

# 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<sup>A</sup>

王芳<sup>1\*</sup>, 侯自立<sup>2</sup>, 韩冰<sup>1</sup>, 解国圣<sup>1</sup>, 张艳玲<sup>1#</sup> (1.邢台市人民医院儿三科, 河北邢台 054000; 2.邢台市人民医院药剂科, 河北邢台 054000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)03-0335-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.03.16

**摘要** 目的:研究桑椹花青素-3-葡萄糖苷对癫痫模型小鼠的保护作用及海马脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸激酶受体B(TrkB)通路的影响。方法:将120只C57BL/6小鼠随机分为正常组、模型组、单药(桑椹花青素-3-葡萄糖苷)和激动剂联用组(桑椹花青素-3-葡萄糖苷+TrkB激动剂LM22B-10),每组30只。单药组和激动剂联用组小鼠每天灌胃600 μg/kg桑椹花青素-3-葡萄糖苷1次,连续给药6周,激动剂联用组小鼠在给药第6周时每天侧脑室注入LM22B-10(5 mg/kg)1次;正常组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水。末次给药后,除正常组外,其余各组小鼠均采用氯化锂-匹罗卡品建立癫痫模型。造模成功后,各组分别取10只小鼠记录其癫痫自发性再发作的潜伏期、发作频率及持续时间,每天观察6 h,连续观察4周;并于造模第14、28、36天记录其脑电图,统计1 h内脑电波异常发生次数。于造模后第6天,各组分别取10只小鼠检测其血清钙离子水平,并取各组剩余10只小鼠检测其海马组织中BDNF mRNA及蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠癫痫自发性再发作的潜伏期、发作频率、持续时间及造模第14、28、36天脑电波异常发生次数均显著增加( $P<0.05$ ),血清钙离子水平及海马BDNF mRNA、蛋白相对表达量均显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,单药组小鼠癫痫自发性再发作为的潜伏期、发作频率、持续时间及造模第28、36天脑电波异常发生次数均显著减少( $P<0.05$ ),血清钙离子水平及海马BDNF mRNA、蛋白相对表达量均显著降低( $P<0.05$ );与单药组比较,激动剂联用组小鼠癫痫自发性再发作的潜伏期、发作频率、持续时间及造模第28、36天脑电波异常发生次数均显著增加( $P<0.05$ ),血清钙离子水平及海马BDNF mRNA、蛋白相对表达量均显著升高( $P<0.05$ )。结论:桑椹花青素-3-葡萄糖苷对癫痫模型小鼠具有一定的保护作用,其机制可能与抑制海马BDNF/TrkB通路的激活有关。

**关键词** 桑椹花青素-3-葡萄糖苷;癫痫;脑源性神经营养因子;酪氨酸激酶受体B;机制;小鼠

## Study on Protection Effect of Mulberry Anthocyanin-3-glucoside on Epilepsy Model Mice and the Effect of Hippocampal BDNF/TrkB Pathway

WANG Fang<sup>1</sup>, HOU Zili<sup>2</sup>, HAN Bing<sup>1</sup>, XIE Guosheng<sup>1</sup>, ZHANG Yanling<sup>1</sup> (1.Dept. Three of Pediatrics, Xingtai People's Hospital, Hebei Xingtai 054000, China; 2.Dept. of Pharmacy, Xingtai People's Hospital, Hebei Xingtai 054000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the protection effects of mulberry anthocyanin-3-glucoside on epilepsy model mice and the effect of hippocampal brain derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine kinase B (TrkB) pathway. METHODS: Totally 120 C57BL/6 mice were randomly divided into normal group, model group, single medication group (mulberry anthocyanin-3-glucoside), agonist combination group (mulberry anthocyanin-3-glucoside+TrkB agonist LM22B-10), with 30 mice in each group. single medication group and agonist combination group were given mulberry anthocyanin-3-glucoside 600 μg/kg intragastrically once a day, for consecutive 6 weeks. The agonist combination group was given LM22B-10 (5 mg/kg) via the lateral ventricle once a day at 6th week. Normal group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically. After last medication, except for normal group, other groups were given lithium chloride-pilocarpine to establish epilepsy model. After modeling, 10 mice in each group were taken to record the latency, frequency and duration of spontaneous recurrent epilepsy, observed for 6 hours a day for 4 weeks; EEG was recorded on the 14th, 28th and 36th day after modeling, and the abnormal frequency of EEG in 1 h was counted. On the 6th day of modeling, other 10 mice in each group were taken to detect the serum calcium level, and the remaining 10 mice in each group were taken to detect the expressions of BDNF mRNA and protein in the hippocampus. RESULTS: Compared with normal group, latency, frequency and duration of spontaneous recurrent epilepsy and the times of abnormal brain wave on the 14th, 28th and 36th day after modeling were increased significantly in model group ( $P<$

