

柴胡加龙骨牡蛎汤对难治性癫痫大鼠神经元损伤的影响及机制[△]

单萍^{1*}, 张继龙^{2#}(1. 武汉市第一医院神经内科, 武汉 430022; 2. 武汉市第一医院急诊科, 武汉 430022)

中图分类号 R285.5; R742.1

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2025)06-0692-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.06.09



摘要 **目的** 探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对难治性癫痫大鼠海马神经元损伤的影响及潜在作用机制。**方法** 采用侧脑室注射海人藻酸建立难治性癫痫大鼠模型, 将难治性癫痫大鼠随机分为模型组、塞来昔布组(阳性对照)、柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组、柴胡加龙骨牡蛎汤+环氧合酶-2(COX-2)过表达组, 每组12只; 另取12只大鼠为假手术组(侧脑室注射生理盐水)。各组给予相应的药物/生理盐水8周后, 采用Racine分级标准评估大鼠癫痫发作行为学, 观察海马组织CA3区病理学变化和细胞凋亡情况; 采用酶联免疫吸附测定法检测海马组织COX-2、前列腺素E2(PGE2)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平; 采用比色法检测海马组织丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性; 分别采用实时荧光定量聚合酶链反应和Western blot法检测海马组织COX-2、P糖蛋白(P-gp)mRNA和蛋白的表达。**结果** 假手术组大鼠无癫痫发作; 与假手术组比较, 模型组大鼠癫痫Racine分级, 海马组织细胞凋亡率, COX-2、PGE2、TNF- α 水平和MDA含量以及COX-2、P-gp的mRNA和蛋白相对表达水平均显著升高, SOD活性显著降低($P < 0.05$), 海马CA3区神经元出现明显损伤; 与模型组比较, 塞来昔布组、柴胡加龙骨牡蛎汤组大鼠癫痫Racine分级, 海马组织细胞凋亡率, COX-2、PGE2、TNF- α 水平和MDA含量以及COX-2、P-gp的mRNA和蛋白相对表达水平均显著降低, SOD活性均显著升高($P < 0.05$), 海马CA3区神经元损伤减轻; 与柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组比较, 柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组大鼠上述指标的改善被显著逆转($P < 0.05$), 海马组织CA3区神经元损伤加重。**结论** 柴胡加龙骨牡蛎汤可能通过抑制COX-2/PGE2信号通路的激活, 抑制炎症和氧化应激, 从而减轻难治性癫痫大鼠海马神经元损伤。

关键词 难治性癫痫; 柴胡加龙骨牡蛎汤; 神经元损伤; 环氧合酶-2/前列腺素E2信号通路

Effects of Chaihu longgu muli decoction on neuronal damage in refractory epilepsy rats and its mechanism

SHAN Ping¹, ZHANG Jilong²(1. Dept. of Neurology, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China; 2. Emergency Department, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effect and potential mechanism of Chaihu longgu muli decoction on hippocampal neuronal damage in refractory epilepsy rats. **METHODS** The refractory epilepsy rat model was established by intracerebroventricular injection of kainic acid. The refractory epilepsy rats were randomly assigned into model group, celecoxib group (positive control), Chaihu longgu muli decoction group, Chaihu longgu muli decoction+empty loading group, Chaihu longgu muli decoction+cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression group, with 12 rats in each group. Another 12 rats were selected as sham operation group (injected with normal saline into the lateral ventricle). After 8 weeks of corresponding drug/normal saline intervention, Racine grading criteria were applied to evaluate the seizure behavior of rats; pathological changes and cell apoptosis in CA3 region of hippocampal tissue were observed; ELISA method was adopted to detect the levels of COX-2, prostaglandin E2 (PGE2), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in hippocampal tissue. The colorimetric method was applied to detect the content of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in hippocampal tissue. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were applied to detect the mRNA and protein expressions of COX-2 and P-glycoprotein (P-gp) in hippocampal tissue. **RESULTS** The rats in the sham operation group had no epileptic seizures. Compared with sham operation group, Racine grade of epilepsy, apoptotic rate of hippocampal tissue cells, COX-2, PGE2 and TNF- α levels, MDA contents, mRNA and protein levels of COX-2 and P-gp in the model group increased significantly, while SOD activity decreased significantly ($P < 0.05$); prominent damage was observed in the hippocampal CA3 region. Compared with model group, Racine grade of epilepsy, apoptotic rate of hippocampal tissue cells, COX-2, PGE2 and TNF- α levels, MDA contents, mRNA and protein levels of COX-2 and P-gp in celecoxib group and Chaihu longgu muli decoction group decreased significantly, while SOD activity increased significantly ($P < 0.05$); the neuronal damage in hippocampal CA3 region was alleviated. Compared with Chaihu longgu muli decoction group and Chaihu longgu muli decoction+ empty loading group, the improvement in the aforementioned indicators

