

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.08.003

咪达唑仑对幼年小鼠惊厥性脑损伤的作用^{*}

施娟¹,姜树中²,王庆华³

(1. 江苏省南通市第六人民医院儿科 226011;2. 江苏省南通市第六人民医院内科 226011;
3. 南通大学实验动物中心,江苏南通 226009)

[摘要] **目的** 本研究通过阐述咪达唑仑对幼年小鼠惊厥性脑损伤的影响,为临床预防和治疗小儿惊厥性脑损伤提供一定的理论依据。**方法** 将 80 只 19 d 幼年小鼠随机分为正常对照组、生理盐水组、低剂量咪达唑仑组、中剂量咪达唑仑组、高剂量咪达唑仑组五组,每组 16 只,分别注射生理盐水或咪达唑仑后 20 min,腹腔注射罗哌卡因,观察惊厥发生分级,并记录惊厥出现时间和持续时间;利用脑立体定位仪进行电极植入,记录各组脑电图变化情况。提取惊厥后 24 h 生理盐水模型组和咪达唑仑低、高剂量组海马组织 RNA,采用 QPCR 检测神经营养因子 S100β 和 GFAP,观察咪达唑仑对幼鼠脑损伤的作用。**结果** 中、高剂量组与生理盐水组相比,小鼠惊厥发生率明显下降,低剂量组与生理盐水组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。小鼠脑电图显示:生理盐水对照组病理样的脑电波表现为尖波、棘波,多棘-慢复合波,波幅为 200~250 μV,通常持续 4 s 以上;低、中高剂量咪达唑仑组脑电异常波较生理盐水组逐渐减少,波幅亦减少,持续时间缩短。高剂量组 S100β 和 GFAP mRNA 表达明显低于生理盐水对照组($P<0.05$)。**结论** 咪达唑仑促使惊厥性脑损伤小鼠的脑电图异常波的减少,波幅减低,持续时间减少,降低脑损伤相关分子的表达,可能对小儿惊厥性脑损伤的治疗提供一定的帮助。

[关键词] 咪达唑仑;惊厥性脑损伤;罗哌卡因;脑电图;神经营养因子

[中图法分类号] Q189 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)08-1218-06

Effects of midazolam on convulsive brain injury in young mice^{*}

SHI Juan¹,JIANG Shuzhong²,WANG Qinghua³

(1. Department of Pediatrics;2. Department of Internal Medicine, Nantong Municipal Sixth People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226011, China; 3. Experimental Animal Center, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226009, China)

[Abstract] **Objective** To elaborate the effect of midazolam on convulsive brain injury in young mice to provide a certain theoretical basis for the clinical prevention and treatment of convulsive brain injury in children. **Methods** Eighty 19 d old young mice were randomly divided into the normal control group, normal saline group, low dose midazolam group, medium dose midazolam group, and high dose midazolam group, 16 cases in each group. At 20 min after the injection of normal saline or midazolam respectively, the intraperitoneal injection of ropivacaine was performed. The grade of convulsion was observed. The appearing time and persistent time of convulsion were recorded. The electroencephalogram (EEG) changes of each group were recorded by electrode implantation with stereotactic brain localizer. The hippocampal tissue RNA in the normal saline model group, midazolam low and high doses groups was extracted at 24 h after convulsion. Q-PCR was adopted to detect S100β and GFAP expressions. The effect of midazolam on the brain injury in young mice was observed. **Results** The occurrence rate of mice convulsion in the medium and high doses groups was significantly decreased compared with the normal saline control group, while there was no statistically significant difference between the low dose group and the normal saline control group($P>0.05$). The mice EEG showed that the pathological brainwaves in the normal saline control group were manifested by sharp wave, spike wave, multi-spike and slow complex wave with an amplitude of 200—250 μV, usually lasting for more than 4 s. Compared with the normal saline group, the EEG abnormal waves in the low, medium and high doses midazolam groups were gradually reduced, the wave amplitude was decreased and the persistent time was also shortened.

