

# 积雪草苷对癫痫小鼠认知功能、炎症反应、氧化应激及沉默信息调节因子 1/内质网应激通路蛋白的影响研究<sup>△</sup>

何冰<sup>1\*</sup>, 杜丽叶<sup>1</sup>, 李志华<sup>1</sup>, 谢洋<sup>1</sup>, 刘莉燕<sup>1#</sup>, 房娉平<sup>2</sup> (1. 邯郸市中心医院康复科, 河北邯郸 056000; 2. 邯郸市中心医院神经内五科, 河北邯郸 056000)

中图分类号 R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)12-1459-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.12.007



**摘要** 目的:探讨积雪草苷(AS)对癫痫(EP)小鼠认知功能、炎症反应、氧化应激及沉默信息调节因子 1(SIRT1)/内质网应激(ER stress)通路蛋白的影响。方法:建立 EP 小鼠模型,将造模成功的 EP 小鼠随机分为模型组、AS 低剂量组(20 mg/kg)、AS 中剂量组(40 mg/kg)、AS 高剂量组(80 mg/kg)和阳性对照组(丙戊酸钠 0.2 g/kg),每组 10 只;另取 10 只健康小鼠作为对照组。除模型组和对照组小鼠灌胃蒸馏水之外,其他各组小鼠给予相应剂量药物干预,1 日 1 次,干预 2 周。给药结束后,观察小鼠 EP 持续状态(SE)次数及总持续时间;采用 Morris 水迷宫实验测定小鼠认知功能,采用酶联免疫吸附试验测定血清中白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平,脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平,采用蛋白质印迹法检测小鼠脑组织中 SIRT1 以及 ER stress 相关蛋白[转录因子 C/EBP 同源蛋白(CHOP)、免疫球蛋白重链结合蛋白(BIP)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)、磷酸化 PERK(p-PERK)、真核翻译起始因子-2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )和磷酸化 eIF2 $\alpha$ (p-eIF2 $\alpha$ )]表达。结果:与对照组相比,模型组小鼠 SE 次数增加,总持续时间和逃避潜伏期延长,血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平以及脑组织 MDA、CHOP、BIP、p-PERK/PERK 和 p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  蛋白表达水平升高,游过平台位置的次数减少,脑组织 SOD、SIRT1 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组相比,AS 低、中、高剂量组以及阳性对照组小鼠 SE 次数减少,总持续时间和逃避潜伏期缩短,血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平及脑组织 MDA、CHOP、BIP、p-PERK/PERK 和 p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  蛋白表达水平降低,游过平台位置的次数增加,脑组织 SOD、SIRT1 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),AS 低、中及高剂量组呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );AS 高剂量组和阳性对照组上述指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:AS 可改善 EP 小鼠认知功能,减轻炎症反应及氧化应激程度,可能与激活 SIRT1 蛋白表达,缓解 ER stress 有关。

**关键词** 积雪草苷; 癫痫小鼠; 认知功能; 炎症反应; 氧化应激; 沉默信息调节因子 1/内质网应激

## Effects of Asiaticoside on Cognitive Function, Inflammatory Response, Oxidative Stress and Silent Information Regulator 1/Endoplasmic Reticulum Stress Pathway Protein in Mice with Epileptic<sup>△</sup>

HE Bing<sup>1</sup>, DU Liye<sup>1</sup>, LI Zhihua<sup>1</sup>, XIE Yang<sup>1</sup>, LIU Liyan<sup>1</sup>, FANG Pingping<sup>2</sup> (1. Dept. of Rehabilitation, Handan Central Hospital, Hebei Handan 056000, China; 2. Dept. of Neurology, Handan Central Hospital, Hebei Handan 056000, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To probe into the effects of asiaticoside (AS) on cognitive function, inflammatory response, oxidative stress and silent information regulator 1 (SIRT1)/endoplasmic reticulum stress (ER stress) pathway protein in mice with epileptic (EP). **METHODS:** EP mouse model were established, so that the successfully modeled EP mice were randomly divided into model group, AS low dose group (20 mg/kg AS), AS medium dose group (40 mg/kg AS), AS high dose group (80 mg/kg AS) and positive control group (0.2 g/kg sodium valproate), with 10 mice in each group; and another 10 healthy mice were taken as the control group. Except for the mice in the model group and the control group were given distilled water by gavage, the mice in other groups were given corresponding doses for drug intervention, once a day for two weeks. After administration, the frequency and total duration of status epilepticus (SE) of EP mice were observed; The Morris water maze test was performed to measure the cognitive function of mice; the enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in serum, superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in brain tissue; the Western blot was adopted to detect the expression of SIRT1 and ER stress-related proteins in brain tissue [transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP), immunoglobulin heavy chain binding protein (BIP), protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), phosphorylated PERK (p-PERK), eukaryotic

