

同病异治对戊四氮点燃大鼠海马区谷氨酸代谢通路的影响

于云红^{1,2} 谢 炜^{1,2} 赵云燕³

摘要 **目的** 观察并比较癫痫“从肝论治”复方柴胡疏肝汤和“从痰论治”定痫丸对戊四氮(pentylene-tetrazole, PTZ)点燃大鼠海马区谷氨酸代谢通路的影响,探讨同病异治理论的分子机制。**方法** 以亚惊厥剂量 PTZ 腹腔注射大鼠建立慢性点燃癫痫模型。完全点燃大鼠 24 只,随机分为 4 组,分别为模型组、丙戊酸钠组、定痫丸组和柴胡疏肝汤组,并分别给予生理盐水、丙戊酸钠、定痫丸和柴胡疏肝汤灌胃干预;对照组大鼠给予生理盐水腹腔注射和灌胃干预。连续灌胃 4 周后,应用 HPLC 荧光法检测大鼠海马谷氨酸(glutamate, Glu)含量;Western blot 技术观察谷氨酸转运体-1(glutamate transporter-1, GLT-1)蛋白表达水平;谷氨酰胺合成酶检测试剂盒检测谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)活性。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠海马区 Glu 含量显著升高、GLT-1 蛋白表达及 GS 活性显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠海马区 Glu 含量均显著降低,GLT-1 蛋白表达及 GS 活性均显著升高($P < 0.01$);两中药复方组比较,柴胡疏肝汤组大鼠海马区 Glu 含量降低及 GS 活性升高较定痫丸组更显著($P < 0.01$),而两组 GLT-1 蛋白表达,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** “从肝论治”复方柴胡疏肝汤和“从痰论治”定痫丸均能降低 PTZ 点燃大鼠海马区 Glu 含量,提高 GLT-1 蛋白表达及 GS 活性,说明两复方均能通过调节 Glu 代谢通路影响脑内 Glu 水平;而柴胡疏肝汤降低癫痫大鼠海马区 Glu 含量、上调 GS 活性效果优于定痫丸,提示柴胡疏肝汤和定痫丸对 Glu 代谢通路的调节存在不同作用靶点,这可能是癫痫同病异治理论的分子机制之一。

关键词 柴胡疏肝汤;定痫丸;戊四氮;癫痫;谷氨酸;谷氨酸转运体-1;谷氨酰胺合成酶

Effects of Heterotherapy for Homopathy on the Metabolism Path of Glutamate in the Pentylene-tetrazol-kindled Seizure Rats' Hippocampus YU Yun-hong^{1,2}, XIE Wei^{1,2}, and ZHAO Yun-yan³ 1 Department of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangdong (510515), China; 2 Department of Internal Chinese Medicine, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangdong (510515), China; 3 Intensive Care Unit, Guangzhou Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong (510130), China

ABSTRACT **Objective** To investigate and compare the effects of Compound Chaihu Shugan Decoction (CHSGD, "treatment from Gan") and Dingxian Pill (DXP, "treatment from the sputum") on the metabolism path of glutamate in the pentylene-tetrazol-kindled seizure rats' hippocampus, thus exploring the molecular mechanism of "heterotherapy for homopathy". **Methods** A chronic kindling seizures rat model was established by intraperitoneal injecting pentylene-tetrazol (PTZ). Totally 24 fully kindled seizure rats were randomized into four groups, i.e., the model control group, the Sodium Valproate (VPA) group, the DXP group, and the CHSGD group. They were respectively treated with normal saline, VPA, CHSGD, and DXP, respectively. Rats in the control group were treated with normal saline by peritoneal injection and by gastrogavage. After intragastric administration for 4 successive weeks, the glutamate (Glu) levels

基金项目:国家中医药管理局中医药科学技术研究专项基金资助项目(No. 06-07JP34);广东自然科学基金资助项目(No. 07002548);广东省中医药局科研课题基金资助项目(No. 2007116);广东省科技计划课题基金资助项目(No. 2008B080701028)

作者单位:1.南方医科大学南方医院中医科(广州 510515);2.南方医科大学中医药学院中医内科(广州 510515);3.广州市中医医院重症监护室(广州 510130)

