

## • 论 著 •

## 丙戊酸通过调控 S100B 蛋白表达对癫痫幼鼠模型的认知功能及 NMDAR1 水平的影响

冯骄 黄丽 侯宁 谢南昌 陈敏

**【摘要】 目的** 探讨丙戊酸通过调控 S100B 蛋白表达对癫痫幼鼠模型的认知功能及 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)1 水平的影响。**方法** 50 只幼鼠按随机数字表分为对照组、模型组、丙戊酸组、喷他脒(Pentamidine)组及丙戊酸 + Pentamidine 组,每组各 10 只;除对照组外,其余各组幼鼠均建立癫痫模型,建模后丙戊酸组灌胃 1 mg/kg 丙戊酸, Pentamidine 组注射 5 mg/kg 的 Pentamidine 及丙戊酸 + Pentamidine 组灌胃 1 mg/kg 丙戊酸和尾部注射 5 mg/kg 的 Pentamidine;水迷宫实验检测认知功能;尼氏染色观察海马组织形态;末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 尾端标记法(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)法检测海马组织神经细胞凋亡率;免疫组化染色检测海马组织 NMDAR1 阳性细胞率;免疫印迹检测海马组织中 S100 钙结合蛋白 B(S100 calcium-binding protein B, S100B)、环氧合酶 2(Cyclooxygenase-2, COX-2)及白细胞介素(Interleukin, IL)-1 $\beta$  蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较,模型组幼鼠第 1、2、3 及 4 d 搜索平台时间、神经细胞凋亡率、NMDAR1 阳性细胞率及 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白水平升高,穿越平台次数及原平台搜索时间占比均减少( $P < 0.05$ );与模型组比较,丙戊酸组幼鼠第 1、2、3 及 4 d 的搜索平台时间、神经细胞凋亡率、NMDAR1 阳性细胞率及 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白水平降低,穿越平台次数及原平台搜索时间占比增加( $P < 0.05$ );与丙戊酸组比较, Pentamidine 组第 1、2、3 及 4 d 的搜索平台时间减少,穿越平台次数及原平台搜索时间占比增加,神经细胞凋亡率、NMDAR1 阳性细胞率及 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白水平无明显变化( $P > 0.05$ );与 Pentamidine 组比较,丙戊酸 + Pentamidine 组幼鼠第 1、2、3 及 4 d 的搜索平台时间、神经细胞凋亡率、NMDAR1 阳性细胞率及 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白水平降低,穿越平台次数及原平台搜索时间占比均增加( $P < 0.05$ )。**结论** 丙戊酸可显著改善癫痫幼鼠模型的认知功能,降低 NMDAR1 表达水平,减少神经细胞凋亡,其机制可能与调控 S100B 表达有关。

**【关键词】** 幼鼠 癫痫 丙戊酸 认知功能 神经细胞 S100 钙结合蛋白 B N-甲基-D-天冬氨酸受体 1

**【中图分类号】** R742.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2023)05-0454-07

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2023.05.006

**Effects of valproic acid on cognitive function and NMDAR1 levels in juvenile epileptic rats by regulating S100B protein expression** Feng Jiao, Huang Li, Hou Ning, et al. Children's Hospital, Maternal and Child Health Care Hospital, Linfen Shanxi 041000

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of valproic acid on cognitive function and NMDAR1 levels in juvenile epileptic rats by regulating S100B protein expression. **Methods** Fifty young rats were randomly divided into the control group, model group, valproic acid group, pentamidine group, and valproic acid plus pentamidine group with 10 rats in each group. Except for the control group, the epilepsy model was established in the other groups. After modeling, the VPA group was orally administered VPA (1 mg/kg) by gavage. The pentamidine group was injected through the tail vein with 5 mg/kg pentamidine. The valproic acid plus pentamidine group was orally administered 1 mg/kg valproic acid and injected with 5 mg/kg pentamidine through the tail vein. The water maze test was used to detect cognitive function. The morphology of the hippocampus was observed by Nissl staining. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling

ling (TUNEL) was employed to determine the apoptotic rate. Immunohistochemical staining was used to detect NMDAR1-positive cells, S100 calcium-binding protein B (S100B), cyclooxygenase-2 (COX-2), and interleukin (Interleukin, IL-1 $\beta$ ) protein expression levels in the hippocampus. **Results** Compared with the control group, the platform searching time, nerve cell apoptotic rate, NMDAR1-positive cell rate, and S100B, COX-2 and IL-1 $\beta$  protein levels were increased in the model group on day 1, day 2, day 3 and day 4, while the times of crossing the platform and the proportion of searching time on the original platform were decreased with statistical significance ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the platform searching time, nerve cell apoptotic rate, NMDAR1-positive cell rate and S100B, COX-2 and IL-1 $\beta$  protein levels of young mice in the valproic acid group decreased on day 1, day 2, day 3 and day 4, while the times of crossing the platform and the proportion of searching time on the original platform increased with statistical significance ( $P<0.05$ ). Compared with the valproic acid group, the pentamidine group spent less time searching on days 1, 2, 3 and 4, and the number of platform crossings and the time spent searching for the original platform were increased. There was no significant difference in the apoptotic rate of nerve cells, the rate of NMDAR1-positive cells or the protein expression of S100B, COX-2 and IL-1 $\beta$  between the valproic acid group and the pentamidine group ( $P>0.05$ ). Compared with the pentamidine group, the platform searching time, nerve cell apoptotic rate, NMDAR1-positive cell rate and protein levels of S100B, COX-2 and IL-1 $\beta$  in the valproic acid plus pentamidine group decreased on day 1, day 2, day 3 and day 4, and the times of crossing the platform and the proportion of searching time on the original platform were increased, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Valproic acid can significantly improve cognitive function, reduce the expression of NMDAR1 and inhibit the apoptosis of nerve cells in juvenile epileptic rats, and the mechanism might be related to its regulation of S100B expression.

**【Key words】** Epilepsy Valproic acid Cognitive function Nerve cell S100B NMDAR1

癫痫是以大脑神经元异常放电诱发的突发性、短暂性且反复发作的以脑功能失常为特征的疾病,发病率高达 5%,是临床儿童最常见的慢性神经系统疾病<sup>[1]</sup>。多数癫痫患儿无智力障碍,但是存在一定程度的暂时或持久性的认知功能损伤。临床研究发现,多数癫痫患儿合并注意力缺陷多动障碍,给患儿身心健康造成严重影响,也是神经内科医生重点关注的问题<sup>[2]</sup>。N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)位于突触后膜,属于离子型兴奋性神经递质谷氨酸受体,NMDAR1 属于其亚型之一,其表达激活可通过影响皮层锥体神经元固有振动及共振特性而加快癫痫发生发展。现阶段临床通过抗 NMDAR1 表达而改善癫痫患者临床症状及炎症反应<sup>[3]</sup>。S100B 是 S100 蛋白家族成员之一,主要在神经胶质细胞中表达,当脑组织损伤时胶质细胞可大量释放 S100B 进入脑脊液,血清中可被检测到而被认为是评估脑组织损伤程度的主要蛋白标志物。癫痫中 S100B 水平升高可导致炎症因子过度表达及聚集,加重炎症及氧化应激反应,加重神经细胞凋亡而降低认知功能<sup>[4]</sup>。现阶段抗癫痫药物(Antiepileptic drugs, AEDs)是治疗癫痫的主要方法,丙戊酸(Valproate, VPA)是广谱的抗癫痫药物,已经被作为儿童癫痫

发作的首选药物,可发挥神经保护作用<sup>[5]</sup>。但是关于丙戊酸能否通过调控 S100B 蛋白,且对 NMDAR1 的水平产生影响还暂无研究,本研究以此作为创新点进行动物实验,旨在为临床抗癫痫提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选取 50 只 10 d 龄的斯特普与达利(Sprague-Dawley, SD)幼鼠,体重 20~30 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号为 SCXK(湘)2021-0010,饲养于本院附属大学动物实验室,湿度 55%~60%,温度 25℃,模拟黑白交替无菌饮食 14 d,5 只幼鼠 1 个笼子,定时清洗、消毒鼠笼,本实验严格按照科技部[(2006)398 号]《关于善待实验动物的指导性意见》文件要求进行实验。所有幼鼠适应环境 1 周后进行相关实验。

### 1.2 试剂与仪器

丙戊酸(湖南省湘中制药有限公司);氯化锂、匹罗卡品及东莨菪碱(美国 Sigma 公司);S100B 抑制剂喷他脒(Pentamidine)(Selleck 中国分公司);0.9%生理盐水、4%四聚甲醛[默克生命科学技术

(南通)有限公司];磷酸盐缓冲盐水(Phosphate buffered saline, PBS)[康迪斯化工(湖北)有限公司];尼氏染色试剂盒(南京建成生物工程研究所);TUNLE 试剂盒(中国 Abcam);鼠抗人 NMDAR1 抗体(美国 BD 公司);兔抗人 S100B 抗体、COX-2 及 IL-1 $\beta$  抗体(中国 Abcam);免疫组化试剂盒、电化学发光液体(Electrochemiluminescence, ECL)、酶联免疫试剂盒、聚氰基丙烯酸正丁酯(Butyleano-acrylate, BCA)蛋白定量试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);Forma 900 系列超低温冰箱(美国 Thermo Scientific 公司);Centrifuge 5424R 型高速低温离心机(美国贝克曼库);蛋白电泳仪(北京六一仪器厂)。