<sup>△</sup> 基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目(No. 20200188)

\* 主治医师。研究方向:脑血管病。E-mail:hebingbing374@163.com

# 通信作者:副主任医师。研究方向:脑血管病。E-mail:zxxyhb2022@163.com

translation initiation factor-2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) and phosphorylated eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ )]. RESULTS: Compared with the control group, the frequency of SE was increased, the total duration and escape latency of SE were prolonged, the IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in serum, the MDA, CHOP, BIP, p-PERK/PERK and p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  protein expression levels in brain tissue were increased, the number of times to swim across platform position was decreased, the SOD and SIRT1 protein expression levels in brain tissue were decreased in the model group, with statistically significant differences ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the frequency of SE was decreased, the total duration and escape latency of SE were shortened, the IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in serum, the MDA, CHOP, BIP, p-PERK/PERK and p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  protein expression levels in brain tissue were decreased, the number of times to swim across platform position was increased, the SOD and SIRT1 protein expression levels in brain tissue were increased in the AS low, medium and high dose groups and the positive control group, with statistically significant differences ( $P<0.05$ ), there were dose-dependent in the AS low, medium and high dose groups ( $P<0.05$ ); there was no statistical significance in differences in the above indicators between the AS high dose group and the positive control group ( $P>0.05$ ). CONCLUSIONS: AS can improve cognitive function, relieve inflammatory response and oxidative stress in EP mice, which may be related to activating the expression of SIRT1 protein and alleviating ER stress.

**KEYWORDS** Asiaticoside; Epileptic mice; Cognitive function; Inflammatory response; Oxidative stress; Silent information regulator 1/endoplasmic reticulum stress

目前癫痫(epilepsia, EP)的治疗以西药治疗为主,但仍有约1/3的患者无法利用药物控制EP,继而发展成为难治性EP,严重影响患者健康<sup>[1-2]</sup>。传统中药积雪草为伞形科植物积雪草的干燥全草,常用于调控神经系统、治疗精神类疾病。积雪草苷(AS)从积雪草中提取而来,具有抗氧化、保护缺氧心肌细胞、抗纤维化等药理作用,可用于心脑血管疾病的治疗,还可以增强痴呆患者的认知能力,但对于能否提高EP患者认知能力及相关机制鲜有报道<sup>[3-4]</sup>。沉默信息调节因子1(SIRT1)在细胞整个过程的发展中发挥重要作用。内质网(ER)存在于真核生物中,参与类固醇、蛋白质、脂质、糖原等合成,可以维持细胞稳态,而氧化应激、钙离子失衡等多种因素会引起内质网应激(ER stress)<sup>[5]</sup>。沉默信息调节因子1(SIRT1)是一种脱乙酰酶,参与细胞分化、增殖、衰老和凋亡的发生。Li等<sup>[6]</sup>的研究结果发现,激活SIRT1表达可以减轻ER stress,进而改善糖尿病小鼠的认知功能。但SIRT1/ER stress通路是否参与AS对EP的影响尚不清楚。本研究通过构建EP小鼠模型,探索AS对EP小鼠认知功能、炎症反应、氧化应激及SIRT1/ER stress通路蛋白的影响,以期对EP的治疗寻找新的潜在药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物: BALB/c 小鼠 60 只(北京脑科学与类脑研究中心提供), 雄性、清洁级、6 周龄, 体重 23~28 g, 动物生产许可证号为 SCXK(京)2020-0005。所有小鼠饲养于 22~25 ℃(温度)、55%~65%(湿度)环境中, 给予小鼠充足的光照、水及饲料。

1.1.2 仪器: Morris 水迷宫(型号: ACT-200A)、酶标仪(型号: Fax-20100)和凝胶成像系统(型号: Gelstudio)均购自张家港市青松生物医学仪器有限公司。

1.1.3 药品与试剂: AS(原料药, 纯度 $\geq 98.8\%$ , 批号为 JXC-02)购自桂林纽泰生物科技有限公司; 丙戊酸钠片(批号为 20210611, 规格为 0.2 g)购自湖南省湘中制药有限公司; 氯化锂溶液(批号为 TW2917)、匹罗卡品(批号为 TW2920)、白细胞介素 6(IL-6, 批号为 TW11676)、超氧化物歧化酶(SOD, 批

