

柴胡皂苷 a 抑制 PTZ 诱导的小鼠海马星形胶质细胞活化*

单萍, 张继龙[△], 笱玉兰, 罗利俊
(武汉市第一医院神经内科, 湖北 武汉 430022)

[摘要] **目的:** 探讨柴胡皂苷 a (SSa) 对戊四氮 (PTZ) 诱导的小鼠海马星形胶质细胞活化的抑制作用。**方法:** 分离培养小鼠海马星形胶质细胞, 将细胞随机分为对照组、PTZ 组、PTZ + 0.625 mg/L SSa 组和 PTZ + 1.25 mg/L SSa 组。通过免疫荧光染色检测胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 的表达来鉴定细胞; 用 MTT 检测评估细胞活力; 用流式细胞术检测各组细胞的周期变化; ELISA 法检测各组细胞中 GFAP 和间隙连接蛋白 43 (Cx43) 的表达水平; 流式细胞术和 Hoechst 33258 染色检测各组细胞的凋亡情况。**结果:** 体外原代培养的星形胶质细胞贴壁生长, 细胞突起明显。免疫荧光显示星形胶质细胞呈 GFAP 阳性表达。与对照组比较, PTZ 组细胞活力和 G₂/M 期细胞百分比显著增加 ($P < 0.05$), GFAP 和 Cx43 的表达水平也显著上调 ($P < 0.05$); 与 PTZ 组比较, PTZ + 0.625 mg/L SSa 组和 PTZ + 1.25 mg/L SSa 组细胞活力和 G₂/M 期细胞百分比均明显下降, GFAP 和 Cx43 的表达水平也降低, 但细胞凋亡水平显著增加 ($P < 0.05$)。**结论:** SSa 能够显著抑制 PTZ 诱导的海马星形胶质细胞活化, 抑制细胞增殖并诱导凋亡。

[关键词] 癫痫; 星形胶质细胞; 柴胡皂苷 a; 戊四氮; 细胞凋亡

[中图分类号] R742.1; R363.2

[文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.03.017

Saikosaponin a inhibits PTZ-induced activation of hippocampal astrocytes in mice

SHAN Ping, ZHANG Ji-long, GOU Yu-lan, LUO Li-jun

(Department of Neurology, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China. E-mail: zhangjilong73@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the inhibitory effect of saikosaponin a (SSa) on pentylenetetrazole (PTZ)-induced activation of hippocampal astrocytes in mice. **METHODS:** Hippocampal astrocytes were isolated and cultured. The cells were randomly divided into control group, PTZ group, PTZ + 0.625 mg/L SSa group and PTZ + 1.25 mg/L SSa group. The cells were identified by detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP). The cell viability was measured by MTT assay. The cell cycle was analyzed by flow cytometry. The expression of GFAP and connexin 43 (Cx43) was measured by ELISA. The level of apoptosis was determined by flow cytometry and Hoechst 33258 staining. **RESULTS:** The primary hippocampal astrocytes grew by adherent culture, and the processes of the astrocytes were obvious. Immunofluorescence showed positive GFAP expression in the astrocytes. Compared with control group, the viability of the cells and the percentage of the cells in G₂/M phase in PTZ group were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression of GFAP and Cx43 was also markedly increased ($P < 0.05$). Compared with PTZ group, the viability of the cells and the percentage of the cells in G₂/M phase were obviously decreased in PTZ + 0.625 mg/L SSa group and PTZ + 1.25 mg/L SSa group, and the expression of GFAP and Cx43 was also reduced, whereas the percentage of apoptotic cells was significantly increased ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** SSa significantly suppresses PTZ-induced activation of hippocampal astrocytes, inhibits the cell proliferation and induced apoptosis.

