

引用:梁政娆,娄勍,甘海宁,黄晓丹.痫得安丸联合丙戊酸钠通过TNF- α /NF- κ B信号通路对癫痫大鼠神经元损伤和炎症的影响[J].中医药导报,2025,31(9):24-31.

痫得安丸联合丙戊酸钠通过TNF- α /NF- κ B信号通路对癫痫大鼠神经元损伤和炎症的影响*

梁政娆¹,娄 勍¹,甘海宁²,黄晓丹³

(1.肇庆市中医院,广东 肇庆 526020;

2.广东省中医药工程技术研究院,广东 广州 510095;

3.广州中医药大学第五临床医学院,广东 广州 510095)

[摘要] 目的:探究痫得安丸联合丙戊酸钠通过肿瘤坏死因子- α (TNF- α)/核因子 κ B(NF- κ B)信号通路对癫痫模型大鼠神经元损伤和炎症的影响。方法:采用氯化锂-匹罗卡品联合注射复制癫痫大鼠模型,将造模成功的40只癫痫大鼠随机分为模型组(痫+丙联用组)、丙戊酸钠组[0.072 g/(kg·d)]、痫得安丸组[1.350 g/(kg·d)]、痫得安丸[1.350 g/(kg·d)]+丙戊酸钠[0.072 g/(kg·d)]联用组(痫+丙联用组),另取10只健康大鼠作为对照组。给药4周后,记录各组大鼠癫痫发作次数和持续时间,苏木精-伊红(HE)染色及尼氏染色观察海马组织病理学变化,检测血清及海马谷氨酸(Glu)、 γ 氨基丁酸(GABA)、TNF- α 和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平,RT-qPCR技术检测海马中TNF- α mRNA、肿瘤坏死因子受体1(TNFR1) mRNA、NF- κ B p65 mRNA、环氧合酶(COX-2)mRNA、基质金属蛋白酶-9(MMP-9) mRNA表达水平,蛋白质印迹法(Western blotting)检测海马组织TNF- α 、TNFR1、NF- κ B p65、磷酸化p65(p-p65)、COX-2、MMP-9蛋白表达水平。结果:模型组大鼠癫痫发作次数多于对照组($P<0.01$),癫痫持续时间长于对照组($P<0.01$);丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠癫痫发作次数少于模型组($P<0.01$),癫痫持续时间均长于模型组($P<0.01$);痫+丙联用组大鼠癫痫持续时间短于痫得安丸组($P<0.05$)。对照组大鼠海马CA1区锥体神经元排列紧密整齐、结构清晰、染色均匀,胞浆内尼氏小体丰富;模型组大鼠海马CA1区的锥体神经元排列紊乱、细胞萎缩、染色加深,尼氏小体数量明显减少;丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠海马CA1区锥体神经元排列更整齐,染色均匀,尼氏小体数量增多,形态接近对照组大鼠海马。模型组大鼠血清GABA含量低于对照组($P<0.01$),Glu含量、Glu/GABA比值、IL-1 β 水平、TNF- α 水平高于对照组($P<0.01$);丙戊酸钠组、痫得安丸组及痫+丙联用组大鼠血清Glu含量、Glu/GABA比值、IL-1 β 水平、TNF- α 水平低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。模型组大鼠大脑GABA含量低于对照组($P<0.05$),Glu含量、Glu/GABA比值、IL-1 β 水平、TNF- α 水平高于对照组($P<0.01$);丙戊酸钠组及痫得安丸组大鼠大脑Glu/GABA比值低于模型组($P<0.05$);痫+丙联用组大鼠大脑Glu含量、TNF- α 水平、Glu/GABA比值低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。模型组大鼠海马TNF- α mRNA、TNFR1 mRNA、NF- κ B p65 mRNA、COX-2 mRNA、MMP-9 mRNA相对表达量高于对照组($P<0.01$);丙戊酸钠组大鼠海马TNF- α mRNA、MMP-9 mRNA相对表达量低于模型组($P<0.05$);痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠海马TNFR1 mRNA、COX-2 mRNA、MMP-9 mRNA及NF- κ B p65 mRNA相对表达量低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。模型组大鼠海马TNF- α 、TNFR1、p-p65、COX-2、MMP-9蛋白相对表达量高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);丙戊酸钠组大鼠海马TNF- α 、TNFR1蛋白相对表达量低于模型组($P<0.05$);痫得安丸组大鼠海马TNF- α 、TNFR1、COX-2蛋白相对表达量低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);痫+丙联用组大鼠海马TNF- α 、TNFR1、p-p65、COX-2、MMP-9蛋白相对表达量低于模型组($P<0.01$)。结论:痫得安丸与丙戊酸钠合用可减少大鼠癫痫的发生,改善癫痫大鼠神经元损伤,降低炎症反应,其机制可能与抑制TNF- α /NF- κ B信号通路有关。

[关键词] 癫痫;痫得安丸;丙戊酸钠;神经元;炎症;肿瘤坏死因子 α ;核因子 κ B;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)09-0024-08

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.09.004

*基金项目:广东省中医药局科研基金重点项目(20223024);第五批全国中医临床优秀人才研修项目(国中医药人教函〔2022〕1号)

通信作者:娄勍,男,主任医师,研究方向为中医脑病

Effects of Xiande'an Pill (痫得安丸) Combined with Sodium Valproate on Neuronal Injury and Inflammation in Epileptic Rats through TNF- α /NF- κ B Signaling Pathway

LIANG Zhengrao¹, LOU Qing¹, GAN Hai'ning², HUANG Xiaodan³

(1.Zhaoqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhaoqing Guangdong 526020, China; 2.Guangdong Provincial Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510095, China; 3.Fifth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510095, China)

