

低氧预处理降低大鼠癫痫易感性及其 脑保护作用的机制初探

高 晨¹, 田立桩², 朱文霞¹, 白 洁¹, 王瑞娟¹, 高菱宜¹, 赵 静¹

(1. 兰州军区兰州总医院安宁分院, 兰州 730070; 2. 兰州军区兰州总医院, 兰州 730050)

【摘要】 目的 初步探讨间断低氧预处理 (intermittent hypoxia preconditioning, IHP) 对氯化锂-匹鲁卡品 (lithium-pilocarpine, Li-pilo) 致痫大鼠痫性发作的影响及其脑保护作用机制。**方法** 96 只清洁级 SD 大鼠, 随机均分为对照组, 癫痫组和 4 个间断低氧预处理 + 癫痫组。癫痫组及 4 个间断低氧预处理 + 癫痫组 (分别在 5 d IHP 预处理后 1, 3, 7, 14 日注射) 大鼠通过腹腔注射氯化锂-匹鲁卡品建立癫痫模型。随后进行 240 min 的发作行为学, 全身性发作潜伏期及百分比量化分析并通过水迷宫实验测试大鼠认知功能。接着利用 TUNEL 标记和免疫印迹方法进行大鼠海马神经元凋亡及相关蛋白 (BCL-2, Bax 和 cleaved-caspase-3) 的检测。**结果** 氯化锂-匹鲁卡品注射后 50 ~ 150 min 之间, 癫痫发作的改良 Racine 评分达到峰值。间断低氧预处理后 3 日诱发癫痫组大鼠其平均改良 Racine 评分明显低于其余各组, 该组全身性发作潜伏期及百分比与癫痫组相比差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。相比癫痫组和其余 3 个间断低氧预处理 + 癫痫组大鼠, 间断低氧预处理后 3 日诱发癫痫组大鼠逃避潜伏期 (escape latency) 较短, 神经元凋亡计数较低, 而目标象限停留时间百分比比较高 ($P < 0.05$)。间断低氧预处理后 3 日诱发癫痫组的水迷宫以及凋亡检测参数与对照组相比较无明显差异 ($P > 0.05$)。**结论** IHP 预处理通过抑制异常凋亡降低大鼠癫痫易感性, 并具有脑保护作用。

【关键词】 低氧预处理; 癫痫; 脑保护; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 12-0032-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.12.007

Preliminary study on the role of hypoxia preconditioning in decreasing the susceptibility to epilepsy and brain protection in rats

GAO Chen¹, TIAN Li-zhuang², ZHU Wen-xia¹, BAI Jie¹, WANG Rui-juan¹, GAO Ling-yi¹, ZHAO Jing¹

(1. AnNing Branch Hospital, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region, Lanzhou 730070, China.

2. Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region, Lanzhou 730050.)

【Abstract】 Objective To preliminarily explore the effects and brain protective mechanism of intermittent hypoxia preconditioning (IHP) on rats with seizures induced by lithium-pilocarpine (Li-pilo). **Methods** A total of 96 8-week old male Sprague Dawley rats (clean grade) were randomly divided into control group, seizure group and four IHP-seizure groups. The animal model of epilepsy was established by intraperitoneal injection of Li-pilo in the seizure group and four IHP-seizure groups (Li-pilo was injected at 1, 3, 7, or 14 days after a 5-day regimen of IHP). Subsequent seizure behavior, the latency period and percentage of generalized seizures were quantitatively evaluated for 240 min and the cognitive function was tested by Morris water maze task, and followed by the detection of hippocampus neuron apoptosis and related protein (BCL-2, Bax, and cleaved-caspase-3) by TUNEL labeling and Western blot, respectively. **Results** The

induced seizure peaked on an average between 50 – 150 min after Li-pilo administration, scored using a modified Racine scale. The average scores of modified Racine scale in the IHP-3d seizure group was significantly lower than that in the other groups. The latency period and percentage of generalized seizures in the IHP-3d seizure group rats were significantly different from the parameters in the seizure group rats ($P < 0.05$). IHP-3d seizure rats showed lower escape latency, neuronal apoptosis counts and higher percentage of time in the probe quadrant compare with the seizure group and the other three IHP-seizure groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, the parameters of water maze and apoptosis detection in the IHP-3d seizure group showed no significant changes ($P > 0.05$). **Conclusions** The results indicate that IHP treatment may help to decrease the susceptibility to epilepsy by reducing abnormal apoptosis, and has a brain protective effect on the seizure rats.