[KEY WORDS] Epilepsy; Astrocytes; Saikosaponin a; Pentylenetetrazole; Apoptosis

癫痫是一种全球范围内最为常见的神经系统综合征, 主要表现为神经过度兴奋以及神经元突发性产生生物电信号导致的癫痫发作, 其特点是反复发作, 扰乱正常的大脑功能, 并有可能损伤大脑, 使原

[收稿日期] 2018-05-17 [修回日期] 2018-07-12

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81703870); 湖北省自然科学基金资助项目 (No. 2017CFC854)

△ 通讯作者 Tel: 15327235336; E-mail: zhangjilong73@163.com

有的神经系统缺陷持续恶化。其中,颞叶癫痫是成人癫痫患者中最为常见的类型,其主要特点是海马区硬化。由于药物治疗的临床疗效不佳,颞叶癫痫现已成为具有药物抵抗性的难治性癫痫,占难治性癫痫总人数的50%以上^[1]。传统观念认为,癫痫的发生是由神经元异常产生的,但越来越多的研究数据显示,星形胶质细胞的功能紊乱和代谢稳态失调参与神经元的过度兴奋、神经毒性和癫痫的发作^[2-3]。使用代谢抑制剂抑制星形胶质细胞新陈代谢时,可导致癫痫的发作^[4]。这表明,星形胶质细胞在维持正常大脑活性中具有关键的作用。研究发现,星形胶质细胞增生和神经炎症与癫痫发生、复发和自发性发作有关^[5-6]。柴胡皂苷 a(Saikosaponin a, SSa)是临床常用中药柴胡的主要药理成分柴胡皂苷的一种单体成分,具有多种药理功能,如抗癫痫、抗抑郁和抗惊厥等^[7-8]。本研究在前人研究的基础上,使用戊四氮(pentylentetrazole, PTZ)和 SSa 处理原代培养的小鼠星形胶质细胞,进一步探究 SSa 对 PTZ 诱导的小鼠海马星形胶质细胞活化的影响。

材 料 和 方 法

1 实验材料

DMEM/F12 培养基购自 Gibco(11320082);PTZ 购自 Sigma(P6500);柴胡皂苷 a 购自国药集团化学试剂有限公司(xw080063);小鼠抗胶质细胞原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)单克隆抗体和小鼠荧光 II 抗购自 Abcam(ab10062 和 ab150116);细胞周期检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒和 Hoechst 33258 染色液购自碧云天生物技术公司(C1052、C1062 和 C1011);小鼠 GFAP 和间隙连接蛋白 43(connexin 43, Cx43)的 ELISA 检测试剂盒购自 Biocompare(orb409337 和 MBS2019835)。

2 方法

2.1 小鼠海马星形胶质细胞的分离及培养 小鼠海马星形胶质细胞的体外原代培养参考 Mccarthy 法并加以改进^[9]。取 1~3 d 新生 C57BL/6 小鼠,乙醇消毒后开颅处理,小心剔除血管和脑膜,分离海马组织,剪碎组织,并进行细胞消化和离心,差速贴壁 40 min 后,采用含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基接种细胞,细胞密度控制为 $1 \times 10^9/L$ 。将接种细胞置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 7~9 d,待细胞融合度达到 70%~80%时,将培养瓶置于 37.0℃ 恒温旋转摇床(240 r/min)上摇 18 h 后,后续传代培养即可获得纯化的星形胶质细胞。

2.2 细胞鉴定 采用免疫荧光检测星形胶质细胞

标志物 GFAP 对分离培养的小鼠海马星形胶质细胞进行鉴定。将培养的小鼠海马星形胶质细胞接种至预先放置有盖玻片的培养皿中,待细胞融合度达到 80%左右时,取出细胞培养皿,清洗细胞后依次采用 4% 多聚甲醛、0.5% Triton X-100 和 5% BSA 处理细胞,随后加入 GFAP I 抗稀释液,室温孵育 1 h 后,清洗后加入荧光 II 抗稀释液,避光室温孵育 1 h。取出干净的载玻片,滴 1 滴抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)(15~20 μL),用镊子小心取出盖玻片,将纸巾搭在边缘吸去多余液体,细胞面朝下,小心贴在载玻片上。荧光显微镜镜检观察。

2.3 细胞分组及处理 将鉴定成功的小鼠海马星形胶质细胞接种于 6 孔培养板中,每孔 5×10^5 个细胞,培养 48 h 后,采用无血清 DMEM/F12 培养基更换细胞培养基,将细胞随机分为 4 组:对照(control)组、PTZ 组、0.625 mg/L SSa 组和 1.25 mg/L SSa 组。PTZ 组细胞采用 10 mmol/L PTZ 进行药物诱导刺激 2 h;0.625 mg/L SSa 组和 1.25 mg/L SSa 组细胞在采用 10 mmol/L PTZ 进行药物刺激之前,依次采用 0.625 mg/L SSa 和 1.25 mg/L SSa 预处理细胞 6 h。

