

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.15.013

半夏白术天麻汤对癫痫模型大鼠急性期和慢性期
海马神经元 miRNA 表达谱及生物功能的影响田茸^{1,2*}, 舍雅莉², 张晓琳³, 张天娥¹, 黄巍¹, 蒋萃¹, 李白雪¹

(1. 成都中医药大学, 四川省成都市温江区柳台大道 1166 号, 611137; 2. 甘肃中医药大学; 3. 长治医学院附属和济医院)

摘要 目的 探讨癫痫急性期和慢性期发病机制, 以及半夏白术天麻汤对癫痫干预的效应机制。方法 将 50 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、急性期模型组、急性期给药组、慢性期模型组、慢性期给药组, 每组 10 只。除正常对照组外, 其余各组大鼠采用氯化锂-匹鲁卡品诱导癫痫发作大鼠模型, 造模后 1~7 天为急性期, 8~30 天为慢性期。造模成功 1 天后急性期给药组和慢性期给药组大鼠给予浓度为 1.548 g/ml 半夏白术天麻汤 2 ml 灌胃, 急性期给药组灌胃 7 天, 慢性期给药组灌胃 30 天。其余 3 组给予 2 ml 蒸馏水灌胃, 均每日 1 次。正常对照组大鼠 5 只和急性期模型组、急性期给药组大鼠 10 只一般行为学观察 7 天并取脑组织; 正常对照组大鼠剩余 5 只和慢性期模型组、慢性期给药组 10 只一般行为学观察 30 天并取脑组织。运用 miRNA 芯片分析检测各组大鼠海马神经元细胞 miRNA 表达谱, 生物信息学软件预测靶基因及 KEGG 富集分析, 并采用实时荧光定量 PCR 验证各组间大鼠海马组织中部分差异基因表达, HE 染色观察海马神经元细胞病理形态学改变。结果 一般行为学观察和 HE 染色结果显示, 半夏白术天麻汤具有抑制癫痫发作程度和频率的作用, 并具有减轻和改善癫痫大鼠大脑海马神经元细胞损伤的作用, 慢性给药组病理改善更好。急性期模型组和慢性期模型组与正常对照组比较得到 10 个重叠差异基因。两模型组前 10 位的通路中有 3 条重叠, 即糖胺聚糖生物合成、长时程增强、赖氨酸降解。选取 4 个重叠 miRNA 通过实时荧光定量 PCR 验证: 与急性期模型组比较, 急性期给药组 4 个重叠 miRNA 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与慢性期模型组比较, 慢性期给药组 rno-miR-146a-5p 下调, rno-miR-218a-5p 上调 ($P < 0.05$)。结论 糖胺聚糖的生物合成、长时程增强效应、赖氨酸降解均可能与癫痫的发生发展密切相关。半夏白术天麻汤有可能是通过调节相关 miRNA 及其靶基因和信号通路, 改善相关生物功能从而发挥其抗癫痫作用, 并且对慢性期效果更好。

关键词 癫痫; 半夏白术天麻汤; 海马; 神经元; 微小 RNA

癫痫是由多种原因引起的神经元同步化异常放电所致的突发性、反复性、短暂性的运动、感觉、意识、精神和植物神经等功能异常的脑部疾病^[1]。中医学认为, 癫痫主要病机是风痰上扰, 急性期主要以“风”为先导, 慢性期主要以“痰”为根本, 风是标, 痰是本, 风痰交互致病。古今诸多医家临证时多选用熄风化痰的经典代表方——半夏白术天麻汤(《医学心悟》)加减施治, 疗效确切^[2-4]。微小 RNA(miRNA)是通过负性调控 mRNA 来协调多种靶蛋白的合成, 从而影响生命进程, 是一类在生物进化过程中具有高度保守性及稳定性的内源性

非编码 RNA, 在神经系统中 miRNA 主要参与神经系统疾病的生理、病理及生物反馈调节, 如神经细胞发育、树突突触形成、胶质细胞增生、神经细胞凋亡及坏死等^[5]。本研究拟通过对 miRNA 表达谱的研究, 探寻与癫痫急性期和慢性期相关的靶基因及其生物功能, 以及可能参与的生物信号通路, 从而阐释癫痫急性期和慢性期的发病机制, 并在此基础上研究半夏白术天麻汤对癫痫急性期和慢性期干预效应的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 50 只, 9 周龄, 体重 (200 ± 10) g, 成都达硕实验动物有限公司

基金项目: 国家自然科学基金(81360519)