【Key words】 Hypoxia preconditioning; Epilepsy; Brain protection; Rat

接近且低于细胞损伤阈值的多种有害刺激诱导机体产生适应性以保护器官对抗后续的同种(耐受)或不同种(交叉耐受)损伤刺激,这一机体的内生性保护机制已成为脑保护研究热点^[1]。研究表明癫痫预处理通过交叉耐受保护大脑抵抗缺血/缺氧损伤^[2]。本研究通过 IHP 预处理后药物致痫大鼠癫痫易感性的实验观察以及海马神经元凋亡检测,初步探讨适度低氧对癫痫的影响及其脑保护机制,为相关疾病新的治疗方案奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

清洁级 8 周龄雄性 SD 大鼠 96 只,兰州大学医学实验动物中心提供【SCXK(甘)2014-0016】,体重 200 ~ 250 g,常规分笼饲养。动物实验经兰州军区兰州总医院伦理委员会书面同意,具备动物实验资格【SYXK(军)2014-022】。动物随机分为 6 组(每组 16 只):对照组(control;始终正常饲养),癫痫组(seizure;制作 Li-pilo 癫痫模型)和 4 个间断低氧预处理 + 癫痫组(IHP-seizure,分别在 IHP 预处理后第 1,3,7,14 日制作 Li-pilo 癫痫模型)。

氯化锂(Q2084)和匹鲁卡品(P6503)购自美国 Sigma 公司。TUNEL 凋亡检测试剂盒(QIA33)购自美国 Merck Millipore 公司。Cleaved-caspase-3 单抗(#9664),Bax 多抗(#2772)和 α -tubulin(#2144)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。Bcl-2(N-19)多抗(sc-492)购自 Santa Cruz 上海分公司。辣根过氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)二抗(ab136817)购自美国 Abcam 公司。

1.2 大鼠 IHP 预处理

大鼠被分组置于密闭的预处理有机玻璃盒子(70 × 40 × 20) cm³ 中,盒内温度维持在 22 ~ 25°C。自充气口向盒内充入低氧混合气体(9% O₂ + 91%

N₂),流量 4 L/min,每日 90 min,连续 5 d。对照组及癫痫组大鼠也间断置于盒子中饲养,但不密闭隔绝空气。

1.3 大鼠 Li-pilo 癫痫模型制作

大鼠先行腹腔注射氯化锂(125 mg/kg),18 ~ 24 h 后再次腹腔注射匹鲁卡品(20 mg/kg)。在匹鲁卡品注射前 30 min,以 1 mg/kg 剂量腹腔注射东莨菪碱可以减轻其胆碱能副作用。对照组大鼠腹腔注射氯化锂,18 ~ 24 h 后以等容量生理盐水代替匹鲁卡品腹腔注射。

1.4 癫痫模型的行为学观察及量化分析

癫痫组及 IHP-癫痫组各组随机选取 8 只进行行为学视频监控,持续 240 min。依据改良 Racine 评分法^[3]对监测视频每 5 min 进行 1 次评分,每只大鼠 48 个评分点。具体评分标准如下:0 级,静止不动,立毛,兴奋和快速呼吸;1 级,嘴部活动,唇舌和触须,流涎;2 级,头和眼阵挛;3 级,前肢阵挛,湿狗样颤栗;4 级,阵挛性直立;5 级,阵挛性直立合并姿势失控及不自控的跳跃。另外计算癫痫大鼠药物注射后达到改良 Racine 4 级(即全身性发作)的平均潜伏期以及 48 个评分点达到全身性发作(改良 Racine 4,5 级)的百分比。

