

# 柴胡疏肝汤对难治性癫痫大鼠脑电图及多药耐药蛋白 P-糖蛋白表达的影响

谢炜<sup>1\*</sup>, 史国军<sup>2</sup>, 李长征<sup>1</sup>, 鲍勇<sup>1</sup>, 于林<sup>2</sup>, 于云红<sup>2</sup>, 杜念念<sup>2</sup>

(1. 南方医科大学南方医院中医科, 广州 510515; 2. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的: 探讨柴胡疏肝汤对锂-匹罗卡品致难治性癫痫模型大鼠脑电图变化以及多药耐药蛋白 P-糖蛋白(P-gp) 表达的影响。方法: 将制备成功的 50 只 SD 难治性癫痫大鼠模型随机分为 5 组, 模型组(B)、丙戊酸钠(VPA)组(C)、柴胡疏肝汤低(D)、中(E)、高(F)剂量组, 每组各 10 只, 另有空白对照组(A) 10 只。柴胡疏肝汤是以柴胡桂枝汤和四物汤为基础方加味煎煮浓缩而成, 含生药  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。VPA 组用量为  $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 柴胡疏肝汤低、中、高浓度依次为  $4.5, 9, 18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 空白组和模型组给予等量生理盐水。各组均 ig 给药 8 周, 给药结束后检测各组大鼠脑电图以及海马、颞叶皮层 P-gp 蛋白的表达。结果: 脑电图: A 组无痫性波出现, B 组出现大量的痫性波, C, D, E, F 组能不同程度的减少脑电图的痫性波, 以 F 组最明显。在大鼠海马区、颞叶皮层, Western blotting 检测各组 P-gp 表达, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与 A 组相比, 其余各组 P-gp 表达水平明显增强( $P < 0.01$ ); 与 B 组相比, C 组表达水平增加( $P < 0.01$ ), D, E, F 组表达水平降低, 以 F 组最明显( $P < 0.01$ )。结论: VPA 明显增强难治性癫痫模型大鼠脑内海马、颞叶皮质 P-gp 蛋白的表达, 柴胡疏肝汤低、中、高剂量均可以降低海马、颞叶皮层 P-gp 蛋白的表达以及脑电图的痫性放电, 以高剂量组明显。

[关键词] 难治性癫痫; 中医药; 脑电图; 多药耐药; P-糖蛋白; 柴胡疏肝汤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0128-04

## Effect of Chaihu Shugan Tang on Electroencephalogram and Expression of Multidrug Resistance Protein P-glycoprotein of Refractory Epilepsy

XIE Wei<sup>1</sup>, SHI Guo-jun<sup>2</sup>, LI Chang-zheng<sup>1</sup>, BAO Yong<sup>1</sup>, YU Lin<sup>2</sup>, YU Yun-hong<sup>2</sup>, DU Nian-nian<sup>2</sup>

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Chaihu Shugan Tang on EEG and expression of multidrug resistance protein P-gp of refractory epilepsy rats induced by licl-pilocarpine. **Method:** Except for blank control group(A), 50 Sprague-Dawley refractory epilepsy rats were randomly divided into five groups: model group(B group), VPA group(C group), low, middle, high dose of Chaihu Shugan Tang groups(D, E, F group). Chaihu Shugan Tang was decocted and concentrated into  $1 \text{ g}$  crude drug/mL. C group is administrated for  $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , D, E, F group is  $4.5, 9, 18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , the same amount of saline was given to A, B group. After the intragastric administration for 8 weeks each group, EEG was recorded and the protein P-gp was detected in rat hippocampus and temporal cortex in each group. **Result:** There was no epileptic wave in A group, but much more epileptic wave in B group. Epileptic wave were decreased in C, D, E, F groups compared with B group. Expression of P-gp by Western blotting was different in each group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** VPA increases expression of multidrug resistance

[收稿日期] 20100720(007)

[基金项目] 广东省科技计划课题(2008B080701028), 广东省医学科研基金(B2009135)

[通讯作者] \* 谢炜, 博士, 教授, 主任医师, 主要从事中西医结合脑病临床及基础研究, Tel: 020-61641672, E-mail: xiewein@fimmu.com

protein P-gp in rat hippocampus and temporal cortex. Chaihu Shugan Tang decreases expression of P-gp and epileptic wave. High dose of Chaihu Shugan Tang is the most efficient.

