

·博士之窗·

熄风胶囊对氯化锂-匹罗卡品 癫痫大鼠海马损伤影响的研究*

李新民,任艳艳,陈会,路岩莉

(天津中医药大学第一附属医院儿科,天津 300193)



作者简介: 李新民(1964-),男,医学博士,教授,主任医师,博士生导师,第一批“全国优秀中医临床人才”。现任天津中医药大学第一附属医院儿科主任、儿科教研室主任,兼任世界中医药学会联合会儿科专业委员会副会长,中华中医药学会儿科分会常务委员、秘书长,中国中西医结合学会儿科专业委员会委员,全国中医药高等教育学会儿科教育研究会常务理事,天津市中医药学会儿科专业委员会主任委员,天津市中西医结合学会儿科专业委员会副主任委员等职。在小儿癫痫、肺炎、哮喘等疾病方面,获得省部级科技奖励12次。

摘要:[目的] 探讨熄风胶囊对氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠海马损伤的影响。[方法] 应用氯化锂-匹罗卡品复制难治性癫痫大鼠模型。观察实验大鼠的反复自发性发作(SRS)情况、海马形态学改变和苔藓纤维出芽(MFS)。[结果] 1)治疗组癫痫大鼠 SRS 的发作次数均明显低于模型组($P<0.01$)。2)光、电镜结果显示:各治疗组中联合治疗组海马结构损伤最轻。3)Timm 染色结果显示:联合治疗组对海马 CA3 区及齿状回 MFS 有较强的干预作用,优于单药治疗组。这种干预作用的强弱与熄风胶囊的剂量呈现一定正相关关系。[结论] 熄风胶囊单药及与卡马西平(CBZ)联合用药能够有效控制氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠的 SRS,降低海马神经元损伤的程度,抑制苔藓纤维异常出芽。

关键词: 癫痫;熄风胶囊;海马;氯化锂-匹罗卡品;反复自发性发作;苔藓纤维出芽

中图分类号: R749.17 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-1519(2012)04-0321-05

癫痫是小儿神经系统常见疾病之一,其中约 75% 通过常规的一线抗癫痫药物治疗可获得满意疗效,但约 25% 的癫痫患者即使科学正规地应用常规抗癫痫药物,发作仍难以控制而成为难治性癫痫(IE)。

针对 IE 属痫病顽疾,具有反复发作、病程缠绵、迁延不愈的特点,肾-精-髓-脑的密切关系,及“久病必虚”、“久病必瘀”、“久病入络”的中医理论,本院马融教授提出 IE 病机关键在于肾精亏虚,痰瘀阻络,属本虚标实证,治宜益肾填精、豁痰熄风、化瘀通络,从而研制出熄风胶囊^[1]。卡马西平(CBZ)是一线抗癫痫西药,主要用于原发性强直-阵挛性发作和部分性发作,为治疗 IE 的首选药物之一。本实验旨在通过观察熄风胶囊对氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠海马损伤的影响,探讨其抗痫机制,为治疗

IE 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 80 只,体质量(200 ± 10) g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,适应性喂养 3 d 后开始实验。

1.1.2 实验药品与试剂 熄风胶囊(天津中医药大学第一附属医院杏林药厂,0.33 g/粒);盐酸匹罗卡品(美国 Sigma 公司,5 g/瓶);氯化锂(美国 Sigma 公司,100 g/瓶);地西洋与阿托品(天津氨基酸公司人民制药厂);卡马西平(北京诺华制药公司,200 mg/片)。

1.2 实验动物处理 80 只大鼠采用随机数字表法随机分成两大组,正常对照组 8 只,其余 72 只用于氯化锂-匹罗卡品癫痫模型的复制。先用氯化锂按 3 mmol/kg(浓度 1.5 mol/L)剂量腹腔注射,18~20 h 后腹腔注射硫酸阿托品 1 mg/kg,30 min 后腹腔注射盐酸匹罗卡品按 30 mg/kg(浓度 1%)注射,注射

