

本文引用: 张艳菊, 潘婷婷, 杨辉, 张林. 愈痫灵含药血清抑制小胶质细胞 Panx1/P2X7R-NLRP3 炎性活化及神经元保护效应研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(12): 2280-2287.

## 愈痫灵含药血清抑制小胶质细胞 Panx1/P2X7R-NLRP3 炎性活化及神经元保护效应研究

张艳菊<sup>1</sup>, 潘婷婷<sup>1</sup>, 杨辉<sup>2</sup>, 张林<sup>2\*</sup>

1. 贵州中医药大学研究生学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵州 贵阳 550003

**[摘要]** **目的** 研究愈痫灵含药血清对脂多糖(LPS)诱导下 BV-2 小胶质细胞神经炎症的调控作用及神经炎症导致的神经元细胞损伤的保护作用。**方法** 建立 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞神经炎症模型, 设置正常对照组、模型组、空白血清组、愈痫灵含药血清(5%、10%、20%)组。采用 CCK-8 法检测细胞活力; 采用 Western blot 分析泛连接蛋白 1(Panx1)、嘌呤能离子通道型受体 7(P2X7R)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶-1(Caspase-1)、离子钙结合衔接分子 1(Iba-1)蛋白表达水平; 采用免疫荧光观察 Panx1、P2X7R、NLRP3、Iba-1 蛋白的表达; 采用 ELISA 检测细胞上清液中白细胞介素-1(IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-18(IL-18)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量。随后收集 BV-2 小胶质细胞培养上清液, 将其加入到纯净的 HT22 海马神经元细胞中共同孵育(即条件培养基处理), 观察愈痫灵含药血清对 HT22 神经元的保护作用。采用 CCK-8 法检测 HT22 细胞存活率。**结果** 与正常对照组比较, 模型组 Panx1、P2X7R、NLRP3、ASC、Caspase-1、Iba-1 蛋白表达较高( $P<0.01$ ), IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$  含量升高( $P<0.01$ ); 海马神经元细胞活力降低( $P<0.01$ )。与模型组比较, 20%愈痫灵含药血清组 Panx1、P2X7R、NLRP3、ASC、Caspase-1、Iba-1 蛋白表达降低( $P<0.01$ ), IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$  含量降低( $P<0.01$ ); 海马神经元细胞活力增加( $P<0.01$ )。**结论** 愈痫灵含药血清可减轻 LPS 诱导下 BV-2 小胶质细胞神经炎症, 进而减轻其对 HT22 神经元的损伤作用。

**[关键词]** 癫痫; 愈痫灵含药血清; 脂多糖; BV-2 细胞; HT22 神经元

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.12.006

## Inhibitory effects of Yuxianling medicated serum on microglial Panx1/ P2X7R-NLRP3 inflammatory activation and its neuroprotective effects

ZHANG Yanju<sup>1</sup>, PAN Tingting<sup>1</sup>, YANG Hui<sup>2</sup>, ZHANG Lin<sup>2\*</sup>

1. Graduate School, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. The Second Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550003, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the regulatory effects of Yuxianling medicated serum on neuroinflammation in lipopolysaccharide (LPS)-induced BV-2 microglial cells and its protective role against neuronal damage resulting from neuroinflammation. **Methods** A neuroinflammation model was established using LPS-induced BV-2 microglial cells, with experimental groups including a normal control group, a model group, a blank serum group, and Yuxianling medicated serum groups (5%, 10%, and 20%). Cell viability was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The protein expression levels of Pannexin 1 (Panx1), Purinergic

**[收稿日期]** 2025-07-21

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82060863); 贵州省教育厅青年科技拔尖人才项目(黔教技[2024]331号); 贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项课题(QZYY-2024-068); 贵州中医药大学校级课题(贵中医科院内[2019]20); 贵州中医药大学第二附属医院院内项目(GZEYK[2020]11)。

**[通信作者]** \* 张林, 男, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: doctorzhanglin01@163.com。

P2X Receptor 7 (P2X7R), NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a card (ASC), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1), and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) were analyzed by Western blot. The expression of Panx1, P2X7R, NLRP3, and Iba-1 proteins were observed using immunofluorescence. The concentrations of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-18, and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the cell culture supernatant were measured by ELISA. Subsequently, the culture supernatant from BV-2 microglial cells was collected and added to pure HT22 hippocampal neuronal cells for co-incubation (i.e., conditioned medium treatment) to investigate the protective effects of Yuxianling medicated serum on HT22 neurons. The survival rate of HT22 cells was determined using the CCK-8 assay. **Results** Compared to the normal control group, the model group exhibited higher protein expression levels of Panx1, P2X7R, NLRP3, ASC, Caspase-1, and Iba-1 ( $P<0.01$ ); elevated cytokine expressions of IL-1 $\beta$ , IL-18, and TNF- $\alpha$  ( $P<0.01$ ); reduced hippocampal neuronal cell viability ( $P<0.01$ ). In comparison with the model group, the 20% concentration Yuxianling medicated serum group showed decreased protein expressions of Panx1, P2X7R, NLRP3, ASC, Caspase-1, and Iba-1 ( $P<0.01$ ); reduced expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-18, and TNF- $\alpha$  ( $P<0.01$ ); and increased viability of hippocampal neuronal cells ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Yuxianling medicated serum can alleviate neuroinflammation in LPS-induced BV-2 microglial cells, thereby reducing their damaging effects on HT22 neurons.