号为 TW12776)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒和蛋白提取试剂盒(批号为 TW19124)均购自上海通蔚实业有限公司; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ , 批号为 SP32174)、丙二醛(MDA, 批号为 SP38199)ELISA 试剂盒均购自武汉赛培生物科技有限公司; SIRT1(批号为 ab110304)、转录因子 C/EBP 同源蛋白(CHOP, 批号为 ab192591)、免疫球蛋白重链结合蛋白(BIP, 批号为 ab21685)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK, 批号为 ab229912)、磷酸化 PERK(p-PERK, 批号为 ab169528)、真核翻译起始因子-2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ , 批号为 ab30271)、磷酸化 eIF2 $\alpha$ (p-eIF2 $\alpha$ , 批号为 ab30276)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin, 批号为 ab19115)单克隆抗体均购自美国 Abcam 公司; 羊抗鼠二抗(批号为 SAB450017)购自上海易汇生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 EP 模型的制备: 所购小鼠适应性喂养 1 周后, 参照文献[7]的造模方法制备 EP 小鼠模型。经小鼠腹腔注射氯化锂溶液 180 mg/kg, 30 min 后腹腔注射匹罗卡品 30 mg/kg, 观察小鼠 EP 发作程度。EP 持续状态(SE)称为 EP 发作, 参照 Racine 分级标准<sup>[8]</sup>, 当 SE 不低于Ⅲ级发作视为造模成功。若小鼠未达到 Racine 分级Ⅲ级及以上标准, 则此后每隔 30 min 给予匹罗卡品追加剂量 10 mg/kg 腹腔注射, 直至出现 Racine 分级Ⅲ级及以上标准为止。匹罗卡品的最大注射剂量为 60 mg/kg, 若达到最大剂量仍未造模成功, 则更换新的小鼠重新造模, 造模过程小鼠无死亡。成功造模 50 只小鼠。

1.2.2 分组及给药: 将成功造模的 50 只小鼠随机分为模型组, AS 低、中及高剂量组, 阳性对照组, 每组 10 只。另取 10 只健康小鼠作为对照组(对照组小鼠仅按“1.2.1”中的方法腹腔注射等量 0.9%氯化钠溶液)。AS 低、中及高剂量组小鼠分别给予 20、40 及 80 mg/kg 的 AS 进行灌胃干预(AS 和蒸馏水相溶配制成质量浓度分别为 2、4 及 8 mg/mL 的溶液, 灌胃体积 10 mL/kg)<sup>[9]</sup>; 阳性对照组小鼠给予 0.2 g/kg 的丙戊酸钠进行灌胃干预(丙戊酸钠和蒸馏水相溶配制成质量浓度为 0.02 g/mL 的混悬液, 灌胃体积 10 mL/kg)<sup>[10]</sup>; 模型组、对照组小鼠灌胃等量蒸馏水; 1 日 1 次, 干预 2 周。

1.2.3 观察小鼠 SE 次数及总持续时间:观察并记录小鼠干预 2 周之后的第 1 日的 SE 次数及总持续时间。

1.2.4 小鼠认知功能检测:采用 Morris 水迷宫实验测定小鼠认知功能<sup>[11]</sup>。将水池等分为 I、II、III 和 IV 4 个象限,将平台置于第 I 象限中央并低于水面 2 cm,每日上下午从 II、III 和 IV 象限区域将小鼠放入水中,记录其寻找并爬上平台的时间为逃避潜伏期,该值越长表明小鼠的认知功能越差;若小鼠在 90 s 内仍未找到平台,则引导其找到平台,并记为 90 s,持续训练 4 d,每日训练 4 次,逃避潜伏期取 4 次的平均值。第 5 日撤去平台,记录 120 s 内小鼠游过平台位置的次数,游过的次数越少表明小鼠的认知功能越差。

1.2.5 ELISA 法检测小鼠血清中 IL-6、TNF-α 水平以及脑组织中 SOD、MDA 水平:待小鼠认知功能检测结束后,采用戊巴比妥钠麻醉小鼠,取眼部血液,离心用于 ELISA 法检测小鼠血清中 IL-6、TNF-α 水平。断头处死小鼠,解剖分离小鼠脑组织,离心取上清液,一部分用于 ELISA 法检测小鼠脑组织中 SOD、MDA 水平;另一部分储存于-80℃冰箱,用于后续蛋白质印迹法检测。

1.2.6 蛋白质印迹法检测小鼠脑组织中 SIRT1/ERstress 通路蛋白表达:取上述适量脑组织,提取总蛋白、检测总蛋白浓度,电泳分离目的蛋白,转膜,脱脂奶粉封闭。依次加入稀释的 SIRT1(1:500)、CHOP(1:500)、BIP(1:500)、PERK(1:300)、p-PERK(1:300)、eIF2α(1:400)、p-eIF2α(1:400)、β-actin(1:1000)一抗于 4℃冰箱中孵育过夜。洗膜后,加入二抗(1:2500)室温孵育 2 h,显色、拍照、收集图像,用 Image J 软件分析灰度值,得到目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验;*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 SE 次数和总持续时间比较