[Abstract] Objective: To explore the effects of Xiande'an pill combined with sodium valproate on neuronal injury and inflammation in epileptic rat models through the tumor necrosis factor- α (TNF- α)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. Methods: Epileptic rat models were established by combined injection of lithium chloride and pilocarpine. Totally 40 successfully modeled epileptic rats were randomly divided into model group, sodium valproate group [0.072 g/(kg·d)], Xiande'an pill group [1.350 g/(kg·d)], and Xiande'an pill [1.350 g/(kg·d)]+sodium valproate [0.072 g/(kg·d)] combination group (combination group). Another 10 healthy rats were used as the control group. After 4 weeks of administration, the frequency and duration of epileptic seizures in each group were recorded. Hematoxylin-eosin staining and Nissl staining were used to observe the pathological changes in the hippocampus. The levels of glutamic acid (Glu), γ aminobutyric acid (GABA), TNF- α and interleukin-1 β (IL-1 β) in serum and brain were detected. The expressions of TNF- α mRNA, tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) mRNA, NF- κ B p65 mRNA, cyclooxygenase 2 (COX-2) mRNA and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) mRNA in the hippocampus were detected by RT-qPCR and Western blotting was used to detect the expressions of TNF- α , TNFR1, NF- κ B p65, phosphorylated p65 (p-p65), COX-2 and MMP-9 protein. Results: The model group showed higher frequency of epileptic seizures than control group ($P<0.01$), and longer duration of epileptic seizures than control group ($P<0.01$). The sodium valproate group, Xiande'an pill group and combination group showed lower frequency of epileptic seizures than model group ($P<0.01$), and shorter duration of epileptic seizures than model group ($P<0.01$). The combination group rats showed shorter duration of epileptic seizures than Xiande'an pill group ($P<0.01$). The pyramidal neurons in the hippocampal CA1 region of the control group rats were arranged tightly and neatly, with clear structure and uniform staining, and abundant Nissl bodies in the cytoplasm. The pyramidal neurons in the hippocampal CA1 area were disordered in arrangement, and the cells atrophied in model group. The staining deepened in model group. The number of Nissl bodies was significantly reduced. The pyramidal neurons in the CA1 region of the hippocampus are arranged more neatly and stained uniformly in the sodium valproate group, Xiande'an pill group and combination group, with an increase in the number of Nissl bodies and a morphology similar to the control group. The model group showed lower serum GABA content than control group ($P<0.01$), while higher serum Glu, Glu/GABA, IL-1 β and TNF- α than control group ($P<0.01$). Sodium valproate group, Xiande'an pill group and combination group showed lower serum Glu, Glu/GABA, IL-1 β and TNF- α than model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The model group showed lower GABA content in brain than control group ($P<0.01$), while higher serum Glu, Glu/GABA, IL-1 β and TNF- α in brain than control group ($P<0.01$). Sodium valproate group and Xiande'an pill group showed lower brain Glu/GABA than model group ($P<0.05$). Combination group showed lower Glu, TNF- α and Glu/GABA in brain, than model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The model group showed higher relative expression levels of TNF- α mRNA, TNFR1 mRNA, NF- κ B p65 mRNA, COX-2 mRNA and MMP-9 mRNA than control group ($P<0.01$). Sodium valproate group showed lower relative expression levels of TNF- α mRNA and MMP-9 mRNA than model group ($P<0.05$). Xiande'an pill group and combination group showed lower TNFR1 mRNA, COX-2 mRNA, MMP-9 mRNA, TNF- α mRNA and NF- κ B p65 mRNA than model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The model group showed higher relative expression levels of TNF- α , TNFR1, p-p65, COX-2 and MMP-9 protein than control group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Sodium valproate group showed lower relative expression levels of TNF- α and TNFR1 protein than model group ($P<0.05$). Xiande'an pill group showed lower TNF- α , TNFR1 and COX-2 protein than model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Combination group showed lower TNF- α , TNFR1, p-p65, COX-2 and MMP-9 protein than model group ($P<0.01$). Conclusion: Xiande'an pill combined with sodium valproate can reduce the occurrence of epilepsy in rats, improve pathological injury, protect neurons and reduce inflammatory response of epileptic rats, the mechanism of which is related to inhibiting TNF- α /NF- κ B signaling pathway.

[Keywords] epilepsy; Xiande'an pill; sodium valproate; neurons; inflammation; TNF- α ; NF- κ B; rat

癫痫是一种由脑部神经元异常放电引发的慢性脑部疾病,以反复癫痫发作为表现,具有反复性和短暂性的特点。癫痫可继发于脑外伤、颅内感染、脑血管疾病、惊厥持续状态等多种脑损伤。癫痫连续发作之间意识未完全恢复又频繁再发,或发作持续30 min以上不自行停止为癫痫持续状态^[1]。长时间癫痫发作,可导致海马损伤、神经功能丧失、脑水肿和脑缺血,从而引起严重临床症状及高死亡率^[2]。各种癫痫发作均可发生持续状态,但临床以强直-阵挛持续状态最常见,全身性发作的癫痫持续状态常伴有不同程度的意识、运动功能障碍。

目前已有不少抗癫痫药物用于治疗癫痫,但仍存在较高的耐药性及毒副作用^[3]。痫得安丸^[4]是由广东省名中医梁剑波教授根据多年治疗癫痫经验研制而成,其主要成分包括天麻、法半夏、胆南星、蜈蚣、茯苓、麦冬等。痫得安丸具有豁痰开窍、镇火平肝、养心安神、息风定痫之功效,适用于治疗各类型癫痫。丙戊酸钠可促进抗癫痫药物从血脑屏障吸收进入大脑,上调 γ -氨基丁酸稳定细胞膜,降低癫痫发作次数,且丙戊酸钠口服吸收迅速,是临床治疗癫痫常用药物^[5]。丙戊酸钠单用疗效不佳,长期使用可能对智力产生影响,不良反应较多^[6]。痫得安丸与丙戊酸钠联合用药,治疗卒中后癫痫及其持续状态疗效显著,但其作用机制尚未阐明。脑损伤后释放的炎症介质肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)可通过降低神经元兴奋阈值、诱发异常放电直接促进癫痫发作;同时TNF- α 与肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)结合后可激活核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)信号通路,进一步上调促炎因子的表达,加剧神经炎症反应。TNF- α /NF- κ B的正反馈可持续放大炎症与神经元放电,导致癫痫发作的恶性循环。本课题基于TNF- α 、NF- κ B相关炎症通路,研究痫得安丸联合丙戊酸钠对癫痫的神经炎症的调控机制,以期为寻找痫得安丸联合丙戊酸钠治疗癫痫的作用靶点提供前期基础。