[**Keywords**] epilepsy; Yuxianling medicated serum; lipopolysaccharide; BV-2 cell; HT22 neuron

癫痫是一种由多种病因导致的慢性脑部疾病,其特征为脑神经元异常过度放电引发的中枢神经系统短暂性、发作性和反复性的功能紊乱。本病全球患病人数超过 7 000 万,我国约有 1 000 万以上癫痫患者<sup>[1-2]</sup>。目前,癫痫的发病机制尚未明确,与离子通道改变、神经递质异常、血脑屏障损伤、胶质细胞异常、突触联系异常、免疫系统紊乱、遗传因素等有关<sup>[3]</sup>。神经炎症与多种中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病的发病机制密切相关。近年来,越来越多的研究表明,神经炎症在癫痫的发病机制中扮演着重要角色。实验研究表明,癫痫发作活动本身会诱发脑部炎症,而反复发作会使慢性炎症长期存在<sup>[4-6]</sup>。

泛连接蛋白 1(pannexin 1, Panx1)是一类重要的膜通道蛋白,参与神经炎症,作为炎症小体激活和细胞因子释放的介质<sup>[7]</sup>。其功能通过影响 ATP 等信号分子的释放,在癫痫等疾病中发挥关键作用<sup>[8]</sup>。Panx1 释放的 ATP 可以激活嘌呤能受体,包括 P2X7 受体,嘌呤能离子通道型受体 7(purinergic P2X receptor 7, P2X7R)和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3)可发生相互作用<sup>[9]</sup>,促进炎症因子(如 IL-1 $\beta$ )的释放,加剧神经炎症<sup>[10-11]</sup>。炎症反应通过介导包括神经胶质(小胶质细胞和星形胶质细胞)的激活、脑内炎症介质的释放以及周围免疫细胞的募集等在内的一系列复杂的生物化学过程,影响神经元的正常功能,加剧脑组织的损伤,并可能导致

神经功能的进一步恶化<sup>[12-13]</sup>。因此,本课题拟通过建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 BV-2 小胶质细胞神经炎症模型,探讨愈痫灵含药血清对炎症反应的抑制作用,并进一步研究在炎症环境下小胶质细胞对神经元功能的影响,为后续深入探索其作用机制提供基础。

## 1 材料

### 1.1 细胞及动物

BV-2 小胶质细胞系及 HT-22 海马神经元由中国科学院上海细胞库提供。实验使用 SPF 级 SD 大鼠,体质量(250 $\pm$ 20) g,动物由重庆医科大学实验动物中心提供[SCXK(渝)2022-0010]。实验涉及动物的饲养和实验过程中均遵守贵州中医药大学实验动物管理与实验伦理学委员会的有关准则(伦理审查:20230196)。

### 1.2 主要试剂

胎牛血清、DMEM 培养基购自美国赛默飞世尔科技公司,货号:10099-141、11995-065;胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液(100X)、CCK-8 试剂盒、HRP 标记山羊抗兔 IgG、QuickBlock 免疫染色封闭液、DAPI 染色液、抗荧光淬灭剂、TritonX-100、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、蛋白裂解液均购自上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0201、C0222、C0039、A0208、P0260、C1006、P0128M、ST795、P0015、P0013; DMSO、牛血清白蛋白购自美国 Sigma-Aldrich 公司,

货号:D2650、V900933-100G;LPS、Tris、甘氨酸购自北京索莱宝科技有限公司,货号:IL2020、T8060、G8200;Panx1、P2X7R 购自美国 Novus Biologicals 公司,货号:NBP3-16578、NBP1-37775; 驴抗山羊 IgG H&L (Cy3®) 预吸附二抗、ASC 购自英国 abcam 公司,货号:ab6949、ab180799;NLRP3 购自江苏亲和生物科技有限公司,货号:DF7438;Caspase 1 购自浙江华安生物技术有限公司,货号:ET1608-69; $\beta$ -actin 购自北京博奥森生物技术有限公司,货号:bs-0061R;iba1 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,货号:SC32725。

### 1.3 主要仪器

电热压力蒸汽灭菌器、电热恒温鼓风干燥箱、双人双面垂直洁净工作台购自上海博迅医疗生物仪器股份有限公司,型号:YXQ-LS-100A、GZX-9140MBE、SW-CJ-2F;CO<sub>2</sub> 培养箱购自 Panasonic Corporation (原 Sanyo 品牌),型号:MCO-18AIC;智能恒温水浴锅购自北京东方瑞利科技有限公司,型号:HW-SY-P;低速离心机购自上海卢湘仪离心机仪器有限公司,型号:TDL-50;超低温冷冻储存箱购自安徽中科美菱低温科技股份有限公司,型号:DW-HL328;倒置荧光显微镜购自日本尼康公司,型号:ECLIPSE Ti-s;多功能酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司,型号:Varioskan LUX;凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司,型号:Tanon-4200;转膜装置购自美国 Bio-Rad 公司,型号:Trans-Blot。

