

定痫汤对癫痫模型大鼠海马 BDNF/TrkB 通路的影响

孙宏^{*}, 王小荣², 陈松盛¹, 高震¹, 任宏伟¹

(1. 西安交通大学第二附属医院, 陕西省西安市西五路 157 号, 710004; 2. 甘肃中医药大学附属医院)

摘要 目的 探讨定痫汤抗癫痫的可能作用机制。方法 将 66 只大鼠随机分为模型组、定痫汤组、定痫汤 + K252a 组各 22 只, 采用锂-匹罗卡品建立大鼠癫痫模型, 另将 22 只健康大鼠设为正常组。定痫汤 + K252a 组在大鼠造模前 1 周开始每日给予酪氨酸激酶受体 B (TrkB) 拮抗剂 K252a 侧脑室注入, 每次 5 μ l, 每日 1 次, 共 1 周; 定痫汤组和定痫汤 + K252a 组在造模后 1 h 开始给予浓度为 1.55 g/ml 定痫汤 2ml 灌胃, 同时正常组、模型组均灌服等体积生理盐水, 均每日 1 次, 连续 6 周。各组大鼠中 11 只监测大鼠脑电图并记录大鼠癫痫自发性再发作行为的潜伏期、发作频率及持续时间, 另 11 只检测大鼠海马脑源性神经生长因子 (BDNF) 蛋白表达。结果 正常组发生癫痫自发性再发作 0 只, 模型组大鼠 9 只, 定痫汤组 5 只, 定痫汤 + K252 组 8 只。与模型组比较, 定痫汤组癫痫自发性再发作潜伏期明显延长, 发作频率下降, 持续时间明显缩短, 海马 BDNF 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。与定痫汤组比较, 定痫汤 + K252 组癫痫自发性再发作的发作频率增加, 持续时间延长, 潜伏期缩短, BDNF 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。结论 定痫汤可能通过调节 BDNF/TrkB 通路发挥抗癫痫作用。

关键词 癫痫; 定痫汤; 脑源性神经生长因子; 酪氨酸激酶受体 B; 癫痫自发性再发作

癫痫作为中枢神经系统的发作性疾病, 一次癫痫发作到随后更多、更密集的发作是癫痫后脑损伤的主要因素^[1]。近年来研究显示, 脑源性神经生长因子/酪氨酸激酶受体 B (BDNF/TrkB) 通路是癫痫反复发作和神经元损伤的关键, 其一方面直接促进癫痫后海马齿状回神经发生、苔藓纤维芽生等病理改变, 另一方面调节神经元的兴奋性, 加重癫痫发作^[2]。《医学心悟·癫狂病》所载定痫丸是中医学治疗癫痫的经典方剂, 研究显示, 采用定痫丸加减治疗癫痫患者可取得显著疗效^[3]。本研究观察定痫汤对癫痫模型大鼠行为及海马 BDNF/TrkB 通路的影响, 从而探讨定痫汤抗癫痫的可能机制, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SD 普通级大鼠 88 只, 体重 180 ~ 220 g, 由兰州大学医学部动物中心提供, 实验动物许可证号: SYXK (甘) 2014-0198。动物的处理遵守国家

健康协会制定的实验动物护理和使用指南^[4]。

1.2 药物

定痫汤由全蝎、僵蚕、石菖蒲、远志、当归、桃仁、红花、赤芍、胆南星、姜半夏、甘草组成, 比例为 3 : 2 : 2 : 1.5 : 2 : 2 : 2 : 1.5 : 1.5 : 1 : 1, 由甘肃中医药大学制剂室加工, 按照处方比例取以上药材, 用 8 倍量 70% 乙醇每次回流 2 h, 提取 3 次, 提取浓缩液干燥得干膏, 干膏粉碎成细粉, 加入挥发油制备成不含赋形剂的浸膏备用。

