文章编号:1000-5404(2010)18-1981-05

论著

常用抗惊厥治疗方案对新生鼠脑发育的影响

徐晓科,蔡方成,宋 艳,李思秀 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院神经电生理中心)

【摘要】 **目的** 探讨临床常用的新生儿惊厥治疗方案中单用尤其联合使用传统抗惊厥药物对新生鼠脑发育的影响。**方法** 以临床剂量换算大鼠用药剂量,新生7 d(P7)大鼠120只分为苯巴比妥(phenobarbital,PB)、地西泮(diazepam,DZP)、苯妥英(phenytoin,PHT)、苯巴比妥联合地西泮(PB+DZP)、苯巴比妥联合苯妥英(PB+PHT)和正常对照(给予等量生理盐水)共6组,每组各20只。分别进行行为学(每组10只)及组织学观测(每组10只)。给药后24 h(P8)检测急性期脑损伤:ELISA法测定血清神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase,NSE)含量,免疫组化检测Bax、Bcl-2蛋白表达;原位末端标记法(TUNEL)检测凋亡细胞。P24行Morris水迷宫实验,HE、尼氏染色观察病理改变。**结果** PB、PHT、PB+DZP、PB+PHT组血清NSE浓度较正常对照组显著增高,分别高出52.48%、67.02%、152.48%和175.53%($P<0.01$);PB+DZP和PB+PHT组分别高出PB单药65.58%和80.20%($P<0.01$)。PB+PHT组Bcl-2蛋白表达较正常对照组显著降低($P<0.05$),各用药组Bax蛋白的表达显著强于正常对照组($P<0.05$);PB、DZP、PHT组海马下托TUNEL染色阳性细胞数较正常对照组(14.86±5.40)分别增加4.74倍、3.27倍、5.44倍($P<0.01$);PB+DZP和PB+PHT组分别高出PB组1.31倍和1.47倍($P<0.01$)。Morris水迷宫实验,单药组PB、DZP组和正常对照组间差异无统计学差异($P>0.05$),PHT组仅穿越平台的次数较正常对照组少,但其寻台潜伏期与对照组差异无显著性;联合用药组平均寻台潜伏期较正常对照组显著延长($P<0.01$),且穿越平台次数较正常对照组减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。P30幼鼠尼氏体染色400倍光镜下海马下托部神经元计数,与正常对照组(82.80±14.44)比较,PHT组、PB+DZP组、PB+PHT组的神经细胞数量分别减少22.6%、23.8%、31.3%($P<0.01$)。**结论** 单用PB、DZP、PHT能引起不同程度的急性期脑损伤,其脑损伤随3周生长发育得到恢复;PB+DZP、PB+PHT联合用药,其脑损伤更为严重,对发育脑造成长期的学习记忆损害。

【关键词】 抗惊厥药;临床方案;脑损伤;动物,新生;大鼠
【中图法分类号】 R720.597;R322.81;R339.3 【文献标志码】 A

Coventional anticonvulsant regimens induce brain damage in newborn rats

Xu Xiaoke, Cai Fangcheng, Song Yan, Li Sixiu (Center of Neurological Electrophysiology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of conventional treatment, especially with multidrug, for neonatal seizure on rat brain development. **Methods** A total of 120 7-day-old rats were divided into 6 treatment groups ($n=20$). Each group was treated with following conventional seizure drugs at a dose determined according to clinical neonatal baby doses, Phenobarbital (PB), Diazepam (DZP), Phenytoin (PHT), Phenobarbital in combination with Diazepam (PB+DZP), Phenobarbital in combination with Phenytoin (PB+PHT) or normal saline respectively by intraperitoneal injection (i.p). In 24 h later, plasma neuron-specific enolase (NSE) was determined by ELISA. Expression levels of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 in the brain neurocytes was detected by immunohistochemistry. Neuronal apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL). The effects of anticonvulsant drugs on cognitive function were assessed by Morris water maze. Histological changes of brain were observed by HE and Nissl staining. **Results** The concentration of plasma NSE exposed to PB, PHT, PB+DZP and PB+PHT was significantly increased by 52.48%, 67.02%, 152.48% and 175.53% respectively compared with controls [(0.282±0.1340) ng/L] ($P<0.01$), and the NSE exposed to PB+DZP and PB+PHT significantly was increased by 65.58% and 80.20% respectively compared with PB group ($P<0.01$). The expression of Bax protein was significantly elevated in all treatment groups compared with controls ($P<0.05$). But the expression Bcl-2 protein was significantly decreased in the PB+PHT group compared to control ($P<0.05$). While the number of TUNEL positive cells in the subicular complex exposed to PB, DZP and PHT was significantly in-

