

左乙拉西坦及辛伐他汀对癫痫持续状态大鼠 脑保护作用的实验研究

李梦秋, 张文武, 陈 涛, 刘 凌[△]

四川大学华西医院 神经内科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨左乙拉西坦、辛伐他汀单用或联用对癫痫持续状态(SE)模型大鼠的早期神经保护作用及其相关机制。**方法** 利用氯化锂-匹鲁卡品制作 SE 大鼠模型,将造模成功的大鼠分为 4 组,采用不同的处理方式(生理盐水即模型组、左乙拉西坦、辛伐他汀、左乙拉西坦+辛伐他汀),同时设空白对照组,将各组大鼠处死后取脑组织,采用免疫组化尼氏染色检测大鼠海马区神经元细胞形态及数量;Western blot 检测大鼠海马区 calpain-1 蛋白表达。**结果** 免疫组化尼氏染色结果显示:与空白对照组相比,模型组大鼠海马区神经元变性,存活神经元细胞减少甚至消失,正常结构消失,表明 SE 后 24 h,大鼠海马区神经元受到了严重损伤;与模型组比较,辛伐他汀组大鼠海马区神经元减少甚至消失,排列疏松紊乱,但差异无统计学意义,表明辛伐他汀不能改变海马神经元损伤;与模型组比较,左乙拉西坦组及左乙拉西坦+辛伐他汀组大鼠海马区神经元排列尚紧密,基本保持有序,说明左乙拉西坦单用或联用辛伐他汀均能明显减少海马神经元死亡,改变海马神经元变性,差异有统计学意义($P<0.05$),但两种处理方式之间差异无统计学意义;Western blot 结果显示,与空白对照组比较,模型组大鼠海马区 calpain-1 蛋白表达显著增高,说明 calpain-1 可能参与到 SE 神经系统损伤的病理生理机制中;与模型组比较,辛伐他汀、左乙拉西坦、辛伐他汀+左乙拉西坦组 calpain-1 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$),表明辛伐他汀、左乙拉西坦及两种药物联用均能通过降低 calpain-1 蛋白表达,一定程度地抑制神经兴奋毒性损伤通路。**结论** 左乙拉西坦可能通过抑制 calpain-1 发挥早期(SE 后 24 h)神经保护作用,然而左乙拉西坦联用辛伐他汀并未发挥更优的作用,辛伐他汀没有早期神经保护作用。

【关键词】 癫痫持续状态 海马 左乙拉西坦 辛伐他汀 Calpain-1

Protective Effects of Levetiracetam and Simvastatin on Pilocarpine-induced Epilepsy in Rat Models LI Meng-qiu, ZHANG Wen-wu, CHEN Tao, LIU Ling[△]. Department of Neurology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: zjllxx1968@163.com

【Abstract】 Objective To determine neuroprotective properties of levetiracetam and simvastatin using rats with pilocarpine-induced epilepsy. **Methods** Epileptic rat models were randomly divided into 4 groups, each being exposed to saline, simvastatin, levetiracetam, or levetiracetam + simvastatin. Brain tissues of the rats were examined. Nissl staining was used to determine pilocarpine-induced neuronal loss in CA1 and CA3 of hippocampus. Western blot was used to detect calpain-1 expression of hippocampus. **Results** Severe cell death was found 24 h after seizures, with a level significantly higher than the controls. Compared with the saline-treated cells, simvastatin did not decrease severe cell death ($P>0.05$), but levetiracetam and levetiracetam + simvastatin decreased severe cell death 24 h after seizures ($P<0.05$). No significant differences were found between those treated with levetiracetam and those with levetiracetam + simvastatin. Compared with controls, overexpressed calpain-1 was found in the rats 24 h after seizures, which indicates that calpain-1 may be involved in the pathophysiological mechanisms of epilepsy. Compared with those treated with pilocarpine + saline, simvastatin, levetiracetam and levetiracetam + simvastatin reduced the level of calpain-1 24 h after seizures ($P<0.05$). **Conclusion** Levetiracetam, not simvastatin, possesses neuroprotective properties, through changing calpain-1 expression levels. But levetiracetam plus simvastatin treatment does not have advantages over the choice of monotherapy. Simvastatin does not possess neuroprotective properties at the early stage of epilepsy.

