

痫愈痊颗粒对戊四氮致痫大鼠海马 Glu, GABA 含量的影响

郑宏¹, 高国财², 郑攀¹, 冯刚¹, 冯斌¹, 张璠¹, 卢婷婷², 钱红涛², 马丙祥^{1*}
(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 河南中医学院, 郑州 450000)

[摘要] **目的:**观察痫愈痊颗粒对戊四氮致痫大鼠海马谷氨酸(Glu), γ -氨基丁酸(GABA)含量的影响, 探讨痫愈痊颗粒治疗癫痫的机制。**方法:**将70只健康雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、丙戊酸钠组(200 mg·kg⁻¹)、痫愈痊颗粒低、高剂量组(586, 1 172 mg·kg⁻¹), 采用亚惊厥剂量戊四氮(PTZ) *ip* 建立癫痫大鼠模型, 在造模同时即开始给药, 共28 d。行为学观察后取海马组织, 采用高效液相色谱-四级杆离子阱串联质谱仪检测海马中Glu, GABA的含量。**结果:**59只大鼠进入结果分析, 与模型组比较, 痫愈痊颗粒与丙戊酸钠干预后发作潜伏期延长、惊厥持续时间缩短($P < 0.01$); 惊厥持续时间高剂量组优于低剂量组($P < 0.05$)。模型组与正常组相比, 海马Glu含量明显上升, GABA含量明显下降($P < 0.01$); 与模型组比较, 痫愈痊颗粒高、低剂量组和丙戊酸钠组可明显降低海马Glu含量, 升高GABA含量($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**采用亚惊厥剂量PTZ能够建立癫痫大鼠模型; 痫愈痊颗粒抗癫痫机制可能与其降低海马Glu含量, 增加GABA含量有关。

[关键词] 癫痫; 痫愈痊颗粒; 戊四氮; 谷氨酸; γ -氨基丁酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0149-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230149

Effects of Xianyuquan Granules on Contents of Aminobutyric Acid and Glutamic Acid in Hippocampus of Rats with Epilepsy Caused by Pentetrazol ZHENG Hong¹, GAO Guo-cai², ZHENG Pan¹, FENG Gang¹, FENG Bin¹, ZHANG Fan¹, LU Ting-ting², QIAN Hong-tao², MA Bing-xiang^{1*} (1. First Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450000, China; 2. Henan College of TCM, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Xianyuquan granules (JYQG) on the contents of aminobutyric acid (GABA) and glutamic acid (Glu) in hippocampus of rats with epilepsy caused by pentetrazol, and explore the mechanism of JYQG in treatment of epilepsy. **Method:** Seventy healthy male SD rats were randomized into normal group, model group, valproic acid (VPA) group (200 mg·kg⁻¹), low-dose and high-dose JYQG groups (586, 1 172 mg·kg⁻¹). Subconvulsant dose of pentetrazol (PTZ) was *ip* administered to establish epileptic rat models. The others were administrated with their medicine respectively for twenty-eight days. Hippocampus tissues were taken after behavior observation. The contents of GABA and Glu in hippocampus of the rats were measured on HPLC-MS/MSQ-TRAP. **Result:** Fifty-nine rats were analyzed finally. Compared with the model group, the incubation period of the VPA treated group and JYQG treated group was prolonged and the convulsion duration was shorter ($P < 0.01$), convulsion duration in high dose group was shorter than that in low dose group ($P < 0.05$). Glu content in the hippocampus of model group was significantly higher than that of the normal group and the GABA content was significantly less than that of the normal group ($P < 0.01$). Glu content in rats administrated with corresponding medicines was significantly less than that of model group while GABA content was higher than that of model group ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** The application of subconvulsant-dose pentetrazol can establish the epileptic model. The anti-epileptic effect of JYQG may be associated with decreasing the content of Glu and increasing the content of GABA in the hippocampus.

[Key words] epilepsy; Xianyuquan granules; pentetrazol; glutamic acid; aminobutyric acid

[收稿日期] 20150411(004)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011A360025)

[第一作者] 郑宏, 博士, 主任医师, 从事中医药防治小儿神经系统疾病研究, Tel: 13903815826, E-mail: drzhenghs@126.com

[通讯作者] * 马丙祥, 博士, 主任医师, 从事中医药防治小儿神经系统疾病研究, Tel: 13592601575, E-mail: ggci001@163.com

癫痫(epilepsy, EP)是以持续存在的反复癫痫发作的易感性并由此引起的神经生物学、认知、心理学及社会方面后果的一种脑部疾病^[1]。其发病机制非常复杂,目前大多研究认为,脑内抑制性神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)与兴奋性神经递质谷氨酸(Glu)合成代谢失衡,造成神经元兴奋性升高、神经元异常放电是导致癫痫发作的重要因素^[2-4]。痫愈痊颗粒(JYQG)是河南省儿科名老中医苗丕显教授治疗痰热痫的经验方,50多年临床实践发现该药具有减少癫痫发作次数、减轻发作症状、降低复发率,且无明显不良反应发生的优势。本实验拟通过观察JYQG对戊四氮(PTZ)致痫大鼠海马Glu, GABA含量的影响,探讨JYQG的抗癫痫机制,为其临床应用及推广提供分子生物学证据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雄性SD大鼠70只,鼠龄6~8周,体重为(200±10)g,由河南省动物实验中心提供,合格证号SCXK(豫)2010-0002,饲养于河南中医学院第一附属医院屏障系统动物实验室。