2.4 MTT 法检测细胞活力 选取生长状态良好的海马星形胶质细胞,制备单细胞悬液,调整细胞浓度后,接种 2.5×10^4 个细胞于 96 孔板内,每组设置 3 个复孔,轻轻混匀后置于培养箱中培养过夜。各组按照相应的处理方式进行处理,待药物作用时间结束后,每孔加入 20 μL 0.5% MTT 溶液,混匀后继续孵育 4 h,小心去掉上清后加入 150 μL DMSO,低速震荡混匀后,采用酶标仪检测 490 nm 处吸光度(A)值。

2.5 流式细胞术检测细胞周期 待各组细胞药物处理时间结束后,采用胰酶消化制备和收集单细胞悬液, $300 \times g$ 4℃ 离心 5 min,弃去上清后采用预冷的 PBS 清洗细胞 1 次后加入 300 μL PBS 重悬细胞,逐滴加入 700 μL 预冷的 70% 乙醇,轻轻吹打混匀后置于 4℃ 固定 24 h。 $1\ 000 \times g$ 离心 5 min,沉淀细胞后弃去上清。每个样本加入 500 μL 染色缓冲液重悬细胞并转入 1.5 mL 离心管中,然后加入 10 μL RNase A 溶液,25 μL 碘化丙啶染色液,轻轻混匀后置于 37℃ 避光温浴 30 min。随后置于冰上,即时采用流式细胞仪检测荧光信号。

2.6 Hoechst 33258 染色 将各组细胞培养液去掉, PBS 清洗 2 次后加入 800 μL 4% 多聚甲醛固定细胞,室温固定 10 min,清洗后,均匀地滴加 300~500 μL Hoechst 33258 染色液,室温孵育 3~5 min。染色结束后采用 PBS 清洗 3 遍后,取出干净的载玻片,滴 1 滴抗荧光淬灭封片液(15~20 μL),用镊子小心取出盖玻片,将纸巾搭在边缘吸去多余液体,细胞面朝

下,小心贴在载玻片上。荧光显微镜镜观察。

2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 待各组细胞药物处理时间结束后,收集单细胞悬液,1 000 × *g*,室温离心 5 min,弃上清,采用 PBS 清洗 2 次后采用 100 μL Binding Buffer 重悬细胞,依次加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染色液,轻轻混匀后,室温避光孵育 30 min。孵育时间结束后加入 300 μL Binding buffer 终止反应,随即进行流式细胞仪检测。

2.8 ELISA 检测各组细胞中 GFAP 和 Cx43 表达 待各组细胞药物处理时间结束后,收集细胞沉淀,采用小鼠的 GFAP 和 Cx43 的 ELISA 检测试剂盒检测各组细胞中 GFAP 和 Cx43 蛋白表达水平。具体操作参照 ELISA 检测试剂盒说明书。

3 统计学分析

实验数据采用均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。各组间统计学差异性检验采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Bonferroni 校正的 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠海马星形胶质细胞的培养和鉴定

镜检显示,原代分离培养的小鼠海马星形胶质细胞贴壁生长,生长状态良好,细胞突起明显可见,向外伸出,长短不一,见图 1A。采用细胞免疫荧光法鉴定,结果显示细胞呈 GFAP 阳性表达,证明分离的细胞为星形胶质细胞,见图 1B。

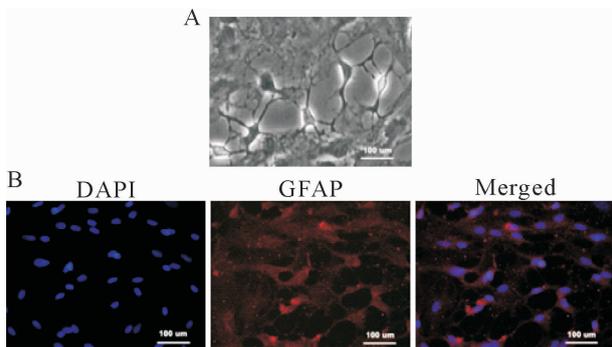


Figure 1. Mouse hippocampal astrocytes and their GFAP immunofluorescence staining. A: the morphological changes of mouse hippocampal astrocytes cultured *in vitro* ($\times 200$); B: mouse hippocampal astrocyte GFAP immunofluorescence positive expression ($\times 200$).