【Key words】 Status epilepsy Hippocampus Simvastatin Levetiracetam Calpain-1

癫痫持续状态(status epilepticus, SE)是指癫痫持续发作 5 min 以上未自行终止,或频繁发作,发作间期意识尚未完全恢复,该病的致残率和病死率

很高,是常见的一种神经内科急症^[1]。研究发现 SE 与神经元的损伤密切相关,尤其是海马区^[2]。神经元损伤伴随而来的是学习记忆功能障碍、局灶性神经系统损伤及慢性癫痫反复发作等。同时相关病理生理机制也受到广泛关注,其中较为重要的一个机

制是神经元兴奋毒性损伤^[3,4]。左乙拉西坦是一种新型抗癫痫药物,不仅可以抑制神经元的高度同步化作用^[5],而且能够阻断 N 型钙通道^[6],同时该药物临床有效剂量即可阻断神经元的高电压激活钙通道(HVA)型钙通道^[7]。近来相关研究报道指出,他汀类药物可以选择性地调控钙蛋白酶介导的一系列神经元存活相关分子的阻断过程,从而发挥其神经保护作用^[8]。迄今为止,左乙拉西坦联用辛伐他汀较单药治疗是否对啮齿类 SE 动物模型具有更优的早期神经保护作用尚不明确。本研究以锂-匹鲁卡品所致的 SE 大鼠为动物模型,检测上述两种药物单独及联合使用是否具有早期脑保护作用并分析其相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用雄性 Wistar 大鼠($n=30$)经四川大学动物实验伦理委员会批准,于四川大学实验动物中心所提供场地进行饲养和相关实验操作,我们以标准环境[12 h 的昼夜规律,(23 ± 1) °C,(55 ± 6)%湿度]饲养大鼠,并且按照国际标准进行所有的实验操作,最大限度地减少实验动物的数量以及痛苦。

1.2 实验分组和不同药物处理

将大鼠分为 5 组(每组 6 只):空白对照组,SE+生理盐水组(即模型组),SE+辛伐他汀组(10 mg/kg,qd,杭州默沙东制药有限公司),SE+左乙拉西坦组(200 mg/kg,bid,比利时优时比制药公司),SE+辛伐他汀+左乙拉西坦组。空白对照组腹腔注射生理盐水。后 4 组为实验组,分别以灌胃饲药物不同分组。大鼠腹腔注射匹鲁卡品后即灌胃饲以不同药物,发作达到 4 级或 5 级的大鼠最终纳入相应实验组。SE 后 24 h 处死。

1.3 氯化锂-匹鲁卡品致颞叶 SE 大鼠模型制备

首先向大鼠腹腔注射氯化锂(127 mg/kg,湖北兴银河化工有限公司)进行预处理,18~24 h 后加以硫酸阿托品腹腔注射(1 mg/kg),以拮抗匹鲁卡品的外周胆碱能反应,观察 30 min 后大鼠腹腔注射匹鲁卡品(30 mg/kg),空白对照组大鼠以生理盐水替代匹鲁卡品腹腔注射^[9]。严密观察大鼠的行为学改变,并根据 Racine 评分标准判定大鼠癫痫发作级别:0 级,未见抽搐发作;1 级,固定不动,触须颤动,嗅探,咀嚼运动及面部抽动;2 级,面部阵挛和有规律的点头;3 级,单侧前肢阵挛;4 级,双侧前肢阵挛同时伴有站立行为;5 级,在以上所有表现的基础上

