

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.13.007

网络首发    [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210427.1627.006.html\(2021-04-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210427.1627.006.html(2021-04-28))

# 石甘散联合托吡酯对癫痫幼鼠认知功能及海马组织 CB2R、MDA、SOD 水平的影响

杨昕悫, 于 滨  
(哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科 150000)

**[摘要]** **目的** 探讨石甘散联合托吡酯对癫痫幼鼠认知功能及海马组织大麻素受体 2(CB2R)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平的影响。**方法** 将 60 只 SPF 级 SD 幼鼠分为对照组、模型组、石甘散组、托吡酯组、联合组,每组 12 只。对照组腹腔注射 1 mL 的 0.9%氯化钠溶液,连续注射 28 d。其余 4 组均于每日固定时间腹腔注射戊四氮溶液,建模成功后,对照组及模型组给予 0.9%氯化钠溶液(10 mg/kg)灌胃,每日 2 次。石甘散组给予 1 g/kg 石甘散灌胃,每日 1 次,托吡酯组给予 18 mg/kg 托吡酯灌胃,每日 1 次,联合组给予 1 g/kg 石甘散和 18 mg/kg 托吡酯灌胃,每日 1 次。连续干预 28 d 后进行 Morris 水迷宫测试。测试结束后立即处死幼鼠,采用考马斯亮蓝法检测海马组织超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)水平,采用 Western blot 法检测海马组织大麻素 2 型受体水平。**结果** 水迷宫结果显示,5 组在同一时间点找到平台时间由高到低分别为模型组、石甘散组、托吡酯组、联合组、对照组,穿越原平台位置次数及在平台象限搜索时间所占百分比由低到高分别为模型组、石甘散组、托吡酯组、联合组、对照组。各组 CB2R 及 MDA 水平分别为模型组[(0.39±0.09) vs. (12.98±2.87)nmol/mg]、联合组[(0.30±0.06) vs. (9.88±1.97) nmol/mg]、石甘散组[(0.20±0.05) vs. (7.32±1.44)nmol/mg]、托吡酯组[(0.19±0.05) vs. (7.56±1.32)nmol/mg]、对照组[(0.13±0.04) vs. (5.19±1.12)nmol/mg],而 SOD 水平由低到高分别为模型组、石甘散组、托吡酯组、联合组、对照组。**结论** 石甘散联合托吡酯可显著改善癫痫幼鼠认知功能,并提高海马组织 SOD 活性及 CB2R 水平,降低 MOD 含量,抑制氧化反应,减轻自由基对脑组织的损伤。

**[关键词]** 癫痫;海马;认知功能;石甘散;托吡酯

**[中图法分类号]** R971+.6      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2021)13-2194-04

## Effect of Shigan Powder combined with topiramate on cognitive function and levels of CB2R,MDA and SOD in hippocampus of epileptic young rats

YANG Xinhui ,YU Bin  
(Department of Neurology,First Affiliated Hospital of Harbin Medical University ,  
Harbin,Heilongjiang 150000,China )

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of Shigan Powder combined with topiramate on the cognitive function and the levels of CB2R,MDA and SOD in hippocampus of epileptic young rats. **Methods** Sixty SPF-grade SD rats were randomly divided into the control group,model group,Shigan Powder group,topiramate group and combination group,12 cases in each group. The control group was intraperitoneally injected by 1 mL of 0.9% sodium chloride solution for consecutive 28 d,and the remaining four groups were intraperitoneally injected with pentylenetetrazol solution at fixed time every day. After successful modeling,the control group and model group were given 0.9% sodium chloride solution(10 mg/kg) by gavage,twice daily,the Shigan Powder group was given the gavage of 1.0 g/kg Shigan Powder,the topiramate group was given the gavage of 18 mg/kg topiramate,once daily,and the combination group was given the gavage of 1.0 g/kg Shigan Powder and 18 mg/kg topiramate,once daily. After 28 d continuous intervention,the Morris water maze test was performed. Immediately after the test,the young rats were sacrificed. The levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the hippocampus were measured by Coomassie Brilliant Blue. The levels of cannabinoid type 2 receptors in the hippocampus were detected by Western blot. **Results** The water maze results showed that the time of five groups finding the platform at the same time point from high to low was the model group >Shigan Powder group > topiramate group >combination group >control group,the