* 通讯作者: t_rongyx@126.com

提供, 实验动物合格证号 SCXK (川) 2013-24。

1.2 药物

半夏白术天麻汤由法半夏、天麻、茯苓、橘红、白术、甘草组成, 比例为 3:2:2:2:5:1, 由成都中医药大学中药制剂室加工, 按照处方比例取以上药物, 用 8 倍量 70% 乙醇每次回流 2 h, 提取 3 次, 得醇提取液和醇提取药渣。合并 3 次醇提取液过滤, 滤液减压回收乙醇后得醇提取浓缩液, 干燥得干膏, 粉碎成细粉, 加入挥发油。实验用不含赋形剂的浸膏, 1 g 浸膏相当于 2.2 g 生药含量, 冰箱保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

氯化锂 (货号: Sigma-213233)、阿托品 (批号: 100040-200510)、匹鲁卡品 (货号: Sigma-P6503)、水合氯醛 (货号: Sigma-45307), 上海伯豪生物技术有限公司; miRNA Complete Labeling 试剂盒 (货号: 5190-0456)、基因表达洗涤缓冲液 (货号: 5188-5327), Agilent 公司; 反转录 miRNA qPCR 检测试剂盒 (货号: SYBR Green), 天根生化科技有限公司; 反转录试剂盒, QIAGEN 公司。

7900 HT 序列检测系统定量 PCR 仪, ABI 公司; NanoDrop ND-2000 分光光度计, Thermo 公司; 生物分析仪 (型号 2100)、鼠 miRNA (8*15K) V21.0 芯片, Agilent 公司; BIOMATE 3S 型核酸定量分析仪, Bio-Rad 公司。

1.4 分组及造模

大鼠适应性饲养 3 天后, 受试动物按体重编号, 以随机数字表法分为正常对照组、急性期模型组、急性期给药组、慢性期模型组、慢性期给药组, 每组 10 只。除正常对照组外, 其余各组均建立癫痫大鼠模型^[8]: 以 127 mg/kg 腹腔注射氯化锂, 24 h 后腹腔注射阿托品 1 mg/kg, 30 min 后按照 35 mg/kg 腹腔注射匹鲁卡品溶液。30 min 后未引起癫痫发作的以每间隔 10 min 给 1 次匹鲁卡品 10 mg/kg, 直至癫痫发作达到 IV 或 V 级; 诱发癫痫发作 1 h 后, 以 300 mg/kg 10% 水合氯醛和 1 mg/kg 阿托品腹腔注射以停止癫痫发作。正常对照组大鼠给予腹腔注射相同剂量的生理盐水。癫痫发作根据 Racine^[9] 分级, 0 级: 无任何反应; I 级: 凝视、咀嚼和须动; II 级: 点头或湿狗样抖动、搔抓; III 级: 前肢局限性阵挛; IV 级: 伴有后肢站立的全身强直性发作; V 级: 伴有站立并摔倒的全身强直-阵挛性发作。以连续出现 3 次 IV 级或 IV 级以上的痫性发作为模型复制成功。本研究将造模后 1~7 天

定为模型急性期, 将造模后 8~30 天定为慢性期。

1.5 干预方法

造模成功 1 天后急性期给药组和慢性期给药组大鼠均按 70 kg 质量成人量换算成大鼠等效剂量^[10], 给予浓度为 1.548 g/ml 半夏白术天麻汤 2 ml 灌胃, 每日 1 次, 急性期给药组灌胃 7 天, 慢性期给药组灌胃 30 天。其余 3 组给予 2 ml 蒸馏水同步灌胃。

1.6 观察指标及方法

正常对照组大鼠 5 只和急性期模型组、急性期给药组大鼠各 10 只在给药后第 7 天处死取材, 一般行为学观察 7 天; 正常对照组大鼠剩余 5 只和慢性期模型组、慢性期给药组各 10 只在给药后第 30 天处死取材, 一般行为学观察 30 天。10% 水合氯醛以 3 ml/kg 腹腔注射麻醉后断头取脑, 钝性分离各组大鼠双侧海马组织, 存储于组织保存液中以 -80℃ 冰箱保存。

1.6.1 海马组织 HE 染色 海马组织石蜡包埋后切片, 切片依次通过二甲苯脱蜡、酒精入水、苏木素染色、氨水返蓝、伊红染色、酒精脱水、二甲苯透明完成, 中性树胶封片。置于显微镜下观察大鼠海马神经元细胞形态学改变。

