

蒙药朝伦雄胡-5对癫痫持续状态大鼠模型中VEGF表达影响的研究

贾月欣, 杨光路*

内蒙古医科大学附属医院儿科, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2025年2月25日; 录用日期: 2025年3月18日; 发布日期: 2025年3月25日

摘要

目的: 通过氯化锂-毛果芸香碱建立大鼠癫痫持续状态模型, 探究癫痫持续状态大鼠模型中不同时间点VEGF的表达变化, 并探讨蒙药朝伦雄胡-5对VEGF表达的影响。方法: 第一部分: 选取90只6~8周龄健康雄性SD大鼠, 随机分为造模成功组、给药对照组和生理盐水对照组, 每组30只。造模成功组与给药对照组通过腹腔注射氯化锂-毛果芸香碱制作大鼠癫痫持续状态模型, 生理盐水对照组给予同等剂量的生理盐水处理, 造模完成后应用qRT-PCR和Western blot方法检测VEGF转录水平及蛋白水平的表达情况。第二部分: 选取40只6~8周龄健康雄性SD大鼠, 随机分为蒙药组和对照组。制作癫痫大鼠模型前3 d, 蒙药组给予蒙药朝伦雄胡-5灌胃处理, 对照组给予同等剂量的生理盐水灌胃, 3 d后对蒙药组和对照组通过腹腔注射氯化锂-毛果芸香碱制作大鼠癫痫持续状态模型。造模完成后应用qRT-PCR和Western blot方法检测VEGF转录水平及蛋白水平的表达情况。结果: 第一部分: 造模成功组VEGF mRNA表达较给药对照组和生理盐水对照组相比显著升高($P < 0.05$); 给药对照组与生理盐水对照组VEGF mRNA表达水平无明显差异。且造模成功组VEGF mRNA随着时间的增长而逐渐升高, 给药对照组、生理盐水对照组VEGF mRNA不随时间而变化。造模成功组较另外2组相比, VEGF蛋白表达水平显著增高($P < 0.05$); 给药对照组与生理盐水对照组VEGF蛋白表达水平无明显差异。而且3组的VEGF蛋白变化均无明显的时间依赖性。第二部分: 蒙药组VEGF mRNA与对照组相比, 表达显著降低($P < 0.05$), 并且随着时间的增长, VEGF不断降低; 蒙药组较造模成功组VEGF蛋白表达显著降低($P < 0.05$), 但并不存在时间依赖性。结论: 1) 在氯化锂-毛果芸香碱诱导的癫痫持续状态大鼠海马中的VEGF mRNA的表达是升高的。2) 在氯化锂-毛果芸香碱诱导的癫痫持续状态大鼠海马中的VEGF蛋白的表达是升高的。3) 蒙药朝伦雄胡-5可诱导癫痫持续状态大鼠海马中的VEGF mRNA表达下降, 并且随着时间的增长而不断降低。4) 蒙药朝伦雄胡-5在癫痫持续状态模型中从蛋白水平上可部分抑制VEGF表达升高。

关键词

SD大鼠, 蒙药朝伦雄胡-5, 癫痫持续状态模型, VEGF

*通讯作者。

Study on the Effect of Mongolian Medicine Zhaolun Xionghu-5 on VEGF Expression in Rat Model with Status Epilepticus

