

愈痫灵颗粒对戊四氮致痫大鼠海马神经生长因子 与认知功能的影响

李智雄¹, 尹烨², 王净净^{1*}, 谢静涛¹, 李进安³, 黄云峰⁴, 丁志高¹, 朱百科⁵, 李振光⁶
(1. 湖南中医药大学, 长沙 410007; 2. 广东省江门市五邑中医院, 广东 江门 529000;
3. 重庆市三峡中心医院, 重庆 万州 404000; 4. 湖南长沙市中心医院, 长沙 410007;
5. 山东省济南市第五人民医院, 济南 250022; 6. 湖南省脑科医院, 长沙 410007)

[摘要] 目的:探讨愈痫灵颗粒对痫性大鼠海马区神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及认知功能的影响。方法:选取150只清洁级SD大鼠,随机选取10只作为正常组;其余动物用戊四氮(PTZ)造模。将符合模型标准的大鼠随机分为4组,ig给药,即愈痫灵颗粒组、丙戊酸钠组、拉莫三嗪组给药剂量分别为 $810\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $122\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $10.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,模型组、正常组每天给予同等体积蒸馏水。每天1次,连续给药28d后,用开场实验(open field test)测定大鼠认知功能变化,采用免疫组织化学方法观察NGF的表达。结果:与模型组相比,愈痫灵颗粒能显著提高戊四氮致痫大鼠的开场实验成绩,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);愈痫灵颗粒能提高NGF阳性细胞平均灰度值和降低NGF阳性细胞平均吸光度,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。结论:降低致痫大鼠海马区NGF的表达是愈痫灵颗粒改善戊四氮致痫大鼠认知功能的可能机制之一。

[关键词] 愈痫灵颗粒;癫痫;戊四氮;开场实验;认知障碍;神经生长因子

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)06-0184-04

Effect of Yuxianling Granules on the NGF of Hippocampus and Cognitive Function in Rats with Epilepsy Induced by Pentylentetrazol

LI Zhi-xiong¹, YIN Ye², WANG Jing-jing^{1*}, XIE Jing-tao¹, LI Jin-an³,
HUANG Yun-feng⁴, DIN Zhi-gao¹, ZHU Bai-ke⁵, LI Zheng-guang⁶

(1. Traditional Chinese Medicine University of Hunan, Changsha 410007, China;
2. Jiangmen Wuyi Hospital of Traditional Chinese Medicine,
Jiangmen 529000, China; 3. Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China;
4. Changsha Central Hospital, Changsha 410004, China; 5. Jinan Fifth Peoples' s Hospital,
Jinan 250022, China; 6. Brain Hospital of Hunan, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Yuxianling granule (YXLG) on the hippocampal nerve growth factor (NGF) and cognitive function in epileptic rats. **Method:** 150 SD rats were used for the experiment, and 10 of them were randomly selected as the blank control group. The rest animals were treated with pentylentetrazol (PTZ) to establish the model. The rats consisting with the model standard were divided randomly into 4 groups, including model group, YXLG group, sodium valproate group and lamotrigine group. . Using gavage administration, the drug doses were $810\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $122\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $10.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ accordingly. The model group and control group were given the same volume of distilled water daily. All the treatment was 1 times daily, lasted for 28 d. The animals were

[收稿日期] 20100115(004)

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(08JJ5001);湖南省教育厅重点课题资助科研项目(06A051)

[通讯作者] *王净净, Tel: (0731)85381113, E-mail: wangjingjing0312@ yahoo. com. cn

tested by open field test for measuring changes in cognitive function. Immunohistochemical method was employed to observe the expression of NGF. **Result:** Compared with the model group, YXLG could increase the opening test results in rats with pentylenetetrazol-induced epilepsy, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). YXLG could enhance the average gray value of NGF-positive cells and reduce the average optical density of NGF-positive cells, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** The reason that YXLG improves the cognitive function of the epileptic rats may be related with the reduced expression of NGF in epileptic rats.