图 1 小鼠海马星形胶质细胞及其 GFAP 免疫荧光染色

2 PTZ 诱导小鼠海马星形胶质细胞活化及 SSa 的干预作用

采用 MTT 法检测 PTZ 诱导下星形胶质细胞的活力,结果显示,PTZ 组细胞活力显著高于对照组 ($P < 0.05$);与 PTZ 组比较,PTZ + 0.625 mg/L SSa

组和 PTZ + 1.25 mg/L SSa 组细胞活力明显降低 ($P < 0.05$);且 PTZ + 1.25 mg/L SSa 组细胞活力较 PTZ + 0.625 mg/L SSa 组更低 ($P < 0.05$)。这表明 PTZ 能够显著活化体外培养的小鼠海马星形胶质细胞,而 SSa 对 PTZ 的这一作用具有显著的抑制作用,见图 2。

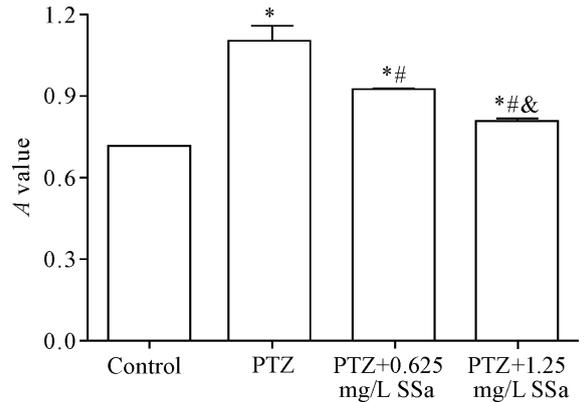


Figure 2. The viability of the astrocytes in each group was measured by MTT assay. Mean ± SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PTZ group; & $P < 0.05$ vs PTZ + 0.625 mg/L SSa group.

图 2 MTT 法检测各组星形胶质细胞的活力

3 SSa 对 PTZ 激活的小鼠海马星形胶质细胞周期的影响

进一步检测 SSa 对 PTZ 活化的小鼠海马星形胶质细胞增殖周期的影响,结果显示,PTZ 组 G_0/G_1 期细胞百分比较对照组显著降低 ($P < 0.05$),但 G_2/M 期细胞百分比较对照组显著升高 ($P < 0.05$);与 PTZ 组相比,PTZ + 0.625 mg/L SSa 组和 PTZ + 1.25 mg/L SSa 组 G_0/G_1 期细胞百分比均明显升高, G_2/M 期细胞百分比均显著降低 ($P < 0.05$);且 PTZ + 0.625 mg/L SSa 组与 PTZ + 1.25 mg/L SSa 组各时期细胞百分比也具有统计学差异 ($P < 0.05$),见图 3。这一结果表明,PTZ 能够促进海马星形胶质细胞增殖,SSa 能抑制 PTZ 诱导的细胞增殖。

4 SSa 对小鼠海马星形胶质细胞凋亡的影响

PTZ 组 Hoechst 33258 染色强阳性细胞数量较少,与对照组类似;但与 PTZ 组比较,PTZ + 0.625 mg/L SSa 和 PTZ + 1.25 mg/L SSa 组 Hoechst 33258 染色强阳性细胞数量明显增加,见图 4A。进一步流式细胞术检测细胞凋亡率,结果显示,PTZ 组和对照组细胞凋亡率均较少,组间比较无显著差异;与 PTZ 组比较,PTZ + 0.625 mg/L SSa 和 PTZ + 1.25 mg/L SSa 组细胞的凋亡百分比均显著增加 ($P < 0.05$),见图 4B。这表明,SSa 可促使小鼠海马星形胶质细胞发生凋亡。