<sup>A</sup> 基金项目:2019年度河北省医学科学研究课题(No.20191712)

\* 主治医师, 硕士。研究方向:神经系统和内分泌系统疾病。

E-mail:wangfang7699@126.com

# 通信作者:主任医师, 硕士。研究方向:儿科神经系统和内分泌系统疾病。E-mail:63725878@qq.com

0.05)。The serum calcium level, mRNA and protein expression of BDNF in hippocampus were increased significantly ( $P<0.05$ )。Compared with model group, the latency, frequency, duration of spontaneous recurrent epilepsy and the times of abnormal brain wave on the 28th and 36th

day after modeling were decreased significantly in single medication group ( $P<0.05$ ), while serum calcium level, mRNA and protein expression of BDNF in hippocampus were decreased significantly ( $P<0.05$ ). Compared with single medication group, the latency, frequency and duration of spontaneous recurrent epilepsy and the times of abnormal brain wave on the 28th and 36th day after modeling were increased significantly in agonist combination group ( $P<0.05$ ), while serum calcium level, mRNA and protein expressions of BDNF in hippocampus were increased significantly ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: Mulberry anthocyanin-3-glucoside has a good protection effect on epilepsy model mice, the mechanism of which may be associated with inhibiting the activation of hippocampal BDNF/TrkB pathway.

**KEYWORDS** Mulberry anthocyanin-3-glucoside; Epilepsy; Brain derived neurotrophic factor; Tyrosine kinase B; Mechanism; Mice

癫痫为儿科常见病,是由于脑神经元反复异常放电所致,临床上多表现为惊厥、阵挛或窒息发作,对患儿的生活质量造成了较大影响,严重者可危及生命<sup>[1-2]</sup>。目前,癫痫主要通过药物进行治疗,常用的药物有丙戊酸钠、奥卡西平等<sup>[3]</sup>。虽然目前临床可使用的抗癫痫药物较多,但其治疗效果却不尽如人意,且药物治疗引起的副作用给患儿及其家属带来了不少困扰<sup>[4]</sup>。癫痫的发病机制较复杂,尚未完全阐明。据报道,脑源性神经营养因子(Brain derived neurotrophic factor, BDNF)/酪氨酸激酶受体B(Tyrosine kinase B, TrkB)通路及与癫痫的发病具有一定的相关性<sup>[5]</sup>。

花青素是自然界中一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素,目前用于提取花青素的主要原料有蓝莓、桑椹、玉米等<sup>[6]</sup>。桑椹为桑科植物桑树(*Morus alba* Linn.)的成熟果穗,具有抗氧化、降血糖、抗衰老等多种生物活性,是常见的药食同源的作物之一,从桑椹中提取的花青素具有含量高、性质较稳定、受光照和温度影响较小等优点,其主要成分为花青素-3-葡萄糖苷<sup>[7]</sup>。研究发现,花青素对癫痫模型小鼠细胞凋亡具有抑制作用<sup>[8]</sup>;花青素-3-葡萄糖苷也具有抗氧化、清除自由基、抗炎和抗肿瘤等作用<sup>[9]</sup>。作为花青素中主要成分,关于其是否具有抗癫痫作用以及其作用机制的报道较少。鉴于此,本研究以桑椹花青素中主要成分花青素-3-葡萄糖苷为研究对象,考察其对癫痫模型小鼠的保护作用,并基于BDNF/TrkB通路考察其作用机制,为该化合物的开发利用提供实验参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);J2-21M型高速低温离心机、Mc pro 384型实时荧光定量-聚合酶链式反应(PCR)仪(德国Eppendorf公司);GE AI600型超灵敏多功能生物分子成像仪(美国Amersham Imager公司);B-H-300A型动物行为学研究试验仪(北京北广精仪仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