1.6.2 基因芯片实验 1) RNA 抽提与纯化。采用 miRNA 总提取试剂盒标准操作流程进行样品的总 RNA 抽提, 抽提所得总 RNA 经分光光度计及生物分析仪进行质检, 经质检筛选合格的 RNA 样品进行后续的芯片实验。2) 芯片检测。各组均选取 4 个质检合格样本用鼠 miRNA (8*15K) V21.0 芯片进行检测。实验样品 RNA 按照试剂盒 miRNA Complete Labeling and Hyb 标准操作流程对样品中 miRNA 分子进行荧光标记。芯片结果采用芯片扫描仪进行扫描, 软件设置 Scan resolution = 5 μm (大鼠), PMT 100%, 用 Feature Extraction software 10.7.1.1 读取数据, 最后采用 R 语言程序包 AgiMicroRna 进行归一化处理, 算法为 Quantile。同步监测芯片实验的质控情况。3) miRNA 差异基因分析。原始数据归一化后, 采用 Fold-change (表达差异倍数) 以及 *t* 检验对差异基因进行筛选。4) miRNA 靶基因预测及生物信息学分析。运用在线分析工具有 TargetScan、miRanda、PicTar、MirTarget2、PITA 等软件, 预测差异 miRNA 的靶基因 (<http://prediction.ebioservice.com:8080/prediction/analysis>), 将差异表达最明显的 miRNA 进行靶基因预测, 并对靶基因基于 KEGG 的功能富集及通路富集, 求

证 miRNA 参与的生物信号通路及其生物功能。

1.6.3 实时荧光定量 PCR 验证各组大鼠海马组织中部分差异基因表达 分别取 1 μ l 各组织 RNA 样品,用核酸定量分析仪测定其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.8~2.0 之间,经总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测,提取的 RNA 符合纯度要求,可用于后续 PCR。按照反转录试剂盒要求操作,所得的单链 cDNA 放置于 -20℃ 保存备用。实时荧光定量 PCR 以 U6 作为内参基因,引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列分别为: miRNA-146a-5p: 5'-TGAGAACT-GAATTCATGGGTT-3'; rno-miR-142-3p: 5'-TGTAGT-GTTTCCTACTTTATGGAAA-3'; rno-miR-551b-3p: 5'-GCGACACATACTTGGTTTCAGT-3'; rno-miR-218a-5p: 5'-TTGTGCTTGATCTAACCATGTAAA-3'; U6: 5'-GTC-CCAGCCTGAACTGAGTC-3'。采用样点拟合法分析结果得到目的基因和 U6 的 Ct 值,用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对待测 miRNA 进行分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析,计量数据符合正态分布以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学比较

造模后除正常对照组外,其余 4 组大鼠在腹腔注射匹鲁卡品数分钟后出现流涎、分泌物增加等外周胆碱能反应表现,以及活动减少、凝视、湿狗样震颤、点头样动作、咀嚼磨牙、排便等;其后大鼠单侧前肢抖动,继而双侧前肢出现抽搐;前肢立起且后肢强直跌倒或躯干翻转,进入癫痫强直阵挛发作持续状态,根据 Racine 分级观察两模型组和两给药组大鼠均连续出现 3 次 IV 级或 IV 级以上的痫性发作,提示模型复制成功,且两给药组与两模型组比较行为学没有明显差异。在给药第 8~14 天期间,慢性期模型组和慢性期给药组大鼠出现精神萎靡、进食活动减少、消瘦、精神紧张、怕人、畏惧声响、冲撞笼栏,甚至咬人等易激惹状态。给药第 15~30 天期间,慢性期模型组大鼠出现癫痫自发作,发作级数在 I~V 级,自发作后大鼠呈高度紧张、兴奋、易激惹状态,甚至躁狂状态,发作频繁时,慢性期模型组大鼠进食明显减少、毛发发黄、无光泽。慢性期给药组大鼠的发作频次和级别均较慢性期模型组大鼠有明显减少和降低,进食、体重、毛发等一般情况也较慢性期模型组大鼠良

好。正常对照组大鼠表现均正常。

2.2 各组大鼠海马 HE 染色的病理形态学比较

HE 染色结果显示,正常对照组神经元结构正常,细胞核圆而规则,核膜清楚,有明显的核仁,神经元、神经纤维未见异常改变,血管等未见异常,仅少量锥体细胞核染色质浓缩,核膜边界不清。急性期模型组大量锥体细胞核不规则并固缩深染,胞浆嗜伊红,细胞间隙明显增大,胞浆呈空泡样变,正常神经元数量显著减少,部分神经元凋亡,小胶质细胞增生明显,可见血管套及噬神经现象,并可见血管扩张,毛细血管充血。急性期给药组仍可见神经元细胞核固缩、裂解,小胶质细胞增生,但较急性期模型组病理性形态学改变稍有减轻。慢性期模型组可见神经元细胞核固缩、裂解,微血管充血,可见噬神经现象,神经元凋亡显著增多。慢性期给药组神经元细胞核固缩、深染、异变及胞浆异染的病理变化减轻,正常结构的神经元较多,神经元病理变化改善明显,与急性期给药组相比能更好地抑制神经元细胞的凋亡,对神经元损伤有更好的保护作用。