[**Key words**] Yuxianling granule; epilepsy; pentylenetetrazol; open field test; cognitive impairment; nerve growth factor

癫痫是一种常见的慢性脑部疾病,抗癫痫药是癫痫治疗的主要手段,它对认知障碍的影响广受关注。愈痫灵颗粒(Yuxianling granule, YXLG)为湖南省老中医王净净长期治疗癫痫(中医辨证属痰瘀阻络型)而总结出来的经验方,临床疗效满意。许多研究^[1-3]表明 YXLG 具有抗癫痫与改善认知障碍的作用,但其机制不甚清楚。该研究应用戊四氮(pentylenetetrazol, PTZ)诱导大鼠癫痫发作,以常规抗癫痫药物丙戊酸钠与对认知障碍有改善作用的新一代抗癫痫药拉莫三嗪为阳性对照,采用随机对照和单药干预的方法,应用开场实验与免疫组织化学方法,从实验角度探讨愈痫灵颗粒抗癫痫作用及对认知功能的影响。

1 材料

1.1 动物 SD 健康大鼠 150 只,雌雄各半,清洁级,体重(170 ± 10)g,由中南大学湘雅医学院实验动物部提供[合格证号 SCXK(湘)-2006-0002]。

1.2 药物 愈痫灵颗粒(由川芎、丹皮、地龙、红花、石菖蒲、冰片等 13 味组成)由湖南中医药大学第一附属医院药剂科制备成每克提取物相当于生药 4 克的颗粒剂;丙戊酸钠片(VPA),湖南省湘中制药有限公司,国药准字 H43020874,批号 070521;拉莫三嗪片,三金集团湖南三金制药有限责任公司,国药准字 H20050596,批号 080304。

1.3 试剂 戊四氮(PTZ),美国 Alfa Aesar 公司产品;即用型 SABC 试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司;神经生长因子(NGF, AS20): sc-52786, Santa Cruz Biotechnology, INC;其余皆为国产分析纯,所有用水均为双蒸水。

1.4 仪器 上海精密科学仪器有限公司 JY3002 型电子天平,德国 Leica 公司 LEICA DM LB2 型双目显微镜,北航公司 MIAS 医学图象分析系统,英国 Shandon 公司 Shandon325 型石蜡切片机,上海精宏

实验设备有限公司 DNP-9162 型电热恒温培养箱,麦克奥迪实业集团公司 Motic B5 显微摄像系统,跳台仪在小鼠跳台仪基础上改进自制。

2 方法

2.1 造模方法及评定标准 以生理盐水新鲜配制浓度为 1.75% PTZ 溶液,每天上午 8:30 准时 ip 给予 35 mg/kg,诱发 SD 大鼠全身强直-阵挛发作,并在注射 PTZ 后观察 1 h 内动物异常行为表现、发作级别和程度。连续处理 28 d,参照 Fathollahi^[4]标准,依据惊厥程度将行为表现分为 6 级。凡连续 5 d 惊厥程度达到 IV 级以上者,停药 1 周,再以相同剂量 PTZ 复燃。惊厥程度达到 IV 级以上者,视为造模成功大鼠。正常组 ip 予体积相同生理盐水。

2.2 分组与给药方法 大鼠先按体重分层,再随机抽取 10 只设为正常组(简称 Normal 组),余皆用 PTZ 造模。从造模成功鼠中随机取 80 只作为实验动物,再随机分为模型组(简称 Model 组)、愈痫灵颗粒组(简称 YXLG 组)、丙戊酸钠组(简称 VPA 组)、拉莫三嗪组(简称 LTG 组),每组 20 只。均 ig 给药,以 60 kg 人为标准,参照剂量-体表面积换算方法^[5]计算大鼠给药量,药物浓度按大鼠 ig $1 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ 容量用蒸馏水配制, YXLG 每克颗粒剂相当于生药 4 g, YXLG 组 $810 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; VPA 组 $122 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; LTG 组 $10.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,正常组、模型组每天给予同等体积蒸馏水。每天 1 次,连续处理 28 d 后检测指标。

2.3 开场实验 用于评估大鼠对新环境的行为反应,测试大鼠的运动能力和探索空间的能力。参见文献^[6]方法,记录大鼠在 60 s 内越格数(格),连续 2 次~3 次、每次间隔 20 s(休息时移出实验箱)。干预结束后进行测试,连续 2 d。第 1 天越格数记为对新环境的兴奋性成绩,第 2 天越格数记为运动成绩。

2.4 免疫组织化学方法检测 NGF 表达 取材参见文

献[3]方法,迅速取出双侧海马组织,按常规固定、脱水、切片,切片厚 10 μm。采用亲和素-生物素-过氧化物酶技术(SABC 法)检测大脑海马组织中 NGF 的表达。兔抗鼠 NGF 单克隆抗体,稀释度为 1:100。