[△] 基金项目 湖北省自然科学基金资助项目(No.2024AFB1070)

* 第一作者 主任医师, 博士。研究方向: 耐药性癫痫的机制。E-mail: danping1978d@163.com

通信作者 主任医师, 硕士。研究方向: 耐药性癫痫的机制。E-mail: tdgse03@163.com

in rats from Chaihu longgu muli decoction+COX-2 overexpression group was significantly reversed ($P < 0.05$), with exacerbated neuronal damage in the CA3 region of the hippocampal tissue. **CONCLUSIONS** Chaihu longgu muli decoction may alleviate hippocampal neuronal damage in

refractory epilepsy rats by inhibiting the activation of COX-2/PGE2 signaling pathway, inhibiting inflammation and oxidative stress, thereby alleviating hippocampal neuronal damage in refractory epilepsy rats.

KEYWORDS refractory epilepsy; Chaihu longgu muli decoction; neuronal damage; COX-2/PGE2 signaling pathway

癫痫是一种常见的神经系统疾病,是多种原因导致的脑部神经元阵发性异常放电。癫痫患者大多数可通过常规药物治疗得到有效控制,但仍有近1/3的癫痫患者对抗癫痫药物不敏感,发展成为难治性癫痫,使治疗难度增加^[1]。神经炎症是癫痫发作后脑组织病理改变的主要原因^[2]。研究表明,癫痫的脑内炎症反应与环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达增加及前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)水平升高密切相关。COX-2作为前列腺素(prostaglandin, PG)合成的限速酶,可在癫痫发作时被激活,进而诱发氧化应激反应,并将花生四烯酸转化为PG等有害物质,从而进一步加剧脑内炎症反应和神经元损伤。多项研究显示,COX-2已成为治疗癫痫的潜在药物靶点之一^[3-4]。

柴胡加龙骨牡蛎汤出自《伤寒论》。现代药理学研究显示,柴胡加龙骨牡蛎汤可抑制戊四氮诱导的癫痫小鼠海马星形胶质细胞内COX-2/PGE2炎症反应通路,从而发挥抗癫痫作用^[5]。然而,该方对难治性癫痫海马神经元损伤的影响尚不清楚。为此,本研究采用海人藻酸诱导难治性癫痫大鼠模型,探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对模型大鼠神经元损伤的影响,并基于COX-2/PGE2信号通路分析其潜在的作用机制,以期柴胡加龙骨牡蛎汤治疗难治性癫痫提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

68001型动物脑立体定位仪购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司;BX61型电动显微镜购自日本Olympus公司;Multiskan™ FC型酶标仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司;LightCycler® 480 II型实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)仪购自瑞士Roche公司。

1.2 主要药品与试剂

柴胡加龙骨牡蛎汤(柴胡12 g、龙骨4.5 g、黄芩4.5 g、生姜4.5 g、铅丹4.5 g、人参4.5 g、桂枝4.5 g、茯苓4.5 g、牡蛎4.5 g、半夏6 g、大黄6 g、大枣6枚)由本院中药制剂中心以水煮醇提法制备,质量浓度为1 g/mL(以生药量计)。COX-2抑制剂塞来昔布对照品(纯度99.09%,批号HY-14398)购自美国MCE公司;COX-2过表达慢病毒载体pcDNA3.1-COX-2(正向序列为5'-GGGGTACCGC-CACCATGCTCTTCCGAGCTGTG-3',反向序列为5'-CCGCTCGAGTTACAGCTCAGTTGAACGCC-3')及其对照慢病毒空载体pcDNA3.1-NC(序列为5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3')均由上海吉凯基因医学科技股份有限公司设计、合成;引物序列由宝生物工程(大连)有限公司设计、合成;海人藻酸对照品(纯度≥99%,

批号K0250)购自美国Sigma-Aldrich公司;大鼠COX-2、PGE2、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(货号分别为ml058808、ml003036、ml002859)均购自上海酶联生物科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、TUNEL细胞凋亡试剂盒(货号分别为G1120、T2196)均购自北京索莱宝科技有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(货号分别为A001-3-2、A003-1-2)均购自南京建成生物工程研究所;兔源COX-2、P糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)抗体(批号分别为ab179800、ab170904、ab9485、ab205718)均购自英国Abcam公司;iScript cDNA合成试剂盒(批号1708890)购自美国Bio-Rad公司。

