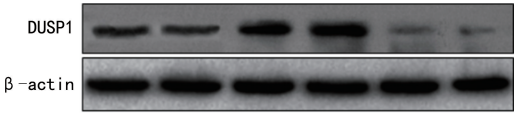


图1 3组小鼠颞叶组织DUSP1蛋白条带

表2 3组DUSP1/ β -actin和DUSP1 mRNA表达水平比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	DUSP1/ β -actin	DUSP1 mRNA
DUSP1 ^{normal} 组	12	0.56±0.09	0.50±0.06
DUSP1 ^{over} 组	12	0.96±0.29 [#]	1.26±0.16 [#]
DUSP1 ^{low} 组	12	0.08±0.02 [#]	0.10±0.05 [#]
<i>F</i>		18.910	99.010
<i>P</i>		0.003	<0.001

注:与DUSP1^{normal}组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.2 3组小鼠EP发作达Ⅳ级潜伏期比较 DUSP1^{normal}+EP组、DUSP1^{over}+EP组和DUSP1^{low}+EP组小鼠EP发作达Ⅳ级潜伏期分别为(49.50±9.28)min、

(92.69±20.49)min和(22.61±8.54)min,差异有统计学意义($F=77.72,P<0.001$)。与DUSP1^{normal}+EP组比较,DUSP1^{over}+EP组小鼠EP发作达Ⅳ级潜伏期明显延长,DUSP1^{low}+EP组小鼠EP发作达Ⅳ级潜伏期明显缩短,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 6组小鼠颞叶组织中小胶质细胞极化标志物mRNA水平比较 与DUSP1^{normal}+Con组比较,DUSP1^{normal}+EP组小鼠颞叶组织中M1型小胶质细胞极化标志物CD16、TNF- α 、IL-1 β 和iNOS mRNA水平均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);M2型小胶质细胞极化标志物CD206、TGF- β 、Arg1和Ym1 mRNA水平均无明显变化,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与DUSP1^{normal}+Con组比较,DUSP1^{over}+Con组与DUSP1^{low}+Con组M1型和M2型小胶质细胞极化标志物mRNA水平均无明显变化,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与DUSP1^{normal}+EP组比较,DUSP1^{over}+EP组M1型小胶质细胞极化标志物CD16、TNF- α 、IL-1 β 和iNOS mRNA水平均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);M2型小胶质细胞极化标志物CD206、TGF- β 、Arg1和Ym1 mRNA水平均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与DUSP1^{normal}+EP组比较,DUSP1^{low}+EP组M1型小胶质细胞极化标志物CD16和IL-1 β mRNA水平均无明显变化,差异均无统计学意义($P>0.05$);M1型小胶质细胞极化标志物TNF- α 和iNOS mRNA水平均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与DUSP1^{normal}+EP组比较,DUSP1^{low}+EP组M2型小胶质细胞极化标志物TGF- β mRNA水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);M2型小胶质细胞极化标志物CD206、Arg1和Ym1水平均无明显变化,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表3、4。

表3 6组M1型小胶质细胞极化标志物mRNA水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD16	TNF- α	IL-1 β	iNOS
DUSP1 ^{normal} +Con组	6	1.00±0.11	1.00±0.10	1.00±0.12	1.00±0.09
DUSP1 ^{normal} +EP组	6	3.73±0.69 [#]	3.49±0.41 [#]	2.74±0.48 [#]	4.86±1.44 [#]
DUSP1 ^{over} +Con组	6	1.17±0.28	1.13±0.20	0.89±0.16	1.19±0.19
DUSP1 ^{over} +EP组	6	1.25±0.24 [*]	1.04±0.34 [*]	1.26±0.29 [*]	1.32±0.23 [*]
DUSP1 ^{low} +Con组	6	0.87±0.23	1.32±0.36	1.12±0.24	0.90±0.21
DUSP1 ^{low} +EP组	6	4.26±0.94	5.82±0.56 [*]	3.49±0.67	6.20±1.27 [*]
<i>F</i>		59.630	129.280	33.330	62.370
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与DUSP1^{normal}+Con组比较,[#] $P<0.05$;与DUSP1^{normal}+EP组比较,^{*} $P<0.05$ 。

2.4 6组小鼠颞叶组织中炎症细胞因子水平比较 与DUSP1^{normal}+Con组比较,DUSP1^{normal}+EP

组炎症细胞因子TNF- α 、IL-6水平均明显升高,IL-10水平明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与

