

KCNQ 通道开放剂 QO-83 对 6 Hz 刺激癫痫模型小鼠的作用研究

王梓宇¹, 王香雨^{1,2}, 李金灿³, 吕添熠¹, 李依莹¹, 王梓潼¹, 马梦妍¹, 贾庆忠^{1,2,3*} (1. 河北医科大学药学院, 石家庄 050017; 2. 河北省新药非临床评价工程实验室, 石家庄 050017; 3. 河北省药理毒理研究重点实验室, 石家庄 050017)

摘要:目的 通过建立并优化 6 Hz 点燃模型, 探究 KCNQ 通道新型开放剂化合物 QO-83 抗癫痫活性, 为 QO-83 在耐药性癫痫中的应用提供科学依据。方法 将小鼠分为对照组、模型组、阳性药左乙拉西坦 (100 mg · kg⁻¹) 组、对照药卡马西平 (50 mg · kg⁻¹) 组和 QO-83 低 (2 mg · kg⁻¹)、中 (4 mg · kg⁻¹)、高 (6 mg · kg⁻¹) 剂量组。建立 6 Hz 点燃癫痫模型小鼠, 腹腔注射相应药物, 30 min 后再次施加 6 Hz 角膜刺激, 进行癫痫行为学评价。随后进行一系列精神行为学实验: 悬尾实验、T 迷宫实验、新物体识别实验, 分别观察小鼠的不动时间、选择正确率、认知指数, 评价动物的抑郁倾向和学习记忆能力。对 6 Hz 点燃癫痫模型小鼠进行免疫荧光染色, 观察 c-Fos 蛋白的表达变化, 评价 QO-83 对特定脑区的保护作用; 观察其靶点 KCNQ2 蛋白的表达变化, 评价其对靶蛋白表达的影响。结果 传统抗癫痫药卡马西平 (50 mg · kg⁻¹) 对建立的模型小鼠无明显作用, 阳性药物左乙拉西坦 (100 mg · kg⁻¹) 有效, 分别给予 2、4、6 mg · kg⁻¹ QO-83 时, 呈现剂量依赖性抗癫痫作用, 可使点燃小鼠的癫痫大发作率及发作时间均显著下降。4 mg · kg⁻¹ 的 QO-83 可明显减少癫痫小鼠在悬尾实验中的不动时间, 增加小鼠 T 迷宫正确率, 增加小鼠新物体识别指数。QO-83 可明显下调癫痫小鼠海马和梨状皮质区的 c-Fos 表达; 上调晚期模型小鼠 CA3、DG 区周围的神经纤维和 PIR 区 KCNQ2 蛋白的表达。结论 化合物 QO-83 具有良好的抗耐药性癫痫活性, 其对癫痫动物的保护情况优于阳性药物左乙拉西坦, 同时还具有改善癫痫动物精神行为的作用, 表现出对耐药性癫痫的治疗潜力, 其作用机制可能与上调靶点蛋白 KCNQ2 表达相关。

关键词: 耐药性癫痫; 6 Hz 点燃模型; 钾通道开放剂; KCNQ2

doi:10.11669/epj.2024.22.007 中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)22-2148-11

Effects of KCNQ Channel Opener QO-83 on 6 Hz Stimulated Epilepsy Model Mice

WANG Ziyu¹, WANG Xiangyu^{1,2}, LI Jincan³, LV Tianyi¹, LI Yixuan¹, WANG Zitong¹, MA Mengyan¹, JIA Qingzhong^{1,2,3*} (1. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Key Laboratory of Innovative Drug Research and Evaluation of Hebei Province, Shijiazhuang 050017, China; 3. Key Laboratory of New Drug Pharmacology and Toxicology of Hebei Province, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the antiepileptic activity of QO-83, a novel KCNQ channel opener, by establishing and optimizing a 6 Hz corneal kinked model, and to provide a scientific basis for the application of QO-83 in drug-resistant epilepsy. **METHODS** The mice were divided into control group, model group, positive drug levetiracetam (100 mg · kg⁻¹) group, control drug carbamazepine (50 mg · kg⁻¹) group, and QO-83 low (2 mg · kg⁻¹), medium (4 mg · kg⁻¹), and high (6 mg · kg⁻¹) dose groups. The 6 Hz kindled mice were established, and drugs was injected intraperitoneally. After 30 min, 6 Hz corneal stimulation was applied again to observe its protective effect on the animal. And set up a series of behavioral experiments: tail suspension test, T-maze test, and new object recognition test, observe the immobility time, selection accuracy, and recognition index of mice respectively, to evaluate its impact on animal depressive tendencies and memory abilities. Immunofluorescence staining was performed on 6 Hz model mice to observe the expression changes of c-Fos protein and evaluate the protective effect of QO-83 on specific brain regions. Observe the expression changes of its target KCNQ2 protein and evaluate its impact on target protein expression. **RESULTS** The established model mice were not sensitive to the action of carbamazepine (50 mg · kg⁻¹), but effective against levetiracetam (100 mg · kg⁻¹). When given 2, 4 and 6 mg · kg⁻¹ QO-83, dose-dependent anti-epileptic effects can be observed, which significantly reduced the incidence and duration of seizures in ignited mice. The 4 mg · kg⁻¹ of QO-83 can significantly reduce the immobility time of epileptic mice in tail suspension experiments, increase the accuracy of mice in T-maze test, and increase the recognition index (RI) of mice in new object recognition test. QO-83 can significantly downregulate the expression of c-fos in the hippocampus and piriform cortex of epileptic mice, and upregulate the expression of KCNQ2 protein in the CA3, DG regions and their surrounding fibers and PIR regions of

基金项目: 河北省重点研发计划项目资助 (21372601D); 河北省自然科学基金项目资助 (H2021206352); 河北医科大学 2023 年大学生创新性实验计划项目资助 (USIP2023200)

作者简介: 王梓宇, 男, 学士 研究方向: 神经药理学 * 通讯作者: 贾庆忠, 男, 博士, 教授 研究方向: 神经药理学、神经精神类疾病药物及靶点发现 Tel: (0311)86266402

late-stage model mice. **CONCLUSION** Compound QO-83 has good anti drug-resistant epilepsy activity, and its protective effect on epileptic animals is better than the positive drug levetiracetam. At the same time, it also has the effect of improving the behavior of epileptic animals, demonstrating the therapeutic potential for drug-resistant epilepsy. The mechanism of action may be related to upregulating the expression of the target protein KCNQ2.

KEY WORDS: drug-resistant epilepsy; 6 Hz kindling model; potassium channel opener; KCNQ2

耐药性癫痫是指患者经过至少 2 种抗癫痫药物 (anti-epileptic drug, AED) 正规治疗, 已经达到最大耐受剂量, 在连续 12 个月及治疗前最长发作间隔 3 倍时间内, 仍不能控制的癫痫。尽管近 20 年来开发了许多新的 AED, 但根据统计显示仍有约 30% ~ 40% 的患者无法克服耐药性癫痫, 多数传统药物对耐药性癫痫没有实质性改善, 寻找能克服耐药的 AED 是药物研究的一个热点。

6 Hz 点燃癫痫模型最早于 1951 年由 Toman 等^[1]建立, 该模型的行为学表现和脑电图模式与精神运动性癫痫的临床表现具有相似性, 于是将其视为精神运动性癫痫发作模型。后来 Brown 等^[2]在建模时发现, 6 Hz 点燃模型动物具有先是极短的阵挛期, 随之僵硬不自觉的行为学表现, 这些特征与部分或边缘性癫痫患者发作的先兆相似, 提示 6 Hz 点燃模型诱导癫痫发作的机制可能与以往的癫痫模型有所不同, 它能更好地模拟人类边缘癫痫发作。Barton 等^[3]的研究还发现, 当电流强度为 32 mA 时, 卡马西平 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可保护 75% 的动物, 当电流强度为 44 mA 时无效, 因为此时的半数有效剂量 (ED_{50}) $> 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 半数毒性剂量 (TD_{50}) = $47.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。也就是说, 随着电流强度的加大, 抗癫痫药物的 ED_{50} 逐渐升高, 模型的耐药性越来越强。在 44 mA 强度的 6 Hz 点燃模型被认为是耐药性癫痫模型。目前, 美国国立卫生研究院 (NIH) 已将 6 Hz 点燃模型作为耐药癫痫模型, 纳入抗癫痫药物筛选的推荐模型^[4]。

