

大黄-黄芩配伍应用对脑损伤早期癫痫易感性的影响

施所琴¹, 严瑶瑶¹, 马瑶¹, 王福顺^{1,2*}

(1. 南京中医药大学 医学与生命科学学院, 南京 210023;
2. 南京中医药大学 心理学院情绪心理研究所, 南京 210023)

[摘要] **目的:**研究大黄-黄芩配伍应用对小鼠脑损伤早期癫痫易感性的影响,探讨该药对抗脑损伤后癫痫的机制。**方法:**将 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为空白组,模型组,大黄-黄芩药对低(1 g·kg⁻¹),高剂量组(4 g·kg⁻¹)及阳性组(2.6 g·kg⁻¹丙戊酸钠)。除空白组外,其余各组采用自由落体法建立小鼠封闭性颅脑损伤模型,于脑损伤后给予相应药物灌胃治疗,连续 7 d。于末次给药后给予戊四氮(pentylenetetrazole, PTZ)亚惊厥剂量刺激,通过行为学观察各组小鼠的癫痫发作潜伏期及平均发作强度,脑电图(electroencephalogram, EEG)分析小鼠的脑部放电图谱,统计 0~20 Hz 的放电总和;免疫组化法(immunohistochemistry, IHC)计数海马 CA1, CA3 区胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的阳性细胞数;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测神经元 Na⁺-K⁺-2Cl⁻共转运体-1(NKCC1)的蛋白表达水平。**结果:**与空白组比较,模型组的小鼠癫痫发作潜伏期明显缩短,脑部异常高频放电明显增多,海马 CA1, CA3 区的 GFAP 阳性细胞计数显著增加($P < 0.05$),且神经元 NKCC1 的表达也较高($P < 0.05$);与模型组比较,药对低、高剂量均可延长癫痫发作的潜伏期,减少脑部异常放电,降低海马区 GFAP 阳性细胞数以及神经元 NKCC1 蛋白的表达,且药对高剂量组与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。**结论:**大黄-黄芩配伍应用可降低脑损伤早期癫痫的易感性,作用机制可能与星形胶质细胞的调控作用有关。

[关键词] 大黄-黄芩; 脑损伤后癫痫; 胶质纤维酸性蛋白(GFAP); 神经元 Na⁺-K⁺-2Cl⁻共转运体-1(NKCC1); 星形胶质细胞

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R277.7 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2018)10-0168-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180835

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180125.1444.002.html>

[网络出版时间] 2018-01-26 10:27

Effect of Combined Application of Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix on Prevalence of Epilepsy of Brain Injury

SHI Suo-qin¹, YAN Yao-yao¹, MA Yao¹, WANG Fu-shun^{1,2*}

(1. School of Medicine and Life Sciences, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. Institute of Emotional Psychology, School of Psychology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of the combined application of Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix on the susceptibility of early epilepsy of traumatic brain injury in mice, in order to explore the mechanism of epilepsy after brain injury. **Method:** SPF-grade C57BL/6J male mice were randomly divided into 5 groups, namely blank control group, model group, low-dose Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix treatment group (1 g·kg⁻¹), high-dose group (4 g·kg⁻¹), positive control group (2.6 g·kg⁻¹ sodium valproate). A mouse model of closed brain injury was established by the weight-falling method in all test groups, except for the blank

[收稿日期] 20171031(010)

[基金项目] 海外及港澳学者合作研究基金项目(816280007);江苏省自然科学基金项目(BK20151565);江苏省中管局重点项目(ZD201501);江苏省六大人才高峰项目(2015YY006)

