

调肝解毒方对点燃癫痫大鼠情感行为及神经肽 Y 蛋白表达的影响

裴 林¹ 李佃贵^{1*} 高社光² 白文忠³ 杨 艳⁴

(1. 河北省中医药研究院, 石家庄市建华南大街 209 号, 050031; 2. 河北省邯郸市中医院;

3. 河北体育学院; 4. 中国人民解放军第二六〇医院)

基金项目: 国家中医药管理局油毒证重点研究室项目(ZD200823-10); 河北省科技攻关计划项目(10276103D-39)

* 通讯作者: peilin148@163.com, (0311)85990296

[摘要] **目的** 观察调肝解毒方对慢性点燃癫痫大鼠情感行为的影响及其作用机制。 **方法** 腹腔注射印防己毒素制作慢性癫痫模型, 将造模成功的 60 只 SD 大鼠随机分为模型组、调肝低量组、调肝高量组、拉莫三嗪组各 15 只, 另设正常组(15 只)同期观察治疗 60 天。治疗期间正常组、模型组灌胃 10ml/kg 生理盐水; 调肝低量组、调肝高量组分别灌胃 0.4g/kg、0.8g/kg 调肝解毒方混悬液; 拉莫三嗪组灌胃 0.002g/kg 拉莫三嗪混悬液, 每天 1 次。用旷场实验、抬高迷宫实验观察大鼠情感行为改变, 并检测大鼠海马等脑组织神经肽 Y(NPY)的表达。 **结果** 与模型组比较, 拉莫三嗪组、调肝高量组情感行为学各指标差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 调肝低量组拒俘反应性评分及开放臂逃避时间差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 其他各组大鼠脑海马区、尾壳核 NPY 蛋白表达均明显提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 拉莫三嗪组、调肝高量组脑海马各区 NPY 阳性细胞数均有增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 调肝低量组 CA3、DG 区亦有增加($P < 0.01$)。 **结论** 调肝解毒方可改善慢性点燃癫痫大鼠情感行为异常, 并可能与其调节脑组织 NPY 表达有关。

[关键词] 癫痫; 情感行为; 神经肽 Y 蛋白; 调肝解毒方

Effect of Tiaogan Jiedu Recipe on the Emotional Behavior and Neuropeptide Y Protein Expression of Kindling Epilepsy Rats

PEI Lin¹, LI Diangui¹, GAO Shenguang², BAI Wenzhong³, YANG Yan⁴

(1. Academy of Traditional Chinese Medicine of Hebei Province, Shijiazhuang 050031; 2. Handan TCM Hospital; 3. Hebei Institute of Physical Education; 4. PLA 260 Hospital)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Tiaogan Jiedu Recipe (Recipe for regulating the liver and detoxifying) on the emotional behavior of chronic kindling epilepsy rats and its mechanism. **Methods** Intraperitoneal injection of cocculin was adopted to make chronic epilepsy models. Sixty successfully-made models were randomized into model group, Tiaogan small-dosage group, Tiaogan large-dosage group, and lamotrigine group, with 15 in each. And a normal group with 15 rats in it was set up for the observation in the same period of time for 60 days. During treatment, the normal group and model group were given normal saline 10ml/kg with intragastric feeding, the Tiaogan small and large dosage groups were treated with Tiaogan Jiedu Recipe suspension 0.4 g/kg and 0.8 g/kg respectively by intragastric feeding, and the lamotrigine group was applied lamotrigine suspension 0.002 g/kg through intragastric feeding, once every day. The open field test and elevated plus maze test (EPMT) were used to observe the changes in emotional behavior and the neuropeptide Y (NPY) expression in the hippocampus and other cerebral tissues was detected. **Results** Compared with the model group, all indices of emotional behavior of lamotrigine group and Tiaogan large-dosage group were statistically different ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the capture refusal reactivity score and EPMT open arms escaping time of Tiaogan small-dosage group were also statistically different ($P < 0.05$). Compared with the model group, the NPY expression in hippocampus and caudate-putamen nucleus of all other groups was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the NPY positive cells of all hippocampal areas of the lamotrigine group and Tiaogan large-dosage group were increased; and those of the CA3 and DG areas of the Tiaogan small-dosage group were increased as well ($P < 0.01$). **Conclusion** Tiaogan Jiedu Recipe is able to improve the emotional behavior abnormality of chronic kindling epilepsy rats and it is possibly related with its regulation of NPY expression of cerebral tissues.

