论著·癫痫精准治疗与脑保护专题

FK506通过抑制钙调神经磷酸酶活性上调星形胶质细胞EAAT1/2表达控制海马区癫痫发作及神经损伤

陈昌领[1],刘 瑛[2],江 婷[2],熊 英[1],汪朝云[1],张 晴[1],冯占辉[3],叶 兰[1] [1]贵州医科大学基础医学院药理学教研室,机能学实验室,贵州贵阳;[2]贵州医科大学附属医院神经内科,贵州贵阳;[3]贵州省人民医院神经内科,贵州贵阳

[摘要] **目的** 钙调神经磷酸酶(calcineurin,CaN)被认为可能参与海马星形胶质细胞兴奋性氨基酸转运蛋白1(excitatory amino acid transporter 1,EAAT1)和兴奋性氨基酸转运蛋白2(excitatory amino acid transporter 2,EAAT2)表达的调控,本研究旨在探究在红藻氨酸(kainic acid,KA)诱导的癫痫模型中他克莫司(tacrolimus,FK506)是否通过上调海马星形胶质细胞EAAT1和EAAT2的表达从而减少癫痫的发生。**方法** 采用来源于GEO数据库人类和小鼠脑scRNA-seq数据集GSE190453、GSE241349分析EAAT1、EAAT2、CaN、GFAP和NeuN的细胞类型分布,采用KA癫痫小鼠海马星形胶质细胞RNA-seq数据集GSE237321分析EAAT1、EAAT2、CaN和GFAP表达特征。实验动物为108只SPF级6~8周龄C57BL/6J小鼠(体质量19~23 g,雌雄各半)。为评估低剂量的FK506对癫痫小鼠的皮层放电和EAAT1、EAAT2的调节作用,本研究首先进行低剂量的FK506干预实验,采用随机数字表法将12只小鼠分为Control组、KA组和FK506组(n=4),FK506组造模前24 h及1 h单次腹腔注射1 mg/kg的FK506,KA组向小鼠两侧海马分别注射0.5 μL KA(0.5 μg/μL)造模,KA造模48 h后评估给药对皮层放电及EAAT1、EAAT2的mRNA表达的影响。为确定EAAT1、EAAT2、CaN和GFAP的蛋白的时间表达特征以及合适的取材时间,本研究利用随机数字表法将36只小鼠分为Control组、6 h、1 d、3 d、5 d和7 d组(n=6),经KA造模后收集对应时间点的海马组织,用于Western blotting实验检测各蛋白指标的变化。为评估不同剂量的FK506的疗效,将60只小鼠分为Control组、KA组、FK506 1 mg/kg组、FK506 2 mg/kg组、FK506 4 mg/kg组(n=10),各FK506治疗组于KA造模前24 h及1 h腹腔注射对应剂量的FK506,KA造模后连续3 d腹腔注射对应剂量的FK506。KA造模后第5天进行旷场实验以评估小鼠运动状态,实验结束后每组收集6只小鼠的海马组织,用于Western blotting实验检测各组EAAT1、EAAT2、CaN和GFAP的蛋白表达,各组其余小鼠采用HE染色观察海马神经元病理改变,采用免疫荧光染色法检测EAAT1、EAAT2与GFAP的共定位情况。**结果** scRNA-seq数据分析结果显示,EAAT1、EAAT2特异性定位于星形胶质细胞,CaN同样在星形胶质细胞中存在表达。小鼠海马星形胶质细胞RNA-seq数据分析结果表明,相较于PBS和AAV组,KA组EAAT1、EAAT2 mRNA水平在KA诱导4 d后显著下调(P<0.01),GFAP和CaN显著上调(P<0.05)。小鼠海马组织切片免疫荧光结果表明,EAAT1和EAAT2与星形胶质细胞标志物GFAP共定位,与Control组相比,KA组GFAP荧光强度显著增加(P<0.05)。Western blotting结果显示,与Control组比较,5 d组EAAT1和EAAT2显著下调(P<0.01);GFAP水平在KA处理后6 h开始升高,3 d时显著增加(P<0.05);CaN全长蛋白水平自3 d起下降(P<0.01),而45 kDa CaN活性片段在3 d和5 d时显著增加。表明CaN在癫痫发生早期就已经被激活,可能参与EAAT1和EAAT2蛋

[基金项目] 国家自然科学基金项目地区科学基金项目(82360266);贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2023]一般395,324,黔科合基础-MS[2025]548)

[通信作者] 叶 兰,E-mail:frogyl266@163.com

2097-0927/Copyright © 2026,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:陈昌领,刘瑛,江婷,等. FK506通过抑制钙调神经磷酸酶活性上调星形胶质细胞EAAT1/2表达控制海马区癫痫发作及神经损伤[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(10):1313-1325. DOI:10.16016/j.2097-0927.202512048.

Citation:CHEN C L,LIU Y,JIANG T,*et al*. FK506 suppresses hippocampal seizures and neuroinjury by upregulating astrocytic EAAT1/2 expression *via* inhibition of calcineurin activity[J]. J Army Med Univ,2026,48(10):1313-1325. DOI:10.16016/j.2097-0927.202512048.

白表达的调控。造模前给予1 mg/kg FK506可改善KA小鼠大脑皮层异常放电,并部分缓解KA诱导的EAAT1和EAAT2 mRNA下调(P<0.05)。造模后连续给予不同剂量FK506干预可减轻海马CA1、CA3区神经元损伤及小鼠运动障碍。Western blotting显示,不同剂量FK506可抑制KA诱导的EAAT1和EAAT2表达下调(P<0.01),抑制CaN全长蛋白下调及45 kDa CaN活性片段产生(P<0.01),同时部分抑制GFAP上调(P<0.01),并显著抑制NeuN下调(P<0.05),表明不同剂量的FK506具有神经保护作用。**结论** 在KA诱导的癫痫小鼠模型中,FK506通过抑制CaN活性片段的产生,上调EAAT1和EAAT2的表达,从而减轻癫痫诱导的神经损伤。

[**关键词**] 他克莫司;钙调磷酸酶;星形胶质细胞;谷氨酸转运体;癫痫

[**中图法分类号**] R742.1;R966;R979.5 [**文献标志码**] A

FK506 suppresses hippocampal seizures and neuroinjury by upregulating astrocytic EAAT1/2 expression *via* inhibition of calcineurin activity

CHEN Changling[1], LIU Ying[2], JIANG Ting[2], XIONG Ying[1], WANG Zhaoyun[1], ZHANG Qing[1], FENG Zhanhui[3], YE Lan[1]

[1]Department of Pharmacology, Functional Physiology Laboratory, Functional Laboratory, Basic Medical College of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou; [2]Department of Neurology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou; [3]Department of Neurology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou, China

[**Abstract**] **Objective** Calcineurin (CaN) is implicated in regulating hippocampal astrocytic excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) and 2 (EAAT2) expression. This study investigates whether tacrolimus (FK506) reduces epileptogenesis by upregulating EAAT1 and EAAT2 in hippocampal astrocytes in a kainic acid (KA)-induced epilepsy model. **Methods** The cellular distribution of EAAT1, EAAT2, CaN, GFAP, and NeuN was analyzed using human and mouse brain single cell RNA sequencing (scRNA seq) datasets (GSE190453, GSE241349) from the GEO database. Hippocampal astrocyte RNA seq data from KA-induced epileptic mice (GSE237321) were used to examine the expression patterns of EAAT1, EAAT2, CaN, and GFAP. A total of 108 specific pathogen free (SPF) C57BL/6J mice aged 6 to 8 weeks (body weight 19 to 23 g, equal numbers of males and females) were used. To evaluate the effect of low dose FK506 on cortical discharges and the regulation of EAAT1 and EAAT2, 12 mice were randomly divided into Control, KA, and FK506 groups(n=4). The FK506 group received a single intraperitoneal injection of 1 mg/kg FK506 24 h and 1 h before modeling; the KA group was modeled by bilateral hippocampal injection of 0.5 μL KA (0.5 μg/μL). Cortical discharges and hippocampal EAAT1 and EAAT2 mRNA levels were assessed 48 h after KA injection. To determine the temporal expression profiles of EAAT1, EAAT2, CaN, and GFAP proteins and identify appropriate sampling time points, 36 mice were randomly allocated to Control, 6 h, 1 d, 3 d, 5 d, and 7 d groups(n=6). Hippocampal tissues were collected at the corresponding time points after KA administration for Western blotting. To evaluate the efficacy of different FK506 doses, 60 mice were divided into Control, KA, FK506 1 mg/kg, FK506 2 mg/kg, and FK506 4 mg/kg groups (n=10). FK506 treatment groups received corresponding doses (intraperitoneal injection) 24 h and 1 h before KA modeling, followed by once daily injections for 3 consecutive days after modeling. On day 5 after modeling, open field testing was performed to assess locomotor activity. Hippocampal tissues from 6 mice per group were used for Western blotting of EAAT1, EAAT2, CaN, and GFAP; the remaining mice were used for HE staining to observe neuronal pathology and immunofluorescence staining to examine the colocalization of EAAT1 and EAAT2 with GFAP. **Results** scRNA-seq analysis revealed that EAAT1 and EAAT2 were specifically localized in astrocytes, and CaN was also expressed in astrocytes. Hippocampal astrocyte RNA seq data showed that