[第一作者] 施所琴, 硕士, 从事抗癫痫药物的神经药理学研究, E-mail: shisuoqin@njucm.edu.cn

[通信作者] *王福顺, 博士, 教授, 从事神经生物学分子机制研究, E-mail: 13814541138@163.com

control group. The mice were given the corresponding drugs by gavage for successively 7 days after mice brain injury. Subacute dose of pentylenetetrazole (PTZ) was given to the mice after the last administration. The latency and mean seizure intensity of epileptic seizures in mice were measured through the behavioral observation. EEG changes of mice were analyzed by counting the sum of 0-20 Hz discharges. Positive cells of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in hippocampal CA1 and CA3 regions were counted by immunohistochemistry. Protein expression of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ co-transporter (NKCC1) was detected by Western blot. **Result:** Compared with the control group, the latency of epilepsy seizure was significantly shortened in the model group, abnormal high-frequency discharge in brain was significantly enhanced, and the number of GFAP positive cells in the hippocampal CA1 and CA3 regions was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression level of NKCC1 in neurons was remarkably increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the low and high-dose Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix could prolong the latency of epileptic seizures, reduce the abnormal discharge of brain, decrease the number of GFAP positive cells and the expression of NKCC1 protein in the hippocampus ($P < 0.05$), with significant difference between the high-dose group and the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The combined application of Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix could reduce the susceptibility of early epilepsy after brain injury, and the mechanism may be related to the regulation of astrocytes.

[Key words] Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix; posttraumatic epilepsy; glial fibrillary acidic protein (GFAP); $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ co-transporter (NKCC1); astrocytes

癫痫(epilepsy)^[1]是一种常见的神经系统疾病,影响全世界约 1% 的人口,其主要特征是脑部神经元异常超同步放电。创伤后癫痫(posttraumatic epilepsy, PTE)是外伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)最严重的并发症之一^[2],具有突发性、短暂性等特点。据初步调查显示,创伤后癫痫的发病率为 5% ~ 50%^[3],一旦发病,其脑损伤导致的继发性炎症反应不仅会提高死亡率,也会加大治疗难度,给患者及社会带来了巨大的心理阴影和经济负担。中药治疗癫痫历史悠久,且疗效稳定,副作用小。王隐君《泰定养生主论》中就有记载镇痫经方“滚痰丸”,从剂量上看,大黄、黄芩这 2 味药的用量独重^[4]。大黄具有抗炎、活血祛瘀、免疫调节等药理作用,近年来研究显示,大黄的蒽醌类成分大黄素(emodin)可以通过抑制多药耐药基因 1 (multidrug resistance protein 1, MDR1) 和其相关炎症因子对癫痫大鼠表现出良好的拮抗作用^[5]。黄芩在我国用来治疗炎症、惊厥等已有数千年的历史,在众多方剂中常作为君、臣之药味施用。既往研究表明,黄芩的主要药理成分黄芩苷(baicalin)具有解痉、抗病毒、抗炎、抗凋亡、抗氧化应激等多种作用,还可透过血脑屏障发挥神经保护作用^[6]。经典方剂中,大黄和黄芩常配伍使用,如牛黄解毒片、凉膈散、泻心汤等,现代药理研究证实,大黄-黄芩药对配伍应用具有抗炎功效^[7]。创伤性脑损伤早期由于脑部创伤导致炎症通路的激活,炎症因子的释放,从而加速了脑部

的氧化应激反应,介导早期癫痫发生^[8]。但目前国内对于封闭性脑损伤早期癫痫的基础研究及临床防治还很薄弱,且临床上对于大黄、黄芩 2 种药材的单味药研究较多,未见两药配伍应用于脑损伤后早期癫痫的报道。因此本实验建立封闭性脑损伤小鼠模型,通过腹腔注射亚惊厥剂量的予戊四氮(PTZ),考察大黄-黄芩配伍应用对脑损伤早期癫痫易感性的影响,初步探讨其抗脑损伤后癫痫的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,雄性,体质量 18 ~ 22 g,购自青龙山动物繁殖场,合格证号 SCXK(苏)2013-0011,在南京中医药大学实验动物中心饲养。实验期间小鼠分组饲养于通风的笼中,严格控制温度 22 ~ 25 ℃,湿度 50% ~ 70%,并保持 12 h/12 h 的明暗周期,自由饮食。实验方案及操作均符合南京中医药大学实验动物伦理委员会规定。