## 2 方法

### 2.1 愈痢灵方的组成及制备

愈痢灵方组成:川芎 10 g,石菖蒲 10 g,红花 10 g,丹参 10 g,黄芪 20 g,白术 20 g,党参 20 g,蜈蚣 10 g,全蝎 5 g,山茱萸 20 g,胆南星 10 g,天竺黄 10 g,冰片 0.1 g。饮片按照常规方法,用 8 倍量水浸泡 30 min,武火煮沸后文火煮 2 h,药液倒出后,药渣加入适量水没过药面继续煎煮,方法同前,合并 2 次药液,双层纱布过滤,浓缩成生药含量为 1 g/mL 的药液,分装灭菌后 4 °C 冰箱内冷藏备用。根据实验动物人与大鼠等效剂量换算公式<sup>[14]</sup>,愈痢灵方每日生药用量为 155.1 g,人与大鼠的药物剂量换算系数为 6.3,换算成大鼠剂量为 4 g/(kg·d)。

### 2.2 愈痢灵含药血清制备

SD 大鼠适应性喂养 1 周,随机分为大鼠血清对

照组和愈痢灵组,对照组 5 只,愈痢灵组 15 只,分别给予生理盐水和愈痢灵 4 g/(kg·d)的剂量进行灌胃处理,1 次/d,连续灌胃 1 周;最后一次给药 1 h 后,使用 1.5%异氟烷腹腔麻醉后,进行腹主动脉采血并混匀,血液静置 1 h 后,于 4 °C、离心力 15 00×g 离心 10 min,分离血清,56 °C 水浴,30 min 灭活,微孔滤过膜过滤除菌,-80 °C 冻存备用。

### 2.3 细胞培养

实验选用处于对数生长期的 BV-2 小胶质细胞系。细胞在含 10%胎牛血清、1%青链霉素和 1%丙酮酸钠的培养瓶中进行培养,培养条件设置为 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度,生长至细胞密度 80%左右时进行传代和实验。

### 2.4 细胞分组和给药

取对数生长期 BV-2 小胶质细胞,随机分为正常对照组、模型组、空白血清组、愈痢灵含药血清(5%、10%、20%)组。正常对照组使用正常培养基培养;模型组用 LPS(1  $\mu$ g/mL)诱导小胶质细胞 12 h 建立炎症模型;空白血清组加入含 20%空白血清的培养基进行干预;5%、10%、20%愈痢灵含药血清组:分别予 5%、10%、20%愈痢灵含药血清干预 30 min 后,再加入 LPS 共同培养 12 或 24 h。

### 2.5 CCK-8 检测各组细胞增殖活性

分别以每孔 7 000、5 000 和 3 000 个细胞的密度将细胞接种于 96 孔板中,每孔最终体积为 100  $\mu$ L,每组设置 3 个复孔,另设空白对照组。将培养板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养。吸去原培养基,更换无血清培养基培养 12 h 使细胞同步化,随后按实验分组加入含药完全培养基。继续培养 24、48、72 h 后检测。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液孵育 1-4 h。30 min 后每隔 10 min 观察显色情况。采用酶标仪测定 450 nm 处吸光度,并计算细胞增殖率。

### 2.6 免疫荧光检测各组细胞中 Iba-1、Panx1、P2X7R、NLRP3 的表达情况

将处于对数生长期的 BV-2 细胞按  $2 \times 10^5$ /孔接种于 12 孔板,依据“2.4”方案分组设置 3 个复孔并给药孵育后进行免疫荧光实验。步骤如下:细胞经 PBS 漂洗后,用 4%多聚甲醛室温固定 10~30 min,经 PBS 再次洗涤,使用 0.5% Triton X-100 室温透化 20 min。随后,样品与一抗(Iba1 1:100;NLRP3 1:250)于 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤后,与 Cy3 标记的

二抗(1:800)避光孵育1 h。最后经 DAPI 复染核、封片,以备观察。

### 2.7 Western blot 检测各组细胞中 Iba-1、Panx1、P2X7R、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白的表达情况

冰上裂解细胞获取蛋白后,采用 BCA 法测定蛋白浓度并进行 20 倍稀释定量;样品与 Loading Buffer 混合煮沸变性后,根据目标蛋白分子量配制 SDS-PAGE 凝胶,上样 20~30  $\mu\text{g}$  蛋白进行电泳(80 V 浓缩胶 $\rightarrow$ 120 V 分离胶);电泳结束后将蛋白转至甲醇活化的 PVDF 膜上,经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗(Iba1、Panx1、P2X7R、NLRP3、ASC、Caspase-1,稀释比例分别为 1:500、1:500、1:1 000、1:1 000、1:500、1:500),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,再与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)于室温孵育 1 h, TBST 充分洗涤;最后用 ECL 显影液避光反应后化学发光成像,以  $\beta$ -actin 为内参通过 ImageJ 软件进行定量分析。