DUSP1^{normal} + Con 组比较, DUSP1^{over} + Con 组和 DUSP1^{low} + Con 组炎症细胞因子 TNF-α、IL-6 和 IL-10 水平均无明显变化, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 DUSP1^{normal} + EP 组比较, DUSP1^{over} + EP 组炎症细胞因子 TNF-α、IL-6 水平均明显降低, IL-10 水平明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); DUSP1^{low} + EP 组炎症细胞因子 TNF-α、IL-6 水平均明显升高, IL-10 水平明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

2.5 6 组小鼠颞叶组织中 DUSP1 诱导小胶质细胞极化相关蛋白表达水平比较 与 DUSP1^{normal} + Con 组比较, DUSP1^{normal} + EP 组 DUSP1/β-actin 表达水

平明显降低, p-ERK1/2、p-JNK 和 p-p38/β-actin 表达水平均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 DUSP1^{normal} + Con 组比较, DUSP1^{over} + Con 组和 DUSP1^{low} + Con 组 DUSP1/β-actin、p-ERK1/2、p-JNK 和 p-p38 表达水平均无明显变化, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 DUSP1^{normal} + EP 组比较, DUSP1^{over} + EP 组 DUSP1/β-actin 表达水平明显升高, p-ERK1/2、p-JNK 和 p-p38 表达水平均明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); DUSP1^{low} + EP 组 DUSP1/β-actin 表达水平明显降低, p-ERK1/2、p-JNK 和 p-p38 表达水平均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6、图 2。

表 4 6 组 M2 型小胶质细胞极化标志物 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD206	TGF-β	Arg1	Ym1
DUSP1 ^{normal} + Con 组	6	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.09
DUSP1 ^{normal} + EP 组	6	0.84 ± 0.15	0.94 ± 0.22	1.04 ± 0.36	1.20 ± 0.34
DUSP1 ^{over} + Con 组	6	0.88 ± 0.12	0.77 ± 0.45	1.11 ± 0.29	1.32 ± 0.22
DUSP1 ^{over} + EP 组	6	1.82 ± 0.51 [*]	4.89 ± 0.98 [*]	3.23 ± 0.52 [*]	2.77 ± 0.31 [*]
DUSP1 ^{low} + Con 组	6	0.83 ± 0.13	0.81 ± 0.19	0.85 ± 0.20	1.05 ± 0.35
DUSP1 ^{low} + EP 组	6	0.72 ± 0.09	0.54 ± 0.31 [*]	0.91 ± 0.23	0.96 ± 0.23
<i>F</i>		12.780	49.560	34.510	25.990
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 DUSP1^{normal} + Con 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 DUSP1^{normal} + EP 组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

表 5 6 组小鼠颞叶组织中炎症细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mg)

组别	<i>n</i>	TNF-α	IL-6	IL-10
DUSP1 ^{normal} + Con 组	6	81.54 ± 15.06	99.88 ± 21.82	396.38 ± 43.71
DUSP1 ^{normal} + EP 组	6	253.58 ± 53.42 [#]	636.91 ± 129.43 [#]	145.24 ± 20.92 [#]
DUSP1 ^{over} + Con 组	6	79.43 ± 19.15	127.77 ± 28.66	431.01 ± 50.05
DUSP1 ^{over} + EP 组	6	101.44 ± 28.74 [*]	146.51 ± 38.52 [*]	351.32 ± 36.97 [*]
DUSP1 ^{low} + Con 组	6	86.44 ± 20.78	136.44 ± 32.79	386.37 ± 43.94
DUSP1 ^{low} + EP 组	6	398.38 ± 66.68 [*]	869.43 ± 148.22 [*]	58.42 ± 18.72 [*]
<i>F</i>		68.290	93.000	100.500
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 DUSP1^{normal} + Con 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 DUSP1^{normal} + EP 组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

表 6 6 组小鼠颞叶组织中 DUSP1 诱导小胶质细胞极化相关蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mg)