^{*} 基金项目:南通市卫生和计划生育委员会青年基金项目(WKZL2018071)。 作者简介:施娟(1977—),副主任医师,硕士,主要从事儿科临床和基础研究工作。

The S100 β and GFAP expression levels in the high dose group were significantly lower than those in the normal saline control group($P<0.05$). **Conclusion** Midazolam promotes the abnormal EEG waves to decrease, reduce the wave amplitude and persistent time in convulsive brain injury mice, as well as decrease the expression of the brain injury-associated molecules, which may provide a certain help for the treatment of pediatric convulsive brain injury.

[Key words] midazolam; convulsive brain injury; ropivacaine; electroencephalogram; neurotrophic factors

惊厥是小儿时期最常见的神经系统急症^[1],流行病学研究估计 4%~8% 儿童在 15 岁前有过惊厥发作,并且在第 1 次发作的儿童中,约 12% 表现为首次原因不明的惊厥发作^[2]。惊厥频繁发作或惊厥的持续状态(status convulsion, SC)容易导致惊厥性脑损伤,可以导致多器官功能障碍综合征等严重并发症,甚至危及患儿生命^[3]。目前,在临床上主要采用苯二氮卓类与抗癫痫药物(anti-epilepsy drugs, AEDs)控制及预防惊厥发作,但反复服用此类药物可能影响儿童的认知发育,内分泌功能及骨骼的发育^[4]。因此,寻找有效且安全的控制和预防惊厥发作的药物对于临床治疗小儿惊厥十分重要。

本研究选择了咪达唑仑这一抗惊厥药物作为研究对象,探索其对惊厥性脑损伤小鼠模型的作用,取得了一定的成果,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

幼年 ICR 小鼠购自南通大学实验动物中心;咪达唑仑购自江苏恩华药业股份有限公司,罗哌卡因购自广东华润顺峰药业有限公司,脑电图仪器购自上海泰益医疗仪器设备有限公司,4% 水合氯醛购自苏州睿捷生物科技有限公司,HiScript II Q RT SuperMix (+ gDNA wiper) (R223-01), AceQ qPCR SYBR Green Master Mix(Q111-02)从南京诺唯赞生物科技有限公司购买,Trizol, DEPC 水购自上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 惊厥小鼠模型制作

SPF 级 19 日龄的幼年 ICR 小鼠 80 只,分成 5 组($n=16$),即正常对照组、生理盐水组、低剂量咪达唑仑组、中剂量咪达唑仑组和高剂量咪达唑仑组^[4]。后 4 组小鼠分别用生理盐水(10 mL/kg),低(0.2 mg/kg)、中(0.5 mg/kg)、高剂量(1 mg/kg)咪达唑仑皮下注射,20 min 后腹腔内注射罗哌卡因(85.9 mg/kg)^[5],观察各组小鼠惊厥潜伏的时间和持续时间。

1.2.2 惊厥评判指标

小鼠惊厥表现为其兴奋性显著增高,活动能力增强,出现跳跃和奔跑次数增多,最终会因四肢的痉挛而导致不能保持体位平衡而出现踉跄、摔倒甚至伏地不起。惊厥症状持续时间:从首次出现惊厥症状,并

伴随肌张力降低开始,到惊厥状态消失,小鼠自主活动无碍为止。本实验中记录惊厥潜伏期时间为罗哌卡因注射完后开始记录,到小鼠初次出现惊厥症状所需要的时间^[6]。

1.2.3 惊厥分级评判指标(Racine 分级标准)

0 级:未观察到任何明显发作反应,小鼠表现正常;I 级:小鼠出现非自主的凝视、咀嚼、嘴和面部节律性抽动,点头动作频繁、面部肌肉痉挛出现节律性的眨眼、咀嚼、胡须抖动等;II 级:点头频繁或不断甩尾、并偶见搔抓动作或湿狗样的抖动,可见痉挛性症状出现;III 级:小鼠单侧前肢体阵挛性抖动或抽搐;IV 级:多个肢体出现抽动或强直,可见后肢站立型全身整体强直;V 级:全身强直抽搐,表现为站立和全身强直,并有下跌表现,失去平衡,无法站立,扶正,出现阵挛性发作^[7]。惊厥发作等级达到 IV~V 级,超过 30 min 惊厥症状消失后能恢复正常状态的小鼠为合格惊厥小鼠模型。纳入标准:小鼠惊厥程度达到 Racine 分类达到 IV~V 级,出现翻正不能,全身强直-阵挛性发作症状。惊厥结束以无明显可见抽搐动作,行动正常,翻正能力恢复。