【通信作者】 蔡方成,电话:(023)63622544,E-mail:caifangc@126.com

creased by 4.74-fold, 3.27-fold and 5.44-fold respectively compared with control group ($P<0.01$), moreover, exposure to PB + DZP and PB + PHT were significantly increased by 1.31-fold and 1.47-fold compared with PB group ($P<0.01$). The rats treated with PB + DZP and PB + PHT always performed worse than controls in Morris water maze. Significant decrease in the number of neurons were observed in subicular complex of rats at postnatal day 30 exposed to PHT, PB + DZP and PB + PHT compared with controls. **Conclusion** PB, DZP and PHT treatment for neonatal seizure can cause acute brain damage. The brain damage will get partly recovered in 3 weeks later, and will not cause cognitive impairment. However, PB + DZP and PB + PHT administration result in more sever brain damage, and even persistent cognitive impairment in neonatal rats.

[Key words] anticonvulsants; clinical protocols; brain injuries; animals, newborn; rats

Corresponding author: Cai Fangcheng, Tel: 86-23-63622544, E-mail: caifangc@126.com

新生儿期是惊厥发生的高风险时期,据美国报道新生儿惊厥发生率为1.8‰~3.5‰,早产儿则更高[1]。临床及动物研究[2]均已证实,严重或反复地惊厥发作皆会导致惊厥性脑损伤,大部分专家主张对新生儿惊厥应积极药物治疗。然而,各国迄今仍缺乏足够循证依据的新生儿惊厥诊疗指南[1,2],但通过长期的临床实践经验,大家采用的抢救方案却基本一致。目前用于新生儿惊厥的一线药物仍是苯巴比妥(phenobarbital,PB)、地西泮(diazepam,DZP)、苯妥英钠,其中PB是最常用药物[3,4]。近年Bittigau等[5]的研究表明:PB、苯妥英(phenytoin,PHT)、DZP等临床一线抗新生儿惊厥药物,临床用药剂量就可能诱导新生鼠脑细胞过度凋亡。但是,目前尚未从临床新生儿惊厥的治疗方案为出发点来探讨PB联合其他药物会对发育脑产生何种影响,亦未探索这些药物对学习记忆的长期影响。为此,我们采用健康新生7 d(P7)大鼠,对当前治疗新生儿惊厥常用的止惊药进行模拟新生儿临床用药方案的实验研究,以PB、DZP和PHT单药为对照,重点观察PB+DZP与PB+PHT联合用药对新生大鼠脑发育的不同影响,以期为新生儿惊厥诊疗指南的确立提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 清洁级健康Wistar大鼠由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。新生7 d(P7)大鼠120只分为PB、DZP、PHT、PB+DZP、PB+PHT和正常对照共6组,每组20只,分别进行行为学(每组10只)及组织学观测(每组10只)。正常对照组给予等量生理盐水。

1.1.2 抗惊厥药物剂量确认 PB、PHT及DZP治疗新生儿惊厥的临床负荷剂量分别是15~20、20、0.3~0.5 mg/kg,重复2~4次[3,4]。依据人与大鼠体表面积换算公式[6]及文献[5],最终确定的剂量分别是PB:62.5,DZP:12.5 mg/kg,PHT:100 mg/kg,一次性腹腔注射给药,分别相当于临床10、2、16 mg/kg。依据PB及PHT在大鼠体内的代谢半衰期[7],各取8只P7新生大鼠分别检测注射PB后12、24 h PB所达到的血药浓度,及注射PHT后1、4 h所达到的血药浓度;每个时间点各4只、雌雄各半,心脏取200~300 μl血液并分离血清,荧光偏振免疫测量PB与PHT的血药浓度。依据PB在大鼠体内的代谢半衰期为9~20 h[5],确定PB注射4 h后给予被联合药物。