compared with PBS and AAV groups, EAAT1 and EAAT2 mRNA levels were significantly downregulated 4 d after KA induction, while GFAP and CaN were significantly upregulated. Immunofluorescence of mouse hippocampal sections indicated that EAAT1 and EAAT2 co-localized with the astrocyte marker GFAP, and GFAP fluorescence intensity was significantly increased in the KA group versus the Control group. Western blotting demonstrated that EAAT1 and EAAT2 were significantly downregulated in the 5 d group compared with the Control group; GFAP levels began to rise 6 h after KA treatment and were significantly increased at 3 d; full length CaN protein levels decreased from 3 d onward, whereas the 45 kDa CaN active fragment was significantly increased at 3 d and 5 d, suggesting that CaN is activated early in epileptogenesis and may participate in regulating EAAT1 and EAAT2 protein expression. Pretreatment with 1 mg/kg FK506 ameliorated abnormal cortical discharges in KA mice and partially alleviated KA induced downregulation of EAAT1 and EAAT2 mRNA. Continuous post modeling intervention with different doses of FK506 reduced neuronal damage in hippocampal CA1 and CA3 regions and improved motor deficits. Western blotting showed that different doses of FK506 inhibited KA-induced downregulation of EAAT1 and EAAT2 expression, suppressed the decrease in full length CaN and the generation of the 45 kDa CaN active fragment, partially inhibited GFAP upregulation, and significantly mitigated NeuN downregulation, indicating that FK506 exerts neuroprotective effects in a dose dependent manner. **Conclusion** In the KA induced epileptic mouse model, FK506 upregulates the expression of EAAT1 and EAAT2 in hippocampal astrocytes by inhibiting the production of the CaN active fragment, thereby attenuating epilepsy-induced neuronal damage.

[**Key words**] tacrolimus; calcineurin; astrocytes; glutamate transporters; epilepsy

Supported by the Regional Science Program of the National Natural Science Foundation of China (82360266) and the Project of Guizhou Provincial Department Science and Technology Plan Project (2023-395, 2023-324, 2025-548). Corresponding author: YE Lan, E-mail: frogyl266@163.com

癫痫是一种慢性复发性神经系统疾病,影响全球约7 000万人,当前国内总体患病率约0.7%,患者约1 000万,其中活动性癫痫患者约600万,且每年新增病例约40万,癫痫已成为最常见且致残率较高的神经系统疾病之一[1-2]。在其复杂的病理机制中,谷氨酸兴奋性毒性是关键的致病环节。兴奋性氨基酸转运蛋白1(excitatory amino acid transporter 1,EAAT1)和兴奋性氨基酸转运蛋白2(excitatory amino acid transporter 2,EAAT2)作为主要的谷氨酸转运蛋白,负责将突触间隙80%~90%的谷氨酸转运至星形胶质细胞中,维持突触间隙谷氨酸稳态,防止兴奋性毒性损伤[3-9]。

有研究表明,EAAT1和EAAT2可能参与癫痫的发生,但人类颞叶癫痫患者和动物癫痫模型中表达水平存在不一致,这可能归结于机体对不同癫痫状态的反应[10-12]。MODARRES MOUSAVI等[12]研究表明,EAAT1在颞叶癫痫患者的海马体和杏仁核中显著上调,且EAAT1和EAAT2的表达与癫痫发作的年龄相关,与癫痫发作年龄<8岁的患者相比,癫痫发作年龄>8岁的患者杏仁核中EAAT1和EAAT2的mRNA的相对表达水平显著升高。已有研究证实,匹罗卡品诱导大鼠癫痫模型中,造模3 d后EAAT2表达显著上调,这种表达差异可能与癫痫模型的构建方式有关,EAAT1和EAAT2表达下调或功能抑制,会造成突触间隙谷氨酸大量蓄积,诱发神经元过度兴奋性放电,进而参与癫痫的病理进程[13-15];反之,上调EAAT2表达或通过药物手段促进EAAT2功能活化,可有效抑制癫痫发作[16-17]。因此,靶向调控EAAT1、EAAT2的表达与功能,已成为癫痫潜在的治疗新策略[18-19]。

钙调神经磷酸酶(calcineurin,CaN)可能参与了EAAT1和EAAT2的表达调控。CaN是一种钙离子/钙调素依赖的丝氨酸-苏氨酸磷酸酶、是催化亚基A(calcineurin subunit a,CnA)和调节亚基B(calcineurin subunit b,CnB)组成的异源二聚体,广泛分布于海马神经元和胶质细胞中,参与突触可塑性的维持[20-21]。CaN下游转录因子NFAT被认为参与EAAT2的调控,但在癫痫动物模型中尚未证实[22-23]。在癫痫模型中CaN的活性存在动态变化,被认为可能参与了癫痫的发生[24-25]。CaN抑制剂他克莫司(tacrolimus,FK506)在癫痫实验模型研究中显示出多靶点治疗潜力,主要通过CaN发挥抗炎、抗氧化及抑制星形胶质细胞活化等机制,在多数动物模型中能延长癫痫潜伏期、减轻发作强度、保护海马神经元并改善认知功能[25-29]。

尽管FK506具备上述保护效应,但其能否通过调控EAAT1和EAAT2表达、减轻谷氨酸兴奋性毒性以

发挥抗癫痫作用,仍有待进一步阐明。因此,本研究推测FK506通过抑制CaN从而上调EAAT1和EAAT2减少癫痫的发生,验证这一假说将有助于阐明FK506在癫痫治疗中的非免疫抑制新机制,为其"老药新用"提供理论依据,也将为开发基于EAAT1和EAAT2调控的癫痫治疗策略提供新的药物靶点。

1 材料与方法

1.1 基于GEO数据库scRNA-seq数据分析相关指标的细胞图谱分布分析

在GEO数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)以"Epilepsy"和"Single cell RNA-seq"作为检索词检索癫痫脑组织单细胞测序数据,最终纳入颞叶癫痫患者脑组织单细胞测序数据集GSE190453和耐药性癫痫小鼠海马数据集GSE241349,用于EAAT1、EAAT2、CaN、GFAP和NeuN细胞图谱分布分析。单细胞RNA测序数据分析采用Seurat v4.0.0软件进行。本研究对单细胞原始数据进行了数据整合与标准化:对原始计数矩阵进行质量控制,保留每个细胞中检测到的基因数在300~7 000、线粒体基因比例<10%的细胞;随后,利用Harmony算法校正样本间的批次效应;基于校正后的数据,将参数设置为15个主成分、分辨率为0.5进行细胞聚类,并通过cellmaker数据库中的经典细胞类型标志基因对获得的细胞亚群进行注释,细胞聚类注释结果通过CellDimPlot可视化。采用FeatureDimPlot软件分析EAAT1、EAAT2、CaN、NeuN和GFAP的表达。

1.2 基于GEO数据库RNA-seq数据分析相关指标的表达

在GEO数据库中以"Epilepsy"作为检索词检索癫痫小鼠海马组织RNA-seq数据,纳入红藻氨酸(kainic acid, KA)癫痫小鼠海马数据集GSE237321进行分析。该数据集包括海马和海马星形胶质细胞RNA-seq数据,为聚焦研究目的,选择后者进行分析。该数据集在KA诱导4 d取样后进行的测序,包括3例KA星形胶质细胞样本数据、3例PBS和3例腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)载体处理的星形胶质样本数据,每例样本由3~4个海马体星形胶质细胞均质而成。在Rstudio中利用Deseq2包进行差异表达分析。差异结果的可视化火山图通过ggplot2、ggrepel及ggpubr等R包完成。

1.3 实验动物

108只SPF级6~8周龄C57BL/6J小鼠(雌雄各半,体质量19~23 g)购自江苏华创信诺医药科技有限公司,动物使用许可证号:SYXK(苏)2020-0009。实验动物饲养于贵州医科大学实验动物中心SPF屏障环境中,室温控制在(22±2)℃,相对湿度为50%~60%,12 h/12 h明暗循环,每笼≤6只,自由摄食饮水。所有动物实验方案获得贵州医科大学实验室动物伦理委员会批准(2403759)。为减少动物疼痛,所有手术操作在0.3 mL三溴乙醇诱导麻醉下进行。实验期间监测动物体质量、毛发状态、行为活动及手术切口愈合情况,监测频率为每日2次。预设的人道终点为:①体质量下降超过基线值的20%;②出现持续癫痫状态(单次发作>5 min或30 min内发作≥3次);③严重自残或无法自行进食饮水;④濒死状态(表现为体温过低、呼吸极度困难、对外界刺激无反应)。一旦动物达到上述任一终点,立即将小鼠经腹腔注射0.3 mL的三溴乙醇进行深度麻醉,待其夹趾反射消失后,采用颈椎脱臼法实施安乐死。实验过程中未发生预期外的严重不良事件。

