

调肝解毒方对慢性癫痫大鼠学习记忆及海马组织环磷酸腺苷反应元件结合蛋白表达的影响

裴 林¹ 李佃贵¹ 娄 燕² 杨 雁¹ 吴国群³

(1. 河北医科大学中医药研究院, 河北省石家庄市建华南大街 209 号, 050031;

2. 河北省人民医院; 3. 河北医科大学基础医学研究所)

[摘 要] **目的** 观察调肝解毒方对慢性癫痫大鼠学习记忆与海马组织环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)表达的影响。**方法** 60 只大鼠腹腔注射印防己毒素制作慢性癫痫模型后, 随机分为模型组, 调肝解毒方低剂量组、调肝解毒方高剂量组, 丙戊酸钠组, 每组 15 只, 与正常组(15 只)同期观察或治疗 60 天, 以 Morris 水迷宫观察大鼠空间学习和记忆能力, 应用 RT-PCR 方法检测大鼠海马组织 CREB mRNA 表达变化, 免疫组织化学方法检测海马组织磷酸化的 CREB 水平变化。**结果** 调肝解毒方低、高剂量组大鼠空间记忆能力高于模型组($P < 0.01$), 海马组织 CREB mRNA 相对吸光度值增高, pCREB 免疫阳性细胞的表达有不同程度增强, 与模型组比较差异有显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 调肝解毒方可在一定程度上改善反复癫痫大鼠的学习记忆能力, 可能与调节海马 CREB 表达有关。

[关键词] 癫痫; 学习记忆; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; 调肝解毒方

Effect of Tiaogan Jiedu Formula on Learning and Memory in Rats with Chronic Epilepsy and Expression of cAMP Responsive Element Binding Protein in Hippocampus

PEI Lin¹, LI Dian-gui¹, LOU Yan², et al.

(1. Institute for Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031; 2. People's Hospital of Hebei Province)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Tiaogan Jiedu Formula(TJF) on learning and memory in rats with chronic epilepsy and expression of cAMP responsive element binding protein(CREB) in hippocampus. **Methods** Totally 60 chronic epilepsy model rats were randomly and equally divided into model group, TJF large-dose group, TJF small-dose group and Sodium Valproate group after intraperitoneal injection of Picrotoxin. The observation and treatment lasted for 60 days, and normal group of 15 rats were observed simultaneously. The ability of learning and memory was tested by Morris water maze. The expression of CREB mRNA in hippocampus and level of phosphorylated CREB in hippocampus were detected by reverse transcription polymerase chain reaction and immunohistochemical method respectively. **Results** Memory ability, relative absorbance of CREB mRNA and positive expression of CREB immunocytes in TJF large-dose and small-dose groups increased significantly as compared with model group($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** TJF can improve learning and memory ability of rats with chronic epilepsy, which might be relevant to its regulating effect on the expression of CREB in hippocampus.

Key Words Epilepsy; Learning and memory; CREB; Tiaogan Jiedu Formula

众多研究表明, 癫痫后存在不同程度学习记忆等认知功能的改变, 特别是儿童癫痫时认知功能的降低对以后患儿生活质量有较大影响^[1,2]。环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP responsive element binding protein, CREB)及其活化形式磷酸化的 CREB(pCREB)是长期记忆形成过程所必需的关键的调节分子^[3~5], 与癫痫突触可塑性改变、学习记忆等有密切关系。我们在临床治疗癫痫患者学习记忆障碍取得较好疗效的基础上, 观察了调肝解毒方对印防己毒素(picrotoxin, PTX)诱发的慢性癫痫大鼠学习记忆以及大鼠海马组织 CREB mRNA 表达和 pCREB 水平变化

的影响, 探讨其作用机理。

1 材料

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 75 只, 雄性, 实验起始体重(110±10)g, 河南省实验动物中心提供。实验室适应性饲养 1 周, 自由饮食, 12 小时光亮/黑暗条件, 23~26℃环境温度, 分隔喂养。饲养地点在河北医科大学中医药研究院中药药理学实验室(Ⅱ级)。