通讯作者:谢 炜, Tel: 020-61641672, E-mail: xieweizn@fimmu.com

in the hippocampus were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). The expressions of glutamate transporter-1 (GLT-1) proteins were detected by Western blot. The activity of glutamine synthetase (GS) was detected by using GS detection kit. Results Compared with the control group, the content of Glu in the model group significantly increased, and the expression of GLT-1 and the activity of GS significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the content of Glu in each medication group significantly decreased, and the protein expression of GLT-1 as well as the activity of GS significantly increased ($P < 0.01$). But when compared between the CHSGD group and the DXP group, the content of Glu was lower and the activity of GS was higher in the CHSGD group than in the DXP group ($P < 0.01$), while there was no statistical difference in the expression of GLT-1 between the two groups ($P > 0.05$). Conclusions CHSGD ("treatment from Gan") and DXP ("treatment from the sputum") could both decrease the level of Glu and raise the expression of GLT-1 and the activity of GS, indicating that CHSGD and DXP both could regulate the metabolism path of Glu to affect the level of the Glu in the brain. But the effects of CHSGD were superior to those of DXP in decreasing the content of Glu and up-regulating the activity of GS, suggesting that there were some different effects targets between the two compounds on the metabolism path of Glu, which may be one of possible molecular mechanisms for treating epilepsy by heterotherapy for homopathy.

KEYWORDS Chaihu Shugan Decoction; Dingxian Pill; pentylenetetrazol; epilepsy; glutamate; glutamate transporter-1; glutamine synthetase

谷氨酸 (glutamate, Glu) 是中枢神经系统内最主要的兴奋性神经递质, 对中枢神经系统的发育及正常脑功能的维持发挥着重要的调节作用, 突触间隙内 Glu 过度聚集而导致神经毒性, 是癫痫发作的原因之一, 并且在癫痫发作过程中局部 Glu 进一步积聚加重神经系统的毒性损害^[1], 引起癫痫的持续性发作。癫痫患者痫性发作前后海马区内 Glu 水平明显升高^[2]。近年来 Glu 及其代谢在癫痫发病机制中的作用成为国内外研究热点。“同病异治”是中医辨证论治的特色之一, 癫痫属于中医学“痫病”范畴, 其辨证论治亦存在不同的治法, “从痰论治”是癫痫传统治法, 近年来“从肝论治”癫痫临床上取得客观疗效, 本课题组前期研究表明“从痰论治”传统定痫丸和“从肝论治”复方柴胡疏肝汤均能抵抗戊四氮 (Pentetrazole, PTZ) 点燃大鼠痫性发作, 降低 PTZ 点燃大鼠不同脑区葡萄糖代谢水平, 降低神经元兴奋性^[3,4]。为了探讨两种治法的抗癫痫作用机制及二者是否存在差异, 本研究联合运用高效液相色谱技术 (HPLC)、Western blot 技术及比色法, 观察并比较了两复方对 PTZ 点燃大鼠海马区 Glu 代谢通路的调节作用, 探讨同病异治理论的分子机制。

材料与方

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级 Wistar 大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 许

可证号: SCXK (粤) 2006 - 0015, 标准条件下饲养, 自由摄取水和食物。

1.2 药物、试剂和仪器 柴胡疏肝汤组成: 柴胡 25 g 黄芩 10 g 半夏 10 g 党参 10 g 桂枝 10 g 白芍 10 g 大枣 4 枚 甘草 10 g 当归 10 g 生地 10 g 川芎 10 g 钩藤 15 g 生龙骨 30 g 生牡蛎 30 g; 定痫丸组成: 天麻 15 g 川贝母 15 g 半夏 10 g 茯苓 10 g 茯神 10 g 胆南星 25 g 石菖蒲 15 g 全蝎 10 g 僵蚕 10 g 陈皮 10 g 远志 10 g 丹参 10 g 麦冬 10 g 甘草 10 g 琥珀粉 10 g 朱砂 10 g, 各药材均购于广东省药材公司, 两复方均水煎 2 次, 合并两次滤液并分别减压浓缩至生药含量 1 g/mL 和 0.5 g/mL 浓度冷藏备用; PTZ (美国 Sigma 公司); 丙戊酸钠片 (VPA, 湖南省湘中制药有限公司); 谷氨酸标准品 (美国 Sigma 公司); 兔谷氨酸转运体-1 (glutamate transporter-1, GLT-1) 抗体 (加拿大 Abcam 公司); 小鼠 Actin 抗体 (碧云天生物技术研究所以); 生物素标记山羊抗兔 IgG (碧云天生物技术研究所以); 生物素标记山羊抗小鼠 IgG (武汉博士德生物工程有限公司); 谷氨酰胺合成酶试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 高效液相色谱 (HP1050 型, 美国惠普); 高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); 超声波清洗机 (KQ2200B 型, 昆山市超声仪器有限公司); 电热恒温水浴箱 (DK-S26 型, 上海精密实验设备有限公司); 半干电转印仪 (美国 Bio-rad 公司); Hofer Mini VE 型 Western 电泳印迹系统 (美国 Amersham 公