1.4 药物与试剂

三溴乙醇购自上海多沃生物公司;FK506购自上海源叶生物公司;EDTA抗原修复液购自上海碧云天生物公司;HE染色液购自南京建成生物工程研究所;EAAT1、EAAT2和β-actin cDNA引物购自上海生工生物工程公司;Cinozol总RNA提取试剂盒和ECL发光液购自长沙信励致和公司;反转录试剂购自山东思科捷生物公司;荧光定量PCR试剂盒购自江苏愚公生物公司;兔抗EAAT1购自南京巴傲得生物;兔抗CaN和兔抗EAAT2购自武汉博士德生物公司;兔抗NeuN购自杭州斯达特生物公司;鼠抗GFAP、兔抗β-actin和兔抗GAPDH购自武汉塞维尔生物公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、免疫荧光染色抗兔和抗鼠二抗购自武汉爱博泰克生物公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购自江苏亲科生物;KA购自美国GLPBIO公司。

1.5 癫痫模型的制备方法

C57BL/6J小鼠在SPF级的动物房适应性饲养1周后,经腹腔注射0.3 mL三溴乙醇诱导麻醉。麻醉成功后,固定小鼠头部,待呼吸平稳后进行后续操作。使用脱毛膏去除小鼠头部毛发,沿头皮由前额叶处向枕部方向切开头皮,暴露颅骨表面。用棉签蘸取适量的医用过氧化氢溶液于颅骨表面,以清晰地分辨冠状缝与矢状缝,以冠状缝与矢状缝交点为坐标原点,调节立体定位仪使注射器针尖对准原点,并将当前的X轴与Y轴坐标归零。参照文献报道[30]的两侧海马CA3区定位坐标(X=3.05 mm;Y=2.7 mm)调整注射器位置。将注射器垂直向下插入颅骨,直至针尖斜面完全进入骨面,此时将Z轴坐标归零,依据海马CA3区深度坐标(Z=-2.9 mm)继续进针。注射过程中若小鼠出现挣扎或呼吸异常,立即终止实验。每侧海马注射0.5 μL

KA(浓度为0.5 μg/μL),注射速度为0.25 μL/min。注射完毕后留针4 min,随后在1 min内缓慢退针。确认无活动性出血后,用碘伏消毒伤口,缝合头皮并再次消毒。术后1 h内观察并记录小鼠癫痫发作情况,依据Racine评分标准[Ⅰ级:口面部运动(如咀嚼、眨眼);Ⅱ级:节律性点头;Ⅲ级:前肢阵挛;Ⅳ级:伴随前肢阵挛的站立;Ⅴ级:站立并跌倒],将发作等级达到Ⅳ级及以上的小鼠纳入后续实验。为确定EAAT1、EAAT2、CaN和GFAP的蛋白的时间表达特征以及合适的取材时间,本研究利用随机数字表法将36只C57BL/6J小鼠分为Control组、6 h、1 d、3 d、5 d和7 d组(n=6),在KA造模后收集对应时间点的海马组织用于后续Western blotting实验检测各蛋白指标的变化。

1.6 实验分组与给药

将FK506溶解于DMSO中,随后用生理盐水将DMSO稀释至1%,分装后保存于-80 ℃冰箱中。为研究不同剂量的FK506对癫痫小鼠海马EAAT1和EAAT2的调控作用,本研究按照随机数字表法将12只体质量在19~23 g的小鼠分为Control组、KA组、FK506组,FK506组仅在KA造模前24 h和1 h经小鼠腹腔单次注射FK506(1 mg/kg),Control组经腹腔注射相同体积1% DMSO的生理盐水,造模后48 h采集各组小鼠海马组织,用于后续RT-qPCR检测。为研究FK506的给药剂量和给药次数对癫痫小鼠的治疗作用以及对EAAT1和EAAT2的调控作用,本研究采用1、2、4 mg/kg的FK506对KA小鼠进行干预。按照随机数字表法将60只小鼠分为Control组、KA组、1 mg/kg FK506组、2 mg/kg FK506组和4 mg/kg FK506组(n=10)。FK506各给药组按照对应的剂量在KA造模前24 h和1 h行单次腹腔注射,KA造模成功后各FK506给药组再用对应剂量干预3 d,Control组经腹腔注射相同体积1%DMSO的生理盐水,在第5天时,每组采集6只小鼠的海马组织,用于Western blotting检测。各组剩余的小鼠继续饲养至14 d,用于制作石蜡切片。

1.7 免疫荧光染色检测EAAT1、EAAT2与星形胶质细胞标志蛋白GFAP的共定位

小鼠经0.3 mL三溴乙醇麻醉后,左心室内灌注4%多聚甲醛,随后采集脑组织,用固定液浸泡12 h,标本脱水后浸蜡,切片至5 μm厚,用于后续实验。石蜡切片在65 ℃烘箱中烤片2 h,经二甲苯(10 min)、无水乙醇(10 min)、95%乙醇(5 min)、85%乙醇(5 min)、75%乙醇(5 min)脱蜡水化,随后用自来水轻轻冲洗3 min。石蜡切片采用高压修复抗原,然后用5%牛血清白蛋白在37 ℃下处理30 min,然后滴加抗兔EAAT1(1∶150)或EAAT2(1∶150)与抗鼠GFAP(1∶500)混合一抗,在4 ℃下孵育过夜。次日,回收一抗,用PBS冲洗,使用ABflo®488标记的山羊抗兔和ABflo®594标记的山羊抗鼠混合二抗室温孵育1 h。孵育完成后用PBS冲洗,滴加4′,6-二脒基-2-苯基吲哚避光孵育30 min,然后用50%甘油涂载,使用荧光显微镜捕获图像。

1.8 RT-qPCR验证FK506对癫痫小鼠海马EAAT1与EAAT2 mRNA的表达影响

利用Cinozol提取在造模前24 h及1 h单次腹腔注射1 mg/kg FK506治疗后的海马组织,随后进行cDNA合成,具体方法如下:将≤2 μg总RNA与gDNA Eraser混合,用无菌无酶水补足至16 μL,混匀后在42 ℃下孵育2 min以去除基因组DNA污染;随后在同一管中加入SPARKscript RT Master Mix Ⅱ,使总体积为20 μL并混匀,再在85 ℃条件下加热5 min以失活反转录酶和gDNA Eraser,将产物置于冰上即可用于后续RT-qPCR。冰上配制SYBR Green预混液后,利用Bio-RAD CFX Duet RT-qPCR检测仪上进行RT-qPCR分析,反应的热循环条件为:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s,循环40次。使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法对β-actin的靶基因表达进行标准化,以确定相对基因表达。使用的引物如下所示,EAAT1:(正向)5′-GTCTCGTCACAGGAATGGCG-3′,(反向)5-CCTTTCCGGGGTGGATGATG-3′;EAAT2:(正向)5′-ACGCAGTCCATTTACGACGA-3′,(反向)5′-CCGCCAGAGTTACCTTGCAC-3′;β-actin:(正向)5′-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3′,(反向)5′-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3′。

1.9 Western blotting检测蛋白表达

收集海马体组织样本后,加入现配的含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,使用手持组织匀浆机破碎海马样本后,冰上裂解30 min。裂解完成后以4 ℃、12 000×g离心10 min,取上清液使用BCA试剂盒检测总蛋白浓度,加入(5×)上样缓冲液制备样本,100 ℃金属浴煮10 min使蛋白变性。总蛋白10 μg通过8%SDS-PAGE分离,然后转移到PVDF膜上。将PVDF膜与5%脱脂牛奶室温孵育2 h,然后将PVDF膜与相应的一抗在4 ℃孵育过夜,包括鼠抗GFAP(1∶4 000)、兔抗NeuN(1∶1 000)、EAAT1(1∶4 000)、EAAT2(1∶4 000),CaN(1∶5 000)、β-actin(1∶5 000)、GAPDH(1∶6 000)。次日,回收一抗,将GFAP、NeuN、EAAT1、EAAT2、CaN、β-actin、GAPDH PVDF膜用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗或辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗室温孵育2 h。最后,用ECL发光液构建蛋白条带。采用Image J对蛋白灰度值进行分析,以β-actin或GAPDH作为内参。

1.10 利用脑电仪检测各组小鼠脑电的波形变化

为评估KA造模前24 h和1 h单次腹腔注射1 mg/kg FK506的疗效,在KA造模48 h时进行了脑电监测,具体方法如下:将小鼠用固定器固定住小鼠的两侧头,固定好四肢,整个过程尽量减少小鼠的痛苦。随后将记录电极植入至目标深度颅骨下1.2 mm,将参考电极与接地电极分别旋入对侧大脑半球和小脑上方的颅骨中,但不穿透硬脑膜。电极植入成功后,检查电极的阻抗,待阻抗合适后开始记录小鼠的脑电。

1.11 旷场实验检测各组小鼠的自发性运动

该实验在KA造模后第5天开展。将动物放置在安静、温度适宜(23~25 ℃)的透明玻璃箱(尺寸为36 cm×36 cm×40 cm)底面的中心,适应5 min后,记录动物5 min内运动能力,用Anymaze软件录像、计时和分析小鼠活动轨迹。