1.3 主要试剂及仪器

盐酸匹罗卡品 (批号: P6504)、戊巴比妥钠 (批号: MFCD03428215)、TrkB 拮抗剂 K252a (批号: MSDS82497), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 地西泮注射液 (批号: H12020957), 天津金耀药业有限公司; 东莨菪碱 (批号: H31021519), 上海禾丰制药有限公司; 兔抗 BDNF 多克隆抗体 (批号: B210003E), 美国 Santa Cruz 公司; 氯化锂 (批号: 140504), 中国医药集团上海试剂公司; 二甲亚砜 (批号: MFCD00002089), 美国 Research Organics 公司。

动物立体定向仪 (SR-5R 型, 日本孚光仪器公

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划 (2017JM3039)

* 通讯作者: sunhongxjt@163.com

司); 脑电图描记仪 (Rodentpack 型, 上海玉研科学仪器有限公司); 全程录像监测系统 (ET1022 型, 武汉优尔生命科学装备有限公司); 多道生理信号采集处理系统 (RM6240 型, 成都仪器厂); 转膜仪 (VE-186 型, 上海天能科技有限公司); 电泳仪 (PowerPacHV 型)、蛋白成像系统 (Chemi-DocXRS 型), 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 模型建立

锂-匹罗卡品癫痫模型制作^[5]: 造模大鼠先腹腔注射新鲜配制的氯化锂, 剂量为 180 mg/kg; 24 h 后腹腔注射东莨菪碱 (1 mg/kg) 以降低大鼠的死亡率, 15 min 后腹腔注射盐酸匹罗卡品, 剂量为 30 mg/kg, 癫痫发作依据 Racine 分级进行评定^[6], 30 min 后未出现癫痫发作的大鼠重复给予盐酸匹罗卡品 (10 mg/kg), 出现癫痫持续状态后 60 min 腹腔注射地西泮注射液 (4 mg/kg) 以终止癫痫持续状态。Racine 分级标准^[6]: 0 级: 无任何反应; I 级: 眨眼、动须、搔抓、面肌抽搐并出现咀嚼运动; II 级: “湿狗样动作”或节律性点头运动; III 级: 双侧前肢阵挛, 或一侧前肢或后肢频繁性抽搐; IV 级: 双侧前肢阵挛, 后肢站立; V 级: 四肢抽搐并跌倒、翻滚。癫痫持续状态开始的标准为持续出现 IV 级及以上发作, 发作间期无正常行为。

1.5 动物分组及给药方法

将 SD 大鼠采用随机数字表分为模型组、定痫汤组、定痫汤 + K252a 组各 22 只, 另将 22 只健康大鼠设为正常组。除正常组外, 其余各组建立大鼠癫痫模型。定痫汤 + K252a 组在大鼠造模前 1 周开始每日给予 TrkB 拮抗剂 K252a 预处理: K252a 10 μ g 溶于 1% 二甲基亚砜, 制成浓度为 10 pmol/ μ l 的 K252a 溶液, 用微量注射器侧脑室注入, 每次 5 μ l, 每日 1 次, 共 1 周。侧脑室注入方法: 大鼠用 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射, 麻醉满意后剃除手术区毛发, 将大鼠固定于脑立体定位仪, 安置皮层记录电极, 电极位点: 大鼠前囟前 2 mm, 中线左右旁 2 mm; 前囟后 4 mm 中线左右旁开 2 mm。在四位点钻开颅骨, 不锈钢螺丝电极 (直径 0.7 mm, 长度 1.0 mm) 植入孔中。4 枚螺丝固定于颅骨作为电极与注药套管的固定桩, 所有电极均用医用牙托粉固定绝缘。术毕待大鼠清醒后, 放回单笼饲养。实验时经注药套管侧脑室给予 K252a。

定痫汤组和定痫汤 + K252a 组在造模后 1 h 开始灌胃, 给予浓度为 1.55 g/ml 定痫汤 2 ml (按 70 kg 质量成人量换算成大鼠等效剂量^[7]), 同时正