1.2.4 小鼠脑电图植入及观察

各组小鼠,先用 4% 水合氯醛,根据体质量腹腔注射麻醉小鼠,然后随机选择了 3 个植入电极,接下来将其固定在脑立体定位仪上,用剃须刀片刮去小鼠头顶部的毛,医用碘酒擦拭消毒,沿头中线切开头皮,并向两侧剥离颞肌组织,暴露颅骨,碘酒擦拭颅骨表面后用酒精棉球脱碘,干燥后微孔电钻钻孔植入电极。参照立体图集,前卤后 3.0 mm,中线旁 3.0 mm 左右(在冠状缝与矢状缝交界处)各用钻出一个小孔,采用微型电钻植入不锈钢的螺丝电极(植入深度 2 mm),记录电极作为其中一个,另一为参数电极,连接电极并从颈背部皮肤中引出,在耳朵根部另接一根地线,3-0 线缝合头皮,并将所有铜线与皮肤缝合固定,植入电极的小鼠,每只小鼠补液 1 mL,术后注射青链霉素冲洗伤口抗感染,并注射丁胺卡那霉素,单笼饲养。脑电图记录:利用多道生物信号采集系统记录小鼠的脑电图,记录时间为 1 h。记录条件为:采集频率 800 Hz、通道模式生物电、扫描速度 250 ms/div、灵敏度 100 μ V、时间常数 0.2 s、滤波频率 30 Hz、导联方式关、低通滤波 15 Hz。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	序列(5'-3')	产物长度(bp)
GFAP	CTC CAG ATC CGA GAA ACC AGC CGC ATC TCC ACA GTC TTT A	90
S100β	GAG AGG GTG ACA AGC ACA AGC AGC GTC TCC ATC ACT TTG T	122

1.2.5 总 RNA 的提取

取出冻存于-80℃的海马组织,剔除多余组织,各个样品中分别加入 1 mL Trizol,用冰水混合物包裹后采用电动匀浆器打碎组织,将匀浆液转移到新的管中,管中置有 1.5 mL 的 RNA free EP,混匀震荡,于室温下静置 5 min;加入 200 μL 氯仿,通过振荡器混匀振荡,室温静置 5 min;通过 4℃冷冻离心机离心,12 000 r/min,15 min,将上层液相转移到新的 1.5 mL Eppendorf 离心管中;加入 500 μL 异丙醇,室温下静置 10 min,上、下颠倒充分混匀;12 000 r/min,4℃离心 10 min,弃上清液;75%乙醇加入 1 mL DEPC 水配置,4℃中,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;置于室温中干燥 RNA 8 min 左右,加入适量 DEPC 水,在 65℃水浴中加速 RNA 溶解,约 10 min。利用核酸测定仪测定所提取的 RNA 浓度,并记录 OD260 液及 OD280 的数值,评判 RNA 质量,舍弃不合格样品。

1.2.6 反转录

加入 RNA 模板 1.0 μg 与 Oligo (dT) primer 1.0 μL 于 EP 管中,加无 RNA 酶的水补足至 12 μL,先在 PCR 中 65℃处理 5 min。随后加入 RiboLock-TM Ribonuclease inhibitor (20 U/μL) 1.0 μL,5×Reaction Buffer 4.0 μL,10 mmol/L dNTP mix 2.0 μL,Revert M-MμLV Reverse Transcriptase (200 U/μL) 1.0 μL 于 EP 管中,用移液器吹打混匀,低速离心,在 PCR 上设置程序如下:42℃ 60 min,70℃ 10 min,4℃ -/-,反应结束后收取产物并置于-20℃备用。

1.2.7 Real-time PCR 反应

引物序列如表 1。反应体系为 Fast SYBR Green Master Mix 10 μL,灭菌双蒸水 7 μL,primer F 1 μL,primer R 1 μL,cDNA 1 μL。反应条件为:95℃预变性 4 min;95℃ 15 s,60℃ 20 s,72℃ 30 s 45 个循环,每个循环收集荧光在 72℃延伸阶段;反应完成后,分析产物的溶解曲线。每组做 3 个平行样本,每个样本重复 3 次,采用 2^{-ΔΔCT} 法进行相对定量分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠惊厥发生及持续时间