电压依赖性钾通道 Kv7 家族 (Kv7.1 ~ Kv7.5) 由 *KCNQ* (*KCNQ1* ~ *KCNQ5*) 基因编码, 在调节神经元兴奋性中发挥重要作用。其中 Kv7.1 主要表达在心肌, 其基因突变引发 Type-1 型的 L-QT 综合征^[5]。*KCNQ2* 和 *KCNQ3* 主要表达在神经系统, 该基因突变会引发良性家族性新生儿癫痫综合征 (benign familial neonatal convulsions, BFNC)。Kv7.4 在耳蜗内的感觉外毛细胞 (OHCs) 中高表达^[6], 主要负责调节听觉神经细胞的内在兴奋性, 该基因 (*DFNA2*) 突变引起感音神经性耳聋。Kv7.5 主要表达在中枢神经核团^[7]。*KCNQ2* 和 *KCNQ3* 钾通道是构成神经 M 通道的分子

基础^[8]。M 电流在神经系统发育初期, 对海马形态和功能起重要调节作用, 抑制 M 电流导致小鼠海马 CA1 锥体神经元表现出兴奋性增加及海马依赖性空间记忆缺陷^[9]。开放 M 通道能引起细胞膜的超极化从而降低神经元的兴奋性。本实验室合成的 KCNQ 通道开放剂 QO-83 是一个结构新颖的小分子化合物, 属于一种 4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4 三苯胺衍生物, 获得中外专利授权【US11247966B2, CN108707087B】, 在治疗与神经元过度兴奋相关的疾病, 例如癫痫和神经性疼痛等方面有很大潜力, 并且对 KCNQ 通道表现很强的开放作用。体外实验结果显示, 其 EC_{50} 为 $(0.15 \pm 0.04) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在最大电刺激 (maximal electroshock seizure, MES) 模型和皮下注射戊四唑癫痫模型中表现出良好效果^[10], 且已有与其作用机制相似的药物上市并显示出较好疗效, 如钾离子通道开放剂瑞替加滨 (RTG) 能够通过增强 M 电流, 阻止脑损伤后神经元过度兴奋导致的癫痫发作^[11]。为了研究该化合物对 6 Hz 点燃癫痫模型是否有效, 本研究利用电刺激行为学观察、组织免疫荧光方法进行评价。

1 材料

1.1 动物

选用 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 [北京斯贝福生物技术有限公司, 合格证号: SCXK (京) 2019-0010], 8 周龄雄性昆明小鼠 [河北医科大学实验动物中心合格证号: SYHK (冀) 2020-002]。所有动物都被饲养在无病原体的环境中, 动物可自由饮水摄食, 控制室温 (22 ± 1) °C, 控制湿度 (50 ± 5) %, 在 12 h 黑暗/光照的条件下饲养 3 d 以上。所有的动物实验严格遵照河北医科大学动物实验中心的动物伦理学条例及国家实验动物饲养和使用指南, 尽量减少试验的次数和试验用的动物数量, 同时保证数据信息的数量与精确度。

1.2 材料及药品

利多卡因 (货号: L397800, Toronto Research Chemicals 公司); 盐酸氟西汀片 (批号: 131102, 上海中西制药有限公司); 卡马西平 (批号: 20220223, 龙

华医药科技有限公司);左乙拉西坦片(批号:356145,珠海制药有限公司);化合物 QO-83(批号:2212271,本实验室自行合成)。磷酸缓冲盐粉末 PBS(货号:BL601A,北京兰杰柯科技有限公司);蔗糖(货号:57-50-1,天津市大茂化学试剂厂);质量分数 4% 多聚甲醛(货号:BL539A,北京兰杰柯科技有限公司);聚乙二醇叔辛基苯基醚(Triton)(货号:T8787,美国 Sigma 公司);驴血清(货号:SL050,北京索莱宝科技有限公司);牛血清白蛋白 BSA(货号:R017085,上海凛恩科技发展有限公司);OCT 包埋液(货号:4583,美国 SAKURA 公司)。c-Fos 一抗为 Rabbit polyclonal to c-Fos-BSA free(Abcam ab190289),kcnq2 一抗为 Rabbit polyclonal antibody to KCNQ2(AffinityBiosciences Cat#DF13451,RRID:AB_2846470)。二抗为 Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG(H+L)(Invitrogen LOT#2376850)。封片剂(Southern biotech,货号:0100-20)

1.3 仪器

小鼠角膜电极(本实验室自行制造);电惊厥仪(GRASS Technologies S48 Stimulator);冰冻切片机(CM1950,德国 Leica 公司);病理切片扫描仪(Panoramic Scan II,匈牙利 3DHISTECH 公司);激光扫描共聚焦显微镜(LSM 900,德国 Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 6 Hz 角膜点燃模型

电惊厥仪刺激参数调整为(44 mA,0.2 ms,3 s,6 Hz)进行电刺激,连续 3 周,每天 2 次,两次间隔大于 4 h,观察并记录小鼠癫痫行为学评分。角膜刺激前先用质量分数 0.5% 利多卡因对小鼠眼部进行局部麻醉,再将直径与角膜相同的铜制电极用生理盐水浸泡后紧贴小鼠角膜,即可给予电刺激。刺激结束后立即将动物放入观察箱内,记录动物癫痫行为学发作情况。对照组小鼠给予相同操作但不给予电刺激。

2.2 癫痫行为学判定

根据 Racine^[12]等级分类法判定动物癫痫行为等级:1 级:面部抽搐;2 级:点头;3 级:单侧前肢阵挛发作;4 级:起身,双侧前肢阵挛发作;5 级:双侧前肢阵挛发作伴倒地。1~3 级为局灶性癫痫发作,4~5 级发作为全身性癫痫大发作。若动物出现连续 3 次或累计 10 次 4~5 级发作则认为造模成功。

2.3 动物分组及给药

相同批次的动物随机平均分配给各组:对照组

{给予质量分数 25% 的环糊精溶液[含体积分数 0.1% 二甲基亚砜(DMSO)]};左乙拉西坦组(LEV,100 mg·kg⁻¹);卡马西平组(CBZ,50 mg·kg⁻¹);氟西汀组(FLX,5.2 mg·kg⁻¹);QO-83 低(2 mg·kg⁻¹)、中(4 mg·kg⁻¹)、高(6 mg·kg⁻¹)剂量组,每组 9 只(行为学实验,n=9)或 3 只(免疫荧光实验,n=3)。造模成功后次日开始给药,给药期间依旧给予相同角膜刺激,所有药物均采用腹腔注射方式给药。所有动物实验均按照河北医科大学实验动物福利伦理文件及操作要求完成。左乙拉西坦、氟西汀由生理盐水溶解;卡马西平、QO-83 由含体积分数 0.1% DMSO 的质量分数 25% 环糊精溶液溶解。

2.4 动物行为学实验

所有动物行为学实验在最后一次给药的次日早 9 点开始,同一个体所需进行的所有行为学实验在同一天内前后完成,顺序依次为:新物体识别实验、T 迷宫自主交替实验、悬尾实验。每种不同的行为学实验之间间隔 2 h 以上。

2.4.1 悬尾实验 将小鼠尾部后三分之一处用胶带固定,悬挂于支架上,头部距离台面 15 cm,进行摄像,摄像背景与小鼠毛色呈明显反差。计时 6 min 后停止,利用小动物行为学分析软件 Smart 3.0 软件对小鼠后 4 min(3~6 min)的不动时间进行统计。

2.4.2 T 迷宫自主交替实验 实验前充分抚摸动物每天 1~2 min,连续 5~7 d。实验时将动物放入 T-形迷宫的主干臂;打开闸门,让动物离开主干臂进入一个目标臂(四肢进入臂内),重复 10 次,记录每次进入的目标臂,前后两次进入的目标臂不同则视为正确,否则视为错误。10 次选择后计算选择正确率。正确率 = 正确次数/10。每次更换动物前用体积分数 75% 乙醇清洗迷宫,消除气味干扰。

2.4.3 新物体识别实验 将 A、B 两个物体放在侧壁的左右两端,动物背朝两物体放入场地中央,放入后立即开启录像 10 min,实验者立即离开测试房间,用 Smart 3.0 记录动物与这两个物体接触的情况,包括鼻子或嘴巴触及物体的次数和距离物体 2~3 cm 范围内探究的时间、次数。待动物休息 1 h 与 24 h 后开始新测试,这时将场地内的 B 物体换作 C 物体,同样录像 5 min。按公式 1 计算认知指数(recognition index, RI)。每次更换动物前用 75% 乙醇清洗迷宫,消除气味干扰。

$$RI(\%) = \frac{\text{新物体接触时间}}{\text{新物体接触时间} + \text{旧物体接触时间}} \times 100\%$$
 公式(1)