Key Words epilepsy; emotional behavior; neuropeptide Y (NPY) protein; Tiaogan Jiedu Recipe (Recipe for regulating the liver and detoxifying)

研究表明^[1], 癫痫患者伴有不同程度的情感行为异常, 神经肽 Y (NPY) 及其受体与癫痫和情感行为密切相关。我们应用免疫组织化学方法、免疫印迹吸附法, 结合行为

学观察,研究调肝解毒方对印防己毒素(picROTOXIN, PTX)诱发的癫痫大鼠情感行为改变以及对海马等脑组织NPY蛋白表达的影响,进而探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物

75只健康雄性SD大鼠,清洁级,体重(120±10)g,由河北医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:DK0411-0005。适应性饲养1周,自由饮食,12h光亮/黑暗条件、23~26℃环境温度,单笼喂养。

1.2 药物

调肝解毒方由柴胡、桂枝、天麻、全蝎、黄连、人工牛黄、绞股蓝组成,中药饮片由河北省中医药研究院饮片厂提供,按2:1:2:1:1:1:2比例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(即天冰调督胶囊,冀药制字Z20050746),每粒0.45g;拉莫三嗪为英国葛兰素威康制药有限公司产品,批号:ZJ0010。

1.3 主要试剂和仪器

兔抗鼠NPY多克隆抗体为美国SantaCruz公司产品,生物素标记羊抗兔IgG工作液为中山生物技术有限公司提供;次分子量标准蛋白质、聚偏氟乙烯(PVDF)由北京华美转导科技有限公司提供;PTX购自Sigma公司,1g/瓶,临用时溶于生理盐水配制成0.1mg/ml溶液。Microm K300精密平推冰冻切片机(德国);BIO-RAD电泳系统(美国);Olympus DP70 IPP图象采集系统(日本);超微量紫外可见分光光度计(上海)。

2 方法

2.1 动物造模与分组方法

75只大鼠依据随机数字表分成正常组15只、PTX点燃组60只。PTX点燃组^[2]每日腹腔注射PTX1.5mg/kg,连续注射20~30天,正常组腹腔注射等容积生理盐水,注射后观察大鼠30min,注射20天起以摄录像机观察大鼠24h动态变化。点燃行为依据Racine分级^[2]以获得连续3次4级或4级以上完全发作为完全点燃,点燃后停止注射。至造模第30天,共造模成功大鼠60只,依据随机数字表分为模型组、调肝低量组、调肝高量组、拉莫三嗪组,每组15只。

2.2 给药方法

于造模第30天开始,行为指标测试后灌胃给药。正常组、模型组灌服10ml/kg生理盐水;调肝

低、高量组分别灌服0.4g/kg、0.8g/kg调肝解毒方混悬液;拉莫三嗪组灌服0.002g/kg拉莫三嗪混悬液。每天1次,持续60天。常规喂养,自由进食饮水。

2.3 情感行为学检测

2.3.1 旷场实验观察 ①旷场活动性:大鼠置于旷场行为观察箱中小方格内,观察30s内活动情况。计分标准^[3]以大鼠1/2以上身体从所在方格进入相邻方格计1分,大鼠后肢性站立计1分,两者相加为所得总分。②拒俘反应性:以大鼠未接触过的手套轻抓动物,观察其反应。计分标准^[4]:0分:容易抓取动物;1分:尖叫或回避;2分:尖叫并回避;3分:逃脱;4分:逃脱并尖叫;5分:咬或试图撕咬手套;6分:主动跃起攻击。

2.3.2 抬高迷宫实验 将大鼠放置于开放臂的末端,面朝环绕臂方向,由于大鼠天生具有害怕高而开阔地方的特性,会向环绕臂移动,记录5min内大鼠在开放臂中逃避时间及进入环绕臂次数^[4]。

2.4 脑组织NPY蛋白Western blot检测

每组取6只大鼠,以25%氨基甲酸乙酯腹腔注射麻醉,取脑并分离海马等组织,超声破碎、离心,测定蛋白浓度。蛋白SDS电泳检测,PVDF膜湿法转膜,含5%脱脂奶粉的TBST液中室温下封闭过夜。各步骤间用TBST漂洗,兔抗鼠NPY抗体(1:1000)4℃孵育12h,生物素化羊抗兔IgG室温孵育2h,SABC复合物室温孵育2h,DAB显色;结果中阳性条带取最大OD值表示。

2.5 海马组织NPY免疫组织化学检测

每组取9只大鼠,在25%氨基甲酸乙酯深度麻醉下开胸,自左心室插管入升主动脉,冲洗、灌注、固定、取脑后入相同固定液4h,25%蔗糖中至沉底,对视交叉和乳头体之间脑组织作冠状连续冰冻切片,片厚35μm。切片充分漂洗,进行NPY指标常规免疫组织化学染色。阴性对照用0.01mol/L PBS替代一抗。光学显微镜高倍视野(×400)观察各脑区NPY免疫反应阳性神经元。计数450μm×450μm面积内阳性细胞数。同一切面计数5张切片,取平均值。