### 1.3 动物分组及建模<sup>[6]</sup>

50 只幼鼠按随机数字表分为对照组、模型组、丙戊酸组、Pentamidine 组及丙戊酸 + Pentamidine 组,每组各 10 只。除对照组外,其余各组幼鼠均建立癫痫模型,方法为幼鼠采用 127 mg/kg 的氯化锂腹腔注射,20 h 后腹腔注射 1 mg/kg 的东莨菪碱,30 min 后按照 30 mg/kg 腹腔注射匹罗卡品,直至出现癫痫持续状态,但若 30 min 后未出现,再次注射 30 mg/kg 的匹罗卡品;癫痫建模成功标准按照 Racine 分级标准进行评估,出现 4、5 级的症状作为建模成功标准,癫痫持续 90 min 后腹腔注射 10 mg/kg 的地西洋终止癫痫持续状态。

### 1.4 药物干预

建模后丙戊酸组幼鼠灌胃 1 mg/kg 的丙戊酸, Pentamidine 组幼鼠尾部静脉注射 5 mg/kg 的 Pentamidine,丙戊酸 + Pentamidine 组幼鼠灌胃 1 mg/kg 的丙戊酸和尾部静脉注射 5 mg/kg 的 Pentamidine,均 1 次/d,连续干预 7 d。

### 1.5 水迷宫实验

水迷宫直径为 1.3 m,高 0.5 m 的圆形蓄水池及透明玻璃构成,水深 0.3 m;水温为室温,测试前 1 d 水池中不放置平台,让幼鼠自由游泳 120 s,熟悉周围环境,此现象持续 5 d 后开始检测;定位航行实验:放置平台,前 4 d 按照东北、西北、西南、东南方向将幼鼠面向池壁浸入到水中,记录找到平台时间,如 120 s 内未找到平台时间则为 120 s;空间探索时间:撤掉平台,将幼鼠头向东北迷宫壁,浸入水中,记录 120 s 穿越平台次数及在平台处的探索时间。

### 1.6 尼氏染色

1.5 实验结束后各组随机抽取 5 只幼鼠,腹腔注

射 1%的戊巴比妥钠麻醉后处死,取新鲜的海马组织进行尼氏染色及 TUNEL 检测;海马组织于中性福尔马林溶液固定 12 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切成 4  $\mu$ m 的切片,甲醛脱蜡至水;采用 Cresyl violet stain 于 56℃温箱浸染 60 min,去离子水冲洗, Nissl Differentiation 分化 1~3 min,直到背景接近于无色为止,快速脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

### 1.7 TUNEL 法检测海马组织神经细胞凋亡率

海马组织石蜡包埋切片,逐层酒精脱水,加入磷酸盐缓冲盐水(Phosphate buffered saline, PBS)冲洗,冲洗 5 min,反复 3 次,加入 20  $\mu$ g/mL 的蛋白酶 K 溶液,在 23℃下进行孵育 30 min;PBS 冲洗后放入 3%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,15 min 后再次 PBS 冲洗,擦片后放入 50  $\mu$ L TUNEL 反应混合液;4',6-二氨基-2-苯基吡啶(4',6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色,37℃下孵育 60 min;PBS 冲洗,抗荧光淬灭封片液封片并在荧光显微镜下拍照,蓝色荧光为凋亡细胞,计算细胞凋亡率 = 凋亡细胞数/总细胞数  $\times$  100%。

### 1.8 免疫组化染色检测海马组织 NMDAR1 阳性细胞率

各组剩余幼鼠处死提取海马组织进行免疫组化染色及免疫印迹实验。海马组织石蜡切片,常规脱蜡脱水后采用 PBS 冲洗 3 次,间隔 5 min,37℃下用羊血清封闭 60 min,加入 NMDAR1(1:500)一抗,4℃下孵育 24 h,加入二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1:1000),孵育 30 min,冲洗后加入 50  $\mu$ L 的链霉亲和素-生物素复合物,二氨基联苯胺显色,冲洗,终止显色,透明、封片,细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,以 Image pro plus 6.0 图像分析系统计算积分光密度,每张切片取 5 个 200 倍视野的光密度的平均值作为该切片的积分光密度值。

### 1.9 免疫印迹检测各组幼鼠海马组织 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$ 蛋白表达水平

海马组织采用 PBS 冲洗后切碎,加入 1 mL 的细胞裂解液,10000 r/min 4℃离心 5 min,取上清液,加入样孔中,采用 BCA 法测总蛋白水平,每孔上样蛋白量 20  $\mu$ g,聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)转印缓冲液配制好后要放入 4℃冰箱内预冷,然后全部转移到聚偏氟乙烯膜(Polyvinylidene fluoride membrane, PVDF)膜上,再把脱脂奶粉加入,全程封闭时长为 1 h;加入一抗 S100B(1:150),COX-2(1:200),IL-1 $\beta$ (1:200),20 倍洗涤缓冲

液(Tris-buffered saline with tween 20,TTBS)漂洗 3 次,每次 10 min;4℃过夜,加入羊抗兔 IgG 二抗(1:2500),ECL 测试系统 JY-Clear 分析蛋白水平。