1.2 药物

1.2.1 药物组成 JYQG由石膏376g,僵蚕376g,蝉蜕228g,沉香81g,白马蹄81g,钩藤376g,朱砂27g等9味药组成。

1.2.2 制备方法 JYQG制作由河南中医学院第一附属医院中药制剂室完成(批号130526)。取1/4石膏及朱砂碎成细末,沉香采用超临界CO₂萃取流体技术提取挥发油备用,药渣与剩余药物(钩藤除外)混合,加水煎煮,钩藤另单煎,合并煎液,滤过浓缩,加入上述细粉及糊精至适量、制粒、干燥后加入上述挥发油,混匀,2002g原药制成1000gJYQG,每包JYQG3g,相当于原药材1.449g。取12gJYQG,放入消毒研钵,加入灭菌蒸馏水100mL配成终质量浓度为0.12g·mL⁻¹低剂量JYQG水溶液。同法,将24gJYQG配制成质量浓度为0.24g·mL⁻¹高剂量JYQG水溶液。丙戊酸钠片(山东东方明药业集团股份有限公司,国药准字H37022627,临用时配制成0.1g·mL⁻¹水溶液)。

1.3 试剂 PTZ(批号097K0663,美国Sigma公司),临用时配制成2g·L⁻¹水溶液。

1.4 仪器 Ultimate3000型高效液相色谱仪(美国戴安公司),3200Q TRAP型串联质谱联用仪(美国Applied Biosystem公司)。

2 方法

2.1 模型制备及干预方法 将实验大鼠采用鱼达^[5]

等随机分组方法分为5组:正常组,模型组,丙戊酸钠组,JYQG低、高剂量组。模型制备参照文献[6-7]的方法,于造模第1天起,模型组及药物干预组 ip PTZ,按照亚惊厥剂量给药37.5mg·kg⁻¹·d⁻¹,连用28d;同期正常组每日 ip 给予生理盐水1mL,连用28d。在造模的同时即开始药物干预,JYQG低、高剂量组分别给予中药混悬液586,1172mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig ;丙戊酸钠组 ig 给予丙戊酸钠溶液200mg·kg⁻¹,共28d,同期正常组和模型组则 ig 给予等体积生理盐水1mL。每只大鼠注射PTZ后观察2h,根据Racine分级标准^[8],凡连续5次达到Ⅱ级以上惊厥,或2次V级以上惊厥者,为达到点燃标准。

2.2 样本制备 实验大鼠于第28天灌药2h后用10%水合氯醛 ip 麻醉,迅速断头。采用文献[9]的海马制备方法,在低温环境剥离海马。然后将海马迅速移至研钵,加入适量的液氮,快速研磨,直至将组织研磨成粉末状,精密天平称重20mg放入EP管中,编号后暂存于液氮罐,取材结束后全部样本转移至-80℃超低温冰箱冻存。

2.3 海马氨基酸测定 采用高效液相色谱-四级杆离子阱串联质谱仪(HPLC-MS/MS Q-TRAP)检测海马中GABA, Glu的含量。

2.4 统计学方法 实验数据用SPSS 19.0统计软件包进行统计分析,大鼠发作潜伏期、惊厥持续时间及海马GABA, Glu含量用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠造模及死亡情况 70只SD大鼠,6只始终未达到点燃标准,弃用;5只大鼠死亡,最终参与统计分析大鼠为59只。

3.2 对戊四氮致痫大鼠发作潜伏期和惊厥持续时间的影响 连续给药28d后,用PTZ测试时,癫痫发作的潜伏期、惊厥持续时间作为行为学观察指标。与模型组比较,JYQG与丙戊酸钠干预后发作潜伏期延长、惊厥持续时间缩短($P < 0.01$);惊厥持续时间JYQG高剂量组优于低剂量组($P < 0.05$)。见表1。

3.3 对戊四氮致痫大鼠海马Glu, GABA含量的影响 模型组与正常组相比,海马Glu含量明显上升, GABA含量明显下降($P < 0.01$)。与模型组相比, JYQG高、低剂量组和丙戊酸钠组均可明显降低海马Glu含量,升高GABA含量($P < 0.05, P < 0.01$)。见表2。