生理盐水组注射罗哌卡因后(159±19)s 出现持

续惊厥,持续时间(907±81)s,15 只小鼠都出现了持续惊厥症状,死亡小鼠 3 只;低剂量咪达唑仑组小鼠注射罗哌卡因后(177±42)s 后出现惊厥,持续时间为(352±66)s,其中 3 只小鼠未出现惊厥症状,死亡小鼠 2 只;中剂量咪达唑仑组小鼠注射罗哌卡因后(348±83)s 后出现惊厥,持续时间为(246±43)s,其中 6 只小鼠未发生惊厥,未见死亡个体;高剂量咪达唑仑组小鼠注射罗哌卡因后(435±94)s 后出现惊厥,持续时间为(257±38)s,其中 12 只小鼠未发生惊厥,未见死亡个体。中、高剂量咪达唑仑组惊厥发生时间及持续时间与生理盐水组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

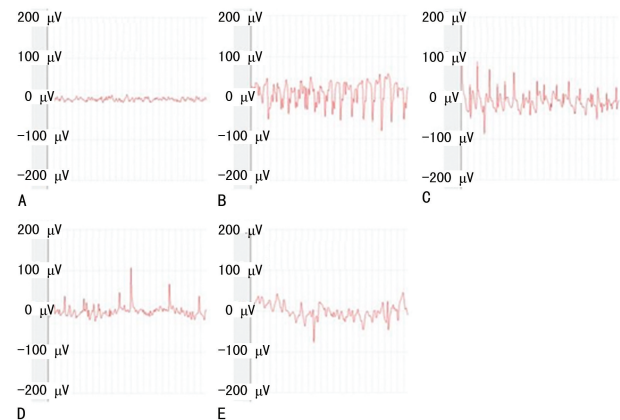
2.2 小鼠惊厥性脑损伤脑电图变化情况

正常对照组小鼠脑电图主要由 α 波、β 波构成,也会散在分布少量的 θ 波,孤立棘波和尖波也会偶尔出现,但未观察到明显病理样波,主要频率范围是 8~12 Hz,波幅范围在 20~50 μV(图 1A)。生理盐水组注射罗哌卡因后病理样的脑电波表现为尖波、棘波、棘-慢复合波^[8],波幅为 200~250 μV,频率范围为 2~4 Hz,持续时间通常持续 4 s 以上(图 1B);低剂量咪达唑仑组小鼠注射罗哌卡因后,I 级发作时出现异常脑电波,以单个尖波、棘波或单个棘-慢复合波为主,频率为 1~2 Hz,波幅为 70~130 μV,Ⅳ、Ⅴ级发作时主要以多个棘波、尖波和棘-慢复合波为主,频率为 2~3 Hz,波幅为 100~180 μV,持续时间为 2~3 s(图 1C)。中剂量咪达唑仑组小鼠注射罗哌卡因后,I 级发作时出现脑电异常波,以单个尖波、棘-慢复合波为主,频率为 1~2 Hz,波幅为 60~120 μV;Ⅳ、Ⅴ级发作时主要以短暂的棘波、尖波和棘-慢复合波为主(图 1D),频率为 2~3 Hz,波幅为 60~130 μV,持续时间为 1~2 s。高剂量咪达唑仑组小鼠注射罗哌卡因后,I 级发作时偶见异常脑电波,以单个尖波、棘波为主,频率为 1~2 Hz,波幅为 60~130 μV,Ⅳ、Ⅴ级发作时主要以短暂的棘波、尖波为主(图 1E),频率为 2~3 Hz,波幅为 100~150 μV,持续时间为 1~2 s。

2.3 小鼠惊厥Ⅴ级发生情况

注射罗哌卡因后,生理盐水组Ⅴ级发生 13 只,Ⅴ级发生率为 86.67%;低剂量咪达唑仑组Ⅴ级发生 10 只,Ⅴ级发生率为 76.92%;中剂量咪达唑仑组Ⅴ级发生 4 只,Ⅴ级发生率为 40.00%;高剂量咪达唑仑组Ⅴ级发生 1 只,Ⅴ级发生率为 25.00%,中剂量咪达唑仑组和高剂量咪达唑仑组与生理盐水组相比,差异有统