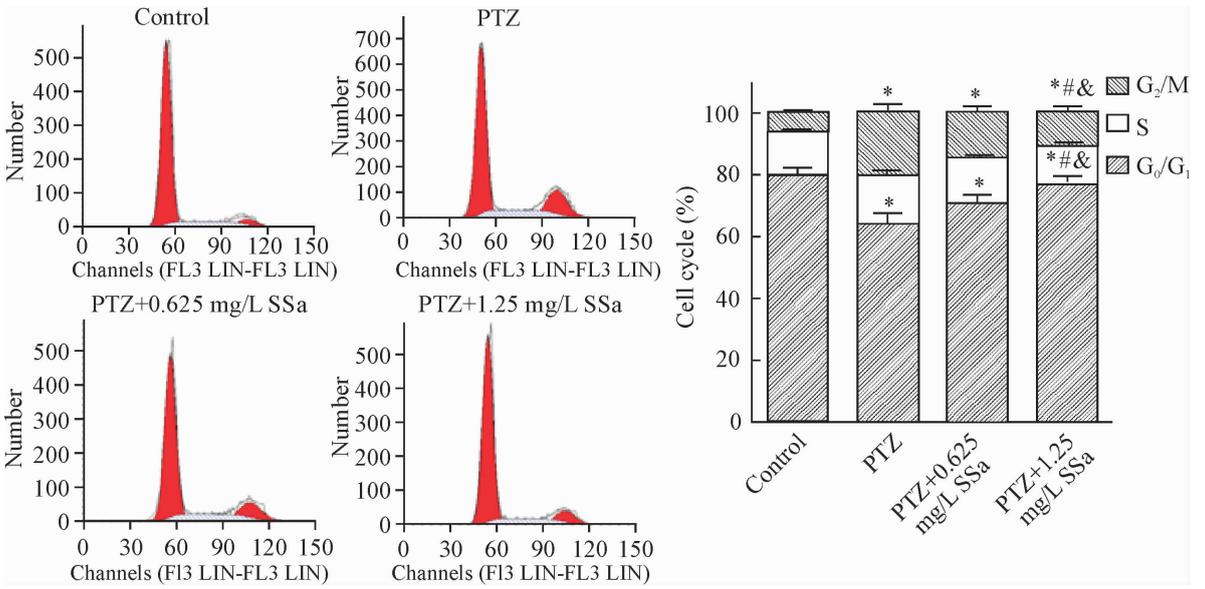


Figure 3. The detection of cell cycle of astrocytes by flow cytometry. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PTZ group; & $P < 0.05$ vs PTZ + 0.625 mg/L SSa group.