失去平衡,出现跌倒^[10]。发作达到 4 级或 5 级的大鼠最终纳入后续实验。

1.4 组织标本制备

大鼠 SE 持续 60 min 之后,腹腔注射水合氯醛(10 mg/kg,湖北兴银河化工有限公司)终止发作。在 SE 后 24 h 处死大鼠。一部分大鼠(共 15 只,每组 3 只)以 10%水合氯醛腹腔注射(300 mg/kg)麻醉,经心脏至升主动脉插管,以止血钳固定心脏,并剪开右心耳,随即用 150~250 mL 生理盐水冲洗,直至流出无色生理盐水后,再灌注 4%多聚甲醛(体积分数,pH7.2~7.5)500 mL 内固定,解剖取脑并将其置于 4%多聚甲醛固定液 24 h 以充分固定,随后梯度酒精脱水、石蜡包埋,制作石蜡切片(片厚 5 μ m),石蜡切片经水浴烫片后,贴在预先以多聚赖氨酸处理过的载玻片上。60 °C 1 h,37 °C 烘箱过夜。每只大鼠取 5 张切片,用硫堇染料(Thionin)行免疫组化 Nissl 染色。另一部分(共 15 只,每组 3 只)大鼠麻醉后断颈处死,直接取出脑组织,分离海马组织标本后立刻保存于-80 °C 液氮内,留作 Western bolt 实验用。

1.5 免疫组化染色

采用 Nissl 染色法。将切片脱蜡至水后,浸入 5 g/L 硫堇水溶液中,随即置于 37 °C 温箱内 20 min。切片取出冷却后加以蒸馏水洗涤,并且以体积分数 0.70 的乙醇溶液分色后,再用 50 g/L 伊红乙醇溶液复染。然后分别以体积分数为 0.95、0.95、1.00、1.00 的乙醇溶液脱水。最后二甲苯透明,加以中性树胶封片在海马 CA1、CA3 区分别用 40 倍物镜随机取 5 个视野计数正常结构神经元,取均数作为此切片该区域的得数。

1.6 Western blot 检测 calpain-1 蛋白表达

称取 0.1 g 脑组织,放入装有 1 mL RIPA 裂解液和 10 μ L PMSF(RIPA:PMSF=100:1)的匀浆器内,冰上匀浆后,低温高速离心(4 °C,12 000 r/min,10 min),取上清,以 BCA 法进行蛋白定量,取出样品加以 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,煮沸使蛋白变性。取预染蛋白 Marker 5 μ L(中杉金桥)和 40 μ g 蛋白样品上样电泳(100 g/L SDS-PAGE 凝胶),电压 120 V,1 h。转印至 PVDF 膜(300 mA,1 h),5%脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h,加入 calpain-1 一抗(1:1 000;ab39170,abcam,香港)或 β -actin 一抗(1:200;sc-47778;Santa Cruz,CA,USA)4 °C 孵育过夜,后加入相应的二抗(1:5 000)室温孵育 1 h。ECL 化学发光法显色,结果经自动电泳凝胶成

像分析仪采集,通过 Quantity one 采图分析软件得出每个条带的平均光密度(AOD)值(每个目的条带与相应的 β -actin AOD 值的比值)。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本间均数比较采用 One-way ANOVA, 两两组间比较采用 Donnet-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组间海马区存活神经元比较

尼氏染色结果(附表和图 1)显示:空白对照组海马 CA1、CA3 区锥体细胞排列整齐,边缘清晰,形似多角型,中有核仁,顶树 μ 突向内层放射状伸展。与空白对照组相比,模型组大鼠海马 CA1 区神经元坏死,正常结构消失,大量固缩浓染的坏死神经元,且排列疏松紊乱,CA3 区神经元损伤明显,神经元胞体肿胀,数目减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),但整体情况较 CA1 区轻,说明 SE 后 24 h,大鼠海马区神经元受到了严重损伤;而 SE+辛伐他汀组海马神经元损伤情况与模型组比较,差异无统计学意义,说明辛伐他汀无 SE 早期脑保护作用;除此之外,SE+左乙拉西坦组和 SE+左乙拉西坦+辛伐他汀组海马神经元细胞排列基本整齐、紧密、有序,极少数散在神经元细胞核固缩、胞浆深染,甚至核碎裂,损伤较模型组、SE+辛伐他汀组轻($P < 0.05$),这表明左乙拉西坦及左乙拉西坦联用辛伐他汀均有 SE 早期脑保护作用,但两组之间差异无统计学意义。

附表 各组海马区存活神经元

Table Survival neuros in hippocampal CA1 and CA3 regions		
Group	CA1	CA3
A	38.50±2.85	22.90±2.71
B	1.86±1.02*	16.50±1.89*
C	4.20±1.01*	18.70±1.95*
D	37.30±3.56#	20.40±2.06#
E	37.20±2.79#	21.10±1.83#