1 材 料

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠,雌雄各半,6~8周龄,体质量为180~200 g,购自广东省医学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2022-0002;实验动物质量合格证号:44007200121753。大鼠饲养于广东省中医药工程技术研究院SPF级动物实验室,标准饲养,自由饮水,室温保持20~24 ℃,相对湿度维持40%~60%,明暗比例1:1,环境设施使用许可证号:SYXK(粤)2020-0059,实验经广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院)实验动物伦理委员会批准,伦理审批号:049306。

1.2 药物与试剂 痫得安丸(肇庆市中医院,批号:21101401);丙戊酸钠(湖南省湘中制药有限公司,批号:1H230339);氯化锂(麦克林公司,批号:C14321940);硫酸阿托品注射液(河南润弘制药股份有限公司,批号:2211241);匹罗卡品(山东西亚化学股份有限公司,批号:20230308);地西洋注射液(上海旭东海普药业有限公司,批号:AH210304);TNF- α 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(批号:AD230728)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)ELISA检测试剂盒(批号:AD230723)、谷氨酸

(glutamate, Glu)ELISA检测试剂盒(批号:AD230727)和 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)ELISA检测试剂盒(批号:AD230722)均购自北京麦格泰克科技有限公司;磷酸酶抑制剂(沈阳万类生物科技有限公司,批号:17A014);TNF- α 、TNFR1、NF- κ B p65、环氧合酶(cyclooxygenase-2, COX-2)、基质金属蛋白酶-9(matrixmetalloproteinase-9, MMP-9)引物均由艾瑞科生物合成;TNF- α 抗体(批号:AF7014)、TNFR1抗体(批号:AF0282)、NF- κ B p65抗体(批号:BF8005)、磷酸化p65(phosphorylation p65, p-p65)抗体(批号:AF3390)、COX-2抗体(批号:AF7003)、MMP-9抗体(批号:AF5228)和 β -actin抗体(批号:AF7018)均购自美国Affinity公司。

1.3 主要仪器 Varioskan Flash型全波长多功能酶标仪(美国Thermo公司);5418型小型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);JJ3000型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);BSA2245型电子天平(德国Sartorius公司);BX51型显微镜(日本奥林巴斯公司);JXFSTPRP-C型冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司);Mini-protean Terad Cell型垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司)、PowerPac Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司);GenScript e Blot L1型快速湿转仪(南京金斯瑞生物科技股份有限公司);Tanon 5200 Multi型多功能成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方 法

2.1 剂量设置 丙戊酸钠临床用药剂量为0.800 g/(kg·d),按“体表面积比”换算大鼠给药剂量为0.072 g/(kg·d)。痫得安丸临床用药剂量为15.000 g/(kg·d),按“体表面积比”换算大鼠给药剂量为1.350 g/(kg·d)。

2.2 动物造模、分组及给药 60只SD大鼠适应性喂养1周后腹腔注射氯化锂(127 mg/kg),18~24 h后腹腔注射硫酸阿托品(1 mg/kg),30 min后腹腔注射匹罗卡品(30 mg/kg)致癫痫^[7]。参考Racine规定标准,IV~V级癫痫发作大鼠纳入实验。Racine分级标准^[7]如下。0级:无反应;I级:耳部及面部肌肉抽搐;II级:局部肌肉抽搐,以点头或甩尾巴为主要表现;III级:单侧肢体的阵发性抽搐;IV级:双侧肢体阵挛或全身强直阵挛发作,并且伴有身体直立;V级:抽搐,伴有身体持续站立、背曲强直、跌倒。癫痫持续1 h后腹腔注射地西洋(10 mg/kg)以降低死亡率。43只大鼠造模成功,造模成功率为71.67%(43/60),随机取40只造模成功大鼠进行后续实验。将40只造模成功大鼠随机分为模型组、丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫得安丸+丙戊酸钠联用组(痫+丙联用组),每组10只;另取10只大鼠腹腔注射等剂量生理盐水,设为对照组。对照组和模型组大鼠每日灌胃给予蒸馏水,其余各给药组每日灌胃给予对应药物,1次/d,连续4周,给药体积为10 mL/kg。末次给药前禁食不禁水24 h,异氟烷麻醉后腹主动脉取血,剥离海马体,每组随机取4只进行病理学观察。

2.3 观察指标

2.3.1 大鼠行为学观察 给药结束24 h后,于08:00:00—18:00:00记录大鼠癫痫发作次数和持续时间^[8]。

2.3.2 海马病理学观察 剪开颅顶皮肤后剪开颅顶骨,使大脑组织充分暴露,分离海马,各组选取4只大鼠海马置于4%多聚甲醛溶液固定,脱水石蜡包埋,切片后经苏木精-伊红(HE)

染色及尼氏(Nissl)染色观察细胞形态和尼氏小体。

2.3.3 血清和大脑神经递质及炎症因子 大鼠腹主动脉取血后,以4℃、4 000 r/min(离心半径为5 cm)离心10 min,取上清后按照ELISA试剂盒说明书操作要求检测血清GABA、Glu、IL-1 β 、TNF- α 含量,采用酶标仪测定并记录数据。

称取50 mg大脑样本,加入500 μ L PBS(pH 7.4),用超声冷冻研磨仪充分匀浆,4℃、4 000 r/min(离心半径为5 cm)离心10 min,取上清。按照ELISA试剂盒说明书操作要求检测GABA、Glu、IL-1 β 、TNF- α 含量。

