

于忠娟,柴峰,时宝林,等. 缬草酸对癫痫小鼠神经元保护及 P-糖蛋白表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 34-39.

Yu ZJ, Chai F, Shi BL, et al. Effect of valeric acid on neuronal protection and P-glycoprotein expression in epileptic mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 34-39.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.006

缬草酸对癫痫小鼠神经元保护及 P-糖蛋白表达的影响

于忠娟¹,柴峰¹,时宝林^{2*},张跃其²,吴春丽³

(1.山东省潍坊市第六人民医院内科,山东 潍坊 261000; 2.山东省潍坊市人民医院神经内科,山东 潍坊 261000;
3.山东省潍坊市人民医院产一科,山东 潍坊 261000)

【摘要】 目的 研究缬草酸联合丙戊酸钠(VPA)对戊四唑(PTZ)诱导癫痫小鼠的神经元保护作用及对 P-糖蛋白(P-GP)表达影响。方法 将小鼠分成 6 组:正常对照组、模型对照组、VPA 组、缬草酸组+VPA(低中高剂量各一组),记录各组癫痫发作潜伏期延长及持续时间;分析脑组织 P-GP 和 caspase-3 活性片段在脑组织中的表达及脑皮层神经元凋亡率。结果 与 VPA 组比较,不同剂量缬草酸+VPA 组发作持续时间缩短,中剂量缬草酸+VPA 组发作潜伏期延长。中剂量及高剂量缬草酸+VPA 组癫痫发作级别较 VPA 组下降。模型对照组大脑皮质 P-GP 明显高于正常对照组,VPA 组 P-GP 蛋白表达较模型对照组无明显改变,缬草酸+VPA 各组 P-GP 蛋白较 VPA 组下降,缬草酸中剂量组 Cleaved-caspase-3 表达较 VPA 组下降。缬草酸+VPA 各组凋亡率较 VPA 组下降。结论 缬草酸可能通过 P-GP 表达减少相关机制降低了戊四唑点燃/VPA 处理小鼠的癫痫发作严重程度。

【关键词】 缬草酸;癫痫;丙戊酸钠;P-糖蛋白;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0034-06

Effect of valeric acid on neuronal protection and P-glycoprotein expression in epileptic mice

YU Zhongjuan¹, CHAI Feng¹, SHI Baolin^{2*}, ZHANG Yueqi², WU Chunli³

(1. Department of Internal Medicine, Sixth People's Hospital of Weifang, Weifang 261000, China.

2. Department of Neurology, People's Hospital of Weifang, Weifang 261000.

3. First Department of Obstetrics, People's Hospital of Weifang, Weifang 261000)

【Abstract】 **Objective** To study the protective effect of valeric acid combined with sodium valproate (VPA) on pentylenetetrazole-induced epilepsy mice and P-glycoprotein (P-GP) expression. **Methods** Mice were divided into six groups: normal control group, model control group, VPA group, and valeric acid +VPA group (low, medium, and high doses). The expression of P-GP and caspase-3 active fragments in brain tissue and the rate of neuronal apoptosis in the cerebral cortex were analyzed. **Results** Compared with the VPA group, the seizure duration in all dose valeric acid + VPA groups was shortened, and the seizure latency in the middle-dose valeric acid group was prolonged. The seizure level in the middle-dose and high-dose valeric acid groups was lower than that in the VPA group. P-GP in the cerebral cortex of the model control group was significantly higher than that of the normal control group. The expression of P-GP protein in the VPA group was not significantly different compared with the model control group. Levels of P-GP protein were decreased in

【基金项目】潍坊市科技发展计划项目(2019YX072)。

【作者简介】于忠娟(1974—),女,副主任医师,研究方向:癫痫及脑血管病研究工作。E-mail:yuzhongjuanz@163.com

【通信作者】时宝林(1976—),男,教授,硕士生导师,研究方向:癫痫及脑血管病研究工作。E-mail:15965096500@163.com

all dose valeric acid + VPA groups compared with the VPA group. The expression of caspase-3 was decreased compared with the VPA group. The apoptosis rate in each dose valeric acid + VPA group was lower than that in the VPA group.