1.10 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8 软件,各组计量数据服从正态分布,计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析,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 各组幼鼠搜索平台时间、穿越平台次数及原平台搜索时间占比

与对照组比较,模型组幼鼠第 1、2、3 及 4 d 的搜索平台时间增加,穿越平台次数及原平台搜索时间占比均降低( $P<0.05$ );与模型组比较,丙戊酸组幼鼠第 1、2、3 及 4 d 的搜索平台时间降低,穿越平台次数及原平台搜索时间占比均升高( $P<0.05$ );与丙戊酸组比较,Pentamidine 组第 1、2、3 及 4 d 的搜索平台时间均升高,穿越平台次数及原平台搜索时间占比均降低( $P<0.05$ );与 Pentamidine 组比较,丙戊酸组+Pentamidine 组幼鼠第 1、2、3 及 4 d 的搜索平台时间降低,穿越平台次数及原平台搜索时间占比均升高( $P<0.05$ )(表 1)。

2.2 尼氏染色观察各组幼鼠海马组织形态

对照组幼鼠海马组织神经元排列整齐、结构完整且尼氏小体丰富;模型组幼鼠神经元结构破坏严重,神经形态紊乱且数目减少,尼氏小体消失;与模

型组比较,丙戊酸组及 Pentamidine 组幼鼠神经元损伤改善,神经元及尼氏小体数目增加;与 Pentamidine 组比较,丙戊酸+Pentamidine 组神经元结构清晰且神经元数目及尼氏小体数量增加(图 1)。

2.3 TUNEL 法检测海马组织神经细胞凋亡率

对照组、模型组、丙戊酸组、Pentamidine 组及丙戊酸+Pentamidine 组幼鼠神经细胞凋亡率分别为( $5.20 \pm 0.63$ )、( $36.54 \pm 5.77$ )、( $21.30 \pm 3.64$ )、( $22.66 \pm 4.52$ )及( $15.63 \pm 2.55$ )%。与对照组比较,模型组海马组织神经细胞凋亡率升高;与模型组比较,丙戊酸组、Pentamidine 组海马组织神经细胞凋亡率均降低;与丙戊酸组比较,Pentamidine 组海马组织神经细胞凋亡率无明显变化( $P>0.05$ );与 Pentamidine 组比较,丙戊酸+Pentamidine 组幼鼠神经细胞凋亡率降低( $P<0.05$ )(图 2)。

2.4 免疫组化染色检测海马组织 NMDAR1 阳性细胞率

对照组、模型组、丙戊酸组、Pentamidine 组及丙戊酸+Pentamidine 组幼鼠 NMDAR1 阳性细胞率分别为( $3.12 \pm 0.20$ )、( $27.19 \pm 3.69$ )、( $20.35 \pm 3.03$ )、( $15.55 \pm 2.80$ )及( $10.43 \pm 1.22$ )%。与对照组比较,模型组 NMDAR1 阳性细胞率升高;与模型组比较,丙戊酸组 NMDAR1 阳性细胞率降低;与丙戊酸组比较,Pentamidine 组 NMDAR1 阳性细胞率降低( $P<0.05$ );与 Pentamidine 组比较,丙戊酸+Pentamidine 组幼鼠 NMDAR1 阳性细胞率降低( $P<0.05$ )(图 3)。

表 1 各组幼鼠搜索平台时间、穿越平台次数及原平台搜索时间占比( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	搜索平台时间(s)				穿越平台次数 (次)	原平台搜索时间 占比(%)
	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d		
对照组	27.25±3.62	17.54±3.50	11.20±3.20	7.08±1.25	15.50±3.74	58.70±6.68
模型组	48.25±6.35*	41.30±5.70*	35.54±4.28*	21.14±3.69*	6.30±1.15*	23.14±2.02*
丙戊酸组	38.41±4.62*#	32.41±4.48*#	26.30±3.74*#	15.85±2.87*#	10.25±1.57*#	38.54±4.20*#
Pentamidine 组	42.36±5.11*#	36.70±3.90*#▲	30.41±3.47*#▲	17.22±3.03*#▲	8.62±1.20*#▲	34.66±3.69*#▲
丙戊酸+Pentamidine 组	31.77±4.56*#▲△	28.55±3.60*#▲△	19.40±3.68*#▲△	12.66±2.70*#▲△	12.70±1.90*#▲△	47.56±4.62*#▲△

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ;与丙戊酸组比较,▲ $P<0.05$ ;与 Pentamidine 组比较,△ $P<0.05$