1.5 水迷宫实验

各组剩余 8 只大鼠进行 Morris 水迷宫实验。以定位航行实验测试大鼠的认知学习能力。将大鼠随机放入圆形泳池等分的 4 个象限内自由游动,直至寻找并爬上水中平台。如在 1 min 内大鼠找到平台,逃避潜伏期即为寻找平台实际时间。如 1 min 内找不到平台,逃避潜伏期记为 60 s。计算每日 2 次 8 个象限的平均逃避潜伏期。连续进行 5 d 实验。

以空间探索实验测试大鼠的记忆能力。在定位航行实验的第 1 日和第 5 日测试后进行空间探索

试验。撤除平台后将大鼠从平台所在对侧象限中点放入水中,计算 120 s 内大鼠在平台象限平均停留的时间百分比。

1.6 鼠脑免疫组化切片制备

各组随机选取 8 只大鼠在水合氯醛麻醉下经心脏灌注处死,断头取脑。4% 多聚甲醛固定 24 h,蔗糖 PB 溶液阶梯脱水 48 h。包埋后连续冰冻切片(厚度 6 μm)。

1.7 原位末端脱氧核苷酸转移酶介导生物素标记的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸缺口末端标记(TUNEL)凋亡检测(显色法)

每组随机选 8 张鼠脑切片,顺序滴加蛋白酶 K 工作液(90 min),3% H_2O_2 甲醇溶液(5 min),TdT 平衡缓冲液(30 min),均室温孵育。滴加 60 μL TdT 标记反应混合物,37°C 避光湿盒内孵育 90 min。滴加终止液室温孵育 5 min。随后顺序滴加封闭缓冲液(10 min),偶联物(30 min)以及 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)工作液(10 ~ 15 min),均室温孵育,甲基绿复染 3 min,显微镜明场条件下观察并拍照。Images J 软件图像分析,每组切片随机选择海马 CA1 区 10 个不同的高倍视野($\times 200$)计数阳性细胞数,取平均值。

1.8 免疫印迹(Western blot)凋亡相关因子及蛋白检测

各组剩余大鼠在水合氯醛麻醉下直接断头处死。取海马组织匀浆后裂解,提取总蛋白,BCA 法测定浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)每孔上样蛋白总量为 20 μg ,时间 120 min。350 mA 恒流带电转膜(120 min),5% 牛血清白蛋白室温震荡封闭 1 h,5% 脱脂奶粉稀释后分别加入一抗(BCL-2, Bax, cleaved-caspase-3, 1:1000),以 α -tubulin(1:1000)作为内参,4°C 孵育过夜。1:5000 稀释的 HRP 二抗在室温下震荡孵育 2 h。滴加发光

检测液在凝胶成像系统中拍照。Image J 软件灰度量化分析,重复 3 次实验取平均值。

1.9 统计学方法

本研究数据资料采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。不同组样本均数间的两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。根据各组总体方差齐同与否,选择 Bonferroni 法或 Tamhane's T2 法修正结果,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癫痫模型大鼠视频行为学表现及量化分析

各组 8 只视频监测癫痫大鼠 48 个时间点改良 Racine 评分均值折线图如图 1 所示。急性期发作峰值在匹鲁卡品注射后 50 ~ 150 min 之间。IHP-1d 癫痫组, IHP-3d 癫痫组和 IHP-7d 癫痫组平均改良 Racine 评分均低于癫痫组($P < 0.05$),而 IHP-3d 癫痫组则明显低于其余各组($P < 0.05$)。IHP-14d 癫痫组发作表现与癫痫组基本相似($P > 0.05$)。