1.2 药物 大黄(熟大黄,产地甘肃,购自于江苏龍升药业有限公司,批号 16050301),黄芩(黄芩片,产地甘肃,购自于安徽健诚中药饮片有限公司,批号 170201),经南京中医药大学中医脑病教研室陶伟伟助理研究员鉴定合格,质量要求均符合 2015 年版《中国药典》一部项下规定。醇提液的制备为称取大黄-黄芩饮片 1:1,加入 10 倍量的 60% 乙醇溶液室温下密封浸泡 0.5 h,加热回流 3 次,每次 1 h,抽滤,合并滤液,药液浓缩至 2 个质量浓度,按生药材计算分别为 1, 4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,浓缩液储存于 4 ℃ 冰箱中,

使用前水浴温热。

1.3 试剂 PTZ(美国 Sigma 公司,批号 P6500);兔抗 GFAP 受体单克隆抗体;兔抗 NKCC1 多克隆抗体,兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 均购自美国 Abcam 公司(货号分别为 BS-0199R, ab59791, EDR16891, ab205718);蔗糖、乙醇、中性树脂(国药集团化学试剂有限公司);通用型二步法免疫组化检测系(北京中杉金桥生物有限公司,货号 PV-9000);DAB 显色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号 DA1010);磷酸盐缓冲液(PBS,通用电气医疗集团生命科学部,货号 AB218110);多聚甲醛(美国 Sigma 公司,批号 P6148);异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司,货号 902-0000-522)。

1.4 仪器 68093 型颅脑创伤撞击器, R5101P 型小动物麻醉机, 68016 型数字单臂立体定位仪, 78001 微型手持式颅钻(深圳瑞沃德生命科技有限公司); Digidata 1550 型数模转换器, Multiclamp 700B 型膜片钳放大器(美国 Axon 公司); BX51 型显微镜(日本 Olympus 公司); CM1950 型冰冻切片机(德国 Leica 公司); SL16 R 型低温超速离心机, Nanodrop Thermo ND2000 超微量生物检测仪(美国 Thermo Scientific 公司); PowerPac 型蛋白电泳以及 Mini-PROTEAN 型转膜系统(美国 Bio-Rad 公司); WD-9405 B 型水平摇床(沃德生物医学仪器公司); Tanon 5200 型全自动化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 脑损伤(TBI)模型的制备 参照 ZHANG 等^[9]的自由落体打击方法,将小鼠置于通有 3.5% 异氟烷的密闭空箱中诱导麻醉,待其翻正反射消失后取出,固定于脑立体定位仪上,并将麻醉浓度调整为 2.5%。在麻醉期间,用 40 °C 放热化学保温垫保持小鼠正常体温。手术切开颅骨表面的皮肤并分离皮下组织,暴露前囟及颅骨,将打击仪器端部对准小鼠左侧顶骨,用 20 g 钢珠从 30 cm 高的不锈钢管内自由落下,打击颅骨,进行封闭性脑损伤。打击后,小鼠立即从立体定位仪上取下,缝合伤口后消毒。空白组只切开颅骨皮肤后缝合,不进行打击。

2.2 动物分组及给药 将脑损伤的小鼠随机分为模型组、大黄-黄芩低、高剂量组、阳性组,未打击的小鼠则为空白组,每组 10 只,各组动物分笼饲养。

空白组小鼠不进行打击,自由饮食、饮水;阳性组小鼠打击后灌胃丙戊酸钠($2.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),模型组小鼠打击后灌胃相同体积的生理盐水,其他两组分别灌胃大黄-黄芩药对醇提液,低剂量组($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),高剂量组($4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。1 次/d,于 TBI 后连续灌胃 7 d。

2.3 癫痫行为指标观察 各组小鼠末次给药后 2 h 给予腹腔注射亚惊厥剂量($37.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) PTZ,将其置于透明的有机塑料空笼中,并对其进行 30 min 的观察期,检测其对致痫剂的癫痫易感性,记录各组小鼠的惊厥发作潜伏期(相当于 1~3 级),全身强直阵挛发作潜伏期(达到 4~5 级)以及平均发作强度等行为学指标。癫痫的发作强度按 Racine 标准分级为 0 级,无反应;1 级,节律性嘴和面部的抽动;2 级,颈部肌肉的抽搐,频繁点头、竖尾;3 级,一侧前肢痉挛;4 级,双侧前肢痉挛,伴后肢伸直,身体立起;5 级,全身广泛性强直阵挛发作。