2.5 免疫荧光

最后一次刺激 2 h 后,用 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥全身麻醉小鼠,3 min 后经小鼠心脏灌入磷酸缓冲液,使血液排出,至流出液近无色,将磷酸缓冲液换成质量分数 4% 多聚甲醛溶液灌入,至小鼠身体僵硬,停止灌流,断头取脑。脑组织放入质量分数 4% 多聚甲醛溶液中在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h,随后脑组织放入质量分数 30% 蔗糖溶液 48 h 至完全脱水。完全脱水的脑组织用包埋液(质量分数 60% 蔗糖-OCT = 1:1)包埋, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,冰冻组织块用冷冻切片机切成 $25 \text{ }\mu\text{m}$ 薄片。一抗用体系($50 \text{ mL PBS} + 2.5 \text{ g BSA} + 125 \text{ }\mu\text{L Triton}$)稀释,稀释比均为 1:400, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(18 ~ 24 h)。室温孵育二抗 2 h。最后用含有细胞核染剂的封片剂封片,在荧光显微镜下观察拍摄。结果用 ImageJ 进行荧光强度分析。

2.6 统计学分析

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析。所有数据均表示为均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm sx$),当两独立样本均符合正态性分析,则首选采用 t 检验;若不符合正态性分析,或样本量较小($n < 6$)时采用非参数 Mann-Whitney 检验, $P < 0.05$ 被认为有显著性差异。

3 结果

3.1 化合物 QO-83 对 6 Hz 癫痫模型小鼠的影响

6 Hz 角膜点燃模型效果与动物品系关系密切,为选取更合适的动物品系,本研究选取了 C57BL/6J 小鼠及 KM 小鼠进行电刺激。结果显示,经过 21 d 的 6 Hz 角膜刺激,从每日两次刺激后动物癫痫行为学评分结果(图 1 A ~ B)可见,C57BL/6J 小鼠比 KM 小鼠癫痫发作等级评分波动幅度小,呈现的结果更稳定。C57BL/6J 小鼠,在点燃第 13 天时,有 75% 小鼠呈现癫痫大发作,且所有小鼠癫痫发作等级平均值大于 4 级;在第 16 天时,所有小鼠癫痫发作等级趋于稳定;在第 21 d 时,有 91% 的小鼠癫痫大发作(图 1C),而没有癫痫大发作的小鼠将被淘汰。可见 C57BL/6J 小鼠比 KM 小鼠更适合用于建立 6 Hz 角膜点燃模型,此研究采用 C57BL/6J 小鼠作为造模动物。

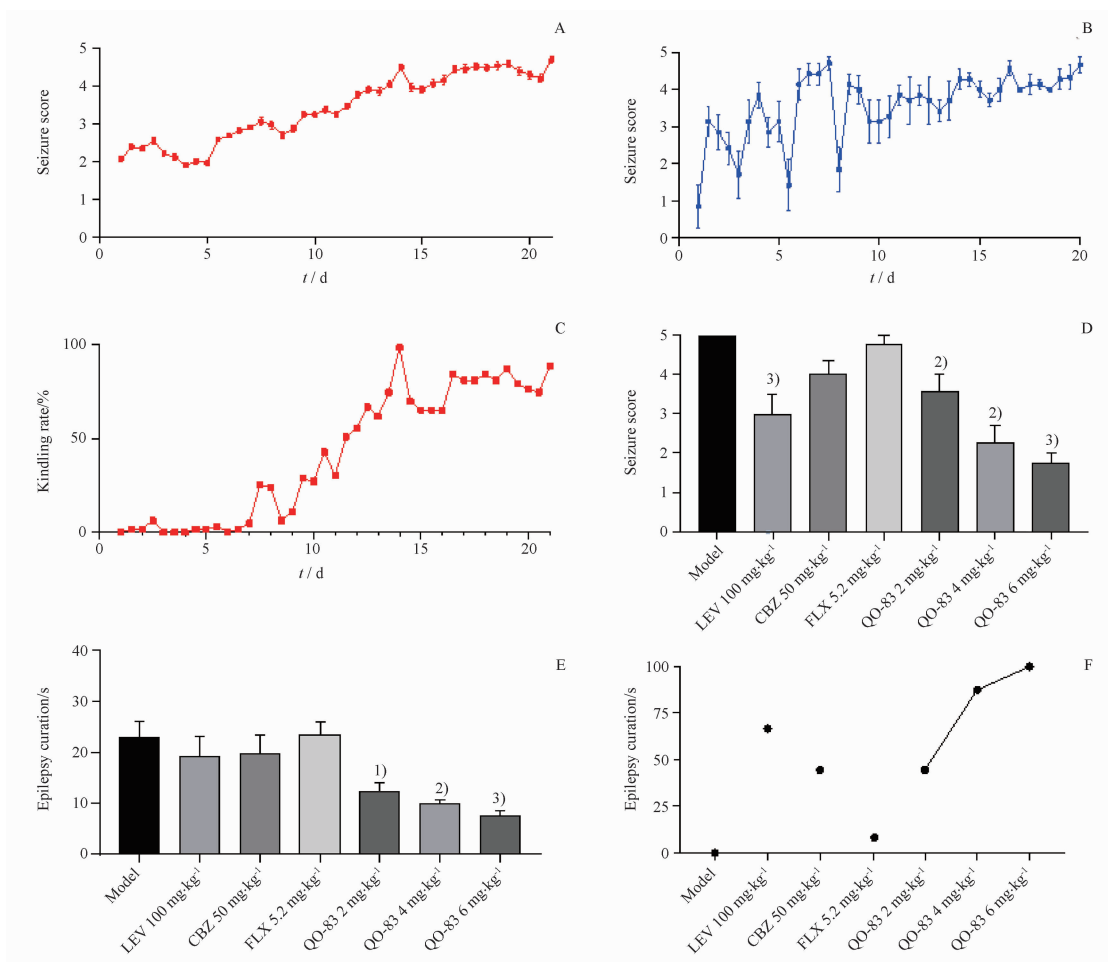
经过 21 d 点燃,癫痫模型评分稳定后将动物分 7 组,分别为模型组、阳性药物 LEV $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,对照药 CBZ $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,FLX $5.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,QO-83 低剂量 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、中剂量 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、高剂量 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各组均腹腔注射给药,连续给药 3 d (模型组给予溶媒),于末次给药后施加同样刺激观察发作级别、持续时间,计算大发作保护率。结果显

示:与模型组比较,LEV 能够显著降低动物癫痫大发作级别,从 (5.00 ± 0.01) 降至 (3.00 ± 0.47) ($P < 0.001$),CBZ 组与 FLX 组未有明显治疗效果 ($P > 0.05$),化合物 QO-83 低、中、高 3 个剂量组评分值分别为 (3.55 ± 0.44) (2.25 ± 0.45) (1.75 ± 0.25) ,均能够显著降低动物癫痫大发作级别($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$),且中、高剂量组的降低程度高于阳性药物 LEV 组 $(2.25 \pm 0.45$ 、 1.75 ± 0.25 vs $3.00 \pm 0.47)$ (图 1D)。记录癫痫 3 级以上发作持续时间,与模型组比较 (22.45 ± 3.45) min,LEV、CBZ、FLX 3 组动物癫痫持续时间没有显著差异,QO-83 低、中、高 3 个剂量组均能显著降低动物癫痫发作持续时间,分别为: (12.24 ± 1.72) (10.24 ± 0.83) (7.58 ± 0.89) min ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$) (图 1E)。比较各组 5 级发作的保护率,LEV、CBZ、FLX 与 QO-83 低中高 3 个剂量组分别为 67%、44%、11.1%、44%、87%、100% (图 1F),QO-83 无论从癫痫发作级别评分,还是癫痫持续时间以及发作保护率,均呈剂量依赖性抗癫痫效果(图 1D ~ F),且中、高剂量保护效果优于阳性药物 LEV。

