

草果知母汤在阻断 PTZ 点燃癫痫模型中对大鼠脑内 c-fos、c-jun mRNA 表达的影响*

张丽萍 贺娟 翟双庆 王洪图 白丽敏 梁怡

内容提要 目的:探讨草果知母汤抗痫作用的分子生物学机制。方法:选用 SD 大鼠以戊四唑(PTZ)诱导产生癫痫动物模型,应用分子原位杂交技术观察草果知母汤对 PTZ 点燃癫痫大鼠脑内 c-fos、c-jun 基因表达的影响。结果:PTZ 点燃癫痫大鼠脑内 c-fos、c-jun 基因表达明显增强,草果知母汤能明显阻断其表达,并显示出良好的抗痫作用。结论:草果知母汤的抗痫作用机制可能与降低脑内 c-fos、c-jun 基因表达水平有关。

关键词 草果知母汤 癫痫 c-fos c-jun 基因表达

Effect of Tsaoko Anemarrhenae Decoction on Intracerebral c-fos, c-jun mRNA Expression in Interrupting Pentylentetrazol Kindled Epileptic Rat Model ZHANG Liping, HE Juan, ZHAI Shuangqing, et al *Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100029)*

Objective: To investigate the molecular biological mechanism of anti-epileptic effect of Tsaoko Anemarrhenae decoction (TAD) on epileptic model rats. **Methods:** The pentylentetrazol (PTZ) induced epileptic Sprague-Dawley rats were selected as the animal model. The effects of TAD on the c-fos, c-jun gene expression in the rats' brain were observed by in situ hybridisation. **Results:** The c-fos, c-jun gene expression was obviously increased, TAD could effectively block the gene expression of c-fos, c-jun, showing better antiepileptic effect. **Conclusion:** The mechanism of TAD anti-epileptic effect might be correlated to the decrease of c-fos, c-jun gene expression.

Key words Tsaoko Anemarrhenae decoction, epilepsy, c-fos, c-jun, gene expression

癫痫(epilepsy, EP)是神经系统的常见病,其发病机理错综复杂,至今尚未明确,近十余年来,脑内分子生化基础是癫痫发病机理研究的热点问题,一些文献资料表明,即刻早期基因(IEG) c-fos、c-jun 在中枢神经系统的表达参与了 EP 的发病机制^[1-4]。本实验在前期工作的基础上,观察了草果知母汤对 PTZ 致痫大鼠脑内 c-fos、c-jun 基因表达的影响,以进一步探讨草果知母汤的抗痫机制。

材料与方法

1 动物模型的制备及处理 选用中国生物药物鉴定所提供的 SD 雄性大鼠,体重(150±10)g,随机分为 4 组,其中模型对照组、中药治疗组、西药治疗组均予戊四唑(PTZ, Sigma 产品)亚惊厥剂量 32 mg/kg 造模;空白对照组则予以同等剂量的生理盐水,腹腔注射,每日 1 次,持续 28 日,停药 1 周,再以相同剂量测

试,凡显示连续 5 次 2 级或 2 级以上惊厥的大鼠被认为达到点燃标准^[5]。各组动物在造模同时即开始给药治疗,空白对照组、模型对照组均胃饲双蒸水,每日 2 ml/kg;中药组胃饲草果知母汤(草果、知母、厚朴、半夏、黄芩、甘草等,经乙醇提取浓缩成 1 g/ml 生药含量的提取液,由本校内经教研室制作),每日 5 g/kg;西药治疗组胃饲苯巴比妥,每日 60 mg/kg(按常规制成混悬液)。

2 脑冰冻切片制备 点燃测试后 1 h,用 10%水合氯醛麻醉动物,经升主动脉先后灌入生理盐水和 4%多聚甲醛(PA)。取脑置 4%PA 后固定 6 h,入 20%蔗糖溶液,4℃过夜,将脑组织用液氮骤冷后,于 -20℃在 CM1900 型恒冷箱切片机(德国产)上冠面切片,贴片,入片盒冷冻保存。

3 c-fos、c-jun mRNA 原位杂交 原位杂交试剂盒:探针(1.2 kb Dig-cfos cRNA, 0.9 kb Dig-cjun cRNA)、杂交液、碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(抗 Dig-AP)、硝基四氮唑蓝(NBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐(BCIP),由北京中山生物技术有限公司提供。冰冻

* 国家中医药管理局科研基金资助课题(No. 98 Y111)

北京中医药大学(北京 100029)

脑片经预处理后分别滴加含 Dig- ϵ -fos cRNA 或 Dig- ϵ -jun cRNA 0.5 μ g/ml 的杂交液,入湿盒中 42 $^{\circ}$ C,杂交 20h 左右。经漂洗、平衡等步骤后,滴加抗 Dig-AP(1:500),室温 2h,再经漂洗、平衡,加 NBT-BCIP 显色液,避光,室温显色 2h,甘油明胶封片。