**[Key words]** refractory epilepsy; traditional Chinese medicine; electroencephalogram; multidrug resistance; P-glycoprotein; Chaihu Shugan Tang

癫痫是一类由多种原因导致的脑部神经元高度同步化异常放电所引起的以短暂中枢神经系统功能失常为特征的临床综合征。大多数癫痫患者经过一段时间的正规药物治疗后,病情可以得到控制,但仍有少数患者,药物治疗并不能够减轻发作的频率和强度,称为难治性癫痫(refractory epilepsy, RE)。RE预后差,常伴有智能障碍和神经缺损,因此了解 RE 的发生机制并寻找有效的治疗方法十分必要。中医药治疗癫痫历来“从痰论治”,本课题组提倡癫痫“从肝论治”,自拟“柴胡疏肝汤”,治疗 RE 取得了较好疗效。本研究建立了氯化锂-匹罗卡品 RE 模型,拟进一步探讨柴胡疏肝汤抗 RE 的机制以及脑电图的变化。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 SPF 级 SD 大鼠,体重 180 ~220 g,由南方医科大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(粤)2006-0015。

**1.2 药品、试剂与仪器** 氯化锂(lithium chloride)(Sigma 公司,批号 115K1308);盐酸匹罗卡品(pilocarpine, Sigma 公司,批号 066k1730);丙戊酸钠(VPA,广谱抗癫痫药)片剂(杭州赛诺菲圣德拉保民生制药有限公司,批号 0402049);小鼠抗大鼠 P-糖蛋白单克隆抗体(C219)(abcam 公司,货号 ab3364);羊抗小鼠 IgG-HRP(武汉博士德生物工程有限公司);监视器以及视频采集系统(广州鹰保智能设备有限公司);EEG-4418K 型脑电图仪(NIHON KOHDEN 公司);柯达 2000MM 全光谱多功能活体成像系统(美国 Kodak 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模方法** 参照王本国<sup>[1]</sup>等人的方法,小剂量反复 ip 匹罗卡品制备颞叶癫痫大鼠模型。100 只 SD 大鼠,除 10 只空白对照(A)外,其余 90 首日 ip 氯化锂( $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),18 ~24 h 后 ip 阿托品  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,30 min 后 ip 匹罗卡品( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。如未出现癫痫持续状态(status epilepticus, SE),则每隔 30 min 继续 ip 匹罗卡品( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),直至大鼠出现 SE 后停止注射。待 SE 出现 60 min, ip10% 的水合

氯醛( $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )终止发作。痫性发作行为观察,参照 Racine 标准<sup>[2]</sup>,0 级:无发作反应;Ⅰ级:节律性口角、耳或面部肌肉抽动阵挛;Ⅱ级:点头并伴随更严重的面部肌肉抽动阵挛;Ⅲ级:出现前肢阵挛但不伴随直立;Ⅳ级:前肢阵挛伴随直立;Ⅴ级:全身强直阵挛发作而跌倒。Ⅴ级以上发作为成功的癫痫持续状态模型。未达到Ⅰ~Ⅳ级发作的弃用。

**2.2 筛选实验动物** 癫痫状态后的大鼠在经过 24 h 的急性期后,进入 10 ~15 d 左右的潜伏期,每天给予 5% 糖盐水 5 mL, ip, 2 次/d。15 d 后进入 4 周慢性期,进行 Vedio 监测。按照以上标准,Ⅴ级以上发作为成功的癫痫自发发作模型。将成功的癫痫自发发作模型大鼠随机分为 5 组,模型组(B)、VPA 组(C)、柴胡疏肝汤低(D)、中(E)、高(F)剂量组。