1.2 药物

调肝解毒方由柴胡、桂枝、天麻、全蝎、黄连、人工牛黄、绞股蓝等组成, 药物组成比例为 2:1:2:1:1:1:2, 按河北省药品监督管理局批准的制剂方法(天冰调督胶囊, 冀药制字 Z20050746), 由河北省中医药研究院制剂室制成浓缩浸膏, 烘干粉碎装胶囊, 每

基金项目: 河北省科学技术攻关项目 A236317D; 河北省中医药管理局科研计划项目(2004027)

通讯作者: 李佃贵, peilin148@163.com, (0311) 85363979

Copyright © 2007 by China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

粒 0.45g, 丙戊酸钠为江苏恒瑞医药股份有限公司提供, 批号: 051213。

1.3 主要仪器

GeneAmp 9600 型 PCR 仪(美国 PE 公司), UVP 凝胶扫描系统(美国 UVP 公司), DYZ-22A 型双恒定电泳仪、DYY-III 桥式电泳仪(北京市六一仪器厂), LEICA 2035 型石蜡切片机(德国), 756 型紫外分光光度计(上海)。

1.4 试剂

设计合成的扩增 CREB 的 cDNA 引物由上海生物工程公司合成。RNA 提取试剂 Trizol Reagent 为美国 Invitrogen 公司产品。逆转录酶(AMV-RT)、核糖核酸酶抑制剂(RNasin)、dNTP、Taq DNA 聚合酶、随机引物、琼脂糖均为美国 Promega 公司产品。兔抗 pCREB 多克隆抗体为美国 Cell Signaling 公司产品。生物素标记的羊抗兔 IgG 工作液为中山生物技术有限公司产品。印防己毒素购自 Sigma 公司, 规格为 1g/瓶, 临用时溶于生理盐水, 配置成 0.01% 溶液, 存 4℃ 冰箱供实验用。

2 方法

2.1 动物造模与分组

75 只大鼠随机分成正常组 15 只, PTX 点燃组 60 只。PTX 点燃组按 Shandra、田发发^[6,7]等方法, 每天上午 10:00~11:30 腹腔注射 PTX 1.5mg/kg, 连续注射 20~30 天。正常组腹腔注射等容积生理盐水。每次注射后观察大鼠 30 分钟, 注射 20 天起以摄像机观察大鼠 24 小时的动态变化。点燃行为依据 Racine^[6]分级标准分为 5 级, 凡已获得连续 3 次 4 级或 4 级以上完全发作者, 被认为完全点燃。造模成功后 PTX 点燃组再随机分为模型组、调肝解毒方低、高剂量组、丙戊酸钠组, 每组 15 只。调肝解毒方低、高剂量组各有 1 只大鼠分别在治疗 4 天、7 天时因长时间的强直-阵挛收缩而死亡。

2.2 给药方法

于造模第 30 天开始给药。正常组、模型组灌服 10ml/kg 生理盐水, 调肝解毒方低剂量组灌服 0.4g/kg (相当生药量) 调肝解毒方混悬液, 调肝解毒方高剂量组灌服 0.8g/kg (相当生药量) 调肝解毒方混悬液, 丙戊酸钠组灌服 0.008g/kg 丙戊酸钠混悬液。于 Morris 水迷宫实验后开始灌胃给药, 每天 1 次, 共 60 天。常规喂养, 自由进食饮水。

2.3 Morris 水迷宫行为学检测

按文献[8]方法制备 Morris 水迷宫, 并进行定位航行实验与空间搜索实验。定位航行实验: 于观察治疗 60 天起进行, 历时 5 天, 记录大鼠寻找并爬上平台所需时

间(逃避潜伏期)。空间搜索实验: 在第 6 天的第 5 次训练时撤除平台, 任选一个入水点, 将大鼠面向池壁放入水中, 记录其在 120 秒内跨过直径为 10cm 的原平台所在位置的次数。

2.4 海马组织 CREB mRNA 的 RT-PCR 检测

2.4.1 取材 随机选取大鼠(每组 6 只), 迅速腹腔注射 10% 水合氯醛 35mg/kg 麻醉, 分离海马, 迅速将组织置于 4℃ DEPC 水中清洗后, 置冻存管中保存于液氮中。