1.3 实验动物

102只雄性Wistar大鼠,SPF级,7~8周龄,体重220~240 g,购自华中科技大学动物实验中心,生产许可证号为SCXK(鄂)2021-0009。大鼠饲养于温度(22±2)℃、相对湿度为(55±5)%、每12 h光/暗循环的环境中,自由进食和饮水。本研究获得武汉华联科生物技术有限公司动物伦理委员会批准(批件号为HLK-202406546)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

实验分为造模组($n=90$)和假手术组($n=12$)。造模组采用侧脑室注射海人藻酸的方法建立癫痫大鼠模型^[6]:采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后,将其头部固定在脑立体定位仪上,局部备皮、消毒后,正中切开头部皮肤,暴露颅骨和前囟,参考《大鼠脑立体定位图谱》^[7]进行侧脑室定位,以颅骨钻钻孔,使用微量注射器在硬脑膜下3.8 mm处下针,向右侧脑室内缓慢注射3 μL海人藻酸溶液(0.5 μg/μL,以生理盐水为溶剂,注射速度为1 μL/min),注射完毕后留针5 min。向假手术组大鼠侧脑室注射0.9%生理盐水,其余操作同前。造模后按照Racine分级标准^[8]评定大鼠的癫痫发作级别,若造模后2 h内出现Ⅳ级以上发作表示癫痫大鼠造模成功。为降低大鼠死亡率,造模组大鼠在造模2 h后通过腹腔注射地西洋(10 mg/kg,以生理盐水为溶剂)终止癫痫持续状态。最终,造模组有80只大鼠在造模2 h内出现Ⅳ级以上发作,造模成功率为88.89%。将造模成功的大鼠于每天同一时间给予卡马西平125 mg/kg(以生理盐水为溶剂)灌胃,每天1次,给药28 d后连续7 d观察大鼠癫痫发作时的脑电图。若大鼠出现Ⅰ级及以上癫痫发作且脑

电图异常(频率>20 Hz或波幅>80 μV),即表示难治性癫痫大鼠造模成功^[8]。在筛选过程中,10只大鼠死亡,8只大鼠造模失败,最终获得62只难治性癫痫大鼠。

取60只难治性癫痫大鼠随机分为模型组、塞来昔布组(阳性对照)、柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组、柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组,每组12只。塞来昔布组和柴胡加龙骨牡蛎汤组大鼠分别于每天同一时间灌胃20 mg/kg塞来昔布(以生理盐水为溶剂)^[9]或12 g/kg柴胡加龙骨牡蛎汤1次;柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组和柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组大鼠每天灌胃12 g/kg柴胡加龙骨牡蛎汤1次,并分别通过尾静脉注射慢病毒空载体或COX-2过表达慢病毒载体200 μL (病毒滴度均为 5.0×10^8 TU/mL),每周1次;假手术组和模型组大鼠则给予灌胃+尾静脉注射0.9%生理盐水。所有大鼠均连续给药/生理盐水8周。

2.2 大鼠癫痫发作行为学观察

末次给药结束后,根据Racine分级标准^[8]评估各组大鼠癫痫发作行为学,具体标准为:0级,癫痫未发作;1级,面部肌肉抽搐;2级,颈部肌肉抽搐;3级,单侧前肢阵挛、抽搐;4级,双侧前肢阵挛、抽搐、身体直立;5级,全身强直阵挛、双侧后肢和身体直立、倒地。

2.3 大鼠海马组织CA3区病理形态学变化观察

Racine分级结束后,将大鼠断头并立即将脑组织取出置于冰板上,迅速剖出海马体,每组随机选取6只大鼠的海马组织用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片(5 μm),进行HE染色,使用光学显微镜观察海马组织CA3区病理学变化并拍照。

2.4 大鼠海马组织细胞凋亡检测

取“2.3”项下制备的海马组织石蜡切片,进行脱蜡、水化后,使用TUNEL反应混合液进行孵育和染色处理,每组随机选择5个视野在光学显微镜下统计TUNEL阳性细胞(呈绿色)数量和细胞总数,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=TUNEL阳性细胞数/视野总细胞数 $\times 100\%$ 。

2.5 大鼠海马组织COX-2、PGE2、TNF- α 水平检测

采用ELISA法检测。每组取“2.3”项下剩余6只大鼠的海马组织,分成三部分,其中两部分组织冻存,剩余一部分称重后,使用组织匀浆器在冰上匀浆,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $2\,500 \times g$ 离心15 min。收集上清液并储存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,采用BCA法检测总蛋白浓度后,检测大鼠海马组织COX-2、PGE2、TNF- α 水平。