桑椹购自河北农沃绿农业科技有限公司(批号:180213),由四川农业大学园艺学院赖云松副研究员鉴定为桑科植物桑树(*M. alba* Linn.)的成熟果穗;TrkB激

动剂LM22B-10(美国Selleck公司,货号:6037,纯度:98.81%);氯化锂(上海晶抗生物工程有限公司,货号:7447-41-8);氢溴酸东莨菪碱注射液(上海禾丰制药有限公司,批号:H31021519,规格:0.3 g/mL);盐酸匹罗卡品(货号:CAT 54-71-7,规格:200 g)、甲基百里香酚蓝(MTB)比色法试剂盒(货号:CAT 1945-77-3)均购自美国Sigma公司;兔源BDNF抗体(货号:ab108389)、鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号:ab22555)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(货号:ab97051)、HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(货号:ab6789)均购自英国Abcam公司;RNA提取试剂盒(美国Invitrogen公司,批号:15589218);引物均由北京擎科生物有限公司合成;其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

### 1.3 动物

C57BL/6小鼠120只,雄性,体质量25~30 g,由河北医科大学动物中心提供,实验动物使用许可证号:SYXK(冀)2014-0198。小鼠饲养环境通风良好,光照周期为12 h,环境温度为25℃,湿度为50%,饲养期间自由摄食、饮水。

## 2 方法

### 2.1 桑椹花青素-3-葡萄糖苷的提取

按文献方法<sup>[9]</sup>提取桑椹花青素-3-葡萄糖苷。将30 g桑椹冷冻干燥后粉碎(30~80目),以0.1%盐酸-乙醇(40:60, V/V)为提取溶剂、固液比1:20(g/mL)、浸提温度50℃、浸提时间1.5 h浸提2次,合并2次提取液,真空抽滤并浓缩得到粗浸膏(得率为11%)。使用Agilent LC 1200型高效液相色谱仪精制纯化花青素-3-葡萄糖苷,制备色谱柱为YMC Hydrosphere C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm),纯化条件为0.04%三氟乙酸(A)-乙腈(B)(95:5, V/V),纯化时间为0.5 h,流速为1 mL/min,检测波长为254 nm。最终制备得到纯度>99.5%的花青素-3-葡萄糖苷样品。用生理盐水将花青素-3-葡萄糖苷制成一定浓度的贮备液,高压灭菌后于-20℃冰箱中保存,备用。

### 2.2 分组、造模与给药

小鼠适应性饲养1周后随机分为正常组、模型组、单药组(桑椹花青素-3-葡萄糖苷)和激动剂联用组(桑椹花

青素-3-葡萄糖苷+LM22B-10), 每组 30 只。单药组和激动剂联用组小鼠均于造模前灌胃 600 μg/kg 桑椹花青素-3-葡萄糖苷, 每日给药 1 次, 连续给药 6 周; 在此基础上激动剂联用组小鼠于造模前 1 周开始给予 LM22B-10, 侧脑室注入, 每次 5 mg/kg, 每日给药 1 次, 连续给药 1 周<sup>[9]</sup>。同时, 正常组、模型组小鼠灌胃等体积生理盐水。给药结束后, 除正常组外, 其余各组小鼠均复制癫痫模型: 小鼠先腹腔注射新鲜配制的氯化锂溶液(180 mg/kg), 24 h 后腹腔注射东莨菪碱(1 mg/kg), 15 min 后再腹腔注射盐酸匹罗卡品(30 mg/kg)<sup>[8]</sup>。根据 Racine 分级进行癫痫发作评定<sup>[9]</sup>, 30 min 后未出现癫痫发作的小鼠重复腹腔注射盐酸匹罗卡品(10 mg/kg), 直至诱导癫痫发作。

