

# 熄风胶囊对癫痫小鼠皮质层神经元型一氧化氮合酶表达的影响

秦晓勇<sup>1\*</sup>, 詹曦菁<sup>2</sup>, 熊杰<sup>1</sup>

(1. 武警医学院附属医院中医理疗科,

天津 300162;

2. 武警医学院微生物教研室, 天津 300162)

癫痫(epilepsy, EP)的发作机理较复杂,大多报道其与兴奋性神经递质有密切联系。近年来,脑组织内源性一氧化氮(NO)在癫痫发病机制中的作用已得到广泛关注,并已有大量的研究报道<sup>[1]</sup>。由于内源性一氧化氮的生成完全依赖于体

内一氧化氮合酶(NOS)的含量和生物学活性,因此本文就熄风胶囊对戊四唑致惊厥小鼠皮质层神经元型一氧化氮合酶(nNOS)活性的影响进行分析,进一步探讨一氧化氮在癫痫发作中的作用,以及该熄风胶囊对一氧化氮合成的影响,为临床治疗提供客观依据。

## 1 材料和方法

**1.1 动物** 健康昆明种小鼠(二级,天津动物研究所提供,津动字第006号)40只,雌雄各半,体重18~22g。随机分为熄风胶囊两个剂量组(熄风胶囊低组、熄风胶囊高组)、模型组、正常对照组。

**1.2 药物** 熄风胶囊煎剂(天津中医学院第一附属医院杏林药场生产,主要成分:紫河车、天麻、石菖蒲、全蝎、僵蚕、白金丸等,每粒0.33g,批号:991226。)戊四唑(PTZ,天津新亚制药厂提供,100mg/支,批号:610325-1。)兔抗鼠nNOS血清(美国Santa Cruz公司);ABC试剂盒(中山公司):含正常山羊血清(NGS);生物素标记的羊抗兔血清(B-IgG);抗生物素蛋白(A液);生物素标记的辣根过氧化物酶(HRP)(B液);二氨基联苯胺(DAB)(Sigma公司);磷酸盐缓冲固定液(pH7.4);0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4);0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲

[收稿日期] 2008-03-03

[通讯作者] \* 秦晓勇, Tel: 13821722552。

液;4% 多聚甲醛 (TBS, pH7.6); 二氨基联苯胺 (DAB) 溶液 (0.05% DAB-0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TBS)。

**1.3 给药与建模** 熄风胶囊低组和高组分别灌服 15.5 和 46.5 g·kg<sup>-1</sup> 两剂量的熄风胶囊浓缩煎剂; 正常组和模型组灌服蒸馏水, 1 mL/次, 2 次/d, 连续灌服 5 d。除空白对照组外, 其余各组于第 6 d 给药 30 min 后腹腔注射 PTZ 55 mg·kg<sup>-1</sup>, 55 min 后开始实验。

**1.4 取材与切片** 四组小鼠在相同条件下麻醉后迅速断头取脑, 置 4℃ 的 4% 多聚甲醛固定液中固定 6 h, 然后移入 10% 蔗糖溶液 2 h 20% 蔗糖溶液 12 h 30% 蔗糖溶液 2 h 梯度脱水。恒冷箱冰冻切片内冰冻切片 (50 μm)。

**1.5 ABC 免疫组化染色** 将切片移入 0.1% Triton-0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液中, 37℃ 孵育 30 min。以 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4) 漂洗 5 min × 3。然后加入 3% 正常羊血清, 37℃ 孵育 30 min 进行封闭。加入兔抗鼠 nNOS 抗体 (1: 100), 37℃ 孵育 1 h, 继以 4℃ 孵育 72 h。以 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4) 漂洗 5 min × 3。加入生物素标记的羊抗兔抗体, 37℃ 孵育 1 h。以 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4) 漂洗 5 min × 3。加入 ABC 液 (1: 100) 37℃ 孵育 1 h。以 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4) 漂洗 5 min × 3。以 0.05% DAB-0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TBS 缓冲液室温下显色, 镜下控制反应强度。0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4) 漂洗 5 min × 3 终止反应, 裱片、脱水、封片。

**1.6 免疫组化对照试验** ① 非特异性对照: 用正常羊血清代替兔抗鼠 nNOS 抗体, 其他步骤与 ABC 法程序相同。② 阴性对照: 用 PBS 代替兔抗鼠 nNOS 抗体, 其他步骤与 ABC 法程序相同。

**1.7 nNOS 阳性神经元计数** 每组选取对应断面的皮质层脑片 30 张, 分别计数 nNOS 阳性神经元数目。

**1.8 统计学分析** 统计分析采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析。

## 2 结果

**2.1 nNOS 阳性神经元计数结果** 见表 1。

表 1 脑皮质层 nNOS 阳性神经元数目  
(个/×200) 的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	剂量(g·kg <sup>-1</sup> )	皮质层 nNOS 阳性神经元数目
正常组	—	39.67 ± 5.61 <sup>1)</sup>
模型组	—	34.40 ± 9.93
熄风胶囊	15.5	44.67 ± 6.29 <sup>2)</sup>
熄风胶囊	46.5	48.20 ± 4.04 <sup>2)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.05; <sup>2)</sup> P < 0.01

## 3 讨论

近年来, 国内外进行了大量的 NO 与 EP 相关性的动物和临床研究, NO 有致 EP 还是有抗 EP 作用, 文献报道不一。国内外有大量证明 NO 有抗痫作用的动物研究文献。Ferraro 等研究了 NO 作为一种新的神经递质在控制海马和大脑皮质的兴奋性作用, 以及其与谷氨酸系统的相互关系, 结果显示神经系统 NO 水平的下降, 可使相应神经元兴奋性增强, 从而可能导致癫痫的发生<sup>[2]</sup>。控制内源性 NO 含量的 NOS 有 3 种, 其中 nNOS 被认为是一种结构型酶, 尽管其生理和病理作用均较为稳定, 但也有研究显示 nNOS 也参与 EP 的发作, 但其作用机理仍有待进一步研究。

在动物实验中戊四唑造模已被广泛应用, 戊四唑造模具有潜伏期相对较短, 死亡率低的优点<sup>[3]</sup>, 同时戊四唑引起的发作是唯一能复制的人体自发癫痫, 而且伴有皮质超同步放电和分化明显的强直相和阵挛相<sup>[2]</sup>。本实验可见: 戊四唑造模后, nNOS 阳性神经元数目明显减少, 对皮质层神经元的抑制作用降低, 神经元的兴奋性增强, 导致癫痫的发生。

服用中药组小鼠皮质区 nNOS 神经元数量较模型组多, 说明 NO 含量增加, 其对皮质层神经元的抑制作用增强, 神经元兴奋性降低, 因此可抑制癫痫的发作, 证明其良好的抗癫痫作用。

## [参考文献]

- [1] Nuwan CK, Jian M, Comac AO, *et al.* Nitric oxide modulate excitatory neurotransmission in the thalamus: implications for epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2000, 41 (suppl. 7): 9.
- [2] Ferraro G, Montalbano ME, La Grutta V. Nitric oxide and glutamate interaction in the control of cortical and hippocampal excitability [J]. *Epilepsia*, 1999, 40 (7): 830-836.
- [3] 郑乃智, 阮旭中, 李震中, 等. 青霉素、戊四唑、美解眠癫痫模型的比较 [J]. *临床脑电学杂志*, 1997, 6 (2): 101.
- [4] 熊杰, 马融, 杨常泉, 等. 熄风胶囊对癫痫小鼠海马一氧化氮合酶活力的影响 [J]. *山西中医*, 2003, 19 (2): 52-53.