2.4 脑电图(EEG)分析 将末次灌胃后的小鼠每组各取 5 只放入异氟烷吸入式麻醉箱中,待小鼠翻正反射消失后取出,固定于脑立体定位仪上,实施开颅手术。首先去除颅骨表面的皮肤及皮下组织,待颅骨暴露后,用手持颅钻在小鼠前囟后侧、中缝右侧开窗,骨窗大小约 $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$,暴露脑组织。经微电极拉制仪拉制玻璃电极,内径约 $3 \mu\text{m}$,电极内注入生理盐水,插入暴露的脑皮层组织中,于脑组织表面滴少量生理盐水形成导联系统。小鼠皮层脑电图通过 Pclamp 10.4 数据分析软件记录。

2.5 免疫组化检测海马区的 GFAP 的变化 将脑电图记录完毕的小鼠仰卧位固定于解剖台上,打开胸腔,4% 多聚甲醛心尖处行心内灌注,并剪开右心耳。灌注结束后迅速断头取脑,并将脑组织放入 4% 多聚甲醛 4 °C 固定 24 h,再转入 30% 蔗糖溶液中脱水。待脑组织脱水完全后取出,冷冻切片包埋剂(optimal cutting temperature compound, OCT)包埋,进行冠状连续冰冻切片,片厚 $40 \mu\text{m}$ 。取出冰冻切片后,按照 PV 二步法进行染色,①切片用 3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶;②滴加一抗,浓度为 1:500,37 °C 水浴锅孵育 2 h;③滴加试剂 1,37 °C 孵育 20 min;④滴加试剂 2,37 °C 孵育 30 min;⑤ DAB 显色;⑥纯水充分冲洗,复染、脱水、透明、中性树脂封片。于 Olympus 光学显微镜下观察细胞的形态与分布,每只小鼠取 3 张大致相同层面脑组织切片,随机选取 3 个视野($\times 400$),计数海马 CA1, CA3 区阳性细胞数目。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测神经元 NKCC1 蛋白的表达 于末次给药后将每组剩余的小鼠断头处死,冰上剥离海马组织,称质量,置于预冷的离心管中,加入组织裂解液,匀浆,于 4 ℃,以 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,提取总蛋白。配制聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶 (8% gel),加样电泳。电泳结束后,取出凝胶,切出目的条带,采用半干法转膜。转膜结束后,将聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 置于加入 4 mL 3% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的长方形小盒中,摇床上慢摇 1 h 封闭。而后倒掉封闭液,向盒子内加入事先配好的一抗 NKCC1 (1:500),GAPDH(1:2 000),随后放入 4 ℃ 冰箱的摇床上,慢摇过夜。回收一抗,加入 TBST(含 0.1% 聚山梨脂 20 的 TBS 缓冲液) 4 mL,摇床上快洗 3 次,每次 10 min。加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:5 000) 室温孵育 1 h。回收二抗,洗膜。最后将条带放于加入化学发光试剂 (electrochemiluminescence, ECL) (1:1) 的避光小盒中,1 min 后在天能凝胶成像系统中拍照显影。结果用 Image J 分析软件检测目的蛋白条带及内参蛋白条带灰度值,以目的蛋白灰度值/内参灰度值表示蛋白的表达。

2.7 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 进行统计分析。组内比较采用配对 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大黄-黄芩配伍对脑损伤后小鼠癫痫行为学的影响 腹腔注射 PTZ 后,空白组小鼠无明显异常,毛发光泽,有部分惊厥行为,但均低于 2 级。模型组小鼠平均 1 min 左右发作,表现为运动减少,紧接着出现口角流涎、抖须等面部不自主活动,继而前肢阵挛,后肢伸直,甚至出现翻滚、扭体、跌倒等全身大发作的特征。其中,大部分小鼠在 5 级发作时的状态类似于临床上的全身强直性阵挛发作,持续数分钟到半个小时后可自行缓解。其余各组小鼠多表现为 2~4 级的反复发作,也有部分小鼠直接由 2 级发展为 5 级。与模型组比较,各药物治疗组癫痫发作潜伏期显著延长 (*P* < 0.05),30 min 内强直-阵挛发作的小鼠数量明显减少 (*P* < 0.05),发作程度显著减弱。药物高剂量组与丙戊酸钠组比较无明显差异。见表 1。