2.6 大鼠海马组织MDA含量和SOD活性检测

采用比色法检测。从冰箱中取出“2.5”项下大鼠海马组织匀浆上清液,按照试剂盒说明书方法检测MDA含量和SOD活性。

2.7 大鼠海马组织COX-2、P-gp蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.5”项下部分海马组织于匀浆管中,加入RIPA裂解液研磨离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、 $2\,500 \times g$ 、

15 min),取上清,采用BCA法测定上清液中的蛋白浓度。采用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用PVDF膜转移分离的蛋白。将膜用5%脱脂奶粉封闭2 h后,向膜中加入COX-2(稀释比例1:1 500)、P-gp(稀释比例1:1 000)和GAPDH(稀释比例1:4 000)抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(稀释比例1:4 000)。蛋白条带使用ECL显影,并使用Image J软件进行定量分析,以目标蛋白与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。上述实验重复3次。

2.8 大鼠海马组织COX-2、P-gp mRNA表达检测

采用RT-qPCR法检测。取“2.5”项下部分海马组织,采用TRIzol试剂提取总RNA,并用NanoDrop法测定其浓度和纯度。之后,使用cDNA合成试剂盒合成第一链cDNA,再在RT-qPCR仪上进行聚合酶链反应。反应体系:SYBR Green Master Mix 10 μL ,正反向引物各0.4 μL ,cDNA 5 μL ,无菌超纯水4.2 μL 。扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,共28个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算mRNA的相对表达水平。COX-2正向引物为5'-CTGTATCCCGCCCTGCTGTG-3',反向引物为5'-ACTTGCCTTGTATGGTGGC-TGTCTT-3',产物长度为211 kb;P-gp正向引物为5'-AACACCCTGGTTGGTGAGAG-3',反向引物为5'-CA-CCATCAAACCAGCAATG-3',产物长度为185 kb;GAPDH正向引物为5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',反向引物为5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3',产物长度为112 kb。

2.9 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。满足正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用SNK- q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

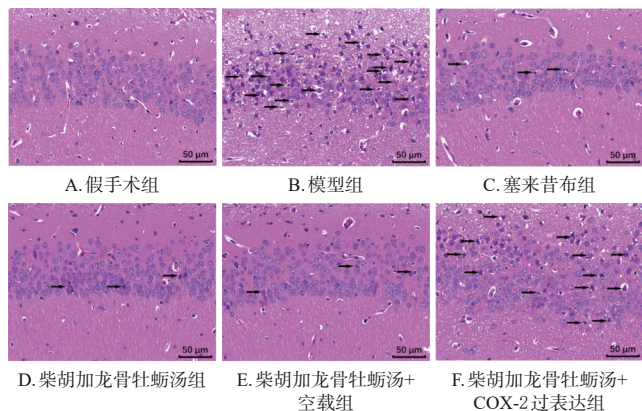
3.1 各组大鼠癫痫发作行为学比较

假手术组、模型组、塞来昔布组、柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组、柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组大鼠癫痫Racine分级分别为0、(4.41 \pm 0.45)、(2.18 \pm 0.27)、(2.23 \pm 0.30)、(2.20 \pm 0.29)、(3.96 \pm 0.38)级。与假手术组比较,模型组大鼠癫痫Racine分级显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组、柴胡加龙骨牡蛎汤组大鼠癫痫Racine分级均显著降低($P < 0.05$);与柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组大鼠癫痫Racine分级显著升高($P < 0.05$)。

3.2 各组大鼠海马组织CA3区病理形态学比较

假手术组大鼠海马神经元结构完整,排列整齐;与假手术组比较,模型组可见大鼠海马神经元排列疏松,细胞间隙增大,部分细胞坏死,出现核固缩,胞质空泡样

变性;与模型组比较,塞来昔布组、柴胡加龙骨牡蛎汤组大鼠神经元排列较整齐,轮廓较清晰,胞质空泡化程度明显减轻;与柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组大鼠神经元排列疏松,部分核固缩,胞质空泡化严重。结果见图1。



箭头:变性神经元。

图1 各组大鼠海马组织CA3区病理学显微图(HE染色)