### 2.8 ELISA 检测各组细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$ 细胞因子的含量

目标蛋白浓度严格依据 ELISA 试剂盒说明书进行操作。简要流程如下:将 100  $\mu\text{L}$  样品或标准品加入孔中,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h;随后依次加入生物素化抗体工作液和酶结合物工作液分别孵育 1 h 与 30 min;各步间使用洗涤液清洗 3 次;最后经 TMB 显色与终止液作用后,于 450 nm 波长下测定 OD 值,并根据标准曲线计算蛋白浓度。

### 2.9 CCK-8 法检测 HT22 细胞存活率

使用 BV-2 小胶质细胞条件培养基与 HT-22 海马神经元细胞共培养,行 CCK-8 法检测共培养 HT22 细胞存活率。

### 2.10 统计学方法

数据采用 SPSS 26.0 分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,通过 Shapiro-Wilk 检验评估数据正态性分布特征。正态分布且方差齐性数据,采用单因素方差分析(ANOVA)比较组间差异。辅以 LSD 法进行两两比较;若数据呈非正态分布,则选用非参数 Mann-Whitney U 检验进行分析。采用双侧检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 愈痫灵含药血清浓度筛选

与正常对照组比较,模型组细胞活力在 24 h 时无显著差异( $P>0.05$ ),在 48 h 与 72 h 时均降低( $P<$

0.05)。与模型组比较,48 h 时 5%、10%、20% 愈痫灵含药血清组细胞活力均升高( $P<0.05$ );72 h 时 20% 浓度组细胞活力显著高于模型组( $P<0.05$ ),而 5%、10% 浓度组与模型组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结果表明,20% 愈痫灵含药血清干预效果最佳,故后续实验选用该浓度。详见图 1。

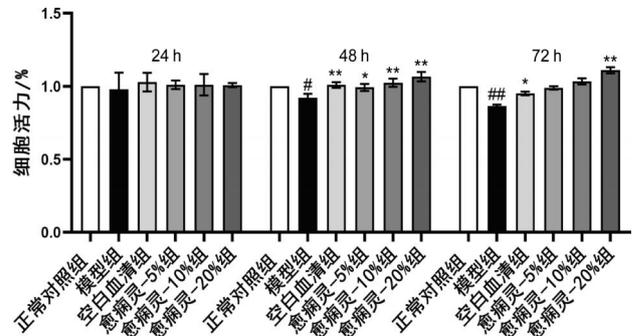


图1 不同浓度愈痫灵含药血清处理后 BV-2 小胶质细胞活力的变化

Fig.1 Changes in the viability of BV-2 microglial cells treated with Yuxianling medicated serum at different concentrations

注:与正常对照组比较, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ ;与模型组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

### 3.2 各组 BV-2 细胞中 Panx1、P2X7R、NLRP3、Iba-1 蛋白表达

免疫荧光结果显示,与正常对照组比较,模型组 Panx1、P2X7R、NLRP3、Iba-1 的蛋白表达较高;与模型组比较,20% 浓度愈痫灵含药血清组 Panx1、P2X7R、NLRP3、Iba-1 的蛋白表达较低。详见图 2。

### 3.3 各组 BV-2 细胞中 Panx1、P2X7R、NLRP3、ASC、Caspase-1、Iba-1 蛋白表达

Western blot 结果显示,与正常对照组比较,模型组 Panx1、P2X7R、NLRP3、ASC、Caspase-1、Iba-1 蛋白表达较高( $P<0.01$ );与模型组比较,20% 浓度愈痫灵含药血清组以上指标表达降低( $P<0.01$ )。详见图 3。

### 3.4 各组 BV-2 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$ 水平比较

与对照组相比,模型组 IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$  细胞因子表达升高( $P<0.01$ );与模型组相比,20% 浓度愈痫灵含药血清组 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$  表达水平降低( $P<0.01$ )。详见图 4。