Conclusions Valeric acid may reduce the severity of seizures in pentylenetetrazol ignition/VPA-treated mice through a mechanism related to reduced P-GP expression.

【Keywords】 valeric acid; epilepsy; sodium valproate; P-glycoprotein; apoptosis

癫痫是一种常见的神经系统疾病,由神经元异常放电引起的大脑短暂功能障碍。全球约有 7000 万癫痫患者,我国的癫痫发病率约 30/10 万/年左右,患病率为 4%~7%^[1],并有 30% 的癫痫患者无法通过抗癫痫药物(anti-epileptic drug, AED)得到有效控制,进一步发展为难治性癫痫或者顽固性癫痫^[2],给家庭和社会带来了沉重的负担,迫切需要寻找到新的癫痫疗法和药物。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-GP)是一种跨膜蛋白,与药物的细胞内积累相关,研究表明其在癫痫患者大脑中过度表达并增加药物排出,介导机体对 AED 的耐药性^[3]。

最近研究发现缬草根提取物(主要为缬草酸)不仅有效治疗焦虑、失眠,还具有抗惊厥作用,增强了抗癫痫药物的作用效果^[4],服用缬草根的癫痫患者会出现更好的治疗效果,提示缬草酸具有潜在的神经元保护作用^[5]。目前少有关于缬草酸的基础研究,尚不明确缬草酸针对癫痫影响的作用机制。本研究拟明确缬草酸联合丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)对戊四唑(Pentylenetetrazole, PTZ)诱导癫痫小鼠的神经元保护作用及对 P-GP 表达影响,从而为难治性癫痫的治疗提供一种新有效手段。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SFP 级 6~8 周健康雄性 KM 小鼠,共 60 只,购自山东大学实验动物中心[SCXK(鲁)2019-0001],体重(19.5±2.4)g,小鼠饲养于潍坊医学院动物房中[SYXK(鲁)2019-0016],饲养温度为 18℃~20℃。环境安静、清洁,模拟自然昼夜。本实验经潍坊市第六人民医院实验动物伦理审查委员会审查(R0821050)。实验过程按照《实验动物管理与使用指南》进行,严格遵守动物使用 3R 原则,整个实验过程均给予实验小鼠以人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

缬草酸(加拿大 Chromadex 公司);戊四唑(美国 Sigma 公司);丙戊酸钠(美国 Sigma 公司);P-GP

及 Cleaved-caspase-3 小鼠一抗(美国 Princeton 公司); β -actin 一抗(美国 Abcam 公司);Western 超敏发光试剂盒(美国 Millipore 公司);DAPI 封固剂(江苏碧云天公司);TUNEL 原位凋亡检测试剂盒(南京凯基公司);化学发光成像分析系统(美国 UVP 公司),台式冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司),转膜电泳仪(北京六一仪器厂);石蜡切片机(德国 Leica 公司);激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

随机分为 6 组:正常对照组、模型对照组、VPA 组、缬草酸+VPA 组(低中高剂量各一组),每组 10 只。

1.3.2 给药

除正常对照组外,每组均于第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 8 天、第 10 天及第 12 天进行 1 次 PTZ 腹腔注射(30 mg/kg)制备癫痫模型^[6],第 12 天腹腔注射后 1 h 连续观察各组癫痫发作的等级、持续时间及潜伏时间。正常对照组按照 PTZ 给药时段给予生理盐水 1 mL 腹腔注射;VPA 组及缬草酸+VPA 组均灌胃给予 VPA(30 mg/kg),连续给药 12 d。在给药 VPA 灌胃的同时,低、中、高剂量缬草酸+VPA 组分别给予 60、120 和 180 mg/kg 缬草酸灌胃。

1.3.3 癫痫发作等级评分

以 Racine 评分评判小鼠癫痫发作等级^[7],标准如下:0 级:正常奔跑,无非应激性反应;1 级:面部肌肉抽搐、颤动;2 级:1 级发作伴节律性点头或前肢肌阵挛;3 级:2 级发作伴有前肢抽搐,无后肢痉挛、直立;4 级:3 级发作伴有后肢阵挛,或有摔倒、后肢直立;5 级:全身性强直、后肢强直性延伸、癫痫持续状态或死亡。