1.12 HE染色法检测各组小鼠海马组织病理变化

海马石蜡切片的制备、脱蜡、水化的方法同1.7所述。石蜡切片经脱蜡、水化后,置于苏木素染色液中染色3 min,流水冲洗,1%盐酸酒精分化20 s,水洗,用伊红染色5 min,再用流水洗涤30 s,再用蒸馏水洗涤3 s。将切片依次放入75%乙醇(30 s)、80%乙醇(1 min)、95%乙醇(1 min)、无水乙醇(1 min)和二甲苯(10 min)中脱水、透明,随后涂中性胶封片,正置显微镜下拍片。

1.13 统计学分析

统计数据的分析和绘制使用GraphPad Prism 8.2和R软件进行。数据均以$\bar{x}\pm s$表示,两组比较采用非配对双尾t检验进行评估,多组比较采用单因素方差分析进行分析,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 单细胞表达谱分析显示CaN泛表达,EAAT1和EAAT2的星形胶质细胞特异性定位

通过cellmaker数据库经典的脑组织标志基因对细胞群进行注释,注释结果表明,相关标志基因可以较好区分每一种细胞(图1A、B)。基于tSNE降维图绘制耐药性癫痫小鼠和颞叶癫痫患者脑单细胞的细胞类型图谱,结果显示,主要细胞类型包括谷氨酸能神经元、γ-氨基丁酸能神经元、少突胶质细胞、少突胶质前体细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞等在内的主要脑细胞类型(图1C、D)。散点图显示,EAAT1、EAAT2主要分布在星形胶质细胞中;CaN在所有的细胞类型中有较高的表达水平(图1E、F)。癫痫患者脑组织单细胞测序数据结果显示,与3例正常人的大脑组织相比,3例颞叶癫痫患者中GFAP表达水平升高(图1G),NeuN的表达水平则降低(图1H)。

2.2 星形胶质细胞EAAT1与EAAT2表达显著下调

利用Desq2对来源于GEO数据库的KA癫痫小鼠海马星形胶质RNA-seq数据进行差异表达分析,结果表明,相较于PBS处理组,KA组小鼠海马星形胶质细胞CaN表达显著上调($P<0.01$,表1),GFAP表达显著上调($P<0.01$),EAAT1表达显著下调($P<0.01$),EAAT2表达显著下调($P<0.01$);相较于AAV处理组,KA组小鼠海马星形胶质细胞CaN表达显著上调($P<0.05$),GFAP表达显著上调($P<0.01$),EAAT1表达显著下调($P<0.01$),EAAT2表达显著下调($P<0.01$)。提示星形胶质细胞在KA诱导4 d时激活,CaN的上调可能参与EAAT1和EAAT2的负向调控。火山图展示差异表达基因的整体分布:图中每个点代表1个基因,横坐标为Log_2FC(即倍数变化),纵坐标为$-Log_{10}(P\ adjust)$。其中,CaN和GFAP位于火山图红色区域即显著上调,而EAAT1和EAAT2位于绿色区域即显著下调(图2)。

表1 KA处理后海马星形胶质细胞相关基因的表达差异

Table 1 Expression changes of astrocyte-related genes in the hippocampus following KA treatment

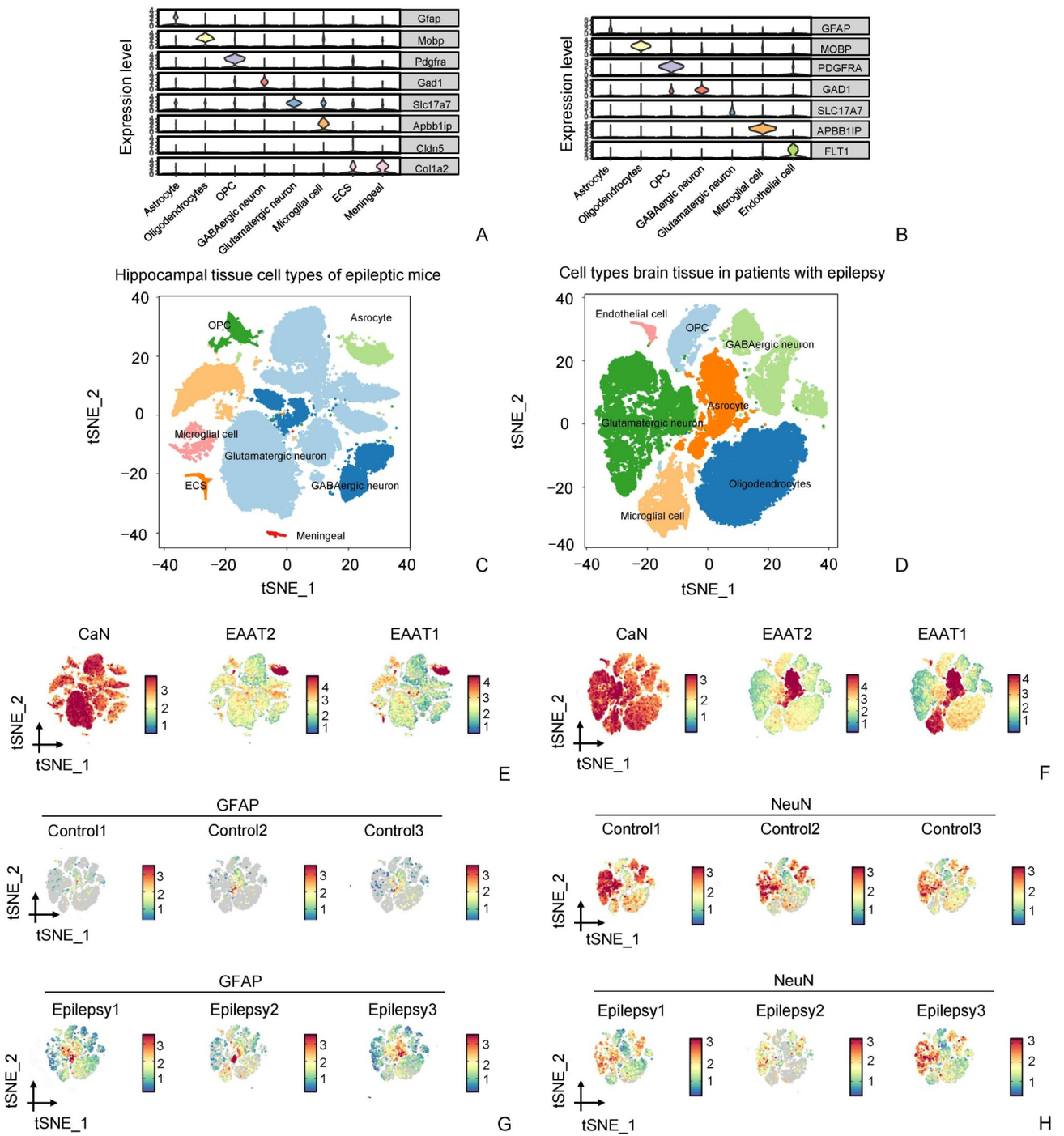
Genes	Groups	P	Log_2FC	Rugulation
EAAT2	KA *vs* PBS	<0.01	−1.487	Down
EAAT1	KA *vs* PBS	<0.01	−0.889	Down
GFAP	KA *vs* PBS	<0.01	2.098	Up
CaN	KA *vs* PBS	<0.01	1.029	Up
EAAT2	KA *vs* AAV	<0.01	−1.358	Down
EAAT1	KA *vs* AAV	<0.01	−1.132	Down
GFAP	KA *vs* AAV	<0.01	2.562	Up
CaN	KA *vs* AAV	<0.05	0.856	Up

2.3 EAAT1、EAAT2与海马星形胶质细胞共定位

免疫荧光染色结果显示,绿色荧光标记的EAAT1和EAAT2在海马区广泛表达,二者均未与蓝色荧光标记的细胞核发生共定位,与红色荧光标记的星形胶质细胞标志物GFAP显示明显共染(图3),提示EAAT1和EAAT2主要表达于星形胶质细胞的细胞质。进一步对齿状回GFAP的免疫荧光强度分析,结果表明,与Control组相比,KA组小鼠海马中GFAP荧光强度显著增加($P<0.05$,图4),说明癫痫的发生伴随着显著的星形胶质细胞增生与激活。