3.2 化合物 QO-83 对癫痫动物精神行为的影响

根据文献[13]报道,6 Hz 点燃的小鼠极度活跃,无焦虑样行为,但会出现一系列精神行为症状群(neuropsychiatric syndrome, NPS),包括快感缺失、动机缺乏、社交情感障碍,以及学习和记忆能力也受到严重损害。因此,本研究通过小鼠悬尾实验、T 迷宫自主交替实验、新物体识别实验,来评价药物对癫痫模型小鼠精神行为的影响。在癫痫模型稳定后,应用悬尾实验测试动物不动时间,与对照组比较,模型组不动时间明显延长,分别为 (55.44 ± 6.15) (102.90 ± 7.98) min ($P < 0.001$),提示 6 Hz 点燃癫痫模型小鼠有明显的抑郁表现。抗抑郁阳性药物 FLX 组小鼠的不动时间为 (25.36 ± 9.40) min,与模型组相比不动时间显著降低 ($P < 0.001$);LEV、CBZ、QO-83 中剂量 $(4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1})$ 也均能够明显降低动物不动时间,分别为 (68.07 ± 9.66) (64.57 ± 7.51) (55.38 ± 11.43) min ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$) (图 2A),提示化合物 QO-83 中剂量 $(4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1})$ 对动物癫痫大发作导致的抑郁行为有改善作用。

在 T 迷宫自主交替试验中,与正常组比较,模型组正确率明显下降,分别为 (0.66 ± 0.03) (0.42 ± 0.03) ($P < 0.001$),提示 6 Hz 癫痫模型小鼠有明显的空间记忆能力受损的表现。FLX、LEV、CBZ 不同程度提高了动物选择的正确率,分别为



A - C57BL/6J 小鼠经 21 d 6 Hz 角膜刺激后癫痫发作等级; B - KM 小鼠经 21 d 6 Hz 角膜刺激后癫痫发作等级 ($n=9$); C - C57BL/6J 小鼠经 21 d 6 Hz 角膜刺激后点燃率; D - 给与药物干预后, C57BL/6J 小鼠癫痫发作等级 [$n=9$, 除模型组 ($n=8$) 和 LEV $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($n=8$) 有动物在造模期间死亡]; E - C57BL/6J 小鼠经 21 d 6 Hz 角膜刺激后癫痫持续时间 [$n=9$, 除模型组 ($n=8$) 和 LEV $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($n=8$) 有动物在造模期间死亡, 且癫痫发作等级 0 级的动物没有计算在内]; F - 药物对 6 Hz 癫痫动物的保护率; 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

A - seizure score of C57BL/6J mice in 21 days of 6 Hz corneal stimulation; B - seizure score of KM mice in 21 days of 6 Hz corneal stimulation ($n=9$); C - kindling rate of C57BL/6J mice in 21 days of 6 Hz corneal stimulation; D - seizure score of C57BL/6J mice after drug intervention [$n=9$ except model ($n=8$) group and LEV group ($n=8$) for some animals die during the modeling stage]; E - epilepsy duration of C57BL/6J mice after 21 days of 6 Hz corneal stimulation [$n=9$ except model ($n=8$) group and LEV group ($n=8$) for some animals die during the modeling stage and animals without epilepsy (seizure score 0) not counted]; F - percent protection against 6 Hz seizures; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$, vs model group.

图 1 QO-83 可保护动物阻止癫痫发作曼-惠特尼 (Mann-Whitney) 检验。 $\bar{x} \pm sx$

Fig. 1 QO-83 protects animals from epilepsy (Mann-Whitney test). $\bar{x} \pm sx$

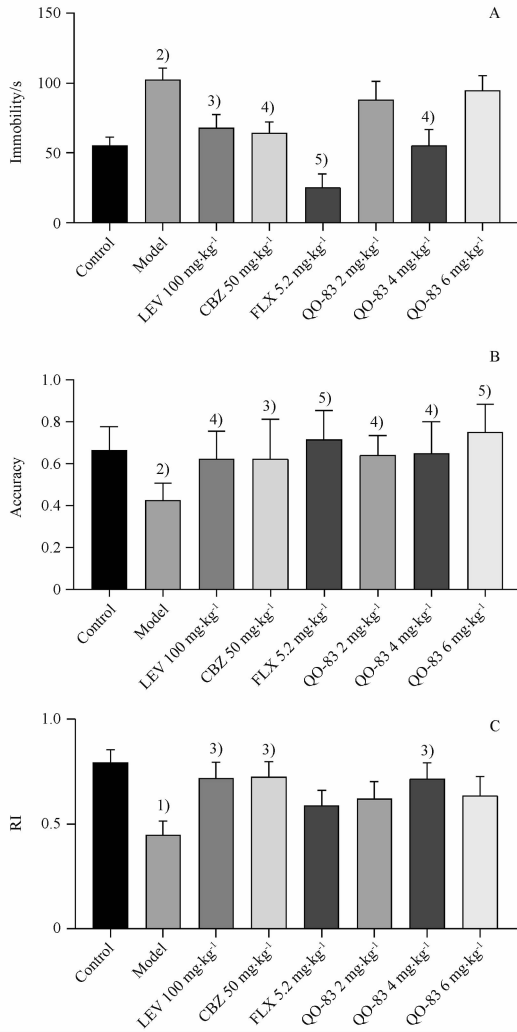
(0.71 ± 0.04) (0.62 ± 0.04) (0.62 ± 0.07) ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), 其中 FLX 改善作用最明显。化合物 QO-83 的 3 个剂量均有改善作用, 并且呈剂量依赖性, 分别为 (0.64 ± 0.03) (0.65 ± 0.05) (0.73 ± 0.04) ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.001$) (图 2B), 提示化合物 QO-83 对 6 Hz 癫痫模型小鼠的空间记忆能力有改善作用。

在新物体识别试验中, 给药 1 h 后与正常组比较, 6 Hz 模型组动物认知指数 (RI) 明显下降, 分别为 (0.79 ± 0.06) (0.44 ± 0.06) ($P < 0.01$), LEV、CBZ 可明显提高动物的 RI 值, 分别为 (0.72 ± 0.07)

(0.72 ± 0.07) ($P < 0.05$, $P < 0.05$), 与模型组比较化合物 QO-83 中剂量组 ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 也明显提高了动物的 RI 值至 (0.71 ± 0.07) ($P < 0.05$) (图 2C); 24 h 后各给药组 RI 值与模型组相比无显著性差异。提示 QO-83 用药后短时有改善动物认知的能力。

以上实验说明, 抗癫痫药 LEV、CBZ 对于癫痫伴随的抑郁、空间记忆力下降、认知能力降低方面均有不同程度改善, 这种作用可能与控制癫痫发作有关。FLX 作为抗抑郁的一线药物, 在改善抑郁行为、提高记忆力方面表现出色, 但对于认知能力的改善

作用不明显。QO-83 作为 KCNQ 通道高选择性化合物,在改善癫痫症状评分方面表现出剂量依赖特征,但是在改善抑郁行为、记忆能力和认知能力方面,只有中剂量($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)作用最明显,所以在后续实验中以该剂量进行观察,这也间接说明 QO-83 改善癫痫动物精神行为的作用不同于抗癫痫作用呈现的明显的剂量依赖性。



A - 悬尾实验中动物的不动时间; B - T 迷宫实验中动物的正确率; C - 新物体识别实验中动物的认知指数 (RI); 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$; 与模型组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ $P < 0.001$ 。

A - the immobility time in tail suspension test; B - the accuracy in spontaneous alternation on a T-maze test; C - the recognition index (RI) of novel object recognition test. ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$, vs control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ $P < 0.001$, vs model group.