1.3.4 组织标本采集

在进行末次行为学评估 30 min 后将各组取脑组织标本,进行蛋白定量或甲醛组织固定。断头处死后,刨开颅脑,小心取出小鼠大脑,将其迅速放在冰上,眼科镊剥离一侧大脑半球皮层组织,放入液氮中保存,以备蛋白定量实验。同时将另一侧未分离大脑组织置于 4% 多聚甲醛固定,以备 Tunel

染色。

1.3.5 Western blot

为明确缬草酸是否能影响癫痫小鼠中 P-GP 及 caspase-3 活性片段,取新鲜皮层组织后进行 Western blot 检测。脑组织中加入裂解液(1 mL/mg),匀浆后在 4℃ 下离心 10 min。在样品中加入 2× 上样缓冲液,煮沸 5 min。每孔上样量 100 μg。十二烷基磺基聚丙烯酰胺钠凝胶电泳(30 mA)分离蛋白质,Marker 接近胶底板时停止电泳。转移至 PVDF 膜,持续 40 min,5% 脱脂牛奶封闭,室温匀摇 2 h,将膜于 P-GP 一抗(1:500)或 Cleaved-caspase-3(1:1000)4℃ 孵育过夜,37℃ 水浴中于 HRP 标记二抗(1:2000)孵育 1 h,漂洗后加如 ECL 发光试剂。使用化学发光分析仪拍照,用 Image-J 软件进行半定量分析。

1.3.6 Tunel 染色

将各组小鼠脑组织进行 Tunel 染色,以观察神经元凋亡率。将冷冻切片浸入盛有 4% 多聚甲醛固定液的染色缸,固定 20 min,浸入 1×PBS 漂洗三次(每次 5 min);样本片浸入通透液中,室温促渗 5 min,漂洗 3 次,每个样本上滴加 50 μL TdT 酶反应液,放入温盒中避光反应 60 min,漂洗 3 次,每个样本上滴加 50 μL Streptavidin-TRITC 标记液,37℃ 避光反应 30 min。漂洗后 DAPI 固封剂封片,室温避光反应 10 min,上共聚焦显微镜观察。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18 软件进行统计学分析,计量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数的比较采用 *t* 检验,多样本均数的比较采用方差分析检验,事后多重比较采用 Tukey 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组行为学表现

各组发作潜伏期及持续时间见表 1。相较模型对照组,VPA 组及不同剂量缬草酸+VPA 组发作持续时间缩短,潜伏时间延长(P 值均 < 0.001)。与 VPA 组比较,不同剂量缬草酸+VPA 组发作持续时间缩短(P 值均 < 0.001),中剂量缬草酸+VPA 组发作潜伏期延长($P = 0.029$)。进一步分析各组小鼠发作等级(图 1),VPA 组癫痫发作级别较模型对照组明显下降($P < 0.001$),而中剂量及高剂量缬草酸+VPA 组癫痫发作级别较 VPA 组下降(P 分别为 $<$

0.001 、 0.019)。以上结果表明,中剂量及高剂量缬草酸可降低癫痫模型小鼠的发展等级,且中剂量组改善更明显。

2.2 大脑皮质 P-GP 及 Cleaved-caspase-3 蛋白表达

癫痫发作 72 h 后,模型对照组大脑皮质 P-GP 明显高于正常对照组($P < 0.001$),VPA 组 P-GP 蛋白表达较模型对照组无明显改变($P > 0.05$),缬草酸低、中、高剂量组 P-GP 蛋白较 VPA 组下降(P 分别为 0.02 、 < 0.001 、 < 0.001),见图 2、3。Cleaved-caspase-3(17kD)是 caspase-3 剪切后的活化形式,我们检测了各组小鼠大脑皮质 cleaved-caspase-3 表达。模型对照组 Cleaved-caspase-3 明显高于正常对照组($P < 0.001$),VPA 组表达较模型对照组明显改变($P = 0.004$),缬草酸中剂量组表达较 VPA 组下降($P = 0.014$),见图 2、4。以上结果表明,相较于 VPA 治疗,VPA 联合不同剂量缬草酸能有效降低癫痫模型小鼠大脑皮质中 P-GP 蛋白表达,而 VPA 联合中剂量缬草酸能减少 Cleaved-caspase-3 表达。

