

参考文献

1 李宏宇,梁 斌,李丽春,等. 体外冲击波治疗四肢骨折内固定术后骨不连[J]. 中国矫形外科,2011,19(2):175-176.

2 Wang L, Liu T, Zhang X, et al. Expression of bone morphogenetic protein 2 in human nonunion tissue and the clinical significance[J]. Zhong Nan Da Xue XueBao Yi Xue Ban, 2014, 39(10):1023-1028.

3 Ogilvie CM, Lu C, Marcucio R, et al. Vascular endothelial growth factor improves bone repair in a murine nonunion model[J]. Iowa Orthop J, 2012, 32:90-94.

4 Shibasaki S, Kitano S, Karasaki M, et al. Blocking c-Met signaling enhances bone morphogenetic protein-2 induced osteoblast differentiation[J]. FEBS Open Bio, 2015, (5):341-347.

5 Vulpiani MC, Vetrano M, Conforti F, et al. Effects of extracorporeal shock wavetherapy on fracture nonunions[J]. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2012, 41(9): E122-127.

6 Wang FS, Yang KD, Kuo YR, et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal shock wave-promoted healing of segmental defect[J]. Bone, 2003, 32(4):387-396.

7 Ma HZ, Zeng BF, Li XL. Upregulation of VEGF in subchondral bone of necrotic femoral heads in rabbits with use of extracorporeal shock-waves[J]. Calcif Tissue Int, 2007, 81(2):124-131.

8 李胜华,李爱民,伍贤进. 接骨草化学成分研究[J]. 中草药, 2011, 42(8):1502-1504.

9 王朝元,易继凌,宋 超,等. 绿原酸对体外培养成骨细胞活性的影响[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2013, 2:46-50.

10 方 芳,王平珍,邱 芸. 仙桃草促进骨折愈合机制探讨[J]. 中国民族民间医药, 2014, (21):15.

[收稿日期 2015-07-27][本文编辑 黄晓红]

课题研究·论著

丙戊酸钠对癫痫大鼠脑损伤时 GFAP 表达的影响

卢万可, 高 然

基金项目: 深圳市宝安区科技计划社会公益项目(编号:2013037)

作者单位: 518101 广东,深圳市宝安区人民医院急诊科

作者简介: 卢万可(1979-),男,大学本科,学士学位,主治医师,研究方向:急诊内科疾病的诊治。E-mail:huangj2013@126.com

[摘要] **目的** 探究应用丙戊酸钠(valproate, VPA)对大鼠癫痫脑损伤时海马胶质原纤维蛋白(glial fibril protein, GFAP)表达的影响。**方法** 选择成年健康SD雄性大鼠80只,以随机数字表法分为A组、B组、C组以及D组各20只。A组不作任何干预措施;B组只进行单纯的VPA洗胃;C组为癫痫模型,不进行任何治疗;D组为癫痫模型,应用VPA治疗。对比各组大鼠海马CA1、CA2区GFAP阳性细胞数、平均截面积、平均灰度值、累积光密度以及平均光密度。**结果** 在海马CA1、CA2区GFAP阳性细胞数C、D组显著高于A、B组,并且D组低于C组。海马区CA1、CA2区中平均截面积、累积光密度以及平均光密度C、D组高于A、B组,并且C组高于B组;而C、D组平均灰度值低于A、B组,并且C组低于B组,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。**结论** VPA具有显著抑制癫痫大鼠模型中GFAP表达的效果,同时减少脑损伤程度,安全程度较高。

[关键词] 癫痫; 脑损伤; 丙戊酸钠; 海马胶质原纤维蛋白

[中图分类号] R 742.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)06-0472-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.06.02