司);柯达 2000MM 全光谱多功能活体成像系统(美国 Kodak 公司);Sigma Diagnostics 201 型酶标仪(美国 Sigma 公司)。

2 方法

2.1 PTZ 点燃大鼠模型的建立 随机选取 6 只 Wistar 大鼠为对照组,其余大鼠以亚惊厥剂量 PTZ (35 mg/kg)每天腹腔注射 1 次,连续注射 21 天,每天注射后观察大鼠痫性发作情况^[5],按照 Racine R 癫痫发作分级标准^[6],评价其痫性发作级别,0 级:无发作反应;1 级:节律性口角、耳或面部肌肉抽动阵挛;2 级:点头并伴随更严重的面部肌肉抽动阵挛;3 级:出现前肢阵挛但不伴随直立;4 级:前肢阵挛伴随直立;5 级:全身强直阵挛发作而跌倒。选取在 (18 ± 3) 天内至少连续 3 次达 4 级或 4 级以上发作的大鼠,间歇 1 周后再次以相同剂量 PTZ 腹腔注射,若其发作仍达到 4 级或 4 级以上惊厥的大鼠被认为是完全点燃成功,对照组腹腔注射等体积的生理盐水。

2.2 分组与给药 选取点燃成功后的大鼠 24 只,按随机数字表法分为 4 组,每组 6 只,分别为模型组、丙戊酸钠组、定痫丸组和柴胡疏肝汤组,各组均于点燃成功后第 1 天起每日上午 8:00 时、下午 6:00 时灌胃给药各 1 次。对照组和模型组:生理盐水灌胃 2 mL/次;丙戊酸钠组:丙戊酸钠混悬液 200 mg/(kg · d)灌胃;定痫丸组:定痫丸水煎液 12 g/(kg · d)灌胃;柴胡疏肝汤组:柴胡疏肝汤水煎液 10 g/(kg · d)灌胃。选用两复方的临床常用剂量,根据《药理实验方法学》提供的人与大鼠剂量换算关系,计算大鼠用药剂量。

2.3 标本收集 连续灌胃给药 28 天,于最后一次给药 1.5 h 后亚惊厥剂量 PTZ 再次腹腔注射,观察记录大鼠痫性发作情况,10 min 后 10% 水合氯醛麻醉下断头取脑,冰上分离海马, -80 ℃ 冻存备用。

2.4 HPLC 荧光法检测大鼠海马区 Glu 含量 精确称取海马组织,放入预冷的玻璃匀浆器中,并以 1:4 (w/v) 比例加入 80% 乙醇冰上匀浆,匀浆液倒入 EP 管中,5 000 r/min 离心 20 min,上清液转入烧杯,残渣再次以上述方法匀浆 1 次,离心后上清液并入烧杯。烧杯置于 80 ℃ 恒温水浴中蒸干,再加入 0.1 mol/L HCL 超声溶解残渣,溶解液移入 5 mL 定溶瓶,并冲洗烧杯 3 次,洗液并入定溶瓶,最后定溶至 5 mL,抽取一定量 HCL 混合物于 EP 管中,4 ℃、15 000 r/min 离心 15 min,上清液经 0.45 μm 的滤膜过滤后,上机进样检测。