number of times to cross the original platform position and the percentage of the search time in the platform quadrant from low to high was the model group < Shigan Powder group < topiramate group < combination group < control group. The levels of CB2R and MDA in each group were  $(0.39 \pm 0.09)$  nmol/mg and  $(12.98 \pm 2.87)$  nmol/mg in the model group,  $(0.30 \pm 0.06)$  nmol/mg and  $(9.88 \pm 1.97)$  nmol/mg in the combination group,  $(0.20 \pm 0.05)$  nmol/mg and  $(7.32 \pm 1.44)$  nmol/mg in the Shigan Powder group,  $(0.19 \pm 0.05)$  nmol/mg and  $(7.56 \pm 1.32)$  nmol/mg in the topiramate group,  $[(0.13 \pm 0.04)$  nmol/mg and  $(5.19 \pm 1.12)$  nmol/mg in the control group, while the SOD levels from low to high were the model group < Shigan Powder group < topiramate group < combination group < control group. **Conclusion** Shigan Powder combined with topiramate can significantly improve the cognitive function in the epileptic young rats, increase the SOD activity and CB2R level in hippocampus tissues, reduce the MOD content, inhibit the oxidative response, and reduce the free radical damage to brain tissue.

**[Key words]** epilepsy; hippocampus; cognitive function; Shigan Powder; topiramate

癫痫是一类由已知或未知病因所致的脑部神经元过度同步化放电为特征的发作性脑病。目前医学上关于癫痫的发病机制尚无统一论<sup>[1-2]</sup>。已有研究证实,氧化应激所致的后续反应可能在癫痫的发生、发展中扮演着重要角色。氧化应激产物自由基的过度表达可对蛋白质等大分子物质造成损伤,进而破坏细胞结构,引起细胞凋亡<sup>[3-5]</sup>。因此如何抑制癫痫患者发病或产生的氧化应激反应是治疗癫痫的关键所在。托吡酯为一类广谱抗癫痫药物,已被证实对多种类型癫痫均具有较好的治疗效果,并可作为一线抗癫痫药物单独与其他药物联合使用<sup>[6-7]</sup>。中医药为我国传统医学范畴,其具有毒副作用小、疗效显著等特点,已广泛运用于临床中,而石甘散是有石菖蒲和甘松组成的抗痫药物,临床效果显著<sup>[8-9]</sup>。基于此,本研究通过探讨石甘散联合托吡酯对癫痫幼鼠认知功能及海马组织大麻素受体 2(CB2R)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平的影响,旨在为临床上治疗癫痫提供相关依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

选取 60 只 10 日龄 SD 大鼠,体重为 25~35 g,购于河南省实验动物中心[动物许可证:SCXK-(豫)2019-017]。于屏障环境下饲养 1 周后开始实验,将 60 只 SD 大鼠分为对照组、模型组、石甘散组、托吡酯组、联合组,每组 12 只。

#### 1.1.2 主要仪器试剂

托吡酯(西安杨森制药有限公司,国药准字:H20020555,每片 25 mg);石甘散:由石菖蒲、甘松按 1:1 比例进行配置;戊四氮、SOD 试剂盒、MDA 试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);CB2R 兔多克隆抗体、兔抗 GADPH(武汉博士德生物工程有限公司);ECL 高效化学发光试剂盒(美国 Genview 公司);蛋白提取试剂盒(宝生物工程有限公司)。Bio Rad 450 酶标仪(美国 Bio Rad 公司);JY-SCZ2 型十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白电泳仪(北京六一仪器厂)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 建模

对照组腹腔注射 1 mL 的 0.9%氯化钠溶液,连续注射 28 d。其余 4 组均于每日固定时间腹腔注射戊四氮溶液(实验前 30 min 将 300 mg 戊四氮晶体溶于 150 mL 的 0.9%氯化钠溶液),连续注射 28 d,以 RACINE<sup>[10]</sup>制订的分级法为评断标准,当 SD 大鼠出现 5 次级以上 II 级及以上症状即为癫痫模型构建成功。

#### 1.2.2 干预

对照组及模型组给予 0.9%氯化钠溶液(10 mg/kg)灌胃,每日 2 次,连续 28 d。石甘散组给予 1 g/kg 石甘散灌胃,每日 1 次,托吡酯组给予 18 mg/kg 托吡酯灌胃(使用前,以 0.1 mg 托吡酯:0.1 mL 的 0.9%氯化钠溶液比例进行稀释),每日 1 次,联合组给予 1 g/kg 石甘散和 18 mg/kg 托吡酯灌胃,每日 1 次,连续干预 28 d。