图 2 QO-83 对癫痫小鼠行为学的影响 (t 检验)。 $n = 9$ 或 $8, \bar{x} \pm s$
Fig. 2 Effects of QO-83 on the behavior of epilepsy mice (t test). $n = 9$ or $8, \bar{x} \pm s$

3.3 化合物 QO-83 对海马脑区 c-Fos 表达的影响

c-Fos 基因是参与细胞外刺激后细胞增殖和分

化的早期反应基因,被认为是将短期刺激转化为长期反应的主要信号分子,并且与急性刺激后的神经反应性有关,可将其用来考察神经活动^[14]。根据 Barton 等^[3]研究结果,6 Hz 点燃的小鼠脑部梨状皮质 (PIR)、外侧杏仁核 (LA) 及海马 (HIP) CA1、CA3 区 c-Fos 表达明显升高。为探究药物对动物特定脑区的保护情况,使用 c-Fos-Antibody 荧光染色标记 c-Fos 蛋白,观察其在小鼠脑中的表达变化,用 DAPI 核染。

结果显示,在经过 3 d 的 6 Hz 刺激后,与对照组相比,Model 组的 PIR 区及海马各区 (CA1、CA3、DG) 荧光强度显著增强 ($P < 0.001$)。给予药物 LEV 或化合物 QO-83 治疗后,海马各区荧光强度显著降低 ($P < 0.01$),PIR 区域荧光强度显著降低 (图 3)。经过 21 d 6 Hz 长期刺激,Model 组 PIR 区及海马各区 (CA1、CA3、DG) 荧光强度与对照组相比显著增强 ($P < 0.001$),与 Model 组比较,LEV 或化合物 QO-83 组的 PIR 及海马各区荧光强度均显著降低 ($P < 0.001$) (图 4)。c-Fos 蛋白的表达反映了小鼠受电刺激后海马及皮质神经元激活的动态变化过程,上述结果提示 LEV 及化合物 QO-83 无论在模型急性期或模型后期,均能有效缓解神经元异常活化。

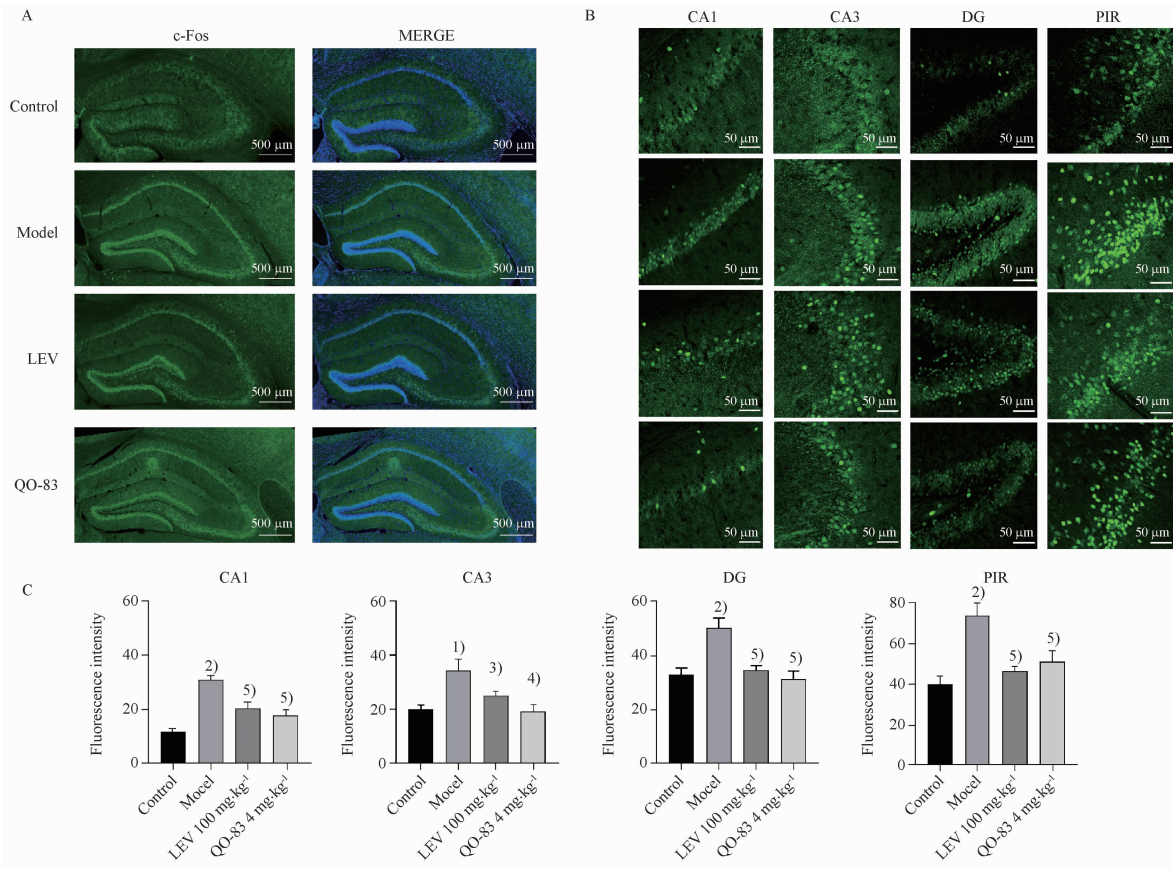
3.4 化合物 QO-83 对小鼠脑内海马区 KCNQ2 表达的影响

KCNQ2 通道在许多脑区都有表达,包括海马体各区、海马下托、新皮质和丘脑网状核^[15],其在海马体和皮层区域表达比较丰富。为探究化合物 QO-83 是否能对其作用靶点基因 Kv7.2 的表达产生影响,使用 KCNQ2-Antibody 荧光染色标记 KCNQ2 蛋白,观察其在小鼠脑中的表达变化。

小鼠经过 3 d 的 6 Hz 刺激后,与对照组比较,Model 组 CA1 区锥体细胞与 PIR 区颗粒细胞层荧光强度显著提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),CA3 区荧光强度有所降低。给予药物 LEV 后与 Model 组相比,CA1、CA3、DG 区的锥体细胞层荧光强度变化不明显,PIR 区域荧光强度显著下降 ($P < 0.01$)。给予药物 QO-83 后与 Model 组相比 CA1 区荧光强度显著升高 ($P < 0.05$),其他脑区变化不明显 (图 5)。海马 CA2 区域的辨识和划分存在争议,因此我们没有在此讨论 CA2 区域的变化。经过 21 d 的 6 Hz 刺激,Model 组海马 CA1、DG 区、PIR 区的锥体细胞层荧光强度显著降低 ($P < 0.0001$, $P < 0.01$, $P < 0.0001$),CA3 区荧光强度变化不明显。给予药

物 LEV 或化合物 QO-83 后,与 Model 组比较,海马 CA1、CA3 区锥体细胞层荧光强度变化不明显, DG、PIR 区锥体细胞及其周围的纤维区域荧光强度有明显提高($P < 0.001$, $P < 0.001$ 或 $P < 0.01$) (图 6)。

以上结果提示, KCNQ2 蛋白在不同的造模时期,或者癫痫模型发展过程中动态变化,推测这种动态变化是为了更好地保护神经元免受外界电刺激造成神经损伤。



A - 海马区(左)和与 DAPI 共标(右)的 c-Fos 表达全景图(5 ×, 标尺 = 500 μm); B - 使用共聚焦显微镜(20 ×)观察海马和 PIR 不同区域的 c-Fos 表达情况(标尺 = 50 μm); C - 6 Hz 角膜刺激增加海马和 PIR 区域 c-Fos 的表达, LEV 和 QO-83 可以逆转这种增加;与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.001$, ²⁾ $P < 0.0001$;与模型组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ $P < 0.0001$ 。

A - panoramic map (5 ×) of c-Fos in the hippocampus (left) and merge with DAPI (right) (scaleplate = 500 μm); B - using confocal microscopy (20 ×) to capture c-Fos in different regions of the hippocampus and PIR (scaleplate = 50 μm), C - 6 Hz corneal stimulation increases expression of c-Fos in hippocampus and PIR regions, LEV and QO-83 can reverse this increase; ¹⁾ $P < 0.001$, ²⁾ $P < 0.0001$, vs control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ $P < 0.0001$, vs model group.