各组大鼠全身性发作平均潜伏期,如表 1 所示。IHP-3d 癫痫组潜伏期最长为 76.88 ± 20.90 min,与其余各组均有明显区别($P < 0.05$)。癫痫组潜伏期最短为 21.64 ± 2.22 min,与 IHP-3d 癫痫组和 IHP-7d 癫痫组(36.73 ± 4.50 min)有明显区别($P < 0.05$),与 IHP-1d 癫痫组(25.64 ± 4.10 min)组及 IHP-14d 癫痫组(24.65 ± 3.89 min)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

各组大鼠全身性发作百分比,如表 2 所示。癫痫组最高为 $41.94 \pm 16.34\%$,与 IHP-1d 癫痫组($31.79 \pm 9.17\%$), IHP-3d 癫痫组($11.13 \pm 4.72\%$), IHP-7d 癫痫组($29.77 \pm 7.76\%$)之间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。IHP-3d 癫痫组明显低于其余各组($P < 0.05$)。IHP-14d 癫痫组($38.56 \pm 13.53\%$)与癫痫组无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 各组癫痫大鼠全身性发作潜伏期(单位:min, n=8)

Tab.1 Latency of generalized seizure in epileptic rats from all groups (Unit: min, n=8 per group)

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	$\bar{x} \pm s$
Seizure#	20.3	18.1	25.2	23.5	21.9	22.2	19.8	22.1	21.64 ± 2.22
IHP-1d seizure#	20.5	19.1	24.6	27.4	25.2	30.0	29.7	28.6	25.64 ± 4.10
IHP-3d seizure*	—	60.4	45.7	80.6	95.1	78.3	—	101.2	76.88 ± 20.90
IHP-7d seizure**	43.2	37.9	40.2	35.5	37.8	29.9	—	32.6	36.73 ± 4.50
IHP-14d seizure#	23.5	20.4	19.9	26.5	22.5	30.8	28.9	24.7	24.65 ± 3.89

注: * $P < 0.05$ 与癫痫组比较, # $P < 0.05$ 与 IHP-3d 癫痫组比较, 单因素方差分析采用 Tamhane's T2 修正值。

Note. * $P < 0.05$ versus the seizure group, # $P < 0.05$ versus the IHP 3d seizure group, ANOVA with post hoc Tamhane's T2 correction.

表 2 各组癫痫大鼠全身性发作评分时间点百分比(单位:% ,n=8)

Tab.2 Percentage of generalized seizure time points in epileptic rats from all groups (Unit: % , n=8 per group)

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
癫痫组 [#]	18/48(37.5)	23/48(47.9)	19/48(39.6)	32/48(66.7)	30/48(62.5)	16/48(33.3)	14/48(29.2)	9/48(18.8)
IHP-1d 癫痫组 ^{*#}	15/48(31.3)	16/48(33.3)	7/48(14.6)	15/48(31.3)	20/40(41.7)	12/48(25.0)	21/48(43.8)	16/48(33.3)
IHP-3d 癫痫组 [*]	—	4/48(8.3)	4/48(8.3)	3/48(6.3)	9/48(18.8)	5/48(10.4)	—	7/48(14.7)
IHP-7d 癫痫组 ^{*#}	16/48(33.3)	14/48(29.2)	8/48(16.7)	19/48(39.6)	11/48(22.9)	15/48(31.3)	—	17/48(35.4)
IHP-14d 癫痫组 ^{*#}	20/48(41.7)	24/48(50.0)	14/48(29.2)	16/48(33.3)	15/48(31.3)	20/48(41.7)	9/48(18.8)	30/48(62.5)

注: * $P < 0.05$ 与癫痫组比较, # $P < 0.05$ 与 IHP-3d 癫痫组比较, 单因素方差分析采信 Tamhane's T2 修正值。

Note. * $P < 0.05$, versus the seizure group; # $P < 0.05$, versus the IHP 3d seizure group. ANOVA with post hoc Tamhane's T2 correction.