2.3 大脑皮质细胞凋亡情况

本研究随后检测了各组小鼠大脑皮质神经元凋亡情况。模型对照组神经元凋亡较正常对照组明显升高($P < 0.001$),VPA 组凋亡率较模型对照组明显降低($P < 0.001$),缬草酸低、中、高剂量组凋亡率较 VPA 组下降(P 分别为 0.028 、 < 0.001 、 < 0.001),见图 5、6。以上结果表明,相较于 VPA 治疗,VPA 联合中剂量缬草酸能显著降低癫痫模型小鼠神经元凋亡率。

3 讨论

目前 AED 有 10 余种,有 1/3 的患者无法通过 AED 得到有效的治疗,进一步发展为难治性癫痫或者顽固性癫痫^[8],AED 的耐药机制是癫痫治疗过程中的关键,耐药过程涉及多种不同的细胞机制^[9-10]。研究发现,AED 治疗可促进多药耐药相关蛋白 1 基因(MRP1)及其蛋白产物 P-GP 的过度表达^[11],P-GP 可以将抗癫痫药泵回外周循环,这种再循环可能会降低大脑药物浓度,从而导致耐药性难治性癫痫和抗癫痫药治疗效果降低^[12]。此外许多抗癫痫药是 P-GP 的底物,癫痫发作本身可能会增加 P-GP 的表达^[13]。已经有研究证实部分药物(如氟桂嗪、环氧合酶 2 等)能有效下调 P-GP 的表达,在难治性癫痫中具有潜在作用^[14-15]。

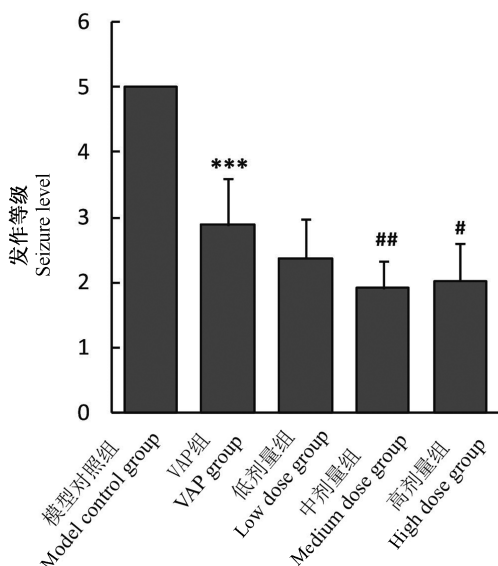
表 1 各组小鼠癫痫发作情况($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Seizures of mice in each group

组别 Groups	发作潜伏期(s) Seizure latency	$P^{\#}$	P^*	发作持续时间(s) Seizure duration	$P^{\#}$	P^*
正常对照组 Normal control group	-	-	-	-	-	-
模型对照组 Model control group	112.76±31.54	-	-	769.28±60.71	-	-
VPA 组 VPA group	265.96±71.18	<0.001	-	489.76±54.55	<0.001	-
缬草酸+VPA 组 Valeric acid and VPA group	-	-	-	-	-	-
低剂量组 Low dose group	304.17±85.54	<0.001	0.804	395.96±44.97	<0.001	<0.001
中剂量组 Medium dose group	371.87±90.97	<0.001	0.029	322.76±31.54	<0.001	<0.001
高剂量组 High dose group	357.71±91.32	<0.001	0.078	346.67±41.01	<0.001	<0.001

注:与模型对照组比较;VPA 组及不同剂量缬草酸+VPA 组发作持续时间缩短,潜伏时间延长(均 $P<0.001$);与 VPA 组比较;不同剂量缬草酸+VPA 组发作持续时间缩短(均 $P<0.001$),中剂量缬草酸+VPA 组发作潜伏期延长($P=0.029$)。

Note. Compared with the model control group, VPA group and different doses of valeric acid + VPA group have shorter onset duration and longer latency (all $P < 0.001$). Compared with the VPA group, the duration of onset was shortened in the different doses of valeric acid + VPA group (all $P < 0.001$), and the onset latency of the medium dose of valeric acid + VPA group was prolonged ($P=0.029$).