图 3 药物对短期点燃(3 d)模型中 c-Fos 表达的影响(t 检验)。 $n = 3$ 只小鼠 × 3 切片, $\bar{x} \pm sx$

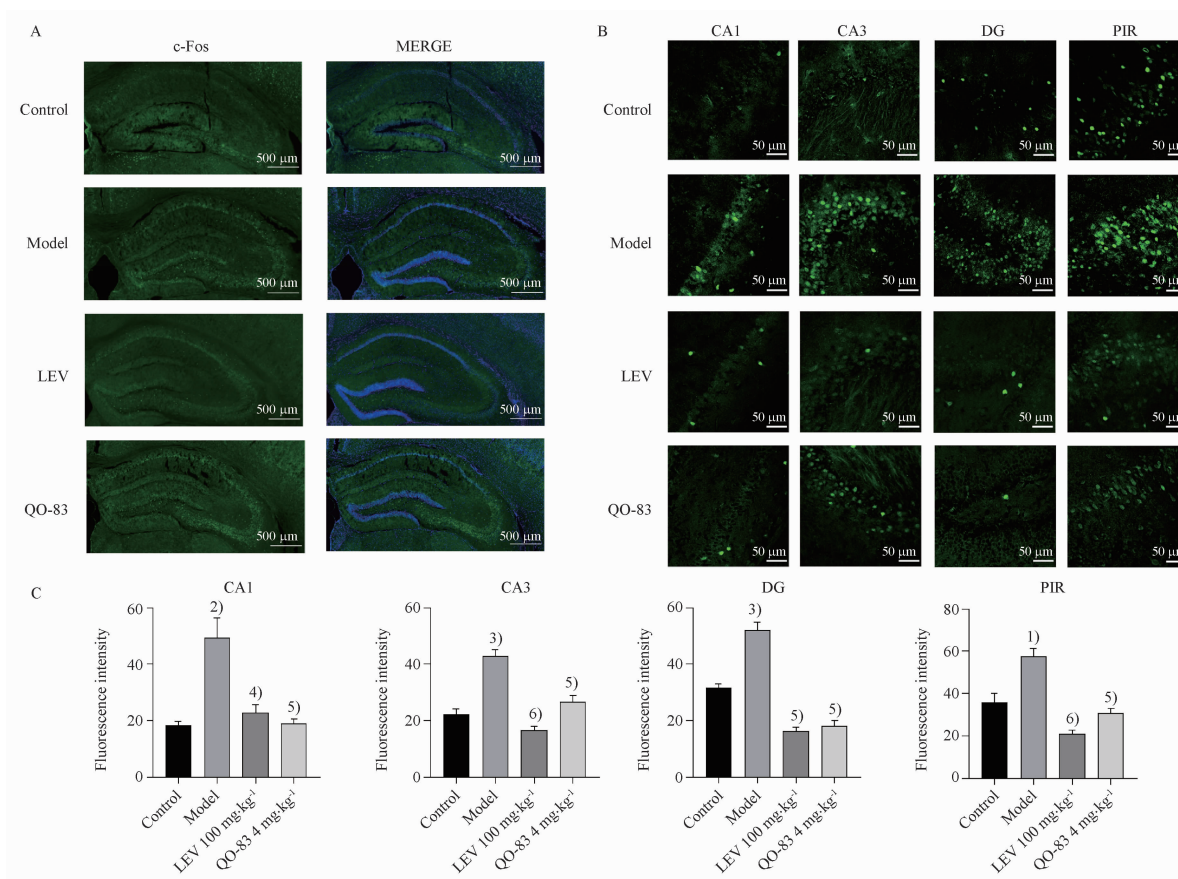
Fig. 3 Effects of drugs on c-Fos expression in short-term kindling model(3 d) (t test). $n = 3$ mice × 3 slice, $\bar{x} \pm sx$

4 讨论

本研究建立和优化了一种耐药性癫痫模型—6 Hz 点燃模型,阐明 KCNQ 通道开放剂 QO-83 具有潜在的抗耐药性癫痫活性。在预实验中设置了一系列给药浓度(1 ~ 40 mg · kg⁻¹),发现在 2 mg · kg⁻¹剂量时 QO-83 即可改善动物癫痫大发作,与上市药物左乙拉西坦(LEV)100 mg · kg⁻¹作用相当。LEV 在临床上常作为耐药性癫痫治疗药物, CBZ 作为常规用药,对耐药性癫痫不敏感。选择 LEV 与 CBZ 两种药物作为对照药,目的在于能更好地评价 6 Hz 癫痫模型小鼠的耐药效果,从实验结果看,无论是癫痫发

作级别的评分,还是防止癫痫发作的保护率, LEV 均表现出明显优于 CBZ 的效果,证明了该模型的可靠性,这为进一步评价新化合物 QO-83 提供了依据。

本研究通过不同种系的小鼠筛选,发现造模动物对模型稳定性影响较大,用 C57 小鼠建立的 6 Hz 角膜点燃模型比以往报道的点燃成功率更高(90.5% vs 80%^[16]),且造模过程中动物死亡率较低,与先前的报道有所不同(7.9% vs 22.5%)^[13]。在 6 Hz 点燃模型问世以前,常用的癫痫动物模型有杏仁核电点燃模型、化学模型和遗传性癫痫模型等。



A - 海马区(左)和与 DAPI 共标(右)的 c-Fos 表达全景图(5 ×, 标尺 = 500 μm); B - 使用共聚焦显微镜(20 ×)观察海马和 PIR 不同区域的 c-Fos 表达情况(标尺 = 50 μm); C - 6 Hz 角膜刺激增加海马和 PIR 区域 c-Fos 的表达, LEV 和 QO-83 可以逆转这种增加; 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$, ³⁾ $P < 0.0001$; 与模型组比较, ⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ $P < 0.001$, ⁶⁾ $P < 0.0001$ 。

A - panoramic map (5 ×) of c-Fos in the hippocampus (left) and merge with DAPI (right) (scaleplate = 500 μm), B - using confocal microscopy (20 ×) to capture c-Fos in different regions of the hippocampus and PIR (scaleplate = 50 μm); C - 6 Hz corneal stimulation increases expression of c-Fos in hippocampus and PIR regions, LEV and QO-83 can reverse this increase; ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$, ³⁾ $P < 0.0001$, *vs* control group; ⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ $P < 0.001$, ⁶⁾ $P < 0.0001$, *vs* model group.

图4 药物对长期点燃(21 d)模型中 c-Fos 表达的影响(*t* 检验)。n = 3 只小鼠 × 3 切片, $\bar{x} \pm s_x$

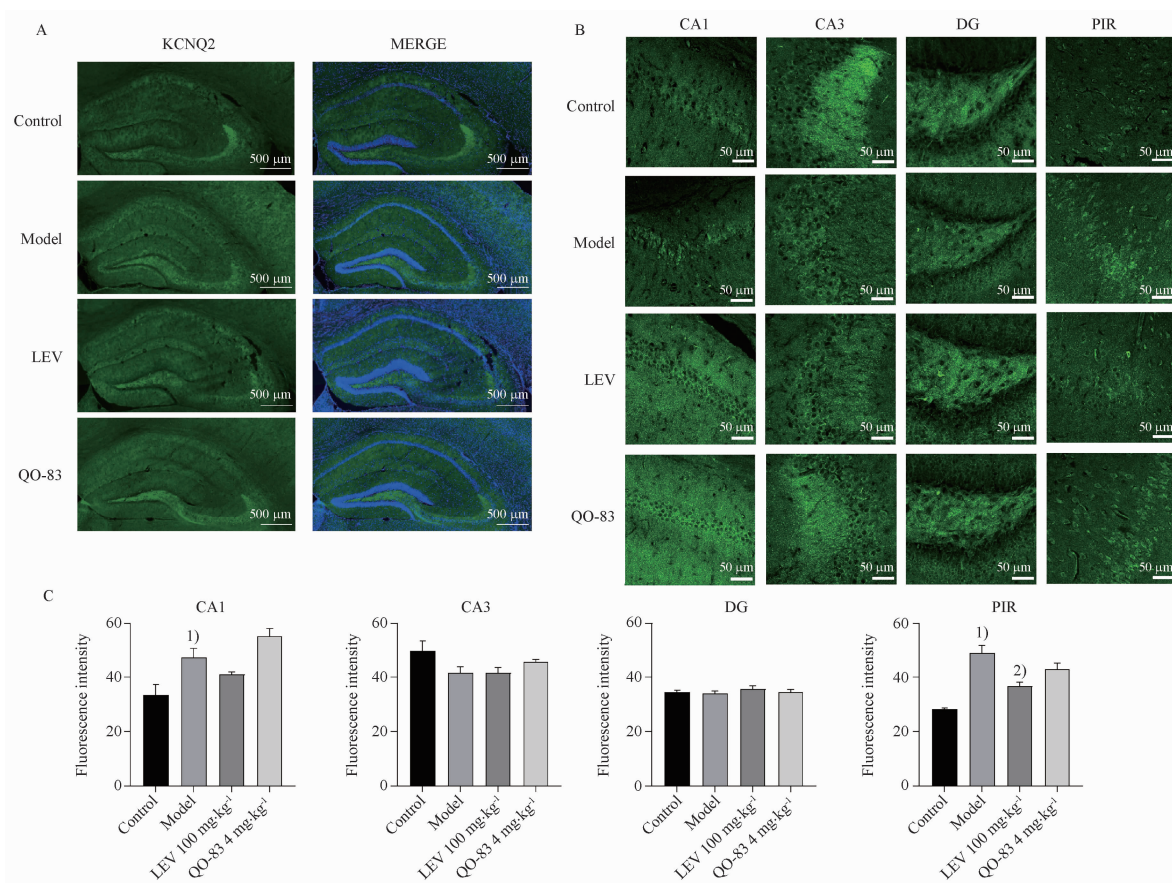
Fig. 4 Effects of drugs on c-Fos expression in long-term kindling model(21 d) (*t* test). n = 3 mice × 3 slice, $\bar{x} \pm s_x$

