

论著 · 实验研究

丙戊酸钠对成、幼年大鼠血脂、血清瘦素及大脑皮质的影响

李静 李丹 黄绍平

(西安交通大学医学院第二医院儿科, 陕西 西安 710004)

〔摘要〕 目的 研究并比较丙戊酸钠(VPA)对成、幼年大鼠血脂、血清瘦素及大脑皮质的影响。方法 健康幼年雌性 Sprague-Dawley (SD)大鼠(生后 21 d)及成年雌性 SD 大鼠(生后 2 月)随机分为幼年对照组、幼年 VPA、成年对照组、成年 VPA 组 4 组,每组 10 只,对照组每日直接灌胃生理盐水 1~2 mL, VPA 组直接灌胃给药每日 VPA 200 mg/kg,干预 6 周后处死,取血清标本及大脑皮质标本,检测血脂(总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白)、放射免疫分析法检测血清瘦素;大脑皮质做尼氏染色及髓鞘染色以评估脑损伤。结果 成年、幼年 VPA 组体重、空腹血脂及瘦素水平均高于各自的对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与成年 VPA 组比较,幼年 VPA 组大鼠血清 LEP、血脂增值水平更高($P < 0.05$)。脑皮质髓鞘染色 VPA 组平均纤维密度较其对照组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);尼氏染色 VPA 组甲苯胺蓝染色神经元数目较其对照组略减少,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 VPA 可显著增高成、幼年大鼠的血清瘦素及血脂水平,尤其见于幼年鼠。长期应用 VPA 对幼年大鼠大脑皮质髓鞘有一定影响,对神经元影响不显著。 [中国当代儿科杂志,2010,12(6):479-482]

〔关键词〕 丙戊酸钠;瘦素;血脂;大脑皮质;大鼠

〔中图分类号〕 R-33 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2010)06-0479-04

Effects of valproate acid on blood lipid, serum leptin and cerebral cortex in juvenile and adult rats

Li Jing, Li Dan, HUANG Shao-Ping. Department of Pediatrics, Second Hospital of Jiaotong University, Xi'an 710004, China (Huang S-P, Email: zhengtu 1127@163.com)

Abstract: Objective To study the effects of valproate acid (VPA) on serum lipid and leptin levels and cerebral cortex in juvenile and adult rats. **Methods** Twenty healthy juvenile female Sprague-Dawley (SD) rats (21-day-old) and twenty healthy adult female SD rats (2-month-old) were randomly divided into four groups ($n = 10$ each): juvenile control, juvenile VPA, adult control and adult VPA. Juvenile and adult VPA groups were fed with VPA 200 mg/kg daily, while the two control groups were fed with normal saline. The body weights were recorded weekly. Six weeks after feeding, serum and brain samples were obtained. Serum lipid levels including total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and lower density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were determined. Serum leptin (LEP) levels were measured by radioimmunoassay (RIA). Myelin staining and Nissl staining were used to evaluate the changes of brain tissues. **Results** The weight and serum LEP and lipid levels in both juvenile and adult VPA groups increased significantly compared with those in the control groups ($P < 0.05$). The juvenile VPA group had more increased serum LEP and lipid levels than the adult VPA group ($P < 0.05$). The Myelin staining showed that the average fiber density in the VPA groups was significantly lower than that in the control groups ($P < 0.05$). The Nissl staining showed that the number of toluidine blue staining neurons in the VPA groups was not statistically different from the control groups. **Conclusions** VPA may increase serum LEP and lipid levels in both juvenile and adult rats, and more increased levels may be found in juvenile rats. Long-term VPA treatment may have an adverse effect on brain myelination, but no effect on neurons.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (6):479-482]

Key words: Valproate; Leptin; Blood lipid; Cerebral cortex; Rats

癫痫是小儿神经系统常见疾病之一,治疗需要数年或终身^[1]。丙戊酸钠(VPA)具有广谱抗癫痫作用,是最常用的抗癫痫药物之一。近年来,与VPA治疗相关的代谢不良反应如体重增加、高脂血

[收稿日期]2009-11-23;[修回日期]2010-01-06
[基金项目]陕西省科技攻关项目部分资助[2006k8-G3(5)]。
[作者简介]李静,女,硕士,主治医师。
[通信作者]黄绍平,主任医师。