常组、模型组均灌服等体积生理盐水, 各组均每日灌胃 1 次, 连续 6 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 癫痫行为分析及脑电图监测 各组大鼠中 11 只通过全程录像监测系统, 观察记录癫痫自发性再发作行为, 自癫痫持续状态后 14 天起, 每天观察 6 h (上午 9 时至 12 时; 下午 14 时至 17 时), 连续观察 4 周。给药 6 周后采用脑电图仪描记脑电图。

1.6.2 海马 BDNF 蛋白检测 既往文献研究结果显示, 在锂-匹罗卡品癫痫模型中, BDNF 蛋白表达在癫痫持续状态后 6~7 天达到高峰^[8-9]。因此, 剩余 11 只大鼠采用 Western blot 分析癫痫持续状态后 7 天大鼠海马 BDNF 的表达。首先将各组大鼠海马提取后称重, 按 80 mg/ml 加入裂解液, 冰浴, 将组织打碎, 超声匀浆 13 000 r/min 离心 15 min, 以上清液提取总蛋白; 将提取的总蛋白进行 SDS-PAGE 分离, 将胶上的蛋白条带电转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜在丽春红染液中染色, 转膜, 将膜放入 TBST 中洗膜, 放入含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 中 4℃ 封闭过夜。室温复温 30 min, 将膜放入适当稀释的一抗中 (兔抗大鼠 BDNF 多克隆抗体 1:200), 洗膜、加入二抗体, 用蛋白成像系统进行定量分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠癫痫自发性再发作发生情况比较

正常组发生癫痫自发性再发作情况 0 只, 模型组大鼠 9 只, 定痫汤组 5 只, 定痫汤 + K252 组 8 只。表 1 示, 与模型组比较, 定痫汤组癫痫自发性再发作潜伏期明显延长, 发作频率及持续时间明显减少 (P < 0.01)。定痫汤 + K252 组自发性再发作的发作频率和持续时间高于定痫汤组, 潜伏期短于定痫汤组 (P < 0.01)。

表 1 各组大鼠癫痫自发性再发作的发生情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	潜伏期 (d)	发作频率 (次/d)	持续时间 (s)
模型组	9	16.2 $\pm$ 6.2*	3.3 $\pm$ 1.0*	57.0 $\pm$ 15.1*
定痫汤组	5	26.7 $\pm$ 5.6	1.8 $\pm$ 0.9	38.2 $\pm$ 17.4
定痫汤 + K252a 组	8	18.6 $\pm$ 4.9*	2.9 $\pm$ 1.2*	49.3 $\pm$ 11.1*

注: 与定痫汤组比较, * P < 0.01

2.2 各组大鼠海马 BDNF 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组大鼠海马 BDNF 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 定痫汤组和定痫汤 + K252a 组 BDNF 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.01$), 且定痫汤 + K252a 组降低 BDNF 蛋白表达弱于定痫汤组 ($P < 0.01$)。各组大鼠海马 BDNF 蛋白电泳图见图 1。

表 2 各组大鼠海马 BDNF 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BDNF
正常组	11	0.521 ± 0.007
模型组	11	$2.012 \pm 0.053^*$
定痫汤组	11	$0.953 \pm 0.021^\Delta$
定痫汤 + K252a 组	11	$1.552 \pm 0.067^{\Delta\Delta}$

注: BDNF, 脑源性神经营养因子; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与定痫汤组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$



注: BDNF, 脑源性神经营养因子

图 1 各组大鼠海马 BDNF 蛋白电泳图

2.3 各组大鼠脑电图结果

图 2 示, 正常组大鼠脑电图背景活动以低波幅波为主, 没有棘波、癫痫样波出现; 模型组大鼠脑电图中有大量的棘波、癫痫波叠加在杂乱的背景活动中; 定痫汤组大鼠脑电图中棘波、癫痫波明显减少, 背景活动以低波幅波为主; 而定痫汤 + K252a 组大鼠脑电图中棘波、癫痫样波明显多于定痫汤组。