计学意义($P<0.05$)。见表 2。



A: 正常对照组; B: 生理盐水组; C: 咪达唑仑低剂量组; D: 咪达唑仑中剂量组; E: 咪达唑仑高剂量组。

图 1 咪达唑仑对罗哌卡因诱导小鼠惊厥脑电图的影响

表 3 咪达唑仑对罗哌卡因致惊厥作用的影响

组别	Ⅳ级数(只)	V级数(只)	V级比率(%)
生理盐水组	2	13	86.67
低剂量组	3	10	76.92
中剂量组	6	4	40.00*
高剂量组	3	1	25.00*

*: $P<0.05$, 与生理盐水组比较。

2.4 惊厥小鼠海马组织中相关分子表达情况

注射罗哌卡因后, RT-PCR 结果显示, 高剂量咪达唑仑组 S100 β 和 GFAP 表达量水平较生理盐水组明显下降($P<0.05$), 见表 4。

表 4 S100 β 及 GFAP 在海马组织中的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	S100 β	GFAP
生理盐水组	1.033 4 \pm 0.234 2	1.136 8 \pm 0.342 6
低剂量组	0.953 8 \pm 0.158 8	0.976 7 \pm 0.144 2
高剂量组	0.384 6 \pm 0.149 6*	0.767 4 \pm 0.139 5*

*: $P<0.05$, 与生理盐水组比较。

3 讨 论

随着儿科手术中局部麻醉临床应用的增加, 由于婴幼儿独特的生理解剖学特点, 其抵抗局部麻醉药物的全身性毒性(local anesthetics systematic toxicity, LAST)的能力较弱, 造成一系列严重的并发症, 主要是对中枢神经系统毒性, 也偶尔会在之后发生心血管毒性。已有文献 Meta 分析表明中枢神经毒性在 LAST 病例中发生率往往达到 45%, 临床中报道也表明婴幼儿中中枢神经系统毒性导致惊厥反复发作也较常见^[8-9]。

虽然罗哌卡因对幼儿心肌细胞钙离子和钠离子通道亲和低, 运动神经阻滞作用较弱, 使其中枢神经系统和心血管系统毒性相对较低^[10], 但临床实践中依然有很多罗哌卡因中毒病例的报道。实践中很难对婴儿惊厥脑损伤的情况进行评估, 为此笔者借助动

物实验来探讨脑损伤情况。惊厥模型的造模方式较多, 但惊厥脑损伤的模型相对较少, 儿科局部麻醉药物可以导致全身性毒性作用, 尤其是中枢神经毒性作用及导致脑损伤, 罗哌卡因是较好的选择, 故本实验选择罗哌卡因致小鼠惊厥脑损伤制作模型; 现有报道小鼠与人类婴幼儿基因同源性更高, 是研究婴幼儿惊厥和癫痫生理过程和机制的重要组成部分, 也是生物学重复的必要手段。大鼠体型较大, 饲养成本高, 对实验人员危害大, 而小鼠体型小, 日常维持成本相对较低, 且温顺易操作, 可以进行电极植入, 与大鼠操作不同的是小鼠电极植入必须利用体视显微镜, 并结合脑立体定位仪操作, 以确保电极植入位置正确, 故选择小鼠造婴幼儿惊厥模型效果更佳。