2.5 Western bolt 检测 GLT-1 蛋白表达 精确称取海马组织于 1.5 mL EP 管中,液氮研磨 2 min 后

以体积比 1:60 的比例加入组织蛋白提取液(组织裂解液: PMSF = 100:1),充分混匀后冰上裂解 1 h,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,上清液再以 4 ℃、13 000 r/min 离心 10 min,留取上清液。抽取适量上清液以超纯水稀释至适宜浓度,BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。根据蛋白定量标准曲线取样品,样品经 5 × SDS 缓冲液稀释后于 95 ℃ 恒温器中煮沸 5 min 进行蛋白变性,经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,采用半干电转移法转移蛋白至 PVDF 膜,PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭 1.5 h,然后加入 1:1 000 稀释的兔抗 GLT-1 抗体及 1:1 000 稀释的小鼠抗 Actin 抗体,4 ℃ 冰上孵育过夜,再用 1:4 000 稀释的生物素标记山羊抗兔 IgG 和 1:4 000 稀释的生物素标记山羊抗小鼠 IgG 室温孵育 1.5 h,最后 ECL 发光液孵育后 KODAK 成像系统曝光成像,反应间用 TBST 充分洗涤。GLT-1 条带灰度值与 β-actin 条带灰度值的比值,作为衡量目的蛋白的表达量。

2.6 谷氨酸胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 活性检测 谷氨酰胺和羟胺在 GS 的作用下生成 γ-谷氨酰氧戊酸和氨,通过显色反应可以测定谷氨酰氧戊酸的含量。精确称取海马组织于预冷的玻璃匀浆器中,以 1:50 (重量/体积) 比例加入预冷的生理盐水,冰上匀浆,匀浆液移入 EP 管中,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min 1 次,取上清再以 10 000 r/min 离心 10 min,留取上清。反应液制备参照谷氨酰胺合成酶试剂盒说明书进行,分空白管、标准管和样品管,之后分别加入纯水、20 mmol/L 标准品 (γ-谷氨酰羟胺) 和上述样品上清液,各 50 μL,混匀,37 ℃ 水浴反应 15 min,加入显色剂 (0.37 mmol/L FeCl₃, 0.67 mol/L HCl, 0.20 mol/L 三氯乙酸) 终止反应,3 500 r/min 离心 10 min,取 200 μL 上清于 96 孔板中 550 nm 处检测吸光度。以每小时 37 ℃ 反应生成的 γ-谷氨酰氧戊酸 1 μmol 的量为一个酶的活性单位,按照试剂盒说明书的计算公式计算 GS 活力。

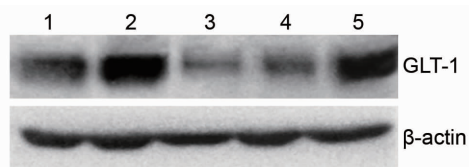
2.7 统计学分析 运用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,首先对数据进行方差齐性检验,若方差齐,采用单因素方差分析进行检验,组间比较用 LSD 法;若方差不齐,采用 Welch 进行检验,组间比较采用 Games-Howell 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 同病异治对 PTZ 点燃大鼠海马区 Glu 含量的影响 (表 1) 与对照组比较,模型组大鼠海马区 Glu

含量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠海马区 Glu 含量均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与柴胡疏肝汤组比较,定痫丸组及丙戊酸钠组大鼠海马区 Glu 含量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$)。

2 同病异治对 PTZ 点燃大鼠海马区 GLT-1 蛋白表达的影响(图 1,表 1) 与对照组比较,模型组大鼠海马区 GLT-1 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠海马区 GLT-1 蛋白表达均显著升高($P < 0.01$);与柴胡疏肝汤组比较,丙戊酸钠组和定痫丸大鼠海马区 GLT-1 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:1 为柴胡疏肝汤组;2 为对照组;3 为模型组;4 为丙戊酸钠组;5 为定痫丸组

图 1 同病异治对 PTZ 点燃大鼠海马区 GLT-1 蛋白表达的影响

3 同病异治对 PTZ 点燃大鼠海马区 GS 活性的影响(表 1) 与对照组比较,模型组大鼠海马区 GS 活性显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠海马区 GS 活性均升高($P < 0.05, P < 0.01$);柴胡疏肝汤组与丙戊酸钠组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而和定痫丸组比较,柴胡疏肝汤组大鼠海马区的 GS 活性升高更显著($P < 0.01$)。