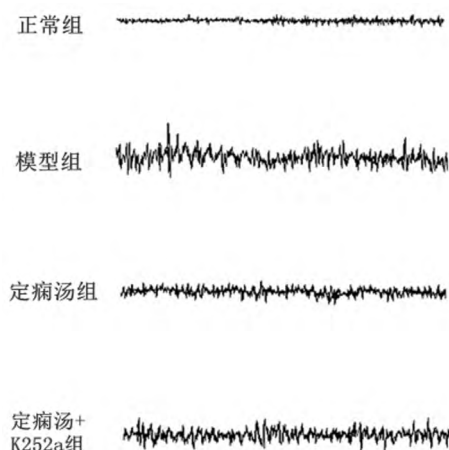


图 2 各组大鼠脑电图表现

3 讨论

癫痫作为神经系统的常见疾病, 其发病机制目前仍不完全清楚, 而癫痫发作后引起脑内炎症反应、神经细胞凋亡、胶质增生及苔藓纤维芽生和神经网络重塑是癫痫反复发作的病理基础^[1]。定痫汤为我们临床抗癫痫常用复方, 方中全蝎、僵蚕为君药以熄风止痉, 胆南星、半夏清热化痰、镇惊利窍, 配以石菖蒲、远志豁痰开窍共为臣药, 当归、桃仁、红花、赤芍活血化瘀、开窍通络为佐药, 甘草调和诸药为使药。

BDNF/TrkB 通路作为中枢神经系统的重要信号通路, 当 BDNF 和其特异性受体 TrkB 结合可引起海马兴奋环路的建立、激活 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体, 而激活的 NMDA 受体导致细胞内 Ca^{2+} 内流, 增强兴奋性突触后电位, 增加癫痫发作的敏感性^[1]。癫痫发作后 BDNF 增加, 使兴奋性突触后电流增加, 进一步加重 Ca^{2+} 超载, 引起神经元死亡和癫痫反复发作^[2]。为进一步明确定痫汤的抗癫痫作用是否通过 BDNF/TrkB 通路, 本研究设定痫汤 + K252a 组, 即大鼠在造模前给予 TrkB 拮抗剂 K252a 进行预处理。

本研究结果显示, 定痫汤组和定痫汤 + K252a 组均可减少癫痫大鼠癫痫自发性再发作的发生、发展, 延长其潜伏期, 减少发作频率及持续时间, 说明治疗方案可抑制癫痫大鼠的病性放电。当造模前提前给予 TrkB 拮抗剂 K252a 预处理后, 由于 K252a 作为 TrkB 受体的拮抗剂, 可有效地阻止 BDNF 和其受体 TrkB 的结合, 阻断 BDNF/TrkB 通路的作用^[3]。与单纯给予定痫汤比较, 预处理给予 K252a 后大鼠癫痫自发性再发作潜伏期缩短, 发作频率、持续时间增加, 说明 TrkB 拮抗剂 K252a 阻止了定痫汤的抗癫痫作用, 也提示定痫汤可能是通过 BDNF/TrkB 通路发挥抗癫痫作用。另外, 定痫汤组和定痫汤 + K252a 组亦可降低大鼠海马 BDNF 蛋白表达, 并且定痫汤组较定痫汤 + K252a 组降低更明显。综上所述, 定痫汤对癫痫大鼠病性放电具有一定的抑制作用, 其机制可能通过调节 BDNF/TrkB 通路发挥作用。

参考文献

- [1] GUO J, LIU J, FU W, et al. The effect of electroacupuncture on spontaneous recurrent seizure and expression of GAD(67) mRNA in dentate gyrus in a rat model of epilepsy [J]. Brain Res, 2008, 1188: 165-172. doi: 10.1016/j.