2.2 癫痫模型大鼠认知和记忆能力评估结果

如图 2A 所示, 定位航行实验中, 癫痫组逃避潜伏期明显长于对照组、IHP-1d 癫痫组、IHP-3d 癫痫组和 IHP-7d 癫痫组 ($P < 0.05$), 与 IHP-14d 癫痫组无明显差异 ($P > 0.05$)。IHP-3d 癫痫组则与对照组无明显差异 ($P > 0.05$)。如图 2B 所示, 空间探索实验结果表明癫痫组大鼠在目标象限停留时间明显短于其余各组 ($P < 0.05$), 而 IHP-3d 癫痫组与对照组无明显差异 ($P > 0.05$)。

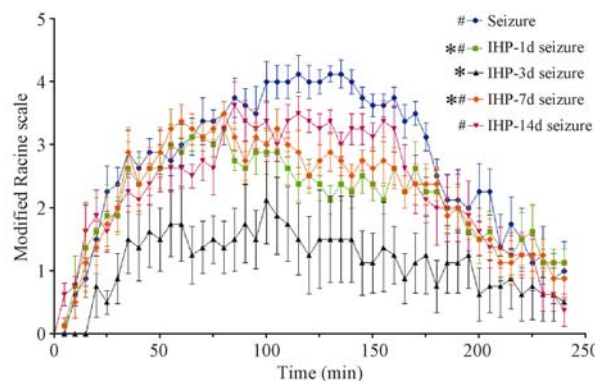
2.3 鼠脑海马 CA1 区神经元凋亡情况

各组大鼠海马 CA1 区神经元凋亡情况, 如图 3 所示。同一倍数视野下, 癫痫组大鼠海马神经元平均凋亡计数高达 69.3 ± 12.8 cells/HP, 与对照组 (15.5 ± 6.8 cells/HP), IHP-1d 癫痫组 (26.3 ± 7.2 cells/HP), IHP-3d 癫痫组 (18.7 ± 9.6 cells/HP) 及 IHP-7d 癫痫组 (30.8 ± 10.6 cells/HP) 均有明显差异 ($P < 0.05$)。IHP-14d 癫痫组 (61.0 ± 8.4 cells/HP) 与癫痫组无明显差异 ($P > 0.05$)。相反, IHP-3d 癫痫组凋亡计数与对照组及 IHP-1d 癫痫组相比较无明显差异 ($P > 0.05$), 明显低于其余各组 ($P < 0.05$)。

2.4 鼠脑海马组织凋亡相关因子及蛋白检测情况

免疫印迹检测如图 4 所示, 对照组大鼠海马组织 BCL-2, Bax 及 cleaved-caspase-3 均有少量正常表达。癫痫组大鼠 Bax 及 cleaved-caspase-3 表达明显升高, BCL-2 明显降低, 与 IHP-14d 癫痫组以外的其余各组均有明显差异 ($P < 0.05$)。IHP-3d 癫痫组的上述指标与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$) 与其余各组之间均有明显差异 ($P < 0.05$)。

综上所述, IHP 预处理后大鼠癫痫易感性降低, 发作后认知和记忆能力损害减轻。在细胞及分子水平神经元凋亡检测显示 IHP 预处理的保护作用在第 3 天达到最佳效果, 14 d 后保护作用基本消失。



注: * $P < 0.05$ 与癫痫组比较, # $P < 0.05$ 与 IHP-3d 癫痫组比较, 单因素方差分析采信 Bonferroni 修正值, $n = 8$ 。

