

· 实验研究 ·

托吡酯伍用叶酸对慢性癫痫幼鼠脑神经元损伤的保护作用

王萍,任榕娜,蔡淑英,陈新民,叶礼燕

(南京军区福州总医院儿科,福建 福州 350025)

[摘要] 目的 目前国内外鲜见托吡酯(TPM)对小儿慢性癫痫发作所致脑神经元损伤保护作用及发挥最佳保护作用的适宜剂量的研究;亦尚未发现 TPM 与叶酸(FA)合用对 TPM 神经元保护作用影响的相关报道。因此,取得 TPM 单药及伍用 FA 后对幼鼠慢性癫痫发作引起的脑神经元损伤的保护作用实验室证据将对儿科临床用药具有重要的指导意义。**方法** 将3周龄雄性 Wistar 大鼠随机分为6组:阴性对照组、阳性对照组、TPM-20组、TPM-40组、TPM-80组和 TPM-40 + FA 组。阳性对照组和 TPM 4个组先行戊四氮(PTZ)腹腔注射制造幼鼠慢性癫痫模型,再分别每日给予等量蒸馏水、TPM 20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kg 和 TPM 40 mg/kg + FA 5 mg/kg 灌胃;阴性对照组则先行生理盐水腹腔注射,再给予等量的蒸馏水灌胃。连续用药2个月。观察大鼠行为、血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)及海马区病理改变。**结果** TPM 4个组大鼠惊厥发作次数,血清 NSE 水平及海马区神经元死亡程度较阳性对照组明显减轻。阴性对照组、阳性对照组、TPM-20组、TPM-40组、TPM-80组、TPM-40 + FA 组的惊厥发作次数依次为:0,48.4 ± 3.7,44.7 ± 2.9,44.3 ± 3.1,42.7 ± 3.2,40.8 ± 3.7次;血清 NSE 值依次为:18.72 ± 2.95,35.71 ± 5.97,27.40 ± 6.40,24.79 ± 6.22,21.47 ± 6.87,22.55 ± 7.02 μg/L;海马 CA3 区坏死神经元细胞百分比依次为:(5.8 ± 1.9)%、(72.2 ± 9.8)%、(43.9 ± 7.1)%、(25.9 ± 5.5)%、(10.5 ± 4.2)%、(16.1 ± 4.8)%;海马 CA1 区坏死神经元细胞百分比依次为:(5.1 ± 1.8)%、(65.6 ± 8.1)%、(40.5 ± 6.4)%、(23.1 ± 5.2)%、(8.9 ± 3.6)%、(14.9 ± 4.3)%。**结论** TPM 对幼鼠慢性癫痫发作引起的脑神经元损伤具有保护作用,该作用存在剂量效应,TPM 80 mg/(kg·d)保护作用最强;TPM 伍用 FA 后,神经元保护作用加强。

[中国当代儿科杂志,2008,10(1):65-69]

[关键词] 癫痫;神经保护;托吡酯;叶酸;大鼠

[中图分类号] R-33;R742.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)01-0065-05

Neuroprotective effects of topiramate and folic acid on young rats with kindling-induced epilepsy

WANG Ping, REN Rong-Na, CAI Shu-Ying, CHEN Xin-Min, YE Li-Yan. Department of Pediatrics, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, China (Email: wangpingpan@126.com)