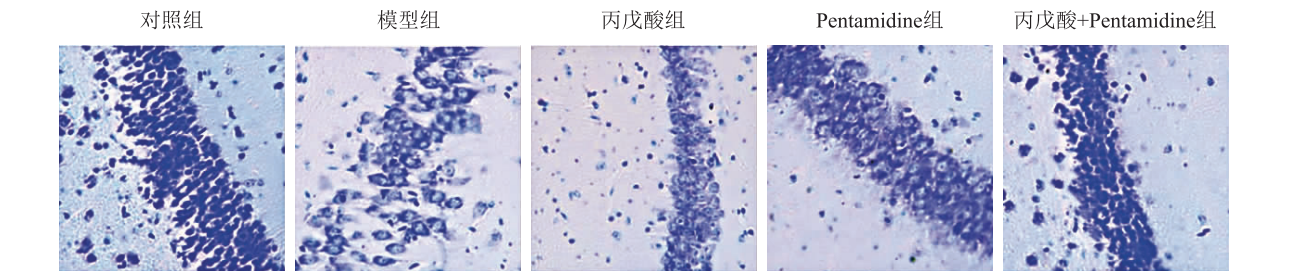


图 1 尼氏染色观察各组幼鼠海马组织形态(×200 倍)

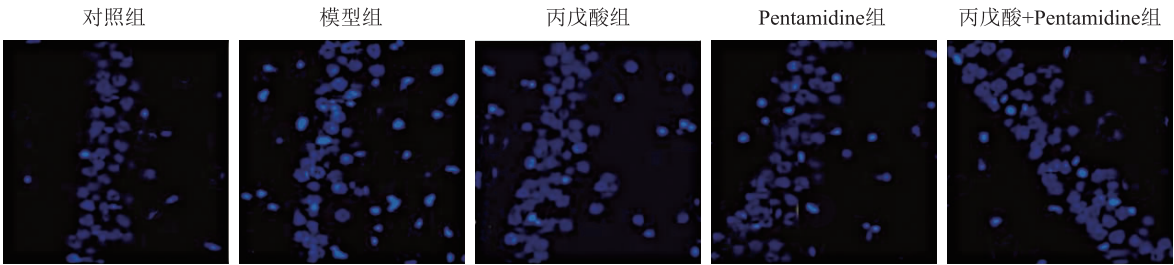


图2 TUNEL法检测海马组织神经细胞凋亡率(×200倍)

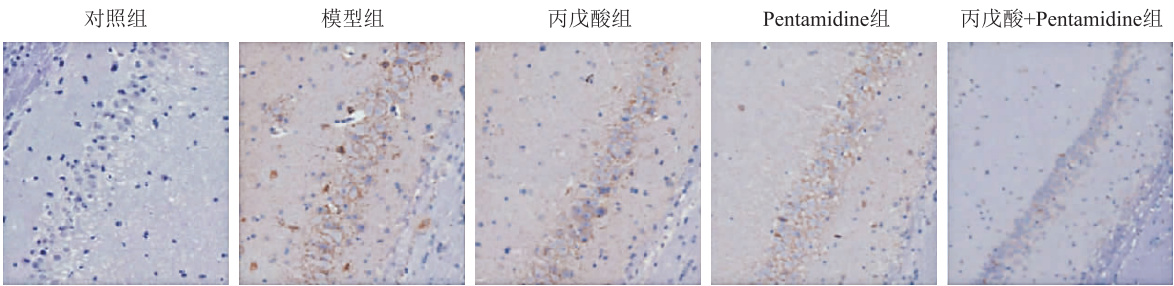


图3 免疫组化染色检测海马组织 NMDAR1 阳性细胞率(×200倍)

2.5 免疫印记检测海马组织中 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平

与对照组比较,模型组 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白水平升高;与模型组比较,丙戊酸组 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白水平降低;与丙戊酸组比较, Pentamidine 组 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白水平无明显变化( $P>0.05$ );与 Pentamidine 组比较,丙戊酸 + Pentamidine 组幼鼠 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白水平降低( $P<0.05$ )(表 2、图 4)。

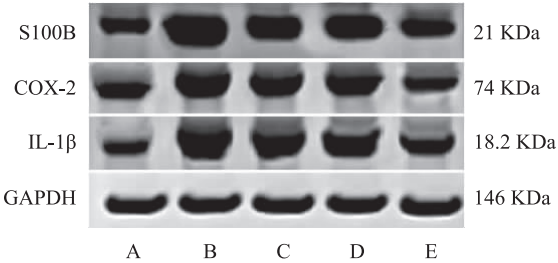


图4 免疫印记检测海马组织中 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平 A 为对照组;B 为模型组;C 为丙戊酸组; D 为 Pentamidine 组;E 为丙戊酸 + Pentamidine 组

表2 各组幼鼠海马组织中 S100B, COX-2 及 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	S100B	COX-2	IL-1 $\beta$
对照组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型组	1.83 $\pm$ 0.25*	2.06 $\pm$ 0.44*	1.71 $\pm$ 0.27*
丙戊酸组	1.35 $\pm$ 0.09**	1.63 $\pm$ 0.23**	1.41 $\pm$ 0.18**
Pentamidine 组	1.32 $\pm$ 0.11**	1.60 $\pm$ 0.22**	1.34 $\pm$ 0.20**
丙戊酸 + Pentamidine 组	1.03 $\pm$ 0.05* $\blacktriangle\blacktriangle$	1.25 $\pm$ 0.15** $\blacktriangle\blacktriangle$	1.10 $\pm$ 0.09** $\blacktriangle\blacktriangle$