2.6 统计学方法

所有数据均采用SAS 6.12统计软件进行分析,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。

表 1 各组大鼠情感行为学指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	旷场活动性(分)	拒俘反应性(分)	开放臂逃避时间(s)	进入开放臂次数(次)
正常组	15	13.60±4.66**	1.20±0.77**	37.93±13.87**	1.67±0.89**
模型组	15	6.32±2.26	3.15±1.21	89.12±22.06	2.93±1.33
拉莫三嗪组	15	9.72±2.14**	2.09±0.71**	61.07±18.45**	2.01±0.96*
调肝低量组	15	7.76±1.98	2.33±0.85*	70.24±15.32*	2.25±1.06
调肝高量组	15	10.16±2.37**	2.10±0.86*	56.46±20.89**	1.97±0.79*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 结果

3.1 各组大鼠情感行为学指标比较

表 1 示,与模型组比较,正常组、拉莫三嗪组、调肝高量组情感行为学各指标差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);调肝低量组拒俘反应性评分及开放臂逃避时间差异亦有统计学意义($P<0.05$)。调肝高量组旷场活动性、开放臂逃避时间、进入开放臂次数较拉莫三嗪组有所改善,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.2 各组大鼠脑组织 NPY 蛋白表达比较

表 2 示,与模型组比较,其他各组大鼠脑海马区、尾壳核 NPY 蛋白表达均明显提高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠脑皮质 NPY 蛋白表达比较差异无统计学意义($P>0.05$);调肝低量组、调肝高量组脑海马、尾壳核 NPY 蛋白表达均比拉莫三嗪组有所提高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 各组大鼠脑组织 NPY 蛋白表达比较(OD 值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	尾壳核	海马	皮质
正常组	6	22.19±5.61**	24.97±4.36**	12.89±5.24
模型组	6	11.61±2.64	14.07±2.91	13.75±3.49
拉莫三嗪组	6	15.92±3.39*	18.51±3.08*	13.25±5.31
调肝低量组	6	17.12±3.67*	20.47±3.04**	15.01±4.26
调肝高量组	6	18.44±5.08*	19.34±4.37*	14.92±3.78

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3.3 各组大鼠脑海马组织 NPY 阳性细胞数比较

免疫组化染色 NPY 阳性神经元主要分布在脑齿状回、CA3、CA1 区。胞体呈圆形或椭圆形,着色部位为胞浆,颜色呈淡褐色,并有 NPY 阳性纤维的表达。表 3 示,与模型组比较,正常组、拉莫三嗪组、调肝高量组脑海马各区 NPY 阳性细胞数均有增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);调肝低量组 CA3、DG 区亦有增加($P<0.01$)。调肝低量组海马 CA3 区、DG 区比拉莫三嗪组相应区域有所增加;调肝高量组海马 CA1 区、CA3 区比拉莫三嗪组相应区域有所增加,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 各组大鼠脑海马组织 NPY 阳性细胞数比较(个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CA1	CA3	DG
正常组	9	31.11±7.20**	36.89±7.67**	35.44±6.32**
模型组	9	22.62±3.71	21.53±4.39	20.67±4.24
拉莫三嗪组	9	27.45±5.26*	26.06±4.15*	27.43±4.86**
调肝低量组	9	24.07±6.29	30.16±5.78**	30.91±6.57**
调肝高量组	9	28.19±5.76*	33.08±7.24**	26.31±5.20*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

4 讨论

癫痫伴随的认知功能损害严重影响患者的生活质量,大约 50% 的癫痫患者有程度不等的认知损害,复杂部分性癫痫、颞叶癫痫、全面性惊厥性癫痫甚至失神性癫痫均可有认知功能缺陷^[5]。癫痫患者一生中情感障碍的发生率为 24%~74%,抑郁、焦虑也是癫痫患者最常见的共患精神障碍^[6]。随着癫痫患者病程延长,情感行为、学习记忆等认知损害有逐渐加重趋势,但临床尚缺乏对癫痫认知损害有效的治疗方药。