## 2.3 给药

**2.3.1 药物配制** 柴胡疏肝汤药物组成及制备:本方由柴胡、党参、半夏、桂枝、黄芩、白芍、当归、川芎、生地、甘草、生姜、大枣、生龙骨、生牡蛎、钩藤组成,煎煮至质量浓度按生药量计  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。VPA 用生理盐水配制成  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液,应用超声恒温水浴振荡器震荡 12 h 助溶。

**2.3.2 给药方法** 空白组和模型组常规饲养给予等量生理盐水 ig, VPA 组用量为  $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 柴胡疏肝汤低、中、高剂量依次为  $4.5, 9, 18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各组大鼠均连续 ig 治疗 8 周。

## 2.4 记录难治性癫痫动物模型的制备和存活情况

**2.5 脑电图描记** 8 周治疗结束时,以上每组随机各取 3 只大鼠进行脑电图描记。电极埋置方法参照文献<sup>[3]</sup>方法。采用 EEG-4418K 型脑电图仪描记各组大鼠脑电图,纸速  $30 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ ,时间常数 0.1 s,滤波 35 Hz,增益  $10 \mu\text{V} \cdot \text{mm}^{-1}$ ,定标为  $50 \mu\text{V}/5 \text{ mm}$ ,连续描记 5 min。

**2.6 Western blotting 检测** 治疗结束时,每组随机取 3 只大鼠,麻醉后,断头取脑,冰上迅速分离海马、颞叶皮层,放入  $-80^\circ\text{C}$  低温冰箱保存。蛋白裂解后,BCA 法定量,制备 SDS-PAGE 凝胶,加样电泳,待溴酚蓝电泳至分离胶底部时结束电泳。采用湿转法转

膜,将 PVDF 膜浸入含 5% 脱脂奶粉 TBST 封闭液中,置于水平摇床上,室温封闭 1 h,然后用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min。用 TBST 配制一抗(小鼠抗大鼠 P-gp 1 25),将 PVDF 膜放入配好的抗体稀释液中,4 过夜, TBST 清洗 3 次,每次 10 min;放入用 TBST 配制 HRP 标记的二抗(羊抗小鼠 IgG 1 2 000),室温 1 h。二抗孵育完后, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;吸干多余的 TBST,用 BeyoECl plus 发光液显影(A 液与 B 液 1 1 配置), Kodak Image Station 2000MM 成像系统采集图像,用图像处理软件 Image Tool 3.0 分析各蛋白条带的灰度值,用 P-gp/  $\beta$ -actin 代表蛋白条带的灰度比值。

**2.7 统计学方法** 数据用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 难治性癫痫模型的制备、存活情况** 在实验过程中,共对 90 只大鼠点燃制备难治性癫痫模型。其中 8 只大鼠反复给予匹罗卡品,始终无法诱发出 SE,故弃用,其余 82 只大鼠在首次或追加匹罗卡品后开始出现痫性发作,并逐步达到 SE。在急性期(24 h)内,有 11 只大鼠因癫痫频繁抽搐而死亡。在潜伏期内(2 周),因频繁抽搐以及不能自主进食衰竭死亡共 13 只,多在 SE 后 1 周死亡,进入慢性期。在慢性期 4 周,存活的大鼠均出现自发发作,发作级别从 1 级逐渐发展至 5 级,无致痫大鼠死亡,共有 58 只大鼠存活,进入筛选。筛选出 50 只模型大鼠,根据随机数字表,分为 B, C, D, E, F 剂量组,每组 10 只,另有 A 组 10 只。各组给药期间,除 B 组大鼠有 1 只死亡外,其余大鼠均存活至治疗结束。

**3.2 对各组大鼠脑电图的影响** A 组大鼠皮质及海马脑电图以基础波即  $\alpha$  波为主,无明显节律性;B 组大鼠出现散在性痫波,多为棘波、尖波、棘慢复合波,出现大量痫性放电;C, D, E, F 组均可见到散在的棘波、尖波出现,而以 F 组出现的最少。表明 VPA 和柴胡疏肝汤各剂量组均能抑制大鼠的痫性放电,以柴胡疏肝汤高剂量组明显。各组大鼠脑电图见图 1。