### 2.3 小鼠癫痫行为分析及脑电图监测

造模结束后, 各组分别取 10 只小鼠, 通过动物行为学研究试验仪观察并记录其癫痫自发性再发行为。自造模成功后, 每天观察 6 h(上午 9:00—12:00, 下午 2:00—5:00), 连续观察 4 周, 记录癫痫自发性再发作的潜伏期(h)、平均发作频率(次/d)和发作持续时间(s)。同时自造模成功后第 14、28、36 天对各组小鼠进行脑电图检查, 每次检测 1 h, 记录单位时间内异常脑电波发生次数。脑电图诊断标准参照冯应琨的《临床脑电图学》及周昌贵的《临床脑电图手册》, 以脑电图出现弥漫性异常、局灶性异常、阵发性节律波及异常波发放和高峰矢律等为异常脑电图。

### 2.4 小鼠血清钙离子水平检测

于造模成功后第 6 天, 各组随机取 10 只小鼠尾静脉取血, 分离血清, 按 MTB 试剂盒说明书检测小鼠血清中钙离子水平。

### 2.5 小鼠海马组织中 BDNF mRNA 表达检测

采用实时荧光定量-PCR 法进行检测。既往文献研究表明, BDNF 蛋白表达在造模成功后 6~7 天达到高峰<sup>[6]</sup>。因此, 本研究在造模成功后的第 6 天, 各组随机取 10 只小鼠处死并取出海马组织, 按 RNA 提取试剂盒说明书对小鼠海马组织中的 mRNA 进行提取, 验证其纯度后反转录合成 cDNA, 以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。BDNF 上游引物序列为 5'-AGTGTGT-CATAGAGCTTCCTGTTTCATCTCCCAGT-3', 下游引物序列为 5'-TGGAACCAGGCCCCAGGGAATCTTTCAGCTGCATT-3', 扩增片段长度为 533 bp; GAPDH 上游引物序列为 5'-GGGAGCCAAAAGGGTCAT-3', 下游引物序列为 5'-GAGTCCTTCCACGATACCAA-3', 扩增片段长度为 452 bp。反应体系总体积为 25 μL。BDNF 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 再延伸 5 min。GAPDH 反应条件中的退火条件为 58 °C 反应 1 min, 其余条件均与 BDNF 相同。以 GAPDH 为内参, 采

用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因的相对表达量。

### 2.6 小鼠海马组织中 BDNF 蛋白表达检测

采用 Western blotting 法进行检测。取“2.5”项下小鼠海马组织, 加入蛋白裂解液 80 mL, 冰浴上超声匀浆(40 kHz、10 s/次, 连续 5~6 次, 每次间隔 30 s), 然后以 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 进行二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量。取蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳, 再转移至硝酸纤维素膜(PVDF 膜), 以脱脂牛奶封闭 2 h 后, 加入 BDNF、GAPDH 一抗(1:1 000), 4 °C 孵育过夜; 以 TBST 缓冲液洗膜 4 次, 每次 20 min, 再加入相应二抗(1:2 000), 室温孵育 2 h; 以 TBST 缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min。漂洗结束后加入化学发光液, 采用超灵敏多功能生物分子成像仪采集 BDNF 和 GAPDH 条带并拍照, 图片采用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件进行灰度值分析, 以目的蛋白条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

### 2.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析和 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组小鼠癫痫自发性再发作的发生情况

经造模后, 模型组小鼠发生癫痫。与模型组比较, 单药组小鼠癫痫自发性再发作的潜伏期显著延长, 发作频率显著降低(*P* < 0.05), 发作持续时间显著缩短(*P* < 0.05), 这提示桑椹花青素-3-葡萄糖苷对模型小鼠癫痫的发作具有一定的抑制作用。与单药组比较, 激动剂联用组小鼠癫痫自发性再发作的潜伏期显著缩短(*P* < 0.05), 发作频率显著升高(*P* < 0.05), 发作持续时间显著延长(*P* < 0.05)。各组小鼠癫痫自发性再发作的潜伏期、发作频率和发作持续时间测定结果见表 1。