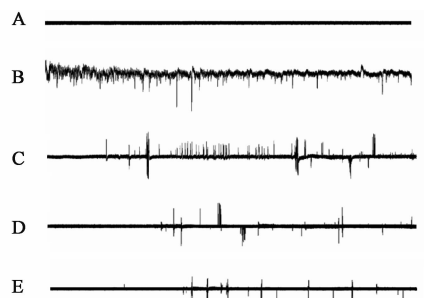
表 1 大黄-黄芩配伍对脑损伤后小鼠癫痫行为学的影响

Table 1 Effect of compatibility of Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix on epileptic behavior after traumatic brain injury

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	强直-阵挛发作/只	强直-阵挛发作潜伏期 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)/s	平均发作/级
空白	-	2	194.3 ± 11.50	2.0
模型	-	10	84.7 ± 10.21 ¹⁾	5.0
大黄-黄芩	1	7	107.0 ± 19.20	4.4
	4	4	151.3 ± 14.84 ²⁾	3.5
丙戊酸钠	2.6	4	156.0 ± 15.62 ²⁾	3.4

注:与空白组比较¹⁾ *P* < 0.05;与模型组比较²⁾ *P* < 0.05 (表 2,3,图 4 同)。

3.2 大黄-黄芩配伍对脑损伤后小鼠癫痫脑电图的影响 空白组的小鼠未接受脑损伤造模,对亚惊厥剂量的 PTZ 不敏感,脑电图也显示正常,均以基础波为主,未监测到明显的痫样波;而模型组小鼠脑电图则显示明显的阵发性癫痫样放电波形,脑电信号表现为异常高幅的棘波、尖波、慢波;中药低、高剂量组均有不同程度的棘(尖)波出现,且高剂量组在经过较长的潜伏期后才出现痫样波。两组出现痫样波的频率均没有模型组高,而经丙戊酸钠组治疗后的小鼠偶有癫痫样放电出现。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C, D. 大黄-黄芩低、高剂量组;E. 丙戊酸钠组 (图 2~4 同)

图 1 大黄-黄芩配伍对脑损伤后癫痫脑电的影响

Fig. 1 Effect of compatibility of Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix on epileptic EEG after traumatic brain injury

每组截取具有明显特征的相同时段 60 s 内的脑电图,运用 clampfit 10.4 软件进行数据分析,5 组脑电图放电量由大到小依次为模型组 > 大黄-黄芩低剂量组 > 大黄-黄芩高剂量组 > 丙戊酸钠组 > 空白组。通过对 0~20 Hz 脑部放电总量和进行统计,结果显示模型组的放电量最大,其余各组数值均较小;为了便于比较,数据处理时采用了对数转换,模型组、低剂量组数值为正,空白组、药物高剂量组和丙戊酸钠组数值均为负。综上所述,药物高剂量组

可以有效抑制小鼠癫痫样放电,与模型组比较($P < 0.05$)。见图 2,表 2。

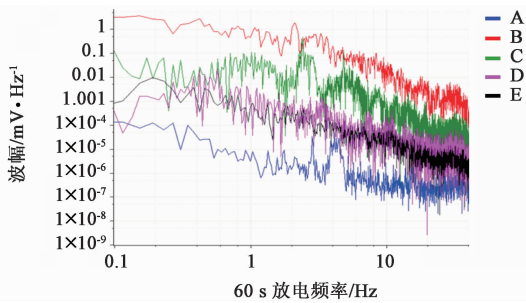


图 2 大黄-黄芩配伍对脑损伤后癫痫脑部放电的影响 ($n = 5$)

Fig. 2 Effect of compatibility of Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix on brain discharges of epilepsy after traumatic brain injury ($n = 5$)

表 2 大黄-黄芩配伍对脑损伤后小鼠癫痫脑部放电的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of compatibility of Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix on brain discharges of epilepsy after traumatic brain injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	0 ~ 20 Hz 放电总和 / mV^2	对数转换值
空白	-	0.01 ± 0.01	-1.86 ± 0.15
模型	-	84.94 ± 1.26 ¹⁾	1.93 ± 0.01 ¹⁾
大黄-黄芩	1	8.18 ± 0.58 ²⁾	0.91 ± 0.03 ²⁾
	4	0.27 ± 0.03 ²⁾	-0.56 ± 0.04 ²⁾
丙戊酸钠	2.6	0.09 ± 0.01 ²⁾	-1.03 ± 0.03 ²⁾