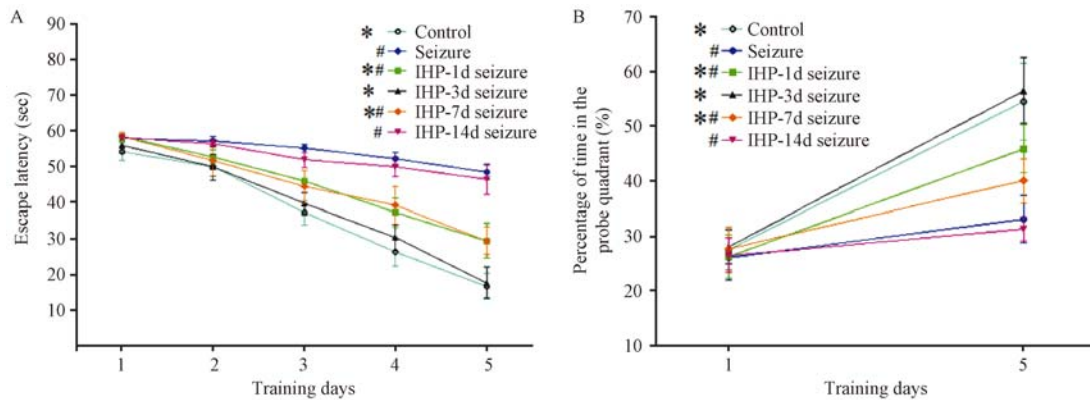
图 1 癫痫大鼠模型改良 Racine 评分情况

Note. * $P < 0.05$ versus the seizure group, # $P < 0.05$ versus IHP 3d seizure group, ANOVA with post hoc Bonferroni correction, $n = 8$ per group.

Fig. 1 The scoring results rated with modified Racine Scale of epileptic rat models in all groups

3 讨论

癫痫严重威胁人类健康, 近年来机体内生性神经保护机制已成为抗癫痫研究的关注热点。研究表明各类物理或化学性的低于细胞损伤阈值的伤害性刺激所诱导的耐受效应具有器官普遍性^[4]和交叉性^[2]。本研究证实轻度缺氧交叉诱导癫痫之间存在“交叉耐受”, IHP 预处理降低实验大鼠癫痫易感性的同时减轻其认知及记忆功能损害。癫痫导致认知功能障碍的始作俑者是发作过程中缺血/缺氧造成的海马神经元损伤。海马与认知功能密切相关^[5], 而海马解剖、病理变化所带来的细胞分子生物学改变则与癫痫发病机制密切相关。因此本研究进一步引入了海马神经细胞凋亡检测以初步探讨痫性脑损伤及 IHP 预处理脑保护机制。细胞凋亡调控的多种蛋白因子中 Bcl-2 和 Bax 尤为重要, 前者阻止凋亡, 后者则促进凋亡^[6]。Bcl-2/Bax 含量比下降激活下游 caspase 蛋白家族的瀑布式反



注: * $P < 0.05$ 与癫痫组比较, # $P < 0.05$ 与 IHP-3d 癫痫组比较, 单因素方差分析采信 Tamhane's T2 修正值, $n = 8$ 。

图 2 各组大鼠认知和记忆能力评估

Note. * $P < 0.05$, versus the seizure group, # $P < 0.05$, versus the IHP 3d seizure group.

ANOVA with post hoc Tamhane's T2 correction, $n = 8$ per group.