组别	<i>n</i>	DUSP1/β-actin	p-ERK1/2 或 ERK1/2	p-JNK/JNK	p-p38/p38
DUSP1 ^{normal} + Con 组	6	0.88 ± 0.15	0.43 ± 0.06	0.32 ± 0.05	0.15 ± 0.06
DUSP1 ^{normal} + EP 组	6	0.24 ± 0.09 [#]	1.25 ± 0.18 [#]	1.21 ± 0.21 [#]	0.83 ± 0.15 [#]
DUSP1 ^{over} + Con 组	6	1.09 ± 0.33 [*]	0.49 ± 0.12	0.36 ± 0.05	0.15 ± 0.06
DUSP1 ^{over} + EP 组	6	0.96 ± 0.15 [*]	0.44 ± 0.11 [*]	0.41 ± 0.08 [*]	0.42 ± 0.12 [*]
DUSP1 ^{low} + Con 组	6	0.11 ± 0.06 [#]	0.42 ± 0.12	0.46 ± 0.13	0.18 ± 0.06
DUSP1 ^{low} + EP 组	6	0.18 ± 0.08 [*]	1.43 ± 0.14 [*]	1.40 ± 0.14 [*]	1.14 ± 0.22 [*]
<i>F</i>		21.280	41.730	44.870	32.750
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 DUSP1^{normal} + Con 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 DUSP1^{normal} + EP 组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

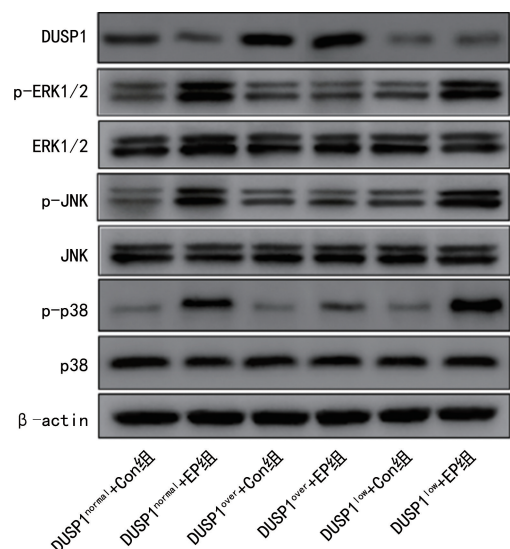


图 2 6 组小鼠颞叶组织中 DUSP1、ERK1/2、JNK 与 p38 蛋白表达条带

3 讨 论

颞叶 EP 是一类发病复杂且表型多样的中枢神经系统疾病^[8]。氯化锂溶液-盐酸匹罗卡品溶液点燃颞叶 EP 属于化学点燃模型,可以很好地模拟临床患者病理学特征^[9]。本研究结果显示,氯化锂溶液-盐酸匹罗卡品溶液点燃的颞叶 EP 小鼠基本都出现了前肢抽搐、时常身体立起症状,但对于 DUSP1 表达差异的小鼠,其潜伏期不同。与 DUSP1^{normal} + EP 组比较, DUSP1^{low} + EP 组小鼠潜伏期明显缩短,但 DUSP1^{over} + EP 组小鼠潜伏期明显延长,且 3 组小鼠在模型构建完成 120 min 内 EP 症状没达到Ⅳ级。提示本研究颞叶 EP 模型构建成功,且小鼠 EP 发作潜伏期与 DUSP1 蛋白表达相关。

DUSP1 在全身广泛表达,参与细胞分化、增殖及凋亡调节^[10]。DUSP1 可以使 MAPK 超家族成员去磷酸化并失活,属于 MAPK 的负调控因子^[3]。MAPK 超家族成员包含 ERK1/2、JNK 和 p38。肝癌相关研究中,DUSP1 被发现通过钝化 ERK1/2/JNK 活性减轻缺氧诱导因子-1 α 过度激活的影响,促进肝癌细胞增殖^[11]。DUSP1 也被报道参与多种中枢神经系统生理信号调控。CHOI 等^[12] 早期研究显示,内源性 DUSP1 蛋白敲除能够明显提高谷氨酸神经毒性,促进细胞凋亡,同时高表达 DUSP1 能够明显减轻神经细胞凋亡。本研究结果显示,颞叶 EP 发作造成小鼠脑组织中 ERK1/2、p38 和 JNK 的磷酸化水平升高,而 DUSP1 过表达则导致 EP 小鼠中 ERK1/2、p38 和 JNK 的磷酸化水平降低,表明 DUSP1 发挥的抗 EP 作用与其抑制 MAPK 信号有关。MAPK 信号在小胶质细胞活化和极化调控中起重要作用^[13]。然而,与 DUSP1^{normal} + Con 组比较, DUSP1^{over} + Con 组 DUSP1 表达水平虽然升高,但 ERK1/2、p38 和 JNK 的磷酸化水平却无明显变化,由此提示 DUSP1 对