与对照组相比,模型组小鼠 SE 次数和总持续时间增加,差异均有统计学意义(*P*<0.05);与模型组相比,AS 低、中、高剂量组以及阳性对照组小鼠 SE 次数和总持续时间降低(*P*<0.05),AS 低、中及高剂量组呈剂量依赖性(*P*<0.05),差异均有统计学意义;AS 高剂量组与阳性对照组小鼠 SE 次数和总持续时间的差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

表 1 各组小鼠 SE 次数和总持续时间比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Tab 1 Comparison of frequency and total duration of SE in mice among each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | SE 次数/次                  | 总持续时间/min                |
|---------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组     | 0.00±0.00                | 0.00±0.00                |
| 模型组     | 55.23±8.53 <sup>a</sup>  | 59.94±10.91 <sup>a</sup> |
| AS 低剂量组 | 38.29±7.81 <sup>b</sup>  | 35.16±7.41 <sup>b</sup>  |
| AS 中剂量组 | 26.43±5.14 <sup>bc</sup> | 19.46±4.01 <sup>bc</sup> |
| AS 高剂量组 | 5.93±1.27 <sup>bcd</sup> | 2.45±0.25 <sup>bcd</sup> |
| 阳性对照组   | 5.72±1.13 <sup>bcd</sup> | 2.18±0.22 <sup>bcd</sup> |

注:与对照组相比,<sup>a</sup>*P*<0.05;与模型组相比,<sup>b</sup>*P*<0.05;与 AS 低剂量组相比,<sup>c</sup>*P*<0.05;与 AS 中剂量组相比,<sup>d</sup>*P*<0.05

Note:ns. control group, <sup>a</sup>*P*<0.05; ns. model group, <sup>b</sup>*P*<0.05; ns. AS low dose group, <sup>c</sup>*P*<0.05; ns. AS medium dose group, <sup>d</sup>*P*<0.05

2.2 各组小鼠认知功能比较

与对照组相比,模型组小鼠逃避潜伏期延长,游过平台位置的次数减少,差异均有统计学意义(*P*<0.05);与模型组相比,AS 低、中、高剂量组以及阳性对照组小鼠逃避潜伏期缩短,游过平台位置的次数增加(*P*<0.05),AS 低、中及高剂量组呈剂量依赖性(*P*<0.05),差异均有统计学意义;AS 高剂量组与阳性对照组小鼠逃避潜伏期和游过平台位置次数的差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表 2。

表 2 各组小鼠逃避潜伏期和游过平台位置次数比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 2 Comparison of escape latency and the number of times to swim across platform position of mice among each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | 逃避潜伏期/s                   | 游过平台位置的次数/次               |
|---------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组     | 12.02±1.24                | 14.19±3.46                |
| 模型组     | 68.16±8.83 <sup>a</sup>   | 3.89±0.81 <sup>a</sup>    |
| AS 低剂量组 | 49.84±7.01 <sup>b</sup>   | 6.71±1.12 <sup>b</sup>    |
| AS 中剂量组 | 32.29±5.23 <sup>bc</sup>  | 9.56±2.28 <sup>bc</sup>   |
| AS 高剂量组 | 15.46±2.25 <sup>bcd</sup> | 13.91±3.39 <sup>bcd</sup> |
| 阳性对照组   | 15.35±2.19 <sup>bcd</sup> | 13.53±3.60 <sup>bcd</sup> |

注:与对照组相比,<sup>a</sup>*P*<0.05;与模型组相比,<sup>b</sup>*P*<0.05;与 AS 低剂量组相比,<sup>c</sup>*P*<0.05;与 AS 中剂量组相比,<sup>d</sup>*P*<0.05

Note:ns. control group, <sup>a</sup>*P*<0.05; ns. model group, <sup>b</sup>*P*<0.05; ns. AS low dose group, <sup>c</sup>*P*<0.05; ns. AS medium dose group, <sup>d</sup>*P*<0.05