### 3.5 愈痫灵含药血清对小胶质细胞条件培养液-神经元间接共培养体系中 HT22 细胞存活率的影响

干预 24 h 时,与对照组相比,模型组海马神经

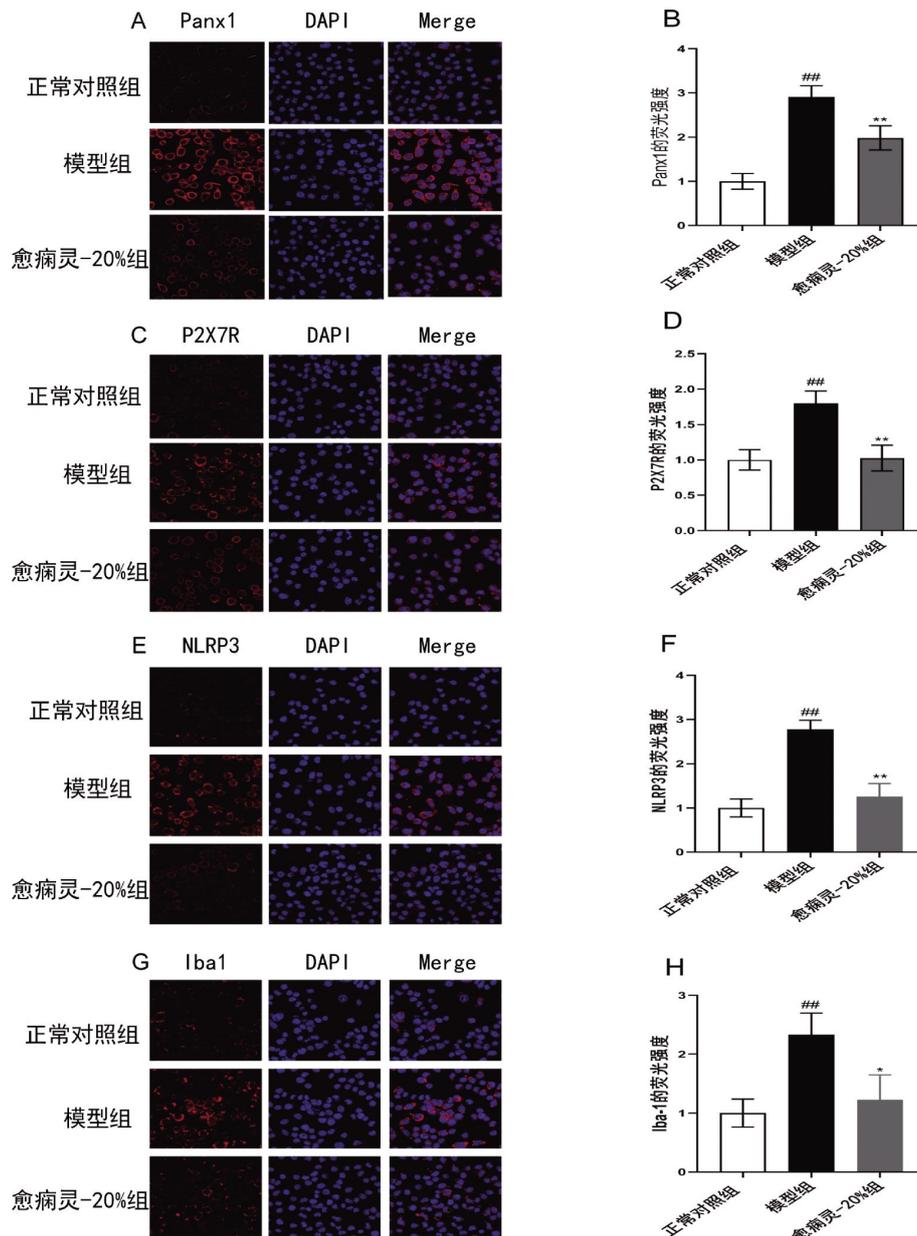


图 2 各组 BV-2 细胞中 Panx1、P2X7R、NLRP3、Iba-1 蛋白表达情况

Fig.2 Protein expression levels of Panx1, P2X7R, NLRP3, and Iba-1 in BV-2 cells of each group

注:与对照比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

元细胞活力降低( $P < 0.01$ ),20%愈痫灵含药血清组海马神经元细胞活力增加( $P < 0.01$ )。干预 48、72 h 时,与对照组相比,模型组海马神经元细胞活力降低( $P < 0.01$ ),20%愈痫灵含药血清组海马神经元细胞活力增加( $P < 0.01$ ),详见图 5。

#### 4 讨论

癫痫属于中医学“痫证”范畴,其病机多责之于“气虚血瘀、痰浊内蕴、毒损脑络”。课题组认为“正气亏虚为内在基础、痰瘀互结贯穿始终、病毒内伏,损

及脑络”,故治疗上以“益气培元、补肾健脾固其本,祛痰化瘀,解毒定痫,醒脑开窍”为核心<sup>[15]</sup>。愈痫灵方是以“益气化瘀解毒”为治则,由川芎、石菖蒲、红花、丹参、黄芪、白术、党参、蜈蚣、全蝎等药物组成。方中黄芪、白术、党参等益气补肾健脾,以固其本。石菖蒲化痰,酌加川芎、红花、丹参等祛瘀之品。药用全蝎、蜈蚣等虫类药解毒通络、息风止痉。此类药含毒性成分,乃以药之毒攻病之毒,非草木药所能代替。所谓以毒攻毒<sup>[16]</sup>,邪去则正自安。石菖蒲、冰片等芳香温通之品,以其辛香走窜之力使脑络得通,气血得以充