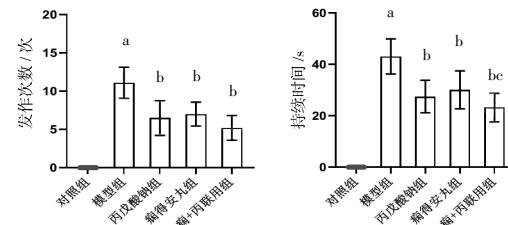
2.3.4 海马中TNF- α mRNA、TNFR1 mRNA、NF- κ B p65 mRNA、COX-2 mRNA、MMP-9 mRNA表达水平 采用RT-qPCR技术检测海马中TNF- α mRNA、TNFR1 mRNA、NF- κ B p65 mRNA、COX-2 mRNA、MMP-9 mRNA表达水平。利用Trigol总RNA提取试剂提取大鼠海马组织RNA,按照说明书静置沉淀后,将其反转录为cDNA,反转录体积为:5 \times PrimeScriptTM RT Master Mix 4 μ L,总RNA和dd H₂O混合物16 μ L;反应条件为:37℃反应15 min,85℃反应5 s,降温至4℃。在实时定量PCR仪中进行定量扩增,扩增体系为:TB Green Premix Taq II 12.5 μ L,ROX 0.5 μ L,引物混合物和ddH₂O 11 μ L,cDNA产物1 μ L,总体积为25 μ L。扩增反应条件为:94℃,5 min;94℃,30 s,58℃,30 s,72℃,50 s,45个循环。内参为 β -actin,运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。引物序列见表1。

2.3.5 海马中TNF- α 、TNFR1、p-p65、COX-2、MMP-9蛋白表达水平 采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测海马中TNF- α 、TNFR1、p-p65、COX-2、MMP-9蛋白表达水平。称取50 mg海马,加入1 mL RIPA(含1% PMSF及1%磷酸酶抑制剂)进行超声冷冻匀浆,4℃,12 000 r/min(离心半径为5 cm)离心10 min,取上清液,按BCA蛋白定量检测试剂盒说明书进行蛋白定量,测定各样品OD值,计算各样品蛋白浓度。加入适量RIPA及5 \times Loading Buffer,混匀加热(100℃,5 min),在SDS-PAGE凝胶按次序加入样本(15 μ L),200 V电泳40 min。裁剪PVDF膜,甲醇活化2 min,切出凝胶,按海绵垫-PVDF膜-凝胶-海绵垫放入夹子进行转膜。PVDF膜加入洗涤液,放置摇床洗涤3次后,加入快速封闭液孵育10 min后弃快封,加入一抗(稀释比例1:2 000)4℃过夜,次日回收一抗,洗涤3次后加入二抗(稀释比例1:3 000)孵育120 min,回收二抗后洗涤3次。PVDF膜浸泡ECL发光显影液,于凝胶自动成像系统进行拍摄后,Image J软件对蛋白条带进行灰度值分析,以 β -actin作为内参蛋白计算目的蛋白相对表达量(相对表达量=目的蛋白光密度值/ β -actin光密度值)。此外,p-p65以p65总蛋白作为内参计算蛋白相对表达量。

2.4 统计学方法 采用SPSS 27.0软件分析数据,使用GraphPad Prism 8.0作图。计量资料符合正态分布,以“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$),采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差齐时两两比较用SNK法,方差不齐时两两比较用Dunnett's T3法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 癫痫状态 造模后43只大鼠出现肌阵挛、抽搐,身体站立甚至跌倒,符合IV~V级癫痫发作。注射地西泮后1 h,癫痫持续状态渐止,在经过24 h的急性期后,进入10~15 d的潜伏期;15 d后进入慢性期。给药4周后,模型组大鼠癫痫发作次数及持续时间多于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠癫痫发作次数及持续时间少于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。痫+丙联用组大鼠癫痫持续时间短于痫得安丸组,差异有统计学意义($P<0.05$)。(见图1)



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与痫得安丸组比较,^{bc} $P<0.05$ 。

图1 各组大鼠癫痫发作次数和持续时间比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

3.2 病理学观察 HE染色显示,对照组大鼠海马CA1区锥体神经元排列紧密整齐、结构清晰、染色均匀;模型组大鼠海马CA1区锥体神经元排列紊乱、细胞萎缩、染色加深;与模型组比较,丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠海马CA1区锥体神经元排列更整齐,染色均匀,形态接近对照组大鼠海马。(见图2)

Nissl染色显示,对照组大鼠海马CA1区锥体神经元排列整齐,胞浆内尼氏小体丰富;模型组锥体神经元萎缩,尼氏小体数量明显减少;与模型组比较,丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组锥体神经元尼氏小体数量增多。(见图3)

3.3 各组大鼠血清神经递质及炎症因子比较 模型组大鼠血清GABA含量低于对照组,Glu含量、Glu/GABA比值、IL-1 β 水平、TNF- α 水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠血清GABA含量与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠血清Glu含量、Glu/GABA比值、IL-1 β 水平、TNF- α 水平均低于模型组,差异均有统计学意义

表1 引物序列

目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增产物长度/bp
TNF- α	TCAGTTCCATGGCCCCAGAC	GTTGTCTTGAGATCCATGCCATT	164
TNFR1	GCTACCTGAGTGAGACGCATT	CACGGTGTCTGTTCTCCTTAC	95
NF- κ B p65	CGACGTATTGCTGTGCCCTC	TTGAGATCTGCCAGGTGGTA	139
COX-2	TGAACACGGACTTGCTCACTTTG	AGGCCTTGCCACTGCTTGTA	107
MMP-9	AGCCGGGAACGTATCTGGA	TGGAAACTCACACGCCAGAAG	173
β -actin	ACGGTCAGGTCACTATCG	GGCATAGAGGTCTTACGGATG	150

($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见图4)

3.4 各组大鼠大脑神经递质及炎症因子比较 模型组大鼠大脑GABA含量低于对照组,Glu含量、Glu/CABA比值、IL-1 β 水平、TNF- α 水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);丙戊酸钠组、痫得安丸组及痫+丙联用组大鼠大脑GABA含量、IL-1 β 水平与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);丙戊酸钠组及痫得安丸组大鼠大脑Glu/CABA比值低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);痫+丙联用组大鼠大脑Glu含量、TNF- α 水平、Glu/CABA比值低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.5 各组大鼠海马TNF- α mRNA、TNFR1 mRNA、NF- κ B p65 mRNA、COX-2 mRNA、MMP-9 mRNA相对表达量比较 模型组大鼠海马TNF- α mRNA、TNFR1 mRNA、NF- κ B p65 mRNA、COX-2 mRNA、MMP-9 mRNA相对表达量高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);丙戊酸钠组大鼠海马TNF- α mRNA、MMP-9 mRNA相对表达量低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠海马TNFR1 mRNA、COX-2 mRNA、MMP-9 mRNA、TNF- α mRNA、NF- κ B p65 mRNA相对表达量低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见图6)