2.3 各组小鼠血清 IL-6、TNF-α 以及脑组织 SOD、MDA 水平比较

与对照组相比,模型组小鼠血清 IL-6、TNF-α 以及脑组织 MDA 水平升高,脑组织 SOD 水平降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);与模型组相比,AS 低、中、高剂量组以及阳性对照组小鼠血清 IL-6、TNF-α 和脑组织 MDA 水平降低,脑组织 SOD 水平升高(*P*<0.05),AS 低、中及高剂量组呈剂量依赖性(*P*<0.05),差异均有统计学意义;AS 高剂量组与阳性对照组小鼠血清 IL-6、TNF-α 以及脑组织 MDA、SOD 水平的差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表 3。

表 3 各组小鼠血清 IL-6、TNF-α 和脑组织 SOD、MDA 水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 3 Comparison of IL-6 and TNF-α levels in serum, SOD and MDA levels in brain tissue of mice among each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | IL-6/(pg/mL)              | TNF-α/(pg/mL)             | MDA/(nmol/mg)            | SOD/(U/mg)                  |
|---------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 对照组     | 21.34±3.64                | 28.09±4.81                | 1.73±0.29                | 210.56±29.08                |
| 模型组     | 121.18±18.23 <sup>a</sup> | 134.86±21.49 <sup>a</sup> | 7.86±1.67 <sup>a</sup>   | 64.59±8.47 <sup>a</sup>     |
| AS 低剂量组 | 86.49±10.67 <sup>b</sup>  | 85.49±9.61 <sup>b</sup>   | 5.84±1.34 <sup>b</sup>   | 95.64±11.61 <sup>b</sup>    |
| AS 中剂量组 | 54.29±8.43 <sup>bc</sup>  | 58.96±7.91 <sup>bc</sup>  | 2.59±0.50 <sup>bc</sup>  | 146.88±23.63 <sup>bc</sup>  |
| AS 高剂量组 | 24.01±4.41 <sup>bcd</sup> | 31.45±5.16 <sup>bcd</sup> | 1.85±0.42 <sup>bcd</sup> | 191.58±26.17 <sup>bcd</sup> |
| 阳性对照组   | 23.48±4.25 <sup>bcd</sup> | 30.97±5.03 <sup>bcd</sup> | 1.79±0.39 <sup>bcd</sup> | 189.19±26.98 <sup>bcd</sup> |

注:与对照组相比,<sup>a</sup>*P*<0.05;与模型组相比,<sup>b</sup>*P*<0.05;与 AS 低剂量组相比,<sup>c</sup>*P*<0.05;与 AS 中剂量组相比,<sup>d</sup>*P*<0.05

Note:ns. control group, <sup>a</sup>*P*<0.05; ns. model group, <sup>b</sup>*P*<0.05; ns. AS low dose group, <sup>c</sup>*P*<0.05; ns. AS medium dose group, <sup>d</sup>*P*<0.05

2.4 各组小鼠脑组织 SIRT1/ER stress 通路蛋白表达水平比较

与对照组相比,模型组小鼠脑组织 SIRT1 蛋白表达水平降低,CHOP、BIP、p-PERK/PERK 和 p-eIF2α/eIF2α 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义(*P*<0.05);与模型组相比,AS 低、中、高剂量组以及阳性对照组小鼠脑组织 SIRT1 蛋白

表达水平升高,CHOP、BIP、p-PERK/PERK、p-eIF2α/eIF2α 蛋白表达水平降低 ( $P<0.05$ ),AS 低、中及高剂量组呈剂量依赖性 ( $P<0.05$ ),差异均有统计学意义;AS 高剂量组与阳性对照组小鼠脑组织 SIRT1、CHOP、BIP、p-PERK/PERK 和 p-eIF2α/eIF2α 蛋白表达水平的差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ),见图 1、表 4。

3 讨论

EP 是一种因大脑神经元同步异常放电而引发的慢性神经系统疾病,不仅影响患者的生活质量,还会伴随抑郁、认知缺陷和焦躁等并发症的出现<sup>[12]</sup>。目前,治疗 EP 的药物易产生精神和运动等方面的不良反应,且 30%的患者会对 EP 治疗药物产生耐药性,故寻求临床不良反应低的潜力药物和疗法非常重要<sup>[13]</sup>。氯化锂-匹罗卡品联合使用可造成动物中枢神经系统兴奋,在短时间内产生 EP 症状,引发呼吸障碍、脑组织缺血缺氧,促使炎症反应、氧化应激发生,导致脑神经细胞凋亡,损坏认知功能<sup>[14]</sup>。本研究采用腹腔注射氯化锂-匹罗卡品建立 EP 小鼠模型,当 SE 不低于Ⅲ级发作时,表明造模成功,可用于下一步的研究。

积雪草是《中华人民共和国药典:一部》(2010 年)收载的中药,味苦、辛,性寒,有清热利湿、解毒消肿的功效,常用于治疗皮肤创伤、痈疽、热证等,具有较广的药用价值,AS 是积