表 1 同病异治对 PTZ 点燃大鼠海马区 Glu 含量、GLT-1 蛋白表达及 GS 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Glu ($\mu\text{mol/L}$)	GLT-1	GS (U/mg)
对照	6	5.390 $\pm$ 0.324	1.583 $\pm$ 0.015	130.255 $\pm$ 4.630
模型	6	7.677 $\pm$ 0.212 **	0.952 $\pm$ 0.011 **	103.683 $\pm$ 4.926 **
丙戊酸钠	6	6.620 $\pm$ 0.221 $\Delta\Delta\Delta$	1.379 $\pm$ 0.014 $\Delta\Delta$	123.599 $\pm$ 4.253 $\Delta\Delta$
定痫丸	6	7.050 $\pm$ 0.114 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.469 $\pm$ 0.006 $\Delta\Delta$	114.351 $\pm$ 13.086 $\Delta\Delta\Delta$
柴胡疏肝汤	6	5.416 $\pm$ 0.201 $\Delta\Delta$	1.456 $\pm$ 0.011 $\Delta\Delta$	124.095 $\pm$ 9.090 $\Delta\Delta$
F		121.361	2284.007	10.148
P		0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与柴胡疏肝汤组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

脑内 Glu 的水平与癫痫的发生、发展及维持密切相关,细胞外 Glu 的浓度升高被认为是癫痫反复发作的重要因素,目前已在多种癫痫动物模型和癫痫患者

的脑组织中观察到了突触间隙内 Glu 浓度的增加^[2]。谷氨酸-谷氨酰胺循环(Glutamate-Glutamine, Glu-Gln)是 Glu 的代谢通路^[7],突触间隙内 Glu 的水平是由谷氨酸转运体(glutamate transporters, GluTs)调控,使其维持在生理水平,发挥正常突触传递作用^[8],脑内 GluTs 包括 EAAT1 (GLAST)、EAAT2 (GLT-1)、EAAT3、EAAT4 和 EAAT5 5 种亚型^[9]。GLT-1 是一种胶质细胞型谷氨酸转运体,提供了超过 90% 总体 Glu 的吸收,起着“谷氨酸泵”的作用^[10],防止局部 Glu 过度积聚引起的兴奋性神经毒性损害^[11],摄入到胶质细胞内的 Glu 在 GS 的催化作用下进一步转化为谷氨酰胺(glutamine, Gln),解除 Glu 的兴奋性毒性作用^[12],后者重新回到突触前神经元,在神经元内谷氨酰胺酶的作用下转化为 Glu,参与其再循环。有研究表明,癫痫患者脑内 Glu-Gln 循环率明显降低^[13]。Tannaka K 等^[14]发现 GLT-1 基因敲除小鼠表现出明显的致命性自发性癫痫。Sarac S 等^[15]研究也表明,癫痫患者脑内 GLT-1 表达水平严重不足。GS 是中枢神经系统中 Glu 代谢的限速酶,使用 GS 竞争性抑制剂甲硫氨酸砷亚胺能引起星形胶质细胞内 Glu 积聚和谷氨酰胺的减少,引发兴奋性毒性作用,GS 表达增高能增加星形胶质细胞 Glu 摄取率,有神经元保护作用^[16]。GS 基因缺陷小鼠也表现出自发性痫性发作^[17],癫痫患者海马区 GS 水平明显降低。

“同病异治”是中医辨证论治的特色之一,疾病在某一特定阶段的病理本质,中医称之为证候,对于某一特定疾病证同治同,证异治异。癫痫属中医学“痫病”范畴,中医学对痫病的认识由来已久,朱丹溪在《丹溪心法》中云:“无非痰涎壅塞,迷闷孔窍”,主张“无痰不作痫”,多以定痫丸化裁治疗。定痫丸源于《医学心悟》,由天麻、川贝、茯苓、丹参、僵蚕、钩藤、酸枣仁、郁金、姜半夏、远志、胆星、全蝎组成,定痫丸提取液能明显提高电刺激点燃大鼠后放电阈值,且抗痫作用安全、有效^[18]。

《黄帝内经·素问·卷二十一·六元正纪大论篇第七十一》“木发之郁,太虚埃昏,云物以扰,大风乃至,屋发折木,木有变。故民病胃脘当心而痛,上支两肋,鬲咽不下通,饮食不下,甚则耳鸣眩转,目不识人,善暴僵仆”,受之启发,名老中医陈宝田教授主张“从肝论治”癫痫,并自拟临床经验方柴胡疏肝汤,治疗原发性癫痫 108 例,总有效率为 85.2%^[19]。