Yuexin Jia, Guanglu Yang*

Department of Pediatrics, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia

Received: Feb. 25th, 2025; accepted: Mar. 18th, 2025; published: Mar. 25th, 2025

Abstract

Objective: To explore the changes in VEGF expression at different time points in the rat model of status epilepticus by lithium chloride-rutin and explore the effect of Mongolian medicine Zhaolun Xionghu-5 on VEGF expression. **Methods:** Part I: 90 healthy male rats aged 6~8 weeks were randomly divided into successful modeling group, drug administration control group and normal saline control group, with 30 rats in each group. The rats in the successful modeling group and the control group were intraperitoneally injected with lithium chloride-rutin to establish the rat model of status epilepticus. The rats in the normal saline control group were treated with the same dose of normal saline. After the modeling, qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of VEGF transcription and protein levels. Part II: 40 healthy male rats aged 6~8 weeks were randomly divided into Mongolian medicine group and control group. Three days before the establishment of the rat model of status epilepticus, the Mongolian medicine group was given Mongolian medicine Zhaolun Xionghu-5 by gavage, and the control group was given the same dose of normal saline by gavage. Three days later, the Mongolian medicine group and the control group were intraperitoneally injected with lithium chloride-rutin to establish the rat model of status epilepticus. After the modeling, qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of VEGF transcription and protein levels. **Results:** Part I: The mRNA expression of VEGF in the successful modeling group was significantly higher than that in the administration control group and the normal saline control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in VEGF mRNA expression between the administration control group and the normal saline control group. Moreover, VEGF mRNA in the successful modeling group increased gradually with the increase of time, while VEGF mRNA in the administration control group and normal saline control group did not change with time. Compared with the other two groups, the protein expression of VEGF in the successful modeling group was significantly increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in VEGF protein expression between the administration control group and the normal saline control group. Moreover, the changes in VEGF protein in the three groups were no time dependence. Part II: Compared with the control group, the expression of VEGF mRNA in the Mongolian medicine group was significantly decreased ($P < 0.05$), and with the growth of time, VEGF continued to decrease; the expression of VEGF protein in Mongolian medicine group was significantly lower than that in successful modeling group ($P < 0.05$), but there was no time dependence. **Conclusion:** 1) VEGF mRNA expression was increased in hippocampus of rats with status epilepticus induced by lithium chloride-rutin. 2) The expression of VEGF protein in hippocampus of rats with status epilepticus induced by lithium chloride-rutin was increased. 3) Mongolian medicine Zhaolun Xionghu-5 can induce the decrease of VEGF mRNA expression in hippocampus of rats with status epilepticus, and it decreases with time. 4) Mongolian medicine Zhaolun Xionghu-5 can partially inhibit elevated VEGF expression at the protein level in the model of status epilepticus.

Keywords

SD Rats, Mongolian Medicine Zhaolun Xionghu-5, Status Epilepticus Model, VEGF



1. 前言

癫痫(epilepsy, EP)影响全球近 1%的人口, 是一种复杂的慢性疾病, 儿童与成人相比, 更容易发生癫痫持续状态。癫痫持续状态(status epilepticus, SE)是一种常见的儿科神经内科急性疾病[1]。尽管目前已有数十种抗癫痫药物可以治疗不同类型的癫痫, 但仍有三分之一的患者预后不佳, 并对抗癫痫药物表现出耐药性。因此, 在临床上寻找一种有效的抗癫痫药物是一个至关重要且紧迫的问题。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是作为二聚体脱氨酸糖蛋白分泌的生长因子家族的一部分, 该家族还包括转化因子- β 、神经生长因子和血小板衍生生长因子[2]。VEGF 家族由 VEGF-a、VEGF-b、VEGF-c、VEGF-d、VEGF-e 五个蛋白质亚群和胎盘生长因子(PlGF)组成, 它们都有一个以上的异构体, 这些配体结合三个高亲和力和酪氨酸激酶(TK)受体, 即 VEGFR-1、VEGFR-2 和 VEGFR-3, 以及两个共受体, 即 neuropilin-1 (NPR-1)和 neuropilin-2 (NPR-2) [2] [3]。VEGF 的信号转导很复杂, 因为多个配体可以与多个受体相互作用, 受体可以形成同型二聚体或异源二聚体复合物[4], 而 VEGFR-1 和 VEGFR-2 作为主要受体。生理条件下, 神经系统中的 VEGFR-1 和 VEGFR-2 的表达位置不同。VEGFR-2 是促进神经前体细胞和分化的神经元细胞有丝分裂的主要受体, 而 VEGFR-1 则为促进胶质发育及存活的主要受体。目前研究表明, VEGFR-2 是性质最为明确的 VEGF 受体, 介导绝大部分 VEGF 的分子应答, 广泛分布于中枢和外周神经系统。现有大量研究表明, 在神经系统中, VEGF 可直接作用于神经细胞, 参与多种疾病的病理过程, 例如癫痫[5]、孤独症谱系疾病[6]、缺血缺氧性脑病[7] [8]等。