2.4 KA癫痫小鼠海马体中EAAT1与EAAT2 mRNA表达水平下降

为检测KA癫痫小鼠海马体中EAAT1和EAAT2的mRNA表达水平,本研究采用RT-qPCR法测定在海

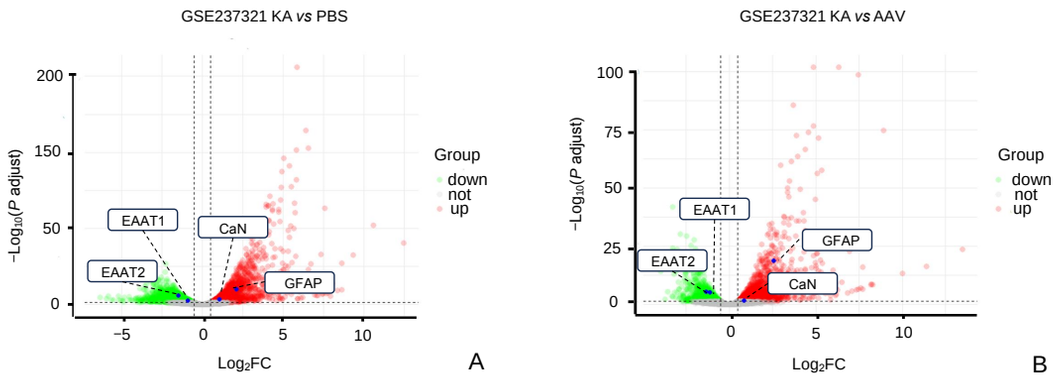


A: Marker genes for hippocampal cell annotation in epileptic mice; B: Marker genes for brain cell annotation in epileptic patient; C: Hippocampal tissue cell types of epileptic mice; D: Cell types of brain tissue in patient with epilepsy; E: High expression levels of EAAT1, EAAT2 and CaN in hippocampal astrocytes of epileptic mice; F: High expression levels of EAAT1, EAAT2 and CaN in astrocytes of patients with epilepsy; G: Increased GFAP expression in the brains of epileptic patients; H: Decreased NeuN expression in the brains of epileptic patients

图1 单细胞测序下的癫痫小鼠及患者脑中CaN广泛表达与EAAT1、EAAT2星形胶质细胞特异性定位

Figure 1 Widespread expression of CaN and astrocyte-specific localization of EAAT1 and EAAT2 in the brains of epileptic mice and patients under single-cell sequencing

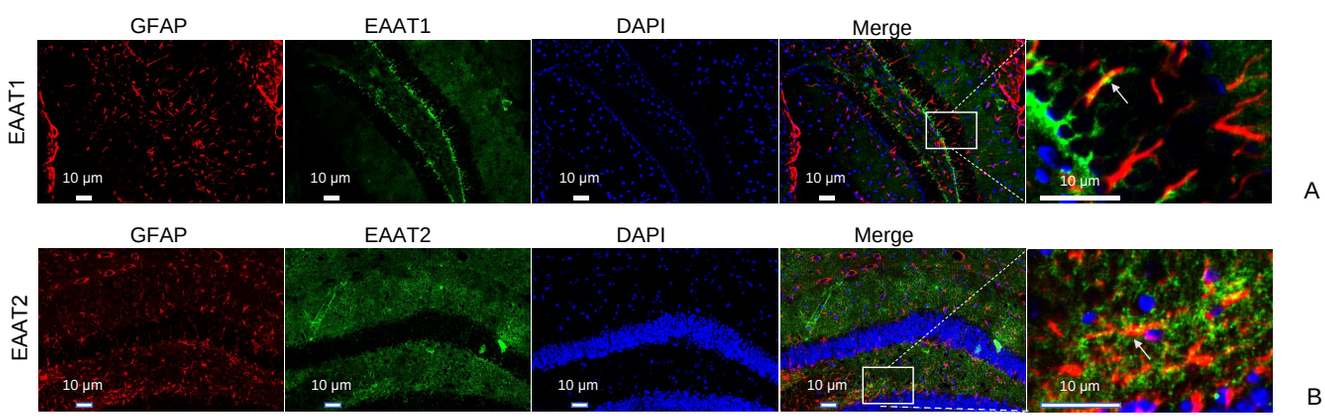
马体注射KA造模12 h和48 h后EAAT1和EAAT2的mRNA表达水平。RT-qPCR结果表明,与Control组比较,12 h和48 h癫痫小鼠海马EAAT1和EAAT2的mRNA相对表达水平均显著下调($P<0.05$,图5)。



A: Compared with PBS-treated mice, KA treatment downregulated EAAT1 and EAAT2 while upregulating GFAP and CaN in hippocampal astrocytes; B: Compared with AAV-treated mice, KA treatment decreased EAAT1 and EAAT2 expression and increased GFAP and CaN expression in hippocampal astrocytes

图2 KA处理后海马星形胶质细胞EAAT1、EAAT2的表达下调

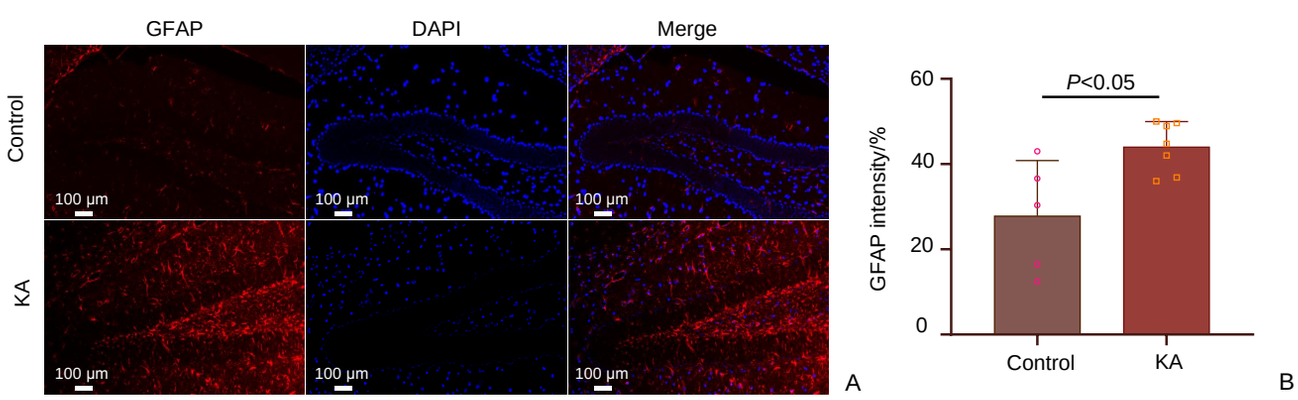
Figure 2 Downregulation of EAAT1 and EAAT2 in hippocampal astrocytes after KA treatment



Arrows: positive signals co-localized with GFAP

图3 EAAT1(A)、EAAT2(B)与海马星形胶质细胞共定位

Figure 3 Co-localization of EAAT1(A) and EAAT2(B) in hippocampal astrocytes



A: Representative images of GFAP immunofluorescence staining in the hippocampal dentate gyrus of KA-induced epileptic mice and normal control mice; B: Significant astrocyte proliferation observed in KA-induced epileptic mice compared to control mice

图4 KA癫痫小鼠海马齿状回GFAP免疫荧光强度变化

Figure 4 Changes in GFAP immunofluorescence intensity in the dentate gyrus of the hippocampus of KA-treated epileptic mice

2.5　KA致痫后海马CaN、EAAT1和EAAT2与GFAP表达的时间依赖性改变

为确定后续FK506药物干预实验的合适取材时间点,采用Western blotting检测KA诱导癫痫后不同时间点(6 h、1 d、3 d、5 d、7 d)海马组织中CaN、EAAT1、EAAT2及GFAP的蛋白表达水平,并与Control组进行比较。结果显示,在第5天时,EAAT1和EAAT2开始显著下调($P<0.01$,图6);CaN全长蛋白水平自第3天时显著下调($P<0.01$),从KA诱导癫痫发作后6 h开始产生了45 kDa的活性片段,随时间的延长逐渐增加,第3天和第5天时表达达到顶峰,表明CaN在癫痫发生早期就已经被激活,早于EAAT1和EAAT2蛋白水平的下调,CaN的活性片段可能参与EAAT1和EAAT2蛋白的调控。星形胶质细胞增生标志物GFAP在KA诱导癫痫发作后6 h逐渐增加,第3天时显著增加($P<0.05$),并随时间的延长逐渐增加。这些结果表明,KA癫痫模型中星形胶质细胞增生和活化参与癫痫早期的一系列生物学事件,包括CaN活性片段的产生,与之相关的EAAT1和EAAT2的下调,参与癫痫的发生。

2.6　FK506抑制KA诱导的癫痫小鼠皮层异常放电

结果显示,Control组小鼠皮层脑电波形平稳,无明显异常的放电活动,KA组癫痫小鼠表现出持续、高频的异常皮层放电活动(图7)。在KA注射前24 h和1 h预先腹腔注射1 mg/kg的FK506,可显著降低KA诱导的异常脑电放电频率与幅度,表明较低剂量的FK506对癫痫小鼠脑部放电活动具有明显的抑制效果。

2.7　FK506改善癫痫小鼠的运动活动能力

采用旷场实验检测Control组、KA组、1 mg/kg FK506组、2 mg/kg FK506组和4 mg/kg FK506组小鼠的总运动距离,以评估不同剂量的FK506对小鼠自主

