DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.035
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)08-0745-02

经验交流

抗痫增智颗粒对点燃模型鼠脑内胆碱能系统的影响

Effect of Kangxianzengzhi pellet on cerebral cholinergic system in brain of kindling model rats

姚凤莉[1],马 融[2],李海南[3],李新民[2] ([1]北京军区总医院儿科,北京 100700;[2]天津中医学院第一附属医院儿科,天津 300013;[3]北京武警总队医院分院中医科,北京 100023)

癫痫是常见的神经疾病,小儿癫痫大发作约34.4%~45%伴智力低下。抗痫增智颗粒是马融教授20余年临床实践基础上筛选的中药方剂,其独到之处是把抗痫、增智结合起来,目前很少有报道。为了探明此方药物机制,本实验观察了抗痫增智颗粒对点燃模型大鼠水迷宫实验,大脑皮层、海马ChAT活性、M受体的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SD雄性大鼠40只,体质量100~120 g,购自中国医学科学院动物研究所。随机分为:正常对照组8只,点燃模型组32只,点燃模型组又分为B、C、D、E 4组。各组间体质量可比。

1.1.1 药物与试剂 抗痫增智颗粒(太子参,茯苓,陈皮,半夏,神曲,石菖蒲,胆南星,青果,五味子,菟丝子等),生药购自天津中医学院第一附属医院中药房,制成浓缩液(1 g/ml)。^{3}H标记QNB,^{3}H标记COA,戊四唑(Pentylenetetrazol,PTZ),为Sigma公司产品。丙戊酸钠为湖南省湘中制药有限公司产品。

1.1.2 PTZ点燃模型的建立 参考文献[1]的方法。用PTZ亚惊厥剂量32 mg/kg,腹腔注射,1次/d,连续注射28 d,停药1周后,再用相同显示连续5次2级以上惊厥的大鼠,被认为达到点燃标准。惊厥评分采用七点评分法[2]。

1.1.3 动物各组用药 正常对照组SD大鼠8只;PTZ点燃大鼠32只,分别为模型对照组;中药低剂量组;中药高剂量组;西药组。正常对照组,模型对照组双蒸水灌胃2 ml/kg,西药治疗组丙戊酸钠灌胃400 mg/kg,中药治疗组抗痫增智颗粒浓缩液灌胃低剂量组5 g/kg,高剂量组10 g/kg,每日1次,持续28 d。

1.2 方法

1.2.1 大鼠学习记忆能力测定 采用文献[3]方法,水池高80 cm,直径120 cm,站台直径10 cm。实验采用1 d训练2次,每次训练2 min的方案。若动物2 min未找到平台,将动物拿到平台上并使它在上面停留30 s。5组动物均于灌胃28 d后,第1天训练,第2、3天进行水迷宫测试。

1.2.2 脑突触膜制备 大鼠断头后剥取海马和皮层,称质量按1∶5比例加入预冷的0.05 mol/L PB缓冲液(pH 7.4)用polytron匀浆2次。39 000×g离心15 min,上清冻存用于测ChAT。沉淀物加入0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4),12 000×g离心3次,每次15 min,最终沉淀物放入-70 ℃冰箱冻存。

1.2.3 M受体样本的制备及测量 采用^{3}H-QNB受体结合实验进行放射配基结合反应,参见文献[4]。以改良的微量Lowry法测定膜蛋白含量,参见文献[5]。用β-液体闪烁记数仪测量cpm值结合突触膜蛋白质浓度计算^{3}H-QNB结合量。(以每毫克蛋白质结合的^{3}H-QNB mol数表示)。

$$^3\text{H-QNB Binding}=\frac{(\text{样品 cpm}-\text{非特异 cpm})\times \text{每管内 pmol/mgprot}}{\text{总计数 cpm}}$$

