

# 草果知母汤对点燃癫痫模型鼠大脑 NMDA 受体基因表达的影响\*

贺娟 梁怡 王洪图

**内容提要** 目的:探讨草果知母汤抗癫痫机理是否包含着脑组织 NMDAR1 mRNA 表达的变化。方法:采用戊四唑(PTZ)点燃癫痫模型,利用分子生物学原位杂交法定量分析 NMDAR1 mRNA 的表达。结果:草果知母汤治疗 4 周后,点燃模型鼠海马组织 CA1、CA2、CA3 区 NMDAR1 mRNA 含量明显降低,与模型对照组比较有显著性差异;而西药抗癫痫灵组无明显变化。结论:草果知母汤能降低 NMDAR1 mRNA 的表达,从而可能减少 NMDA 受体的含量,而起到抗癫痫的作用。

**关键词** 草果知母汤 癫痫模型 NMDA 受体 基因表达

**Effect of Caoguo Zhimu Decoction on N-Methyl-D-Aspartate Receptor Gene Expression of Epileptic Kindling Model in Rats** He Juan, Liang Yi, Wang Hongtu *Beijing University of TCM, Beijing (100029)*

**Objective:** To explore the effect of Caoguo Zhimu decoction (CGZMD) on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor gene expression of epileptic model on rat brain. **Methods:** Adopting the pentylenetetrazol (PTZ) kindling model to observe the NMDAR1 mRNA gene expression by situs hybridization. **Results:** After 28 days of CGZMD treatment, the NMDAR1 mRNA gene expression on CA1, CA2, CA3 part of rat hippocampus reduced obviously, the comparison between experimental group and the model control group showed significant difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** CGZMD decreased NMDAR1 mRNA gene expression, it may be caused the NMDA receptor decline, hence revealed its anti-epileptic effect.

**Key words** Caoguo Zhimu decoction, epileptic model, N-Methyl-D-Aspartate receptor, gene expression

NMDA 受体是脑内重要的兴奋性氨基酸谷氨酸 (Glu)受体的一种,已有大量实验证实,NMDA 受体在癫痫的发病中起着极为重要的作用。鉴于草果知母汤具有拮抗多种类型的癫痫模型发作的作用<sup>(1)</sup>,我们进行本研究,以期了解草果知母汤的作用机制,是否包含着改变 NMDAR1 mRNA 的作用。

## 材料与方法

1 实验动物 SD 雄性大鼠,体重 180~220g,购自中国药品生物制品鉴定所。

2 药物与试剂 草果知母汤(草果、知母、黄芩、厚朴、半夏、菖蒲、赤芍、乌梅、甘草,购自北京市药材公司,制成生药含量 1g/ml 的醇提液)。抗癫痫灵,系胡椒碱的衍生物,化学名称为 3,4 次甲二氧桂皮酰呱啉,片剂,含量 100mg,购自北京医科大学药厂。PTZ(戊四唑),Sigma 公司产品。碱性磷酸酶标记抗地高辛抗

体,Dupon 公司。地高辛标记试剂盒,B/M 公司。含 NMDAR1 cDNA 的质粒 pN60 由日本 Moriyoshi 博士馈赠,经质粒转化入大肠杆菌—扩增—抽提质粒—酶切—回收 cDNA,进行地高辛标记。

3 PTZ 点燃模型的建立 参考文献<sup>(2)</sup>的方法。用 PTZ 亚惊厥剂量 32mg,腹腔注射,每天 1 次,连续注射 28 天。停药 1 周后,再用相同剂量的 PTZ 测试。凡显示连续 5 次 2 级以上惊厥的大鼠被认为达到点燃标准。

4 动物分组及处理 正常对照组 SD 大鼠 10 只;PTZ 点燃大鼠 30 只,随机分为 3 组,分别为模型组、西药组、中药组,共 4 组。正常对照组、模型对照组双蒸水灌胃 2ml/kg,西药治疗组抗癫痫灵灌胃 500mg/kg,中药治疗组草果知母汤灌胃 5ml/kg。每日 1 次,持续 28 天。