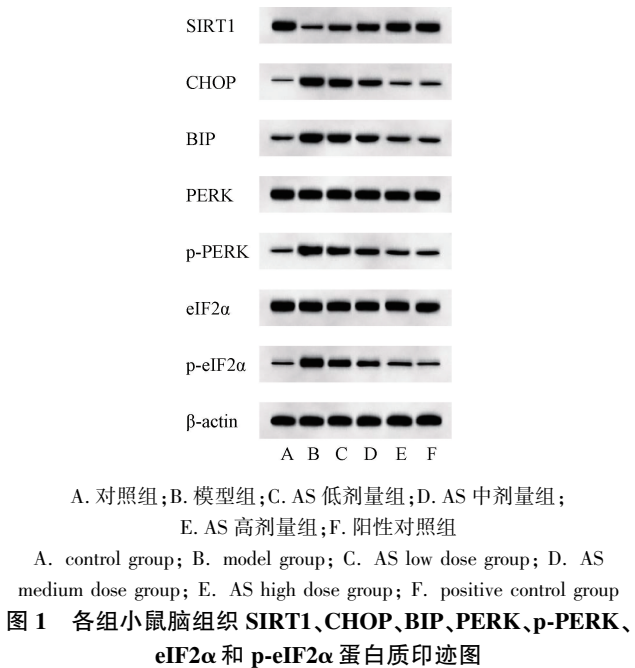


Fig 1 Diagram of Western blot of SIRT1, CHOP, BIP, PERK, p-PERK, eIF2α, p-eIF2α in brain tissue of mice in each group

表 4 各组小鼠脑组织 SIRT1/ER stress 通路蛋白表达水平比较 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

| 组别      | SIRT1/β-actin            | CHOP/β-actin             | BIP/β-actin              | p-PERK/PERK              | p-eIF2α/eIF2α            |
|---------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组     | 1.05±0.19                | 0.18±0.03                | 0.26±0.03                | 0.24±0.04                | 0.16±0.02                |
| 模型组     | 0.35±0.05 <sup>a</sup>   | 0.96±0.12 <sup>a</sup>   | 1.01±0.14 <sup>a</sup>   | 0.98±0.13 <sup>a</sup>   | 0.89±0.10 <sup>a</sup>   |
| AS 低剂量组 | 0.58±0.07 <sup>b</sup>   | 0.78±0.10 <sup>b</sup>   | 0.88±0.12 <sup>b</sup>   | 0.77±0.11 <sup>b</sup>   | 0.62±0.07 <sup>b</sup>   |
| AS 中剂量组 | 0.76±0.08 <sup>bc</sup>  | 0.58±0.09 <sup>bc</sup>  | 0.63±0.09 <sup>bc</sup>  | 0.52±0.08 <sup>bc</sup>  | 0.44±0.05 <sup>bc</sup>  |
| AS 高剂量组 | 0.98±0.13 <sup>bcd</sup> | 0.25±0.05 <sup>bcd</sup> | 0.36±0.06 <sup>bcd</sup> | 0.32±0.05 <sup>bcd</sup> | 0.21±0.03 <sup>bcd</sup> |
| 阳性对照组   | 1.02±0.15 <sup>bcd</sup> | 0.23±0.04 <sup>bcd</sup> | 0.32±0.05 <sup>bcd</sup> | 0.31±0.05 <sup>bcd</sup> | 0.19±0.02 <sup>bcd</sup> |

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 AS 低剂量组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与 AS 中剂量组相比,<sup>d</sup> $P<0.05$

Note:zs. control group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; zs. model group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; zs. AS low dose group, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; zs. AS medium dose group, <sup>d</sup> $P<0.05$

雪草中的活性成分<sup>[3]</sup>。Zhang 等<sup>[15]</sup>的研究结果发现,在脑缺血再灌注损伤模型中,AS 降低了细胞凋亡、炎症和氧化应激水平,为治疗脑损伤提供了新途径。Guo 等<sup>[16]</sup>的研究结果证明,AS 可以减轻自噬体的形成以及自发改变行为的损伤,可有效预防大鼠脑缺血介导的认知障碍和神经元损伤。在 EP 发病过程中,过度兴奋的大脑神经元会刺激炎症细胞释放大量的炎症因子,引发一系列炎症反应进而导致细胞损伤,其中 TNF-α 作为炎症趋化因子,可导致炎症级联反应,进而加剧炎症损伤;IL-6 的释放将导致大量活性氧产生,进一步加重氧化应激损伤。一旦有大量活性氧生成,便会加大 SOD 需求量,活性氧破坏分子结构,产生 MDA,因此,SOD、MDA 含量在一定程度上代表氧化应激的反应程度<sup>[17]</sup>。本研究结果发现,模型组小鼠 SE 次数和总持续时间、逃避潜伏期,血清 IL-6、TNF-α 水平,以及脑组织 MDA 水平高于对照组,游过平台位置的次数少于对照组,脑组织 SOD 水平低于对照组;经 AS 干预后,小鼠 SE 次数和总持续时间、逃避潜伏期,血清 IL-6、TNF-α,以及脑组织 MDA 水平降低,游过平台位置的次数增加,脑组织 SOD 水平升高。表明 AS 可以降低炎症反应、氧化应激程度,改善 EP 小鼠的症状及认知功能,但具体研究机制还有待探索。