2.3 基因芯片结果

2.3.1 差异基因基本信息 急性期模型组与正常对照组对比 (如图 1),共有 18 个 miRNA 差异表达明显,其中 9 个 miRNA 表达上调,9 个 miRNA 表达下调,上调最明显的为 rno-miR-21-5p,下调最明显的是 rno-miR-218a-5p。慢性期模型组与正常对照组比较 (如图 2),共有 49 个 miRNA 差异表达明显,其中 26 个 miRNA 表达上调,23 个 miRNA 表达下调,上调最明显的为 rno-miR-23a-3p,下调最明显的是 rno-miR-410-3p。

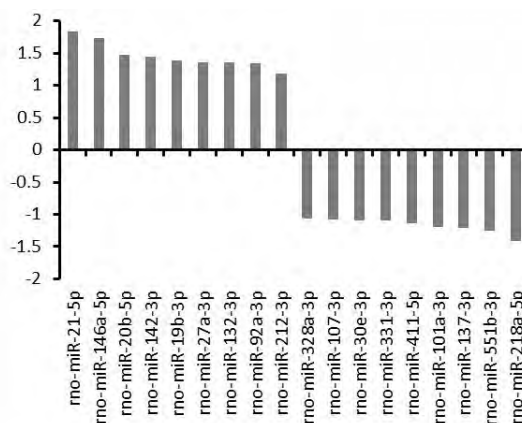


图 1 急性期模型组与正常对照组大鼠比较 18 个差异表达 miRNA 的差异倍数

通过对比后得出急性期模型组和慢性期模型组与正常对照组比较后有 10 个重叠出现的差异基因，各组间比较得出这些差异基因的表达情况（如表 1 所示）。大鼠海马 rno-miR-146a-5p、rno-miR-142-3p、rno-miR-27a-3p 在癫痫的急性期至慢性期都呈现上调，但其中 rno-miR-146a-5p 在经过 30 天的半夏白术天麻汤治疗后呈现下调。其余 rno-miR-328a-3p、rno-miR-107-3p、rno-miR-331-3p、rno-miR-411-5p、rno-miR-137-3p、rno-miR-551b-3p、rno-miR-218a-5p 7 个 miRNA 在癫痫的急性期至慢性期都呈现下调，但其中 rno-miR-137-3p 和 rno-miR-218a-5p 在经过 30 天的半夏白术天麻汤治疗后呈现上调。

课题组为了揭示该 10 个重叠 miRNA 的作用机制，通过 miRTarBase 数据库（<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>）检索到靶基因，并通过 PubMed（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>）获得 miRNA 的功能注释和 miRNA 靶基因相互作用的相关文献。表 2 示，该 10 个 miRNA 中有 6 个已经报道可以调控一个或多个靶基因并在许多疾病和生物过程中发挥重要作用，几乎所有这 10 个重叠的 miRNA 都参与了神经系统疾病的分子机制。

2.3.2 miRNA 靶基因生物信息学分析结果 为了评估差异表达 miRNA 的调控功能，课题组通过 miRNA 靶标预测数据库 miRDB 预测靶基因。分别在癫痫急性期模型组和癫痫慢性期模型组预测 miRNA 的靶基因分别为 831 个和 1412 个。对所得靶基因使用 KEGG 数据库进行通路富集分析，以 $P < 0.05$ 为筛选条件。结果表明：急性期模型组与正常对照组比较共有 25 个通路显著表达，慢性期模型组与正常对照组比较共有 48 个通路显著表达，两项比较有 16 个重叠出现的通路富集（如表 3 所示）。糖胺聚糖生物合成在两个模型组中都显示为富集最显著的途径。并且该两组中排前 10 位的途径中有 3 条重叠途径，即糖胺聚糖生物合成、长时程增强、赖氨酸降解。

2.4 各组大鼠海马组织中部分差异基因实时荧光定量 PCR 验证结果

课题组选取 4 个重叠 miRNA 即 miR-146a-5p、miR-142-3p、miR-551b-3p、miR-218a-5p 通过实时荧光定量 PCR 验证其在各组大鼠海马组织中的表达情况。对比 PCR 与芯片结果可以得出基本相同的变化趋势（如表 4 所示），PCR 验证结果提示：