蒙药朝伦雄胡-5, 又名擦拉古德-5, 来源于《蒙医方剂汇编》, 由朱砂 50 克、巴豆(制) 50 克、胡黄连 30 克、牛黄 1 克、麝香 1 克这五味药组成[9]。主治急性惊风、胸满便秘、积食不消、四肢抽搐, 具有镇惊、安神、顺气、驱风的功能。目前国内外尚无关于蒙药朝伦雄胡-5 在癫痫中的研究, 这也是本研究的一大创新点。

先前本课题组将轴突导向分子 Semaphorin 3F (Sema3F)在 0 min、5 min、15 min、30 min 加入到原代大鼠海马神经元当中, 发现了海马神经元中 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达随着时间的变化逐渐增多[10]。课题组另一项研究, 在 0 min、30 min 这两个时间点, 向培养到 3 天的原代大鼠海马神经元中加入了 Sema3F, 而对照组加入了同等剂量的胎牛血清, 后应用高通量测序的方法发现实验组的 VEGF mRNA 较对照组表达明显升高[11]。以上也提示了 VEGF 在神经系统中具有一定的潜在作用。

本实验旨在通过建立癫痫持续状态大鼠模型, 观察癫痫发作急性期 VEGF 的变化情况, 以及应用蒙药朝伦雄胡-5 对 VEGF 表达的改变情况, 探讨该药物在癫痫疾病中的潜在作用。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

实验动物: 6~8 周龄健康雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 130 只, 由内蒙古医科大学实验动物中心提供(许可证号: SCKK2012-0004)。实验程序和动物使用及护理规程由内蒙古医科大学动物伦理委员会批准。

2.2. 实验方法

2.2.1. 第一部分: 大鼠癫痫持续状态模型的建立及分组

选取 90 只 6~8 周龄健康雄性 SD 大鼠, 采用随机数字法将它们随机分为 3 组, 分别为造模成功组、

给药对照组与生理盐水对照组, 每组各 30 只。前两组通过腹腔注射氯化锂 - 毛果芸香碱制作癫痫持续状态大鼠模型, 首先给予氯化锂(127 mg/kg)腹腔注射, 间隔 18~24 h 后给予阿托品(1.5 mg/kg)腹腔注射, 30 min 后再给予毛果芸香碱腹腔注射, 首次剂量为 60 mg/kg, 无发作者, 以后每 30 min 给予 10 mg/kg, 最多给予 5 次, 直至出现 IV~V 级惊厥发作(参考 Racine 分级标准) [12]。在大鼠持续惊厥 90 min 后给予地西泮(10 mg/kg)腹腔注射止惊, 以后每隔 10 min 注射地西泮 10 mg/kg, 直至惊厥停止。生理盐水对照组给予同等剂量的生理盐水处理。造模完成后, 选取造模成功后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 为时间点, 每组每个时间点随机选取 3 只大鼠处死, 留取海马组织标本, 使其保存于-80℃冰箱, 用于后续的实验。

2.2.2. 第二部分: 应用蒙药朝伦雄胡-5 对大鼠癫痫持续状态模型进行干预

选取 6~8 周龄健康雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为 2 组, 为蒙药组和对照组。制作癫痫大鼠模型前 3 d, 蒙药组给予蒙药朝伦雄胡-5 (10 mg/kg 1 次/日)灌胃处理, 对照组给予同等剂量的生理盐水灌胃[9]。3 d 后对蒙药组和对照组通过腹腔注射氯化锂 - 毛果芸香碱制作大鼠癫痫持续状态模型, 制作模型方法同第一部分。选取造模成功后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 为时间点, 每组每个时间点随机选取 3 只大鼠处死, 留取海马组织标本, 保存于-80℃冰箱, 用于后续的实验。