3.3 大黄-黄芩配伍对脑损伤后小鼠癫痫海马区 GFAP 的影响 GFAP 阳性细胞为棕黄色,散在分布。其中,模型组 GFAP 免疫阳性反应明显增强,镜下细胞数量增多,胞体与空白组比较肥大且增生,呈不规则星状,有粗长的突起;空白组 GFAP 阳性细胞属于正常生理形态。其余经过中药治疗的各组小鼠海马 CA1, CA3 区 GFAP 阳性细胞数量增加明显减少。见图 3。

各组小鼠海马 CA1, CA3 区 GFAP 阳性细胞数,与空白组比较,模型组数量明显增多,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。中药组与模型组比较,GFAP 阳性细胞数目明显减少,存在显著差异($P < 0.05$),结果说明经过中药灌胃和丙戊酸钠处理后,小鼠海马区异常激活的星形胶质细胞 GFAP 得到了明显的抑制,且中药高剂量组效果与丙戊酸钠组间无明显差异。见表 3。

3.4 大黄-黄芩配伍对脑损伤后小鼠癫痫神经元 NKCC1 表达的影响 通过蛋白免疫印迹检测

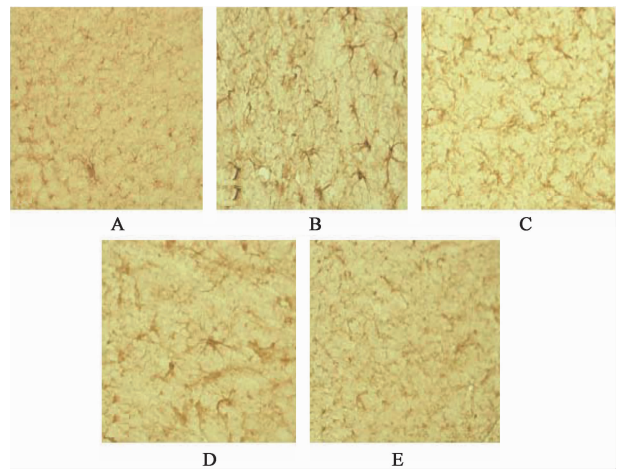


图 3 大黄-黄芩配伍对脑损伤后小鼠癫痫海马区 GFAP 的影响 (IHC, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of compatibility of Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix on GFAP positive cells in hippocampus of epilepsy after traumatic brain injury (IHC, $\times 400$)

表 3 大黄-黄芩配伍对脑损伤后癫痫海马区 CA1, CA3 区 GFAP 阳性细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of compatibility of Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix on GFAP positive cells in hippocampal CA1 and CA3 regions of epilepsy after traumatic brain injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	CA1 区阳性 细胞	CA3 区阳性 细胞
空白	-	7.60 ± 1.35	8.40 ± 1.27
模型	-	26.30 ± 3.62 ¹⁾	27.50 ± 2.13 ¹⁾
大黄-黄芩	1	15.60 ± 1.58 ²⁾	16.30 ± 1.43 ²⁾
	4	9.70 ± 1.41 ²⁾	10.80 ± 1.65 ²⁾
丙戊酸钠	2.6	9.50 ± 2.02 ²⁾	10.20 ± 1.94 ²⁾

NKCC1 表达,发现模型组较空白组明显增高($P < 0.01$),中药低剂量组、高剂量组、丙戊酸钠组均较模型组明显降低($P < 0.05$),中药高剂量组与丙戊酸钠组间无统计学意义。见图 4。