Fig. 2 Evaluation of the cognition and memory ability in rats from all groups

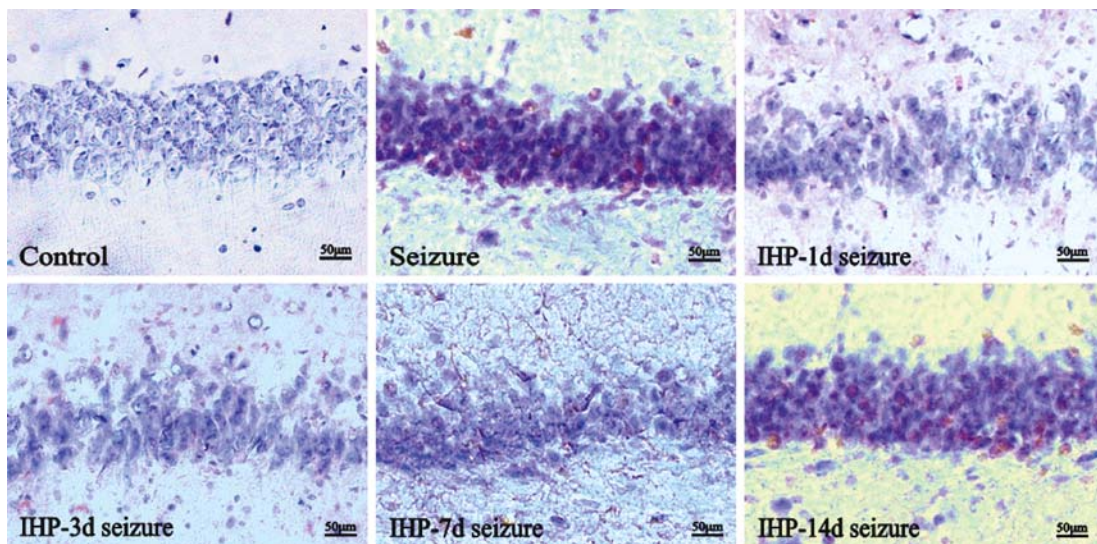
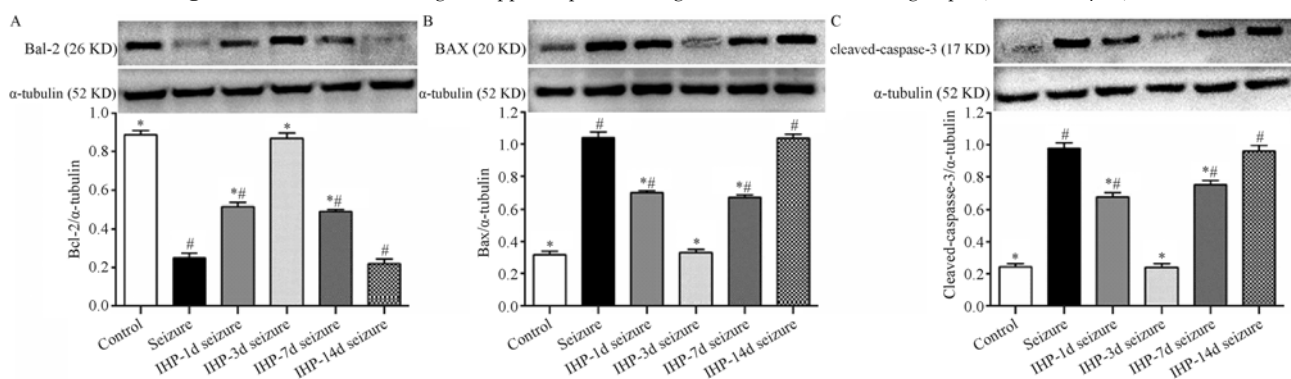


图 3 各组大鼠海马 CA1 区 TUNEL 显色法染色情况 (×200)

Fig. 3 The TUNEL labeling of hippocampal CA1 region in the rats from all groups (Bar = 50 μm)



注: * $P < 0.05$ 与癫痫组比较, # $P < 0.05$ 与 IHP-3d 癫痫组比较, 单因素方差分析采信 Tamhane's T2 修正值, $n = 8$ 。

图 4 各组大鼠海马凋亡相关因子及蛋白检测情况

Note. * $P < 0.05$ versus the seizure group, # $P < 0.05$ versus the IHP 3d seizure group, ANOVA with post hoc Tamhane's T2 correction, $n = 8$ per group.

Fig. 4 Detection of apoptosis-related factors and proteins in the rat hippocampus from all groups

应,最后通过 caspase-3 产生细胞凋亡^[7],后者在凋亡执行阶段,负责关键性蛋白的酶切。海马神经元绝对数量减少以及神经纤维变性,造成神经轴突出芽和突触重塑,形成了反复异常的兴奋点,造成大脑兴奋性和抑制性网络失衡,进而导致癫痫发作^[8]。本研究结果表明,癫痫大鼠海马神经元出现了以凋亡失调为主要特征的病理损害,促凋亡因子升高,凋亡抑制因子下调,最终导致神经元大量丢失。IHP 预处理逆转了上述病理过程,大鼠癫痫易感性随之降低,功能性脑损伤亦明显减轻。