#### 1.2.3 认知功能评价

水迷宫实验:水迷宫由直径为 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。实验期间水迷宫周围参照物摆放顺序无变动,水温为室温。在测试前 1 d,水池内不放平台,让大鼠于池中自由游泳 120 s,让其熟悉周围环境,此阶段持续 5 d 后开始测试。定位航行实验:放置平台,第 1~4 天每日上午及下午固定时间按照东北、西北、西南、东南 4 个象限将大鼠面向池壁完全浸入水中,记录其从入水到找到平台时间。若 120 s 内未找到平台则引导其找到平台,搜索时间记为 120 s。所有大鼠在找到平台后均保持在台上 30 s,让其熟悉周围参照物。空间探索时间:第 5 天撤掉平台,将大鼠头向东北迷宫壁的中点浸入水中,记录大鼠在 120 s 内穿越原平台次数及在原平台处探索时间,并计算百分比。

#### 1.2.4 CB2R、MDA、SOD 水平检测

水迷宫实验结束后立即处死大鼠,并提取海马组织。冰浴条件下超声震碎制成 10%组织匀浆液,并于 4℃、3 000 r/min 条件下离心 10 min,采用考马斯亮蓝检测法测定海马组织 MDA 及 SOD 水平。取海马

组织,根据蛋白提取试剂盒提取总蛋白并测定浓度。根据 Western blot 试剂盒说明书进行电泳、转膜、封闭,采用 1:300 比例稀释后的兔抗 CB2R 孵育过夜。次日 TBST 洗涤后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗,孵育 2 h 后,进行成像,并采用 Image J 软件进行灰度值分析。根据内参标准计算目标条带相对值,判断蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 进行统计分析,计数资料用例数和百分数表示,计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,相关性分析采用 Pearson 相关法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 水迷宫结果

第 1~4 天,5 组在同一时间点找到平台时间由高到低分别为模型组、石甘散组、托吡酯组、联合组、对照组。撤掉平台后,穿越原平台位置次数及在平台象限搜索时间所占百分比由低到高分别为模型组、石甘散组、托吡酯组、联合组、对照组,见表 1、2。

表 1 各组大鼠搜索平台时间( $\bar{x} \pm s, s$ )

| 组别   | 第 1 天                      | 第 2 天                      | 第 3 天                      | 第 4 天                     |
|------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 对照组  | 27.34±7.73 <sup>abcd</sup> | 17.35±5.31 <sup>abcd</sup> | 11.48±3.12 <sup>abcd</sup> | 6.95±1.72 <sup>abcd</sup> |
| 联合组  | 31.43±6.57 <sup>abc</sup>  | 24.52±3.32 <sup>abc</sup>  | 18.79±2.27 <sup>abc</sup>  | 12.02±1.69 <sup>abc</sup> |
| 托吡酯组 | 39.47±8.65 <sup>a</sup>    | 31.68±4.91 <sup>a</sup>    | 23.46±3.38 <sup>a</sup>    | 17.07±1.99 <sup>a</sup>   |
| 石甘散组 | 39.98±8.71 <sup>a</sup>    | 31.45±4.96 <sup>a</sup>    | 23.82±3.16 <sup>a</sup>    | 17.95±2.01 <sup>a</sup>   |
| 模型组  | 47.65±11.21                | 38.18±7.24                 | 29.79±4.98                 | 20.56±2.98                |

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与石甘散组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,与托吡酯组比较;<sup>d</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较。

表 2 各组大鼠穿越平台时间及在原平台象限搜索时间所占百分比( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 次数(次)                      | 时间百分比(%)                   |
|------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组  | 15.76±3.46 <sup>abcd</sup> | 58.45±3.71 <sup>abcd</sup> |
| 联合组  | 12.59±1.92 <sup>abc</sup>  | 44.78±3.22 <sup>abc</sup>  |
| 托吡酯组 | 9.32±1.76 <sup>a</sup>     | 33.45±2.24 <sup>a</sup>    |
| 石甘散组 | 9.48±1.84 <sup>a</sup>     | 33.71±2.43 <sup>a</sup>    |
| 模型组  | 6.21±1.34                  | 22.35±2.19                 |

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与石甘散组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,与托吡酯组比较;<sup>d</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较。