Abstract: Objective To study the neuroprotective effects of topiramate (TPM) alone or together with folic acid (FA) on young rats with kindling-induced epilepsy. **Methods** Rat models of epilepsy were prepared by pentylenetetrazol (PTZ)-induced kindling. Seventy-two 3-week-old male Wistar rats were randomly divided into 6 groups: four TPM-treated epilepsy groups (TPM 20, 40 or 80 mg/kg·d and TPM 40 mg/kg·d + FA 5 mg/kg·d), a positive control group (untreated epilepsy group) and a negative control group (normal control group). After two months of administration, behaviors of the rats were recorded; serum levels of neuron-specific enolase (NSE) were measured using ELISA; pathological changes in the hippocampus were observed. **Results** The frequency of convulsion seizures in the 20, 40 and 80 mg TPM treatment and TPM + FA groups was 44.7 ± 2.9, 44.3 ± 3.1, 42.7 ± 3.2, and 40.8 ± 3.7 respectively, which were significantly lower than that in the positive control group (48.4 ± 3.7) ($P < 0.01$). Twenty, forty and eighty mg TPM treatment and TPM + FA treatment significantly reduced NSE levels from 35.71 ± 5.97 μg/L of the control group to 27.40 ± 6.40, 24.79 ± 6.22, 21.47 ± 6.87 and 22.55 ± 7.02 μg/L respectively ($P < 0.05$). Neuronal apoptosis in the CA3 and CA1 regions were alleviated in the four TPM-treatment groups compared with positive control. The number of necrotic neurons was progressively reduced with the increased dose of TPM. The 40 mg TPM + FA treatment group showed less necrotic neurons in the CA3 and CA1 regions than the 40 mg TPM alone treatment group. **Conclusions** TPM has protective effects against epilepsy-induced neuronal damage. The effect is dose-dependent. A combination of TPM and FA can produce a synergistic effect.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(1):65-69]

Key words: Epilepsy; Neuroprotection; Topiramate; Folic acid; Rats

[收稿日期]2007-05-21; [修回日期]2007-07-10

[作者简介]王萍,女,硕士研究生,主治医师。主攻方向:小儿神经和精神疾病的研究。

[通讯作者]任榕娜,主任医师,硕士生导师,南京军区福州总医院儿科,邮编:350025。

癫痫发作可引起神经元丢失及不可逆性脑损伤^[1]。因此,理想的抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs)应具有抗癫痫和神经保护双重作用。托吡酯(topiramate, TPM)作为一种新型广谱 AEDs,易于通过血脑屏障,对各种类型癫痫(epilepsy, EP)均有明显疗效^[2],对脑缺血^[3]、脑外伤^[4]所造成的神经元损伤亦具有明显保护作用;但其因面市时间较短,对小儿慢性癫痫发作引起的脑神经元损伤是否具有保护作用国内外相关研究少。临床报道^[5,6]显示对服用 AEDs 的患者同时适量补充叶酸(folic acid, FA)可明显减少 AEDs 的致畸作用,改善 AEDs 对认知功能的不良影响,推测 FA 具有一定的神经保护作用,但还需进一步印证。

本实验通过建立戊四氮(pentylentetrazol, PTZ)点燃幼年大鼠的慢性癫痫模型,分组给予相当于临床治疗剂量的 TPM 和 FA 灌胃,观察慢性癫痫幼鼠血清神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)水平变化及海马区病理改变,探讨 TPM 对幼年大鼠慢性癫痫发作引起的脑神经元损伤的保护作用及伍用 FA 后对其保护作用的影响,旨在科学合理地指导临床用药。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 SPE 级 3 周龄雄性 Wistar 大鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证 SCXK 沪 2005-0005),平均体重 48.5 g。将幼鼠随机分为 6 组:阴性对照组、阳性对照组、TPM-20 组、TPM-40 组、TPM-80 组、TPM-40 + FA 组,每组 12 只。

1.1.2 使用药物及试剂 托吡酯(TPM,西安杨森制药公司,规格 100 mg,批号:060713288)。叶酸(FA,济南东方制药,规格 5 mg,批号:060802)。戊四氮(1,5-pentamethylene-1H-tetrazole, PZT, Sigma, Lot: 10106150)。大鼠血清 NSE-ELISA 检测试剂盒购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 幼鼠慢性癫痫模型制作 癫痫模型制作参照文献^[7]。隔日上午 8 时,阳性对照组和 TPM 4 个组称重后行 1% PTZ 生理盐水溶液腹腔注射,剂量为 40 mg/kg,以诱发癫痫发作;阴性对照组行生理盐水 2 mL/kg 腹腔注射作为对照;给药后观察 1 h,诱发幼鼠癫痫发作后采用 Racine 分级标准^[8],0 级:无反应;I 级:耳、面部抽搐;II