3.3 各组大鼠海马组织细胞凋亡情况比较

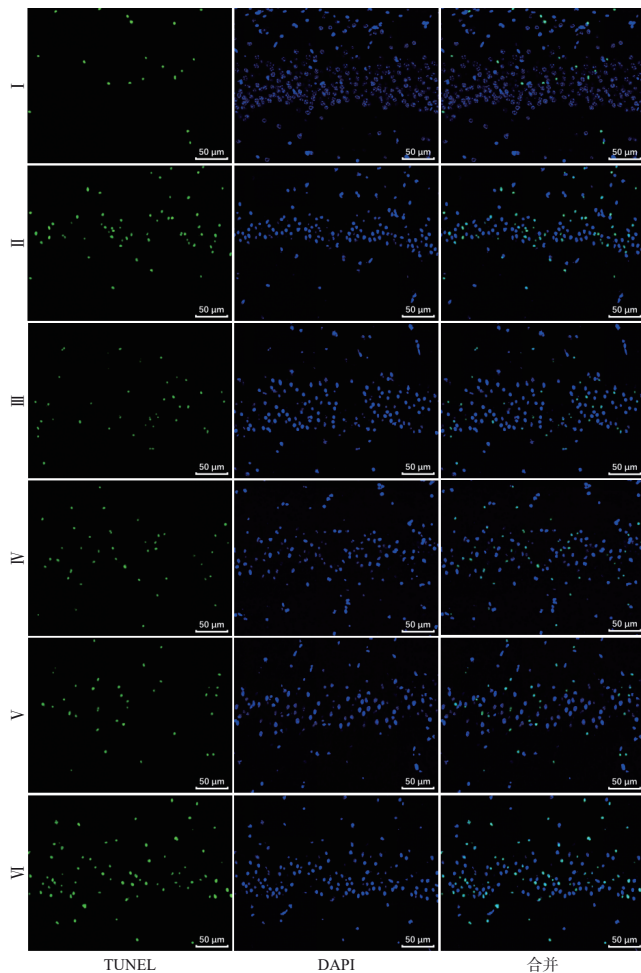
假手术组、模型组、塞来昔布组、柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组、柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组大鼠海马组织细胞凋亡率分别为(5.30 ± 1.09)%、(34.21 ± 2.14)%、(12.87 ± 1.55)%、(13.02 ± 1.62)%、(12.94 ± 1.58)%、(26.10 ± 1.97)%。与假手术组比较,模型组大鼠海马组织细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组、柴胡加龙骨牡蛎汤组大鼠海马组织细胞凋亡率均显著降低($P < 0.05$);与柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组大鼠海马组织细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$)。结果见图2。

3.4 各组大鼠海马组织COX-2、PGE2、TNF- α 水平比较

与假手术组比较,模型组大鼠海马组织COX-2、PGE2、TNF- α 水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组、柴胡加龙骨牡蛎汤组大鼠海马组织上述指标水平均显著降低($P < 0.05$);与柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组大鼠海马组织上述指标水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见表1。

3.5 各组大鼠海马组织MDA含量和SOD活性比较

模型组大鼠海马组织MDA含量显著高于假手术组,SOD活性显著低于假手术组($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组、柴胡加龙骨牡蛎汤组大鼠海马组织MDA含量均显著降低,SOD活性均显著升高($P < 0.05$);与柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组大鼠海马组织MDA含量显著升高,SOD活性显著降低($P < 0.05$)。结果见表2。



I:假手术组;II:模型组;III:塞来昔布组;IV:柴胡加龙骨牡蛎汤组;V:柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组;VI:柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组。

图2 各组大鼠海马组织细胞凋亡图(TUNEL染色)

表1 各组大鼠海马组织COX-2、PGE2、TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/mg}$)

组别	COX-2	PGE2	TNF- α
假手术组	14.37 ± 2.25	6.04 ± 1.13	36.25 ± 4.82
模型组	65.09 ± 5.10 ^a	24.75 ± 2.06 ^a	85.70 ± 8.39 ^a
塞来昔布组	29.48 ± 3.04 ^b	9.80 ± 1.39 ^b	52.31 ± 6.06 ^b
柴胡加龙骨牡蛎汤组	33.15 ± 3.22 ^b	10.26 ± 1.60 ^b	57.84 ± 6.25 ^b
柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组	30.99 ± 3.27 ^b	10.03 ± 1.45 ^b	54.56 ± 6.19 ^b
柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组	52.86 ± 4.60 ^{cd}	18.54 ± 1.91 ^{cd}	71.93 ± 7.68 ^{cd}

a:与假手术组比较, $P < 0.05$;b:与模型组比较, $P < 0.05$;c:与柴胡加龙骨牡蛎汤组比较, $P < 0.05$;d:与柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组比较, $P < 0.05$ 。