- brainres. 2007. 10. 017.
- [2] POO MM. Neurotrophins as synaptic modulators [J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(1): 24-33.
- [3] 吴琼, 刁丽梅. 定痫丸治疗癫痫的研究新进展 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(1): 40-42.
- [4] 王建飞, 周艳, 刘吉宏. 实验动物饲养管理和使用指南 [M]. 8 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 37.
- [5] JOPE RS, MORRISETT RA, SNEAD OC. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats [J]. Exp Neurol, 1986, 91(3): 471-480.
- [6] RACINE RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 281-294.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 132.
- [8] HONG S, XIN Y, HAIQIN W, et al. The PPAR γ agonist rosiglitazone prevents neuronal loss and attenuates development of spontaneous recurrent seizures through BDNF/TrkB signaling following pilocarpine-induced status epilepticus [J]. Neurochem Int, 2013, 63(5): 405-412.
- [9] BENMANSOUR S, DELTHEIL T, PIOTROWSKI J, et al. Influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on serotonin neurotransmission in the hippocampus of adult rodents [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 587(1/3): 90-98.
- [10] YANG T, ZHOU D, STEFAN H. Why mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression? [J]. Neurol Sci, 2010, 296(1/2): 1-6.
- [11] HEINRICH C, LÄHTEINEN S, SUZUKI F, et al. Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy [J]. Neurobiol Dis, 2011, 42(1): 35-47.
- [12] KIM JH, ROBERTS DS, HU Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor uses CREB and Egr3 to regulate NMDA receptor levels in cortical neurons [J]. J Neurochem, 2012, 120(2): 210-219.

Effects of *Dingxian Decoction* (定痫汤) on BDNF/TrkB Pathway of Hippocampus in Epilepsy Model Rats

SUN Hong¹, WANG Xiaorong², CHEN Songsheng¹, GAO Zhen¹, REN Hongwei¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004; 2 Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of anti-epilepsy effect of *Dingxian Decoction* (定痫汤). **Methods** A total of 66 rats were randomly divided into model group, *Dingxian Decoction* group and *Dingxian Decoction* + K252a group, with 22 rats in each group. Lithium pilocarpine was used to establish rat epilepsy model, and 22 healthy rats were set as normal group. K252a-antagonist tyrosine kinase receptor B (TrkB) was injected into lateral ventricles of rats in *Dingxian Decoction* + K252a group one week before the establishment of model, 5 μ l each time and once a day for a week; *Dingxian Decoction* group and *Dingxian Decoction* + K252a group were given 2 ml *Dingxian Decoction* through lavage at the concentration of 1.55 g/ml 1 hour after the establishment of model, while normal group and the model group were given the same volume of normal saline once a day for 6 weeks. Eleven rats in each group were monitored by electroencephalogram (EEG) and the latency, frequency and duration of spontaneous epileptic recurrence were recorded. The expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus was detected in the other 11 rats of each group. **Results** There was no spontaneous epilepsy recurrences in the normal group, while 9 rats in the model group, 5 rats in the *Dingxian Decoction* group and 8 rats in the *Dingxian Decoction* + K252 group showed spontaneous epilepsy recurrence. Compared with the model group, the latency of spontaneous recurrence of epilepsy in *Dingxian Decoction* group was significantly prolonged, the frequency and duration of epilepsy were significantly reduced, and the expression of BDNF protein in hippocampus was decreased ($P < 0.01$). Compared with *Dingxian Decoction* group, the frequency and duration of spontaneous epilepsy recurrence in *Dingxian Decoction* + K252 group were increased, and the latency was shortened and the expression of BDNF was decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** *Dingxian Decoction* may play an anti-epileptic role by regulating BDNF/TrkB pathway. **Keywords** epilepsy; *Dingxian Decoction*; brain-derived neurotrophic factor; tyrosine kinase receptor B; spontaneous recurrence of epilepsy

(收稿日期: 2018-09-18; 修回日期: 2018-10-02)

编辑: 邓 媛