Effect of sodium valproate on the expressions of GFAP in rats with epileptic brain injury LU Wang-ke, GAO Ran. Department of Emergency, the People's Hospital of Baoan District, Shenzhen City, Guangdong 518101, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of sodium valproate(VPA) on the expressions of glial fibril protein(GFAP) in hippocampus of rats with epileptic brain injury. **Methods** Eighty adult male SD rats were randomly divided into group A, group B, group C and group D, with 20 cases in each group. No intervention was given to group A; group B was only treated with VPA gastric lavage; Epileptic rat's models were established in both group C and group D, with the treatment of valproate in group D and without any intervention in group C. The number of CA1 positive cells in CA2 and GFAP regions, the average cross-sectional area, the average gray value, the accumulated opti-

cal density, and the average optical density were compared among the four groups. **Results** The numbers of GFAP positive cells in CA2 and CA were significantly higher in group C and group D than those in group A and group B, and the number of GFAP cells in group D was significantly lower than that in group C. The mean cross-sectional area of CA1 or CA2, was significantly higher in group C or group D than that in group A or group B, and the mean area of CA1 or CA2 in group C was higher than that in group B. The average gray values were significantly lower in group C and group D than group A and group B, and the one in group C was lower than that in group B. **Conclusion** Valproate can significantly inhibit the expression of GFAP in rat model of epilepsy, and reduce the degree of brain damage.

[Key words] Epilepsy; Brain injury; Sodium valproate; Hippocampal glial fibrillary protein

随着交通业及建筑业的高速发展,导致的颅脑损伤发生率逐渐增加^[1]。其中癫痫发生后出现脑损伤已经成为常见的并发症,对患者生活造成严重的影响^[2]。癫痫患者脑部组织氧供严重缺失,使得损伤后的颅脑再次受到神经挫伤,还有可能引起意识障碍,伤后昏迷时间长以及增加脑部水肿的几率。颅脑损伤后若长时间昏迷,加大了病后处理难度和病死率。因此,临床必须采用有效的抗癫痫药物治疗。丙戊酸钠(valproate, VPA)作为新型抗癫痫药物逐渐被关注,但其作用效果及机制仍需进一步试验来观察及探讨^[3]。鉴于此,本文通过应用 VPA 治疗癫痫大鼠,同时观察海马胶质原纤维蛋白(glial fibril protein, GFAP)表达情况,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 实验资料 选择健康成年 SD 雄性大鼠 80 只。大鼠由河北医科大学实验动物中心提供,合格证号 906161。以随机数字表法分为 4 组,即正常组(A 组)、正常洗胃组(B 组)、癫痫模拟组(C 组)以及癫痫治疗组(D 组)各 20 只。其中 A 组不作任何干预措施;B 组只进行单纯的 VPA 洗胃;C 组为癫痫模型,不进行任何治疗;D 组同样为癫痫模型,应用 VPA 治疗。VPA 缓释片为赛诺菲安万特制药有限公司提供,GFAP 抗体 ZA-0117-9000 免疫组化检测试剂盒由北京中杉金桥生物有限公司提供。应用光学显微镜(Olympus)观察,以及 Ax07 TRF-A 荧光显微成像系统取得观察图片。

1.2 研究方法

1.2.1 模型制备 根据 10 μl/g 剂量给大鼠注射致癫痫剂马桑内酯,观察活动情况。然后按照分组进行饲养,所有大鼠饲养的饲料量、环境一致。以 Racine 作为评定标准:1 级动须,2 级节律性点头,3 级一侧前肢阵挛,4 级站立伴双前肢阵挛,5 级在 4 级基础上加跌倒伴全身抽搐达到 3 级以上为成功。灌胃 VPA 以 100 mg/kg 为标准,并且灌胃次数、时间相等,1 次/d,持续 1 周。

1.2.2 固定后取材 饲养时间为 7 d,每天均在同一时间洗胃一次,所有大鼠一次性进行检查。采用乙醚对大鼠进行麻醉后固定四肢,从心尖穿刺到主动脉后应用止血夹止血后用生理盐水进行输液。在右心耳输出的液体逐渐变澄清后输注 4% 多聚甲醛,肌抖动消失后再持续 30 min 即可。最后通过颅骨切开取得完整的脑组织,并放置在 4% 的甲醛中固定 6 h。