2.4.2 总 RNA 提取及完整性检测 参照 Trizol 试剂说明书程序提取海马总 RNA。提取 RNA 的完整性检测: 将 RNA 提取液 4μl 与上样缓冲液 2μl 混合, 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 电泳缓冲液 1×TBE, 80V, 38mA, 电泳 30 分钟, 凝胶成像系统观察结果。RNA 含量采用紫外分光光度检测法测量 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值, 检测 RNA 的纯度和含量, 选用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.8~2.0 的 RNA 用作反转录。

目的基因引物的合成: 取 10μg RNA 按照反转录系统试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA。引物序列依据文献报道的 CREB 序列, 设计合成了扩增 CREB cDNA 的引物。CREB 上游引物: 5'-TCA GCC GGG TAC TAC CAT TC-3'; 下游引物: 3'-TCT CTT GCT GCT TCC CTG-5'; 扩增长度为 252 bp。选用大鼠 βactin cDNA 引物序列作为内参照。βactin 上游引物: 5'-GCC ATG TAC GTA GCC ATC CA-3; 下游引物: 5'-GAA CCG CTC ATT GCC GAT AG-3; 扩增长度为 375bp。PCR 总反应体积 25μl, 按照步骤扩增, CREB 基因扩增条件为: 94℃ 2 分钟, 94℃ 40s, 52℃ 40s, 72℃ 40s (35 个循环), 72℃ 延伸 5 分钟。

RT-PCR 产物半定量分析: 取 RT-PCR 产物 4μl, 加上样缓冲液 1μl, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 80V, 45 分钟, 用 UVP 凝胶图像成像系统扫描定量并摄像电泳条带的灰度, 确定扩增物的相对量, 用凝胶图像分析系统分析结果。

2.5 海马组织 pCREB 免疫组织化学检测

取材: 最后一次 Morris 水迷宫行为学检测结束后, 取正常组 7 只、模型组 8 只、调肝解毒方低剂量组 7 只、调肝解毒方高剂量组 7 只、丙戊酸钠组 8 只大鼠, 深度麻醉, 暴露心脏, 自升主动脉插管, 生理盐水冲洗, 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液灌流固定, 取脑后相同灌流固定液固定 4 小时, 置 25% 蔗糖液中至沉底。切取视交叉和乳头体处垂直横断脑组织, 做冠连续冰冻切片, 切片厚 35μm。切片进行 pCREB 免疫组织化学染色。

表 1 各组大鼠空间学习与记忆指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	寻找平台时间(s)			通过平台次数(次)
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	
正常组	7	6.0±0.7	4.9±0.5	2.9±0.3	12.4±2.3
模型组	8	10.2±0.9	7.9±0.6	5.2±0.5	7.4±1.7
丙戊酸钠组	8	9.6±1.0	7.8±0.7	5.1±0.7	7.7±1.5
调肝解毒方低剂量组	7	8.4±1.3*	6.1±1.1*△△	4.0±0.6*△△	10.2±1.1*△△
调肝解毒方高剂量组	7	8.0±1.2*△	5.3±0.8*△△	4.3±0.4*△	11.6±1.9*△△

与模型组比较, * $P < 0.01$; 与丙戊酸钠组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

pCREB 免疫组织化学染色:常规免疫组织化学染色,切片用兔抗 pCREB 多克隆抗体孵育 12 小时,生物素化二抗羊抗兔 IgG 工作液 37℃ 孵育 30 分钟;辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 37℃ 下孵育 30 分钟,DAB 显色,常规脱水,透明封片。阴性对照用 0.01mol/L PBS 替代一抗。

pCREB 阳性细胞计数:在光学显微镜下,用高倍视野(400×) 观察海马同一阶段 CA¹、CA²、CA³、DG 区域的pCREB 阳性神经元的免疫反应性。同一切面取 5 张,观察指定面积内 450 μm × 450 μm 阳性细胞数的算术平均值。

2.5 统计学方法

所有数据均采用 SAS 6.12 统计软件包进行分析,各组检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 行为学指标观察结果