咪达唑仑属于水溶性苯二氮卓类药物, 其半衰期短, 广泛应用予临床麻醉过程中^[7]。与其他抗惊厥药相比而言, 药代动力学和药理作用具有独特性, 其苯唑环溶于水打开, pH 为酸性, 在口鼻黏膜、肌肉注射等吸收良好, 是唯一的水溶性苯二氮卓类化合物, 遇到生理性 pH 值时环状结构就关闭而变为脂溶性, 能够快速通过血脑屏障进入中枢神经系统, 从而具备临床上起效迅速的特点, 起效时间为 20 min^[11], 故本实验给予注射咪达唑仑 20 min 后再给予药物诱发惊厥。一定剂量罗哌卡因可致中枢神经毒性且导致脑损伤的发生率高, 并且起效迅速, 可以先给予一定量的咪达唑仑来降低兴奋性, 从而减轻罗哌卡因的中毒性, 本实验研究表明, 咪达唑仑能够预先有效抑制罗哌卡因所致的小鼠惊厥发生率和小鼠病死率, 随着剂量的增加明显延缓了惊厥发生的时间, 为去除惊厥的诱因争得时间, 亦明显缩短了惊厥持续时间, 降低脑电异常波出现频率和波幅及持续的时间, 证明了咪达唑仑对惊厥脑损伤的有效保护性。

现有报道脑电图出现棘波、尖波、棘慢波、高幅慢波, 呈对称性、同步性或局限性等改变, 且这些脑电图异常波持续存在, 提示以后转为癫痫等后遗症的危险性增大, 提示一定程度的脑损伤^[12]。脑电图改变与脑损伤有一定关系, 由脑电图改变可以部分地反映脑的损伤, 认为脑电图改变与惊厥脑损伤有一定关系。故本实验结合脑电图的分析来调整咪达唑仑和罗哌卡因的用量, 减少惊厥持续的时间, 减少癫痫等并发症的发生, 对惊厥脑损伤进行评估。

综上, 一定剂量罗哌卡因可致中枢神经毒性, 且导致脑损伤的发生率较高, 咪达唑仑可以拮抗罗哌卡因诱导惊厥的作用, 随着剂量的增加惊厥发生的时间明显延缓, 惊厥持续时间缩短, 脑电图的异常减轻波。关于小鼠惊厥模型较多, 但惊厥脑损伤模型较少, 本实验先用咪达唑仑干预, 再给予罗哌卡因诱发惊厥, 并结合脑电图进行评估, 此联合用药实验并联合脑电图评判小鼠惊厥脑损伤模型在临床实验研究中少见。由此实验的成功性可以证明此种小鼠惊厥造模方式

是可行的。

已有研究证实,海马是脑内最易诱发癫痫、惊厥活动的神经结构,大脑的海马区内环境理化特性易于被诱发紊乱,并可能引起一系列惊厥样放电,该种异常的电活动能够扩散到其他脑区而诱发惊厥发作^[13]。本研究采用罗哌卡因建立模拟临床麻醉剂不良反应导致的婴幼儿惊厥过程,咪达唑仑被认为对此过程具有保护作用。S100 β 蛋白的氨基酸序列高度保守,主要位于中枢神经系统的星形细胞、少突神经胶质细胞及周围神经系统的雪旺细胞,在神经系统属于特异性蛋白^[14]。S100 β 是一类相对分子质量较小的钙结合蛋白,具有一系列重要的神经生物学功能,具有广泛的生物活性,生理状态下是一种神经营养因子,到达细胞外通过旁分泌和自分泌方式,作用神经胶质细胞和神经元,神经胶质细胞的生长、繁殖、分化受到影响,钙稳定性得到维持,促进脑的发育^[15]。S100 β 对神经元的生长和维持均起到营养和支持作用^[16],对不同时期和不同区域神经细胞发挥协调性和竞争性的调节作用,脑脊液和血液中在非神经系统疾病中一般不易测出或值很低^[17-18]。在脑损伤反应中 S100 β 表达明显增加,且作为脑损伤的生化标志物、敏感标志物,在脑损伤后有一定的时间变化规律,而且与脑损伤程度及预后有紧密联系,稳定性又明显高出其他神经生化指标^[19-20]。此外 S100 β 蛋白作为神经生化标志物,在中枢神经系统的发育、成熟、衰老及病理条件的研究中日益受到重视^[21]。小鼠持续惊厥后是否会引起脑损伤,通过监测脑 S100 β 的水平及升高降低程度来评估病情及预后。通过咪达唑仑给药后,检测 S100 β 的变化情况来阐述咪达唑仑的脑损伤保护机制^[21]。本实验研究表明惊厥持续发作后,S100 β 明显增高,高剂量的咪达唑仑能很快且明显地降低 S100 β 蛋白水平,提示高剂量咪达唑仑能减轻惊厥脑损伤的程度,对脑有保护作用,而低剂量咪达唑仑对降低 S100 β 效果不明显,故提示对脑保护作用不明显。