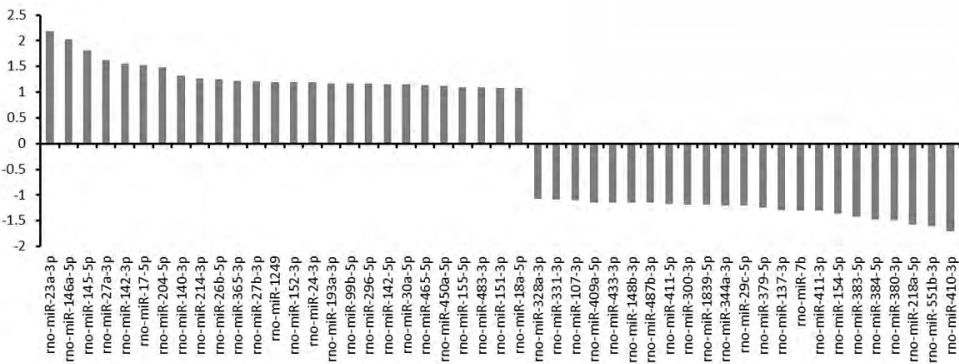


图2 慢性期模型组与正常对照组大鼠比较 49 个差异表达 miRNA 的差异倍数

表 1 急性期模型组和慢性期模型组与正常对照组比较后的 10 个重叠出现的差异基因在各组间比较的表达情况

miRNA 名称	Group2 VS Group 1	Group4 VS Group 1	Group3 VS Group 1	Group5 VS Group 1	Group3 VS Group 2	Group5 VS Group 4	Group4 VS Group 2
rno-miR-146a-5p	上调	上调	上调	—	—	下调	—
rno-miR-142-3p	上调	上调	上调	—	—	—	—
rno-miR-27a-3p	上调	上调	上调	上调	上调	—	—
rno-miR-328a-3p	下调	下调	—	—	—	—	—
rno-miR-107-3p	下调	下调	下调	下调	—	—	—
rno-miR-331-3p	下调	下调	—	—	—	—	—
rno-miR-411-5p	下调	下调	下调	—	下调	—	—
rno-miR-137-3p	下调	下调	下调	—	—	上调	—
rno-miR-551b-3p	下调	下调	下调	—	—	—	—
rno-miR-218a-5p	下调	下调	下调	—	—	上调	—

注：Group1：正常对照组；Group 2：急性期模型组；Group 3：急性期给药组；Group 4：慢性期模型组；Group 5：慢性期给药组

表 2 急性期模型组和慢性期模型组与正常对照组比较后的 10 个重叠出现的差异基因与神经系统疾病相关的靶基因及生物学功能

miRNA 名称	验证的靶基因	报告的与神经疾病相关的生物学功能
mo-miR-146a-5p	Irak1, Snap25, Smad4, Traf6, Klf4, Nfkb1	炎症和免疫过程-颞叶癫痫
mo-miR-142-3p	—	哺乳动物大脑发育过程中的创伤性脑损伤
mo-miR-27a-3p	Trim63, Hyou1, Thrb, Rxra	大鼠海马高水平的神经再生
mo-miR-328a-3p	Igfl1, Cav1, Sept3	哺乳动物神经元的规范翻译
mo-miR-107-3p	Arnt, Pdcd10	促进兴奋性神经毒性
mo-miR-331-3p	Fgf16	在哺乳动物神经元中与多核糖体共纯
mo-miR-411-5p	—	—
mo-miR-137-3p	—	海马的神经退行性变
mo-miR-551b-3p	—	大鼠海马中的新型小 RNA
mo-miR-218a-5p	Tgm2, Cntn4, Kcnj16	在哺乳动物神经元中与多核糖体共纯

表 3 急性期模型组和慢性期模型组与正常对照组比较后得到重叠的 16 个通路富集

信号通路名称	急性期模型组与正常对照组比较		慢性期模型组与正常对照组比较	
	P 值	富集因子	P 值	富集因子
糖胺聚糖生物合成	0.0043	5.72	0.0064	4.15
赖氨酸降解	0.0038	3.58	0.0096	2.59
Wnt 信号通路	0.0003	3.53	0.0001	2.42
RNA 降解	0.0012	3.30	0.0295	2.00
粘合连接	0.0027	3.18	0.0424	1.94
长时程增强	0.0075	2.90	0.0001	3.16
上皮细胞的细菌侵袭	0.0088	2.82	0.0058	2.41
mTOR 信号通路	0.0228	2.75	0.0157	2.39
TGF- β 信号通路	0.0079	2.69	0.0224	2.01
T 细胞受体信号通路	0.0045	2.63	0.0001	2.71
轴突导向	0.0050	2.48	0.0008	2.33
MAPK 信号通路	0.0002	2.45	0.0000	2.14
B 细胞受体信号通路	0.0377	2.29	0.0011	2.70
细胞内噬作用	0.0431	1.95	0.0002	2.30
焦点粘连	0.0359	1.85	0.0069	1.84
肌动蛋白细胞骨架的调控	0.0414	1.77	0.0020	1.93