3.6 各组大鼠海马组织COX-2、P-gp蛋白和mRNA表达比较

与假手术组比较,模型组大鼠海马组织COX-2、P-gp蛋白和mRNA相对表达水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组、柴胡加龙骨牡蛎汤组大鼠海马组织COX-2、P-gp蛋白和mRNA相对表达水平均显著降低($P < 0.05$);与柴胡加龙骨牡蛎汤组、柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组大鼠海马组织COX-2、P-gp蛋白和mRNA相对表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结果表3、见图3。

表2 各组大鼠海马组织MDA含量和SOD活性比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

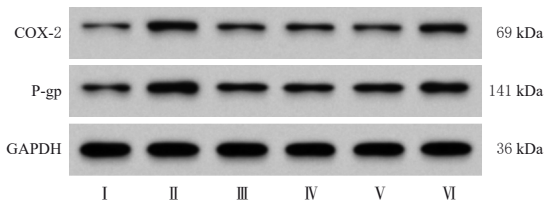
组别	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)
假手术组	6.59 ± 1.17	148.03 ± 19.25
模型组	38.12 ± 3.05 ^a	69.50 ± 10.14 ^a
塞来昔布组	11.43 ± 1.60 ^b	120.76 ± 16.38 ^b
柴胡加龙骨牡蛎汤组	12.07 ± 1.78 ^b	115.80 ± 15.79 ^b
柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组	11.85 ± 1.69 ^b	118.34 ± 16.02 ^b
柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组	26.30 ± 2.24 ^{cd}	84.29 ± 11.56 ^{cd}

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与柴胡加龙骨牡蛎汤组比较, $P < 0.05$; d: 与柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组比较, $P < 0.05$ 。

表3 各组大鼠海马组织COX-2、P-gp蛋白和mRNA相对表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	COX-2/GAPDH	P-gp/GAPDH	COX-2 mRNA	P-gp mRNA
假手术组	0.27 ± 0.04	0.36 ± 0.05	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.13
模型组	0.69 ± 0.07 ^a	0.81 ± 0.09 ^a	2.51 ± 0.22 ^a	2.27 ± 0.21 ^a
塞来昔布组	0.44 ± 0.05 ^b	0.52 ± 0.06 ^b	1.60 ± 0.17 ^b	1.40 ± 0.15 ^b
柴胡加龙骨牡蛎汤组	0.48 ± 0.06 ^b	0.57 ± 0.07 ^b	1.71 ± 0.18 ^b	1.55 ± 0.18 ^b
柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组	0.47 ± 0.06 ^b	0.55 ± 0.06 ^b	1.65 ± 0.17 ^b	1.51 ± 0.16 ^b
柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组	0.61 ± 0.07 ^{cd}	0.70 ± 0.08 ^{cd}	2.23 ± 0.20 ^{cd}	1.98 ± 0.19 ^{cd}

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与柴胡加龙骨牡蛎汤组比较, $P < 0.05$; d: 与柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组比较, $P < 0.05$ 。



I: 假手术组; II: 模型组; III: 塞来昔布组; IV: 柴胡加龙骨牡蛎汤组; V: 柴胡加龙骨牡蛎汤+空载组; VI: 柴胡加龙骨牡蛎汤+COX-2过表达组。

图3 各组大鼠海马组织COX-2、P-gp蛋白表达电泳图

4 讨论

一般认为,患者经过适当的药物治疗(包括单药治疗和联合用药)后,仍无法有效控制癫痫发作,且持续时间较长(如2年以上),可诊断为难治性癫痫,其治疗除药物治疗外,还可考虑手术、神经刺激等方式,但风险较高^[10]。中医药在难治性癫痫的治疗中可能具有潜在优势。

神经元损伤、退化和细胞凋亡是癫痫持续的主要表现,可导致认知障碍。癫痫发作时,神经元会经历异常的电活动,导致神经元细胞膜通透性改变和能量代谢障碍,加剧神经元损伤和死亡;海马神经元损伤后,还可能引发炎症和氧化应激反应,释放大量的炎症因子和氧化应激产物,进一步损伤神经元并促进癫痫的发生和发展^[11-12]。COX-2可通过生成PGE2,介导大量炎症因子(如TNF- α)的产生,同时产生大量的自由基(如超氧阴离子、过氧化氢等),进而发生一系列炎症和氧化应激反应^[12]。海人藻酸模型能较好地模拟多种癫痫发作类型,且海人藻酸引起的病理生理改变与人类难治性癫痫的