5 组织切片的制备 末次给药后 1h,各组大鼠各 8 只,4% 多聚甲醛心脏灌注,取脑,置入 20% 的蔗糖磷酸缓冲液,24h,液氮骤冷,做海马垂直断面冰冻切片,厚 10 $\mu$ m,贴片后 -20℃ 保存。

\* 本研究由国家中医药管理局科研基金资助(No. 94A1111)  
北京中医药大学(北京 100029)

## 6 原位杂交法检测大鼠脑海马组织 NMDAR1 mRNA 的表达

6.1 切片预处理 4% PA(多聚甲醛)15min, 0.1M PBS 15min × 2, 蛋白酶 K (100ug/ml) 37℃ 30min, 4% PA 15min, 0.1M PBS 1min, 0.2M HCl 10min, 0.1M PBS 1min, 0.1m 三乙醇胺 (pH8.0) 1min, 0.1M 三乙醇胺与 0.25% 无水乙酸 10min, 乙醇梯度脱水。

6.2 杂交 将含 NMDAR1 探针的杂交液 (0.5μg/ml)20μl, 滴加在预处理后的切片上, 用封口膜覆盖, 50% 的甲酰胺湿盒中 37℃, 16h 保温。

6.3 杂交后处理 2 × SSC、50% 甲酰胺溶液, 室温, 15min × 2, 2 × SSC 50℃ 20min, TNE 37℃ 5min, 1 × SSC 50℃ 15min × 2。

6.4 抗体反应 Digbuffer I 5min, 100μl 抗体溶液 (抗体浓度 1/500)30min, Digbuffer I 15min × 2。

6.5 显色反应 Dig buffer III 3min × 2, 滴加显色液 100μl 37℃ 避光显色 16h, TE 3min, 4% PA 10min,

乙醇梯度脱水, 中性树胶封片。紫蓝色产物为 mRNA 杂交阳性信号, 同时已设立无探针阴性对照组。

6.6 图象分析 用联有光学显微镜的自动图象分析仪, 原位定量分析各组鼠脑组织海马阳性反应面积值, 每只动物取 3 张切片, 每片均取海马 CA1、CA2、CA3 及丘脑四个视野, 并计算海马各部的平均值, 用 *t* 检验作数据的显著性分析。

## 结 果

4 组大鼠脑海马 NMDAR1 mRNA 表达的变化, 见表 1。与正常对照组相比, 模型组 CA3 区与海马均数 NMDAR1 阳性反应面积明显升高, 差别有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), CA1、CA2 区阳性反应面积亦升高, 但差别无显著性意义; 与模型对照组相比, 中药组 CA1、CA2、CA3 区及海马均数阳性反应面积均降低, 差别均有显著性意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型对照组比较, 西药组各区阳性反应面积亦降低, 但差别无显著性意义。

表 1 4 组大鼠脑海马各区 NMDAR1 阳性表达面积的变化 ( $\text{mm}^2, \bar{x} \pm s$ )

| 组别 | 鼠数 | CA1              | CA2              | CA3              | 海马均数             |
|----|----|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 模型 | 8  | 12944.6 ± 4537.5 | 10904.0 ± 3131.8 | 17025.3 ± 6616.8 | 13624.2 ± 4221.4 |
| 正常 | 8  | 7422.6 ± 3976.8  | 6313.2 ± 3221.5  | 8343.4 ± 3230.3* | 7339.4 ± 3317.4* |
| 中药 | 8  | 6660.2 ± 1640.2* | 6703.2 ± 1565.9* | 6507.1 ± 2045.5* | 7257.6 ± 2261.4* |
| 西药 | 8  | 12777.2 ± 6759.6 | 9588.4 ± 3358.6  | 12852.2 ± 4436.0 | 11737.4 ± 4100.5 |