**3.3 Western blotting 法检测 P-gp 在海马和颞叶皮层的表达** 如表 1 所示,在大鼠海马区, Western Blotting 检测各组 P-gp 表达的灰度比值差异有统计

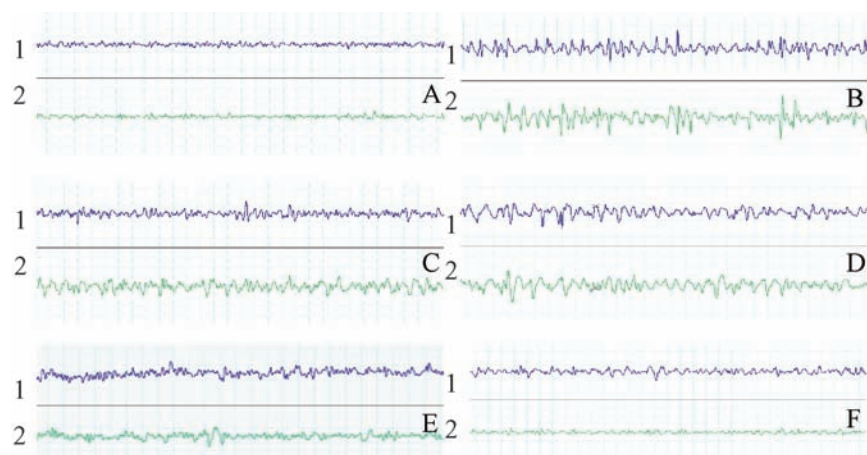


图 1 癫痫自发发作模型大鼠治疗 8 周后各组大鼠脑电图

A. 空白对照组; B. 模型组; C. VPA 组 ( $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ );  
D. 柴胡疏肝汤  $4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; E. 柴胡疏肝汤  $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;  
F. 柴胡疏肝汤  $18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; 1. 代表皮质, 2. 代表海马

学意义( $P < 0.001$ )。结果表明,给药后 VPA 明显增强 P-gp 蛋白的表达,柴胡疏肝汤中、高剂量均可以降低海马区 P-gp 蛋白的表达,以高剂量组明显。在大鼠颞叶皮质, P-gp 表达的灰度比值差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。结果表明,给药后柴胡疏肝汤中、高剂量均可以降低颞叶皮质 P-gp 蛋白的表达,以高剂量组明显。

表 1 癫痫自发发作模型大鼠治疗 8 周后各组大鼠海马和颞叶皮质 P-gp 的灰度比值( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

分组	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	海马 P-gp	颞叶 P-gp
空白	-	$0.391 \pm 0.066$	$0.251 \pm 0.016$
模型	-	$0.758 \pm 0.033$	$0.617 \pm 0.020$
VPA	0.2	$0.914 \pm 0.037^{1)}$	$0.648 \pm 0.043$
柴胡疏肝汤	4.5	$0.705 \pm 0.056^{3,5)}$	$0.588 \pm 0.033^{2,5)}$
	9	$0.635 \pm 0.017^{1,3,4)}$	$0.512 \pm 0.028^{1,3,5)}$
	18	$0.519 \pm 0.062^{1,3)}$	$0.360 \pm 0.025^{1,3)}$

注:与模型组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 VPA 组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,  
<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; 与柴胡疏肝汤高剂量组相比<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 4 讨论

癫痫属于中医“痫病”范畴,“诸暴强直,皆属于风……诸风掉弦,皆属于肝”。痫病的病机与肝的疏泄功能异常关系密切,其风、痰、瘀产生均为肝失疏泄、条达的病理变化,因而治肝是痫病的关键所在。现代名医熊辅信和陈宝田教授治疗上紧紧抓住“气、风、痰、瘀”四个方面,尤推崇癫痫“从肝论治”。本课题治疗癫痫,从肝立论,创立柴胡疏肝汤,该方以柴胡桂枝汤为底方,配四物汤,加生龙牡、钩藤组成,具有疏肝养肝、柔肝平肝、镇肝潜阳之效。