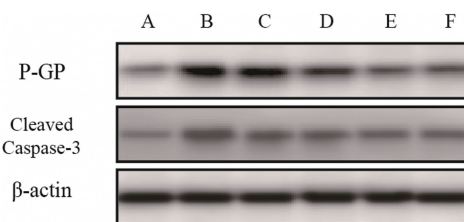
注:与模型对照组比较,*** $P<0.001$;与 VPA 组比较,## $P<0.001$;与 VPA 组比较, $P<0.05$ 。

图 1 各组癫痫发作等级

Note. Compared with model control group, *** $P<0.001$. Compared with VPA group, ## $P<0.001$. Compared with VPA group, $P<0.05$.

Figure 1 Seizure level of each group

本研究中,缬草酸联合 VPA 可降低癫痫小鼠发作等级,相较单用 VPA 效果好,提示缬草酸可增强 VPA 的抗惊厥作用。缬草酸为缬草提取物中的主要成分,含有不同比例的羟基缬氨酸和乙酰氧基缬氨酸。缬草提取物已用于治疗多种症状,如焦虑症和失眠症,已有超过 2000 年的历史^[17]。目前研究表明,缬草酸具有很强的抗惊厥作用, Torres-Hernández 等^[16]发现缬草酸与氯硝西洋及苯



注:A:正常对照组;B:模型对照组;C:VPA 组;D:低剂量缬草酸+VPA 组;E:中剂量缬草酸+VPA 组;F:高剂量缬草酸+VPA 组。

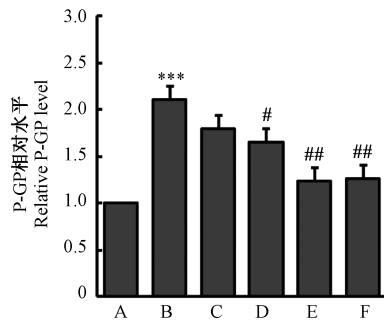
图 2 Western blot 检测各组小鼠 P-GP 及 Cleaved-caspase-3 蛋白表达

Note. A, Normal control group. B, Model control group. C, VPA group. D, Low dose valeric acid +VAP group. E, Medium dose valeric acid + VPA group. F, High dose valeric acid +VPA group.

Figure 2 Representative western blot of P-GP and Cleaved-caspase-3 protein in each group

妥英钠具有协同相互作用,增强了两者的抗惊厥作用,可延长成年斑马鱼癫痫发作的潜伏期^[16]。服用缬草的癫痫患者会有明显的镇静作用,并有更好的抗癫痫治疗效果^[4],而且由于其吸收快、不易蓄积的特性,具有较好的安全性。本研究结果进一步证实了缬草酸的抗惊厥作用,但目前尚无关于缬草酸抗癫痫机制的研究。

丙戊酸钠(VPA)是一种有效的 AED,成本相对较低,为癫痫治疗的重要药物。在本研究中,我们将缬草酸与 VPA 联合使用以观察对 PTZ 癫痫模型小鼠 P-GP 水平及癫痫发作的影响。结果表明,缬草酸和 VPA 共同给药可降低大脑皮层 P-GP 水平,癫痫发作严重程度显著降低,提示缬草酸可能通过调节 P-GP 表达而增强 VPA 的抗惊厥作用。



注:与正常对照组比较,*** $P < 0.001$;与VPA组比较,# $P < 0.001$,## $P < 0.001$ 。A:正常对照组;B:模型对照组;C:VPA组;D:低剂量缬草酸+VPA组;E:中剂量缬草酸+VPA组;F:高剂量缬草酸+VPA组。

图3 各组 P-GP 相对表达量分析

Note. Compared with normal control group, *** $P < 0.001$. Compared with VPA group, # $P < 0.05$. ## $P < 0.001$. A, Normal control group. B, Model control group. C, VPA group. D, Low dose valeric acid + VPA group. E, Medium dose valeric acid + VPA group. F, High dose valeric acid + VPA group.