2.5 图像分析 用显微镜(德国 Leica 公司)和 Mias2000 图像分析系统采集图像。每张切片随机选取 5 个相邻视野,以切片背景的灰度值作背底校正,对每张切片海马区 NGF 免疫反应产物进行灰度测定。

2.6 统计学方法 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料满足正态性及方差齐性者多组样本均数间比较用 *F* 检验,两两之间比较用 *q* 检验,方差不齐者用 Tamhane's T2 检验,运用 SPSS15.0 统计软件包进行处理。所涉及的统计学检验均以 *P* < 0.05 作为差异有统计学意义,采用双侧检验。

3 结果

3.1 愈痫灵颗粒对戊四氮致痫大鼠开场实验的影响 与模型组相比,愈痫灵颗粒和拉莫三嗪能显著提高戊四氮致痫大鼠的开场实验成绩,差异有显著统计学意义(*P* < 0.01)。提示愈痫灵颗粒对戊四氮致痫大鼠的认知功能有改善作用。见表 1。

表 1 愈痫灵颗粒对致痫大鼠认知功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	<i>n</i>	兴奋性 成绩/分	运动 成绩/分
正常	—	10	17.00 ± 6.45	17.80 ± 0.45
模型	—	15	10.13 ± 6.06 ¹⁾	12.26 ± 0.64 ¹⁾
丙戊酸钠	122	18	9.75 ± 5.30 ¹⁾	12.59 ± 0.92 ¹⁾
拉莫三嗪	10.1	18	14.64 ± 7.54 ^{2,3)}	15.48 ± 0.65 ^{1,2,3)}
愈痫灵颗粒	810	16	15.03 ± 6.37 ^{2,3)}	15.71 ± 1.11 ^{1,2,3)}

注:与正常组比较,¹⁾*P* < 0.01;与模型组比较,²⁾*P* < 0.01;与丙戊酸钠组比较,³⁾*P* < 0.01(下同)。

3.2 愈痫灵颗粒对戊四氮致痫大鼠海马 NGF 表达的影响 与模型组相比,愈痫灵颗粒能提高 NGF 阳性细胞平均灰度值和降低 NGF 阳性细胞平均光密度,差异有显著统计学意义(*P* < 0.01)。提示愈痫灵颗粒下调致痫大鼠海马区 NGF 的表达。见表 2。

表 2 愈痫灵颗粒对戊四氮致痫大鼠海马 NGF 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	阳性细胞 平均灰度值	平均 吸光度
正常	—	14 095.55 ± 119.23	15.20 ± 0.47
模型	—	9 223.52 ± 150.34 ¹⁾	20.92 ± 0.64 ¹⁾
丙戊酸钠	122	9 310.91 ± 100.12 ¹⁾	21.33 ± 0.20 ¹⁾
拉莫三嗪	10.1	13 669.84 ± 618.50 ^{2,3)}	15.33 ± 0.23 ^{2,3)}
愈痫灵颗粒	810	13 896.47 ± 237.55 ^{2,3)}	15.54 ± 0.32 ^{2,3)}

4 讨论

癫痫发作是导致癫痫患者认知功能障碍的主要原因之一。癫痫患者及致痫动物可以出现记忆力、计算力和思维能力等的下降,且发病率较高。该实验亦证实 PTZ 诱导癫痫发作后,癫痫模型鼠开场实验认知功能受损,提示癫痫发作可导致认知障碍。海马是学习记忆的关键部位,参与学习和记忆、认知、突触可塑性和神经发育等重要的生理功能。研究显示癫痫发作导致一系列复杂的病理过程,引起海马锥体细胞坏死和凋亡,最终影响海马突触的可塑性,使长时程增强明显受到抑制,出现学习、记忆功能损害。