级:肌阵挛,但无直立位;III 级:肌阵挛,伴直立位;IV 级:全面性强直-阵挛发作;V 级:全面性强直-阵挛发作,并失去体位控制。凡连续 5 次出现 II 级以上发作即判定该鼠被慢性点燃;此后 PTZ 给药由 1 次/隔日改为 1 次/3~4 日,剂量不变,以维持点燃效应。

1.2.2 给药 每日上午 9 时,TPM-20 组、TPM-40 组、TPM-80 组、TPM-40 + FA 组分别经口灌胃 TPM 20 mg/kg、TPM 40 mg/kg、TPM 80 mg/kg、TPM 40 mg/kg + FA 5 mg/kg;阴性和阳性对照组经口灌胃等量蒸馏水。连续用药 2 个月。

1.3 取材及样本制备

1.3.1 血清的采集 连续用药 2 个月后,用 10% 水合氯醛腹腔麻醉(0.36 mL/100 g)后,剪开幼鼠胸腔,心腔取血 2 mL,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液置 -70℃ 冰箱保存待测 NSE。

1.3.2 海马组织的采集 采血后迅速从心尖处插入圆头针至左心室主动脉入口,同时剪开右心耳使血液排出。先用生理盐水快速推注冲洗,冲洗至从右心耳流出的液体变得清亮,然后立即向心脏内注射 2.5% 戊二醛 + 2% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液,灌注速度为 5~10 mL/min,直至幼鼠尾部僵硬为止。灌注完毕后立即断头,迅速取出右侧海马组织,4% 中性甲醛固定,石蜡包埋、切片及苏木精-伊红染色,BHS-312 光镜观察。

1.4 观察指标

1.4.1 行为学观察 从开始用药至实验结束,共 2 个月。2 个月中,每日观察实验动物行为 1 h,以首次惊厥发作时间、惊厥发生次数及强度(I、II、III 级发作为轻型,IV、V 级发作为重型)、点燃时间等进行比较和评价。

1.4.2 血清 NSE 水平 ELISA 法检测血清 NSE 水平。

1.4.3 脑组织形态学变化 所有资料完整的幼鼠均行海马组织病理检查。全部幼鼠均任选一张切片,在海马 CA1,CA3 区各选取相似部位,在同一高倍(800 倍)视野下,对神经元进行计数,计算坏死神经元在总细胞数中百分比。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 11.5 软件分析处理,计量资料采用完全随机设计资料的方差分析和两样本 *t* 检验,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;计数资料采用行 × 列表资料的 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 实验动物数量

纳入动物 72 只,制作幼鼠慢性癫痫模型时因出现癫痫持续状态死亡 9 只,其余 63 只灌胃 2 个月全部存活。取材时因溶血等因素脱失 5 份标本,剩余资料完整共 58 份标本(阳性对照组 12 份,阴性对照组 8 份,TPM-20 组 9 份,TPM-40 组 10 份,TPM-80 组 11 份,TPM-40 + FA 组 8 份)进入结果统计。

2.2 幼鼠腹腔注射 PTZ 后行为表现

实验幼鼠慢性 EP 模型的评价参数见表 1。表 1 提示 TPM 4 个组惊厥首次发作时间及 IV 或 V 级首次发作时间相对较晚,慢性点燃所需时间长,惊厥发作次数少,点燃率高,死亡率低,惊厥发作程度相

对较轻;但与阳性对照组比较,除惊厥发作次数差异显著($P < 0.01$)外,其余均无统计学意义。

2.3 实验幼鼠血清 NSE 水平的 ELISA 检测结果

各组幼鼠血清 NSE 值见表 2。TPM 4 个组血清 NSE 值均高于阴性对照组而低于阳性对照组;与阴性对照组相比,TPM-20 组、TPM-40 组差异有统计学意义(均 $P < 0.01$); TPM-80 组、TPM-40 + FA 组差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);与阳性对照组相比,TPM 4 个组差异均有统计学意义(TPM-20 组 $P < 0.05$,; TPM-40 组、TPM-80 组、TPM-40 + FA 组均 $P < 0.01$);但 TPM-20 组、TPM-40 组、TPM-80 组、TPM-40 + FA 组 4 个组相比,差异无统计学意义($F = 1.4610, P > 0.05$)。