症、高瘦素血症等已见报道,但相关的作用机制未完全明了^[2-3]。体重增加是 VPA 最常见的不良反应,但 VPA 引起体重增加的机制不清楚,可能与高瘦素血症、瘦素抵抗、高胰岛素血症及胰岛素抵抗等有关^[2,4]。VPA 可以促进脂肪组织合成瘦素,提高瘦素水平^[2]。研究显示,用 VPA 治疗的患者可出现胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白升高,提示 VPA 治疗人群比普通人群具有容易患心血管疾病的高危因素。另外,VPA 对大脑皮质的影响尚不清楚且存在争议,有研究认为 VPA 可影响血氨平衡、阻碍一元羧酸进入脑内、干扰脑能量、碳水化合物及脂质代谢,可引起髓鞘形成不良^[5],但也有一些研究持相反观点,认为 VPA 对大脑皮质有保护作用^[6]。本研究通过观察 VPA 治疗对幼年大鼠体重、血脂、血清(LEP)及大脑皮质的影响,初步探讨其相关的作用机制。

1 材料和方法

1.1 试验对象

健康的幼年雌性 Sprague-Dawley (SD)大鼠(生后 21 d)及成年雌性 SD 大鼠(生后 2 月)各 20 只,由西安交通大学动物中心提供,饲养温度 20 ~ 22 ℃,湿度 55% ~ 65%,7 am ~ 7 pm 见光。

1.2 实验方法

将大鼠随机分为幼年对照组、幼年 VPA 组、成年对照组和成年 VPA 组,每组 10 只。对照组每日经口插胃管给予生理盐水 1 ~ 2 mL,VPA 组直接灌胃给药每日 VPA 200 mg/kg,每周记录大鼠体重,实验初留取所有 VPA 组大鼠血标本,6 周后取血和大脑皮质标本。

1.3 血脂和瘦素检测

血标本全部采集后,采用酶显色法检测血脂(胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白)浓度。利用放射免疫分析法检测血清 LEP 水平,试剂盒由北京解

放军总医院科技开发中心提供。

1.4 脑组织切片、髓鞘染色及神经元尼氏染色

所有大鼠麻醉后打开胸腔暴露心脏,从左心室插管至主动脉根部,用 4% 多聚甲醛快速灌注,0.55 mol/L 磷酸盐缓冲液、4% 多聚甲醛固定脑组织。根据鼠脑立体定位图,在视交叉水平从乳头体冠切头骨以取出脑组织,4% 多聚甲醛固定 12 h,石蜡包埋,制成 5 μm 的石蜡涂片。用丽春红 G 方法进行髓鞘染色。光镜下髓鞘染成红色。采用计算机图像分析仪器半定量测定平均单根纤维面积、平均纤维密度及神经纤维占有率以评估髓鞘化程度。利用苯甲蓝进行髓鞘染色,染色后采用计算机图像分析仪器半定量测定尼氏体密度以评估神经元损伤。

1.5 统计学处理

所有数据均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 软件分析和处理试验数据,均数间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 体重变化

幼年对照组及 VPA 组大鼠试验初体重分别为 81.6 ± 5.4 g 和 83.7 ± 6.4 g,两组比较差异无统计学意义。实验结束后,幼年 VPA 组大鼠体重为 233.0 ± 10.8 g,较对照组 215.7 ± 14.2 g 明显增加,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.2 血清 LEP 和血脂水平

成、幼年 VPA 组大鼠的血清 LEP、血脂[胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)]与相应对照组比较均明显增高,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1、表 2。与成年 VPA 组比较,幼年 VPA 组大鼠血清 LEP、血清 TC、TG 及 LDL 增值水平明显增高(*P* < 0.05),见表 3。