* 基金项目:天津市高等学校科技发展基金重点项目(2006ZD03);天津市社会发展计划应用基础研究面上项目(08JCYDJC10900)。

1次,直到出现癫痫持续状态后 60~90 min,再给予地西洋 10 mg/kg 腹腔注射解除抽搐,如不能缓解痫性发作,可重复注射地西洋 1~2 次,直到痫性发作被解除。惊厥评分采用 Racine 分级标准^[2],痫性发作达到 4 级及以上,解除痫性发作后状态良好且存活的大鼠为合格的模型。

1.3 分组、染色及监控 选取造模成功且存活的 56 只大鼠,随机分为 7 组:模型组、熄风胶囊高剂量组(熄高组)、熄风胶囊中剂量组(熄中组)、熄风胶囊低剂量组(熄低组)、熄风胶囊高剂量+CBZ 组(联高组)、熄风胶囊高剂量+CBZ 1/2 剂量(联低组)、CBZ 组,每组 8 只,并设正常对照组,共计 8 组。每组的 8 只大鼠分放入两个饲养笼中,每笼 4 只,分别以品红(红色)、苦味酸(黄色)、染发剂(黑色)全身染色,其中 1 只不染色,以示区分,8 个组都重复以上染色。每 1 个摄像头观察 4 个笼子,所有实验大鼠在 4 个红外摄像头下集中观察。

1.4 各组动物给药情况 熄高组:灌胃给予熄风胶囊 0.99 g 浓缩煎剂 2 mL;熄中组:灌胃给予熄风胶囊 0.66 g 浓缩煎剂 2 mL;熄低组:灌胃给予熄风胶囊 0.33 g 浓缩煎剂 2 mL;联高组:灌胃给予熄风胶囊 0.99 g 浓缩煎剂 2 mL 和 CBZ 20 mg/kg;联低组:灌胃给予熄风胶囊 0.99 g 浓缩煎剂 2 mL 和 CBZ 10 mg/kg;CBZ 组:灌胃给予 CBZ 20 mg/kg;模型组和正常对照组:分别灌胃给予生理盐水 2 mL。每日上午 9 时和下午 4 时各灌胃 1 次,共持续 28 d。

1.5 标本采集 实验动物用 10%水合氯醛按 0.3 g/kg 腹腔注射麻醉,开胸暴露心脏,12 号注射针头刺入心脏左心室,同时切开右心耳,用生理盐水 500 mL 加肝素钠 12 500 U 从左心室快速灌入,直至肝脏变成灰白色,右心耳流出无色透明液体,改灌注 4%冷多聚甲醛 0.1 mol/L 磷酸缓冲液约 250 mL 进行内固定,直至肝脏,四肢,尾部变硬。立即断头取脑,甲醛固定约 24 h,流水冲洗后,酒精梯度脱水,石蜡包埋。

1.6 光镜标本的制备 将石蜡包块常规光镜制片,片厚 3 μ m,苏木—伊红(HE)染色。在光镜下观察海马结构的形态学改变。

1.7 电镜标本的制备 将石蜡包块切成小于 1 mm³ 的小块,放入 4%戊二醛中前固定,用磷酸盐缓冲液(PBS)充分清洗后,放入 1%锇酸中后固定,再用 PBS 充分清洗,酒精梯度脱水,每次 10~15 min,再行 100%丙酮脱水两次,每次 10~15 min,环氧树脂

812、815 混合物包埋、聚合后,用 Leica 超薄切片机切片,厚度为 50 nm,醋酸铀和柠檬酸铅双重电子染色,日立 H-7500 型透射电子显微镜观察、照相,加速电压 80 kV。

1.8 Timm 组织化学染色标本的制备 将经过上述处理得到的厚冰冻切片晾干。暗室中将晾干切片浸入新鲜配制的孵育液中(10%阿拉伯胶 60 mL,柠檬酸缓冲液 10 mL,5.67%对苯二酚 30 mL,2%硝酸银 2 mL),恒温水浴箱孵育 30~60 min。移出孵育液后,在暗处将切片用蒸馏水洗 5 min,移出暗处后再用蒸馏水洗 10 min。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封固。