A: Control group; B: Pilocarpine + saline group; C: Pilocarpine + simvastatin group; D: Pilocarpine + levetiracetam group; E: Pilocarpine+levetiracetam+simvastatin group. * $P < 0.05$, vs. A group; # $P < 0.05$, vs. B group

2.2 各组间海马区 calpain-1 蛋白的表达

见图 2。与空白对照组相比,模型组 calpain-1 蛋白表达明显增高($P < 0.05$),说明 calpain-1 可能参与到 SE 神经系统损伤的病理生理机制中。与模型组比较,SE+辛伐他汀组、SE+左乙拉西坦组及 SE+左乙拉西坦+辛伐他汀组均能降低氯化锂-匹

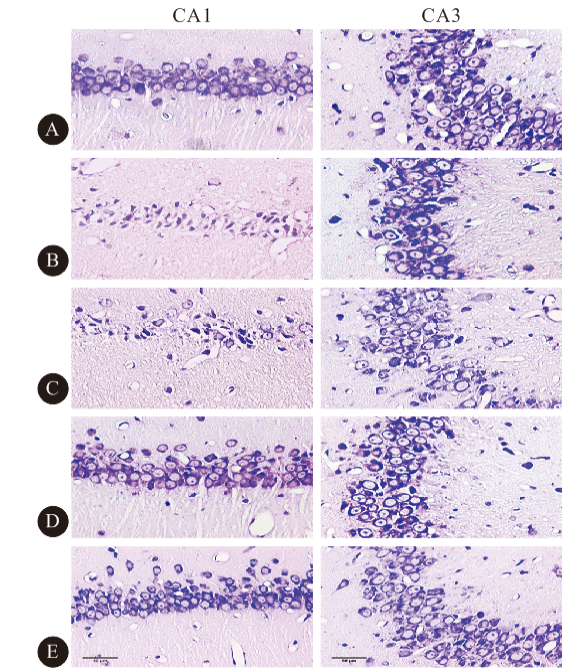


图 1 大鼠海马显示 CA1、CA3 区存活神经元。Nissl 染色 $\times 400$
Fig 1 Nissl staining was used to determine survival neurons in CA1 and CA3 of hippocampus in rats. $\times 400$

A: Control group; B: Pilocarpine+saline group; C: Pilocarpine + simvastatin group; D: Pilocarpine + levetiracetam group; E: Pilocarpine+levetiracetam+simvastatin group

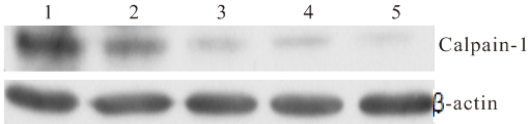


图 2 大鼠海马区 calpain-1 蛋白表达
Fig 2 Calpain-1 expressions in hippocampus of rats
1: Pilocarpine + saline group; 2: Pilocarpine + simvastatin group; 3: Pilocarpine + levetiracetam group; 4: Pilocarpine + levetiracetam+simvastatin group; 5: Control group

鲁卡品所致 SE 大鼠模型海马区 calpain-1 蛋白表达($P < 0.05$),这表明辛伐他汀、左乙拉西坦及两种药物联用均能通过降低 calpain-1 蛋白表达,一定程度上抑制神经兴奋毒性损伤通路。

3 讨论

研究显示,左乙拉西坦不仅可以抑制神经元的高度同步化作用^[11],而且能够阻断 N 型钙通道^[5],同时该药物临床有效剂量即可阻断神经元的 HVA 型钙通道^[6]。左乙拉西坦能在 SE 后 6 h 有效改善喹啉酸点燃所致的大鼠海马神经元细胞减少^[12]。这表明 SE 及时应用左乙拉西坦可以收到早期神经保护作用。研究还显示,辛伐他汀连用 14 d 或者 4~6 月后能明显减少海马神经元丢失、抑制星型胶质细

