

安痢宁冲剂对小鼠癫痫模型脑组织中 MDA SOD ATP 酶的影响

宋立群, 肖洪彬, 赵丹阳, 宋淑娟
(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 目的: 通过安痢宁冲剂对青霉素诱导的小鼠癫痫模型脑组织中 MDA SOD ATP 酶影响的实验研究, 探讨安痢宁冲剂的抗癫痫作用。方法: 采用青霉素诱导小鼠癫痫模型, 利用化学比色法测定小鼠癫痫模型脑组织中 MDA SOD ATP 酶的含量。结果: 模型组小鼠腹腔注射青霉素, 均能成功致病, 其病性发作程度较重, 均为 III- V 级; 安痢宁冲剂能降低癫痫小鼠脑中 MDA 的含量, 提高 SOD ATP 酶的活性。结论: 安痢宁冲剂具有一定的抗癫痫作用, 与其镇静安神、抗惊厥、清除自由基和维持 Na^+ 、 K^+ Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 离子的动态平衡有关。

关键词: 安痢宁冲剂; 小鼠癫痫模型; MDA SOD ATP 酶

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2002)03-0044-03

安痢宁冲剂是由柴胡、白芍、制南星、钩藤、茯苓、白胡椒药物组成的纯中药制剂, 具有燥湿祛痰, 熄风止痉之功效, 对“风”、“痰”为患的痫证确有疗效。为进一步研究安痢宁冲剂的抗癫痫作用, 我们进行了安痢宁冲剂对青霉素诱导的小鼠癫痫模型脑组织中 MDA SOD ATP 酶的影响的实验研究, 试探讨安痢宁冲剂的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 选用昆明种小白鼠, 雌雄各半, 体重 $20 \pm 2\text{g}$, 由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。医动字第 09-2-2 号。

1.2 试剂 MDA 试剂盒: 南京市建成生物工程研究所生产, 批号 990824。SOD 试剂盒: 南京市建成生物工程研究所生产, 批号 990828。ATP 酶试剂盒: 南京市建成生物工程研究所生产, 批号 990520。冰醋酸: 开封化学试剂总厂生产, 批号 8604801。无水乙醇: 哈尔滨新春化工厂生产, 批号 9808601。安痢宁冲剂: 将白胡椒、钩藤加乙醇提取两次, 每次 2h, 乙醇液回收乙醇至稠膏状, 残渣再与其余药味混合, 加水煎煮两次, 每次 2h, 浓缩至稠膏状, 并同白胡椒、钩藤提取物混匀, 加赋型剂制成颗粒。该冲剂由黑龙江中医药大学附属一院制剂室制备。苯妥英钠: 天津市力生制药总厂生产, 批号 9803001-12。青霉素: 哈尔滨制药总厂生产, 批号 951003。

1.3 仪器 722- 光栅分光光度仪, 成都仪器厂生产。LMB-2B 型二道生理记录仪, 成都仪器厂生产。

2 方法

2.1 青霉素诱导小鼠癫痫模型 取小鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为安痢宁高、中、低剂量组、阳性药物苯妥英钠和模型组。各组给药剂量见表 1, 均为口服给药。模型组灌服同体积水。各组动物均在给药或蒸馏水 1h 后, 腹腔注射青霉素 600 万 U/kg, 参照 Racine 标准^[1-2], 观测各组小鼠痫性发作行为:

- 0 级: 无反应或抽搐停止。
- I 级: 节律性嘴或面部抽动。
- II 级: 点头或甩尾。
- III 级: 单肢抽动。
- IV 级: 多肢抽动或强直。
- V 级: 全面性强直-阵挛发作。