1.1.3 主要试剂 原位凋亡检测试剂盒购自美国Roche公司。小鼠抗大鼠Bax单抗、小鼠抗大鼠Bcl-2单抗、SABC免疫组化试剂盒及DAB显色剂均购自北京中山生物技术有限公司。神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase,NSE)购自北京尚柏生物医学技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 组织病理学观察 用药24 h后(P8),10%水合氯醛3 ml/kg麻醉新生大鼠,心脏取血,继以生理盐水和4%多聚甲醛先后组织灌流固定。断头取脑,采集自额极向后3~5 mm,位于视交叉和乳头体间,含海马结构及颞叶皮层的脑组织标本,4%多聚甲醛固定24 h,脱水、石蜡包埋、选择5 μm厚度冠状面连续切片,分别行HE、尼氏染色,光镜下观察脑组织形态。将收集的血标本分离血清(所有溶血标本弃之),检测其NSE含量。

1.2.2 双抗夹心法测定血清NSE含量 将1.2.1中收集的血清,严格按NSE的ELISA检测试剂盒说明操作,检测NSE含量。

1.2.3 免疫组化检测凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2的表达 严格按试剂盒说明操作,取1.2.1连续切片中的脑片染色,细胞质中有棕黄色颗粒者为Bax、Bcl-2阳性细胞。分别在海马各区固定部位取5个视野(40×10),IPP软件分析平均光密度值。

1.2.4 原位TUNEL法检测细胞凋亡 严格按试剂盒操作说明,选择1.2.1中的脑片,细胞核显示深棕黄色者为TUNEL阳性细胞。

1.2.5 各组大鼠学习记忆能力测试 各组P7新生大鼠给药后,分配母鼠喂养,每窝7只,直至21 d断奶并饲养于标准饲养笼内。

Morris水迷宫测试空间记忆能力:①定位航行实验:检测获取学习记忆的能力。P23时,让大鼠自由游泳2 min,从第2天起、即P24,每天上午训练4次,每次从不同点入水,记录大鼠寻找并爬上平台所需时间(即寻台潜伏期),连续5 d。如果大鼠在60 s内未找到平台,潜伏期记为60 s。②空间探索实验:测

量保持空间位置记忆的能力。定位航行实验结束后，于次日上午（P29）撤除平台，统一选择第 3 象限池壁中点作为入水点，将大鼠面向池壁放入水中，记录在 60 s 内跨过该象限平台相应位置的次数。

1.2.6　远期病理学观察　　Morris 水迷宫测试完成后，次日（P30）按照 1.2.1 的方法取幼鼠脑组织，并行 HE、尼氏染色，光镜下观察脑组织形态。尼氏染色海马下托复合体神经元计数。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 16.0 统计软件，多组间的比较采用单因素方差分析，水迷宫数据采用重复测量方差分析。