表 1 各组小鼠癫痫自发性再发作的潜伏期、发作频率及持续时间测定结果( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 1 Determination results of latency, frequency and duration of epilepsy seizure of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	潜伏期, h	发作频率, 次/d	发作持续时间, s
正常组	0	0	0
模型组	16.22 ± 6.21 <sup>*</sup>	3.3 ± 1.10 <sup>*</sup>	57.03 ± 15.12 <sup>*</sup>
单药组	28.73 ± 5.69 <sup>†</sup>	1.5 ± 0.56 <sup>†</sup>	34.13 ± 16.91 <sup>†</sup>
激动剂联用组	18.63 ± 4.91 <sup>‡</sup>	2.9 ± 1.03 <sup>‡</sup>	49.60 ± 15.64 <sup>‡</sup>

注: 与正常组比较, \**P* < 0.05; 与模型组比较, <sup>†</sup>*P* < 0.05; 与单药组比较, <sup>‡</sup>*P* < 0.05

Note: vs. normal group, \**P* < 0.05; vs. model group, <sup>†</sup>*P* < 0.05; vs. single medication group, <sup>‡</sup>*P* < 0.05

### 3.2 各组小鼠脑电图异常情况观察结果

在造模成功后第 14、28、36 天, 模型组小鼠异常脑电

波发生次数均显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,单药组小鼠在造模成功后第28、36天时异常脑电波发生次数显著降低( $P<0.05$ )。与单药组比较,激动剂联用组小鼠在造模成功后第28、36天时异常脑电波发生次数显著升高( $P<0.05$ )。各组小鼠在造模成功不同时间后的脑电图异常脑电波发生次数测定结果见表2。

表2 各组小鼠在造模成功不同时间后的异常脑电波发生次数测定结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab 2 The times of abnormal brain waves of mice in each group after different time of modeling ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	造模成功不同时间后		
	第14天	第28天	第36天
正常组	0	0	0
模型组	18.2±1.8*	18.5±2.2*	19.0±1.2*
单药组	15.9±2.6	8.1±1.9 <sup>△</sup>	7.1±0.8 <sup>△</sup>
激动剂联用组	17.9±3.1	16.1±1.5 <sup>△</sup>	18.9±1.1 <sup>△</sup>

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ;与单药组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$

Note: vs. normal group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, \* $P<0.05$ ; vs. single medication group, <sup>△</sup> $P<0.05$

### 3.3 各组小鼠血清中钙离子水平测定结果

与正常组比较,模型组小鼠血清中钙离子水平显著降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,单药组小鼠血清中钙离子水平显著升高( $P<0.05$ )。与单药组比较,激动剂联用组小鼠血清中钙离子水平显著降低( $P<0.05$ )。各组小鼠血清中钙离子水平测定结果见表3。

表3 各组小鼠血清钙离子水平测定结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab 3 Determination results of serum calcium level of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

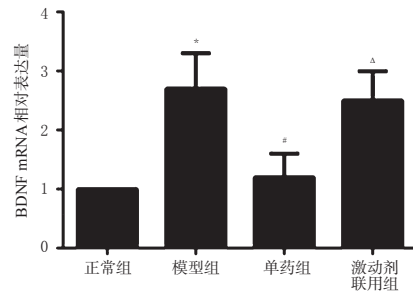
组别	血清钙离子,mmol/L
正常组	1.33±0.02
模型组	0.67±0.11*
单药组	1.29±0.09 <sup>△</sup>
激动剂联用组	0.77±0.10 <sup>△</sup>

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ;与单药组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$

Note: vs. normal group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, \* $P<0.05$ ; vs. single medication group, <sup>△</sup> $P<0.05$

### 3.4 各组小鼠海马组织中BDNF mRNA及蛋白表达水平测定结果

与正常组比较,模型组小鼠海马组织组织中BDNF mRNA及蛋白的相对表达量均显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,单药组小鼠海马组织中BDNF mRNA及蛋白的相对表达量均显著降低( $P<0.05$ )。与单药组比较,激动剂联用组小鼠海马组织中BDNF mRNA及蛋白的相对表达量显著升高( $P<0.05$ )。各组小鼠海马组织中BDNF mRNA的相对表达量测定结果见图1, BDNF蛋白表达电泳图及相对表达量测定结果见图2。