观测癫痫小鼠各组动物脑电图变化时, 取小鼠 30 只, 雌雄各半, 随机分为 3 组, 每组 10 只, 分别为安痢宁高剂量组、模型组及正常对照组。高剂量组给药剂量为 2.14g/kg , 模型组和对照组均给予同体积水。需要各组动物均在给药或蒸馏水 1h 后, 腹腔注射 20% 的乌拉坦 5ml/kg 进行麻醉。动物麻醉后, 于小鼠海马 CA_3 区(前囟后 3.8mm , 旁开 2.0mm , 硬膜下 2.6mm), 皮质顶叶(前囟后 7.6mm , 正中缝旁开 2.0mm , 硬膜下 0.5mm) 安装不锈钢电极。选取右后肢为 0 电极, 单导联。采用 LMB-2B 型二道生理记录仪描记脑电图, 纸速 10mm/s , 灵敏度为 1, 时间常数

0.2s, 滤波 100Hz。在排除电极插入可能对脑组织造成的损伤, 确定动物处于正常脑电活动状态后, 连续描记脑电图 5min。然后, 对模型组及安痢宁组小鼠腹腔注射青霉素 600 万 U/kg, 对照组小鼠腹腔灌服同体积水。观测各组动物脑电图变化。

2.2 安痢宁冲剂对小鼠癫痫模型脑组织中 MDA、SOD、ATP 酶的影响 取小鼠 48 只, 雌雄各半, 随机分为 4 组, 每组 12 只, 分别为安痢宁高剂量组、阳性药物苯妥英钠、模型组和空白组。各组给药剂量见表 2 3 4, 均为口服给药。模型组、空白组灌服同体积水。各组动物均在连续给药或蒸馏水 3d 后, 腹腔注射青霉素 600 万 U/kg。之后, 其痫性发作程度达到平均为 III~V 级, 说明造模成功。待动物癫痫发作 30min 后, 活体断头取脑, 然后将脑组织迅速放入冰箱冷冻。24h 后, 取出脑组织, 切除丘脑及小脑。其中对小鼠脑中 MDA 含量的影响, 是将大脑组织作成 10% 的匀浆, 按 MDA 试剂盒说明书测脑匀浆中 MDA 的含量; 对小鼠脑中 SOD 含量的影响, 是将大脑组织作成 1% 的匀浆, 按 SOD 试剂盒说明书测脑匀浆中 SOD 的活动; 对小鼠脑中 ATP 酶活性的影响, 是将大脑组织作成 2% 的匀浆, 按 ATP 酶试剂盒说明书测脑匀浆中 ATP 酶的活性。

3 结果

3.1 安痢宁冲剂对青霉素诱导小鼠痫性发作行为的影响, 结果见表 1、图 1。

表 1 安痢宁冲剂对青霉素诱导小鼠痫性发作行为的影响

组别	组数	0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级	V 级
模型组	10	0	0	0	2	3	5
苯妥英钠	10	3	3	2	2	0	0*
安痢宁(高)	10	2	3	3	2	0	0*
安痢宁(中)	10	1	3	3	2	1	0*
安痢宁(低)	10	1	2	2	3	1	1*

与模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

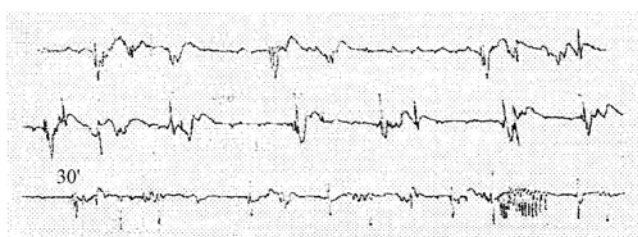


图 1 模型组小鼠腹腔注射青霉素后的脑电图

3.2 安痢宁冲剂对小鼠脑中 MDA 含量的影响, 结果见表 2。

表 2 安痢宁冲剂对小鼠脑中 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量(g/kg)	MDA(nmol/ml)
安痢宁	3.8	8.27 ± 1.62**
苯妥英钠	4.5mg	8.14 ± 1.48**
模型组		10.46 ± 1.80
空白组		6.31 ± 1.54*