2.4 实验幼鼠海马神经元损伤病理改变

各组幼鼠 CA3、CA1 区坏死神经元细胞百分比见表 2。阴性对照组海马区罕见神经元损伤。神经

表 1 实验幼鼠慢性 EP 模型的评价参数

组别	鼠数	惊厥首次 发作时间(d)	IV或V级首次 发作时间(d)	慢性点燃 时间(d)	惊厥发作 次数(次)	点燃率 (%)	死亡率 (%)	IV、V级 比例(%)	I、II、III级 比例(%)
阳性对照组	12	8.6 ± 3.9	14.6 ± 3.4	17.4 ± 3.4	48.4 ± 3.7	75.0	25.0	66.7	33.3
TPM-20 组	12	8.8 ± 3.6	15.4 ± 2.3	18.0 ± 2.9	44.7 ± 2.9 ^a	83.3	16.7	50.0	50.0
TPM-40 组	12	9.2 ± 3.8	15.7 ± 3.3	19.2 ± 3.8	44.3 ± 3.1 ^a	91.7	8.3	45.5	54.5
TPM-80 组	12	9.0 ± 4.5	16.2 ± 3.4	19.5 ± 3.6	42.7 ± 3.2 ^a	91.7	8.3	45.5	54.5
TPM-40 + FA 组	12	8.8 ± 3.8	16.2 ± 3.9	19.4 ± 4.3	40.8 ± 3.7 ^a	83.3	16.7	40.0	60.0