GFAP 在星形细胞中是主要的单体中间丝蛋白,在中枢神经系统中属于特有的细胞骨架性蛋白^[22],在星形细胞中属于标志性蛋白^[23],各种中枢神经系统损伤均可引起星形胶质细胞反应,表现为 GFAP 的聚合物分解为可溶性胶质纤维酸性蛋白释放到周围组织^[24],使血清中 GFAP 蛋白水平增高,GFAP 可以作为中枢神经系统损伤程度和进展及预后的标志物。GFAP 是有丝分裂过程中微丝复合体重要的调控蛋白,GFAP 和磷酸化的 GFAP 通常分布在细胞分裂间隙,并均匀分布在子细胞中,进而调控神经细胞的增殖和凋亡。同时,GFAP 还调控神经髓鞘的形成和降解过程。因此,GFAP 被认为是脑损伤后星形细胞受损的特征性蛋白^[25],并且有报道证实了 GFAP 可以反映神经细胞受损的程度和范围,损伤越重,脑组织破坏越多,越来越多的实验证明 GFAP 可以作为脑损

伤评价最为可靠的指标^[26]。本研究发现咪达唑仑能够有效降低 GFAP 的表达,抵抗罗哌卡因的致惊厥作用,通过调节咪达唑仑的量,发现低剂量的咪达唑仑量不足抵抗罗哌卡因的中枢毒性,GFAP 明显高出了正常范围,且下降趋势不明显,而高剂量的干预明显降低了 GFAP 水平,且下降的速度比较明显,结合 GFAP 指标给予调整咪达唑仑的预治疗量大大减轻了脑损伤的程度,尽可能避免脑损伤的发生,使惊厥脑损伤的后遗症减少,为临床上治疗提供了更好的选择机会,消除了患儿家长的担忧。

综上所述,本研究联合 S100 β 和 GFAP 指标及脑电图的分析,及时调整咪达唑仑的预治疗量,低剂量咪达唑仑预治疗时,S100 β 、GFAP 指标同时明显升高,且一直处于较高水平,结合脑电图中癫痫波,可见预治疗效果不明显,给予调整咪达唑仑剂量;高剂量时,小鼠脑电图癫痫波明显减少,S100 β 和 GFAP 指标同时明显降低,提示脑损伤得到明显好转,可见这三项指标变化受到咪达唑仑预先的作用,使脑损伤发生尽可能降到最轻的程度,尽可能地避免。临床上单纯性惊厥不可避免,但可尽量避免严重惊厥和持续惊厥所致的脑损伤。故本实验给予咪达唑仑预治疗,通过 S100 β 、GFAP 的检测,结合脑电图的比较分析,来预测脑损伤的预后是有用的,但临床上仍需进一步研究,对临床应用的有效性和实用性进行评估,以更好地预防和治疗惊厥脑损伤。

参考文献

- [1] 曹春姘,孙桂绒. 小儿惊厥 386 例分析[J]. 基层医学论坛,2013,17(8):1078-1079.
- [2] 邓瑜琼,罗敏,方亮,等. 小儿惊厥 30 例临床分析[J]. 江西医药,2015,16(7):464-465.
- [3] 霍淑芬. 小儿惊厥 100 例临床分析[J]. 吉林医学,2013,22(8):4082-4083.
- [4] 李文刚,冯丽芳. 小儿惊厥 1 000 例病因分析[J]. 临床荟萃,2012,27(15):1333-1334.
- [5] WANG X C, LEI Y, WANG L, et al. diffusion kurtosis imaging reflects glial fibrillary acidic protein (GFAP), Topo II α , and O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression in astrocytomas[J]. Med Sci Monit, 2018, 6 (24):8822-8830.
- [6] WANG X, SHU Q, NI Y, et al. CRISPR-mediated SOX9 knockout inhibits GFAP expression in retinal glial (Müller) cells[J]. Neuroreport, 2018, 29(17):1504-1508.
- [7] KARPOVA M N, KUZNETZOVA L V, KLISHINA N Y, et al. Gaba and its receptors in pathogenesis of epilepsy[J]. Usp Fiziol Nauk,