阴性对照实验:杂交液中不加探针,实验步骤同上,结果为阴性。

定量分析采用 CMIAS8 真彩病理图像分析系统进行分析,数据统计采用 ANOVA、 t 检验。

结 果

1 大鼠大脑皮层、海马内 ϵ -fos 基因表达 见表 1。各组大鼠大脑皮层、海马内均可见程度不同的 ϵ -fos 基因表达,阳性神经元胞质呈紫蓝色。模型对照组染色明显加深,阳性神经元显著增加,与空白对照组比较,有显著性差异($P < 0.01$);中、西药治疗组可见胞质染色明显变浅,基因表达量显著降低,与模型对照组比较,有显著性差异($P < 0.01$);中、西药治疗组间比较,未见差异($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠大脑皮层、海马内 ϵ -fos mRNA 阳性神经元数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性神经元数	
		海马	大脑皮层
空白对照	5	103.52 $\pm$ 11.69	101.20 $\pm$ 13.21
模型对照	5	222.02 $\pm$ 28.01 ^A	292.82 $\pm$ 21.45 ^A
中药治疗	5	126.88 $\pm$ 13.79 [*]	154.40 $\pm$ 13.25 [*]
西药治疗	5	123.24 $\pm$ 14.45 [*]	160.62 $\pm$ 14.49 [*]

注:与模型对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与空白对照组比较,^A $P < 0.01$

2 大鼠大脑皮层、海马内 ϵ -jun 基因表达 见表 2。与空白对照组大脑皮层、海马内 ϵ -jun mRNA 基础表达程度相比,模型对照组阳性神经元胞质着色加深呈深紫蓝色,基因表达量明显增加($P < 0.01$);中、西药治疗组可见阳性神经元胞质染色变浅,表达量显著下降,与模型对照组比较,有显著性差异($P < 0.01$);中、西药治疗组组间比较,未见统计学差异($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠大脑皮层、海马内 ϵ -jun mRNA 阳性神经元数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性神经元数	
		海马	大脑皮层
空白对照	5	103.94 $\pm$ 16.06	105.54 $\pm$ 15.87
模型对照	5	194.46 $\pm$ 15.93 ^A	215.18 $\pm$ 33.39 ^A
中药治疗	5	120.84 $\pm$ 21.15 [*]	157.54 $\pm$ 14.05 [*]
西药治疗	5	130.36 $\pm$ 23.78 [*]	164.56 $\pm$ 16.75 [*]

注:与模型对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与空白对照组比较,^A $P < 0.01$

讨 论

业已证明,在生理和病理情况下,中枢神经系统都

存在即刻早期基因(IEG)表达,但在生理状态时,中枢神经系统仅存在 IEG 低水平的表达,而在某些因素作用下 IEG 表达增强。研究表明,EP 诱导剂戊四唑(pentylenetetrazole, PTZ)可引起 ϵ -fos mRNA 在脑内迅速、一过性表达,主要分布于大脑皮层和边缘系统,抗 EP 药可阻断其聚积^(2,6)。本实验中也观察到处在生理状态下的空白组大鼠大脑皮层、海马内存在一定量的 ϵ -fos、 ϵ -jun 基因表达,而 PTZ 点燃的大鼠脑内 ϵ -fos、 ϵ -jun mRNA 表达则显著增强。说明 IEG- ϵ -fos、 ϵ -jun 基因表达增强与 EP 活动有密切关系。

现代抗 EP 药物虽能较有效地控制 EP 病发作,但寻找疗效好且毒副作用小的药物,仍属急待解决的问题。草果知母汤是治疗实验性 EP 等神志疾病的效验方,既方旨明确,见解独到,又无毒、副作用⁽⁷⁾。本结果显示,给予本方治疗的模型动物大脑皮层、海马 ϵ -fos、 ϵ -jun mRNA 表达均较模型对照组明显减弱,而与西药组相比,无统计学差异,并且在点燃全过程中,中药组动物惊厥级别始终较低,最高仅达 3 级,与模型组(最高达 6 级)比较,有显著性差异($P < 0.01$)。可见,本方抗痫机制与降低脑内 ϵ -fos、 ϵ -jun 基因表达有关。

由于 IEG 具有偶联细胞外各种刺激和细胞内与长时程改变有关基因——迟反应基因(LRG)表达的作用,而 LRG 的表达产物可使神经网络的兴奋性和神经元的固有成分发生改变,最终在中枢神经系统的某一部位形成持久甚至永久的异常兴奋灶即 EP 病灶,因此说,IEG 的表达可诱导 LRG 的表达最终产生灾难性的后果。我们推测,草果知母汤的抗痫机制可能与降低 ϵ -fos、 ϵ -jun mRNA 表达水平,从而阻断 LRG 的表达,杜绝 EP 病灶的形成有关,相关研究有待进一步进行。

参 考 文 献

1. Saffen DW, Cole AJ, Worley PF, et al. Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. Proc Natl Acad Sci 1988;85: 7795—7799.
2. Morgan JJ, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system; involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. Ann Rev Neurosci 1991;14: 421—451.
3. Morgan JJ, Curran T. Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. Trends Pharmacol Sci 1991;12(9): 343.
4. 郭丽莎,郭亮,柴惠霞,等.马桑内酯对 EP 大鼠脑内 ϵ -fos mRNA 表达的影响.神经科学 1995;(增刊): 181.
5. 王丽,Ono J, Walson PD. 大鼠戊四唑点燃模型的建立.药学报 1993;28(7): 487.
6. Morgan JJ, Cohen DR, Hempstead JJ, et al. Mapping patterns

of c-fos expression in the central nervous system after seizure. Science 1987;192:197.