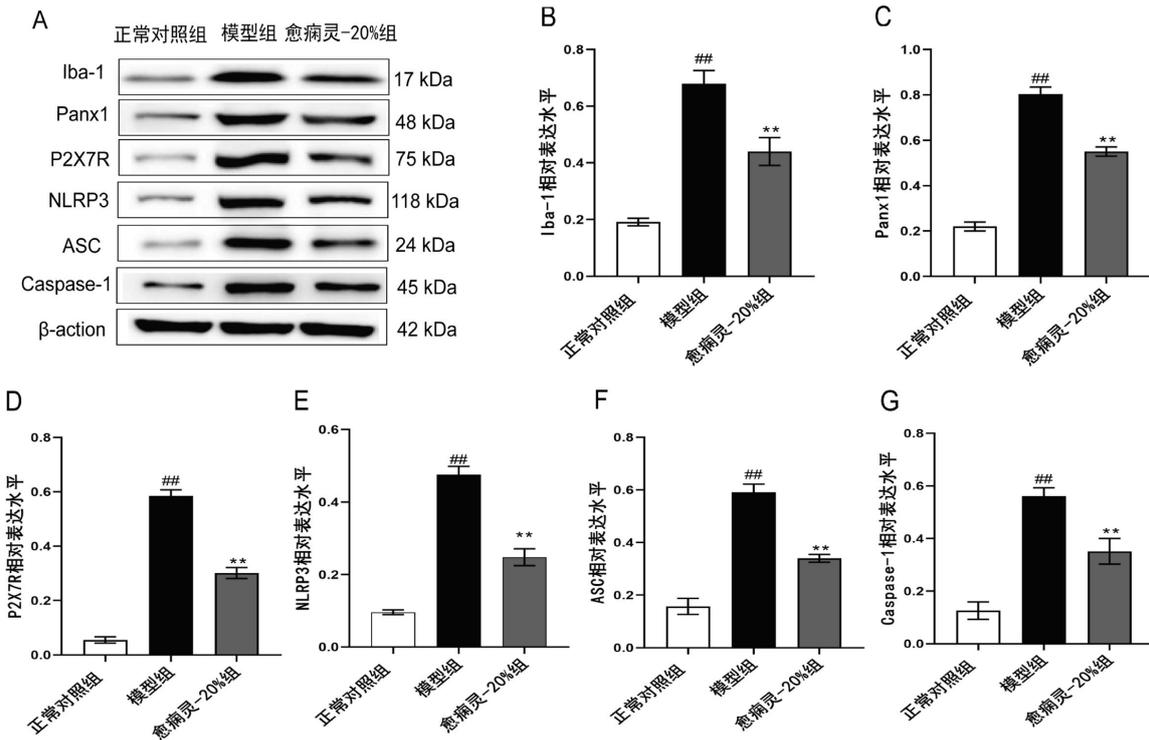


图 3 各组 BV-2 细胞中 Panx1、P2X7R、NLRP3、ASC、Caspase-1、Iba-1 蛋白表达情况

Fig.3 Protein expressions of Panx1, P2X7R, NLRP3, ASC, Caspase-1, and Iba-1 in each group of BV-2 cells  
注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,# $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.01$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

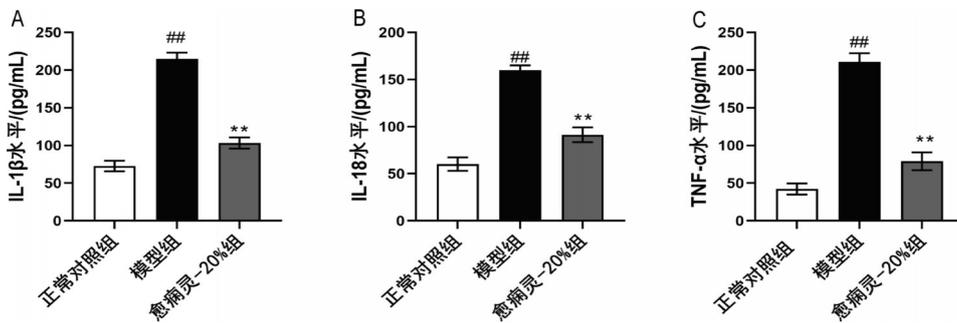


图 4 各组 BV-2 细胞培养上清液中 IL-1β、IL-18 和 TNF-α 细胞因子表达情况

Fig.4 Expressions of the cytokines IL-1β, IL-18, and TNF-α in the culture supernatant of BV-2 cells in each group

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,# $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.01$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

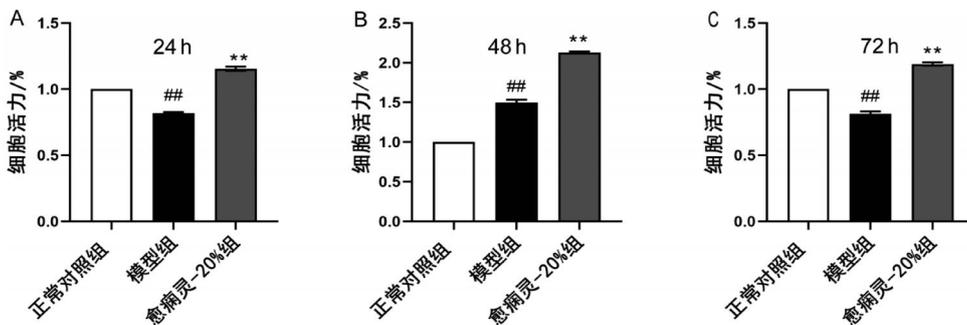


图 5 CCK-8 检测细胞活力

Fig.5 CCK-8 assay for cell viability

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,# $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.01$ ,\*\* $P < 0.01$ ;A 为 BV2 小胶质细胞条件培养液干预海马神经元细胞 24 h;B、C 分别为 BV2 小胶质细胞条件培养液干预海马神经元细胞 48 h、72 h。