每只实验动物选 4 张脑片,每组 3 只,在 HMISA-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统分别测海马 CA3 及齿状回苔藓纤维出芽(MFS)的总面积。

1.9 统计学方法 采用 SPSS18.0 软件对实验数据进行统计学处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 熄风胶囊对氯化锂—匹罗卡品癫痫大鼠反复自发性发作(SRS)的控制效果 见表 1。

由表 1 可见,在本次实验研究中,所有治疗组癫痫大鼠 SRS 的发作次数均明显低于模型组(均 $P<0.01$)。其中熄高组 SRS 的发作次数少于熄低组($P<0.01$),联高组 SRS 的发作次数显著少于熄低组($P<0.01$),与联低组 SRS 的发作次数比较无明显差

表 1 熄风胶囊单药和联合用药对氯化锂—匹罗卡品癫痫大鼠 SRS 的控制效果($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Effect of Xi Feng capsule only and combined with CBZ on the controlling of SRS attack in lithium-pilocarpine

epileptic rats($\bar{x}\pm s$)		次
组别	n	SRS 次数
正常组	8	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	8	17.63 $\pm$ 6.61 [#]
熄高组	8	5.75 $\pm$ 1.58 ^{**}
熄中组	8	7.13 $\pm$ 3.52 ^{**}
熄低组	8	11.25 $\pm$ 4.06 ^{**Δ}
联高组	8	5.38 $\pm$ 0.91 ^{**}
联低组	8	6.75 $\pm$ 2.12 ^{**}
CBZ 组	8	6.88 $\pm$ 1.55 ^{**}

注:与正常组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.01$;与熄高组比较,^{*} $P<0.01$;与中西药联合治疗一组比, ^{Δ} $P<0.01$ 。

异($P>0.05$)。该结果显示:熄风胶囊单药及联合治疗能有效控制氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠的 SRS,这种控制效果与熄风胶囊的剂量呈现正相关关系。

2.2 熄风胶囊治疗对氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠海马超微结构损伤及形态学的影响 电镜结果显示:正常对照组(见图 1A)示神经细胞结构基本正常($\times 5\,000$ 低倍)。模型组与正常对照组比较,海马结构明显损伤。各治疗组中联低组海马结构损伤最轻。各中药治疗组中熄高组损伤较熄中组、熄低组轻。模型组(见图 1B)示马神经元类似半月、凋亡现象($\times 8\,000$ 低倍);熄高组(见图 1C)示神经元胞质和核质轻度水肿,细胞器的数量减少($\times 6\,000$ 低倍);熄中组(见图 1D)示海马神经元中度水肿,细胞器的数量减少($\times 7\,000$ 低倍);熄低组(见图 1E)示海马神经中度水肿,细胞器数量明显减少($\times 7\,000$ 低倍);联高组(见图 1F)示海马神经元胞质轻度水肿($\times 7\,000$ 低倍);联低组(见图 1G)示海马接近正常神经元,可见突起($\times 2\,000$ 低倍);CBZ 组(见图 1H)示海马神经元中度水肿,细胞器数量减少($\times 4\,000$ 低倍)。

光镜结果显示:正常对照组示神经细胞结构基本正常。模型组与正常对照组比较,海马结构明显损伤。各治疗组中联低组海马结构损伤最轻。各中药治疗组中熄高组损伤较熄中组、熄低组轻。其中模型组(见图 2A)高倍镜下显示 CA1 区和 CA3 区及齿状回可见许多神经元发生变性、坏死;变性的