3.3 安痢宁冲剂对小鼠脑中 SOD 含量的影响, 结果见表 3。

3.4 安痢宁冲剂对小鼠脑中 ATP 酶活性的影响, 结果见表 4。

表 3 安痢宁冲剂对小鼠脑中 SOD 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量(g/kg)	SOD(nmol/ml)
安痢宁	3.8	1.139 ± 0.026**
苯妥英钠	4.5mg	0.135 ± 0.021**
模型组		0.118 ± 0.018
空白组		0.193 ± 0.038**

表 4 安痢宁冲剂对小鼠脑中 ATP 酶活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量(g/kg)	Na ⁺ K ⁺ ATPase	Ca ⁺⁺ ATPase	Mg ⁺⁺ ATPase
		(μMpi/mgprot/h)		
安痢宁	3.8	1.52 ± 0.19*	0.98 ± 0.19*	1.48 ± 0.21*
苯妥英钠	4.5mg	1.56 ± 0.38*	1.04 ± 0.27*	1.50 ± 0.25*
模型组		1.35 ± 0.15	0.71 ± 0.18	1.27 ± 0.20
空白组		2.13 ± 0.36*	1.27 ± 0.32*	1.89 ± 0.35*

与模型组相比 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

4 讨论

青霉素是经典的致痫剂^[3~6], 其急性或点燃癫痫动物模型已获公认。青霉素能抑制 GABA 能神经元, 引起抑制性突触活动减弱或兴奋性突触活动增强, 从而导致神经元兴奋性增高。当神经元兴奋性突触后电位(EPSP) 综合超过一定阈值即可产生阵发性去极化漂移(PDS)。PDS 是癫痫电生理学的主要特征之一, 脑电图记录到的棘波就是 PDS 有关动作电位的反映。

为进一步研究安痢宁冲剂的抗癫痫作用, 我们进行了安痢宁冲剂对青霉素诱导的小鼠癫痫模型的实验研究。过去多采用海马杏仁核直接注射青霉素的方法诱导小鼠癫痫模型, 因其具有实验复杂、动物死亡率高、实验结果受手术手法影响较大等缺点, 现在较多采用腹腔点燃的方法诱导小鼠癫痫模型, 避免人为的脑部创伤。我们观察了安痢宁冲剂对癫痫小鼠癫痫发作程度及脑电图的影响。实验结果显示: 模型组小鼠腹腔注射青霉素, 均能成功致病, 其

痫性发作程度较重,均为 III~V 级;由脑电图可见,小鼠腹腔注射青霉素后 10~15min 开始出现散在的痫波,多为棘波,波幅为 130~250μV,以后棘波逐渐增多,至 25min 后痫波明显增多,40min 痫波频率最高,可见棘慢波和阵发性多棘波等多种表现,说明造模成功。经 Radit 统计,模型组小鼠痫性发作程度最重,苯妥英钠组小鼠痫性发作程度最轻,安痢宁冲剂高、中、低剂量组小鼠痫性发作程度较轻,与模型组均具有显著差异($P < 0.05$),说明安痢宁冲剂具有一定的抗癫痫作用。