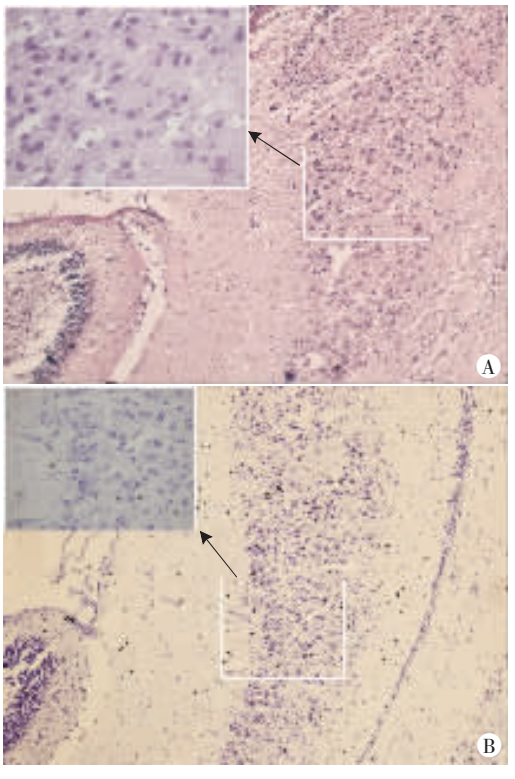
2　结果

2.1　各组所达到的血药浓度水平

P7 新生鼠一次性注射 PB 62.5 mg/kg 后 12 h，血药浓度为 51.8 ~ 61.4（55.9 ± 4.2）μg/ml，注射后 24 h，血药浓度为 35.0 ~ 47.3（43.7 ± 5.9）μg/ml；PHT 100 mg/kg 一次性腹腔注射后 1 h，血药浓度为 25.4 ~ 28.1（27.0 ± 1.3）μg/ml，4 h 后血药浓度为 29.2 ~ 32.5（30.1 ± 1.7）μg/ml。均达到并超过了临床治疗癫痫时的血药浓度。

2.2　病理改变

P7 新生鼠给药 24 h 后，HE 染色可见各用药组海马下托部变性、坏死的神经细胞，联合用药组病变更加严重：大量神经元固缩、变性、坏死，散在正常神经细胞（图 1A），正常对照组则未见明显异常。同 HE 染色所见一致，尼氏染色该部位亦可见神经元尼氏小体数量减少，部分神经元尼氏小体甚至溶解、消失；联合用药组病变明显重于单药组（图 1B）。



A：HE 染色；B：尼氏染色

图 1　PB + PHT 组 P8 新生鼠 SB 区病理学观察　（×100）

2.3　给药 24 h 后 NSE 含量

无论单药或联合用药，均引起急性期血清 NSE 显著增高。PHT 和 PB 单药一次注射后，新生鼠血清 NSE 分别高出正常对照 67.02% 和 52.48%（$P < 0.05$）；DZP 组与对照组间无显著性差异。联合用药致血清 NSE 的增高远较单药突出，PB + DZP 和 PB + PHT 组分别高出正常对照 152.48% 和 175.53%（$P < 0.01$）。而且，联合用药组较其中任何单药更明显地使血清 NSE 增高，PB + DZP 和 PB + PHT 组分别高出 PB 单药 65.58% 和 80.20%（$P < 0.01$）。PB + PHT 组引起的 NSE 增高是 PB 单药组增高的 1.81 倍，是 PHT 单药的 1.65 倍；PB + DZP 的 NSE 增高是 PB 单药组增高的 1.66 倍，是 DZP 单药的 1.89 倍。结果表明，一次性使用 PB、PHT 止惊药物，可能导致新生鼠脑内神经元的坏死；而联合用药则成倍的加重此坏死性损伤。

2.4　给药 24 h 后 TUNEL 染色原位检测细胞凋亡

与 Bax 及 Bax/Bcl-2 比值的变化一致，用药各组海马下托部凋亡细胞均明显增高（表 1）；联合用药组过度凋亡现象更为严重，海马下托部可见呈片状分布的凋亡细胞带（图 2）。

2.5　海马区 Bax 以及 Bcl-2 蛋白表达

给药后 24 h（P8），除 PB + PHT 组 Bcl-2 蛋白表达较正常对照组显著降低外，其余各组 Bcl-2 表达与正常对照组均无明显差异（$P > 0.05$）。各用药组海马区 Bax 蛋白表达和 Bax/Bcl-2 比值均较正常对照组显著增高，联合用药组增高更突出（$P < 0.01$，$P < 0.05$）。两联合用药组海马区 Bax 蛋白表达同样明显高于 PB、PHT 和 DZP 等单药组（$P < 0.01$）。见表 1。