旷场及抬高迷宫实验是观察动物恐惧焦虑、警觉等行为药理作用常用的实验方法^[4],旷场实验利用了动物对陌生环境探索、厌恶的特点,给以新环境刺激,来诱导大鼠发生焦虑等行为,用旷场活动性、拒俘反应性指标进行评价。抬高迷宫利用开场增高的区域刺激大鼠固有的恐惧和焦虑,进而出现防护性情感反应。本实验发现,点燃癫痫大鼠除了有典型的惊厥症状和脑电图异常外,尚有焦虑等情感反应以及活动能力、警觉水平改变,调肝解毒方药可干预该模型大鼠行为异常,并与拉莫三嗪作用相似^[7],对改善癫痫情感行为障碍具有积极作用。

NPY 广泛分布于中枢和外周神经系统,既是摄食行为的中枢兴奋剂,对情绪、大脑皮层兴奋性也有调节作用。电生理学方法发现,外源性 NPY 尚可抑制大鼠海马内同步化兴奋性放电^[3],多数学者倾向于 NPY 具有抗癫痫作用,并影响癫痫后认知功能生理调节过程。NPY 在抑郁、焦虑等病理紊乱性

疾病中有重要作用,其表达主要在与情感反应有关的边缘系统特别是尾壳核、背部海马等脑组织。有研究^[4]显示,在 NPY 过分表达的大鼠中,抗焦虑作用可以维持到老年,进而支持 NPY 在抗焦虑行为中的作用。本研究结果表明,模型点燃后大鼠伴有情感行为异常,同时 NPY 蛋白水平降低,经调肝解毒方药干预,大鼠脑 NPY 蛋白水平有所增高,推测该方药改善癫痫大鼠情感行为异常的作用可能与调节 NPY 水平有关。

癫痫时情感行为异常,与肝风浊毒内扰,毒损脑络,枢机不利有关。肝失疏泄,气血失和,痰浊内伏,凝聚成毒,损伤脑络,肝风浊毒上扰而出现发作性神昏抽搐或情感行为异常。调肝解毒方中柴胡配桂枝,和解疏郁,桂枝温通阳气,天麻平肝熄风通络,全蝎攻毒散结,黄连、绞股蓝化浊解毒。诸药配伍,调肝疏利,化浊解毒,熄风止搐。使浊毒伏邪能除、肝气调畅、邪去正复,情感行为改善。

参考文献

- [1] Carvajal CC, Vercauteren F, Dumont Y. Aged neuropeptide Y transgenic rats are resistant to acute stress but maintain spatial and non-spatial learning[J]. Behav

Brain Res, 2004, 153(2):471-480.

- [2] Shandra AA, Mazarati AM, Godlevsky LS, et al. Chemical kindling: Implications for antiepileptic drugs-sensitive and resistant epilepsy models[J]. Epilepsia, 1996, 37(3): 269-274.
- [3] 周陆平, 贺玉芳, 王帆, 等. 热性惊厥对大鼠情感行为及学习记忆的影响[J]. 中国儿童保健杂志, 2004, 12(3): 239-240.
- [4] Lamberty Y, Kitgaard H. Consequences of Pentylentetrazole Kinding on Spatial Memory and Emotional Responding in the Rat[J]. Epilepsy Behav, 2000, 1(4): 256-261.
- [5] Erdogan F, Golgeli A, Arman F, et al. The effects of pentylentetrazole-induced status epilepticus on behavior, emotional memory, and learning in rats[J]. Epilepsy Behav, 2004, 5(3): 388-393.
- [6] Gaitatzis A, Trimble MR, Sander JW. The psychiatric comorbidity of epilepsy[J]. Acta Neurol Scand, 2004, 110(4): 207-220.
- [7] 程海军. 拉莫三嗪与丙戊酸钠对癫痫患者认知功能影响对比研究[J]. 临床医药实践杂志, 2008, 17(2): 97.

(收稿日期: 2011-01-26; 修回日期: 2011-04-28)

[编辑: 崔京艳]



东华原—煎药机行业标准参与制定者

专业品牌

煎药包装设备行业领军品牌, 拥有多项国家专利(ZL02 2 53232.3 ZL 03 2 66107.X 等), 6000多家医院、40000多家终端客户共同见证。

专业资质

9大系列、30多个型号产品, 覆盖了中药煎药包装行业全部领域, 充分满足医院、药店、诊所等不同机构的不同需求。

专业品质

通过ISO9001、ISO13458质量体系认证, 德国CE产品安全质量认证, 产品质量、服务及安全均已达到欧盟标准。

专业服务

全国30多家分公司和办事处, 100多位维修工程师, 450多位服务人员, 为您提供及时周到的“一站式”服务。



北京东华原医疗设备有限责任公司

传 真: 010-89718021

网 址: www.donghuagroup.com

邮 编: 100022

地 址: 北京市中关村科技园区昌平园振超路1号

400-800-0258
800-810-0359