Figure 3 Analysis of relative expression of P-GP in each group

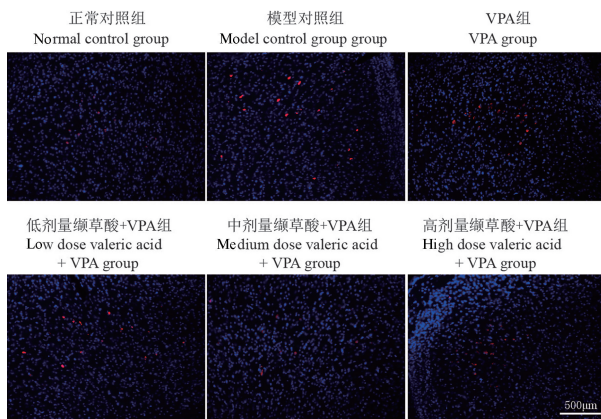
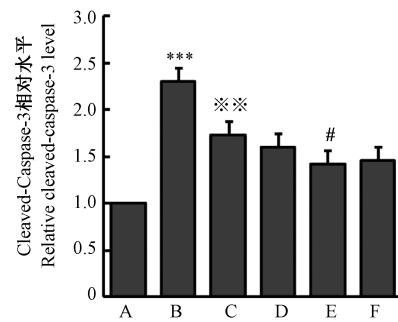


图5 TUNEL 检测各组小鼠神经元凋亡

Figure 5 Apoptosis examination was performed by TUNEL assay

癫痫发作可导致脑神经元损伤,进而出现神经元凋亡,并引起胶质细胞增生、突触重建等脑结构功能变化^[8],细胞凋亡是一个复杂的生物过程,涉及许多细胞信号通路。Caspase-3 是关键的细胞凋亡介体,剪切后的活化形式分子量为 17×10^3 的 Cleaved-caspase-3^[18],一般是用活性形式说明 caspase 途径的激活。我们检测了 Cleaved-caspase-3 的表达以明确缬草酸对脑组织的保护作用。结果表明,缬草酸显著降低了癫痫小鼠大脑中 Cleaved-caspase-3 的表达,同时,癫痫小鼠的神经元凋亡率也明显降低,提示缬草酸在减轻癫痫发作等级的同

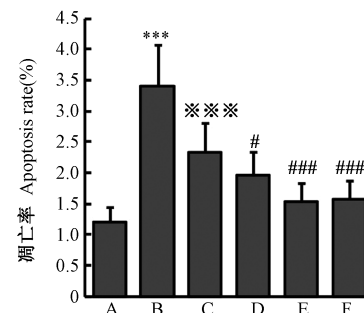


注:与正常对照组比较,*** $P < 0.001$;与模型对照组比较,** $P < 0.05$;与VPA组比较,# $P < 0.001$ 。A:正常对照组;B:模型对照组;C:VPA组;D:低剂量缬草酸+VPA组;E:中剂量缬草酸+VPA组;F:高剂量缬草酸+VPA组。

图4 各组 Cleaved-caspase-3 相对表达量分析

Note. Compared with normal control group, *** $P < 0.001$. Compared with model control group, ** $P < 0.05$. Compared with VPA group, # $P < 0.001$. A, Normal control group. B, Model control group. C, VPA group. D, Low dose valeric acid + VPA group. E, Medium dose valeric acid + VPA group. F, High dose valeric acid + VPA group.

Figure 4 Analysis of relative expression of Cleaved-caspase-3 in each group



注:与正常对照组比较,*** $P < 0.001$;与模型对照组比较,*** $P < 0.05$;与VPA组比较,# $P < 0.001$,### $P < 0.001$ 。A:正常对照组;B:模型对照组;C:VPA组;D:低剂量缬草酸+VPA组;E:中剂量缬草酸+VPA组;F:高剂量缬草酸+VPA组。

图6 各组神经元凋亡率分析

Note. Compared with normal control group, *** $P < 0.001$. Compared with model control group, *** $P < 0.05$. Compared with VPA group, # $P < 0.001$, ### $P < 0.001$. A, Normal control group. B, Model control group. C, VPA group. D, Low dose valeric acid + VPA group. E, Medium dose valeric acid + VPA group. F, High dose valeric acid + VPA group.