开场实验主要反映动物的兴奋性、对陌生环境的适应能力、紧张程度及空间认知功能变化,实验显示造模成功后致痫大鼠存在认知功能损害,药物干预后示丙戊酸钠无明显认知障碍改善作用,拉莫三嗪和 YXLG 对认知障碍有改善作用。各组分别 ig28d 后,正常组无死亡;模型组死亡 5 只,剩余 15 只;愈痫灵颗粒组死亡 4 只,剩余 16 只;拉莫三嗪组、丙戊酸钠组各死亡 2 只,每组剩余 18 只。干预过程中因 ig 手法不熟练导致痫性发作及灌入肺内致大鼠死亡 12 只,愈痫灵颗粒组致胃穿孔死亡 1 只。干预过程中抗癫痫药物组较模型组出现痫性发作事件少,因此死亡率较模型组低。前期研究证实^[7]YXLG 所含有的川芎、丹皮均能降低细胞内 [Ca²⁺]_i,可通过血脑屏障,改善局部血液微循环状况,扩张脑血管,保护脑神经;石菖蒲、全蝎、蜈蚣则有抗癫痫发作敏感性形成的作用。诸药合用,可以有效改善癫痫灶局部缺血和神经元 Ca²⁺ 超载,改善大鼠癫痫发作期脑部微循环障碍与能量代谢障碍,从而达到保护癫痫发作时异常放电对脑组织的病理损害。该实验证实愈痫灵颗粒能降低致痫大鼠海马区 NGF 的表达。

NGF 作为一种经典的神经元营养因子,对神经元的生存、分化、生长和代谢起着重要作用,特别对轴突的存活、再生和功能的维持发挥营养作用。海马是神经系统中 NGF 含量较高的结构之一,在信息整合、储存和传递过程中起着至关重要的作用,因而它对维持机体正常的学习记忆是非常关键的结构。研究显示^[8]NGF 对脑缺血有确切的保护和治疗作用,其机制可能包括:①抗自由基作用;②拮抗兴奋性氨基酸的神经毒性;③维持细胞内 Ca²⁺ 的稳态;

④抑制神经细胞凋亡;⑤促进受损神经细胞功能恢复。同时神经生长因子和 NGF 受体已证明与胆碱能神经支配有关,NGF 可挽救衰老或胆碱能损伤动物的变性神经元,并伴有空间定位能力的恢复。但也有研究^[9]显示 NGF 对戊四氮有同化作用,可缩短大鼠癫痫潜伏期,使发作次数增多,致痫鼠病死率明显提高。有报道示 NGF 参与异常轴突生长和突触的重建,可促进苔藓纤维芽生,而苔藓纤维芽生是癫痫反复发作的病理学基础。因此 YXLG 改善致痫大鼠学习、记忆能力的机制可能是下调 NGF 的过高表达,发挥 NGF 的正常生物活性,保护中枢神经系统对抗代谢性和兴奋性氨基酸毒性损伤,维持细胞内 Ca^{2+} 的稳态,抗自由基和抑制神经细胞凋亡,促进受损神经细胞功能恢复,改善致痫大鼠已受损的海马胆碱能投射系统的功能,最终使其学习,记忆能力明显改善。

[参考文献]

[1] 王净净,李振光,邓元江,等. 愈痫灵抗癫痫作用的临床研究[J]. 中国医师杂志,2001,3(11):821.
[2] 王净净,张晓霞. 愈痫灵对致痫大鼠海马神经元 CaM 和 CaMK II α 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2006,26(5):21.

[3] 李智雄,尹焱,谢静涛,等. 愈痫灵颗粒对戊四氮致痫大鼠海马 CA3 区超微结构及认知功能障碍的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2009,29(3):17.
[4] Fathollahi Y, Motamedi F, Semnani S, *et al.* Examination of persistent effects of repeated administration of pentylenetetrazol on rat hippocampal CA1: evidence from in vitro study on hippocampal slice[J]. Brain Res, 1997, 258:92.
[5] 贺石林,王健,王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 2 版. 长沙:湖南科学技术出版社,2001:48.
[6] 李素霞,黄明生,王雪. 3,4-亚甲二氧基甲基苯丙胺的开场试验研究[J]. 中国行为医学科学, 2004,13(1):26.
[7] 王净净,韩萌,张晓霞,等. 愈痫灵对戊四氮点燃癫痫大鼠钙离子的干预作用[J]. 中华中医药杂志,2005,20(10):628.
[8] Altar AC, Armanini M, Dugich-Djordjevic M. Recovery of cholinergic phenotype in the injured rat neostriatum: role for endogenous nerve growth factor [J]. J Neurochem, 1992,59:2167.
[9] 赵小林,倪鑫,路长林. 神经生长因子对戊四氮诱导的大鼠癫痫的同化作用[J]. 中国生化药物杂志,2000,21(6):284.

[责任编辑 聂淑琴]