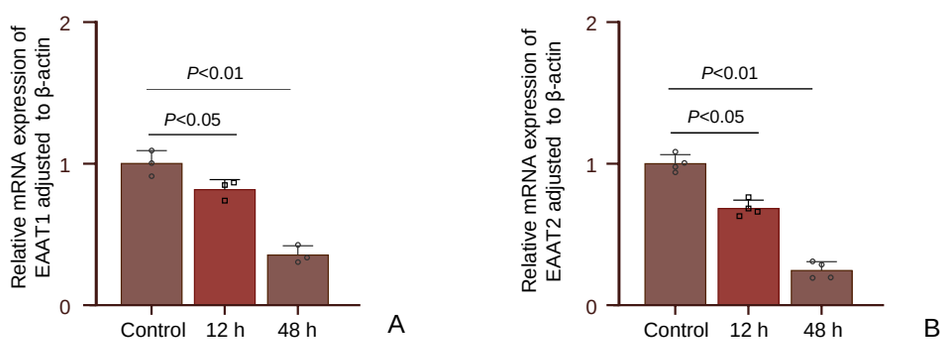
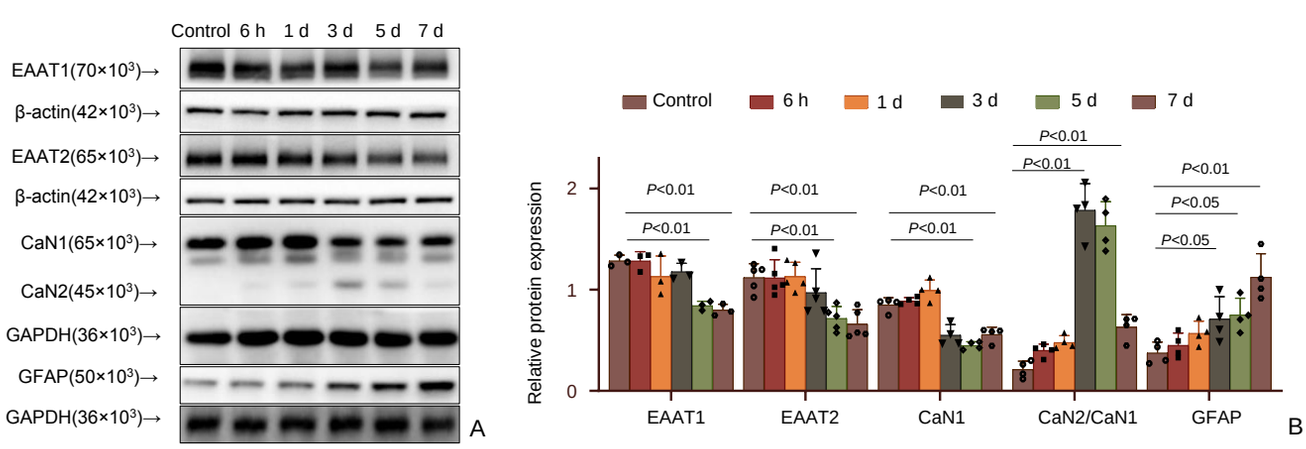


图5　KA致痫后小鼠海马中EAAT1(A)、EAAT2(B)mRNA表达的动态变化

Figure 5　Time-dependent downregulation of EAAT1 (A) and EAAT2 (B) mRNA expression in the mice hippocampus following KA-induced epileptogenesis



A: Representative Western blot bands of CaN, EAAT1, EAAT2, and GFAP at different time points after KA-induced epilepsy; B: Protein expression statistics of CaN, EAAT1, EAAT2, and GFAP at different time points after KA-induced epilepsy

图6　KA致痫后小鼠海马中CaN、EAAT1、EAAT2与GFAP蛋白表达的动态变化

Figure 6　Dynamic changes in CaN, EAAT1, EAAT2, and GFAP protein expression in the mouse hippocampus after KA-induced epilepsy

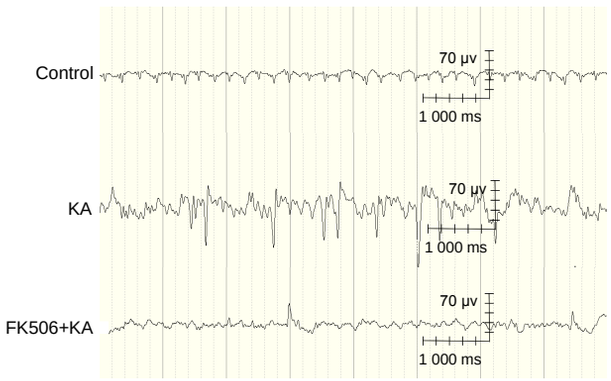


图7　FK506对癫痫小鼠脑部异常放电的抑制

Figure 7　Inhibition of abnormal brain discharge by FK506 in epileptic mice

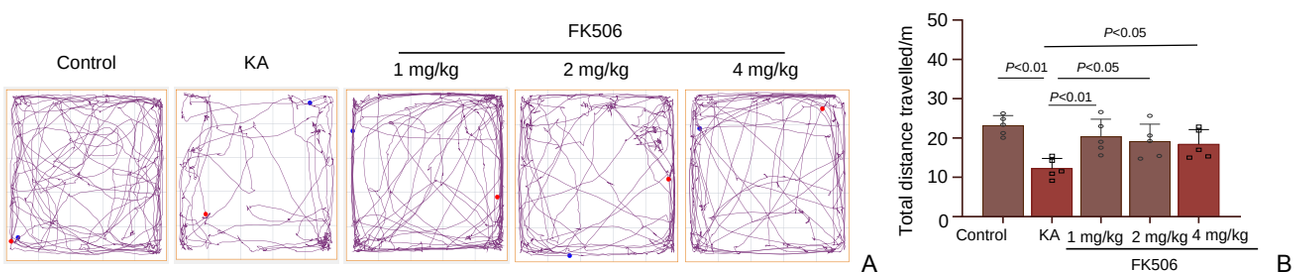
活动能力的影响。结果显示:与Control组比较,KA组小鼠的总距离运动显著缩短(P<0.01,图8);与KA组小鼠相比,给予1、2和4 mg/kg剂量的FK506干预后,KA组癫痫小鼠的运动总距离显著增加(P<0.05)。上述结果提示,FK506能够有效缓解癫痫所致的运动障碍。

2.8　FK506减少KA癫痫小鼠海马神经元损伤

HE染色结果显示,Control组小鼠海马CA1和CA3区锥体神经元呈层紧密排列,细胞形态完整,胞浆丰富、淡染,胞核大而圆、核仁清晰,无空泡变性和固缩现象(图9)。KA组小鼠海马CA1和CA3区出现显著的神经丛损伤。主要表现为:细胞数量锐减,CA1区正常锥体细胞层几乎消失,CA3区细胞排列松散、层次紊乱;大量神经元出现病理性改变,包括胞体固缩、核染色质深染、核膜皱缩,以及胞浆嗜酸性增强,部分细胞核溶解消失。与KA组小鼠比较,1 mg/kg FK506组、2 mg/kg FK506组和4 mg/kg FK506组小鼠海马CA1和CA3区的神经从存活数量明显增加,残留神经元形态相对完整,固缩细胞数量减少,但仍有轻度的细胞层变薄和散在的空泡样改变。

2.9　FK506对癫痫小鼠海马相关基因与蛋白表达的调控作用

在注射KA前24 h和1 h给予1 mg/kg FK506,可部分缓解KA诱导24 h后EAAT1和EAAT2 mRNA的表达水平降低(P<0.05,图10A、B),KA造模后对FK506



A: Movement trajectory maps of mice in each group, red dots indicating the starting point and blue dots indicating the endpoint; B: Significantly increased movement distance of epileptic mice after FK506 intervention

图8　不同剂量的FK506对癫痫小鼠运动距离的改善

Figure 8　Improvement of locomotor distance by different doses of FK506 in epileptic mice

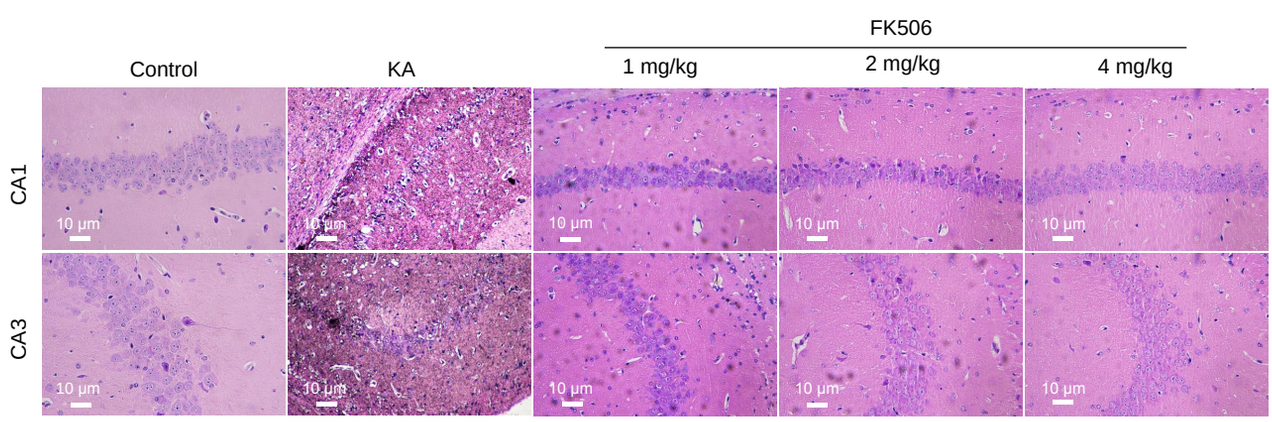


图9　不同剂量的FK506对KA癫痫小鼠海马神经元损伤的改善作用

Figure 9　Ameliorating effects of different doses of FK506 on hippocampal neuronal damage in KA-induced epileptic mice