SIRT1 是广泛分布于细胞内、生物学功能较广的一种酶。研究结果表明,上调 SIRT1 的表达对醋酸铅诱导的小鼠认知障碍,具有保护作用<sup>[18]</sup>。ER stress 是由细胞内环境失衡造成的亚细胞器发病过程,与 EP 脑损伤中异常蛋白质的加工密切相关<sup>[19]</sup>。Zhang 等<sup>[20]</sup>研究结果发现,补肾益智方可以通过增加 SIRT1 的蛋白质表达,降低 ER stress 相关蛋白表达,改善小鼠认知功能障碍。本研究结果发现,模型组小鼠脑组织 SIRT1 蛋白表达水平低于对照组,CHOP、BIP、p-PERK/PERK 和 p-eIF2α/eIF2α 蛋白表达水平高于对照组;经 AS 干预后,小鼠脑组织 SIRT1 蛋白表达水平升高,CHOP、BIP、p-PERK/PERK 和 p-eIF2α/eIF2α 蛋白表达水平降低。表明 AS 可以激活 EP 小鼠 SIRT1 蛋白表达,缓解脑组织 ER stress。

综上所述,AS 可以改善 EP 小鼠的认知功能,降低小鼠的炎症反应及氧化应激程度,可能与激活 SIRT1 蛋白表达、缓解 ER stress 有关。但由于 EP 作用机制复杂,进一步的机制有待研究。

参考文献

[1] BRIGO F, MARSON A. Approach to the medical treatment of epilepsy[J]. Continuum (Minneapolis), 2022, 28(2): 483-

- [2] WILLEMS L M, BAUER S, ROSENOW F, et al. Recent advances in the pharmacotherapy of epilepsy: brivaracetam and perampanel as broad-spectrum antiepileptic drugs for the treatment of epilepsies and status epilepticus[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2019, 20(14): 1755-1765.
- [3] 秦慧真, 林思, 邓玲玉, 等. 积雪草苷的药理作用及机制研究进展[J]. *中国药房*, 2021, 32(21): 2683-2688.
- [4] 邢晨, 张振玲. 积雪草苷药理作用的分子信号通路[J]. *中国工业医学杂志*, 2021, 34(2): 126-128.
- [5] TANG Y, ZHOU X, CAO T, et al. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Inflammatory Diseases[J]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41(11): 924-934.
- [6] LI H Y, WANG X C, XU Y M, et al. Berberine improves diabetic encephalopathy through the SIRT1/ER stress pathway in *db/db* mice[J]. *Rejuvenation Res*, 2018, 21(3): 200-209.
- [7] 王芳, 侯自立, 韩冰, 等. 桑椹花青素-3-葡萄糖苷对癫痫模型小鼠的保护作用及海马 BDNF/TrkB 通路的影响[J]. *中国药房*, 2020, 31(3): 335-339.
- [8] PHELAN K D, SHWE U T, WILLIAMS D K, et al. Pilocarpine-induced status epilepticus in mice: a comparison of spectral analysis of electroencephalogram and behavioral grading using the Racine scale[J]. *Epilepsy Res*, 2015, 117: 90-96.
- [9] 朱德伟, 沈云辉. 积雪草苷对平阳霉素诱导的大、小鼠肺纤维化的保护作用[J]. *上海中医药大学学报*, 2020, 34(6): 41-46.
- [10] 朱晓煜, 聂玲辉, 丁月文, 等. 柴胡疏肝汤对颞叶癫痫小鼠的脑保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(10): 1158-1162.
- [11] 屠海军, 何杰, 周建伟. 丙泊酚麻醉对大鼠认知功能的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(12): 1682-1685.
- [12] KAESTNER E, REYES A, WANG Z I, et al. Topological alterations in older adults with temporal lobe epilepsy are distinct from amnesic mild cognitive impairment[J]. *Epilepsia*, 2020, 61(11): e165-e172.
- [13] 亓蕾, 杜佳琳, 任连坤. 药物难治性癫痫的精准外科治疗进展[J]. *中华医学杂志*, 2021, 101(41): 3433-3437.
- [14] 江冉冉, 王莉平, 李晓东, 等. 藏红花素对氯化锂-匹罗卡品致痫大鼠的脑保护作用及机制研究[J]. *中医药导报*, 2021, 27(6): 10-14, 30.
- [15] ZHANG C H, CHEN S Y, ZHANG Z X, et al. Asiaticoside alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury via NOD2/mitogen-activated protein kinase (MAPK)/nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e920325.
- [16] GUO M, XU J M, WANG S W, et al. Asiaticoside reduces autophagy and improves memory in a rat model of dementia through mTOR signaling pathway regulation[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3): 645.
- [17] 管萍, 刘文娟, 卢鹏超, 等. 基于 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  通路探究葛根素减轻癫痫小鼠症状的机制[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(14): 1706-1710, 1716.
- [18] REN Y F, SUN-WATERHOUSE D X, OUYANG F X, et al. Apple phenolic extracts ameliorate lead-induced cognitive impairment and depression- and anxiety-like behavior in mice by abating oxidative stress, inflammation and apoptosis via the miR-22-3p/SIRT1 axis[J]. *Food Funct*, 2022, 13(5): 2647-2661.
- [19] YUE J, WEI Y J, YANG X L, et al. NLRP3 inflammasome and endoplasmic reticulum stress in the epileptogenic zone in temporal lobe epilepsy: molecular insights into their interdependence[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2020, 46(7): 770-785.
- [20] ZHANG S J, XU T T, LI L, et al. Correction: Bushen-Yizhi formula ameliorates cognitive dysfunction through SIRT1/ER stress pathway in SAMP8 mice[J]. *Oncotarget*, 2020, 11(27): 2684-2685.