注: 与模型组比较, \*  $P < 0.05$

## 讨 论

在有关癫痫发病机理的研究中, 兴奋性氨基酸类神经递质 Glu 及其受体的研究一直倍受关注。Glu 受体共有 5 种亚型, 其中, NMDA 受体与癫痫发作存在极为密切的关系。NMDA 受体兼有与 N 型 Ca 离子通道和第二信使相耦连的特点, 其激动剂对于已去极化的神经原作用显著, 起到促进痫样放电扩展的作用; 其拮抗剂 MK-801 可抑止正在点燃过程中的癫痫发作。这种现象在动物或海马脑片点燃模型均已得到证实<sup>[3]</sup>。因此, 许多学者寄希望于 NMDA 受体拮抗剂, 希望其为临床治疗提供新途径。

从本研究实验结果来看, 戊四唑点燃模型形成后, 鼠脑海马组织 NMDAR1 mRNA 均增强, 其中 CA3 区表达增强最为明显, 呈显著性意义, 从而为既往的研究有关 NMDA 受体参与癫痫形成的论点提供了佐证。

一般认为, 经典抗癫痫药多是作用于抑止性氨基酸类神经递质 GABA 及其受体发挥相应的抗癫痫作用, 如苯二氮草类<sup>[4]</sup>。从本研究的实验结果来看, 抗癫痫灵虽使点燃癫痫模型鼠海马 NMDA mRNA 表达稍有

降低, 但差别无显著性意义, 说明抗癫痫灵的作用位点不在 NMDA 受体, 而有可能同其他经典抗癫痫药一样, 作用于 GABA 能系统。

草果知母汤是王洪图教授以“脾胃主神志”理论为指导, 从调理脾胃入手, 治疗癫痫的经验方, 经临床观察及动物药效学实验证实, 对多种类型的癫痫发作, 均有明显的拮抗作用<sup>[1]</sup>。既往的研究结果提示, 草果知母汤作用于兴奋性氨基酸类神经递质 Glu, 使其含量明显降低<sup>[5]</sup>。而从本研究的实验结果来看, 草果知母汤能明显降低点燃癫痫模型鼠海马组织 NMDA mRNA 的表达, 提示改变兴奋性神经递质 Glu 及其受体的含量, 可能是草果知母汤抗癫痫的重要途径。

## 参 考 文 献

1. 贺 娟, 赵明瑞, 梁 怡, 等. 草果知母汤的药效学实验研究. 北京中医药大学学报 1997;20(2):37—39.
2. 王 丽, J Ono and PD Walson. 大鼠戊四唑点燃模型的建立. 药学学报 1993;28(7):486—489.
3. 吴希如. 癫痫发病机制在神经化学方面的研究进展. 基础医学与临床 1993;13(5):321—325.

4. 韩济生主编. 神经科学纲要. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993: 863—864.
5. 贺娟, 梁怡, 王洪图, 等. 草果知母汤抗惊厥作用机理探

讨. 中医基础医学杂志 1997; 3(3): 26—27.

(收稿: 1998-04-01 修回: 1999-06-05)

## 中药合剂 RP-Ⅱ 减少食管癌后装放疗吞咽疼痛副作用的前瞻性研究

曹新平 陈昆田 何智纯 利国威

由于后装技术或称为近距离放射疗法的应用, 食管癌的治疗效果有了一定的提高。但是后装治疗的患者 70%~90% 出现吞咽疼痛, 这是目前最突出的副作用, 部分患者还出现较严重的放射性食管炎或食管穿孔。本单位从 1994 年 5 月~1998 年 4 月进行了抗放射中药合剂 RP-Ⅱ 保护食管粘膜的前瞻性研究, 现报告如下。

### 资料和方法

1 临床资料 所有患者均经病理诊断确诊, 依照性别、年龄(相差不超过 5 岁)、病理类型(低分化鳞癌、中分化鳞癌、高分化鳞癌)、病变长度(相差不超过 2cm)、病变部位(上、中、下)、患者的一般情况(差、中、好)、X 线分型(髓质型或缩窄型), 进行 1:1 配对, 随机分为实验组和对照组, 我们研究了 43 对共 86 例的患者, 年龄由 41~65 岁, 中位年龄 56.3 岁, 男:女=62:24, 两组临床资料经统计学检验,  $P>0.05$ , 无统计学差异。