各处理组每天分别给予1、2和4 mg/kg的FK506干预，持续3 d。采用Western blotting检测各组小鼠海马CaN、EAAT1、EAAT2、GFAP和NeuN蛋白的表达水平。Western blotting结果表明，相较于KA组小鼠，1、2和4 mg/kg的FK506干预能够抑制KA诱导的EAAT1表达下调（$P<0.01$，图10C、D），抑制KA诱导的EAAT2表达下调（$P<0.01$），抑制CaN全长蛋白的下调（$P<0.01$）和45 kDa CaN活性蛋白片段的产生（$P<0.01$），这表明星形胶质细胞谷氨酸再摄取功能恢复。星形胶质细胞增殖标志物GFAP蛋白水平一定程度被抑制（$P<0.01$），但其表达水平仍高于正常小鼠。KA诱导的NeuN蛋白水平的下调被显著抑制（$P<0.05$），表明不同剂量的FK506具有神经保护作用。

3　讨论

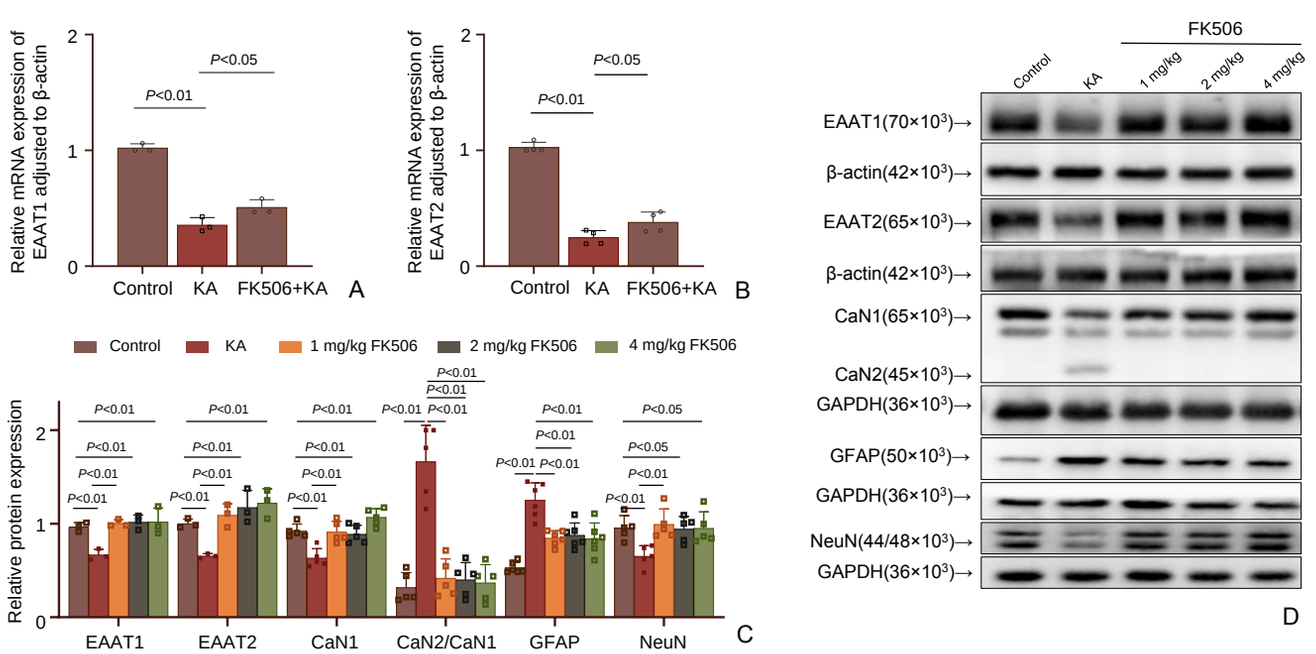
星形胶质细胞谷氨酸转运体EAAT1与EAAT2的功能障碍，是癫痫发生重要机制之一。本研究通过多组学分析，提供CaN、EAAT1和EAAT2在癫痫中的潜在关联证据，利用动物实验在KA癫痫模型中系统揭示了星形胶质细胞内CaN活性片段可能参与对EAAT1和EAAT2的负向调控，并证实免疫抑制剂FK506可通过阻断该通路恢复EAAT1和EAAT2表达、发挥神经保护效应。

3.1　CaN活性片段的产生先于EAAT1和EAAT2的表达下调

本研究发现，在KA诱导的癫痫小鼠海马中，EAAT1与EAAT2的mRNA及蛋白水平显著下调，这与已知的癫痫致兴奋性毒性理论一致[13-15]。CaN活性片段的产生（6 h开始产生，第3天表达顶峰）在时序上先于KA造模48 h时EAAT1和EAAT2的mRNA相对表达水平的下调及KA造模第5天时其蛋白表达水平的下调。这一时序顺序为CaN活性片段驱动EAAT1和EAAT2表达下调提供了关键的时间证据。主流研究多关注CaN在神经元中的功能，而本研究将CaN的作用拓展至星形胶质细胞，填补了癫痫星形胶质细胞CaN研究的空白，指出45 kDa CaN活性片段的产生是导致EAAT1和EAAT2下调的上游关键事件。

3.2　FK506通过抑制CaN活性片段生成逆转EAAT1和EAAT2下调

既往的研究表明，FK506具有抗炎、抗氧化等作用，但本研究在KA癫痫模型中证实：FK506能特异性抑制CaN活性片段的产生，有效逆转EAAT1与EAAT2的表达下降。药效学结果显示，造模前24 h及1 h单次注射1 mg/kg的FK506可减少KA诱导的皮层异常放电，并部分恢复EAAT1和EAAT2转录水平；1、2和



A: Significant attenuation by FK506 of KA-induced downregulation of EAAT1 relative mRNA expression level; B: Significant attenuation by FK506 of KA-induced downregulation of EAAT2 relative mRNA expression level; C and D: Protein expression statistics and Western blot bands of CaN, EAAT1, EAAT2, GFAP and NeuN after FK506 treatment

图10　FK506对癫痫小鼠海马相关基因与蛋白表达的调控作用

Figure 10　Regulatory effect of FK506 on hippocampal gene and protein expression in epileptic mice

4 mg/kg的FK506连续干预抑制了CaN活性片段的产生,显著抑制EAAT1、EAAT2及NeuN的蛋白表达下调,同时抑制GFAP异常增加,改善癫痫小鼠的运动功能与海马病理损伤。上述结果表明,恢复星形胶质细胞谷氨酸摄取功能可能是FK506实现神经保护的新机制,为其临床转化提供了新的理论依据。

3.3 星形胶质细胞CaN活性片段的产生可能源于Calpain-1的切割

本研究观察到,在癫痫状态下CaN并非通过经典CaM途径激活,而是表现为全长蛋白减少伴随活性片段生成,这一特征与文献报道的Calpain-1介导的切割模式高度一致[31]。尽管本研究提出FK506-FKBP12复合物可能通过空间位阻抑制Calpain-1对CaN的切割,但本研究未使用Calpain-1特异性抑制剂进行验证,因此该切割事件是否为CaN激活的必要上游环节尚不明确。此外,细胞内钙超载作为Calpain-1/CaN通路的启动因素,其动态变化在本研究中未被监测。未来应结合特异性抑制剂及星形胶质细胞钙成像技术,完整阐明"钙超载-Calpain-1切割-CaN活化-EAAT1/2下调"这一信号链条。

本研究发现,利用FK506干预KA癫痫鼠可以有效缓解KA诱导的EAAT1和EAAT2的下调,发挥神经保护作用,但仍存在一定的局限性:①CaN对下游蛋白的调控通常依赖于NFAT信号通路,本研究并未涉及对NFAT的抑制作用[32];②CaN活性片段的产生依赖于Calpain-1的切割,本研究并未利用Calpain-1的特异性抑制剂进行干预;③细胞内钙超载是启动Calpain-1/CaN信号通路的源头,本研究未进行细胞内钙离子的检测;④本研究在进行脑电检测时采取了技术更为成熟、信号更易获取的大脑皮层作为电生理记录的位点,但这并不能完全反映在海马这一深部实现长期、稳定的群体神经元放电记录。

综上所述,本研究利用FK506干预KA癫痫小鼠发现CaN与EAAT1和EAAT2之间存在调控关系,为FK506发挥治疗效应提供了新的视角。然而,需要进一步的研究来阐明这种关联的具体机制,为未来的研究方向提供了新的思路。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] PONG A W, XU K J, KLEIN P. Recent advances in pharmacotherapy for epilepsy[J]. Curr Opin Neurol, 2023, 36(2): 77-85. DOI:10.1097/WCO.0000000000001144.