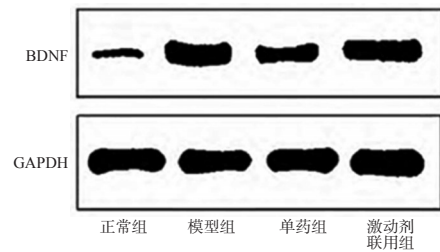


注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ;与单药组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$

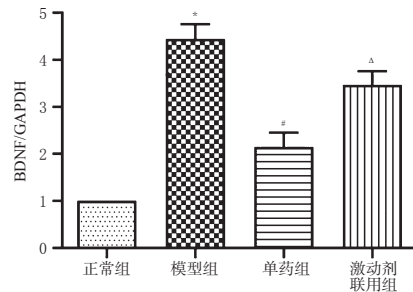
Note: vs. normal group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, \* $P<0.05$ ; vs. single medication group, <sup>△</sup> $P<0.05$

图1 各组小鼠海马组织中BDNF mRNA表达水平测定结果( $n=10$ )

Fig 1 mRNA expression of BDNF in hippocampus of mice in each group ( $n=10$ )



A. BDNF 蛋白表达电泳图



B. BDNF 蛋白相对表达水平

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ;与单药组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$

Note: vs. normal group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, \* $P<0.05$ ; vs. single medication group, <sup>△</sup> $P<0.05$

图2 各组小鼠海马组织中BDNF蛋白表达电泳图及相对表达量测定结果( $n=10$ )

Fig 2 Electrophoretogram of BDNF protein and its relative expression level in hippocampus of mice in each group ( $n=10$ )

## 4 讨论

BDNF/TrkB 通路是中枢神经系统的重要信号通路。酪氨酸蛋白激酶受体(Trk)是BDNF的高亲和力受体,包括TrkA、TrkB、TrkC等亚型,其中TrkB与BDNF结合形成的BDNF/TrkB通路涉及到如神经元存活、轴突生长、细胞迁移、调节神经兴奋性与抑制性的平衡等功能<sup>[10]</sup>。当BDNF与TrkB结合时,TrkB受体内在的酪氨酸

磷酸化,进而触发一系列级联信号转导,包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)信号通路和磷脂酶C- $\gamma$ (PLC- $\gamma$ )信号通路<sup>[1]</sup>。BDNF/TrkB信号通路的激活还可引起海马兴奋环路的建立、激活N-甲基-D-天冬氨酸受体,导致细胞内钙离子内流,增强兴奋性突触后电位,降低癫痫发作的阈值<sup>[12]</sup>。癫痫发作后BDNF表达水平也随之上调,使兴奋性突触后电流再次增加,进一步加重钙离子超载,引起神经元死亡和癫痫反复发作<sup>[13]</sup>。上述研究均提示,BDNF/TrkB信号通路是治疗癫痫的潜在靶标之一,可以通过阻断BDNF/TrkB通路的激活,从而达到抑制癫痫发作的目的。

癫痫是常见的中枢神经系统疾病,约20%~25%的患者最终演变为难治性癫痫<sup>[14]</sup>。多数癫痫患者即使在间隙期,脑电图依然会有异常。本研究结果显示,模型组小鼠出现了癫痫症状及异常脑电波,并且其血清中钙离子水平显著降低、海马组织中BDNF蛋白及mRNA水平均明显升高。给予桑椹花青素-3-葡萄糖苷干预后,小鼠癫痫自发性再发潜伏期延长、发作频率降低、发作持续时间缩短,异常脑电波发生次数减少,血清中钙离子水平回升,同时海马组织中BDNF mRNA及蛋白相对表达量也显著降低。其原因可能是桑椹花青素-3-葡萄糖苷能够阻断TrkB受体酪氨酸磷酸化,抑制细胞内钙离子内流,降低兴奋性突触后电位,从而升高癫痫发作的阈值,达到抑制癫痫发作的目的。LM22B-10是典型的TrkB激动剂,能够精确地诱导体内外TrkB、TrkC和细胞外信号调节激酶(ERK)等的活化,在针对信号通路TrkB的研究中使用较为普遍<sup>[15-16]</sup>。本研究在药物治疗基础上加入TrkB激动剂LM22B-10,进一步探讨BDNF/TrkB这条信号通路在本模型中是否发挥作用。结果显示,加入激动剂LM22B-10后,可使小鼠血清中钙离子水平再次降低,癫痫自发性再发潜伏期缩短、发作频率升高、发作持续时间延长,并使海马组织中BDNF mRNA及蛋白表达水平升高。