表 1 示,观察治疗 60 天后,在水迷宫实验中,第 1、3、5 天,调肝解毒方低、高剂量组大鼠寻找平台时间比同期模型组明显减少($P < 0.01$),调肝解毒方高剂量组寻找平台时间也比同期丙戊酸钠组明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);调肝解毒方低剂量组大鼠寻找平台时间在第 3、5 天比同期丙戊酸钠组明显减少($P < 0.01$);调肝解毒方低、高剂量组通过平台次数均比模型组及丙戊酸钠组明显增加,差异有显著性意义($P < 0.01$)。

3.2 大鼠海马组织 CREB mRNA 表达

表 2 示,经观察治疗后,各组大鼠海马组织 CREB mRNA 相对吸光度值比较,模型组比正常组明显降低($P < 0.01$);而调肝解毒方低、高剂量组 CREB mRNA 均比模型组明显增加($P < 0.01$, $P < 0.05$),也比丙戊酸钠组明显增加($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3.3 大鼠海马组织 pCREB 免疫阳性细胞表达

经观察治疗后,各组大鼠海马组织均可见 pCREB 免疫阳性细胞的表达,呈密集的带状分布,pCREB 阳性反应物分布在海马结构的各区神经细胞核内。表 3

示,在 CA¹、CA³ 区,调肝解毒方低、高剂量组 pCREB 阳性细胞数均比模型组明显增多($P < 0.01$),pCREB 阳性细胞数高剂量组比丙戊酸钠组表达增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);调肝解毒方低剂量组 pCREB 阳性细胞数只在 CA¹ 区比丙戊酸钠组表达增多($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠海马组织 CREB mRNA 相对吸光度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CREB/βactin
正常组	6	0.76±0.13
模型组	6	0.42±0.11*
丙戊酸钠组	6	0.48±0.09
调肝解毒方低剂量组	6	0.63±0.07△△▲▲
调肝解毒方高剂量组	6	0.59±0.10△▲

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与丙戊酸钠组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

表 3 各组大鼠海马组织不同区域 pCREB 阳性细胞数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CA ¹ 区	CA ³ 区
正常组	7	81.37±12.06	76.26±9.11
模型组	8	32.14±9.53	25.58±6.06
丙戊酸钠组	8	47.09±6.27*	36.31±7.06*
调肝解毒方低剂量组	7	56.32±8.19*△	39.47±4.23**
调肝解毒方高剂量组	7	63.11±7.46*△△	42.86±5.08**△

与模型组比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$; 与丙戊酸钠组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

4 讨论

癫痫反复发作可引起学习记忆等认知功能障碍,小儿癫痫大发作约 34.4%~45% 伴有智力低下、学习记忆等认知功能障碍,并且认知功能的损害随癫痫发作频率增加、病程延长而加重^[9~11]。因此,积极控制癫痫发作的同时,改善癫痫后学习记忆等认知功能,对提高患者生活质量具有重要的现实意义。

动物癫痫模型的点燃要求尽可能与人类癫痫发作相似。PTX 化学点燃癫痫模型与人类癫痫有高度相似性,具有制作方便、成功率高、不破坏脑组织结构、点燃作用持久等优点^[12]。我们的研究表明,PTX 点燃模型大鼠癫痫反复发作后导致空间学习记忆能力下

降,这与文献报道一致。丙戊酸钠作为公认的治疗癫痫的常用药物,能控制癫痫发作,但对学习记忆认知功能的改善无明显促进作用^[13]。本实验结果表明,应用丙戊酸钠治疗后,大鼠学习记忆指标无显著改善,而调肝解毒方各剂量组学习记忆指标明显好转,表明该方药在改善癫痫后学习记忆方面具有较好疗效,比单纯通过控制癫痫来改善学习记忆能力具有明显优势。

CREB 是一种真核生物细胞核内蛋白质,具有调节基因转录功能,是细胞内多种信号通路的关键成分之一,在记忆形成过程中发挥着重要作用。其以活化形式 pCREB 调节即刻早基因等多种下游基因的转录,是长期记忆形成过程所必需的一种关键的调节分子,在突触可塑性、学习和记忆功能等方面起着重要作用^[14]。新近的研究表明,磷酸化后的 CREB 是海马基因转录的开关,由它引发的基因表达可加强海马区长时程记忆的形成^[15]。而啮齿类动物反复的惊厥,对海马长时程记忆有深远而有害的影响,可以降低海马提供信息处理的可塑性^[16]。我们的研究结果显示,癫痫反复发作大鼠学习记忆功能降低的同时,海马组织中 CREB 转录水平下调,CREB 蛋白磷酸化水平下降,而调肝解毒方治疗后癫痫模型大鼠学习记忆能力明显改善,同时 CREB 转录水平上调,CREB 蛋白磷酸化水平增强,表明该方改善慢性癫痫模型大鼠空间记忆能力的作用,可能与调节 CREB 转录水平或促进 CREB 蛋白磷酸化有关。