2.2.3. qRT-PCR 法检测 VEGF 表达量

1、RNA 提取

- 1) 从-80℃冰箱中取出组织放于冰上, 剪取小块组织放在 EP 管中剪碎, 用取样器吹打混匀;
- 2) 将处理后的样品置于室温下 5 min, 使得核酸蛋白复合物完全分离;
- 3) 匀浆样品中加入氯仿 0.2 ml, 关闭管盖, 猛摇匀液 15 s, 室温放置 3~5 min;
- 4) 2~8℃1200 rpm 离心 10 min;
- 5) 加入 500 ul 洗柱液在吸附柱中, 室温下放置 2 min, 2~8℃12,000 rpm 离心 2 min;
- 6) 在步骤 4)中, 将 200 ul 无水乙醇加入收集的上清中, 混合。上清液加入吸附柱静置 2 min, 2~8℃, 12,000 rpm 离心 2 min;
- 7) 将 600 ul 冲洗液加入吸附柱中, 12,000 rpm 离心 2 min;
- 8) 重复 7);
- 9) 2~8℃12,000 rpm 离心 2 min, 将吸附柱置于室温放置数分钟将吸附柱中的残留漂洗液去除;
- 10) 将吸附柱放入新管中, 将 50~100 ul RNase-free ddH₂O 滴入膜中心, 室温放置 5 min, 室温 12,000 rpm 离心 2 min, 得到 RNA。

2、总 RNA 逆转录及 RT-PCR

① RNA 逆转录: 用 FastKing 一步法通过预混试剂合成第一链 cDNA。50 ng~2 ug 总 RNA 可建立 20 ul 反应体系。

② Real-time PCR: 采用两步法进行。

2.2.4. Western Blot 检测 VEGF 蛋白表达量

- 1) 从-80℃冰箱中取出海马组织放在冰上, 剪取小块组织被放在 EP 管中, 再切成小块, 每管加入裂解液 200 ul~300 ul, 冰裂 45 min;
- 2) 裂解后, 4℃12,000 rpm 离心 15 min;
- 3) 蛋白质浓度测定: 加 5× loadingbuffer, 煮沸 5 min, -80℃保存。
- 4) 上样电泳: 100℃处理 5 min, 每孔取总细胞蛋白 100 μg。电泳采用每凝胶 15 mA 恒流电源进行。
- 5) 转膜: 膜转移过程在 4℃下进行, 膜转移条件为 100 V/100 mA。
- 6) 免疫印迹显色: ECL 显色系统。

- ① 封闭: 用 $1\times$ PBST 配制 5% 脱脂奶, 4° 摇床过夜或室温 2 h。
- ② 一抗: 用封闭液稀释一抗, 将 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中, 4°C 孵育过夜。
- ③ 洗膜: 一抗回收, 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 5 分钟。
- ④ 二抗: 孵育各自对应的种属的二抗, 室温, 45 min。
- ⑤ 洗膜: 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 5 分钟。
- ⑥ 显色曝光。

2.3. 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用两样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 第一部分: 癫痫持续状态大鼠模型海马组织中 VEGF mRNA 及蛋白水平变化情况

在造模期间, 共有 4 只大鼠因癫痫持续状态而导致死亡, 有 17 只未出现惊厥发作, 造模成功率为 65.0%。首先, 为了探究癫痫持续状态大鼠模型海马组织中 VEGF 的表达情况, 我们应用 qRT-PCR 法测定了大鼠癫痫持续状态后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 这 5 个时间点 VEGF mRNA 的表达情况, 结果发现造模成功组 VEGF mRNA 表达较给药对照组和生理盐水对照组显著升高($P < 0.05$); 给药对照组与生理盐水对照组 VEGF mRNA 表达水平无明显差异。且造模成功组 VEGF mRNA 随着时间的增长而逐渐升高, 给药对照组与生理盐水对照组的 VEGF mRNA 不随时间而变化。为了进一步研究, 应用 Western blot 法测定了大鼠癫痫持续状态后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h, VEGF 蛋白的表达情况, 造模成功组较另外 2 组相比, VEGF 蛋白表达水平显著增高($P < 0.05$); 给药对照组与生理盐水对照组 VEGF 蛋白表达水平无明显差异。而且 3 组的 VEGF 蛋白变化均无明显的时间依赖性。