- 2015,46(3):46-59.
- [8] BREITLING B, BRUNKHORST R, VERHOF F M, et al. Post-mortem serum concentrations of GFAP correlate with agony time but do not indicate a primary cerebral cause of death[J]. PLoS One, 2018, 13(10):e0205323.
- [9] DE LANEROLLE N C, LEE T S, SPENCER D D, et al. Astrocytes and epilepsy[J]. Neurotherapeutics, 2010, 7(4):424-438.
- [10] TENNAKOON A H, IZAWA T, WIJESUNDE RA K K, et al. Immunohistochemical characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing cells in a rat liver cirrhosis model induced by repeated injections of thioacetamide (TAA)[J]. Exp Toxicol Pathol, 2015, 67(1):53-63.
- [11] SCHIPPER S, AALBERS M W, RIJKERS K, et al. Tonic GABA receptors as potential target for the treatment of temporal lobe epilepsy[J]. Mol Neurobiol, 2015, 53(8):5252-5265.
- [12] LAPA A T, POSTAL M, SINICATO N A, et al. S100 β is associated with cognitive impairment in childhood-onset systemic lupus erythematosus patients[J]. Lupus, 2017, 26(5):478-483.
- [13] NORIS-GARCOA E, ARCE S, NARDIN P, et al. Peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor and S100B in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2018, 27(13):2041-2049.
- [14] ZHOU S, ZHU W, ZHANG Y, et al. S100B promotes microglia M1 polarization and migration to aggravate cerebral ischemia[J]. Inflamm Res, 2018, 67(11-12):937-949.
- [15] DU W, LI H, SUN J, et al. The prognostic value of serum neuron specific enolase (NSE) and S100B level in patients of acute spinal cord injury[J]. Med Sci Monit, 2018, 24:4510-4515.
- [16] WAGNER N B, FORSCHNER A, LEITER U, et al. S100B and LDH as early prognostic markers for response and overall survival in melanoma patients treated with anti-PD-1 or combined anti-PD-1 plus anti-CTLA-4 antibodies[J]. Br J Cancer, 2018, 119(3):339-346.
- [17] HE X, WEN L J, CUI C, et al. The significance of S100 β protein on postoperative cognitive dysfunction in patients who underwent single valve replacement surgery under general anesthesia[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(9):2192-2198.
- [18] CHARMSAZ S, HUGHES É, BANE F T, et al. S100 β as a serum marker in endocrine resistant breast cancer[J]. BMC Med, 2017, 15(1):79.
- [19] KANG J Q, BARNES G. A common susceptibility factor of both autism and epilepsy: functional deficiency of GABA A receptors[J]. J Autism Dev Disord, 2013, 43(1):68-79.
- [20] CHEN L, HU X, WU H, et al. Over-expression of S100B protein as a serum marker of brain metastasis in non-small cell lung cancer and its prognostic value[J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(3):427-432.
- [21] CAGATAY KAYA B, KARADAG H, ONER O, et al. Serum S100B protein levels in patients with panic disorder: effect of treatment with selective serotonin reuptake inhibitors[J]. Psychiatry Investig, 2015, 12(2):260-262.
- [22] KIM B, KIM S, JIN M S, et al. Crystal structure of the human glial fibrillary acidic protein 1B domain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4):2899-2905.
- [23] KUMAR P, GODBOLE N M, CHATURVEDI C P, et al. Mechanisms involved in epigenetic down-regulation of Gfap under maternal hypothyroidism[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 502(3):375-381.
- [24] HOL E M, CAPETANAKI Y. type iii intermediate filaments desmin, glial fibrillary acidic protein (gfap), vimentin, and peripherin[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9(12):a021642.
- [25] LONG Y, LIANG J, XU H, et al. Autoimmune glial fibrillary acidic protein astrocytopathy in Chinese patients: a retrospective study[J]. Eur J Neurol, 2018, 25(3):477-483.
- [26] LEE S H, NAM T S, KIM K H, et al. Aggregation-prone GFAP mutation in Alexander disease validated using a zebrafish model[J]. BMC Neurol, 2017, 17(1):175.