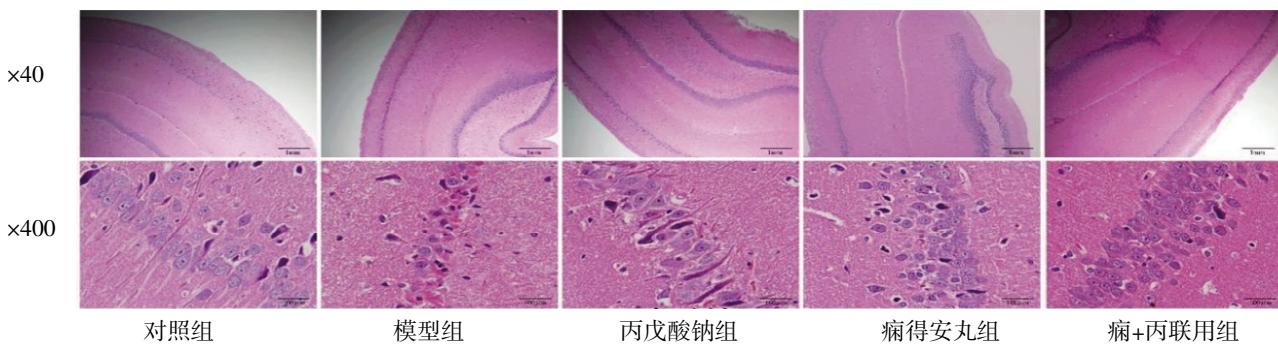


图2 大鼠脑组织海马区HE染色

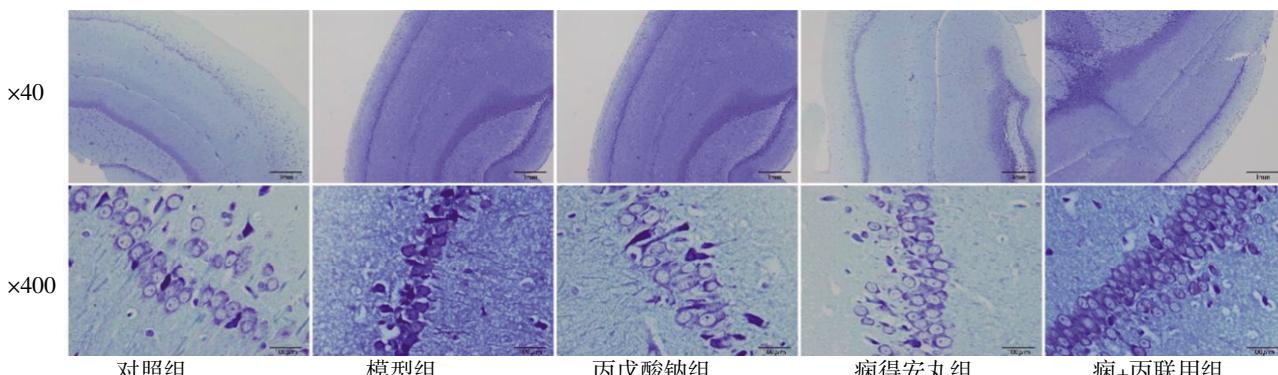
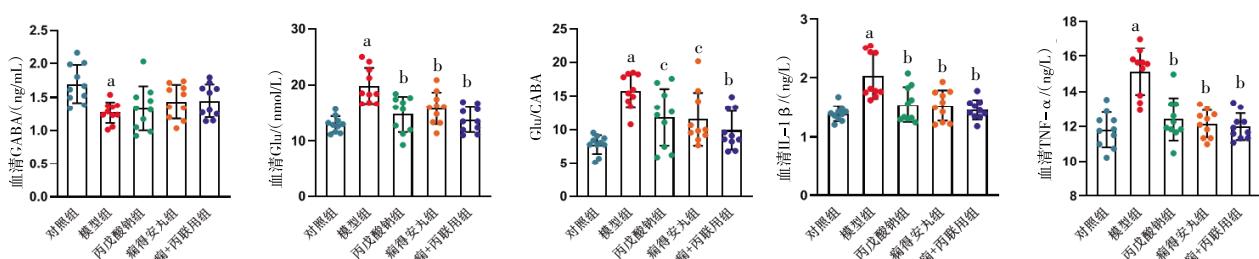
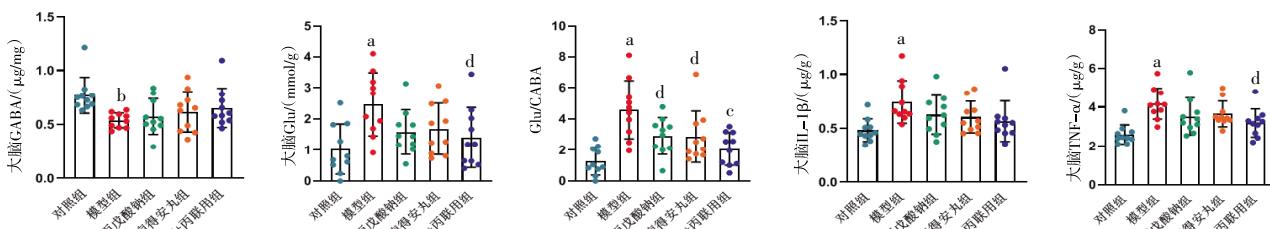


图3 大鼠脑组织海马区Nissl染色



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$ 。

图4 各组大鼠血清神经递质及炎症因子比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)



注:与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.01$,^d $P<0.05$ 。

图5 各组大鼠大脑神经递质及炎症因子比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

3.6 各组大鼠海马TNF- α 、TNFR1、p-p65、COX-2、MMP-9蛋白相对表达量比较 模型组大鼠海马TNF- α 、TNFR1、p-p65、COX-2、MMP-9蛋白相对表达量高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);丙戊酸钠组大鼠海马TNF- α 、TNFR1蛋白相对表达量低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);痫得安丸组大鼠海马TNF- α 、TNFR1、COX-2蛋白相对表达量低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);痫+丙联用组大鼠海马TNF- α 、TNFR1、p-p65、COX-2、MMP-9蛋白相对表达量均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$)。(见图7-8)