临床表现和病理生理过程相似,故海人藻酸诱导的大鼠难治性癫痫模型是研究人类难治性癫痫的理想模型^[13]。研究显示,海人藻酸诱发癫痫后,大鼠脑内COX-2表达和PGE2水平升高,并促进海马CA3区神经元死亡^[14]。P-gp是一种多药转运蛋白,广泛分布于血脑屏障中,其主要功能是通过三磷酸腺苷依赖的泵运机制,将多种外来物质(包括药物)从细胞内主动转运到细胞外,从而保护细胞免受这些物质的损害。然而,在难治性癫痫中,P-gp的这种功能却可能导致抗癫痫药物被泵出作用靶位,无法有效作用于病灶区,从而导致患者产生耐药性^[15]。研究表明,在难治性癫痫模型大鼠海马组织中P-gp呈高表达,这可能是导致难治性癫痫患者耐药的重要原因之一^[15]。塞来昔布是一种非甾体抗炎药,有研究证实,塞来昔布能通过降低COX-2活性来抑制炎症反应和氧化应激,延缓癫痫大鼠海马的结构变化和海马神经元的缺失,减少癫痫发作^[9]。因此,本研究选择塞来昔布作为阳性对照。本研究结果显示,在海人藻酸诱导的大鼠难治性癫痫模型中,海马组织细胞凋亡率、COX-2、PGE2、TNF- α 水平和MDA含量以及COX-2、P-gp表达均显著升高,SOD活性显著降低,与上述研究结果一致,表明海人藻酸可诱导大鼠海马组织发生细胞凋亡、炎症和氧化应激反应,并产生耐药性,与难治性癫痫的病理特征一致,提示难治性癫痫大鼠模型复制成功;而柴胡加龙骨牡蛎汤可显著降低难治性癫痫大鼠模型海马组织细胞凋亡率、COX-2、PGE2、TNF- α 水平和MDA含量以及COX-2、P-gp表达,升高SOD活性,与阳性对照药塞来昔布的作用基本一致。以上结果表明,柴胡加龙骨牡蛎汤可抑制炎症和氧化应激反应,减轻难治性癫痫大鼠海马神经元损伤。

COX-2为炎症反应的关键酶,是大脑神经炎症和氧化应激的诱发因素。据报道,COX-2/PGE2信号通路的激活可导致戊四氮诱导的癫痫小鼠海马神经元损伤及认知障碍,而塞来昔布可显著减少海马神经炎症和神经元损伤,其作用可能与对COX-2的抑制有关^[16]。此外,抑制COX-2可阻断谷氨酸诱导的离体大鼠脑毛细血管中P-gp的表达和转运功能的增强以及癫痫大鼠体内脑毛细血管中癫痫发作引起的P-gp表达上调^[17]。另有研究显示,慢性癫痫大鼠脑内P-gp表达的增强与抗癫痫药物苯妥英脑渗透的显著减少有关,COX-2抑制剂可降低海马旁回和腹侧海马中P-gp表达,促进苯妥英的脑递送^[18]。本研究中,塞来昔布既是难治性癫痫的阳性药物,也是COX-2抑制剂,实验结果显示,柴胡加龙骨牡蛎汤对难治性癫痫大鼠海马神经元损伤的改善作用与塞来昔布一致,说明柴胡加龙骨牡蛎汤可能通过下调COX-2/PGE2信号通路改善难治性癫痫大鼠海马神经元损伤。进一步采用慢病毒转染过表达COX-2进行验证的结果显示,过表达COX-2可减弱柴胡加龙骨牡蛎汤对

难治性癫痫大鼠海马神经元损伤的改善作用。以上提示,柴胡加龙骨牡蛎汤能减轻难治性癫痫大鼠海马神经元损伤,其作用机制可能是通过抑制 COX-2/PGE2 信号通路的激活来实现的。

综上所述,柴胡加龙骨牡蛎汤可能通过抑制 COX-2/PGE2 信号通路的激活,抑制炎症和氧化应激,减轻难治性癫痫大鼠海马神经元损伤。未来可对难治性癫痫大鼠的认知功能进行检测,并结合体外细胞实验,深入分析柴胡加龙骨牡蛎汤治疗难治性癫痫的作用机制。

参考文献

[1] MESRAOUA B, BRIGO F, LATTANZI S, et al. Drug-resistant epilepsy: definition, pathophysiology, and management[J]. *J Neurol Sci*, 2023, 452: 120766.