1.2.4 ChAT活性测定 采用^{3}H-COA结合实验。实验时从-70 ℃冰箱取触冻存上清,突触膜,按1∶4加入0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)打匀,震荡,取处理的突触膜20 μl,加入60 μl Tris-HCl缓冲液,50 μl反应液,在非特异结合管加80 μl Tris-HCl缓冲液和50 μl反应液,每管中加入10 μl ^{3}H-COA,在37 ℃水浴中孵育30 min反应后的样品加入3.0 ml 4 ℃终止液,将溶液移至闪烁杯,加入2.0 ml乙腈液和甲苯闪烁液6 ml,轻摇1 min,静置10 min,测cpm值。

$$\text{ChAT 活性}=\frac{\text{样品 cpm}-\text{空白 cpm}}{\text{cpm 总计数}}\times\frac{\text{每管内(标记物+非标物)nmol 数}}{\text{mg 蛋白数}\times 30\text{ min}}$$

1.3 统计方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS10.0统计软件包进行分析,采用方差分析。

2 结果

2.1 大鼠水迷宫测试结果及药物的影响

模型组寻找平台所需时间,比正常组明显增加,有显著性差异($P<0.05$)。与模型组相比,中药高剂量组寻找平台所需时比模型组明显缩短,有显著性差异($P<0.05$)。中药低剂量组、丙戊酸钠组所需时间与模型组比较缩短,但差异无显著意义,见表1。

2.2 大鼠大脑皮层、海马M受体活性改变及药物的影响

与正常组相比,模型组海马、皮层M受体活力明显降低,有显著性差异($P<0.05$)。与模型组相比,中药高剂量组海马、皮层M受体活力增高,有显著性差异($P<0.05$),见表2。

作者简介:姚凤莉(1967-),女,硕士,主治医师,主要从事小儿神经临床学科方面的研究,发表论文10余篇。电话:(010)66721629-8067

收稿日期:2003-10-08;修回日期:2003-12-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 大鼠水迷宫测试结果及药物的影响

组别	例数	寻找平台所需时间(s)
正常	8	8.5±4.1
模型	8	22.8±9.1*
中药低	8	11.9±6.0
中药高	8	9.5±7.6△
丙戊酸钠	8	13.5±4.8

*：与正常组相比，$P<0.05$；△：与模型组相比，$P<0.05$

表 2 点燃鼠大脑皮层、海马 M 受体结合力改变及药物影响(pmol/mg)

组别	例数	皮层	海马
正常	8	2 251±210	5 428±588
模型	8	1 381±211*	3 007±444*
中药低	8	1 634±184	4 257±645
中药高	8	2 207±185△	5 362±306△
丙戊酸钠	8	1 482±253	4 213±386

*：与正常组相比，$P<0.05$；△：与模型组相比，$P<0.05$

2.3 大鼠大脑皮层、海马 ChAT 活性改变及药物的影响

与正常组相比，模型组海马 ChAT 活性明显降低，差异有显著意义($P<0.05$)，模型组皮层 ChAT 活性明显降低，差异有显著意义($P<0.05$)。与模型组相比，中药高、低剂量组、丙戊酸钠组海马、皮层 ChAT 活性增高，但差异无显著意义($P>0.05$)，见表 3。

表 3 点燃鼠大脑皮层、海马 ChAT 活性改变及药物影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	皮层	海马
正常	8	4 509±468	5 174±484
模型	8	3 621±151	3 455±214*
中药低	8	3 825±364	4 041±418
中药高	8	3 852±133	4 135±366
丙戊酸钠	8	3 783±283	3 943±355

与正常组相比，*：$P<0.05$

3 讨论

小儿癫痫大发作作为儿童癫痫发作的最常见类型，约 1/3 全身大发作患儿有明显的记忆障碍[6]。癫痫大发作开始即累及双侧大脑半球，意识首先丧失，且多数呈强直-阵挛发作，完全可能造成对缺血、缺氧敏感的大脑皮层的广泛损害，从而使记忆功能受损。虽然近代对其病因、病理、生理等方面有了较深入的认识与研究，但迄今为止，其治疗措施仍局限于药物控制方面。且长期服药其药物本身可严重影响患儿认知功能的发育，有的可因药物性脑损伤而形成新的癫痫灶。因此，对癫痫患儿尤其是伴有智力低下的癫痫大发作患儿，在有效控制癫痫发作的同时，如何促进智能改善，提高生活质量，成为癫痫领域一个重要研究课题。从中医理论出发，注重其整体调节作用，探索一种高效无毒同时改善认知功能的抗癫痫中成药具有重要意义。