3.2. 第二部分: 应用蒙药朝伦雄胡-5 对癫痫持续状态大鼠模型干预后, 大鼠海马组织中 VEGF mRNA 及蛋白水平变化情况

为了较好地探究蒙药朝伦雄胡-5 对癫痫持续状态大鼠 VEGF 的影响, 我们应用了 qRT-PCR 和 Western blot 两种方法对大鼠海马组织 VEGF mRNA 及蛋白进行了测定, 结果发现, 在 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 这 5 个时间点, 蒙药组 VEGF mRNA 与对照组相比, 表达显著降低($P < 0.05$), 并且随着时间的增长, VEGF 不断降低; 在 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h, 蒙药组较造模成功组 VEGF 蛋白表达显著降低($P < 0.05$), 但并不存在时间依赖性。

4. 讨论

惊厥是儿科神经病学中最常见的急症, 儿童抽搐的发病率比成年人高[13]并且儿童更容易发生癫痫持续状态(SE), 导致严重的神经系统后遗症, 如癫痫、认知障碍、情感障碍, 从而极大地影响着患儿的生活质量。目前, SE 后癫痫的发生机制尚不完全清楚, 也没有有效的治疗方法来修复惊厥所致的脑损伤或者有效地预防癫痫的发生。癫痫发生是一种以自发性反复性癫痫(SRS)为特征的病理过程。急性惊厥性脑损伤向癫痫转化的发展过程, 根据脑内发生的不同生理病理变化和 SRS 的发生时间, 可分为急性期、潜伏期和慢性期。在动物模型中, 0~3 d 为急性期, 3~7 d 为潜伏期, 7~10 d 左右为慢性早期。VEGF 是神经系统与血管之间重要的联系因子[14], 然而, 关于其在癫痫中是否发挥作用的相关研究有限, 因此在本实验中我们选择了 VEGF 这一因子, 同时选择了氯化锂-毛果芸香碱诱导的癫痫大鼠模型, 因为这个模

型引起的癫痫发作以及脑组织损伤与人类的癫痫发作较相似[15]。

VEGF 家族需依赖 VEGF 受体发挥相应的生物学功能。目前已知的 VEGF 受体及相关受体有 VEGFR-1 (Flt-1)、VEGFR-2 (Flk-1/kDR)、VEGFR-3 (Flt-4)、神经纤维蛋白-1 和神经纤维蛋白-2。VEGFR-1 和 VEGFR-2 是主要受体。VEGFR2 是一种酪氨酸激酶受体, 可激活多条下游的信号通路, 引起神经发生、血管生成、神经回路重建和异常神经网络形成。激活 PI3K/PKB 信号通路和 MAPK/ERK 信号通路是重要的信号通路, 在细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要作用[16]。这两种途径都可能在癫痫的发生发展中发挥作用。

癫痫通常被认为是由过度的神经元活动引起。因此, 过度的神经元活动是目前使用的抗癫痫药物的主要作用靶点。然而, 仍有多达 30% 的癫痫患者对现有的抗癫痫药物表现出耐药性, 这表明癫痫不仅与神经细胞有关, 还可能与其他脑细胞有关。星形胶质细胞、周皮细胞和内皮细胞构成了血脑屏障(BBB), 它调节着脑实质和循环血液之间的物质交换。有人认为血脑屏障功能障碍, 尤其是屏障渗漏, 会加剧癫痫的发生发展, 反之, 癫痫发作也会诱发血脑屏障渗漏。此外, 多项研究表明血脑屏障功能障碍是发生难治性癫痫的主要原因之一。VEGF 是一种与血脑屏障功能障碍相关的分子之一[17]。在啮齿动物模型中, VEGF 能够诱导血脑屏障渗漏[18], 这表明 VEGF 与难治性癫痫的发生也存在相关性。先前本课题组将 Sema3F 在 0 min、5 min、15 min、30 min 这 4 个时间点, 加入到原代大鼠海马神经元当中, 发现了海马神经元中 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达随着时间的增长而逐渐增多。本课题组另一项研究, 在 0 min、30 min 这两个时间点, 在培养到 3 天的原代大鼠海马神经元中加入了 Sema3F, 而对照组加入了同等剂量的胎牛血清, 之后应用高通量测序的方法发现实验组的 VEGF mRNA 较对照组表达显著升高, 以上本课题的研究结果也提示了在神经系统中 VEGF 具有一定的作用。