氧自由基不但通过生物膜中多不饱和脂肪酸的过氧化反应^[7~9],而且通过脂氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤。导致细胞膜构型、结构和细胞膜对离子通透性的改变,影响 Na^+ 、 Ca^{2+} 流动,使 Ca^{2+} 内流增加,导致进行性的去极化。此外,过氧化反应还可以引起 Na^+ - K^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase 活性的降低^[10~15],影响 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的转运而导致神经元膜电活动的异常。因此 MDA 的含量可以反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映细胞损伤的程度。SOD 活力的高低又间接反应了机体清除氧自由基的能力。本研究首次以中药安痢宁冲剂,对癫痫小鼠脑组织中 MDA 的含量, SOD 的活性、ATP 酶的活力进行了实验研究。实验结果表明,安痢宁冲剂能降低癫痫小鼠脑中 MDA 的含量、提高 SOD 的活性,减轻自由基对细胞膜的攻击,维持细胞膜的稳定性,具有一定的抗氧化作用。作用机理可能是:中药中含有抗氧化的成分,能直接清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 $\text{H}^{\cdot}$,以终止自由基氧化还原链锁反应;或者,由于中药可增强、活化并参与阻断自由基氧化反应的酶系统。ATP 酶的功能障碍,导致神经元细胞膜 K^+ 、 Mg^{2+} 的通透性下降和/或 Ca^{2+} 的通透性升高,都可使神经元的兴奋阈值降低,以致微弱的刺激即可引起痫性放电。安痢宁冲剂使小鼠脑匀浆中 Na^+ - K^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase 的活性明显高于模型组。说明安痢宁冲剂具有提高小鼠脑中 ATP 酶活力的作用,从而维持了细胞内外 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子的动态平衡。

综上所述,安痢宁冲剂具有一定的抗癫痫作用,与其镇静安神、抗惊厥、清除自由基和维持 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 离子的动态平衡有关。但是,安痢宁冲剂多方面、多靶点的作用机制,还有待于进一步深

入研究。

参考文献:

- [1] Racine R. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure[J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32: 281.
- [2] 樊友武,李龄,刘斌.迷走神经刺激对戊四氮致痫大鼠行为及脑电图的影响[J]. *同济医科大学学报*, 1999, (1): 42.
- [3] 彭尧书.癫痫动物模型的选择与运用中医药治疗的实验研究进展[J]. *湖南中医药导报*, 1999, (11): 11.
- [4] 邹晓毅,阮旭中,周厚伦.青霉素癫痫大鼠脑组织中一氧化氮合成酶阳性神经元的观察[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 1997, (2): 116.
- [5] 潘云曦,谭启富.癫痫的点燃动物模型[J]. *金陵医院学报*, 1998, (1): 69.
- [6] 裴印权,王大仁.实验动物癫痫模型[J]. *国外医学·神经精神疾病分册*, 1988, (1): 13.
- [7] 徐运,顾金枝.癫痫患者血小板活化因子丙二醛的变化及其相关性[J]. *临床神经病学杂志*, 1996, (3): 165.
- [8] 徐运,刘绪宏.自由基代谢在癫痫中的意义及与脑电图的关系[J]. *中国实用内科杂志*, 1995, (6): 357.
- [9] 王焕林,蒋勤.癫痫患者红细胞氧自由基防御酶活性改变初探[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 1993(191): 49.
- [10] 谢安木,迟兆富.实验性癫痫大鼠脑细胞中 ATP 酶含量变化的研究[J]. *临床神经病学杂志*, 1998, (3): 135.
- [11] 朱晓峰,朱长庚.马桑内酯对大鼠脑突触膜 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶作用的研究[J]. *中国药理学杂志*, 1997, (1): 14.
- [12] Lopes da Silva FH, L. kamphuis. W. Van Neerven. J. M. A. M. & Pijn. P. M. Cellular and network mechanism in the kindling model of epilepsy: the role of GABAergic inhibition and the emergence of strange attractors[J]. *Acta Neurol. Scandinavica* 1992, Jan(86), 34-38.
- [13] Walden, Speckmann EJ, Witte OW. Membrane currents induced by pentylentetrazol in identified neurons of *Helix pomatia*[J]. *Brain Res.* 1988, 294-305.
- [14] 李麟仙.钙离子、兴奋性氨基酸与缺血性脑损伤[J]. *生理科学进展*, 1992, (2): 131.
- [15] Leone A-M. Palmer R-M-J. Knowles R-G. Francis P-L. Ashton D-S. Moncada S. Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases Incorporate Molecular Oxygen into Both Nitric Oxide and Citrulline[J]. *J Biochem.* 1991, Dec 15. 266 (35). 23790.