(收稿日期:2022-05-11 修回日期:2022-07-21)

(上接第 1458 页)

- [15] KORB D R, GREINER J V, HERMAN J P, et al. Lid-wiper epitheliopathy and dry-eye symptoms in contact lens wearers[J]. *CLAO J*, 2002, 28(4): 211-216.
- [16] LEONARD J P, TRNENY M, IZUTSU K, et al. AUGMENT: a phase III study of lenalidomide plus rituximab versus placebo plus rituximab in relapsed or refractory indolent lymphoma[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(14): 1188-1199.
- [17] ZHANG L, ZHOU S X, ZHOU T J, et al. Potential of the tumor-derived extracellular vesicles carrying the miR-125b-5p target TNFAIP3 in reducing the sensitivity of diffuse large B cell lymphoma to rituximab[J]. *Int J Oncol*, 2021, 58(6): 31.
- [18] ATISHA-FREGOSO Y, MALKIEL S, HARRIS K M, et al. Phase II randomized trial of rituximab plus cyclophosphamide followed by belimumab for the treatment of lupus nephritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73(1): 121-131.
- [19] CHISARI C G, SGARLATA E, ARENA S, et al. Rituximab for the treatment of multiple sclerosis: a review[J]. *J Neurol*, 2022, 269(1): 159-183.
- [20] NG C C, SY A, CUNNINGHAM E T Jr. Rituximab for non-infectious uveitis and scleritis[J]. *J Ophthalmic Inflamm Infect*, 2021, 11(1): 23.
- [21] VIVINO F B, CARSON S E, FOULKS G, et al. New treatment guidelines for Sjögren's disease[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2016, 42(3): 531-551.
- [22] KLINOWSKI G, GOZZI F, TRENTACOSTI F, et al. Rituximab for the treatment of acute onset interstitial lung disease in primary Sjögren's syndrome[J]. *Pulmonology*, 2021, 27(6): 575-578.
- [23] DE WOLFF L, ARENDS S, PONTARINI E, et al. Development and performance of the clinical trials ESSDAI (ClinTrialsESSDAI), consisting of frequently active clinical domains, in two randomised controlled trials in primary Sjögren's syndrome[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2021, 39 Suppl 133(6): 100-106.
- [24] GANDOLFO S, DE VITA S. Double anti-B cell and anti-BAFF targeting for the treatment of primary Sjögren's syndrome[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37 Suppl 118(3): 199-208.
- [25] CERUTTI M L, PESCE A, BÈS C, et al. Physicochemical and biological characterization of RTX83, a new rituximab biosimilar[J]. *BioDrugs*, 2019, 33(3): 307-319.

(收稿日期:2022-04-21 修回日期:2022-06-26)