Figure 6 Analysis of neuronal apoptosis rate in each group

时,还存在神经元的保护作用。

总之,本研究表明,缬草酸联合VPA可降低PTZ诱导癫痫小鼠大脑中P-GP的表达并增强VPA的抗惊厥作用。此外,缬草酸还可降低caspase-3活

性片段的表达,在癫痫治疗过程中对大脑起到潜在保护作用。缬草酸与 VPA 联合治疗癫痫可能是一种有效且耐受性良好的治疗方案,而缬草酸如何调控 P-GP、凋亡因子及其信号通路机制尚未清楚,有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 许向军,周志明. 癫痫的诊断和治疗 [J]. 中华全科医学, 2019, 17(10): 1619-1620.
- [2] Sander JW. The use of antiepileptic drugs-principles and practice [J]. *Epilepsia*, 2004, 45(6): 28-34.
- [3] Lubberink M. Kinetic models for measuring P-glycoprotein function at the blood-brain barrier with positron emission tomography [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(38): 5786-5792.
- [4] Spinella M. Herbal medicines and epilepsy: the potential for benefit and adverse effects [J]. *Epilepsy & Behavior*, 2002, 2(6): 524-532.
- [5] Fugh-Berman A. Herbal medicinals: selected clinical considerations, focusing on known or potential drug-herb interactions [J]. *Arch Intern Med*, 1999, 159(16): 1957-1958.
- [6] 王丽, Ono. J, Walson PD. 大鼠戊四唑点燃模型的建立 [J]. 药学学报, 1993, 28(7): 486-489.
- [7] Zhang C, Fan Q, Chen SL, et al. Reversal of P-glycoprotein overexpression by Ginkgo biloba extract in the brains of pentylenetetrazole-kindled and phenytoin-treated mice [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2015, 31(8): 398-404.
- [8] 党翔吉, 王艺璇, 焦海胜. 全天麻及天麻素联合卡马西平对癫痫小鼠脑部海马体神经元及基因 *mrp1* 表达的影响 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(13): 1556-1561.
- [9] Zhang C, Kwan P, Zuo Z, et al. The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(10): 930-942.
- [10] Stepień KM, Tomaszewski M, Tomaszewska J, et al. The multidrug transporter P-glycoprotein in pharmacoresistance to antiepileptic drugs [J]. *Pharmacol Rep*, 2012, 64(5): 1011-1019.
- [11] Wang X, Huang S, Jiang Y, et al. Reactive astrocytes increase the expression of P-gp and *Mrp1* via TNF- α and NF- κ B signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1198-1204.
- [12] Lai ML, Tien YE, Huang YS, et al. Studies on pharmacokinetic mechanism of phenytoin resistance in refractory epilepsy [J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102(9): 3189-3195.
- [13] Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. Evaluation of transport of common antiepileptic drugs by human multidrug resistance-associated proteins (MRP1, 2 and 5) that are overexpressed in pharmacoresistant epilepsy [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(7): 1019-1032.
- [14] van Vliet EA, Zibell G, Pekcec A, et al. COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(2): 404-412.
- [15] Sulová Z, Seres M, Barancik M, et al. Does any relationship exist between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and intracellular calcium homeostasis [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2009, 28(Spec No Focus): F89-F95.
- [16] Torres-Hernández BA, Valle-Mojica LMD, Ortíz JG. Valerianic acid and *Valeriana officinalis* extracts delay onset of Pentylenetetrazole (PTZ)-Induced seizures in adult *Danio rerio* (Zebrafish) [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15(1): 228.
- [17] Tagarelli G, Tagarelli A, Liguori M, et al. Treating epilepsy in Italy between XIX and XX century [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(2): 608-613.
- [18] Jiang W, Chen Y, Li B, et al. DBA-induced caspase-3-dependent apoptosis occurs through mitochondrial translocation of *cyt-c* in rat hippocampus [J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(9): 1863-1873.

[收稿日期]2020-04-21