这些模型普遍存在一些难以解决的问题,譬如耐药性比例较低、建模过程繁琐费力、动物消耗多或者存在药物间相互作用等^[17],以至于它们不能完全阐释药物药理作用,或成为解决耐药性癫痫的得力工具。6 Hz 点燃模型以其独特的发作机制和突出的优势成为了目前最具潜力的动物癫痫模型。而且 44 mA 强度的 6 Hz 模型还对许多 AED 显示出耐药性,已成为了耐药性癫痫研究的必要模型。其对于人类边缘性癫痫发作的拟合无疑也给了临床用药更准确的指导。但还是要与其他模型搭配使用,各取所长相互完善,以便发挥它们的最佳作用。

癫痫患者脑部呈现神经元异常放电的病理现象,现有的抗癫痫药物一般通过减少病理性过度放电或提高脑组织兴奋性阈值来治疗或减轻癫痫的发作。c-Fos 作为神经元激活或兴奋的标志物,广泛用

于癫痫等中枢神经系统疾病发生时神经元异常放电的监测。在对 c-Fos 蛋白进行免疫荧光染色时,可以观察到在模型早期海马区整体 c-Fos 强烈表达,而在模型后期 c-Fos 较模型前期表达下降,可能是动物对长期的刺激产生了适应性或神经元疲劳,不能再持续兴奋;但在 PIR 区域,c-Fos 无论在模型早期或晚期都强烈表达,未见下降趋势。给予药物 LEV 及化合物 QO-83 可见 c-Fos 表达全面下降,说明其均能够保护动物特定脑区,避免刺激引发的异常放电。

根据 KCNQ2 的亚细胞定位不同,其对神经元的兴奋性发挥多方面调节作用,胞体 KCNQ2 主要产生 M 电流(I_{KM}), I_{KM} 抑制使神经元去极化,增加神经元的兴奋性, I_{KM} 激活使细胞膜超极化,降低神经元的兴奋性;树突 KCNQ2 通道会被反向传播的



A - 海马区(左)和与 DAPI 共标(右)的 KCNQ2 表达全景图(5 ×, 标尺 = 500 μm); B - 使用共聚焦显微镜(20 ×)观察海马和 PIR 不同区域的 KCNQ2 表达情况(标尺 = 50 μm); C - 3 d 6 Hz 角膜刺激增加 CA1、PIR 区锥体神经元和 DG 区颗粒细胞中 KCNQ2 的表达, LEV 和 QO-83 没有改变海马中的 KCNQ2 表达, 但降低了 PIR 区 KCNQ2 表达; 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.0001$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

A - panoramic map (5 ×) of KCNQ2 in the hippocampus (left) and merge with DAPI (right) (scaleplate = 500 μm); B - using confocal microscopy (20 ×) to capture KCNQ2 in different regions of the hippocampus and PIR (scaleplate = 50 μm); C - 3 d 6 Hz corneal stimulation increase KCNQ2 expression in pyramidal neurons of CA1, PIR region and granular cells of DG region, LEV and QO-83 did not alter the KCNQ2 content in the hippocampus, but decreased the KCNQ2 expression in the PIR region; ¹⁾ $P < 0.0001$, vs control group; ²⁾ $P < 0.01$, vs model group.

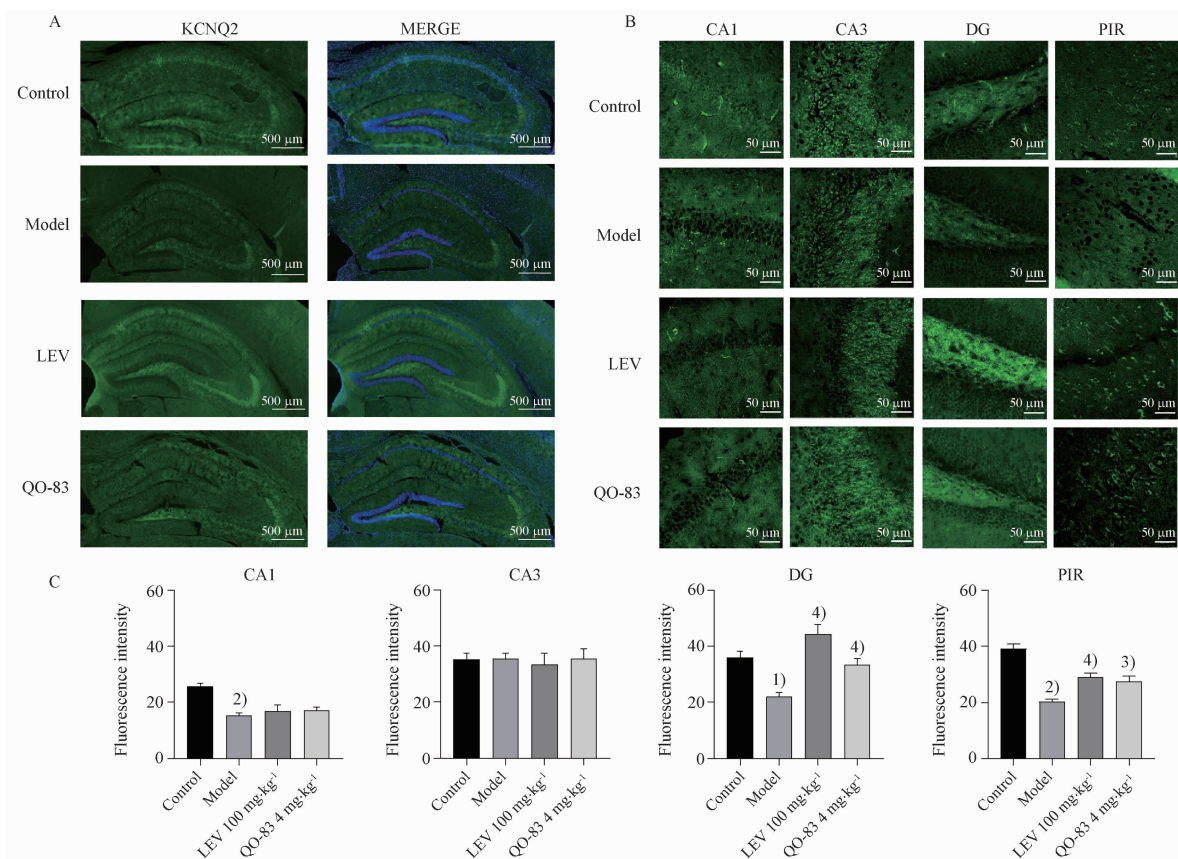
图 5 药物对短期点燃(3 d)模型中 KCNQ2 表达的影响(t 检验)。n = 3 只小鼠 × 3 切片, $\bar{x} \pm s_x$

Fig. 5 Effects of drugs on KCNQ2 expression in short-term kindling model(3 d) (t test). n = 3 mice × 3 slice, $\bar{x} \pm s_x$

动作电位强烈激活,以减弱后去极化和重复放电;轴突 KCNQ2 通道密集分布在轴突起始段(axon initial segment, AIS)和郎氏节处,与 Nav 通道共分布影响动作电位的起源和传导^[15]。通过免疫荧光观察 KCNQ2 在海马区的表达,可以发现在造模早期(3 d 时)海马区锥体细胞和颗粒细胞 KCNQ2 表达增加,这与 Caver 等^[18]发现的急性化学刺激诱导的惊厥时,海马 CA1、CA3 区域 KCNQ2 mRNA 含量升高相一致,提示 KCNQ2 通道在受到急性损伤刺激时,适应性表达增高发挥了保护作用。

QO-83 的干预主要体现在增大通道电流、增强通道开放功能,降低兴奋性刺激损伤,同时在一定程度上还能增加通道表达,有利于改善癫痫症状保护神经。在造模后期海马区锥体细胞和颗粒细胞 KCNQ2 表达下降,可能是由于长期的异常放电导致