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ;与丙戊酸组比较, $\blacktriangle P<0.05$ ;与 Pentamidine 组比较, $\triangle P<0.05$

3 讨论

癫痫是以大脑神经元异常放电诱发的突然及反复性的脑部功能障碍,是儿科高发的慢性神经疾病,对患儿认知功能产生损伤,严重影响患儿身心健康。目前癫痫人群伴随不同程度的认知功能障碍,临床症状主要表现为注意力不集中、语言及反应能力障

碍,严重影响社会生活甚至产生自杀及自残行为<sup>[7]</sup>。现阶段药物是抗癫痫的主要治疗方法,丙戊酸为临床抗癫痫一线药物,具有安全性高且对意识无不良影响。

本研究通过氯化锂 + 匹罗卡品腹腔注射建立癫痫动物模型,具有自发性反复发作的特点,与人类癫痫具有相似的临床及病理特征<sup>[8]</sup>。癫痫发作后可对认知功能产生不同程度损伤,发生机制主要是癫痫发生后胶质细胞增生加剧;大脑神经元反复放电导致点燃效应;神经突触重组导致大脑神经递质水平失衡,表现为  $\gamma$ -氨基丁酸等神经递质水平升高而诱发氧化应激反应,进而导致神经元变性、坏死,最终损害认知功能<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,与模型组比较,丙戊酸组幼鼠搜索平台时间减少,穿越平台次数及原平台搜索时间占比均升高,说明丙戊酸可以提高空间搜索及学习记忆的能力,改善认知功能。丙戊



酸具有显著抗癫痫作用,可增加抑制性神经递质的功能,从而减少脑电波异常放电,降低神经递质水平的同时可阻滞钾离子及钠离子的传导而降低细胞的兴奋性,抗癫痫的同时改善认知功能<sup>[10]</sup>。有研究表明,丙戊酸可显著提高癫痫患者的认知功能,无明显不良反应<sup>[11]</sup>。有研究证实,丙戊酸组癫痫大鼠逃避潜伏期缩短,穿越平台次数增加,即丙戊酸可显著改善癫痫大鼠的认知功能<sup>[12]</sup>。

本研究结果显示,与模型组比较,丙戊酸组海马组织病理形态学改善,神经细胞凋亡率降低,说明丙戊酸对癫痫幼鼠大脑具有保护作用。尼氏染色后模型组幼鼠海马组织神经元缺失、变性、坏死,同时发现尼氏小体减少,无法满足神经活动所需,导致神经元存活大大降低,但是采用丙戊酸灌胃后海马组织神经元坏死程度改善,认为丙戊酸可以显著减少神经元死亡而发挥海马神经元保护作用。丙戊酸可通过激活多个信号通路来抑制神经细胞凋亡,主要可通过降低凋亡级联反应中关键因子 B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Cysteine containing aspartate-specific proteases-3, Caspase-3)表达水平来促使神经元存活。本研究结果表明,模型组幼鼠 NMDAR1 阳性细胞率较高,丙戊酸灌胃后 NMDAR1 阳性细胞率降低,说明丙戊酸对 NMDAR1 表达具有抑制作用。谷氨酸是中枢神经系统中重要的兴奋性神经递质,离子型受体 NMDAR 与癫痫的发生关系密切,以海马最丰富, NMDAR1 在 NMDAR 中发挥主要作用,认为脑组织中其表达水平升高可加快神经兴奋毒性作用而导致神经元损伤是导致癫痫发生的主要发作机制<sup>[13-14]</sup>。已有研究证实,抗痫灵抑制癫痫大鼠谷氨酸对神经元兴奋毒性作用可能与抑制 NMDAR1 表达有关<sup>[15]</sup>。但是关于丙戊酸对 NMDAR1 的抑制作用还不明确,需要进一步研究。

本研究结果显示,与模型组比较,丙戊酸组 S100B、COX-2 及 IL-1 $\beta$  表达水平降低,与 Pentamidine 组相似,并发现丙戊酸可通过调控 S100B 而发挥抑制炎症反应。S100B 是钙离子结合蛋白超家族,被认为是神经系统的特异性蛋白,可作为细胞外信号传递作用,并根据所处细胞环境的变化而发挥神经保护或神经毒性作用<sup>[16]</sup>。在癫痫发生时胶质细胞可释放大量的 S100B,进而激活氧化应激活性氧物质(Reactive Oxygen Species, ROS)/胚胎致癌