1.2.3 免疫组化 固定的材料进行常规脱水后包埋得到片厚 4 μm 的切片,然后采用 SABC 法进行脱蜡。通过稀释后加用二抗 DAB 进行显色,苏木素复染后显微镜观察。

1.3 观察指标^[4,5] 选择海马 CA1、CA2 区并于 40 × 10 倍显微镜下观察计算 GFAP 阳性细胞数。由显微成像系统获得的图片通过软件分析得到平均截面积、平均灰度值、累积光密度以及平均光密度。

1.4 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四组大鼠海马区 CA1、CA2 区 GFAP 阳性细胞数比较 在海马 CA1、CA2 区中 C、D 组 GFAP 阳性细胞数显著高于 A、B 组,并且 D 组低于 C 组,差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.05)。见表 1。

表 1 四组大鼠海马区 CA1、CA2 区 GFAP 阳性细胞数比较 [$(\bar{x} \pm s)$, %]

组 别	动物数	CA1	CA2
A 组	20	8.38 ± 2.15	8.45 ± 2.26
B 组	20	8.67 ± 2.31	8.73 ± 2.51
C 组	20	17.37 ± 4.08 ^{▲▲}	17.94 ± 4.51 ^{▲▲}
D 组	20	13.15 ± 3.12 ^{▲▲#}	14.02 ± 3.41 ^{▲▲#}
<i>F</i>	—	7.382	8.471
<i>P</i>	—	0.000	0.000

注:与 A 组相比,△*P* < 0.05;与 B 组相比,▲*P* < 0.05;与 C 组相比, #*P* < 0.05

2.2 四组大鼠海马 CA1、CA2 区平均截面积和平均灰度值比较

海马区 CA1、CA2 区中 C、D 组平均截面积高于 A、B 组,并且 C 组高于 B 组。而 C、D 组平均灰度值低于 A、B 组,并且 C 组低于 B 组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。见表 2。

表 2 四组大鼠海马 CA1、CA2 区平均截面积和平均灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	平均截面积(μm^2)		平均灰度值(解析度)	
		CA1	CA2	CA1	CA2
A 组	20	421.47 $\pm$ 117.48	445.39 $\pm$ 134.28	128.34 $\pm$ 26.48	125.43 $\pm$ 24.18
B 组	20	424.85 $\pm$ 121.32	456.28 $\pm$ 141.28	126.30 $\pm$ 25.85	124.18 $\pm$ 24.01
C 组	20	840.38 $\pm$ 251.47 ^{△▲}	873.29 $\pm$ 275.39 ^{△▲}	103.29 $\pm$ 19.40 ^{△▲}	98.12 $\pm$ 18.64 ^{△▲}
D 组	20	503.47 $\pm$ 171.48 ^{△▲#}	541.37 $\pm$ 184.28 ^{△▲#}	115.23 $\pm$ 23.18 ^{△▲#}	109.47 $\pm$ 22.11 ^{△▲#}
F	—	5.382	5.932	3.583	4.059
P	—	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 A 组相比,△ $P < 0.05$;与 B 组相比,▲ $P < 0.05$;与 C 组相比,# $P < 0.05$

2.3 四组大鼠海马 CA1、CA2 累积光密度和平均光密度比较

在海马 CA1、CA2 区中累积光密度和平均光密度 C、D 组显著高于 A、B 组,并且 D 组低于 C 组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。见表 3。

表 3 四组大鼠海马 CA1、CA2 区累积光密度和平均光密度比较[($\bar{x} \pm s$),OD]