脑;且芳香之品性走而不守,能引祛痰、化痰、解毒之药上行,直达病所,以更好更快发挥药效。

研究证明,神经炎症在癫痫的发生和发展中扮演着重要角色,其中小胶质细胞的激活是神经炎症的核心环节<sup>[17]</sup>。癫痫发作可诱发脑损伤,进而激活小胶质细胞和星形胶质细胞,释放出具有神经毒性特性的多种炎症介质。高水平的炎症介质可导致小鼠大脑中神经元兴奋增强 BBB 功能障碍,最终导致癫痫耐药和癫痫发作,从而形成恶性循环<sup>[18]</sup>。值得注意的是,Panx1 作为在多种脑细胞(包括小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元)中广泛表达的通道蛋白<sup>[19-29]</sup>,已被证实是影响 CNS 的各种炎症性疾病中释放 ATP 的有效机制,参与 TBI<sup>[30]</sup>、脑缺血<sup>[31-32]</sup>和癫痫<sup>[33-34]</sup>的病理过程。细胞外 ATP 被证明直接参与 P2X7 受体的炎性小体激活,随后导致钾的外流和核苷酸结合寡聚结构域受体的激活,即 NLRP3<sup>[35]</sup>。进而激活小胶质细胞,过度活化的小胶质细胞会产生炎性细胞因子诱导神经毒性作用,其产生的炎性因子是导致神经系统炎症的关键因素<sup>[36]</sup>。过度活化的小胶质细胞诱导氧化损伤,加剧神经元凋亡的发生<sup>[37]</sup>。

在上述机制背景下,本研究以 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞为模型,探讨愈痫灵含药血清在改善神经炎症及相关神经元损伤方面的作用。结果显示,愈痫灵含药血清能提高 LPS 刺激下 BV-2 细胞的活力,并下调 Panx1、P2X7R、NLRP3、ASC、Caspase-1 及 Iba-1 等蛋白的表达,提示其可能通过抑制 Panx1/P2X7R-NLRP3 通路的异常激活,发挥抗癫痫作用。此外,愈痫灵含药血清还降低了细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达,进一步说明其通过缓解神经炎症反应减轻小胶质细胞介导的炎性损伤。为验证其神经保护作用,我们利用 BV-2 条件培养基处理 HT-22 海马神经元细胞,发现 20% 愈痫灵含药血清能增强神经元细胞活力,减少细胞死亡,表明其对海马神经元细胞具有保护作用。综上所述,本研究结果不仅与已有文献中关于 Panx1 及神经炎症通路在癫痫中作用的结论相呼应,更进一步从实验层面证实,愈痫灵可能通过调节小胶质细胞活化及下游炎症信号,发挥抗癫痫与神经保护的双重作用。

当然,本研究亦存在若干局限:第一,未设计空

白血清毒性试验,未能排除高浓度血清本身对细胞的潜在影响;第二,对炎症因子等功能性指标的检测未设置浓度梯度,未能全面揭示量效关系;第三,缺乏通过基因敲减或抑制剂等手段对 Panx1/P2X7R-NLRP3 通路进行功能验证,机制论证有待深化;第四,部分结果描述缺乏定量数据支持,且免疫荧光实验未能充分证明目标蛋白在小胶质细胞中的共定位关系。这些不足为未来的研究指明了改进方向。

## 参考文献

- [1] PAUDEL Y N, ANGELOPOULOU E, PIPERI C, et al. From the molecular mechanism to pre-clinical results: Anti-epileptic effects of fingolimod[J]. *Current Neuropharmacology*, 2020, 18(11): 1126-1137.
- [2] DING D, ZHOU D, SANDER J W, et al. Epilepsy in China: Major progress in the past two decades[J]. *The Lancet Neurology*, 2021, 20(4): 316-326.
- [3] 魏 丽. 癫痫发病机制研究进展[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2012, 12(3): 313-315.
- [4] VEZZANI A, GRANATA T. Brain inflammation in epilepsy: Experimental and clinical evidence[J]. *Epilepsia*, 2005, 46 (11): 1724-1743.
- [5] RIAZI K, GALIC M A, PITTMAN Q J. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: Cytokines and brain excitability[J]. *Epilepsy Research*, 2010, 89(1): 34-42.
- [6] RIIKONEN R. Infantile spasms: Therapy and outcome[J]. *Journal of Child Neurology*, 2004, 19(6): 401-404.
- [7] ILLANES-GONZÁLEZ J, FLORES-MUÑOZ C, VITUREIRA N, et al. Pannexin 1 channels: A bridge between synaptic plasticity and learning and memory processes[J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2025, 174: 106173.
- [8] SHAN Y S, NI Y H, GAO Z W. Pannexin-1 channel regulates ATP release in epilepsy[J]. *Neurochemical Research*, 2020, 45(5): 965-971.
- [9] FRANCESCHINI A, CAPECE M, CHIOZZI P, et al. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein[J]. *The FASEB Journal*, 2015, 29(6): 2450-2461.
- [10] PELEGRIN P. P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: Partners in crime[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2021, 187: 114385.
- [11] POHLENTZ M S, MÜLLER P, CASES-CUNILLERA S, et al. Characterisation of NLRP3 pathway-related neuroinflammation in temporal lobe epilepsy[J]. *PLoS One*, 2022, 17(8): e0271995.
- [12] UMPIERRE A D, WU L J. How microglia sense and regulate neuronal activity[J]. *Glia*, 2021, 69(7): 1637-1653.
- [13] BORST K, DUMAS A A, PRINZ M. Microglia: Immune and non-immune functions[J]. *Immunity*, 2021, 54(10): 2194-2208.