MAPK 家族蛋白的影响需要在激活条件下发挥。

最近,DUSP1 被证实通过抑制 p38 MAPK 信号减弱小胶质细胞诱发的神经炎症反应^[14]。本研究结果也显示 DUSP1 高表达能够抑制 MAPK 信号,促进 M2 型小胶质细胞活化。此外,低表达 DUSP1 与激活 MAPK 信号及促进小胶质 M1 极化相关^[13-14]。小胶质细胞介导的神经炎症反应与颞叶 EP 病理发展进程相关。体外研究中,M1 型小胶质细胞是由脂多糖或干扰素- γ 刺激诱导形成,其特征包括释放几种细胞因子,如 iNOS、CD68、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 。M2 型小胶质细胞是由 IL-4、IL-10 和 IL-13 诱导,其特征包括 Arg-1、CD206 蛋白表达增加或 IL-4、IL-10 细胞因子释放增加^[15]。有研究表明,与对照组比较,颞叶 EP 患者血清 IL-1 β 、IL-6 水平均升高^[16]。FU 等^[17] 报道表明,丙戊酸钠耐受 EP 小鼠表现出的持续 EP 发作与颞叶中小胶质细胞 M1/M2 型极化标志物比例增加相关。DENG 等^[18] 研究表明,小鼠颞叶 EP 模型中,位于小胶质细胞膜表面的 Runx1 蛋白通过 Notch1 信号促进 M2 型小胶质细胞向 M1 型小胶质细胞极化,缩短 EP 潜伏期。这些研究表明 M1 型小胶质细胞介导的神经炎症反应与颞叶 EP 发作有关。本研究观察显示,颞叶 EP 发作潜伏期与小胶质细胞中 M1 型极化增加相关,M1 型小胶质细胞极化标志物 mRNA 水平和炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 水平均明显升高证明了这一点。小胶质细胞 M1/M2 型极化的改变在控制神经损伤的炎症反应中起关键作用。M1 型小胶质细胞加剧神经毒性,而 M2 型小胶质细胞发挥神经保护作用。因此,提高小胶质细胞向 M2 型可极化是颞叶 EP 治疗的一种有前途的策略。本研究结果也证实了通过提高 DUSP1 表达能够明显促进 M2 型小胶质细胞极化。具体结果表现为,高表达 DUSP1 明显降低 iNOS mRNA 表达水平与炎症细胞因子(TNF- α 、IL-6)释放。

本研究仍存在一些局限性。首先,高表达 DUSP1 或低表达 DUSP1 小鼠大脑颞叶组织中 iNOS 及 Arg1 蛋白表达水平并没有明显升高或降低,这可能涉及小胶质细胞活化/极化相关其他信号通路补偿,这些相关的信号通路可能也会成为 EP 治疗的潜在靶标。此外,通过体外实验探究高表达 DUSP1 能否促进小胶质细胞 M2 极化作用仍需进一步研究。

本研究意义在于揭示了 DUSP1 基因蛋白表达降低与 EP 发作相关。高表达 DUSP1 基因能够明显延长小鼠 EP 发作至Ⅳ级的潜伏期,其机制可能涉及抑制 MAPK 信号通路来调节小胶质细胞向 M2 型极化。因此,针对 DUSP1 基因设计相关生物制剂,诱导 DUSP1 蛋白表达,将有助于丰富 EP 的治疗选择。

参考文献

[1] XU L, HE D, BAI Y. Microglia-mediated inflammation

and neurodegenerative disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(10):6709-6715.

[2] WANG J, LIANG J, DENG J, et al. Emerging role of microglia-mediated neuroinflammation in epilepsy after subarachnoid hemorrhage[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(6): 2780-2791.

[3] LI Y, XU S, XU Q, et al. Clostridium difficile toxin B induces colonic inflammation through the TRIM46/DUSP1/MAPKs and NF- κ B signalling pathway[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1):452-462.

[4] ZHAO Y, WANG S, CHU Z, et al. MicroRNA-101 in the ventrolateral orbital cortex (VLO) modulates depressive-like behaviors in rats and targets dual-specificity phosphatase 1 (DUSP1)[J]. *Brain Res*, 2017, 1669:55-62.