图3 流式细胞术检测星形胶质细胞的细胞周期

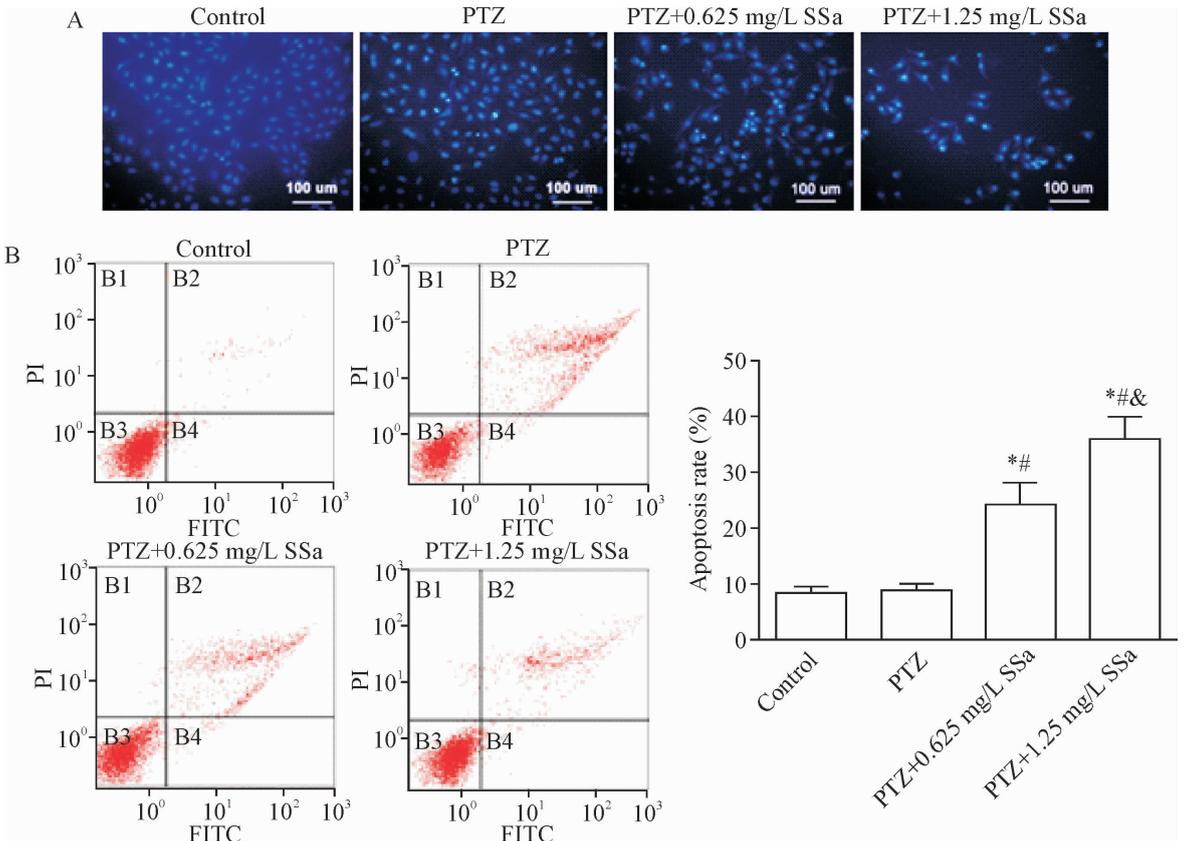


Figure 4. Apoptosis level detection and quantitative statistics in the astrocytes. A: apoptosis of the astrocytes was detected by Hoechst 33258 staining ($\times 200$); B: flow cytometry for the detection and statistical analysis of apoptosis of the astrocytes. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PTZ group; & $P < 0.05$ vs PTZ + 0.625 mg/L SSa group.

图4 星形胶质细胞的凋亡水平检测及定量统计

5 SSa 对 PTZ 激活的小鼠海马星形胶质细胞 GFAP 和 Cx43 蛋白表达的影响

检测不同处理条件下星形胶质细胞中 GFAP 和

Cx43 蛋白表达水平时发现,与对照组相比,PTZ 可显著增加细胞中 GFAP 蛋白表达水平,同时上调 Cx43 蛋白的表达($P < 0.05$);与 PTZ 组相比,PTZ + 0.625

mg/L SSa 组和 PTZ + 1.25 mg/L SSa 组细胞中 GFAP 和 Cx43 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 5。

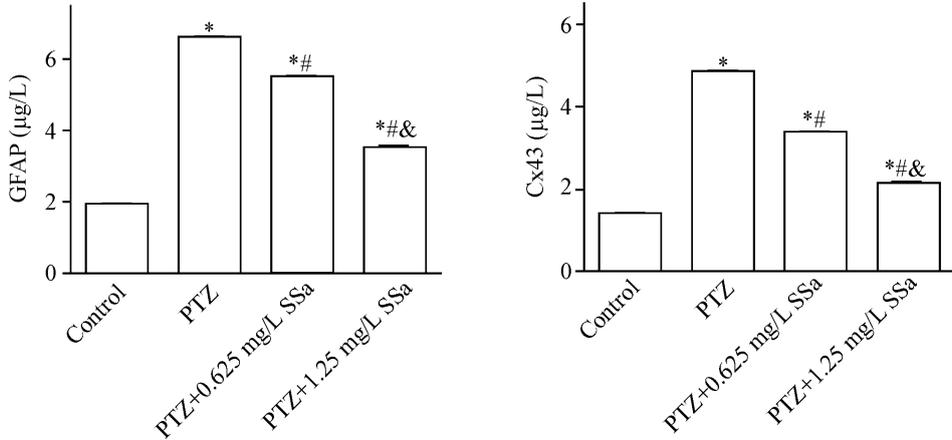


Figure 5. Protein expression levels of GFAP and Cx43 in the astrocytes of each group. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PTZ group; & $P < 0.05$ vs PTZ + 0.625 mg/L SSa group.

图 5 各组星形胶质细胞中 GFAP 和 Cx43 的蛋白表达水平

讨 论

据统计,全球癫痫患者数量高达五千万,我国癫痫患者占比全球癫痫患者的 18%,其中 55% ~ 67% 的癫痫患者为活动性癫痫患者^[10]。目前,癫痫的治疗手段仍是以抗癫痫药物治疗为主,尽管药物治疗已取得了明显的进步和疗效,由于癫痫患者对药物的耐药性或其他原因,仍有 30% 患者的治疗效果不佳,成为难治性癫痫^[11]。