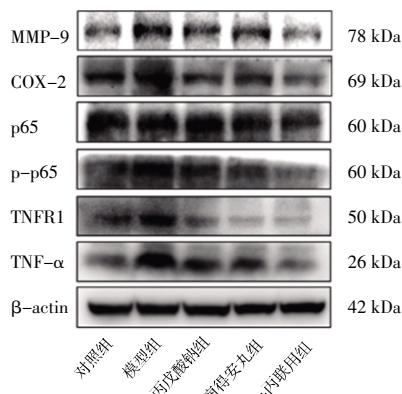


图8 大鼠海马TNF- α 、TNFR1、p-p65、COX-2、MMP-9蛋白表达Western blotting图

4 讨论

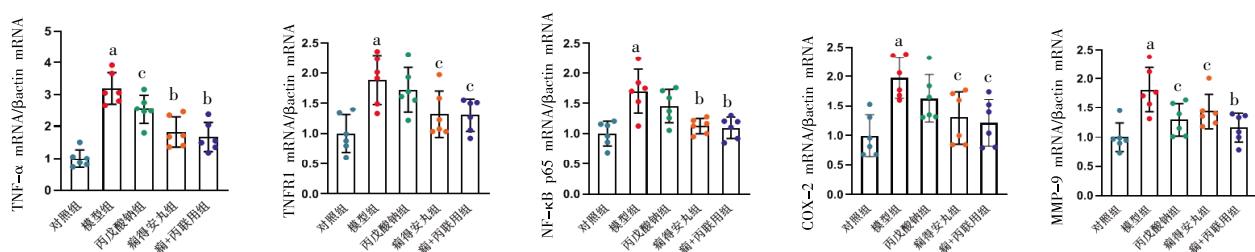
氯化锂-匹罗卡品联合注射是复制癫痫动物模型的常用方法,可在短时间内引起脑组织缺血,导致炎症反应和神经功能障碍^[9]。本实验中大鼠注射氯化锂-匹罗卡品后癫痫发作成功率为71.67%,造模成功大鼠进行下一步研究。给药4周后,丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠癫痫发作次数及持续时间均低于模型组($P<0.01$),痫+丙联用组大鼠癫痫持续时间低于痫得安丸组($P<0.05$)。说明痫得安丸和丙戊酸钠联用能更好地控制大鼠癫痫发作的程度。

神经元是海马体的基本组成单位。神经元接受刺激产生

神经冲动,并把神经冲动传导到其他海马神经元。当海马神经元发生变性坏死或丢失时,神经元信号中断,使海马神经元网络失衡从而引发癫痫^[10]。本研究结果表明,与对照组大鼠比较,模型组海马CA1区锥体神经元排列紊乱、细胞萎缩,尼氏小体数量明显减少;与模型组大鼠比较,丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组海马CA1区锥体神经元排列更整齐,细胞形态接近对照组,尼氏小体数量增加。

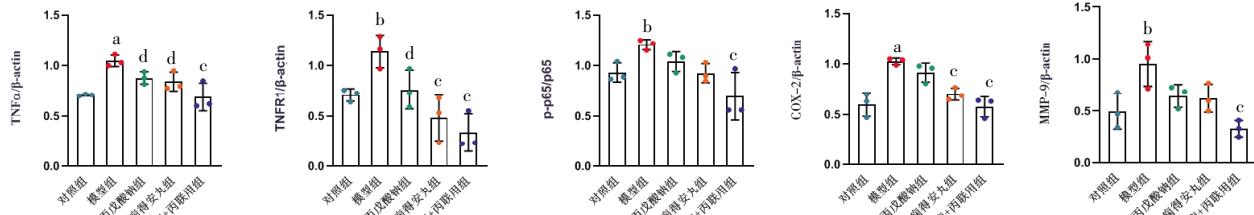
神经递质的改变是癫痫发作的一个重要因素,参与了癫痫发生的全部过程^[11]。海马主要通过各类神经递质来传导信号和进行神经元之间的联系^[12],其中最为主要的是氨基酸类兴奋类神经递质Glu以及氨基酸类抑制性神经递质GABA。癫痫患者常伴随着Glu水平升高和GABA水平降低等神经递质失衡的情况^[13]。本研究结果表明,丙戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠血清Glu含量、Glu/GABA比值低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);丙戊酸钠组及痫得安丸组大鼠大脑Glu/GABA比值低于模型组($P<0.05$);痫+丙联用组大鼠大脑Glu含量、Glu/GABA比值低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

炎症介质是癫痫发生的重要病理生理学基础,血液及脑组织中细胞因子浓度的增加与癫痫的发生密切相关^[14-16]。癫痫的反复发作可导致脑内炎症反应,造成癫痫发作后脑组织病理改变,特别是海马组织的结构损伤^[17-18]。脑部损伤可激活细胞因子和炎症介质的释放,进一步增加神经元异常放电的风险,从而导致癫痫发作,而癫痫的反复发作又可导致脑内炎症反应。两者相互影响形成癫痫发作的恶性循环^[19]。TNF- α 属于多效应促炎细胞因子,IL-1 β 高表达是促炎反应发生的关键。癫痫大鼠海马组织TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高^[20]。TNF- α 参与了癫痫的致病过程^[21-22],能抑制谷氨酸脱羧酶合成,减少GABA的生成,相对增加脑内Glu含量,引起神经元过度兴奋,从而诱导癫痫发作;TNF- α 还可破坏血脑屏障,使炎性因子进入脑组织,致使癫痫阈值下调^[8-23]。IL-1 β 具有致痫性^[24-26]。IL-1 β 在癫痫患者和动物的海马中表达水平升高,被认为是与癫痫发作密切相关的炎症介质^[27]。本研究结果表明,丙



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$ 。

图6 各组大鼠海马TNF- α mRNA、TNFR1 mRNA、NF- κ B p65 mRNA、COX-2 mRNA、MMP-9 mRNA相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)



注:与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.01$,^d $P<0.05$ 。

图7 各组大鼠海马TNF- α 、TNFR1、p-p65、COX-2、MMP-9蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