神经损伤或失代偿所致。此时使用 QO-83 在增强钾通道电流的同时,钾通道表达也明显增加,这种保护机制有助于损伤的神经元恢复活性。给予 QO-83 后除了增加神经元上 KCNQ2 通道表达,还增强神经纤维上的通道表达,这样更利于 QO-83 通过轴突侧支以补偿受损的回路。尤其是苔状纤维在使用 QO-83 后 KCNQ2 表达提高的程度最明显。因此, QO-83 能通过促进神经元或神经纤维的 KCNQ2 表达降低神经兴奋性。关于 KCNQ2 的表达情况,大量研究表明其在神经纤维网,尤其是苔藓纤维和透明层的染色最为强烈^[15,19-20]。但是,也有报道在海马锥体层(sp)和颗粒层(g)中表达高,除了少数细胞体外(例如 CA3)染色较轻^[8],在整个主要细胞层(CA1、CA3 的锥体细胞层和齿状回的颗粒细胞层)的细胞体上均有中度标记。本研究也发现不同周龄



A - 海马区(左)和与 DAPI 共标(右)的 KCNQ2 表达全景图(5 ×, 标尺 = 500 μm); B - 使用共聚焦显微镜(20 ×)观察海马和 PIR 不同区域的 KCNQ2 表达情况(标尺 = 50 μm); C - 21 d 6 Hz 角膜刺激降低了 CA1 和 PIR 区域的 KCNQ2 表达, LEV 和 QO-83 没有改变海马中的 KCNQ2 表达, 但增加了 PIR 区域 KCNQ2 的表达; 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.001$, ²⁾ $P < 0.0001$; 与模型组比较, ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.001$ 。

A - panoramic map (5 ×) of KCNQ2 in the hippocampus (left) and merge with DAPI (right) (scaleplate = 500 μm), B - using confocal microscopy (20 ×) to capture KCNQ2 in different regions of the hippocampus and PIR (scaleplate = 50 μm); C - 21 d 6 Hz corneal stimulation reduce KCNQ2 expression in CA1 and PIR regions, LEV and QO-83 did not alter the KCNQ2 expression in the hippocampus, but increased the KCNQ2 expression in the PIR region; ¹⁾ $P < 0.001$, ²⁾ $P < 0.0001$, vs control group; ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.001$, vs model group.

图 6 药物对长期点燃(21 d)模型中 KCNQ2 表达的影响(t 检验)。 $n = 3$ 只小鼠 × 3 切片, $\bar{x} \pm s_x$

Fig. 6 Effects of drugs on KCNQ2 expression in long-term kindling model(21 d) (t test). $n = 3$ mice × 3 slice, $\bar{x} \pm s_x$

的小鼠 KCNQ2 表达情况有所差异, 而 M 通道被证明与海马早期的发育有关, KCNQ2 缺陷会导致海马发育不全^[21]。另外, 随着年龄老化, KCNQ2 的表达会下降, 从而导致神经元兴奋性增加, 导致睡眠呈现碎片化^[22]。综上, KCNQ2 在锥体细胞和颗粒细胞中的表达情况似乎会跟随年龄变化有关, 这一点有待进一步考证。

Lopez 等^[23]的研究显示, 慢性社会失败压力(CSDS)模型会导致小鼠腹侧海马区域谷氨酸能神经元中 KCNQ2 蛋白含量降低, 给予药物氯胺酮后, 随着小鼠抑郁倾向的改善, 其 KCNQ2 蛋白含量回升。本研究的 6 Hz 角膜点燃模型小鼠使用药物保护, 改善其抑郁症状后, 腹侧海马未见回升, 说明 6 Hz 角膜点燃小鼠的癫痫伴抑郁与 CSDS 抑郁模型机制可能不同, 也说明本研究中抑郁是由

癫痫引起, 而非与癫痫割离。KCNQ 通道开放剂 QO-83 化合物作为一个结构新颖的小分子化合物, 不仅能够增强 KCNQ 通道电流, 而且还能增加 KCNQ2 通道蛋白的表达, 这一作用可能有利于改善动物的抑郁行为。

本研究发现了化合物 QO-83 的抗耐药性癫痫活性, 并能够改善耐药性癫痫动物的行为学表现, 保护动物特定脑区免受电刺激影响。其作用机制可能与靶点 KCNQ2 在特定脑区的表达量和表达方式(神经元或神经纤维)有关, 此部分有待进一步研究考证。此外, 通过对不同造模时期的动物进行免疫组织染色, 观察到了此耐药性癫痫模型的发展情况。其中 KCNQ2 的表达由短期时增高到长期时降低, 可能是癫痫发作或耐药性癫痫发作的一个重要因素。总之, 本研究为 QO-83 的临床应用和其他钾通

道开放剂药物的开发提供了线索和依据, 希望有助于耐药性癫痫的治疗和预防。

REFERENCES

- [1] TOMAN J E. Neuropharmacologic considerations in psychic seizures [J]. *Neurology*, 1951, 1(6): 444-460.
- [2] BROWN W C, SCHIFFMAN D O, SWINYARD E A, *et al.* Comparative assay of an antiepileptic drugs by psychomotor seizure test and minimal electroshock threshold test [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1953, 107(3): 273-283.
- [3] BARTON M E, KLEIN B D, WOLF H H, *et al.* Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2001, 47(3): 217-227.
- [4] LÖSCHER W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs [J]. *Seizure*, 2011, 20(5): 359-368.
- [5] WANG Q, CURRAN M E, SPLAWSKI I, *et al.* Positional cloning of a novel potassium channel gene; KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias [J]. *Nat Genet*, 1996, 12(1): 17-23.
- [6] KUBISCH C, SCHROEDER B C, FRIEDRICH T, *et al.* KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness [J]. *Cell*, 1999, 96(3): 437-446.
- [7] TZINGOUNIS A V, HEIDENREICH M, KHARKOVETS T, *et al.* The KCNQ5 potassium channel mediates a component of the afterhyperpolarization current in mouse hippocampus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(22): 10232-10237.
- [8] COOPER E C, HARRINGTON E, JAN Y N, *et al.* M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(24): 9529-9540.
- [9] WANG H S, PAN Z, SHI W, *et al.* KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel [J]. *Science*, 1998, 282(5395): 1890-1893.
- [10] LIU X. Evaluation of the activity and mechanism of action of QO-83, a novel KCNQ potassium channel opener [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2019.
- [11] JENTSCH T J. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2000, 1(1): 21-30.
- [12] RACINE R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294.
- [13] GAO Q, ZENG G R, OUYANG D S. Research progress on 6 Hz corneal kindling epilepsy animal model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin* (中国实验动物学报), 2019, 27(3): 393-398.
- [14] VELAZQUEZ F N, CAPUTTO B L, BOUSSIN F D. c-Fos importance for brain development [J]. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(12): 1028-1029.
- [15] NAPPI P, MICELI F, SOLDOVIERI M V, *et al.* Epileptic channelopathies caused by neuronal Kv7 (KCNQ) channel dysfunction [J]. *Pflugers Arch*, 2020, 472(7): 881-898.
- [16] LU H M, XIE M J, LI S, *et al.* Improvement of a 6 Hz corneal kindling resistant epilepsy mouse model and the effects of three traditional Chinese medicine formulas [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2018, 53(7): 1048-1053.
- [17] ZHENG Y M, ZHANG J P, TANG S, *et al.* Establish and use of an epilepsy model in larval zebrafish [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2016, 51(4): 580-587.
- [18] CARVER C M, HASTINGS S D, COOK M E, *et al.* Functional responses of the hippocampus to hyperexcitability depend on directed, neuron-specific KCNQ2 K⁺ channel plasticity [J]. *Hippocampus*, 2020, 30(5): 435-455.
- [19] KLINGER F, GOULD G, BOEHM S, *et al.* Distribution of M-channel subunits KCNQ2 and KCNQ3 in rat hippocampus [J]. *Neuroimage*, 2011, 58(3): 761-769.
- [20] TINEL N, LAURITZEN I, CHOUABE C, *et al.* The KCNQ2 potassium channel; splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3 [J]. *FEBS Lett*, 1998, 438(3): 171-176.
- [21] PETERS H C, HU H, PONGS O, *et al.* Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(1): 51-60.
- [22] LI S B, DAMONTE V M, CHEN C, *et al.* Hyperexcitable arousal circuits drive sleep instability during aging [J]. *Science*, 2022, 375 (6583): eabh3021. DOI: 10. 1126/science. abh3021.
- [23] LOPEZ J P, LÜCKEN M D, BRIVIO E, *et al.* Ketamine exerts its sustained antidepressant effects via cell-type-specific regulation of Kenq2 [J]. *Neuron*, 2022, 110(14): 2283-2298.

(收稿日期:2024-04-15)