4 讨论

脑损伤后癫痫动物模型的研究为现代临床抗癫痫治疗提供了思路。在一些大脑区域,包括海马和颞叶皮层,由于脑损伤,导致病灶周围的星形胶质细胞反应性增生,产生脑部炎症反应。其主要特征包括血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的破坏,脑水肿,小胶质细胞及星形胶质细胞的激活和迁移,炎症因子的释放,从而通过促进脑组织氧化应激的过程,介导早期癫痫发作。以往的临床和实验研究均证实 TBI 后许多细胞因子明显升高,包括肿瘤坏死因子(TNF)- α ,转化生长因子- β (TGF- β)和白细胞介素(IL-1 β 和 IL-10),这些细胞因子涉及核转录因子-

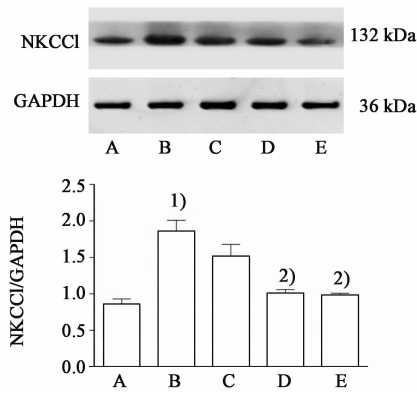


图 4 大黄-黄芩配伍对脑损伤后癫痫神经元 NKCC1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of compatibility of Rhei Radix et Rhizoma-Scutellariae Radix on expression of NKCC1 in neurons of epilepsy after traumatic brain injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

κ B (NF- κ B) 的下游信号级联反应的激活^[10], 进而导致神经炎症的发生、发展。戊四氮是目前国际上通用的致病剂, 可以模拟出人类的全身强直-阵挛大发作。由于脑损伤后癫痫灶附近炎症反应的发生, 导致早期出现对癫痫易感性增加的现象, 因此需要深入了解脑部创伤后神经炎症的发展进程, 掌握脑损伤早期癫痫发作的分子机制。

星形胶质细胞 (astrocytes, AST) 作为最大的一种神经胶质细胞, 对神经元具有支持和保护的作用。正常生理情况下, AST 内储存着大量的 K^+ , 对神经元的周围环境起到非常重要的调节作用。而近年来的研究将 AST 的活化作为癫痫病理的标志, 研究表明, IL-1 β , TNF- α , TGF- β 等都是使 AST 活化的早期来源。激活的 AST 诱发神经元功能改变, 特殊蛋白的表达量增多, 如 AQP₄, NKCC 等。NKCC 是一种膜蛋白, 属于阳离子型氯协同转运蛋白家族, 其中 NKCC1 遍布全身。最近的研究表明 NKCC1 可能参与了脑缺血、焦虑、癫痫等病理生理学过程^[11], 且癫痫灶附近神经元中 NKCC1 的表达量增加与脑损伤后神经通路的激活有关^[12], 因此推测 NKCC1 可能参与了脑损伤早期癫痫的发生。实验中采用免疫印迹检测神经元中 NKCC1 的表达, 从蛋白的表达情况分析可以看出, 经过中药低、高剂量组以及丙戊酸钠组的治疗后, NKCC1 蛋白表达量明显降低, 且中药高剂量组与模型组之间存在显著性差异, 与丙戊酸钠组比较无统计学意义。

本实验过程中建立封闭性颅脑打击损伤模型, 给予 PTZ 亚惊厥致病剂量刺激诱发癫痫, 通过行为学及脑电图观察大黄-黄芩配伍应用对小鼠脑损伤

后癫痫易感性的影响, 探讨其抗脑损伤后癫痫的分子机制。结果显示, 中药低、高剂量组可显著延长脑损伤后癫痫发作的潜伏期, 其中中药高剂量组的效果明显优于低剂量组。且通过皮层脑电的记录结果分析来看, 造模后的脑电波较空白组发生明显改变, 显示异常高频的棘波、棘(尖)慢波, 尤其是模型组。但给予中药治疗后的小鼠脑部放电显著改善, 图谱显示为异常放电的减少, 波幅的降低。星形胶质细胞 GFAP 表达量增加被认为是脑损伤和癫痫的一个标志性蛋白^[13-15], 因此实验中利用免疫组化检测 GFAP 阳性细胞数, 经过中药低、高剂量组治疗的脑损伤后癫痫小鼠, 其海马区 GFAP 阳性细胞的数量明显减少, 且存在剂量依赖性。上述结果表明, 大黄-黄芩配伍应用抗脑损伤后早期癫痫的机制可能与星形胶质细胞的调节作用有关。