[2] CHEN Y, NAGIB M M, YASMEN N, et al. Neuroinflammatory mediators in acquired epilepsy: an update[J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(4): 683-701.

[3] ROJAS A, CHEN D, GANESH T, et al. The COX-2/prostanoid signaling cascades in seizure disorders[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(1): 1-13.

[4] FISCHER A, HÜLSMEYER V I, MUNOZ SCHMIEDER V P, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition as an add-on strategy in drug resistant epilepsy: a canine translational study[J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 864293.

[5] 单萍, 张继龙, 笱玉兰, 等. 柴胡龙骨牡蛎汤下调星形胶质细胞环氧化酶-2/前列腺素E2的表达[J]. *世界中医药*, 2022, 17(23): 3343-3346.

SHAN P, ZHANG J L, GOU Y L, et al. Chaihu longgu muli decoction downregulates the expression of COX-2/PGE2 in hippocampal astrocytes[J]. *World Chin Med*, 2022, 17(23): 3343-3346.

[6] 王潇慧, 鄢泽然, 张青, 等. 柴贝止痢汤调节海人酸致痫大鼠脑组织耐药蛋白MRP2表达的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(12): 4961-4965.

WANG X H, YAN Z R, ZHANG Q, et al. Study on regulation of Chaibei zhixian decoction on expression of MRP2 protein in brain tissue of kainic acid-induced epilepsy rats[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2016, 31(12): 4961-4965.

[7] 帕克森勒斯·乔治, 沃森·查尔斯. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 诸葛启钊, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 2-30.

PAXINOS G, WATSON C. Stereoscopic mapping of rat brain[M]. ZHUGE Q C, translated. Beijing: People's Health Publishing House, 2005: 2-30.

[8] 王田, 岳玉琴. 柴贝止痢汤调控P38MAPK通路改善难治性癫痫大鼠行为学及对海马神经元超微结构的影响[J]. *中药材*, 2023, 46(6): 1531-1536.

WANG T, YUE Y Q. Chaibei zhixian decoction regulates

the P38MAPK pathway to improve the behavior of refractory epilepsy rats and its effect on the ultrastructure of hippocampal neurons[J]. *J Chin Med Mater*, 2023, 46(6): 1531-1536.

[9] CHEN L, NIU Q S, GAO C B, et al. Celecoxib treatment alleviates cerebral injury in a rat model of post-traumatic epilepsy[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e16555.

[10] KHANKHANIAN P, LEE A M, DREES C N, et al. Combined VNS-RNS neuromodulation for epilepsy[J]. *J Clin Neurophysiol*, 2022, 39(2): e5-e9.

[11] VERGALEN M, MANZELLA S, VONCK K, et al. Increased dentate gyrus excitability in the intrahippocampal kainic acid mouse model for temporal lobe epilepsy[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(1): 660.

[12] GIOVANNINI G, BEDIN R, FERRARO D, et al. Serum neurofilament light as biomarker of seizure-related neuronal injury in status epilepticus[J]. *Epilepsia*, 2022, 63(1): e23-e29.

[13] ŁUKAWSKI K, CZUCZWAR S J. Oxidative stress and neurodegeneration in animal models of seizures and epilepsy[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(5): 1049.

[14] KAWAGUCHI K, HICKEY R W, ROSE M E, et al. Cyclooxygenase-2 expression is induced in rat brain after kainate-induced seizures and promotes neuronal death in CA3 hippocampus[J]. *Brain Res*, 2005, 1050(1/2): 130-137.

[15] 刘冲冲, 孙江燕, 袁斯远, 等. 柴贝止痢汤及 α 细辛醚对难治性癫痫大鼠脑内P-gp表达及卡马西平含量的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(3): 1203-1206.

LIU C C, SUN J Y, YUAN S Y, et al. Effects of Chaibei zhixian decoction and α -asarone on the P-gp expression and carbamazepine content in the brain of intractable epileptic rats[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(3): 1203-1206.

[16] ZHU X J, YAO Y Y, YANG J R, et al. COX-2-PGE2 signaling pathway contributes to hippocampal neuronal injury and cognitive impairment in PTZ-kindled epilepsy mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 87: 106801.

[17] ZIBELL G, UNKRÜER B, PEKCEC A, et al. Prevention of seizure-induced up-regulation of endothelial P-glycoprotein by COX-2 inhibition[J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56(5): 849-855.

[18] VAN VLIET E A, ZIBELL G, PEKCEC A, et al. COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats[J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(2): 404-412.

(收稿日期: 2024-09-19 修回日期: 2025-01-15)

(编辑: 舒安琴)