近年受到肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)机制的启示,多药转运体在癫痫患者脑内的

表达受到关注。研究发现 RE 患者脑内特别是血脑屏障部位存在多药转运体和药物靶酶的高表达<sup>[4]</sup>,可能参与了 RE 的耐药,目前认识较多的是 P-gp。若脑内 P-gp 表达增高,毛细血管内皮细胞管腔侧的 P-gp 可将抗癫痫药物(AEDs)泵回血中,导致药物扩散入脑的数量减少,导致 RE 多药耐药的发生。研究发现 RE 患者颞叶海马血管内皮细胞、胶质细胞、神经元内 P-gp 的表达显著增加<sup>[5]</sup>。P-gp 过度表达与癫痫发作有关,但也与使用 AEDs 产生诱导有关。在体外培养脑星形胶质细胞的实验表明,常用 AEDs 如 PB、VPA 等作用一段时间后,细胞 MDR1 表达均有不同程度增强,且与剂量、时间有关,提示 P-gp/MDR1 表达增强可能与抗癫痫药物的诱导有关<sup>[6]</sup>。药物诱导 MDR1 的过度表达的机制尚未明确。有学者认为,转录水平的调节是最重要的调节途径。药物作为外源性刺激剂,通过增加 DNA 甲基转移酶活性或其他机制,促进 MDR1 启动区 CpG 位点去甲基而激活 MDR1 的转录是该途径的最后通路<sup>[7]</sup>。

我们的研究结果提示,模型组和 VPA 组脑内 P-gp 蛋白的表达较正常组增强,VPA 组更明显,这与既往报道相一致。而柴胡疏肝汤低、中、高剂量均可以不同程度的降低脑内 P-gp 蛋白的表达,减少脑电图的痫性波,以柴胡疏肝汤高剂量组明显,此发现可能为中医药治疗 RE 提供了新的途径。课题组前期研究也发现,柴胡疏肝汤中柴胡及其主要成分总皂苷有镇静和实验性抗惊厥作用<sup>[8]</sup>,具有对抗小鼠 PTZ 致痫作用。本研究结果提示中药柴胡疏肝汤具有抑制多药耐药蛋白的表达作用,但其内在的机制是什么,中药复方柴胡疏肝汤对多药耐药蛋白表达的调节作用与其高表达的机制之间存在何种联系,

这些问题有待于进一步研究、探讨。

#### [参考文献]

- [1] 王本国,廖卫平,罗爱华. 氯化锂联合匹罗卡品小剂量多次注射诱发癫痫持续状态模型的研究[J]. 广东医学,2006,27(6):810.
- [2] RACINE R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3):281.
- [3] 黄运生,谢炜,陈宝田. 柴胡皂甙对癫痫大鼠脑电的影响[J]. 第一军医大学学报,2004 24(12):1379.
- [4] Kubota H, Ishihara H, Langmann T, et al. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis [J]. *Epilepsy Res*, 2006, 68(3):213.
- [5] Lazarowski A, Czornyj L, Lubienieki F, et al. ABC transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2007, 48(Suppl 5):140.
- [6] 吕洋,晏勇,王学峰,等. 抗癫痫药体外诱导鼠星形胶质细胞多药耐受基因 P-糖蛋白的表达 [J]. 中华神经科杂志,2001,34(1):36.
- [7] Nakama M, Wada M, Haradea T, et al. Hypomethylation status of CPG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 1998, 92(11):4296.
- [8] 谢炜,鲍勇,于礼建,等. 柴胡总皂甙对 PTZ 慢性点燃大鼠痫性发作及脑电图的影响 [J]. 南方医科大学学报,2006,26(2):177.

[责任编辑 聂淑琴]