神经元正常生理功能的实现依赖于胶质细胞对其能量代谢的维护^[9]。星形胶质细胞-神经元乳酸穿梭 (astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis, ANLSH) 理论诠释了二者能量代谢上联系的重要性。神经兴奋性和癫痫发作与快速葡萄糖利用及糖酵解相关,脑能量代谢从葡萄糖利用转变为缺氧状态下的乳酸及酮体利用,通过复杂集成系统降低神经兴奋性增强抑制性,表明癫痫起病与脑能量内稳态改变相关^[10],而维护大脑自稳态是星形胶质细胞最重要的生理功能^[11]。高压氧治疗过程中氧化一氮将增加癫痫易感性^[12],进一步反证缺血/缺氧对癫痫的抑制作用。因此,我们认为 IHP 预处理所诱导的癫痫耐受正是通过星形胶质细胞对神经元能量代谢的维护而得以实现的。IHP 预处理后 3d 为最佳保护期,随后保护效果逐渐减退,考虑系预处理激活的内生性保护因子经过机体代谢逐渐消失所致。

ANLSH 依赖于单羧酸转运体 (monocarboxylate transporters, MCTs) 对乳酸调控^[13]。MCT4 是低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 的靶基因之一^[14]。后者通过调控靶基因对缺血/缺氧及时应答以保持体内氧平衡^[15]。缺血/缺氧与癫痫之间交叉耐受系多种低氧及神经兴奋性效应分子共同作用的结果。针对这些保护因素的深入研究将为开发新的诊疗手段提供重要的理论支撑。

参考文献:

- [1] Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischemia: from experimental strategies to clinical use [J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(4): 398–412.
- [2] Plamondon H, Blondeau N, Heurteaux C, et al. Mutually protective actions of kainic acid epileptic preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: involvement of adenosine A1 receptors and K(ATP) channels [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19(12): 1296–1308.
- [3] Medina-Ceja L, Sandoval-Garcia F, Morales-Villagran A, et al. Rapid compensatory changes in the expression of EAAT-3 and GAT-1 transporters during seizures in cells of the CA1 and dentate gyrus [J]. *J Biomed Sci*, 2012, 19: 78.
- [4] Sharp FR, Ran R, Lu A, et al. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury [J]. *NeuroRx*, 2004, 1(1): 26–35.
- [5] Titiz AS, Mahoney JM, Testorf ME, et al. Cognitive impairment in temporal lobe epilepsy: Role of online and offline processing of single cell information [J]. *Hippocampus*, 2014, 24(9): 1129–1145.
- [6] Cory S, Adams JM. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch [J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(1): 5–6.
- [7] Mehmet H. Caspases find a new place to hide [J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 29–30.
- [8] Sloviter RS. Progress on the issue of excitotoxic injury modification vs real neuroprotection: implications for post-traumatic epilepsy [J]. *Neuropharmacology*, 2011, 61(5–6): 1048–1050.
- [9] Araque A, Perea G. Glial modulation of synaptic transmission in culture [J]. *Glia*, 2004, 47(3): 241–248.
- [10] Hartman AL. Does the effectiveness of the ketogenic diet in different epilepsies yield insights into its mechanisms? [J]. *Epilepsia*, 2008, 49(Suppl 8): 53–56.
- [11] Lauritzen F, Perez EL, Melillo ER, et al. Altered expression of brain monocarboxylate transporter 1 in models of temporal lobe epilepsy [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1): 165–176.
- [12] Liu W, Li J, Sun X, et al. Repetitive hyperbaric oxygen exposures enhance sensitivity to convulsion by upregulation of eNOS and nNOS [J]. *Brain Res*, 2008, 1201: 128–134.
- [13] Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(11): 1766–1791.
- [14] Rademakers SE, Lok J, van der Kogel AJ, et al. Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1 α , CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4 [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 167.
- [15] Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress [J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 294–309.

[修回日期]2016-07-01