[2] DING D, ZHOU D, SANDER J W, *et al*. Epilepsy in China: major progress in the past two decades[J]. Lancet Neurol, 2021, 20(4): 316-326. DOI:10.1016/S1474-4422(21)00023-5.

[3] PARKIN G M, UDAWELA M, GIBBONS A, *et al*. Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders[J]. World J Psychiatry, 2018, 8(2): 51-63. DOI:10.5498/wjp.v8.i2.51.

[4] LEE H G, WHEELER M A, QUINTANA F J. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(5): 339-358. DOI:10.1038/s41573-022-00390-x.

[5] GREEN J L, DOS SANTOS W F, FONTANA A C K. Role of glutamate excitotoxicity and glutamate transporter EAAT2 in epilepsy: Opportunities for novel therapeutics development[J]. Biochem Pharmacol, 2021, 193: 114786. DOI:10.1016/j.bcp.2021.114786.

[6] DAS S, MCCLOSKEY K, NEPAL B, *et al*. EAAT2 activation regulates glutamate excitotoxicity and reduces impulsivity in a rodent model of Parkinson's disease[J]. Mol Neurobiol, 2025, 62(5): 5787-5803. DOI:10.1007/s12035-024-04644-0.

[7] LUO X, ZHU Z L, ZHENG T W, *et al*. Astrocytic YAP prevents the glutamate neurotoxicity by upregulation of EAAT2 expression and promotes the gain of stemness in astrocytes in ischemic stroke mice[J]. Cell Death Dis, 2025, 16(1): 577. DOI:10.1038/s41419-025-07806-7.

[8] PAJARILLO E, DIGMAN A, NYARKO-DANQUAH I, *et al*. Astrocytic transcription factor REST upregulates glutamate transporter EAAT2, protecting dopaminergic neurons from manganese-induced excitotoxicity[J]. J Biol Chem, 2021, 297(6): 101372. DOI:10.1016/j.jbc.2021.101372.

[9] DAHLMANNS M, DAHLMANNS J K, SAVASKAN N, *et al*. Glial glutamate transporter-mediated plasticity: system x(c)(-)/xCT/SLC7A11 and EAAT1/2 in brain diseases[J]. Front Biosci, 2023, 28(3): 57. DOI:10.31083/j.fbl2803057.

[10] SHA L Z, LI G J, ZHANG X N, *et al*. Pharmacological induction of AMFR increases functional EAAT2 oligomer levels and reduces epileptic seizures in mice[J]. JCI Insight, 2022, 7(15): e160247. DOI:10.1172/jci.insight.160247.

[11] YANG Z, WANG J, YU C Y, *et al*. Inhibition of p38 MAPK signaling regulates the expression of EAAT2 in the brains of epileptic rats[J]. Front Neurol, 2018, 9: 925. DOI:10.3389/fneur.2018.00925.

[12] MODARRES MOUSAVI S M, ALIPOUR F, NOORBAKHSH F, *et al*. Clinical correlation of altered molecular signatures in epileptic human hippocampus and amygdala[J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(2): 725-752. DOI:10.1007/s12035-023-03583-6.

[13] PETR G T, SUN Y, FREDERICK N M, *et al*. Conditional

deletion of the glutamate transporter GLT-1 reveals that astrocytic GLT-1 protects against fatal epilepsy while neuronal GLT-1 contributes significantly to glutamate uptake into synaptosomes[J]. J Neurosci, 2015, 35(13): 5187-5201. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4255-14.2015.

[14] MALIK A R, WILLNOW T E. Excitatory amino acid transporters in physiology and disorders of the central nervous system[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5671. DOI:10.3390/ijms20225671.

[15] HOTZ A L, JAMALI A, RIESER N N, *et al*. Loss of glutamate transporter eaat2a leads to aberrant neuronal excitability, recurrent epileptic seizures, and basal hypoactivity [J]. Glia, 2022, 70(1): 196-214. DOI: 10.1002/glia.24106.

[16] RAMANDI D, ELAHDADI SALMANI M, MOGHIMI A, *et al*. Pharmacological upregulation of GLT-1 alleviates the cognitive impairments in the animal model of temporal lobe epilepsy[J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0246068. DOI: 10.1371/journal.pone.0246068.

[17] PETERSON A R, GARCIA T A, CULLION K, *et al*. Targeted overexpression of glutamate transporter-1 reduces seizures and attenuates pathological changes in a mouse model of epilepsy[J]. Neurobiol Dis, 2021, 157: 105443. DOI:10.1016/j.nbd.2021.105443.

[18] KAMIŃSKI K, SOCAŁA K, ABRAM M, *et al*. Enhancement of glutamate uptake as novel antiseizure approach: preclinical proof of concept[J]. Ann Neurol, 2025, 97(2): 344-357. DOI:10.1002/ana.27124.

[19] HUNG C F, CHIU W C, CHEN J C, *et al*. NRICM101 prevents kainic acid-induced seizures in rats by modulating neuroinflammation and the glutamatergic system [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 140: 112842. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.112842.

[20] RYDZANICZ M, WACHOWSKA M, COOK E C, *et al*. Novel calcineurin A (PPP3CA) variant associated with epilepsy, constitutive enzyme activation and downregulation of protein expression[J]. Eur J Hum Genet, 2019, 27(1): 61-69. DOI:10.1038/s41431-018-0254-8.

[21] KILKA S, ERDMANN F, MIGDOLL A, *et al*. The proline-rich N-terminal sequence of calcineurin Abeta determines substrate binding[J]. Biochemistry, 2009, 48(9): 1900-1910. DOI:10.1021/bi8019355.

[22] DEMATTEIS G, RESTELLI E, CHIESA R, *et al*. Calcineurin controls expression of EAAT1/GLAST in mouse and human cultured astrocytes through dynamic regulation of protein synthesis and degradation [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2213. DOI:10.3390/ijms21062213.

[23] ABDUL H M, SAMA M A, FURMAN J L, *et al*. Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in calcineurin/NFAT signaling [J]. J Neurosci, 2009, 29(41): 12957-12969. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1064-09.2009.

[24] TAPELLA L, DEMATTEIS G, RUFFINATTI F A, *et al*. Deletion of calcineurin from astrocytes reproduces proteome signature of Alzheimer's disease and epilepsy and predisposes to seizures [J]. Cell Calcium, 2021, 100: 102480. DOI:10.1016/j.ceca.2021.102480.

[25] LIU J Z, LI X L, CHEN L G, *et al*. Increased calcineurin expression after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with brain focal edema and astrogliosis[J]. Int J Neurosci, 2016, 126(6): 560-567. DOI:10.3109/00207454.2015.1045975.

[26] XIONG T Q, CHEN L M, TAN B H, *et al*. The effects of calcineurin inhibitor FK506 on actin cytoskeleton, neuronal survival and glial reactions after pilocarpine-induced status epilepticus in mice[J]. Epilepsy Res, 2018, 140: 138-147. DOI:10.1016/j.eplepsyres.2018.01.007.

[27] WANG A H, SI Z H, LI X L, *et al*. FK506 attenuated pilocarpine-induced epilepsy by reducing inflammation in rats [J]. Front Neurol, 2019, 10: 971. DOI: 10.3389/fneur.2019.00971.

[28] CAMPBELL J N, GANDHI A, SINGH B, *et al*. Traumatic brain injury causes a tacrolimus-sensitive increase in non-convulsive seizures in a rat model of post-traumatic epilepsy [J]. Int J Neurol Brain Disord, 2014, 1(1): 1-11. DOI: 10.15436/2377-1348.14.002.

[29] LIU J Z, SI Z H, LI S Q, *et al*. The calcineurin inhibitor FK506 prevents cognitive impairment by inhibiting reactive astrogliosis in pilocarpine-induced status epilepticus rats [J]. Front Cell Neurosci, 2018, 11: 428. DOI: 10.3389/fncel.2017.00428.

[30] LI X, QUAN P, SI Y, *et al*. The microRNA-211-5p/P2RX7/ERK/GPX4 axis regulates epilepsy-associated neuronal ferroptosis and oxidative stress [J]. J Neuroinflammation. 2024, 21(1):13. DOI: 10.1186/s12974-023-03009-z.

[31] WU H Y, TOMIZAWA K, ODA Y, *et al*. Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration[J]. J Biol Chem, 2004, 279(6): 4929-4940. DOI:10.1074/jbc.M309767200.

[32] KIPANYULA M J, KIMARO W H, ETET P F S. The emerging roles of the calcineurin-nuclear factor of activated T-lymphocytes pathway in nervous system functions and diseases[J]. J Aging Res, 2016, 2016(1): 5081021. DOI: 10.1155/2016/5081021.

(收稿:2025-12-10;修回:2026-01-12)

(编辑 严 涵)