研究显示,柴胡总皂苷可抑制 PTZ 慢性点燃大鼠的病性放电,进而抑制癫痫大鼠的发作,降低癫痫发作的级别和发作次数,即对 PTZ 慢性点燃癫痫进程具有一定的抑制作用^[12]。柴胡总皂苷是中草药柴胡的主要成分,依据其化学结构的不同可分为多种单体,其中 SSa 和柴胡皂苷 d (SSd) 是柴胡皂苷的有效成分,具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒和抗癫痫等多种作用^[13-14]。越来越多的研究发现,SSa 能够显著降低 PTZ 点燃大鼠癫痫发作的严重程度和持续时间,同时显著提高了癫痫发作的潜伏期,且能够通过下调 mTOR 信号通路抑制海马神经元的凋亡^[15]。SSa 能够抑制慢性点燃癫痫大鼠海马和颞叶皮层 PGP 的表达并抑制脑电图的病性放电,也能够降低 PTZ 诱导海马星形胶质细胞 TNF- α 的表达并抑制 TNFR1 的高表达^[9, 11]。

星形胶质细胞在维持内环境稳定、神经兴奋传递和血脑屏障等多方面发挥着重要作用^[16-17]。GFAP 是一种中间丝蛋白,广泛存在于发育和成熟的星形胶质细胞中,构成星形胶质细胞的细胞骨架。因此,GFAP 通常用作星形胶质细胞的特异性标志蛋

白,其表达量的多少也用于反映胶质细胞的功能状态^[18]。本实验中原代分离培养海马星形胶质细胞,免疫荧光检测 GFAP 表达水平鉴定细胞时发现,细胞 GFAP 免疫荧光呈阳性,结合细胞形态学观察,可以确定海马星形胶质细胞的成功分离,可用于后续实验。

这些结果表明,SSa 能够抑制 PTZ 诱导的星形胶质细胞中 GFAP 和 Cx43 的表达。

目前,星形胶质细胞增生、神经元损伤是癫痫患者大脑的病理特征,并被认为是癫痫发作的诱发因素^[19-20]。一般情况下,星形胶质细胞可有效清除兴奋性神经递质谷氨酸,将其转化为谷氨酰胺后释放到细胞外;但在病理情况下,星形胶质细胞增生可下调神经细胞的兴奋阈值,还可促使炎症因子和神经营养因子等释放,参与海马硬化,促进癫痫的发生^[21]。杨展能等^[22]的研究也发现 PTZ 诱导的癫痫模型中星形胶质细胞发生活化。本研究数据显示,PTZ 能够活化海马星形胶质细胞,促进细胞增殖,增加 GFAP 的表达;但 SSa 处理能够有效抑制 PTZ 诱导的海马星形胶质细胞的活化,抑制细胞的增殖,诱导细胞发生凋亡。此外,缝隙连接(gap junction, GJ)是由一系列的缝(间)隙连接蛋白(connexin, Cx)组成,主要行使细胞间直接信息交流的功能,其中 Cx43 是星形胶质细胞中最为常见的缝隙连接蛋白。有研究显示,在癫痫和帕金森病等疾病情况下,海马组织中 Cx43 蛋白表达水平及功能发生异常^[23]。例如,在致痫大鼠模型的相关研究中发现,致病组大鼠海马区与皮层区 Cx43 免疫阳性表达在癫痫发作 1 h 后开始增强,24 h 达到高峰,且致病 24 h 时海马区 Cx43 免疫阳性表达明显高于同一时限的皮层区^[24]。采用免疫组化及 Western blot 对难治性颞叶癫痫患者

的临床样本进行研究时发现,癫痫患者较无癫痫病史者的海马组织中 Cx43 蛋白表达异常增强,提示海马星形胶质细胞中 Cx43 的表达异常在癫痫等疾病的发生发展中发挥着重要的作用^[25]。而在帕金森大鼠模型中同样发现,模型组大鼠 Cx43 mRNA 表达较正常组和假手术组均显著升高^[26]。本文研究数据显示,SSa 可显著降低 PTZ 诱导的海马星形胶质细胞中 Cx43 的高表达。

[参 考 文 献]

[1] 杨海龙, 乔丽娜, 谭连红, 等. 耳穴区经皮电刺激对颞叶癫痫大鼠癫痫发作频率及海马区白介素-1 β /肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 针刺研究, 2016, 41(4): 283-290.