A：PB + DZP 组；B：正常对照组

图 2　TUNEL 法检测给药 24 h 后新生鼠海马下托区及丘脑细胞凋亡　（×40）

表1 给药后24 h各组海马Bax及bcl-2蛋白表达的平均光密度值及TUNEL阳性细胞计数（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	海马区平均光密度值			TUNEL阳性细胞数（个/200倍视野）
	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2	
正常对照组	0.09±0.02	0.13±0.01	0.70	14.86±5.40
PB组	0.13±0.02[a]	0.12±0.01	1.05	70.43±20.65[a]
DZP组	0.12±0.02[b]	0.13±0.01	0.89	48.57±10.88[a]
PHT组	0.13±0.02[a]	0.12±0.02	1.10	80.86±14.96[a]
PB+DZP组	0.17±0.02[ac]	0.12±0.02	1.45	92.14±15.01[a]
PB+PHT组	0.18±0.04[ac]	0.11±0.01[b]	1.62	103.86±27.96[a]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与正常对照组比较；c：$P<0.01$，与PB组比较

2.6 远期病理学观察

HE染色（P30）可见联合用药组颞叶皮层出现多数退行性变的红色神经元：其细胞质红色深染、胞核边界不清（图3）；尼氏染色400倍光镜下行海马下托区神经元计数，结果显示：与正常对照组（82.80±14.44）比较，PHT组（64.10±15.96）、PB+DZP组（63.10±10.12）、PB+PHT组（56.90±16.47）神经元数量显著减少（$P<0.01$）；而PB组（71.50±13.34）及DZP组（77.30±9.96）与对照组无明显差别。PHT组海马下托神经元的减少可能与其剂量相对较大有关。

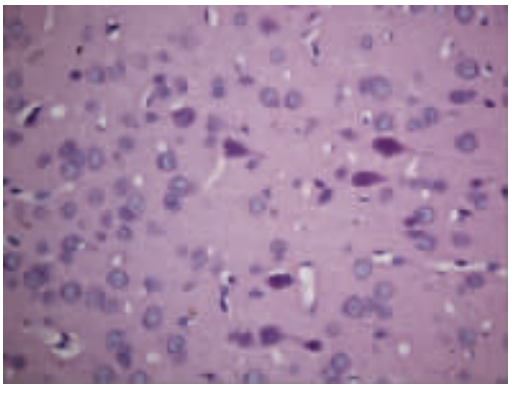


图3 PB+PHT组P30幼鼠颞叶皮层病理学观察（HE ×400）

2.7 Morris水迷宫测试

定位航行实验：各组大鼠寻台潜伏期随训练时间的延长而呈下降趋势，第1~2天（P24、P25）各组大鼠寻台潜伏期无显著性差别，第3~4天（P26、P27）PB+PHT组大鼠寻台潜伏期显著长于正常对照组（$P<0.05$）；第5天（P28）PB+DZP组及PB+PHT组大鼠寻台潜伏期均较正常对照组显著延长（$P<0.05$）。见表2。

空间探索实验：PHT组、PB+DZP组、PB+PHT组大鼠穿越平台次数较正常对照组少，差异有统计学意义（$P<0.01$），而PB、DZP与正常对照组间无明显差异（$P>0.05$）。

3 讨论

新生儿惊厥的死亡率很高，幸存者常有高风险神经发育异常（如运动或认知缺陷）。然而，当前的抗惊厥药物疗效并不十分理想，常用抗惊厥药物单一用药控制发作的有效率不足50%[2]，这些药物大多还存在潜在的神经毒性。临床及动物实验均已证实，母孕期使用PB、PHT等抗癫痫药（antiepileptic drugs，AEDs）可导致小头、生长发育迟滞、神经管缺损、唇腭裂、和指趾畸形等宫内发育异常[8]。由于人脑快速发育的关键期从孕6个月一直持续至生后2~3年，在此特殊时期发育脑极易受到内、外环境因素的影响而使脑发育进程的受到干扰，那么新生儿期的脑发育对抗惊厥药物的特殊敏感性就引起临床医生的极大关注。我们的前期工作对婴儿鼠和成年鼠长程施用AEDs的对照性动物实验发现[9,10]：未成熟脑对部分AEDs有特殊敏感性，AEDs不仅引起皮层功能障碍，还可能导致不易恢复的脑组织结构损伤，后者更可能成为癫痫患儿持续性认知功能低下的重要原因。新生儿一次性用药后是否也会引起持续性脑损伤和皮层功能低下目前尚不清楚。因此，本研究以临床新生儿惊厥抢救常用的中等剂量为基础，通过换算[5,6]，分别获得PB、PHT、DZP在P7新生大鼠用药基础剂量，参照各自在大鼠体内半衰期测定的用药后血浓度，最终确定研究剂量。在对健康P7新生大鼠一次性施药后3周，对比观察单用或联合两种AED对大鼠脑组织及皮层功能的远期影响。