我们依据中医基础理论和临床治疗观察,认为癫痫时学习记忆障碍与肝风内动、浊毒内扰、毒损脑络、脑神失养有关。因癫痫患者胎毒内留或邪气内侵,或先后天失调,使浊毒之邪内伏于脑;而情志失调,肝失疏泄,肝风内动,导致浊毒阻络,毒损脑络,气血失和,脑神失养^[17],引起癫痫反复发作,甚则痴呆智障。调肝解毒方以调肝攻毒化浊立法,以柴胡配桂枝,仿柴胡桂枝汤意,和解调肝疏郁,桂枝温通阳气,天麻熄风通络平肝,全蝎、人工牛黄攻毒散结,熄风通络,黄连解毒化浊。诸药配伍,调肝熄风,化浊解毒,使浊毒能消、伏邪能除、毒散络通、邪去正复,肝气调畅,气血调和,脑神得养,学习记忆能力得以恢复。

参考文献

- [1] Bulteau C, Jambaque I, Viguier D, et al. Epileptic syndromes, cognitive assessment and school placement: a study of 251 children. *Dev Med Child Neurol*, 2000, 42(5): 319~327.
- [2] Kwan P, Brodie MJ. Neuropsychological effects of epilepsy and antiepileptic drugs. *Lancet*, 2001, 357(9251): 216~222.
- [3] Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 2002, 35(4): 605~623.
- [4] Josselyn SA, Shi C, Carlezon WA Jr, et al. Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein over expression in the amygdala. *J Neurosci*, 2001, 21(7): 2404~2412.
- [5] Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, et al. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus dependent spatial memory. *Neuron*, 2002, 34(3): 447~462.
- [6] Shandra AA, Mazarati AM, Godlevsky LS, et al. Chemical kindling: implications for antiepileptic drugs-sensitive and resistant epilepsy models. *Epilepsia*, 1996, 37(3): 269~274.
- [7] 田发发, 谢光洁, 杨期东, 等. 实验性癫痫与 γ -氨基丁酸和谷氨酸脱羧酶的关系. *中华神经科杂志*, 2000, 33(4): 224~226.
- [8] Dalm S, Grootendorst J, de Kloet ER, et al. Quantification of swim patterns in the Morris water maze. *Behav Res Methods Instrum Comput*, 2000, 32(1): 134~139.
- [9] Bernabeu R, Bevilacqua L, Ardenghi P, et al. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(13): 7041~7046.
- [10] White AM, Matthews DB, Best PJ. Ethanol, memory, and hippocampal function: a review of recent findings. *Hippocampus*, 2000, 10(1): 88~93.
- [11] Okada T, Yamada N, Tsuzuki K, et al. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning. *Eur J Neurosci*, 2003, 17(2): 341~349.
- [12] 朱丹彤, 肖波, 谢光洁, 等. 化学点燃癫痫大鼠在水迷宫中学习记忆能力的测定. *中风与神经疾病*, 2003, 10(1): 36~39.
- [13] 王湘庆, 郎森阳. 新型抗癫痫药对认知功能的影响. *海军总医院学报*, 2006, 19(1): 26~28.
- [14] Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 2002, 35(4): 605~623.
- [15] Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, et al. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus dependent spatial memory. *Neuron*, 2002, 34(3): 447~462.
- [16] Hinoi E, Balcar VJ, Kuramoto N, et al. Nuclear transcription factors in the hippocampus. *Prog Neurobiol*, 2002, 68(2): 145~165.
- [17] 李澎涛, 王永炎, 黄启福. 毒损脑络病机假说的形成及其理论与实践意义. *北京中医药大学学报*, 2004, 24(1): 1~6.

(收稿日期: 2006-08-08; 修回日期: 2006-11-09)