本课题组前期研究表明,柴胡疏肝汤及定痫丸均能降低 PTZ 点燃大鼠痫性发作,降低癫痫大鼠神经元兴奋性^[3,4]。本研究发现,柴胡疏肝汤及定痫丸均能

显著降低 PTZ 点燃大鼠海马区 Glu 浓度,推测两复方可能通过降低脑内 Glu 的浓度发挥抗癫痫作用。柴胡疏肝汤及定痫丸均能上调 PTZ 点燃大鼠海马区 GLT-1 蛋白的表达水平及 GS 的活性,说明两者可能通过影响 Glu 的代谢通路,增加 Glu 的代谢,从而达到降低癫痫大鼠海马区 Glu 的浓度。但柴胡疏肝汤与定痫丸相比较,柴胡疏肝汤降低癫痫大鼠海马区 Glu 含量、上调 GS 活性作用显著优于定痫丸,而对 GLT-1 蛋白表达水平的作用无差异,提示柴胡疏肝汤及定痫丸在催化 Glu 转化为 Gln 环节存在一定的作用差异,而在 Glu 摄取环节无明显作用差异,说明两复方在调节 Glu 代谢通路中作用靶点各有侧重,这可能是“从肝论治”、“从痰论治”两种不同治法抗癫痫机制的差异之一,这从分子水平为“同病异治”的中医学理论提供了一个良好的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders [J]. *Science*, 1993, 262(5134): 689-695.
- [2] Cavus I, Pan JW, Hetherington HP, et al. Decreased hippocampal volume on MRI is associated with increased extracellular glutamate in epilepsy patients [J]. *Epilepsia*, 2008, 49(8): 1358-1366.
- [3] 谢炜, 于云红, 赵云燕, 等. 同病异治复方对戊四氮慢性点燃大鼠痫性发作的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2010, 37(10): 1898-1900.
- [4] 谢炜, 于云红, 赵云燕. 柴胡疏肝汤对戊四氮慢性点燃大鼠不同脑区兴奋性的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2010, (12): 1619-1622.
- [5] Nassiri-Asl M, Mortazavi SR, Samiee-Rad F, et al. The effects of rutin on the development of pentylene-tetrazole kindling and memory retrieval in rats [J]. *Epilepsy Behav*, 2010, 18(1-2): 50-53.
- [6] Racine R. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294.
- [7] Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer [J]. *J Neurochem*, 2006, 98(3): 641-653.
- [8] Danbolt NC. Glutamate uptake [J]. *Prog Neurobiol* 2001, 65(1): 101-105.
- [9] Camacho A, Massieu L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death [J]. *Arch Med Res*, 2006, 37(1): 11-18.
- [10] Robinson MB. The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype [J]. *Neurochemistry*, 1999, 33(6): 479-491.
- [11] Marcaggi P, Attwell D. Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics [J]. *Glia*, 2004, 47(3): 217-225.
- [12] Van der Hel WS, Notenboom RG, Bos IW, et al. Reduced glutamine synthetase in hippocampal areas with neuron loss in temporal lobe epilepsy [J]. *Neurology*, 2005, 64(2): 326-333.
- [13] Petroff OA, Errante LD, Rothman DL, et al. Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus [J]. *Epilepsia*, 2002, 43(7): 703-710.
- [14] Tanaka K, Watase K, Manabe T, et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1 [J]. *Science*, 1997, 276(5319): 1699-1702.
- [15] Sarac S, Afzal S, Broholm H, et al. Excitatory monoacid transporters EAAT-1 and EAAT-2 in temporal lobe and hippocampus in intractable temporal lobe epilepsy [J]. *APMIS*, 2009, 117(4): 291-301.
- [16] Renis M, Cardile V, Russo A, et al. Glutamine synthetase activity and HSP70 levels in cultured rat astrocytes: effect of 1-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine [J]. *Brain Res*, 1998, 783(1): 143-150.
- [17] Eid T, Ghosh A, Wang Y, et al. Recurrent seizures and brain pathology after inhibition of glutamine synthetase in the hippocampus in rats [J]. *Brain*, 2008, 132(pt 8): 2061-2070.
- [18] 王学峰, 文世全, 吕洋, 等. 定痫丸抗痫作用及其安全性的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2004, 13(4): 236-237.
- [19] 黄运生, 陈宝田, 谢炜. 柴胡疏肝汤添加治疗原发性癫痫 108 例疗效观察 [J]. *中药材*, 2002, 25(5): 374-376.

(收稿:2011-09-16 修回:2012-09-21)