2 治疗方法 所有患者首先经<sup>60</sup>Co 外照射治疗, 常规三野或颈段患者采用两前野加楔型板, 肿瘤剂量 60~70Gy。外照射 2 周后进行后装治疗, 后装治疗期间实验组同时口服中药合剂, RP-Ⅱ 方由黄芩、防风、黄芪、白芍、丹参、白术、元胡、甘草组成, 每天 3 次, 每次 15ml, 一直服用到治疗后 2 周。对照组给予安慰剂(蒸馏水), 服用方法同上, 实验过程为单盲法。后装治疗机为国产威达 HDR-18 型。施源器为非气囊型, 直径 6mm, 放射源为铱-192, 大小  $\phi 1.1\text{mm} \times \text{长度 } 6\text{mm}$ 。后装治疗 5GY $\times$ 3 次。参考点离源 10mm, 每周 1 次。

3 观察指标 吞咽疼痛指进食的时候患者食管病变部位出现一过性的疼痛; 进食好转指进食状况的完全梗阻、可进食流质、半流质, 普食, 5 级指标经过治疗后至少有 1 级的改善。

4 统计学方法 采用 SPSS/PC 统计软件程序进行  $\chi^2$  检验。

### 结 果

实验组出现食管吞咽疼痛的发生率为 23.3% (10/43), 对照组出现食管吞咽疼痛的发生率为 83.7% (36/43), 经检验  $\chi^2 = 31.60$ ,  $P < 0.01$ , 有统计学意义; 实验组治疗后进食好转率为 46.5% (20/43), 对照组治疗后进食好转率为 53.5% (23/43), 经检验  $\chi^2 = 0.419$ ,  $P > 0.05$  两组差别无统计学意义。

### 讨 论

食管癌是一种常见的恶性肿瘤, 属于八大恶性肿瘤之一, 其治愈率一直在 5%~10% 左右。由于后装技术的应用近年来有报道食管癌的治愈率提高到了 10%~30%。但是由于后装放疗是点源腔内照射, 在离放射源 5cm 内剂量分布近似地和距离的平方成反比。剂量梯度变化大, 造成局部剂量极不均匀, 从而出现了大多数患者有吞咽疼痛, 放射性食管炎的症状。食道镜可发现患者的食道有浅表性溃疡。它不同于外照射引起的吞咽疼痛, 疼痛的症状重且持续的时间长。我们这种研究方法的出发点是采用中国传统的中药合剂来防治食道粘膜的副反应。本科室从 1985 年开始从事中药合剂防治宫颈癌后装放疗直肠粘膜反应的研究, 已取得了较好的疗效, 使放射性直肠炎从 37% 降为 14%, 而治疗效果不受影响。我们在动物实验中发现, 照射前给药, RP-Ⅱ 对 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  线 100% 致死量照射的纯系 NIH 小白鼠有显著的抗放射作用; 照射后给药显示有一定的治疗效果, 能使受损的白细胞、血小板和脾脏有明显的修复作用; 醋酸扭体试验和戊巴比妥钠阈下催眠剂量影响实验显示 RP-Ⅱ 有很强的非特异性镇痛作用和镇静效果, 它的水提物具有很强的放射损伤防护作用。在此基础上尝试对食管癌患者进行同类型研究, 从以上结果来看初步见到较好的效果, 使吞咽疼痛的症状从 83.7% 降到 23.3%, 而且对治疗效果无明显的反作用。由于配对严格造成病例数较少, 但在统计学上已有较好的结果支持。远期反应以及细胞学变化和生存分析还有待进一步的研究。

中山大学肿瘤医院(广州 510060)

(收稿: 1999-02-05 修回 1999-04-25)