组 别	动物数	累积光密度		平均光密度	
		CA1	CA2	CA1	CA2
A 组	20	11309.48 $\pm$ 756.12	11301.28 $\pm$ 48.12	0.3928 $\pm$ 0.0932	0.4018 $\pm$ 0.0978
B 组	20	11302.48 $\pm$ 755.38	11294.29 $\pm$ 45.68	0.3921 $\pm$ 0.0930	0.4021 $\pm$ 0.0983
C 组	20	49741.38 $\pm$ 131.58 ^{△▲}	49712.38 $\pm$ 127.09 ^{△▲}	0.7528 $\pm$ 0.1938 ^{△▲}	0.7138 $\pm$ 0.1911 ^{△▲}
D 组	20	32501.37 $\pm$ 87.38 ^{△▲#}	32482.19 $\pm$ 79.03 ^{△▲#}	0.5738 $\pm$ 0.1128 ^{△▲#}	0.5619 $\pm$ 0.1121 ^{△▲#}
F	—	8.382	9.604	10.483	7.483
P	—	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 A 组相比,△ $P < 0.05$;与 B 组相比,▲ $P < 0.05$;与 C 组相比,# $P < 0.05$

3 讨论

3.1 癫痫属于神经系统中常见疾病之一,虽然已经有较长历史,但是其发病机制还未完全确定^[6]。这使得对癫痫患者的诊断以及治疗存在一定的限制,尤其是癫痫造成脑损伤的患者。癫痫临床上没有根治的方法,加大了患者及其家属的生活压力。临床上对癫痫发病机制的深入了解发现 GFAP 在整个抗癫痫的治疗过程中发挥着重要作用,从而也成为癫痫药物研发的主要依据^[7]。癫痫患者出现脑损伤后相关星形胶质细胞(AST)会出现反应性细胞,病理表现出肥硕与增生的主要特征。其中 GFAP 是主要的反应性细胞,流程上通过对其观察能了解中枢神经系统相关 AST 的活动状态。因此,抑制 GFAP 生长的抗癫痫药物具有显著的治疗效果。药物治疗癫痫病有一定效果,同时在癫痫药物治疗后发现患者出现脑血管疾病的比例增大。为加强对癫痫患者的病情控制,临床上开始广泛应用 VPA 等癫痫药物^[8]。但是 VPA 在临床上对癫痫患者的实际作用还有待观察,需要通过多个试验以确定 VPA 能安全、有效地应用于癫痫患者的治疗。

3.2 本文通过应用 VPA 于癫痫大鼠中发现,在海马 CA1、CA2 区中 GFAP 阳性细胞数 C、D 组显著高于 A、B 组,并且 D 组低于 C 组。符合 Luo 等的报道^[9,10]。VPA 主要是通过提高合成 γ -氨基丁酸(GABA)的量,同时降低消耗 GABA 达到双重保证 GABA 浓度。这样就明显抑制神经元的兴奋性,从而消除癫痫的发生。并且 VPA 还能通过相关生理机制对 AST 蛋白的主要表达进行调控,从而发挥对神经元的保护作用。正常情况下 AST 支持神经元的相关功能,但是在激活后对癫痫疾病存在显著的促进作用。因为 AST 激活后与神经元之间的连接出现异常,这是癫痫发作的结构变化基础。再者,AST 在激活后还容易使炎症细胞因子水平产生的显著波动,导致神经元过度兴奋,从而形成坏死性神经元,促进

癫痫症状恶化。最后是激活的 AST 造成神经递质分泌水平的紊乱,在谷氨酸过度摄取的情况下造成神经元兴奋。所以,VPA 可能通过抑制激活后 AST 的相关功能进而降低 GFAP 表达。因此,VPA 成为临床主要治疗癫痫的药物。此外,海马区 CA1、CA2 区中平均截面积、累积光密度以及平均光密度 C、D 组高于 A、B 组,并且 C 组高于 B 组。而 C、D 组平均灰度值低于 A、B 组,并且 C 组低于 B 组,在 Jellett 等^[11,12]的报道中也有类似结论。当 GFAP 阳性细胞数逐渐减少后出现截面积液下降,相应的灰度值增加。尤其是 GFAP 阳性表达减少后表现出浅淡的着色结果,进而相关光密度下降^[13]。

综上所述,VPA 对大鼠癫痫脑损伤中 GFAP 表达有明显的抑制作用。VPA 主要通过抑制相关星状胶质细胞激活来发挥治疗癫痫的作用,安全性较高。

参考文献

1 王文志,吴建中,李世倬,等.我国农村地区 607 例癫痫患者应用丙戊酸钠治疗效果评价[J].中华神经科杂志,2011,44(1):15-19.