表 1 幼年组血清 LEP 和血脂水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LEP(ng/mL)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL(mmol/L)
幼年对照组	10	5.11 ± 2.43	1.38 ± 0.27	0.66 ± 0.44	0.31 ± 0.19
幼年 VPA 组	10	7.81 ± 1.44 ^a	1.78 ± 0.46 ^a	1.26 ± 0.23 ^a	0.62 ± 0.26 ^a

a:与对照组比较,*P* < 0.05

表 2 成年组血清 LEP 和血脂水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LEP(ng/mL)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL(mmol/L)
成年对照组	10	4.02 ± 2.32	1.45 ± 0.36	0.68 ± 0.42	0.32 ± 0.24
成年 VPA 组	10	6.45 ± 5.31 ^a	1.72 ± 0.38 ^a	1.05 ± 0.39 ^a	0.51 ± 0.15 ^a

a:与对照组比较,*P* < 0.05

表 3 成年大鼠血清 LEP、TC、TG、LDL 的增值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LEP (ng/mL)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL (mmol/L)
成年 VPA 组	10	1.65 ± 0.24	0.28 ± 0.23	0.37 ± 0.16	0.21 ± 0.13
幼年 VPA 组	10	1.86 ± 0.43 ^a	0.39 ± 0.12 ^a	0.52 ± 0.12 ^a	0.31 ± 0.16 ^a

a:与成年 VPA 组比较, $P < 0.05$

2.3 脑组织髓鞘染色

髓鞘染色显示,幼年对照组额叶大脑皮质横切面显示髓鞘呈环状,髓鞘着色均匀,而幼年 VPA 组髓鞘染色浅,部分结构缺如。幼年 VPA 组平均纤维密度为 $(8.12 \pm 1.24) \times 10^3/\text{mm}^2$,而对照组平均纤维密度为 $(10.80 \pm 1.65) \times 10^3/\text{mm}^2$,VPA 组平均纤维密度低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

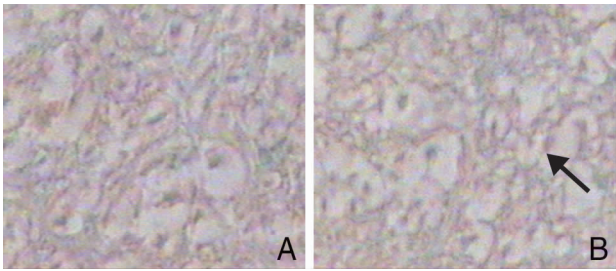


图 1 髓鞘染色结果($\times 400$) A:幼年对照组大鼠大脑皮质横断面髓鞘呈环状,着色均匀,无脱失现象。B:幼年 VPA 组髓鞘肿胀,髓鞘淡染,部分髓鞘变性崩解,呈颗粒状或不着色,部分结构缺如。

2.4 脑组织尼氏染色

尼氏染色显示,幼年对照组的神经元形态规则,胞膜清晰,细胞器丰富,结构完整,核膜界线清晰,核内染色质均匀。幼年 VPA 组神经元胞膜边界不清晰,细胞器减少,甲苯氨蓝神经元数量略减少。幼年 VPA 组甲苯氨蓝神经元数目为 $(93.26 \pm 1.85)\%$,幼年对照组为 $(94.35 \pm 1.16)\%$,VPA 组甲苯氨蓝神经元数目略低于对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

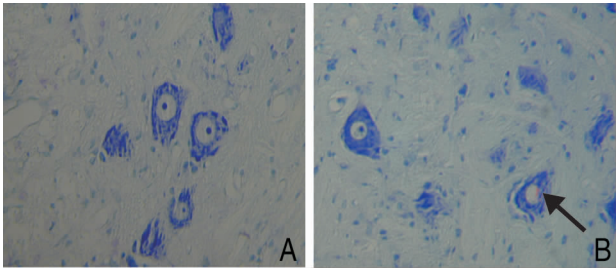


图 2 神经元尼氏染色结果($\times 400$) A:幼年对照组的神经元形态规则,胞膜清晰,细胞器丰富,结构完整,核膜界线清晰,核内染色质均匀。B:幼年 VPA 组甲苯氨蓝神经元数量略减少,神经元胞膜边界不清晰,细胞器减少,胞体呈空泡状(箭头)。