表 4 4 个重叠差异 miRNA 在各组大鼠海马组织中实时荧光定量 PCR 验证表达结果

miRNA 名称	Group2 VS Group1				Group3 VS Group2				Group4 VS Group1				Group5 VS Group4			
	芯片表达谱		QPCR		芯片表达谱		QPCR		芯片表达谱		QPCR		芯片表达谱		QPCR	
	Fc	P 值	Fc	P 值	Fc	P 值	Fc	P 值	Fc	P 值	Fc	P 值	Fc	P 值	Fc	P 值
mo-miR-146a-5p	1.73	0.030	1.89	0.001	1.00	0.759	1.00	0.362	2.03	0.013	2.13	0.010	-1.36	0.026	-1.41	0.004
mo-miR-142-3p	1.44	0.048	1.20	0.014	1.01	0.874	1.00	0.538	1.56	0.022	1.02	0.804	-1.02	0.302	1.01	0.568
mo-miR-551b-3p	-1.25	0.042	-1.75	0.021	1.00	0.671	1.02	0.085	-1.58	0.003	-2.12	0.010	1.01	0.092	1.03	0.057
mo-miR-218a-5p	-1.42	0.001	-1.46	0.053	1.03	0.086	1.00	0.273	-1.60	0.025	-1.79	0.001	1.29	0.004	1.36	0.027

注: QPCR, 实时荧光定量 PCR; Group1: 正常对照组 (n=3); Group 2: 急性期模型组 (n=4); Group 3: 急性期给药组 (n=3); Group 4: 慢性期模型组 (n=4); Group 5: 慢性期给药组 (n=3); Fc: 差异倍数; Fc 正数: 上调; Fc 负数: 下调

与正常对照组比较, 急性期模型组大鼠海马组织 rno-miR-146a-5p、mo-miR-142-3p 上调, rno-miR-551b-3p、miR-218a-5p 下调 ($P < 0.05$); 慢性期模型组大鼠海马组织 rno-miR-146a-5p 上调, rno-miR-551b-3p、rno-miR-218a-5p 下调 ($P < 0.05$)。与急性期模型组比较, 急性期给药组 4 个重叠 miRNA 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与慢性期模型组比较, 慢性期给药组 rno-miR-146a-5p 下调, rno-miR-218a-5p 上调 ($P < 0.05$)。

3 讨论

癫痫中医学称为“痫病”, 其临床特征正如《黄帝内经》曰“风胜则动”“诸暴强直, 皆属于风”, 故可出现两目上视、四肢抽搐、颈项强直等动风之证“风性善行而数变”, 故当风携痰移走, 不再蒙蔽清窍时则表现出苏醒, 醒后如常人, 此时风痰虽不蒙蔽清窍但由于发作时机气逆乱, 神机闭阻从而损伤元神, 发作次数越多, 发作历时越长则

元神受损越盛。半夏白术天麻汤方中天麻熄风止痉，平抑肝阳，祛风通络，用于肝风内动、惊痫抽搐，为“治风神药”。半夏燥湿化痰，降逆止呕，消痞散结。天麻与半夏两药合用，为治疗风痰之要药，共为本方之君药。白术为臣，健脾燥湿，与半夏、天麻配伍，祛湿化痰、熄风之功更佳。茯苓利水渗湿，健脾安神，是为佐药，与白术相伍，尤能治生痰之本。橘红散寒燥湿，理气化痰，使气顺则痰消，亦为佐药。甘草益气补中，清热解毒，祛痰止咳，缓急止痛，调和药性，煎加生姜、大枣以调和脾胃。诸药合用，共奏熄风化痰之效，使风熄痰消，癫痫自愈。本研究通过大鼠一般行为学改变和 HE 染色结果说明半夏白术天麻汤具有抑制癫痫发作程度和频率的作用，并具有减轻和改善癫痫大鼠脑海马神经元细胞损伤的作用，并且半夏白术天麻汤对癫痫慢性期能更有效地减少神经元细胞的损伤，更好地发挥抗癫痫效应。