早先的研究[5,9,10]均一致揭示，传统AEDs主要通过诱导脑内细胞过度凋亡而导致婴幼鼠脑损伤。TUNEL是当前公认检测凋亡细胞可靠标记，Bax和Bcl-2则是凋亡启动的重要调节因子。本研究中无论在PB、DZP、PHT单药或PB+DZP或PB+PHT联合用药引起的新生儿脑损伤中，都伴有与脑损伤程度一致的同步性TUNEL及Bax/Bcl-2改变，从而再次确认相关AEDs主要通过诱导过度凋亡致未成熟脑损伤这一重要致病机理。凋亡和坏死有在形态学上有一定的重叠，且细胞内ATP和Caspases活性降低能够把正在进

表2 各组大鼠不同定位航行实验检测时间点寻台潜伏时间（s，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
正常对照组	47.11±14.88	49.91±9.23	29.11±12.33	29.95±17.27	22.12±14.50
PB组	55.58±6.87	44.51±15.25	37.19±13.21	30.10±12.48	28.62±11.77
DZP组	50.87±9.58	44.40±7.98	37.71±12.70	27.40±16.33	24.62±17.06
PHT组	49.88±10.23	43.12±13.61	35.81±14.88	35.95±11.02	33.79±12.40
PB+DZP组	53.17±8.45	39.14±15.91	36.53±18.76	32.78±13.31	39.41±16.01[a]
PB+PHT组	55.91±1.10	49.19±13.58	48.57±11.90[a]	48.46±7.35[a]	46.70±11.34[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较

行凋亡的过程转变为坏死过程[11]。NSE 是糖酵解途径中的关键性酶,特异的存在于神经元和神经外胚层组织细胞内,当神经元坏死时可见到该酶在周围血清和脑脊液中含量升高,是当前反映脑内神经元变性坏死的可靠指标[12]。我们的结果显示:除 DZP 组未引起显著意义的血清 NSE 增高外,其余各组均明显增高,联合用药组尤为显著;与 TUNEL 的结果一致说明:传统抗惊厥药物不仅引起了神经元的过度凋亡,而且存在坏死过程;联合用药组脑损伤比单药组更为严重。

Morris 水迷宫是检测大鼠空间学习记忆的重要工具。朱海霞等[9]长期给予幼鼠 PB 30 mg/(kg·d),即使停药后 1 个月,对大鼠认知功能仍有明显的抑制,提示这种远期损害有可能直至成年;这与我们前期的研究相一致,生后早期长程给予 PB 后显著抑制未成熟脑内海马神经发生,主要表现为抑制新生细胞的增殖和存活[13]。本研究结果显示:联合用药 PB + DZP、PB + PHT 组寻台潜伏期有统计学意义的延长,而单药组未见显著差别。说明随着 3 周的正常生长发育,单药组脑损伤得到了一定程度的自我修复,并未对新生大鼠造成持久的智力伤害;联合用药组则显示长期显著性的智力损害。高度提示:单药应用其急性期损害可以得到恢复,未造成远期智力损害;而联合使用可能对未成熟脑认知功能造成持久性损害,且难以恢复。

本研究结果表明:单药组能引起不同程度的急性期脑损伤,但是,其脑损伤随 3 周生长发育得到恢复;而 PB + DZP、PB + PHT 联合用药脑损伤更为严重,对发育脑造成长期的学习记忆损害,难以恢复。