基因(Rat sarcoma viral oncogene homolog, RAS)/外周神经系统调节蛋白激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路而加剧神经细胞炎症反应<sup>[17]</sup>。COX-2 是神经炎症的重要介质,在癫痫患者及动物模型的海马组织中均能够检测到 COX-2 水平显著升高,并认为通过抑制 COX-2 可显著改善脑功能<sup>[18]</sup>。IL-1 $\beta$  是免疫系统中促炎因子,近些年被认为是癫痫海马硬化的启动因子,可加快癫痫患者的炎症反应<sup>[19]</sup>。相关研究表明,在氧化应激中 IL-1 $\beta$  表达水平升高,丙戊酸可通过下调小胶质细胞炎症反应而发挥改善作用<sup>[20]</sup>。本研究认为丙戊酸可通过下调 S100B 而抑制炎症反应,改善脑组织损伤。

综上所述,丙戊酸可显著改善癫痫幼鼠模型的认知功能,降低 NMDAR1 表达水平,减少神经细胞凋亡,其机制可能与调控 S100B 表达有关。

## 参 考 文 献

- [1] Singh G, Sander JW. The global burden of epilepsy report: implications for low- and middle-income countries [J]. *Epilepsy Behav*, 2020, 105: 106949.
- [2] 杨桃妮, 王嫚, 贾永苗等. 维生素 D 辅助治疗对癫痫共患注意力缺陷多动障碍患儿认知功能与血清炎症因子水平的影响 [J]. *延安大学学报(医学科学版)*, 2023, 21(1): 55-58.
- [3] Zhang YN, Dong HT, Duan L, et al. SLC1A2 mediates refractory temporal lobe epilepsy with an initial precipitating injury by targeting the glutamatergic synapse pathway [J]. *IU MBM Life*, 2019, 71(2): 213-222.
- [4] 姜小花, 陈利娟, 陈敏等. RAGE 受体阻断剂对癫痫幼鼠脑电图、神经元损伤及 S100B 蛋白表达的影响 [J]. *中国医疗设备*, 2023, 38(5): 156-160.
- [5] Mostacci B, Ranzato F, Giuliano L, et al. Alternatives to valproate in girls and women of childbearing potential with Idiopathic generalized epilepsies: state of the art and guidance for the clinician proposed by the epilepsy and gender commission of the Italian League against epilepsy (LICE) [J]. *Seizure*, 2020 (85): 26-38.
- [6] 裴印权, 王大仁, 慕容慎行, 等. 实验性动物癫痫模型 [J]. *国外医学. 神经病学神经外科学分册*, 1982, 1982(1): 13-18.
- [7] Steriade C, Titulaer MJ, Vezzani A, et al. The association between systemic autoimmune disorders and epilepsy and its clinical implications [J]. *Brain*, 2021, 144(2): 372-390.
- [8] 黄亚辉, 杨萍, 朱勇, 等. 氯化锂-匹罗卡品诱导癫痫大鼠海马组织差异表达 circRNA 的筛选及功能分析 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2022, 17(6): 315-319.
- [9] 农雪娟, 覃丽娜, 黄瑜, 等. 灵芝三萜联合外源性 GM1 对癫痫大鼠认知功能和海马突触结构的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2022, 31(10): 918-925.
- [10] 刘春香. 丙戊酸钠联合复方丹参滴丸对癫痫大鼠抗痫作用的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [11] 张伟, 李娜, 李庆利. 拉莫三嗪或奥卡西平对丙戊酸无效型成人

- 难治性癫痫患者认知功能、血清 GFAP 及 NSE 水平的影响价值分析[J]. 中国医学工程, 2022, 30(10): 89-92.
- [12] 周宾, 冯涛, 刘晓, 等. 铁皮石斛多糖对癫痫大鼠认知功能及海马神经元凋亡的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2021, 28(5): 370-375.
- [13] Li YL, Liu F, Zhang YY, et al. NMDAR1-Src-pannexin1 signal pathway in the trigeminal ganglion contributed to orofacial ectopic pain following inferior alveolar nerve transection [J]. Neuroscience, 2021(466): 77-86.
- [14] Chen K, Yang LN, Lai C, et al. Role of grina/nmdara1 in the central nervous system diseases [J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(9): 861-867.
- [15] 孙丽, 冯铁为, 李敬孝. 抗痫灵对癫痫大鼠脑电图及海马 NMDAR1 表达的影响[J]. 中医药信息, 2012, 29(4): 89-90.
- [16] Langeh U, Singh S. Targeting S100B protein as a surrogate biomarker and its role in various neurological disorders[J]. Curr Neuropharmacol, 2021, 19(2): 265-277.
- [17] Eriksson H, Löwhagen hendén P, Rentzos A, et al. Acute symptomatic seizures and epilepsy after mechanical thrombectomy[J]. Epilepsy Behav, 2019, 104: 31526644.
- [18] Rawat C, Kukal S, Dahiya UR, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: future therapeutic strategies for epilepsy management[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 197.
- [19] 云永利, 陈萍, 杨蕾, 等. S100B 抑制剂减少颞叶内侧癫痫模型鼠海马中的 COX-2、IL-1 $\beta$  的表达[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(6): 1056-1060, 1096.
- [20] Jin Baozhe, 金保哲, Li Wuxiong, 等. 丙戊酸在颅脑损伤大鼠伤灶局部抗炎作用与机制[C]. 2017.