VEGF 对神经系统中的血管和神经有着双重作用。一方面, 它能够促进血管增殖, 加剧癫痫的发生。另一方面, 它能够抑制海马细胞凋亡, 促进神经干细胞(neural stem cells, NSCs)增殖, 以及修复受损的神经[19], 对癫痫的发生有保护作用。既往研究发现, SE 后癫痫的发展过程中 VEGF 和 VEGFR2 的表达存在波动现象, 这与 SRS 的发生趋势是一致的[20]。VEGF 可促进 SE 后急性期海马 NSCs 的再生, 提示其可能参与了癫痫的发生。研究人员已经证明了 VEGF 的双重作用参与了正常成人脑的神经和血管生成。在脑缺血模型中已经证实, VEGF 在脑损伤后的不同时期具有不同的作用。缺血早期阻断 VEGF 的表达可减轻脑水肿, 在亚急性期促进 VEGF 表达可改善脑血管灌注, 促进血管生成以及损伤部位的神经生成, 而且还不会破坏血管的渗透性[21]。一项研究[22]显示, 在颅脑损伤的亚急性期, 将外源性 VEGF 注入侧脑室, 可以促进内皮细胞增殖, 增加血管总数, 从而达到保护大脑的作用。因此, 目前 VEGF 在癫痫的发生中的具体作用机制仍然是不明确的。

VEGF/VEGFR 信号在中枢神经系统血管生成中至关重要[23]。一些研究中, 有的强调了 VEGF/VEGFR 信号通路在癫痫病中的负面作用, 包括血管畸形、血脑屏障功能障碍和血管的过度生成。也有研究显示, VEGF/VEGFR 信号在中枢神经系统中具有神经营养作用, 包括诱导神经突生长和抑制神经元死亡。一些研究报道了 VEGF 在毛果芸香碱诱导的 SE 大鼠中具有抗癫痫作用[24], 应用 VEGF 治疗可减少脑组织神经元的自发放电, 并促进体内海马神经发生, 提高识别能力。此外, 使用 VEGF 治疗能够改变星形胶质细胞的形态, 特别是其分支的形态, 这可能会改善癫痫发作后的海马区域的功能。在实验性癫痫模型中, VEGF 在三个突触回路中每个主要的谷氨酸突触水平上抑制诱发的突触后电位, 并减少毛果芸香碱导致 CA3 区诱发的或自发的癫痫发作[25]。在本实验中, 在使用氯化锂-毛果芸香碱诱导的癫痫持续状态的大鼠海马组织中, 发现 VEGF 的表达明显增高, 这也提示了 VEGF 对癫痫的发生具有一定的潜在作用。

蒙医药的发展早在 3000 年前就有了记载, 一些传统的蒙医药方剂在民间广为流传。这些古老的民间

偏方被用于治疗各种疾病, 初步奠定了蒙医药发展的基础。蒙医以阴阳五行哲学为指导, 辨证治疗六种基本疾病。蒙医沿用至今, 疗效准确可靠。它是在长期临床实践的基础上逐步发展起来的。蒙医药为蒙古民族的繁荣昌盛、疾病防治作出了贡献, 丰富了祖国的医学宝库, 应继续发扬光大。在本研究中, 我们使用蒙药朝伦雄胡-5 对癫痫持续状态大鼠模型进行干预, 希望能为癫痫的治疗提供新的治疗手段。实验结果发现, 与对照相比, 在蒙药组中, 该药物会对 VEGF mRNA 及蛋白起到了一定的抑制作用。

综上, 本实验发现 VEGF 参与了癫痫的病理过程, 且在毛果芸香碱诱导的大鼠发生癫痫持续状态后的 24 小时内, VEGF mRNA 以及蛋白的表达是升高的, 这提示在癫痫发作的急性期, VEGF 可能具有一定的潜在作用, 但其具体的保护机制还需要进一步研究。而蒙药朝伦雄胡-5 在癫痫发作的急性期会抑制癫痫大鼠模型海马组织中 VEGF mRNA 和蛋白的表达, 表明该药物在癫痫这一疾病的治疗方面可能具有一定作用, 我们在后续实验中会继续研究该药物的作用机制。