戊酸钠组、痫得安丸组、痫+丙联用组大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 水平均低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；痫+丙联用组大鼠大脑TNF- α 水平低于模型组($P<0.05$)。

TNF- α /NF- κ B通路是目前研究较多的典型炎症信号通路。TNF- α 是一种活跃的促炎细胞因子，通常在机体受到刺激时产生。TNF- α 在炎症及细胞周期的调节中具有重要的作用^[28]。NF- κ B的激活通常需要TNFR1发挥其生物学效应。TNFR1可募集肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域蛋白、受体相互作用蛋白和NF- κ B激酶抑制剂，从而激活NF- κ B^[29]。NF- κ B是炎症的主要调节因子，参与癫痫的神经炎症调节^[30-32]。在癫痫发病过程中，NF- κ B在神经元兴奋和胶质细胞活化过程中被激活。NF- κ B可增加炎症因子的表达，启动或抑制TNF、白细胞介素、COX-2等相关基因的转录^[33-35]。COX-2与癫痫发病密切相关，而在癫痫大鼠脑内，NF- κ B对其下游靶基因COX-2具有调控作用。COX-2的高表达是由NF- κ B的正性调节完成的^[36]。研究^[37]发现，颤叶癫痫小鼠海马区COX-2蛋白表达异常增加。COX-2具有促病性。脑内COX-2的激活可促进癫痫活动诱导的神经元死亡，缩短癫痫动物发作行为到恢复的时间，促进癫痫的反复发作。NF- κ B可直接靶向MMP-9基因启动子区域并促进MMP-9基因表达^[38]，MMP-9可使神经元树突结构改变和促进炎症发生。癫痫发生时，神经元去极化，MMP-9转录增加，从而上调IL-1 β 和趋化因子等炎症因子表达。本研究结果表明，丙戊酸钠组大鼠海马TNF- α mRNA、MMP-9 mRNA相对表达量以及TNF- α 、TNFR1蛋白相对表达量低于模型组($P<0.05$)；痫得安丸组大鼠海马TNFR1 mRNA、COX-2 mRNA、MMP-9 mRNA、TNF- α mRNA、NF- κ B p65 mRNA相对表达量以及TNF- α 、TNFR1、COX-2蛋白相对表达量低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；痫+丙联用组大鼠海马TNFR1 mRNA、COX-2 mRNA、MMP-9 mRNA、TNF- α mRNA、NF- κ B p65 mRNA相对表达量以及TNF- α 、TNFR1、p-p65、COX-2、MMP-9蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

本研究结果显示，癫痫模型大鼠癫痫发作次数增加，平均持续时间延长，神经元排列稀疏紊乱、体积缩小，血清及大脑神经递质紊乱，炎症因子水平升高，海马IL-1 β 、TNF- α 表达增加，NF- κ B通路被激活，下游靶基因COX-2及MMP-9转录增加，神经元损伤及炎症加重。给药后，痫+丙联用组大鼠海马组织神经元损伤减轻，癫痫发作次数、平均持续时间减少或缩短，血清及大脑神经递质、炎症因子水平有所恢复，海马IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、MMP-9表达下降。痫+丙联用组上述指标改善幅度大于丙戊酸钠组、痫得安丸组。痫得安丸合用丙戊酸钠可降低癫痫模型大鼠癫痫发作次数及强度，减轻海马组织神经元损伤及炎症反应。痫得安丸合用丙戊酸钠可能在癫痫发生过程中通过抑制TNF- α /NF- κ B信号通路，发挥保护海马组织神经元损伤及炎症反应的作用。

综上所述，痫得安丸与丙戊酸钠合用可通过抑制TNF- α /NF- κ B信号通路，降低相关基因和蛋白表达量，减轻神经组织炎症损伤，缓解癫痫发作。痫得安丸与丙戊酸钠合用效果优于痫得安丸、丙戊酸钠单用。

参考文献

- [1] 廖正俭.黄芩苷对小鼠癫痫持续状态后海马神经细胞的保护作用及其机制研究[D].福州:福建医科大学,2014.
- [2] FAWCETT J, DAVIS S, MANFORD M. Further advances in epilepsy[J]. J Neurol, 2023, 270(11):5655-5670.
- [3] FEYISSAA M, HASANT F, MESCHIAJ F. Stroke-related epilepsy[J]. Eur J Neurol, 2019, 26(1):18.
- [4] 姚伟生,孙华芳,梁锡祺.痫得安丸质量标准的研究[J].湖北中医药学院学报,2003,5(1):37-39.
- [5] 刘梅.醒脑静联合拉莫三嗪、丙戊酸钠治疗老年脑卒中继发性癫痫患者的疗效观察[J].辽宁中医杂志,2023,13(13):35-38,55.
- [6] 王萍,任榕娜.抗癫痫药物的毒副作用[J].国际内科学杂志,2007,34(2):91-94.
- [7] 齐凤芹,李秀敏,韩洁,等.甘草酸苷对癫痫持续状态大鼠模型炎性因子释放的调节作用[J].中国医药科学,2023,13(13):35-38,55.
- [8] 陈喜萍,黄金珠,李永格.盐酸羟考酮对癫痫大鼠炎症和神经元凋亡的影响及机制研究[J].中华老年心脑血管病杂志,2023,25(10):1093-1097.
- [9] AMANLOU A, ESLAMI F, SHAYAN M, et al. Anti-convulsive evaluation and histopathological survey of thalidomide synthetic analogs on lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats[J]. Res Pharm Sci, 2021, 16(6):586-595.
- [10] 张珂峰,严贵忠,侯博儒,等.海马结构在创伤性脑损伤后癫痫中的作用[J].中国神经精神疾病杂志,2023,49(8):498-502.
- [11] 王一晰,黄柏玮.癫痫相关诱发机制及治疗方法的研究进展[J].中国实用神经疾病杂志,2024,27(9):1168-1172.
- [12] NIKBAKHT F, HASHEMI P, VAZIFEKHAH S, et al. Investigating the mechanism of antiepileptogenic effect of apigenin in kainate temporal lobe epilepsy: Possible role of mTOR[J]. Exp Brain Res, 2023, 241(3):753-763.
- [13] GULYAEVAN V. Stress-associated molecular and cellular hippocampal mechanisms common for epilepsy and comorbid depressive disorders[J]. Biochemistry (Mosc), 2021, 86(6):641-656.
- [14] RANA A, MUSTOA E. The role of inflammation in the development of epilepsy[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1):144.
- [15] VEZZANI A, BALOSSO S, RAVIZZA T. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy[J]. Nat Rev Neurol, 2019, 15(8):459-472.
- [16] SOLTANI KHABOUSHAN A, YAZDANPANAH N, REZAEI N. Neuroinflammation and proinflammatory cytokines in epileptogenesis [J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(3):1724-1743.
- [17] 王涛,罗强,张世荣,等.骨髓间充质干细胞移植对大鼠癫

癫痫海马神经炎症的抑制作用研究[J].中华细胞与干细胞杂志(电子版),2016,6(6):339-344.