(2023-03-05 收稿)

## (上接第 448 页)

- [4] Wang H, Zong Y, Han Y, et al. Compared of efficacy and safety of high-dose donepezil vs standard-dose donepezil among elderly patients with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Expert Opin Drug Saf, 2022, 21(3): 407-415.
- [5] Valis M, Dlabkova A, Hort J, et al. The measured CSF/plasma donepezil concentration ratio but not individually measured CSF and plasma concentrations significantly increase over 24 h after donepezil treatment in patients with Alzheimer's disease [J]. Biomed Pharmacother, 2023: 114223.
- [6] 雷哲, 吴寒, 欧颖晖, 等. SPECT/CT 脑血流灌注显像联合 NeuroGamTM 软件在主观认知下降、轻度认知障碍和阿尔兹海默病中的临床应用[J]. 核技术, 2022, 45(2): 32-38.
- [7] 任汝静, 殷鹏, 王志会, 等. 中国阿尔兹海默病报告 2021[J]. 诊断学理论与实践, 2021, 20(4): 317-337.
- [8] Ip EH, Pierce J, Chen SH, et al. Conversion between the modified mini-mental state examination (3MSE) and the mini-mental state examination (MMSE) [J]. Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring, 2021, 13(1): e12161.
- [9] Scheinost D, Teisseyre TZ, Distasio M, et al. New open-source ictal SPECT analysis method implemented in bioImage suite [J]. Epilepsia, 2010, 51(4): 703-707.
- [10] 罗媛, 肖川, 林伟杰. STAT3 通路调控阿尔兹海默症大脑脂质代谢及星形胶质细胞活化的机制研究[J]. 岭南急诊医学杂志, 2022, 27(3): 208-211, 218.
- [11] 王刘清, 窦非, 王友军. 神经元钙信号系统异常与阿尔兹海默病的“钙假说”[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(6): 689-698.
- [12] 尤一萍, 浦梦佳. 丁苯酞胶囊联合多奈哌齐对老年血管性痴呆患者细胞因子、MMP-9、Hcy 和 SOD 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(8): 1899-1902.
- [13] 李倩, 马文颖, 汤凡字, 等. 多奈哌齐血药浓度及其代谢酶 CYP3 A4 基因多态性在轻中度阿尔兹海默病治疗中的应用 [J]. 临床神经病学杂志, 2022, 35(5): 366-369.
- [14] Valotassiou V, Malamitsi J, Papatranta fyllou J, et al. SPECT and PET imaging in Alzheimer's disease [J]. Ann Nucl Med, 2018, 32(9): 583-593.
- [15] Kanetaka H, Hanyu H, Hirao K, et al. Prediction of response to donepezil in Alzheimer's disease: combined MRI analysis of the substantia innominata and SPECT measurement of cerebral perfusion [J]. Nucl Med Commun, 2008, 29(6): 568-573.
- [16] Tepmongkol S, Hemrungrojn S, Dupont P, et al. Early prediction of donepezil cognitive response in Alzheimer's disease by brain perfusion single photon emission tomography [J]. Brain Imaging Behav, 2019, 13(6): 1665-1673.
- [17] Giacobini E, Cuellar AC, Fisher A. Reimagining cholinergic therapy for Alzheimer's disease [J]. Brain, 2022, 145(7): 2250-2275.
- [18] 高启超, 李蔚然, 张升校, 等. 萝卜硫素对 AD 模型小鼠焦虑和恐惧记忆的影响及氧化应激机制 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2021, 30(5): 385-390.
- [19] Rong X, Jiang LW, Qu MJ, et al. Enhancing therapeutic efficacy of donepezil by combined therapy: a comprehensive review [J]. Curr Pharm Des, 2021, 27(3): 332-344.
- [20] 方堃, 张玉蓉, 王芳, 等. 尿 AD7c-NTP 联合尿甲醛、血清 S100B 在 AD 早期诊断中的价值及与认知水平的相关性 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(1): 113-116, 121.
- [21] 李桂英, 吴晓燕, 邸彬, 等. 18F-FDG SPECT-CT 脑代谢显像鉴别不同神经变性痴呆的临床应用价值研究 [J]. 中国医学装备, 2018, 15(12): 71-74.
- [22] 王艳艳, 李晓霞, 夏欢, 等. 基于 PET/CT 探索阿尔兹海默病患者脑葡萄糖代谢与认知功能的相关性 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(28): 152-155, 封 4.
- [23] 梁瑞景, 梁瑞凯. 中西医结合疗法对阿尔兹海默病认知功能和精神行为的影响 [J]. 川北医学院学报, 2021, 36(4): 454-458.

(2023-04-17 收稿)