2 姜远旭,袁世茨,尚游,等.丙戊酸钠对内毒素血症大鼠全身炎症反应的影响[J].中华麻醉学杂志,2011,31(5):637-638.

3 Harrison IF, Crum WR, Vernon AC, et al. Neurorestoration induced by the HDAC inhibitor sodium valproate in the lactacystin model of Parkinson's is associated with histone acetylation and up-regulation of neurotrophic factors[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(16):4200-

4215.

4 吕锦,卢丽萍,蓝丽康,等.丙戊酸钠对 EAE 大鼠的治疗作用及其免疫调节机制[J].中华微生物学和免疫学杂志,2014,1(8):609-615.

5 Bollino D, Balan I, Aurelian L, et al. Valproic acid induces neuronal cell death through a novel calpain-dependent necroptosis pathway[J]. J Neurochem, 2015, 133(2):174-186.

6 史向松,王守勇,李洪亮,等.表现为精神障碍的非惊厥性癫痫持续状态二例[J].中华精神科杂志,2014,47(6):363-364.

7 张晓玲,官俏兵,钱淑霞,等.老年人丙戊酸钠脑病 10 例并文献复习[J].中华老年医学杂志,2013,32(1):33-36.

8 衣明纪,冯雪英,付伟伟,等.高压氧对丙戊酸钠孤独症模型鼠学习记忆能力及海马锥体细胞形态学的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2013,35(6):447-451.

9 Luo Z, Fang Y, Zhang L, et al. The effects of antiepileptic drug valproic acid on apoptosis of hippocampal neurons in epileptic rats[J]. Pak J Pharm Sci, 2015, 28(1):319-324.

10 金保哲,李武雄,司昊天,等.丙戊酸对大鼠颅脑损伤局部炎症反应的抑制作用[J].中华实验外科杂志,2014,31(9):1910-1912.

11 Jellett AP, Jenks K, Lucas M, et al. Standard dose valproic acid does not cause additional cognitive impact in a rodent model of intractable epilepsy[J]. Epilepsy Res, 2015, (110):88-94.

12 刘军,邢福祺,石宇,等.丙戊酸钠对少女癫痫患者性激素的影响[J].中华神经医学杂志,2012,11(10):989-991.

13 徐其岭,闫莉,谭毅,等.外伤性癫痫发病机制的研究进展[J].中国临床新医学,2013,6(9):913-916.

[收稿日期 2015-09-23][本文编辑 刘京虹]

课题研究·论著

单纯配镜对学龄前儿童戴镜视力改善作用的临床研究

蓝方方, 赵武校, 甘露

基金项目: 广西卫计委科研课题(编号:Z2011453,Z2014200); 广西医疗卫生重点科研课题(编号:重 2012111)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院视光科

作者简介: 蓝方方(1974-),女,医学硕士,副主任医师,研究方向:屈光不正的防治。E-mail:lf9898@163.com

【摘要】目的 探讨屈光不正儿童在戴镜前后的视力变化,评估单纯屈光矫正在学龄前儿童视力改善中的临床作用。方法 回顾性分析 112 例(224 眼)2~7 岁的屈光不正儿童,给予合理的屈光矫正后,随访 3 个月、6 个月后戴镜视力的变化情况。结果 按年龄分组:在戴镜 3 个月后,3 个年龄组间戴镜视力提升有差异($\chi^2=29.391, P=0.000$),其中 3~5 岁提升最明显,5~7 岁年龄组其次,<3 岁年龄组最差;戴镜半年后各年龄组间戴镜视力的提升差异无统计学意义($\chi^2=8.210, P=0.084$)。按屈光状态分组:在屈光矫正半年后,各组间的戴镜视力提升差异有统计学意义($\chi^2=23.517, P=0.003$),其中单纯远视或远视散光的儿童戴镜视