神经元肿胀,体积增大,核固缩;坏死的神经元胞质浓缩、深染,核碎裂。熄高组(见图 2B)高倍镜下显示 CA1 区细胞变性不明显,CA3 区偶见细胞核固缩,变性,大多数细胞核清晰;齿状回颗粒细胞排列整齐,偶见细胞核固缩、变性。熄中组(见图 2C)高倍镜下显示 CA1 区可见核固缩散在,CA3 区大多细胞核清晰,齿状回可见核固缩,细胞排列欠整齐。熄低组(见图 2D)高倍镜显示 CA1 区可见细胞萎缩,偶可见神经元发生变性和固缩核,CA3 区可见较多固缩核,细胞排列不整齐,齿状回区可见神经元核固缩、坏死。联高组(见图 2E)高倍镜下显示 CA1 区和 CA3 区及齿状回细胞形态较好,偶见神经元变性、核固缩。联低组(见图 2F)高倍镜下显示 CA1 区和 CA3 区及齿状回细胞形态较好,较少见神经元变性、核固缩。CBZ 组(见图 2G)高倍镜下显示 CA1 区细胞层数 2~3 层,可见变性细胞核,CA3 区细胞减少,齿状回可见核固缩、变性,细胞周围水肿。

2.3 熄风胶囊对氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠苔藓纤维出芽(MFS)的影响 见表 2。

表 2 结果显示:所有治疗组海马 CA3 始层及齿状回分子层 Timm 染色颗粒 MFS 总面积显著低于模型组(均 $P<0.01$)。其中,熄高组和联低组 CA3 区 Timm 染色颗粒 MFS 总面积与正常对照组无明显差异($P>0.05$)。在海马 CA3 区,熄高组的作用优于熄中组和 CBZ 组($P<0.05$),联低组的作用优于熄中

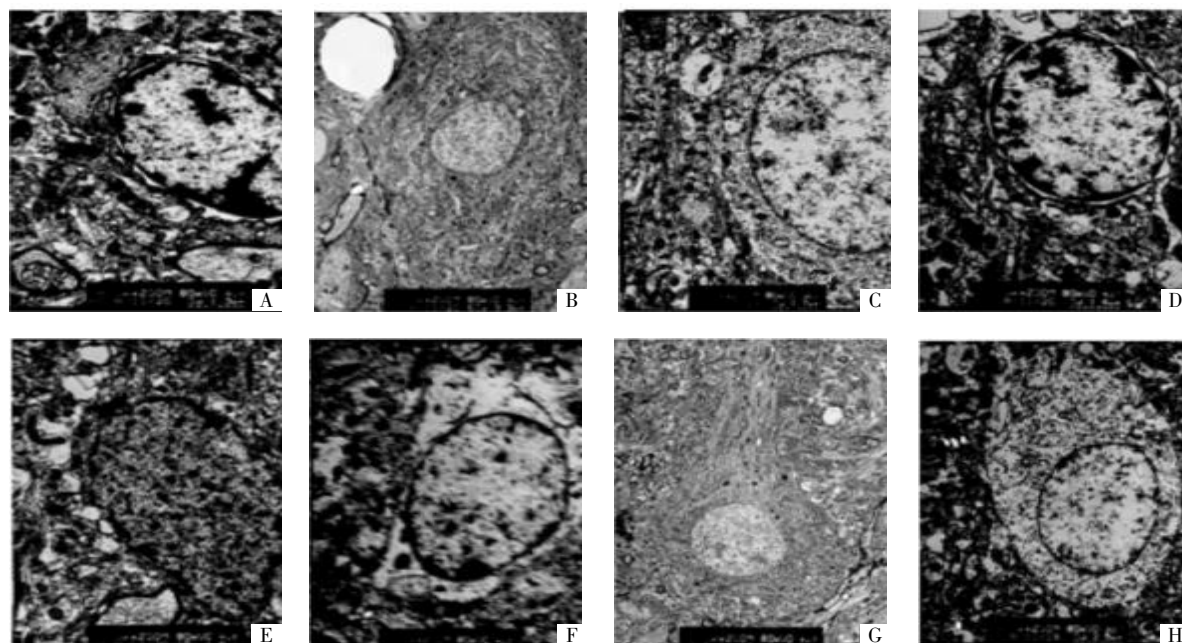


图 1 大鼠海马超微结构电镜变化

Fig.1 The ultrastructural changes of hippocampus under electron microscopy in epileptic rats induced by lithium-pilocarpine