2.2 脑组织 MDA 及 SOD 水平比较

各组 MDA 水平由高到低分别为模型组、石甘散组、托吡酯组、联合组、对照组,而 SOD 水平由低到高分别为模型组、石甘散组、托吡酯组、联合组、对照组,见表 3。

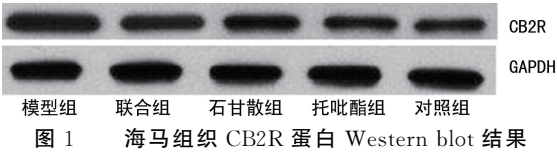
2.3 海马组织 CB2R 蛋白水平比较

各组 CB2R 蛋白水平表现分别为模型组(0.39±0.09)、联合组(0.30±0.06)、石甘散组(0.20±0.05)、托吡酯组(0.19±0.05)、对照组(0.13±0.04),模型组与其他各组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );石甘散组与对照组及联合组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );托吡酯组与对照组及联合组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

表 3 各组脑组织 MDA 及 SOD 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | SOD(U/mg)                  | MDA(nmol/mg)              |
|------|----------------------------|---------------------------|
| 对照组  | 35.18±3.65 <sup>abcd</sup> | 5.19±1.12 <sup>abcd</sup> |
| 联合组  | 27.12±4.42 <sup>abc</sup>  | 9.88±1.97 <sup>abc</sup>  |
| 托吡酯组 | 20.57±3.97 <sup>a</sup>    | 7.56±1.32 <sup>a</sup>    |
| 石甘散组 | 20.94±4.03 <sup>a</sup>    | 7.32±1.44 <sup>a</sup>    |
| 模型组  | 14.54±3.38                 | 12.98±2.87                |

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与石甘散组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,与托吡酯组比较;<sup>d</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较。



3 讨 论

流行病学资料显示,世界范围内癫痫发病率约为 5%,且是儿童时期最为常见的慢性神经系统疾病之一,高发于出生后的第一年<sup>[11]</sup>。大部分癫痫儿童的智力无明显异常,但有部分患儿会表现为暂时或永久性的认知损伤,这将严重影响患儿的生活质量及身心健康。研究认为,导致癫痫患儿认知功能的主要因素包括引起癫痫发作的神经病理因素,其次为癫痫的发作形式、社会心理因素及抗癫痫药物,上述因素相互作用导致患儿的认知功能障碍<sup>[12-13]</sup>。抗痫药物为目前临床上治疗癫痫的主要方式,其具有应用范围广、使用时间长等特点,而单药或多药物的长期应用导致抗痫药物对患者,特别是大脑处于发育期的患儿认知功能的影响则是临床工作者及家长的关注重点。

托吡酯是一种新型抗痫药物,其发挥作用的主要机制包括以下几个方面<sup>[14]</sup>:(1)通过  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)受体作用,从而对 GABA 介导的神经抑制作用产生促进作用;(2)对电压依赖性钠离子通过产生阻断作用;(3)调节谷氨酸水平从而调节离子通道;(4)对部分电压门控及钙门控钾离子通道内流具有增强作用。有研究发现,托吡酯对正常幼鼠的认知功能无影响,而对癫痫幼鼠的认知功能具有一定的改善作用<sup>[15]</sup>。而也有研究发现,托吡酯对癫痫患者的运动能力、注意力等方面产生负面影响<sup>[16]</sup>。石甘散属我国传统医学范畴,由石菖蒲及甘松组成。研究发现,石甘散可改善戊四氮所致的癫痫大鼠海马组织中的谷氨酸、GABA 水平,从而调节离子通道,抑制神经元放电,最终保护脑细胞,发挥抗痫的作用<sup>[17]</sup>。现代药理学研究表明,石菖蒲含有氨基酸、有机酸、挥发油等成分,具有抗惊厥、镇静、脑保护及益智等作用<sup>[18]</sup>。而甘松发挥药效的主要成分为甘松新酮,并具有改善认知功能、保护脑神经及镇静等作用<sup>[19]</sup>。基于此,本研究探讨了石甘散联合托吡酯对癫痫幼鼠认知功能的影响。结果显示,单独用药或联合用药均可改善癫痫幼鼠的认知功能,且石甘散联合托吡酯治疗对幼鼠的认知功能改善效果更为明显。