7. 贺娟, 赵明瑞, 王洪图, 等. 草果知母汤抗癫痫模型的药效

实验研究. 北京中医药大学学报 1997;20(2):37.

(收稿:2000-01-08 修回:2000-04-24)

中西医结合治疗肛门湿疹 61 例

刘桂卿 周 辉

近年来,我们以中药龙胆泻肝汤口服为主并配合局部皮内注射普鲁卡因治疗肛门湿疹 61 例,取得满意疗效,现介绍如下。

临床资料 102 例肛门湿疹患者随机分为两组,治疗组 61 例,其中男 46 例,女 15 例;年龄 21~64 岁;病程 2.5 个月~5 年。对照组 41 例,其中男 32 例,女 9 例;年龄 23~60 岁;病程 3 个月~5 年。全部病例符合肛门湿疹的临床诊断(中国人民解放军总后勤部卫生部编.临床疾病诊断依据治愈好转标准.北京:人民军医出版社,1987:535)。

治疗方法 治疗组:(1)龙胆泻肝汤加减:龙胆草 10g 黄芩 15g 栀子 15g 苍术 15g 泽泻 10g 苦参 15g 车前子 30g(布包) 白鲜皮 10g。湿重渗出明显者加黄柏 15g,草薢 20g;瘙痒剧烈者加地肤子 15g,刺蒺藜 10g;合并感染者加蒲公英 30g,生大黄 10g。每日 1 剂,水煎 2 次分服,药渣再煎,每晚取汁坐浴 20~30 min,连续治疗 10 天为 1 个疗程。(2)普鲁卡因皮内点状注射,患者膝胸卧位,患处皮肤以 0.1%新洁尔灭消毒,用 0.5%普鲁卡因 10 ml,从肛门周围皮肤部位边缘开始作皮内点状及浸润注射。对部分病情顽固、皮损明显增厚者可同时加用强的松龙 5 mg 与普鲁卡因混匀后一并注射。每 5 天注射 1 次,注射后皮损部位可出现暂时性水肿,勿需作特殊处理。

对照组 普鲁卡因或普鲁卡因与强的松龙混合液皮内点状注射与治疗组相同,但不用中药口服及坐浴,而改用口服常规剂量抗组织胺药,每日早晚温水坐浴 1 次,局部外擦肤轻松软膏或皮炎平软膏,疗程同治疗组。两组病例均观察 1 个疗程,在治疗期间不合并使用其他药物。

结果 疗效判定标准:皮疹全部消退,无瘙痒感为痊愈;皮疹消退 30%~70%,瘙痒明显减轻为有效;皮疹消退<30%,瘙痒无明显变化或加重为无效。结果:治疗组治愈 49 例(80.3%),有效 7 例(11.5%),无效 5 例(8.2%),总有效率 91.8%;对照组治愈 24 例(58.5%),好转 9 例(22.0%),无效 8 例(19.5%),总有效率 80.4%。治愈率治疗组优于对照组($\chi^2=5.7, P<0.05$)。

讨论 肛门湿疹是皮肤科的常见疾病,病因复杂,一般认为属于过敏性炎症性皮肤病,此类患者多具过敏体质。临床部分患者可继发于肛瘘、肛裂等炎症或分泌物刺激所致,病变多局限于肛门周围皮肤,亦可延及会阴及阴囊。局部表现为红斑、糜烂、渗出、结痂,病程长者则可见局部皮肤增厚、粗糙或皲裂等。病变常反复发作,易演变成慢性。由于剧烈瘙痒,往往严重影响患者的正常工作及生活。中医学认为本病多与湿邪有关,湿可蕴热,则可发为湿热之症,临床以清热除湿之法治疗本病取得较好疗效。现代药理研究表明,苍术、地肤子、栀子、白鲜皮有抗过敏作用;龙胆草、黄芩、生大黄、苦参、泽泻、车前子等均有较强的抑菌、杀菌作用,龙胆草还具有较强的免疫抑制作用。

肛门湿疹患者往往因剧烈瘙痒而就诊,普鲁卡因病变部位皮下注射能有效地麻醉末梢神经而止痒,消除了搔抓、摩擦、烫洗等恶性刺激对局部皮肤的不良损害,让局部皮肤组织有一个相对稳定的良性环境而得以修复。

中西医药物相互配合,内外兼治,中药局部坐浴则更有利于其药效的发挥。普鲁卡因局部注射操作简便,不需要特殊器械,且疗效确切,药简价廉,患者易于接受。

(收稿:2000-02-02 修回:2000-04-28)

贵阳中医学院第一附属医院皮肤科(贵阳 550001)