[2] Boison D, Steinhäuser C. Epilepsy and astrocyte energy metabolism[J]. *Glia*, 2018, 66(6):1235-1243.

[3] Dossi E, Vasile F, Rouach N. Human astrocytes in the diseased brain[J]. *Brain Res Bull*, 2018, 136:139-156.

[4] Willoughby JO, Mackenzie L, Broberg M, et al. Fluorocitrate-mediated astroglial dysfunction causes seizures[J]. *J Neurosci Res*, 2003, 74(1):160-166.

[5] Vizuete AFK, Hansen F, Negri E, et al. Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15:68.

[6] Robel S, Buckingham SC, Boni JL, et al. Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(8):3330-3345.

[7] 戈宏焱, 陈博, 许丹, 等. 柴胡皂苷 A 对抑郁模型大鼠脑中单胺类神经递质及其代谢产物含量的影响[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(8): 1535-1538.

[8] 李长征, 谢炜, 鲍勇, 等. 柴胡皂苷 α 对实验性癫痫大鼠模型的干预作用[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(6):839-840.

[9] 谢炜, 康萍, 张作文, 等. 柴胡皂苷 a 对 PTZ 诱导大鼠海马星形胶质细胞 TNF- α 释放及其受体表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(7): 647-649.

[10] 魏惠, 赵文艳, 高学军. 癫痫药物治疗研究进展[J]. 临床误诊误治, 2017, 30(6):108-112.

[11] 谢炜, 陈伟军, 孟春想, 等. 柴胡皂苷 a 对难治性癫痫大鼠多药耐药蛋白 P-糖蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 229-232.

[12] 谢炜, 鲍勇, 于礼建, 等. 柴胡总皂甙对戊四氮慢性点燃大鼠痫性发作及脑电图的影响[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(2):177-180.

[13] 谢东浩, 蔡宝昌, 安益强, 等. 柴胡皂苷类化学成分及

药理作用研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(1):63-65.

[14] 刘丹, 王佳贺. 柴胡皂苷抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(1):203-208.

[15] Ye M, Bi YF, Ding L, et al. Saikosaponin a functions as anti-epileptic effect in pentylenetetrazol induced rats through inhibiting mTOR signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81:281-287.

[16] 张菲菲. 星形胶质细胞在癫痫发病机制中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2015, 42(3): 272-275.

[17] 章科娜, 丁悦敏, 杜月光, 等. 星形胶质细胞的缝隙连接蛋白 43 参与冷冻伤后脑水肿的形成[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(11):1996-2002.

[18] 赵鑫, 寇江力, 郭永强, 等. Ski 在大鼠活化星形胶质细胞中表达的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(6):968-974.

[19] Peixoto-Santos JE, Velasco TR, Galvis-Alonso OY, et al. Temporal lobe epilepsy patients with severe hippocampal neuron loss but normal hippocampal volume: extracellular matrix molecules are important for the maintenance of hippocampal volume[J]. *Epilepsia*, 2015, 56(10):1562-1570.

[20] Liu J, Si Z, Li S, et al. The calcineurin inhibitor FK506 prevents cognitive impairment by inhibiting reactive astrogliosis in pilocarpine-induced status epilepticus rats[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11:428.

[21] 林卫红, 张淑琴, 孟红梅, 等. 星形胶质细胞在实验性癫痫中的作用及意义探讨[J]. 中风与神经疾病, 2004, 21(4):317-319.

[22] 杨展能, 姜靓婧, 顾仕红, 等. NMDA 受体在匹罗卡品癫痫小鼠海马星形胶质细胞活化中的作用[J]. 东南大学学报: 医学版, 2017, 36(2): 129-136.

[23] 董淑英, 童旭辉, 蒋国君, 等. 星形胶质细胞中缝隙连接蛋白 connexin 43 的表达及其功能调控[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(10):1423-1426.

[24] 曾杨滨, 刘宇明. 缝隙连接蛋白 Cx32 与 Cx43 在癫痫发病中的作用[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(9): 1438-1440.

[25] 姚丽芬, 王真奎, 王真刚, 等. 缝隙连接蛋白 Cx32、Cx43 在难治性颞叶癫痫患者脑中表达的研究[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(43):3058-3060.

[26] 马骏. 电针对帕金森病模型大鼠纹状体相关蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 中国针灸, 2015, 35(7):697-701.

(责任编辑: 卢萍, 罗森)