注:a:与阳性对照组比较, $P < 0.01$ 。

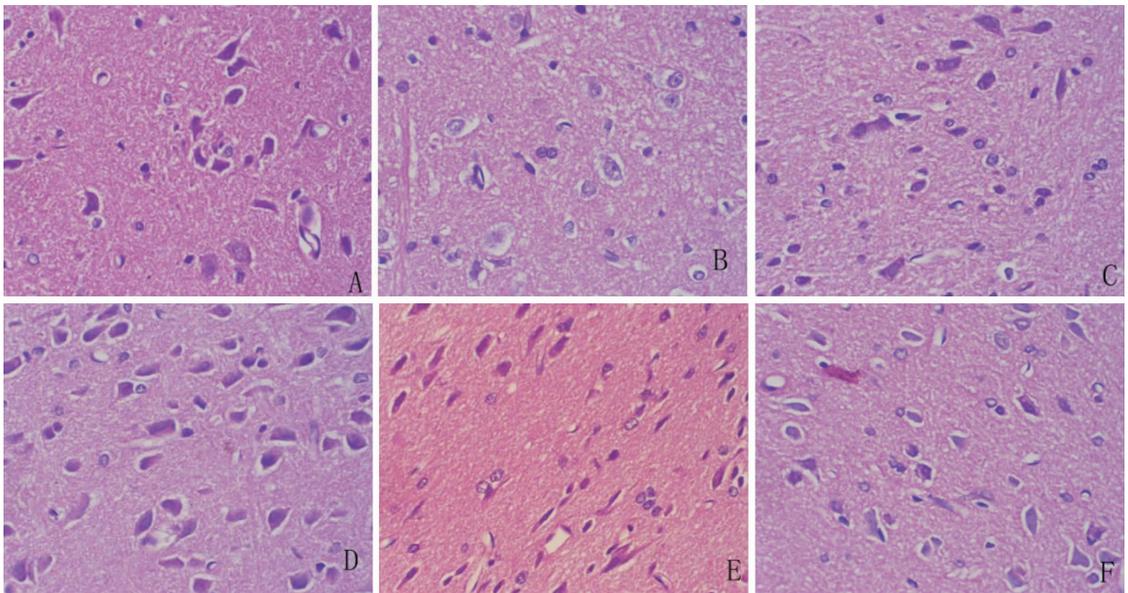


图 1 幼鼠海马的组织切片图(苏木精-伊红染色 800 ×) A: 阴性对照组罕见神经元变性、坏死; B: 阳性对照组可见广泛的神经元(约 70%)变性、坏死,胶质细胞增生,出现嗜神经元现象; C: TPM-20 组可见部分神经元(约 40%)变性、坏死,胶质细胞增生明显,有嗜神经元现象; D: TPM-40 组可见小部分神经元(约 25%)变性、坏死,胶质细胞增生明显,有嗜神经元现象; E: TPM-80 组可见极少数神经元(约 10%)变性、坏死,胶质细胞增生,偶见嗜神经元现象; F: TPM-40 + FA 组可见少数神经元(约 15%)变性、坏死,胶质细胞增生,偶见嗜神经元现象。

表2 各组血清 NSE 含量和 CA3、CA1 区坏死神经细胞百分比比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	NSE 值($\mu\text{g/L}$)	CA3 区(%)	CA1 区(%)
阴性对照组	12	18.72 \pm 2.95 ^b	5.8 \pm 1.9 ^b	5.1 \pm 1.8 ^b
阳性对照组	8	35.713 \pm 5.97 ^a	72.2 \pm 9.8 ^a	65.6 \pm 8.1 ^a
TPM-20 组	9	27.40 \pm 6.40 ^{a,b}	43.9 \pm 7.1 ^{a,b}	40.5 \pm 6.4 ^{a,b}
TPM-40 组	10	24.79 \pm 6.22 ^{a,b}	25.9 \pm 5.5 ^{a,b}	23.1 \pm 5.2 ^{a,b}
TPM-80 组	11	21.47 \pm 6.88 ^b	10.5 \pm 4.2 ^{a,b}	8.9 \pm 3.6 ^{a,b}
TPM-40 + FA 组	8	22.55 \pm 7.02 ^b	16.1 \pm 4.8 ^{a,b}	14.9 \pm 4.3 ^{a,b}

注:a;与阴性对照组比较, $P < 0.01$;b:与阳性对照组比较, $P < 0.05$ 。

元细胞核大而圆,位于细胞中央,异染色质少,似空泡状,呈淡蓝色,中央有一清楚核仁;胞浆呈淡红色,多有突起(图 1A)。阳性对照组出现明显神经元变性、死亡。表现为核染色质碎裂,核仁消失,核溶解;胞浆空化,或胞浆浓缩变暗,整个神经元体积缩小,胞膜皱缩,呈三角形或不规则形,最终整个细胞可呈均匀一致的红色。神经元周围出现空隙。胶质细胞增生并出现嗜神经现象(图 1B)。TPM 4 个组亦可见神经元变性、坏死,胶质细胞增生,但较阳性对照组明显减少(均 $P < 0.01$;图 1C,D,E,F);且 TPM-20 组、TPM-40 组、TPM-80 组、TPM-40 + FA 组 4 个组相互相比,差异明显(CA3 区 $F = 68.1334$, $P < 0.01$;CA1 区 $F = 73.0347$, $P < 0.01$),TPM-40 组和 TPM-40 + FA 组差异也具有统计学意义(CA3 区 $t = 3.969$, $P < 0.01$;CA1 区 $t = 3.5814$, $P < 0.01$)。随着 TPM 剂量的增加,坏死神经细胞数相应减少;伍用 FA 较单用 TPM 坏死神经细胞数目少。

3 讨论

通过 PTZ 建立的慢性癫痫模型,其脑内高度兴奋性神经元可永久存在且与人类精神运动性癫痫的再发作为、脑电图、痫样放电的扩散方式等方面极相似,被认为是目前较理想的癫痫模型。本实验发现 TPM 对 PTZ 所诱导的癫痫有一定的抑制作用,主要表现在降低惊厥发作次数和程度上,而对延长惊厥首次发作时间和慢性点燃时间作用不强,可能与用药时间尚短,TPM 起效较缓慢有关。同时,实验也证明 FA 不会增加癫痫发作。