3 讨论

VPA 是一种广谱抗癫痫药物,被广泛应用于全身性发作性癫痫儿童。VPA 可引起代谢不良反应,最常见的是体重增加^[2]。本研究显示 VPA 组大鼠体重增加明显大于对照组,差异有统计学意义。有研究显示 3% ~ 71% VPA 治疗的患者出现体重明显增加,增值约 5 ~ 49 kg^[7-8]。VPA 引起体重增加的机制尚不完全清楚,可能有:(1)VPA 对下丘脑的影响:VPA 可以促进食欲,增加饥饿感和高热量食物的摄入^[1];VPA 使中枢神经系统下丘脑组织的 GABA 水平升高,可部分解释 VPA 患者食欲增加、体重增长的原因^[9];(2)VPA 引起的高 LEP 血症和 LEP 抵抗:VPA 可直接作用于脂肪细胞促使 LEP 分泌增高,与 VPA 引起的肥胖有关^[1];高 LEP 水平引发的肥胖可导致机体对 LEP 敏感度下降^[10];(3)VPA 引起的高胰岛素血症和胰岛素抵抗:高胰岛素血症是由 β 细胞分泌增多引起的,胰岛素分泌增多可促进食欲和能量储存,从而引起体重增加^[11]。胰岛素抵抗在体重增长中也起了重要的作用^[1]。(4)引起体重增加的其他因素:如交感神经系统活性不足、肥胖基因调节、肉毒素缺乏致脂肪酸 β 氧化受抑制等^[4]。体重增长不仅引起不良的心理影响,致药物依从性降低,而且可能引起与肥胖相关的疾病如血脂异常、高血压、糖尿病、动脉硬化和相关血管并发症^[12]。

有关瘦素变化与年龄关系的报道不多,有研究显示体重增长见于各个年龄段,尤其见于青少年^[2]。本研究显示 VPA 组大鼠血清 LEP 明显增高,且幼年组血清 LEP 水平增值比成年组明显增高,提示与成年大鼠相比,血清 LEP 水平升高在幼年大鼠中更容易出现。本研究发现 VPA 治疗的大鼠血脂异常,成年组和幼年组的胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白均明显升高,差异有统计学意义,与以往报道一致^[13-14]。有报道显示 VPA 治疗的患者存在血脂异常,血脂异常与体重增加和高胰岛素血症有关^[15]。本研究显示幼年组血清胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白水平增值均比成年组明显增高,提示与成年大鼠相比,脂代谢异常更容易在幼年大鼠中出现。但

是有关血脂变化与年龄关系具体机制尚不清楚。

本研究显示,长期应用 VPA 对大脑皮质髓鞘有影响,但对神经元影响不大,引起髓鞘形成不良的机制不详,推测可能与脂代谢紊乱及肥胖有关^[16]。VPA 对大脑皮质的影响存在争议。有研究显示 VPA 可影响血氨平衡,阻碍一元羧酸进入脑内,干扰脑能量、碳水化合物及脂质代谢^[5]。高氨血症是 VPA 的副作用之一,可能引起脑损伤^[17]。有报道在新生大鼠脑切片中发现乳酸和 3-羟基乙酸乙酯的氧化受到 VPA 抑制,由于乳酸和酮体是脑发育的重要物质,因此 VPA 可能影响脑发育^[18]。由乳酸合成的主要磷脂如卵磷脂、磷脂酰乙醇胺及磷脂酰丝氨酸减少^[19],皮质中的 24-脱氢胆固醇、胆固醇及羊毛甾醇的合成受到 VPA 抑制,因此可能出现髓鞘形成不良。另外,有研究认为长期应用 VPA 可引起血浆胆固醇浓度升高,胆固醇大量聚集可引起脑损伤和神经元星形胶质化^[20]。

总之,体重增长是 VPA 治疗的一个最重要的不良反应,可引起血脂和 LEP 代谢异常。VPA 可引起大脑皮质髓鞘形成不良,但对神经元无影响。但 VPA 导致血脂及 LEP 改变和大脑皮质髓鞘形成不良的影响机制,仍需进一步深入探讨。

参考文献

[1] Hamed SA, Fida NM, Hamed EA. States of serum leptin and insulin in children with epilepsy: risk predictors of weight gain[J]. *Eur J Paediatr Neurol*, 2009, 13(3):261-268.

[2] Hamed SA. Leptin and insulin homeostasis in epilepsy: Relation to weight adverse conditions[J]. *Epilepsy Res*, 2007, 75(1):1-9.