5. 结论

- 1) 在氯化锂 - 毛果芸香碱诱导的癫痫持续状态大鼠海马中的 VEGF mRNA 的表达是升高的。
- 2) 在氯化锂 - 毛果芸香碱诱导的癫痫持续状态大鼠海马中的 VEGF 蛋白的表达是升高的。
- 3) 蒙药朝伦雄胡-5 在大鼠癫痫持续状态模型中从转录水平上可诱导 VEGF 表达下降, 并且随着时间的增长而不断降低。
- 4) 蒙药朝伦雄胡-5 在癫痫持续状态模型中从蛋白水平上可部分抑制 VEGF 表达升高。

基金项目

内蒙古医科大学青年项目: 蒙药朝伦雄胡-5 对难治性癫痫大鼠模型中 VEGF 表达影响的研究(项目编号: YKD2024QN002); 国家自然科学基金项目: 癫痫大鼠模型中 Sema3F 与 VEGF 相关性研究(项目编号: 8226050455); 内蒙古医科大学面上项目: 蒙药朝伦雄胡-5 对难治性癫痫大鼠模型干预作用机制研究(项目编号: YKD2022MS032)。

参考文献

- [1] Han, W., Song, X., He, R., Li, T., Cheng, L., Xie, L., *et al.* (2017) VEGF Regulates Hippocampal Neurogenesis and Reverses Cognitive Deficits in Immature Rats after Status Epilepticus through the VEGF R2 Signaling Pathway. *Epilepsy & Behavior*, **68**, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.12.007>
- [2] Iyer, S. and Acharya, K.R. (2011) Tying the Knot: The Cystine Signature and Molecular-Recognition Processes of the Vascular Endothelial Growth Factor Family of Angiogenic Cytokines. *The FEBS Journal*, **278**, 4304-4322. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08350.x>
- [3] Wittko-Schneider, I.M., Schneider, F.T. and Plate, K.H. (2013) Brain Homeostasis: VEGF Receptor 1 and 2—Two Unequal Brothers in Mind. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **70**, 1705-1725. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1279-3>
- [4] Greenberg, D.A. and Jin, K. (2013) Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) and Stroke. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **70**, 1753-1761. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1282-8>
- [5] Claesson-Welsh, L. and Welsh, M. (2013) VEGFA and Tumour Angiogenesis. *Journal of Internal Medicine*, **273**, 114-127. <https://doi.org/10.1111/joim.12019>
- [6] Masi, A., Breen, E.J., Alvares, G.A., Glozier, N., Hickie, I.B., Hunt, A., *et al.* (2017) Cytokine Levels and Associations with Symptom Severity in Male and Female Children with Autism Spectrum Disorder. *Molecular Autism*, **8**, Article No. 63. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0176-2>
- [7] Belagodu, A.P., Fleming, S. and Galvez, R. (2017) Neocortical Developmental Analysis of Vasculature and Their Growth Factors Offer New Insight into Fragile X Syndrome Abnormalities. *Developmental Neurobiology*, **77**, 1321-1333. <https://doi.org/10.1002/dneu.22514>
- [8] Moore, A.M., Mahoney, E., Dumitrescu, L., De Jager, P.L., Koran, M.E.I., Petyuk, V.A., *et al.* (2020) APOE E4-Specific Associations of VEGF Gene Family Expression with Cognitive Aging and Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*,