新生儿惊厥预后依然严重,当前传统的抗惊厥药物疗效不好且存在潜在的神经毒性[2]。由于人们发现大多数新生儿惊厥入院后会自然地逐日减轻并很少复发,且与是否接受 PB 预防性治疗无关,故目前多数学者主张患儿出院后不要盲目给予 PB 等 AEDs 预防惊厥复发[2]。国际上已有专家呼吁探索将托吡酯(topiramate,TPM)和左乙拉西坦(levetiracetam,LEV)列为新生儿惊厥主要抢救药物的必要性[2,14]。近年来,日益增多的 NICU 和小儿神经专家超越说明书地将新一代 AEDs 用于新生儿惊厥的抢救[14,15]。本研究结果也表明:一次性或短期施用 PB、DZP、PHT 等传统抗惊厥药对未成熟脑并不引起持续性远期组织学或功能损伤,但要避免不必要的持久用药,或 2~3 种 AEDs 联合用药;同时,应探索新一代 AEDs 在新生儿的安全性,将为新生儿惊厥抢救打开更理想门路。从而在总体上提高新生儿惊厥的诊治水平,最大程度的降低新生儿惊厥的危害。

参考文献:

[1] Silverstein F S, Jensen F E, Inder T, *et al*. Improving the treatment of neonatal seizures: National Institute of Neurological Disorders and Stroke workshop report[J]. J Pediatr, 2008, 153(1): 12-15.

[2] Glass H C, Wirrell E. Controversies in neonatal seizure management[J]. J Child Neurol, 2009, 24(5): 591-599.

[3] Bartha A I, Shen J, Katz K H, *et al*. Neonatal seizures: multicenter variability in current treatment practices[J]. Pediatr Neurol, 2007, 37(2): 85-90.

[4] Vento M, de-Vries L S, Alberola A, *et al*. Approach to seizures in the neonatal period: a European perspective[J]. Acta Paediatr, 2010, 99(4): 497-501.

[5] Bittigau P, Sifringer M, Genz K, *et al*. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(23): 15089-15094.

[6] Wang Y, Zhou D, Wang B, *et al*. A kindling model of pharmacoresistant temporal lobe epilepsy in Sprague-Dawley rats induced by Coriaria lactone and its possible mechanism[J]. Epilepsia, 2003, 44(4): 475-488.

[7] Loscher W. The pharmacokinetics of antiepileptic drugs in rats: consequences for maintaining effective drug levels during prolonged drug administration in rat models of epilepsy[J]. Epilepsia, 2007, 48(7): 1245-1258.

[8] Ornoy A. Neuroteratogens in man: an overview with special emphasis on the teratogenicity of antiepileptic drugs in pregnancy[J]. Reprod Toxicol, 2006, 22(2): 214-226.

[9] 朱海霞, 蔡方成, 张晓萍. 治疗血浓度下抗癫痫药对未成熟脑发育影响的实验研究[J]. 中华神经科杂志, 2007, 40(3): 157-161.

[10] 朱海霞, 蔡方成, 张晓萍. 长程服用苯巴比妥、氯硝安定、丙戊酸和托吡酯对未成熟脑发育影响的实验研究[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(2): 121-125.

[11] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516.

[12] Marchi N, Rasmussen P, Kapural M, *et al*. Peripheral markers of brain damage and blood-brain barrier dysfunction[J]. Restor Neurol Neurosci, 2003, 21(3/4): 109-121.

[13] Chen J, Cai F, Cao J, *et al*. Long-term antiepileptic drug administration during early life inhibits hippocampal neurogenesis in the developing brain[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(13): 2898-2907.

[14] Silverstein F S, Ferriero D M. Off-label use of antiepileptic drugs for the treatment of neonatal seizures[J]. Pediatr Neurol, 2008, 39(2): 77-79.

[15] Blume H K, Garrison M M, Christakis D A. Neonatal seizures: treatment and treatment variability in 31 United States pediatric hospitals[J]. J Child Neurol, 2009, 24(2): 148-154.

(收稿:2010-04-06 修回:2010-05-30)

(编辑 汪勤俭)