NSE 是能量代谢的关键,又称 2-磷酸甘油酸水解酶,在糖酵解途径中将 2-磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸,主要存在于大脑神经元和神经内分泌细胞内,脑胶质细胞和其他神经组织不含 NSE,是检测脑内神经元损伤或坏死的客观指标。癫痫发作后由于脑组织损伤,NSE 从损伤或坏死神经细胞内溢入脑脊液和血液,诱发 NSE 升高,且其升高

程度与癫痫的持续时间和预后关系密切^[9]。

临床和动物实验亦早已证实:癫痫发作可致人或动物大脑皮质、海马、杏仁核等部位神经元变性、坏死和凋亡;海马由于代谢率高而血供单一,是一个极易受损的敏感部位。且海马损伤的程度与癫痫病程的长度和抽搐发作的频度呈正比关系,病程越长,发作周期越短,神经细胞损害越明显^[10]。从海马区神经元损伤程度亦可以判断抗癫痫药物的治疗效果和癫痫的预后。

本实验结果显示阴性对照组无惊厥发作,血清 NSE 水平在正常范围,海马区未见神经元损伤。PTZ 点燃阳性对照组惊厥发作程度重,血清 NSE 水平明显高于其他 5 组,海马区神经元坏死重,证明 PTZ 诱发的幼鼠癫痫发作存在脑神经元损伤。TPM-20 组、TPM-40 组、TPM-80 组及 TPM-40 + FA 组幼鼠由于服用了 TPM,惊厥发作次数明显减少,发作程度相对较轻,血清 NSE 水平和海马区坏死神经细胞百分比均明显低于阳性对照组,证明 TPM 不仅具有可靠的控制惊厥发作的作用,且有一定程度的神经元保护作用。不同剂量的 TPM 组之间,海马区坏死神经细胞百分比差异显著,TPM 的治疗剂量越高,神经细胞坏死越少,说明 TPM 的神经元保护作用存在剂量效应,80 mg/kg 神经元保护作用最强。TPM-40 + FA 组海马区坏死神经细胞百分比亦低于 TPM-40 组,差异有统计学意义,说明 FA 对 TPM 的脑神经元保护作用有加强作用。TPM 不同剂量组之间及 TPM-40 组与 TPM-40 + FA 组之间,血清 NSE 水平差异无显著性,推测与 NSE 的释放和降解时间有关,符合 Buttner 等^[11]报道的 NSE 在惊厥发作 48h 内升高达峰值,48 h 后逐渐降低。

TPM 神经保护作用的机制可能是^[12~15]:①通过非 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体拮抗谷氨酸(Glu)的兴奋毒性作用。②增强 GABA 介导的抑制作用,减少海马 CA1 区锥体细胞的死亡。③阻断电压激活的 Na⁺通道,抑制神经元异常放电。④抑制神经元 L-高电压激活的 Ca²⁺通道,降低突触后神经元 Ca²⁺含量,从而产生神经保护作用。⑤TPM 还具有抗过氧化反应、促进神经元轴突生长、抗细胞凋亡、调节细胞内环境等作用。

AEDs 可降低血清 FA 水平,而 FA 是神经系统生长发育及维持神经细胞正常功能所必需的重要营养素,FA 缺乏可导致神经细胞结构和功能的异常。一些临床及动物实验显示在 AEDs 治疗的同时,适量补充 FA 能有效地改善由于 FA 缺乏所致的认知功能障碍及胚胎毒性。本实验也证实了 FA 具有神

经保护作用,TPM 伍用 FA 比单用 TPM 的神经元保护作用强。

FA 神经保护的确切机制还不十分清楚,推测与以下作用有关^[16~18]:①参与嘌呤、嘧啶核苷酸的合成代谢和氨基酸的转化。FA 缺乏可导致 DNA 片段的断裂、异常的 DNA 修复活动以及 dNTP 之间的不平衡性,从而对 DNA 的合成产生影响,导致凋亡的发生。②为同型半胱氨酸转化为蛋氨酸的辅酶。FA 可降低同型半胱氨酸血浓度,大大减轻高同型半胱氨酸血症造成的神经元损害。③在神经递质的合成和传递中起重要作用。FA 缺乏可使膜结构上磷脂酰胆碱磷脂饱和度降低,膜蛋白合成受阻,严重影响了与神经传递有关的细胞膜内过程,导致神经元功能异常。