抗痫散应用于临床已有 20 余年，临床观察及实验研究表明对癫痫大发作、小发作、精神运动性发作有一定的作用[7]。抗痫增智颗粒是根据多年癫痫专科临床经验反复筛选而成，在抗痫散的基础上加菟丝子、五味子等补肾中药。经临床观察除了具有与抗痫散相同的效果外，对癫痫大发作伴智力低下的患儿，还有提高学习、记忆功能的作用。方中石菖蒲、胆南星豁痰祛痰；太子参、茯苓健脾益气；陈皮、枳壳、沉香调畅气机；配合天麻熄风止痉；五味子、菟丝子、紫河车益肾填精。

大量的研究证明中枢胆碱能系统对学习、记忆的重要性[8]。ChAT 是生成 Ach 的限速酶，是胆碱能系统的特异性标志，常作为估计 Ach 含量(释放量)的间接指标。乙酰胆碱是中枢胆碱能系统中的重要神经递质，通过 mAch-R 发生作用，而 mAch-R 参与大脑皮层的唤醒、选择注意力、情绪和运动的协调等功能的调节，特别是现象和认知等方面被认为是关键环节之一[9]。但以往的研究多是补肾中药对老年痴呆中枢胆碱能系统的影响，对于应用中药治疗癫痫大发作伴智力低下后，中枢胆碱能系统的变化报道较少。本研究结果显示，点燃模型大鼠寻找平台所需时间延长，证明本实验模型确实造成了大鼠学习记忆的障碍。抗痫增智颗粒可明显缩短模型大鼠在 Morris 水迷宫中寻找平台所需的时间，明显提高点燃模型大鼠的 M 受体的结合量、提高 ChAT 活性，表明抗痫增智颗粒通过影响中枢胆碱能系统 M 受体的结合量，ChAT 活性提高学习记忆。抗痫增智颗粒组与丙戊酸钠组比较，在 Morris 水迷宫中寻找平台所需的时间短，在提高 M 受体的结合量，ChAT 活性方面优于丙戊酸钠组，虽然差异无显著意义，但中药组无肝肾功能损害，长期服用无毒副作用[10]。此实验为抗痫增智颗粒用于治疗癫痫大发作伴智力低下的临床应用提供了初步的实验依据。

关键词：抗痫增智颗粒；点燃模型大鼠；M 受体结合量；胆碱乙酰转移酶

中图法分类号：R285.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王 丽，Ono J，Walson P D. 大鼠戊四唑点燃模型的建立[J]. 药学学报，1993，28(7)：486－489.

[2] Ono J，vieth R F，Walsen P D，*et al*. Electrocorticographical observation of seizures induced by pentylenetetrazol injection in rats[J]. Funct Neurol，1990，5(4)：345－352.

[3] 张孟仁，郭赛珊. 补肾活血方对拟血管性痴呆小鼠大脑皮层兴奋性氨基酸的影响[J]. 北京中医，1999，18(6)：47－49.

[4] 小川纪雄主编，冯建波译，脑受体[M]. 北京：北京医科大学，中国协和医科大学联合出版社，1997. 136－141，143－146.

[5] 莫启忠，马 骏，宫 斌，等. 补肾中药对拟痴呆小鼠胆碱能 M 受体功能与胆碱酯酶活性的影响[J]. 中国中西医结合杂志，1996，15(2)：99.

[6] 许克铭，王立文. 癫痫儿童生活质量的研究[J]. 中华儿科杂志，1998，36(5)：282.

[7] 马 融，李少川，李新民，等. 抗痫胶囊治疗小儿癫痫 930 例临床观察[J]. 中医杂志，2002，43(4)：279－280.

[8] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海：上海科学技术出版社，1991. 176.

[9] 康迪生，毛娟红. 临床实用药物及其药理基础[M]. 上海：复旦大学出版社，1996. 28.

[10] 马 融，李新民，林嫦娥. 豁痰顺气健脾和中法治疗小儿腹型癫痫的临床观察[J]. 中医儿科，2000，1(1)：6－8.

(编辑 栾 嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net