胞增生,具有长期脑保护作用^[13]。该脑保护作用与辛伐他汀保护大脑神经元免于遭受 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA)的兴奋性毒性作用有关^[14]。此类药物可能是通过调节 sAPP 来实现神经保护作用,后者可以使钙蛋白酶所致的蛋白质降解作用衰减。既往研究显示左乙拉西坦及辛伐他汀可以分别作用于神经兴奋毒性通路的上游钙通道及下游酶通路,所以我们在本次实验中针对 SE 大鼠,观察早期左乙拉西坦、辛伐他汀单用及两药联用的脑保护效果及作用机制。实验结果发现,对于氯化锂-匹鲁卡品诱发成功的 SE 大鼠模型所致海马 CA1、CA3 区神经元损伤、死亡等,左乙拉西坦单药或联用辛伐他汀均可以起到明显的早期(SE 后 24 h)神经保护,然而辛伐他汀单药治疗除了发现有降低神经兴奋毒性通路下游酶 calpain-1 蛋白表达外,并未发现对神经元早期保护作用,这可能与本次实验药物作用时间较短有关,辛伐他汀间接阻断下游酶通道实现神经保护作用目的,需要建立在累积作用时间及作用强度的条件之上,超过临界值才能发挥作用,所以这也可能是其早期神经保护受到限制的部分原因。本研究表明左乙拉西坦可以通过阻断 calpain-1 来发挥神经保护作用,可能与抑制多种钙通道,阻断神经兴奋毒性通路中钙离子内流途径继而抑制下游酶激活,从而发挥其神经保护作用有关。这表明抑制上游钙通道较抑制下游酶通道能更早发挥神经保护作用,并且左乙拉西坦的抗惊厥作用也可以减少脑皮层放电程度来抑制继发神经元损害。但是左乙拉西坦与辛伐他汀联用并未发挥神经兴奋毒性通路协同阻断作用而达到更优的神经保护目的,其原因是联合用药协同作用的有效性 with 药物作用时间、作用强度均密切相关。左乙拉西坦与辛伐他汀两者长期联用是否能收到满意的效果仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- Brophy GM, Bell R, Claassen J, *et al.* Guidelines for the evaluation and management of status epilepticus. *Neurocrit Care*, 2012; 17(1): 3-23.
- Nairismagi J, Grohn OH, Kettunen MI, *et al.* Progression of brain damage after status epilepticus and its association with epileptogenesis: a quantitative MRI study in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2004; 45(9): 1024-1034.
- Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 2003; 34(4-5): 325-337.
- Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: Implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*, 2003; 28(10): 1563-1574.
- Margineanu DG, Klitgaard H. Inhibition of neuronal hypersynchrony *in vitro* differentiates levetiracetam from classical antiepileptic drugs. *Pharmacol Res*, 2000; 42(4): 281-285.
- Zona C, Niespodziany I, Marchetti C, *et al.* Levetiracetam does not modulate neuronal voltage-gated Na⁺ and T-type Ca²⁺ currents. *Seizure*, 2001; 10(4): 279-286.
- Niespodziany I, Klitgaard H, Margineanu DG. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca²⁺ current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*, 2001; 306(1-2): 5-8.
- Ma T, Zhao Y, Kwak YD, *et al.* Statin's excitoprotection is mediated by sAPP and the subsequent attenuation of calpain-induced truncation events, likely via Rho-ROCK signaling. *J Neurosci*, 2009; 29(36): 11226-11236.
- 陈刚, 邓艳春, 王小木等. 癫痫大鼠海马神经元和星形胶质细胞的病理演变. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2007; 6(3): 229-232.
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation, II: motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972; 32: 281-294.
- Xie C, Sun J, Qiao W, *et al.* Administration of simvastatin after kainic acid-induced status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. *PLoS One*, 2011; 6(9): e24966. doi:10.1371/journal.pone.0024966. Epub 2011 Sep 19.
- Marini H, Costa C, Passaniti M, *et al.* Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life Sci*, 2004; 74(10): 1253-1264.
- Stępień K, Tomaszewski M, Czuczwar SJ. Neuroprotective properties of statins. *Pharmacol Rep*, 2005; 57(5): 561-569.
- Ramirez C, Tercero I, Pineda A, *et al.* Simvastatin is the statin that most efficiently protects against kainate-induced excitotoxicity and memory impairment. *J Alzheimers Dis*, 2011; 24(1): 161-174.

(2014-06-18 收稿, 2014-10-20 修回)

编辑 汤洁