表 1 病愈痊颗粒对戊四氮致痫大鼠发作潜伏期,惊厥持续时间的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of JYQG on convulsion duration and incubation period in rats with epileptic caused by pentetrazol ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	惊厥潜伏 时间/s	惊厥持续 时间/s
正常	-	13	-	-
模型	-	10	41.1 ± 2.7	233.9 ± 10.4
丙戊酸钠	200	11	275.3 ± 7.4 ²⁾	130.5 ± 8.6 ²⁾
JYQG	586	12	176.6 ± 11.4 ²⁾	181.2 ± 8.6 ²⁾
	1 172	13	190.3 ± 8.6 ¹⁾	130.6 ± 6.6 ^{1,4)}

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.01;与模型组比较²⁾ P < 0.05,³⁾ P < 0.01;与 JYQG 低剂量组比较⁴⁾ P < 0.05(表 2 同)。

表 2 病愈痊颗粒对戊四氮致痫大鼠海马氨基酸类神经递质含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of JYQG on contents of amino acid neurotransmitters in hippocampus of rats with epileptic caused by pentetrazol ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	Glu /μmol·L ⁻¹	GABA /μmol·L ⁻¹
正常	-	13	394.1 ± 8.2	200.6 ± 8.0
模型	-	10	460.8 ± 10.1 ¹⁾	110.9 ± 9.6 ¹⁾
丙戊酸钠	200	11	420.6 ± 6.5 ³⁾	128.4 ± 11.2 ³⁾
JYQG	586	12	418.7 ± 6.9 ³⁾	114.3 ± 7.1 ³⁾
	1 172	13	416.8 ± 6.5 ³⁾	126.1 ± 8.8 ³⁾

4 讨论

癫痫发病机制尚未明确,目前国内外专家主要从神经元电生理、神经元离子的分布和调控、中枢神经递质合成与代谢、免疫机制、神经细胞凋亡等方面进行研究^[10-11],脑内氨基酸类神经递质合成代谢异常与癫痫发作密切相关已成专家共识。Glu, GABA 分别代表着兴奋性神经递质与抑制性神经递质,在维持中枢神经系统的兴奋与抑制的平衡方面有着非常重要的作用,二者在代谢上相互转化,在作用上相互协调。GABA 由谷氨酸经过谷氨酸脱羧酶(GAD)作用而合成,脑组织损伤后,神经元细胞凋亡增加,可导致 GAD 活性降低,从而使抑制性作用减弱。脑组织中 Glu 和 GABA 在“谷氨酸-谷氨酰胺-γ-氨基丁酸”循环通路中代谢异常是导致癫痫发作的重要因素。

JYQG 主要由石膏、僵蚕、蝉蜕、钩藤、滑石、沉香、白马蹄、朱砂等 9 味药物组成,经本院药剂科制成颗粒剂。该药具有清热涤痰、熄风止痉的功效,方

中生石膏辛甘大寒,清肺胃之大热,僵蚕祛风解痉、化痰散结,二者共奏清热化痰、熄风止痉之功,共为君药;滑石助生石膏清热化痰,白马蹄归肝经,有定惊熄风之功,二者共为臣药;雄黄燥湿化痰、熄风定痫,朱砂、蝉蜕安神定惊,钩藤平肝熄风共为佐药;沉香降气涤痰,为使药。诸药共奏清热涤痰、熄风定痫之效。本研究结果显示:JYQG 可以延长模型大鼠发作的潜伏期,缩短惊厥持续时间及降低海马 Glu 含量、提高 GABA 的含量,据此可推测 JYQG 抗癫痫作用机制可能是通过调节脑内 Glu, GABA 能系统平衡实现的。

[参考文献]

- [1] 王卫平. 儿科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:392-400.
- [2] 杨国娟. 抗痫煎剂对实验性癫痫大鼠海马氨基酸含量的影响[D]. 广州:广州中医学院, 2011.
- [3] 张永全, 杨国娟. 抗痫煎剂对实验性癫痫大鼠脑内氨基酸含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 672-673.
- [4] 马丽华. 发育期遗传性癫痫大鼠海马组织 Glu 与 GABA 循环通路重要靶点的研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2013.
- [5] 鱼达, 李辉, 姜骊. 实验动物随机分组的计算机程序处理[J]. 实验动物科学, 2011, 28(1): 25-27.
- [6] 张永全, 杨国娟. 抗痫煎剂对实验性癫痫大鼠脑内氨基酸含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 672-673.
- [7] Martina E V, Uta R. Pentylentetazole (PTZ) induced c-fos expression in the hippocampus of kindled rats is suppressed by concomitant treatment with treatment with naloxone[J]. Brain Res, 1998, 792(2): 299-308.
- [8] 方好, 杨建英, 杨东东. 癫痫化学点燃效应整体动物模型研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(3): 179-180.
- [9] 黄永凯, 方芳, 罗湘颖, 等. 新生大鼠海马的显微手术入路[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(2): 150-152.
- [10] Reid C A, Jackson G D, Berkovic S F, et al. New therapeutic opportunities in epilepsy: A genetic perspective [J]. Pharmacol Ther, 2010, 1289(2): 274-280.
- [11] Löscher W, Schmidt D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver; ways out of the current dilemma[J]. Epilepsia, 2011, 52(4): 657-678.

[责任编辑 聂淑琴]