氧化应激及其所致的神经细胞凋亡是诱发并导致癫痫反复发作的主要原因,其主要机制为活性氧簇



ROS 的过度表达从而增加了细胞间的钙离子浓度,进而导致脑部神经元的重塑、坏死及凋亡<sup>[5]</sup>。SOD 为体内超氧化物酶,具有清除自由基、还原有毒过氧化物的作用;MDA 是脂质发生氧化应激的终产物,具有细胞毒性,二者在癫痫的发生、发展中均发挥着重要作用。内源性大麻素系统在中枢神经系统中起着重要作用,而 CB2R 为内源性大麻素受体之一,主要表达于外周免疫细胞。近年来,随着研究的深入,发现 CB2R 在中枢神经系统中的特定区域也有所表达。有研究发现,在毛果芸香碱诱导的癫痫大鼠模型慢性期中,大麻素可改善大鼠的癫痫行为,并通过对神经元自噬作用激活从而产生抗氧化作用<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,单独用药或联合用药均可改善癫痫幼鼠的脑组织 MDA、SOD 及海马 CB2R 水平,且石甘散联合托吡酯治疗对幼鼠的各指标改善效果更为明显,提示可抑制癫痫幼鼠的氧化作用。

综上所述,石甘散联合托吡酯可显著改善癫痫幼鼠认知功能,并提高海马组织 SOD 活性及 CB2R 水平,降低 MOD 含量,抑制氧化反应,减轻自由基对脑组织的损伤。

## 参考文献

- [1] FORSGREN L, BEGHI E, OUN A, et al. The epidemiology of epilepsy in Europe: a systematic review[J]. *Eur J Neurol*, 2005, 12(4): 245-253.
- [2] VON E N, PELLEGRINO G, HEDRICH T, et al. Detection and magnetic source imaging of fast oscillations (40—160 Hz) recorded with magnetoencephalography in focal epilepsy patients[J]. *Brain Topogr*, 2016, 29(2): 218-231.
- [3] 余晓佳, 吴国栋, 孟祥红, 等. 左乙拉西坦联合中药治疗部分性癫痫发作疗效及对脑电图的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(9): 993-996.
- [4] MAES M, GALECKI P, CHANG Y S, et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2011, 35(3): 676-692.
- [5] YC C. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death[J]. *Acta Neurol Taiwan*, 2010, 19(1): 3-15.
- [6] 石福宏, 吕秋杰. 卡马西平、托吡酯与丙戊酸钠治疗脑炎继发癫痫的临床疗效[J]. *中国医学创新*, 2015, 7(33): 122-124.
- [7] 王金莉, 陈杰明, 林合麟. 托吡酯、卡马西平与丙戊酸钠治疗不同类型脑炎继发癫痫疗效观察[J]. *中国实用医刊*, 2017, 44(4): 21-23.
- [8] 庞博, 张韧, 张奇, 等. 石甘散对戊四氮致痫大鼠氧化应激反应及 Nrf2、HO-1 因子影响的研究[J]. *中国中医急症*, 2018, 27(10): 1722-1725, 1729.
- [9] 张韧, 程为平, 庞博. 石甘散对戊四氮致痫大鼠海马组织 MDA、GSH-Px、SOD 含量影响的研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2018, 13(4): 454-457.
- [10] RACINE R. Kindling: the first decade[J]. *Neurosurgery*, 1978, 3(2): 234-252.
- [11] 皮凤兰, 胡化侠, 张渺, 等. 不同抗癫痫药物对新诊断癫痫患儿认知功能的影响[J]. *精神医学杂志*, 2016, 29(4): 299-301.
- [12] 陈亚南, 张媿, 徐善森, 等. 丙戊酸钠联用新型抗癫痫药对癫痫患儿血氨的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(15): 1378-1380.
- [13] 卢军, 曾其昌, 王琴, 等. 托吡酯与丙戊酸钠对癫痫患儿脑电活动及糖脂代谢的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(28): 5546-5548, 5571.
- [14] 毛小元, 程振国, 俞军龄, 等. 托吡酯对遗传性癫痫大鼠脑内 GAT-1 和 GAT-3 表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(8): 1069-1074.
- [15] 杨文桢, 张新定, 张建生, 等. 托吡酯对大鼠创伤性脑损伤的保护作用[J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2010, 4(10): 1998-2000.
- [16] BAETA E, SANTANA I, CASTRO G, et al. Cognitive effects of therapy with topiramate in patients with refractory partial epilepsy[J]. *Rev Neurol*, 2002, 34(8): 737-741.
- [17] 马振旺, 程为平, 张奇, 等. 石甘散对戊四氮致癫痫模型大鼠海马行为学表现以及海马组织 Glu、GABA 水平影响的研究[J]. *中国医药导刊*, 2017, 19(3): 293-294.
- [18] 林晨, 安红梅. 石菖蒲的中枢神经系统药理作用研究[J]. *长春中医药大学学报*, 2014, 30(2): 230-233.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [20] BARTOLOMEI F, KHALIL M, WENDLING F, et al. Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study[J]. *Epilepsia*, 2005, 46(5): 677-687.