- [14] 吴秉纯. 医学动物实验基础及基本技术方法[M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 2008: 202.
- [15] 张林, 钟艳, 赵静, 等. 王净净从虚、痰、瘀、毒论治难治性癫痫经验[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(8): 108-110.
- [16] 马丽. 毒性中药与以毒攻毒[J]. 现代中西医结合杂志, 2001, 10(23): 2324-2325.
- [17] 王一晰, 黄柏玮. 癫痫相关诱发机制及治疗方法的研究进展[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2024, 27(9): 1168-1172.
- [18] VISHWAKARMA S, SINGH S, SINGH T G. Pharmacological modulation of cytokines correlating neuroinflammatory cascades in epileptogenesis[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(2): 1437-1452.
- [19] BRUZZONE R, HORMUZDI S G, BARBE M T, et al. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(23): 13644-13649.
- [20] DVORANTCHIKOVA G, IVANOV D, PANCHIN Y, et al. Expression of pannexin family of proteins in the retina [J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(9): 2178-2182.
- [21] DVORANTCHIKOVA G, IVANOV D, PESTOVA A, et al. Molecular characterization of pannexins in the lens [J]. *Molecular Vision*, 2006, 12: 1417-1426.
- [22] RAY A, ZOIDL G, WAHLE P, et al. Pannexin expression in the cerebellum[J]. *Cerebellum*, 2006, 5(3): 189-192.
- [23] RAY A, ZOIDL G, WEICKERT S, et al. Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2005, 21(12): 3277-3290.
- [24] SÖHL G, MAXEINER S, WILLECKE K. Expression and functions of neuronal gap junctions[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, 6: 191-200.
- [25] SHESTOPALOV V I, PANCHIN Y. Pannexins and gap junction protein diversity[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(3): 376-394.
- [26] VOGT A, HORMUZDI S G, MONYER H. Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain[J]. *Molecular Brain Research*, 2005, 141(1): 113-120.
- [27] WEICKERT S, RAY A, ZOIDL G, et al. Expression of neural connexins and pannexin1 in the hippocampus and inferior olive: A quantitative approach[J]. *Molecular Brain Research*, 2005, 133(1): 102-109.
- [28] ZAPPALÀ A, CICERO D, SERAPIDE M F, et al. Expression of pannexin1 in the CNS of adult mouse: Cellular localization and effect of 4-aminopyridine-induced seizures[J]. *Neuroscience*, 2006, 141(1): 167-178.
- [29] ZOIDL G, PETRASCH-PARWEZ E, RAY A, et al. Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus[J]. *Neuroscience*, 2007, 146(1): 9-16.
- [30] SEO J H, DALAL M S, CALDERON F, et al. Myeloid Pannexin-1 mediates acute leukocyte infiltration and leads to worse outcomes after brain trauma[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 245.
- [31] WEILINGER N L, LOHMAN A W, RAKAI B D, et al. Metabotropic NMDA receptor signaling couples Src family kinases to pannexin-1 during excitotoxicity[J]. *Nature Neuroscience*, 2016, 19(3): 432-442.
- [32] WEILINGER N L, TANG P L, THOMPSON R J. Anoxia-induced NMDA receptor activation opens pannexin channels via Src family kinases[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2012, 32(36): 12579-12588.
- [33] SCEMES E, VELÍŠKOVÁ J. Exciting and not so exciting roles of pannexins[J]. *Neuroscience Letters*, 2019, 695: 25-31.
- [34] AQUILINO M S, WHYTE-FAGUNDES P, LUKEWICH M K, et al. Pannexin-1 deficiency decreases epileptic activity in mice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(20): 7510.
- [35] DI VIRGILIO F, BEN D D, SARTI A C, et al. The P2X7 receptor in infection and inflammation[J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 15-31.
- [36] JAYARAJ R L, RODRIGUEZ E A, WANG Y, et al. Outdoor ambient air pollution and neurodegenerative diseases: The neuroinflammation hypothesis[J]. *Current Environmental Health Reports*, 2017, 4(2): 166-179.
- [37] JIANG D Q, MA Y J, WANG Y, et al. Microglia activation induces oxidative injury and decreases SIRT3 expression in dopaminergic neuronal cells[J]. *Journal of Neural Transmission*, 2019, 126(5): 559-568.

(本文编辑 苏维)