综上所述,本研究证实了花青素-3-葡萄糖苷对癫痫模型小鼠具有一定的保护作用,其机制可能与抑制BDNF/TrkB通路的激活有关,但其更多的作用机制有待进一步研究证实。

## 参考文献

[1] 陈恩,林琳,吕赛平,等.青霉素诱导的大鼠癫痫模型中STAT3及IL-6表达[J].中国免疫学杂志,2016,32(8):1112-1117.

[2] SAJJAN S, JAIN P, SHARMA S, et al. Injuries in children with epilepsy: a hospital based study[J]. *Indian Pediatr*, 2016, 53(10):883-885.

[3] 史菁菁,廖清船,于峰.抗癫痫药物的基因组学研究进展[J].中国药房,2013,24(1):8-11.

[4] SÁNCHEZ FERNÁNDEZ I, JACKSON MC, ABEND NS,

et al. Refractory status epilepticus in children with and without prior epilepsy or status epilepticus[J]. *Neurology*, 2017, 88(4):386-394.

[5] ZHANG L, FAN D, WANG Q, et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor and noise on transitions in temporal lobe epilepsy in a hippocampal network[J]. *Chaos*, 2018, 28(10):106322-106332.

[6] 张丽梅,雷泉,王莉,等.桑椹花青素-3-葡萄糖苷调控Bcl-2/Bax/Cleaved caspase-3信号通路诱导乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡[J].中药药理与临床,2018,34(5):22-26.

[7] 蔡荣荣,姜东青,贾姗姗,等.桑椹花青素的提取工艺优化研究[J].安徽农业科学,2014,42(34):12307-12308、12346.

[8] 甄军丽,曲珍珍,司沛沛,等.PI3K/Akt信号通路在癫痫鼠海马神经细胞中的作用及葡萄籽原花青素影响[J].脑与神经疾病杂志,2016,24(7):410-414.

[9] 崔京燕,杨静,桑鑫燕,等.桑椹花青素的提取及其与总黄酮的比较研究[J].食品研究与开发,2018,35(15):53-60.

[10] NIRWAN N, SIRAJ F, VOHORA D. Inverted-U response of lacosamide on pilocarpine-induced status epilepticus and oxidative stress in C57BL/6 mice is independent of hippocampal collapsin response mediator protein-2[J]. *Epilepsy Res*, 2018, 145(1):93-101.

[11] KIM HY, HUR YJ, KIM HD, et al. Modification of electrophysiological activity pattern after anterior thalamic deep brain stimulation for intractable epilepsy: report of 3 cases[J]. *J Neurosurg*, 2017, 126(6):2028-2035.

[12] YOSHII A, CONSTANTINE-PATON M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease[J]. *Dev Neurobiol*, 2010, 70(5):304-322.

[13] LU B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation[J]. *Learn Mem*, 2003, 10(5):86-98.

[14] 王英,陈松杰,徐杰,等.以精神异常起病、反复发作的抗NMDA受体脑炎1例报告[J].中国免疫学杂志,2018,34(11):1724-1725、1728.

[15] BRUNA B, LOBOS P, HERRERA-MOLINA R, et al. The signaling pathways underlying BDNF-induced Nrf2 hippocampal nuclear translocation involve ROS, RyR-Mediated Ca<sup>2+</sup> signals, ERK and PI3K[J]. *BBRC*, 2018, 505(1):201-207.

[16] YANG T, MASSA SM, TRAN KC, et al. A small molecule TrkB/TrkC neurotrophin receptor co-activator with distinctive effects on neuronal survival and process outgrowth[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 110(Pt A):343-361.

(收稿日期:2019-07-24 修回日期:2019-12-30)

(编辑:林静)