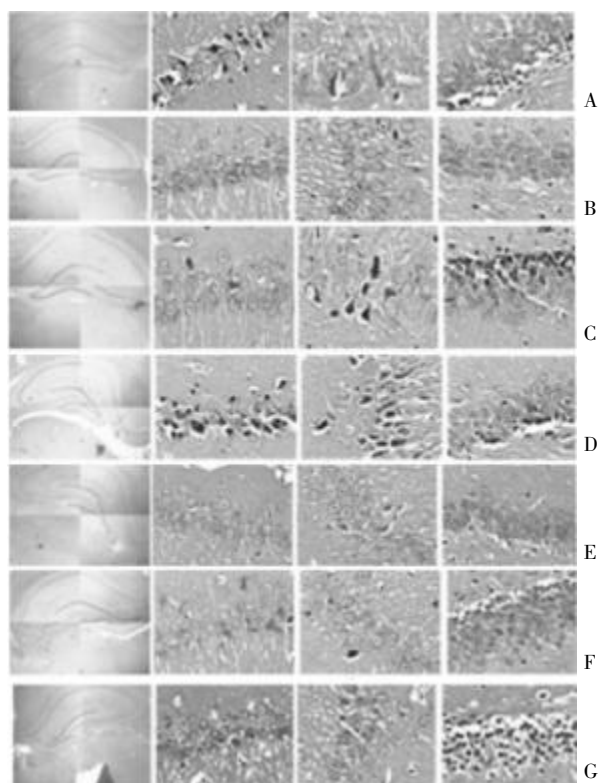


图2 大鼠海马超微结构光镜变化

Fig.2 The ultrastructural changes of hippocampus under optic microscopy in epileptic rats induced by lithium-pilocarpine

表2 熄风胶囊单药和联合用药对氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠 MFS 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MFS 的总面积	
		CA3 区	齿状回
正常组	8	86.63± 27.39	49.36± 15.61
模型组	8	540.01±170.77 [●]	344.22±108.85 [●]
熄高组	8	123.51± 39.06 [▲]	115.66± 36.58 ^{●▲}
熄中组	8	122.87±38.87 ^{●▲◆*}	146.30± 48.77 ^{●▲}
熄低组	8	343.17±108.52 ^{●▲*}	198.18± 62.67 ^{●▲}
联高组	8	117.72±3 7.23 ^{●▲}	182.10± 57.59 ^{●▲}
联低组	8	81.40± 25.74 [▲]	143.24± 45.30 ^{●▲}
CBZ 组	8	309.81± 97.97 ^{●▲◆*}	101.17± 31.99 ^{●▲}

注:与正常对照组相比,● $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.01$;与熄高组比较,◆ $P<0.05$;与联低组比较,* $P<0.05$ 。

组、熄低组和 CBZ 组(均 $P<0.05$)。熄高组和联低组无论是在 CA3 区还是在齿状回分子层,两者作用均无明显差异(均 $P>0.05$)。该结果提示:熄风胶囊单药和联合用药对海马 CA3 区及齿状回 MFS 有较强

的干预作用,这种干预作用的强弱与熄风胶囊的剂量呈现一定正相关关系,并且海马 CA3 区较齿状回区对药物作用相对敏感。

3 讨论

IE 是指频繁的癫痫发作至少每月 4 次以上,应用一线抗癫痫药物(AEDs)正规治疗,药物稳态血浓度在有效治疗范围内,无严重的药物不良反应;至少观察 2 a,发作仍不能控制,影响日常生活;无进行性中枢神经系统疾病或占位性病变^[3]。而大约有 70% 的难治性癫痫为颞叶癫痫(TLE)。TLE 最显著的临床特征是长期反复出现的自发性癫痫发作^[4]。