在此基础上，进一步对大鼠海马组织进行芯片检测实验结果显示，*miR-146a-5p* 在癫痫急性期和慢性期都呈现上调，但在经过 30 天的半夏白术天麻汤治疗后呈现下调，其靶基因为 *Irak1*、*Snap25*、*Smad4*、*Traf6*、*Klf4*、*Nfkb1*。*Irak1* 负责白细胞介素 1 诱导的转录因子核因子 κ B (NF- κ B) 的上调，而 NF- κ B 可通过调节突触可塑性，突触功能以及通过调节树突和树突棘的生长来部分调节学习和记忆^[1]。*Snap25* 是突触前质膜蛋白，在神经细胞中高度特异性表达，该基因编码一种对突触小泡融合和神经递质释放至关重要的蛋白质，研究表明人类中至少有一些 *Snap25* 基因突变可能导致注意缺陷多动症^[2]；*Smad4* 是一种高度保守的蛋白质，存在于所有多细胞动物中，它属于转录因子蛋白 SMAD 家族，其作为转化生长因子 β (TGF- β) 信号转导的介质，在调节生物生命周期的关键过程，如胚胎发育、组织稳态、再生和免疫调节中具有重要作用^[3]。研究还显示，*miR-143-3p* 和 *miR-218a-5p* 在癫痫急性期以上慢性期都呈现下调，经过 30 天半夏白术天麻汤治疗后呈现上调，其生物功能主要和哺乳动物神经元与多核糖体共纯化、海马神经退化有关。以上说明半夏白术天麻汤有可能是通过影响这些 *miRNA* 的表达来发挥其抗癫痫的作用。值得关注的是，4 个重叠 *miRNA* 在急性期给药组治疗前后差异不显著，究其原因，可能是由于半夏白术天麻汤需要一个长时程的服用周期才能起到抗癫痫的疗效，短期服用很难见效，与半夏白术天麻汤对海马组织病理改善效果相符，其

具体作用机制值得进一步深入研究。

通过 *miRNA* 靶基因生物信息学分析，得出 3 条重要的生物信号通路，即糖胺聚糖生物合成、长时程增强、赖氨酸降解。在神经系统中，糖胺聚糖的重要作用调节轴突的侧生长，参与细胞迁移和黏附、轴突分化和基质的神经极性，它可与生长因子、细胞外基质的糖蛋白、细胞黏附分子、蛋白酶和抗蛋白酶结合，促进轴突生长^[4]。长时程增强效应是发生在两个神经元信号传输中的一种持久增强现象，与学习、记忆过程密切相关，学习记忆的神经生物学基础是中枢神经系统的可塑性，包括神经网络、神经环路及突触连接等不同水平的可塑性，其中突触可塑性尤为关键^[5]。有研究^[6]以盐酸赖氨酸注射液治疗出血性脑血管患者，患者的神经功能障碍明显改善，认为补充赖氨酸能够激活神经肽功能，促使神经细胞复活和恢复神经系统功能。

综上，癫痫的发生涉及多个靶基因、多条信号通路，其发生机制非常复杂，其中糖胺聚糖的生物合成、长时程增强效应、赖氨酸降解均可能与癫痫的发生发展密切相关。而半夏白术天麻汤具有一定的抗癫痫作用，有可能是通过调节相关的 *miRNA* 及其靶基因和信号通路，改善相关的生物功能从而发挥其抗癫痫的作用。

参考文献

- [1] 潘心, 邹飒枫, 杨静娴. 中药对癫痫神经保护作用的研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2011, 28(4): 381-382.
- [2] 谭启荣. 张觉人教授治疗脑病术后并发症经验 [J]. 四川中医, 2009, 27(1): 1-2.
- [3] 侯树平, 肖艳梅, 刘秀英, 等. 植物神经性癫痫临床治验 [J]. 中医药学报, 1994(3): 29-30.
- [4] 吴哲. 中西医结合治疗外伤性癫痫 19 例 [J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(9): 49-50.
- [5] 张蓓蓓, 陈俊, 丁砚兵. 涂晋文运用半夏白术天麻汤经验举隅 [J]. 江苏中医药, 2016, 48(7): 24-28.
- [6] 张永洛, 岳月娥, 李世光, 等. 半夏天麻白术汤治疗癫痫的疗效观察 [J]. 中国医药学报, 1995, 10(3): 22-25.
- [7] PASQUINELLI AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship [J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(4): 271-282.
- [8] 高旭光, 冯体良, 王军, 等. 氯化锂-匹罗卡品致大鼠急性癫痫模型 [J]. 中国血液流变学杂志, 2003, 3(4): 308-312.
- [9] RACINE RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 281-294.
- [10] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算 [J]. 江西医学院学报, 1997, 4(12): 41.