[18] 刘运权,李若照,郭磊磊,等.平肝止痫复方联合卡马西平通过HMGB1/TLR4/NF-κB通路对难治性癫痫大鼠神经元损伤的影响[J].中国免疫学杂志,2021,37(19):2345-2350.

[19] 毕翻,姜俊杰,潘恒恒,等.癫痫相关炎症介质的研究进展[J].癫痫与神经电生理学杂志,2023,32(2):117-120.

[20] 吴琼莹,高文勇,艾艳萍,等.槲皮素通过HMGB1/RAGE/NF-κB通路减轻癫痫大鼠神经炎症的实验研究[J].中国免疫学杂志,2024,40(8):1601-1606.

[21] ZAHEDIPOUR F, HOSSEINIS A, HENNEY C, et al. Phytochemicals as inhibitors of tumor necrosis factor alpha and neuroinflammatory responses in neurodegenerative diseases[J]. Neural Regen Res, 2022, 17(8):1675-1684.

[22] 聂荔,李巷,谈庆华,等.血清基质金属蛋白酶-9、肿瘤坏死因子- α 、 γ 干扰素水平与癫痫患儿脑电图的相关性分析[J].中国医学前沿杂志(电子版),2020,12(3):90-94.

[23] SADEGHIM A, HEMMATI S, MOHAMMADI S, et al. Chronically altered NMDAR signaling in epilepsy mediates comorbid depression[J]. Acta Neuropathol Commun, 2021, 9(1):53.

[24] 李大立,王献忠,杨海涛,等.丙戊酸联合拉莫三嗪治疗不同类型癫痫患者的疗效及对细胞因子的影响[J].癫痫与神经电生理学杂志,2021,30(2):102-105.

[25] 张菲菲,程艳伟,石向群.大鼠癫痫持续状态后海马TNF- α 、IL-1 β 的动态变化[J].中国神经精神疾病杂志,2017,43(6):362-367.

[26] XIAO Z H, PENG J, WU L W, et al. The effect of IL-1 β on synaptophysin expression and electrophysiology of hippocampal neurons through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy[J]. Neurol Res, 2017, 39(7):640-648.

[27] 叶霖,黄虹蜜,吴莹,等.抗NMDA受体脑炎相关癫痫小鼠脑组织小胶质细胞及IL-1 β 、TNF- α 表达的变化[J].癫痫与神经电生理学杂志,2022,31(3):129-134.

[28] BAUD V, KARIN M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives[J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(9):372-377.

[29] 韵成才,雍文兴.TNF- α /NF-κB信号通路在慢性阻塞性肺疾病中的作用及中医药调控研究进展[J].临床医学研究与实践,2024,9(7):7-10.

[30] KAN M C, SONG L H, ZHANG X Q, et al. Circulating high mobility group box-1 and toll-like receptor 4 expressions increase the risk and severity of epilepsy[J]. Braz J Med Biol Res, 2019, 52(7):e7374.

[31] ZHANG S T, HU L, JIANG J L, et al. HMGB1/RAGE axis mediates stress-induced RVLM neuroinflammation in mice via impairing mitophagy flux in microglia[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1):15.

[32] 杜双霞,张晓红,赵合意,等.miRNA-146a-5p对癫痫大鼠海马神经元NF-κB信号转导通路的影响[J].临床和实验医学杂志,2019,18(4):341-346.

[33] CAI M T, LIN W H. The function of NF- κ B during epilepsy, a potential therapeutic target[J]. Front Neurosci, 2022, 16:851394.

[34] SINGH S, SINGH T G. Role of nuclear factor kappa B (NF-κB) signalling in neurodegenerative diseases: An mechanistic approach[J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(10):918-935.

[35] LAWRENCE T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6):a001651.

[36] 赵永顺.NF-κB“圈套”对癫痫大鼠脑内COX-2调控作用的研究[D].大连:大连医科大学,2008.

[37] 朱坤,胡明,杨蓬勃,等.阿司匹林通过促进海马功能性神经再生改善颞叶癫痫慢性期小鼠的空间记忆能力[J].西安交通大学学报(医学版),2016,37(5):622-626.

[38] 苏晨,毛永尽,杨慧琳,等.牛MMP9启动子与转录因子NF-κB作用的研究[J].中国乳品工业,2021,49(12):4-7.

(收稿日期:2025-02-26 编辑:蒋凯彪)

(上接第16页)ARE通路探讨CDDO-Im对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用[J].中国免疫学杂志,2023,39(12):2513-2516,2522.

[34] 陈淑颖,陈丽敏,李晓晓,等.Nrf2/HO-1信号通路在卒中后认知障碍中的作用及中药干预的研究进展[J].中国医院药学杂志,2023,43(11):1281-1287.

[35] AHMED S M U, LUO L, NAMANI A, et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863 (2): 585-597.

[36] WANG Y J, HUANG Y, XU Y Z, et al. A dual AMPK/Nrf2 activator reduces brain inflammation after stroke by enhancing microglia M2 polarization[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 28(2):141-163.

[37] LANDIS R C, QUIMBY K R, GREENIDGE A R. M1/M2 macrophages in diabetic nephropathy: Nrf2/HO-1 as therapeutic targets[J]. Curr Pharm Des, 2018, 24(20):2241-2249.

(收稿日期:2025-02-27 编辑:蒋凯彪)