本实验证实,TPM 对幼年期大鼠癫痫发作引起的脑神经元损伤具有保护作用;且每日 20 mg/kg、40 mg/kg 及 80 mg/kg 三剂量之间存在剂量效应,80 mg/kg 神经元保护作用最强;同时 FA 可加强 TPM 的神经元保护作用。由于动物及癫痫模型选择的不同,给药途径及给药时间等的差异,本研究还需随机大样本的实验及临床研究作进一步证实。

参 考 文 献

[1] Riban V, Bouillere V, Pham-Le BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy [J]. *Neuroscience*, 2002, 112(1):101-111.

[2] 马青,于丰花,高维华,王粤,解学孔. 托吡酯治疗癫痫的临床观察[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2007, 15(2):124-125.

[3] Khan SH, Wright SL, Banigesh A, Miyashita H, Todd K, Hemmings SJ, et al. Antiischemic effects of topiramate in a transient global forebrain ischemia model: a neurochemical, histological, and behavioral evaluation [J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(8):1235-1239.

[4] Hoover RC, Motta M, Davis J, Saatman KE, Fujimoto ST, Thompson HJ, et al. Differential effects of the anticonvulsant topiramate on neurobehavioral and histological outcomes following traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21

(5):501-512.

[5] Candito M, Naimi M, Boisson C, Rudigoz JC, Gaucherand P, Gueant JL, et al. Plasma vitamin values and antiepileptic therapy: case reports of pregnancy outcomes affected by a neural tube defect [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2007, 79(1):62-64.

[6] Hernandez R, Fernandez Mde L, Miranda G, Suastegui R. Decrease of folic acid and cognitive alterations in patients with epilepsy treated with phenytoin or carbamazepine, pilot study [J]. *Rev Invest Clin*, 2005, 57(4):522-531.

[7] 王艺,李智平,施忆赞. 戊四氮点燃幼鼠慢性癫痫模型的建立及评价[J]. *复旦学报(医学版)*, 2006, 33(2):206-208.

[8] Racine RJ, Steingart M, McIntyre DC. Development of kindling-prone and kindling-resistant rats: Selective breeding and electrophysiological studies [J]. *Epilepsy Res*, 1999, 35(3):183-195.

[9] DeGiorgio CM, Gott PS, Rabinowicz AL, Heck CN, Smith TD, Correale JD. Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus [J]. *Epilepsia*, 1996, 37(7):606-609.

[10] Peredery O, Persinger MA, Parker G, Mastrosov L. Temporal changes in neuronal dropout following inductions of lithium/pilocarpine seizures in the rat [J]. *Brain Res*, 2000, 881(1):9-17.

[11] Buttner T, Lack B, Jager M, Wunsche W, Kuhn W, Muller T, et al. Serum levels of neuron-specific enolase and s-100 protein after single tonic-clonic seizures [J]. *J Neurol*, 1999, 246(6):459-461.

[12] Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2004, 45(12):1478-1487.

[13] Qian J, Noebels JL. Topiramate alters excitatory synaptic transmission in mouse hippocampus [J]. *Epilepsy Res*, 2003, 55(3):225-233.

[14] 郭渠莲,刘文君,王成才,朱红枫,唐章华,朱正芳. 托吡酯治疗小儿癫痫的临床研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2002, 4(6):511-512.

[15] 刘秋庭,崔萍,王文安. 托吡酯添加治疗小儿难治性癫痫 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2000, 2(5):359-360.

[16] 肖荣,梁江,赵海峰. 叶酸配伍木黄酮对神经细胞早期凋亡的影响 [J]. *营养学报*, 2004, 26(6):438-441.

[17] Kruman H, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(5):1752-1762.

[18] Joseph JA, Cutler R, Roth GS. Changes in G protein-mediated signal transduction in aging and Alzheimer's disease [J]. *Ann New York Acad Sci*, 1993, 695(1):42-45.

(本文编辑:吉耕中)