[3] Hamed SA, Hamed EA, Kandil MR, El-Shereef HK, Abdellah MM, Omar H. Serum thyroid hormone balance and lipid profile in patients with epilepsy[J]. *Epilepsy Res*, 2005, 66(1-3):173-183.

[4] El-Khatib F, Rauchenzauner M, Lechleitner M, Hoppichler F, Naser A, Waldmann M, et al. Valproate, weight gain and carbohydrate craving: A gender study[J]. *Seizure*, 2007, 16(3):226-232.

[5] Sobaniec-Lotowska ME. A transmission electron microscopic study of microglia/macrophages in the hippocampal cortex and neocortex following chronic exposure to valproate[J]. *Int J Exp Pathol*, 2005, 86(2):91-96.

[6] Shao L, Young LT, Wang JF. Chronic treatment with mood stabili-

zers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells[J]. *Biol Psychiatry*, 2005, 58(11):1879-1884.

[7] Biton V. Effect of antiepileptic drugs on body weight: overview and clinical implications for the treatment for the treatment of epilepsy[J]. *CNS Drugs*, 2003, 17(11):781-791.

[8] Zimmermann U, Kraus T, Himmerich H, Schuld A, Pollmacher T. Epidemiology, implications and mechanisms underlying drug induced weight gain psychiatric patients[J]. *Psychiatr Res*, 2003, 37(3):193-220.

[9] van den Pol AN. Weighing the role of hypothalamic feeding neurotransmitters[J]. *Neuron*, 2003, 40(6):1059-1061.

[10] Sahu A. A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. Minireview[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(6):2613-2620.

[11] Luef GL, Lechleitner M, Bauer G, Trink A, Hengster P. Valproic acid modulates islet cell insulin secretion: a possible mechanisms of weight gain in epilepsy patients[J]. *Epilepsy Res*, 2003, 55(1-2):53-58.

[12] McTigue K, Larson JC, Valoski A, Burke G, Kotchen J, Lewis, C. E, et al. Mortality and cardiac and vascular outcomes in extremely obese women[J]. *JAMA*, 2007, 296(1):79-86.

[13] Sonmez FM, Demir E, Orem A, Yildirmis S, Orhan F, Aslan A, et al. Effect of Antiepileptic drugs on plasma lipids, lipoprotein, liver onzymes[J]. *Child Neurol*, 2006, 21(1):70-74.

[14] Luef M, Rauchenzauner M, Waldmann W, Sturm A, Sandhofer K, Seppi E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), insulin resistance and lipid profile in antiepileptic drug treatment[J]. *Epilepsy Research*, 2009, 86(1):42-47.

[15] Pylvanen V, Pakarinen A, Knip M, Isojarvi J. Insulin-related metabolic changes during treatment with valproate in patients with epilepsy[J]. *Epilepsy Behavior*, 2006, 8(3):643-648.

[16] Spiegel A, Nabel E, Volkow N, Landis S, Li TK. Obesity on the brain[J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(5):552-553.

[17] Segura-Bruna N, Rodriguez-Campello A, Puente V, Roquer J. Valproate-induced hyperammonemic encephalopathy[J]. *Acta Neurol Scand*, 2006, 114(1):1-7.

[18] Nathan BP, Nisar R, Short J, Randall S, Grissom E, Griffin G, et al. Delayed olfactory nerve regeneration in ApoE-deficient mice[J]. *Brain Res*, 2005, 1041(1):87-94.

[19] Bazinet RP, Rao JS, Chang L, Rapoport SI, Lee HJ. Chronic valproate does not alter the kinetics of docosahexaenoic acid within brain phospholipids of the unanesthetized rat[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 182(1):180-185.

[20] Reid PC, Lin S, Vanier MT, Ohno-Iwashita Y, Harwood HJ Jr, Hickey WF, et al. Partial blockage of sterol biosynthesis with a squalene synthase inhibitor in early postnatal Niemann-Pick type C npcni null mice brains reduces neuronal cholesterol accumulation, abrogates astrogliosis, but may inhibit myelin maturation[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 168(1):15-25.

(本文编辑:黄 榕)