匹罗卡品癫痫动物模型是目前比较理想的研究 TLE 的模型,该模型呈现 3 个时期,即急性期(癫痫持续状态,持续 6~24 h)、静止期(行为与脑电图均正常,7~42 d)和慢性期(出现慢性 SRS),较好地模拟了人类癫痫发生、扩布和形成的全过程,类似于人类 TLE 的临床特征^[5]。病理学研究证实匹罗卡品能诱发海马神经元死亡及 MFS,类似于人类 TLE 的病理特征,适用于探讨 TLE 形成机制及筛选抗癫痫药物^[6-7]。因此,为了更好的研究熄风胶囊治疗 IE 的可能作用机制,笔者选择氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠模型。

神经病理学研究发现,强烈而持久的癫痫发作导致突触后 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体过度兴奋,线粒体跨膜电位降低,基质渗透性肿胀,外膜断裂,致线粒体功能丧失,ATP 水平耗竭,最终导致神经元死亡。病性损伤后海马苔藓纤维异常发芽 MFS,其芽生侧枝进入颗粒体层、齿状回内分子层以及 CA3 区起始层,重建海马神经网络,形成的兴奋性突触占优势,同时齿状回对兴奋的滤过作用降低,这种神经元破坏和重组后重新形成的反复兴奋性反应有助于产生一个惊厥阈降低的神经元回路,使冲动在再生神经回路中迅速传播,最终导致癫痫反复发作^[8]。因此,癫痫反复发作——海马神经元细胞死亡和重组——回返性兴奋性环路形成——加重癫痫反复发作,形成恶性循环,成为 IE 耐药形成的病理基础。

熄风胶囊为马融教授的经验方,积临床 10 余年治疗癫痫的经验研制而成。方中紫河车味甘、咸,性温,为君药,益肾填精、补脑益智,可调节机体免疫力;天麻平肝潜阳、熄风止痉,其性润不燥,为风中之润剂,治风之妙药;配以石菖蒲豁痰开窍;全蝎、僵蚕熄风止痉;白金丸行气豁痰。诸药合用,益

肾填精、熄风豁痰^[9]。现代药理学研究证明,石菖蒲的主要成分 α 、 β -细辛醚,分别具有抗电惊厥、抗戊四唑惊厥及中枢镇静的作用^[10]。天麻可通过影响中枢不同脑区的儿茶酚胺类神经递质的代谢来协调脑兴奋和抑制的平衡。天麻能降低动物惊厥率和死亡率,缩短阵挛时间,且多次长时间用药比单次用药效果更佳^[11]。全蝎、僵蚕有抗惊厥,减少自发活动的作用^[12-13]。CBZ为三环类抗惊厥剂,是目前传统的抗癫痫药物之一,临床上,CBZ对部分发作、原发性全身强直阵挛发作及继发全身发作均可作为首选药物^[14]。CBZ能够增强癫痫患儿细胞免疫功能调节作用^[15]。卡马西平有抗惊厥作用,能抑制神经元持续高频率重复发放。卡马西平抑制癫痫大鼠海马齿状回内源性神经前体细胞增殖^[16]。

本研究发现熄风胶囊单用及与CBZ联合用药能较好的控制氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠的SRS,对海马CA3区及齿状回MFS有较强的干预作用,其作用效果与熄风胶囊的剂量呈现一定的正相关趋势。并且两者联合应用效果更佳。因此,本研究提示减轻海马损伤和抑制苔藓纤维发芽为熄风胶囊治疗IE的作用机制之一,为熄风胶囊治疗IE提供了进一步的实验依据,也为熄风胶囊与CBZ联合治疗提供合理依据。

参考文献:

- [1] 马融,李新民,魏小维,等.熄风胶囊治疗小儿癫痫强直-阵挛性发作的研究[J].天津中医药,2003,20(2):87-89.
- [2] Coulter DA. Chronic epileptogenic cellular alterations in the limbic system after status epilepticus[J]. Epilepsia, 1999, 40 (Suppl 1): 523-533.
- [3] 沈鼎烈,王学峰.临床癫痫学[M].上海科学技术出版社,2007:403.
- [4] 孔淑贞,彭森.难治性癫痫动物模型研究进展[J].重庆工商大学学报(自然科学版),2009,26(1):94-96.
- [5] Kreak P, Mikudecka A, Druge R, et al. An animal model of nonconvulsive status epilepticus: a contribution to clinical controversies [J]. Epilepsia, 2001, 42(2): 171-180.
- [6] Morimoto K. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain [J]. Prog Neurobio, 2004, 73(1): 60.
- [7] 伍犹梁,梁军潮,詹纯列,等.锂-匹罗卡品颞叶癫痫模型的建立及苔藓纤维出芽的动态变化[J].中国比较医学杂志,2009,19(6): 43-46.
- [8] 梁益,孙红斌.氯化锂-匹罗卡品癫痫模型研究[J].实用医院临床杂志,2008,5(3):112-114.
- [9] 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,2003,4(2):52-53.
- [10] 鲁效慧,赵芬琴.石菖蒲多糖的抗惊厥作用研究[J].中国医药导报,2009,6(26):39-40.
- [11] 王本国,杨楠,廖卫平,等.天麻提取物在锂-匹罗卡品癫痫大鼠中的神经保护作用[J].中国康复理论与实践,2009,15(3): 203-205.
- [12] 王新风,陈靖京,王明正,等.全蝎乙醇提取物对耐药惊厥大鼠脑内mdr1mRNA和P2gp表达的影响[J].中国中药杂志,2009,34(17):2223-2226.
- [13] 王莉.12种中药乙醇提取物抗惊厥作用和时间-体存生物当量的比较研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2010,8(4):460-463.
- [14] 杨世杰.药理学[M].北京:人民卫生出版社,2005:210.
- [15] 王晓青,韩静,刘瑾,等.卡马西平对癫痫患儿细胞免疫功能调节作用的研究[J].中国全科医学,2008,3(5):389-390.
- [16] 林芝惠,权青云,徐晓霞,等.卡马西平对匹罗卡品诱导成年癫痫大鼠海马齿状回神经前体细胞增殖的影响[J].脑与神经疾病杂志,2011,19(1):39-42.

(收稿日期:2012-05-17)

Effect of Xi Feng capsule on hippocampal lesion in rats with epilepsy induced by lithium-pilocarpine

LI Xin-min, REN Yan-yan, CHEN Hui, LU Yan-li

(Pediatric Department, The First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To study the effect of Xi Feng capsule on hippocampal lesion in rats with epilepsy induced by Lithium-pilocarpine. [Methods] Lithium-pilocarpine was used to duplicate the epilepsy in rats. Then the spontaneous recurrent seizures(SRS) of rats was observed and recorded by the video control system. The conventional histopathological method and transmission electron microscope were utilized to observe the morphological changes in hippocampus. Timm histochemical technique was adopted to study mossy fiber sprouting (MFS). [Results] 1)The recurrent time of SRP in treatment group was much less than model group ($P<0.01$). 2)Conventional histopathological method and transmission electron microscope found that, in all therapy groups, the damage of neuron in hippocampus was ameliorated in Xi Feng high-dose + Carbamazepine (CBZ)1/2 dose group. 3)The result of Timm stain method suggested that the hippocampal CA3 subfield in Xi Feng high-dose + CBZ 1/2 dose group was less than that of Xi Feng single group. This effect of Xi Feng capsule could be increased as its dose increased. [Conclusion] Xi Feng capsule only and combined with CBZ can control the SRS of rat with epilepsy induced by lithium-pilocarpine, and protect hippocampal neurons from more serious lesion and inhibit mossy hippocampal MFS.

Key words: epilepsy; Xi Feng capsule; hippocampus; lithium-pilocarpine; spontaneous recurrent seizures; mossy fiber sprouting.