- 87, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.10.021>
- [9] 昭乌达蒙医院进修班, 编. 蒙医药方汇编[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2004.
 - [10] 额日和木其其格. 原代大鼠海马神经元中 Sema3F 对 VEGF mRNA 及蛋白表达的影响[D]: [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019.
 - [11] 赵晶晶. 原代大鼠海马神经元中 Sema3F 与 CREB 在基因和转录水平的相关性[D]: [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021.
 - [12] 陈睿, 薛国芳. 难治性癫痫动物模型的研究进展[J]. 癫痫杂志, 2021, 7(5): 431-435.
 - [13] Park, K., Amano, H., Ito, Y., Kashiwagi, S., Yamazaki, Y., Takeda, A., *et al.* (2016) Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1) Signaling Enhances Angiogenesis in a Surgical Sponge Model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **78**, 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.005>
 - [14] Holopainen, I.E. (2008) Seizures in the Developing Brain: Cellular and Molecular Mechanisms of Neuronal Damage, Neurogenesis and Cellular Reorganization. *Neurochemistry International*, **52**, 935-947. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.10.021>
 - [15] Ben-Ari, Y. and Holmes, G.L. (2006) Effects of Seizures on Developmental Processes in the Immature Brain. *The Lancet Neurology*, **5**, 1055-1063. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(06\)70626-3](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(06)70626-3)
 - [16] Dienstmann, R., Rodon, J., Serra, V. and Tabernero, J. (2014) Picking the Point of Inhibition: A Comparative Review of PI3K/AKT/mTOR Pathway Inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics*, **13**, 1021-1031. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-13-0639>
 - [17] Abe, E., Fujiki, M., Nagai, Y., Shiqi, K., Kubo, T., Ishii, K., *et al.* (2010) The Phosphatidylinositol-3 Kinase/AKT Pathway Mediates Geranylgeranylacetone-Induced Neuroprotection against Cerebral Infarction in Rats. *Brain Research*, **1330**, 151-157. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.074>
 - [18] Rigau, V., Morin, M., Rousset, M.-., de Bock, F., Lebrun, A., Coubes, P., *et al.* (2007) Angiogenesis Is Associated with Blood-Brain Barrier Permeability in Temporal Lobe Epilepsy. *Brain*, **130**, 1942-1956. <https://doi.org/10.1093/brain/awm118>
 - [19] Jiang, S., Xia, R., Jiang, Y., Wang, L. and Gao, F. (2014) Vascular Endothelial Growth Factors Enhance the Permeability of the Mouse Blood-Brain Barrier. *PLOS ONE*, **9**, e86407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086407>
 - [20] Lenzer-Fanara, J.R., Li, T., Salerni, E.A., Payen, F. and Croll, S.D. (2017) VEGF Treatment during Status Epilepticus Attenuates Long-Term Seizure-Associated Alterations in Astrocyte Morphology. *Epilepsy & Behavior*, **70**, 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.02.019>
 - [21] Zhu, L., Dai, S., Lu, D., Xu, P., Chen, L., Han, Y., *et al.* (2020) Role of NDEL1 and VEGF/VEGFR-2 in Mouse Hippocampus after Status Epilepticus. *ASN Neuro*, **12**, Article 1759091420926836. <https://doi.org/10.1177/1759091420926836>
 - [22] Zhang, Z.G., Zhang, L., Jiang, Q., Zhang, R., Davies, K., Powers, C., *et al.* (2000) VEGF Enhances Angiogenesis and Promotes Blood-Brain Barrier Leakage in the Ischemic Brain. *Journal of Clinical Investigation*, **106**, 829-838. <https://doi.org/10.1172/jci9369>
 - [23] Lange, C., Storkebaum, E., de Almodóvar, C.R., Dewerchin, M. and Carmeliet, P. (2016) Vascular Endothelial Growth Factor: A Neurovascular Target in Neurological Diseases. *Nature Reviews Neurology*, **12**, 439-454. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.88>
 - [24] Han, W., Song, X., He, R., Li, T., Cheng, L., Xie, L., *et al.* (2017) VEGF Regulates Hippocampal Neurogenesis and Reverses Cognitive Deficits in Immature Rats after Status Epilepticus through the VEGF R2 Signaling Pathway. *Epilepsy & Behavior*, **68**, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.12.007>
 - [25] McCloskey, D.P., Croll, S.D. and Scharfman, H.E. (2005) Depression of Synaptic Transmission by Vascular Endothelial Growth Factor in Adult Rat Hippocampus and Evidence for Increased Efficacy after Chronic Seizures. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 8889-8897. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2577-05.2005>