大黄-黄芩配伍出自《扁鹊心书·神方》, 而后在方剂中常配伍使用, 近年来, 有学者通过对《中医方剂大辞典》中治疗癫痫的高频药物用药规律的统计研究发现, 使用频率在 15% 以上的便有大黄和黄芩^[16]。现代医学研究认为, 大黄-黄芩配伍应用具有抗炎作用^[7]。因此, 本课题组由滚痰丸启发, 在前期礞石滚痰汤抗癫痫的研究基础上, 选取大黄-黄芩药对, 探讨其对脑损伤后早期癫痫易感性的影响。而近年来的研究表明癫痫灶周围的星形胶质细胞增生与脑损伤后癫痫的发生之间存在关联, 因此笔者推测大黄-黄芩可能通过调控星形胶质细胞达到干预脑损伤后早期癫痫的作用的, 其具体的分子作用机制还有待进一步研究探讨。

[参考文献]

- [1] Nizamahmed S. Epileptic seizures and epilepsy [J]. Epilepsia, 2010, 10 (46): 1700-1701.
- [2] 柯遵斌, 杨志荣, 郁毅刚. 创伤性癫痫的治疗进展 [J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2016, 2 (1): 37-40.
- [3] 余胜坤, 戴文杰, 沈红. 外伤性癫痫研究新进展 [J]. 中国临床神经外科杂志, 2013, 18 (2): 94-98.
- [4] 柳亚平. 礞石滚痰丸方证探讨 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17 (6): 642-643.
- [5] YANG T, KONG B, KUANG Y, et al. Emodin plays an interventional role in epileptic rats via multidrug resistance gene 1 (MDR1) [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8 (3): 3418.
- [6] 刘养凤, 迟丽屹, 高飞, 等. 黄芩苷对戊四氮诱发的小鼠惊厥模型的保护作用 [J]. 天津中医药, 2013,

- 30 (8): 492-494.
- [7] 王沛明, 陈文, 张祎, 等. 基于 p38MAPK 通路初探大黄黄芩配伍对内毒素血症模型大鼠肝脏炎症的调节机制 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (18): 3425-3431.
- [8] Semple B D, O'Brien T J, Gimlin K, et al. Interleukin-1 receptor in seizure susceptibility after traumatic injury to the pediatric brain [J]. J Neurosci, 2017, 37 (33): 7864-7877.
- [9] ZHANG Z B, XIONG L L, LU B T, et al. Suppression of trim32 enhances motor function repair after traumatic brain injury associated with antiapoptosis [J]. Cell Transplant, 2017, 26 (7): 1276-1285.
- [10] HAN T, QIN Y, MOU C, et al. Seizure induced synaptic plasticity alteration in hippocampus is mediated by IL-1 β receptor through PI3K/Akt pathway [J]. Am J Transl Res, 2016, 8 (10): 4499-4509.
- [11] Jaggi A S, Kaur A, Bali A, et al. Expanding spectrum of sodium potassium chloride co-transporters in the pathophysiology of diseases [J]. Curr Neuropharmacol, 2015, 13 (3): 369-388.
- [12] LU K T, HUANG T C, WANG J Y, et al. NKCC1 mediates traumatic brain injury-induced hippocampal neurogenesis through CREB phosphorylation and HIF-1 α expression [J]. Pflugers Arch, 2015, 467 (8): 1651-1661.
- [13] 李晓红, 李映良. GFAP 蛋白在创伤性脑损伤中表达的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19 (14): 2524-2526.
- [14] XU Z C, XUE T, ZHANG Z X. Role of signal transducer and activator of transcription-3 in Up-regulation of GFAP after epilepsy [J]. Neurochem Res, 2011, 36 (12): 2208-2215.
- [15] 林秀慧, 周春吉, 马珂, 等. 芪仙通络方对脑缺血大鼠内源性神经干细胞再生的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 141-147.
- [16] 何乐, 陈浩方, 赵文君, 等. 基于古籍文献分析癫痫临证方剂用药规律的研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2013, 30 (6): 56-59.

[责任编辑 仝燕]