[5] TAYLOR D M, MOSER R, RÉGULIER E, et al. MAP kinase phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1) is neuroprotective in Huntington's disease via additive effects of JNK and p38 inhibition[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(6): 2313-2325.

[6] BARTHAS F, HUMO M, GILSBACH R, et al. Cingulate overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 as a key factor for depression[J]. *Biol Psychiatry*, 2017, 82(5):370-379.

[7] PHELAN K D, SHWE U T, WILLIAMS D K, et al. Pilocarpine-induced status epilepticus in mice; a comparison of spectral analysis of electroencephalogram and behavioral grading using the Racine scale[J]. *Epilepsy Res*, 2015, 117:90-96.

[8] WEBER Y G, BISKUP S, HELBIG K L, et al. The role of genetic testing in epilepsy diagnosis and management[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017, 17(8):739-750.

[9] WANG P, MA K, YANG L, et al. Predicting signaling pathways regulating demyelination in a rat model of lithium-pilocarpine-induced acute epilepsy; a proteomics study[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 193(Pt B):1457-1470.

[10] YANG J, SUN L, HAN J, et al. DUSP1/MKP-1 regulates proliferation and apoptosis in keratinocytes through the ERK/Elk-1/Egr-1 signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 223:47-53.

[11] LIU C, SHI Y, HAN Z, et al. Suppression of the dual-specificity phosphatase MKP-1 enhances HIF-1 trans-activation and increases expression of EPO[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312(3):780-786.

[12] CHOI B H, HUR E M, LEE J H, et al. Protein kinase cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 7):1329-1340.

[13] PLASTIRA I, BERNHART E, JOSHI L, et al. MAPK signaling determines lysophosphatidic acid (LPA)-induced inflammation in microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):127.

[14] WANG X, JIANG Y, LI J, et al. DUSP1 promotes microglial polarization toward M2 phenotype in the medial prefrontal cortex of neuropathic pain rats via inhibition of MAPK pathway[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(6): 966-978.

[15] TANG Y, LE W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2):1181-1194.

[16] ULUDAG I F, DUKSAL T, TIFTIKCIOGLU B I, et al. IL-1 β , IL-6 and IL1Ra levels in temporal lobe epilepsy[J]. *Seizure*, 2015, 26:22-25.

[17] FU M, ZHU Y, ZHANG J, et al. MicroRNA-221-3p suppresses the microglia activation and seizures by inhibiting of HIF-1 α in valproic acid-resistant epilepsy[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:714556.

[18] DENG X L, FENG L, WANG Z X, et al. The Runx1/Notch1 signaling pathway participates in m1/m2 microglia polarization in a mouse model of temporal lobe epilepsy and in BV-2 cells[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(9): 2204-2216.

(收稿日期:2023-10-18 修回日期:2024-04-10)

(上接第 2229 页)

[15] GAMBICHLER T, ABU R N, SUSOK L, et al. Serum neuron-specific enolase independently predicts outcomes of patients with Merkel cell carcinoma[J]. *Br J Dermatol*, 2022, 187(5):806-808.

[16] HANIN A, DEMERET S, DENIS J A, et al. Serum neuron-specific enolase; a new tool for seizure risk monitoring after status epilepticus[J]. *Eur J Neurol*, 2022, 29(3):883-889.

[17] 张斌, 何惟高, 戴伶伶. 不同 GCS 评分脑挫伤患者额叶功能及血清及脑脊液 NSE、MBP 检测分析[J]. *浙江创伤外科*, 2019, 24(1):178-179.

[18] 刘保茹, 周江朝. 血清及脑脊液 S-100 β 、NSE、MBP 联合 sICAM-1 评估病毒性脑炎儿童神经功能的价值[J]. *山东第一医科大学(山东省医学科学院)学报*, 2021, 42(6): 439-441.

[19] 吕庆平, 金许洪, 陈怀, 等. 颅脑损伤患者脑脊液神经元特异性烯醇化酶、星形胶质源性蛋白水平变化及其临床意义[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2020, 30(6):474-477.

[20] 云磊, 刘军, 付杰. 血清 S-100 β NSE MBP 动态变化对新生儿颅内出血预后的评估价值[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2023, 26(11):1360-1364.

(收稿日期:2023-11-06 修回日期:2024-04-15)