- [1] BOERSMA MC, DRESSELHAUS EC, DE BIASE LM, et al. A requirement for nuclear factor- κ B in developmental and plasticity-associated synaptogenesis [J]. J Neurosci, 2011, 31 (14): 5414-5425.
- [2] BROPHY K, HAWI Z, KIRLEY A, et al. Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) : evidence of linkage and association in the Irish population [J]. Mol Psychiatry, 2002, 7 (8): 913-917.
- [3] MASSAGÉ J. TGF β signalling in context [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13 (10): 616-630.
- [4] LUXARDI G, GALLI A, FORLANI S, et al. Glypicans are differentially expressed during patterning and neurogenesis of early mouse brain [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 352 (1): 55-60.
- [5] VOLK LJ, LENORA JL, BACHMAN R, et al. PKM- ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory [J]. Nature, 2013, 493 (7432): 420-423.
- [6] HOFFMANN GF, KÖLKER S. Cerebral organic acid disorders and other disorders of lysine catabolism [M/OI] // FERNANDES J, SAUDUBRAY JM, BERGHE G, et al. Inborn Metabolic Diseases. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2016: 333-348. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-540-28785-8_23.

Effects of *Banxia Baizhu Tianma Decoction* (半夏白术天麻汤) on miRNA Expression Profile and Biological Function of Hippocampal Neurons in Acute and Chronic Epileptic Rats

TIAN Rong^{1,2}, SHE Yali², ZHANG Xiaolin³, ZHANG Tian¹, HUANG Wei¹, JIANG Cui¹, LI Baixue¹

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137; 2. Gansu University of Chinese Medicine; 3. Affiliated Heji Hospital of Changzhi Medical College)

ABSTRACT Objective To investigate the pathogenesis of epilepsy in acute and chronic phase, and the mechanism of *Banxia Baizhu Tianma Decoction* (半夏白术天麻汤) on epilepsy intervention. **Methods** A total of 50 Wistar rats were randomly divided into a normal control group, an acute phase model group, an acute phase treatment group, a chronic phase model group and a chronic phase treatment group, with 10 rats in each group. Rats were given lithium chloride pilocarpine to induce the rat model of epilepsy except the normal control group. The acute phase was 1 to 7 days after modeling and the chronic phase was 8 to 30 days. One day after the successful model establishment, the acute phase treatment group and the chronic phase treatment group were given a concentration of 1.548 g/ml *Banxia Baizhu Tianma Decoction* 2 ml by gastric perfusion. The acute phase treatment group was administered for 7 days, and the chronic phase treatment group was administered for 30 days. The other 3 groups were given 2 mL of distilled water for gavage, once a day. Five rats in the normal control group and 10 rats in the acute phase model group and the acute phase treatment group were observed for 7 days and the brain tissue was taken out. The remaining 5 rats in the normal control group and 10 in the chronic phase model group and the chronic phase treatment group were performed general behavioral observations for 30 days and brain tissue was then taken out. Analysis of miRNA microarray was used to detect miRNA expression profiles in hippocampal neurons of each group. Bioinformatics software predicted target gene and KEGG enrichment analysis, and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to verify the expression of some differential genes in hippocampus of rats. HE staining was used to observe the pathological changes of hippocampal neurons. **Results** The results of general behavioral observation and HE staining showed that *Banxia Baizhu Tianma Decoction* had the effect of inhibiting the degree and frequency of epilepsy, and had the effect of alleviating and improving the damage of hippocampal neurons in the brain of rats with epilepsy. The pathological improvement in the chronic treatment group was better. Ten overlapping differential genes were obtained in the acute phase model group and the chronic phase model group compared with the normal control group. Three of the top ten pathways in the two model groups overlapped, namely glycosaminoglycan biosynthesis, long-term potentiation, and lysine degradation. Four overlapping miRNAs were selected by real-time fluorescent quantitative PCR for verification. Compared with the acute phase model group, there were no significant differences in the 4 overlapping miRNAs in the acute phase ($P > 0.05$). Compared with the chronic phase model group, rno-miR-146a-5p was down-regulated and rno-miR-218a-5p was up-regulated in the chronic phase ($P < 0.05$). **Conclusion** The biosynthesis, long-term potentiation effect and lysine degradation of glycosaminoglycan may be closely related to the occurrence and development of epilepsy. *Banxia Baizhu Tianma Decoction* may play an anti-epileptic effect by regulating related miRNAs and their target genes as well as signaling pathways, improving related biological functions, and has a better effect on the chronic phase.

Keywords epilepsy; *Banxia Baizhu Tianma Decoction* (半夏白术天麻汤); hippocampus; neurons; microRNA

(收稿日期: 2018-10-24; 修回日期: 2019-02-28)

编辑: 邓 媛