

中药复方熄风胶囊对难治性癫痫大鼠多药耐药基因 MDR1mRNA 表达的影响

陈会 李新民 路岩莉 孙丹 聂坤 房艳艳 任艳艳

【摘要】 目的 探讨中药复方熄风胶囊对氯化锂—匹罗卡品致难治性癫痫模型大鼠脑组织 MDR1mRNA 表达的影响。**方法** 建立氯化锂—匹罗卡品癫痫大鼠模型。实验大鼠随机分为 8 组: 正常对照组(空白组)、模型对照组(模型组)、熄风胶囊低剂量组(熄低组)、熄风胶囊中剂量组(熄中组)、熄风胶囊高剂量组(熄高组)、卡马西平治疗组(CBZ 组)、熄风胶囊中剂量+卡马西平组(熄卡组)、熄风胶囊中剂量+1/2 卡马西平组(熄卡低组)。熄低、中、高组分别予熄风胶囊 0.33 g、0.66 g、0.99 g, 浓缩剂 2 mL; CBZ 组予 CBZ 20 mg/kg; 熄卡、熄卡低组分别予熄风胶囊 0.66 g 和 CBZ 20 mg/kg、CBZ 10 mg/kg; 模型组和空白组分别予生理盐水 2 mL。每天上午灌胃一次, 共持续 60 天。给药结束后检测各组大鼠脑组织 MDR1mRNA 的表达。**结果** 与空白组比较, 其余各组的 MDR1mRNA 的基因表达均上调($P < 0.05$); 与模型组比较, 熄中组、熄卡组、熄卡低组和 CBZ 组的 MDR1mRNA 表达均下降($P < 0.05$); 与 CBZ 组相比, 熄卡低组和熄卡组的基因表达均明显降低($P < 0.05$)。**结论** 熄中组、熄卡低组、熄卡组、CBZ 组对 MDR1mRNA 表达有抑制作用, 且熄卡低组和熄卡组对 MDR1mRNA 表达的抑制作用比单用卡马西平作用更明显。

【关键词】 中药复方; 难治性癫痫; 多药耐药基因; 熄风胶囊

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.07.004

Effect of the Chinese herbal compound Xifeng capsule on expression of MDR1mRNA of intractable epilepsy rats CHEN Hui, LI Xinmin, LU Yanli, et al. Department of Paediatrics, The First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
Corresponding author: LI Xinmin, E-mail: tjtcmlxm@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of Chinese herbal compound Xifeng capsule on different expression of MDR1mRNA in the brain tissue of epileptic rats induced by lithium chloride-pilocarpine. **Methods** Epileptic rat model was established by lithium chloride-pilocarpine. Rats were randomly divided into eight groups: normal control group, model control group, Xifeng capsule low-dose treatment group (Xifeng low-dose group), Xifeng capsule middle-dose treatment group (Xifeng middle-dose group), Xifeng capsule high-dose treatment group (Xifeng high-dose group), carbamazepine treatment group (CBZ group), Xifeng middle-dose + carbamazepine treatment group (xi-car group), Xifeng capsule middle-dose + 1/2 dose carbamazepine treatment (xi-car low group). Xifeng low, medium and high group was respectively given 0.33 g, 0.66 g and 0.99 g, thickening agent 2 mL; CBZ dose group was given CBZ 20 mg/kg; Xi-car and Xi-car low group was respectively given Xifeng capsule 0.66g thickening agent 2mL and CBZ 20mg/kg, CBZ 10mg/kg; normal control group and model control group was respectively given 2 mL saline solution. The rats were intragastric administration once a day in the morning for 60 days. The

基金项目: 国家自然科学基金(81373690)

作者单位: 300193 天津中医药大学第一附属医院儿科(陈会、李新民、路岩莉、孙丹、聂坤); 天津中医药大学研究生院[房艳艳(博士研究生)]; 山东省邹城市妇幼保健计划生育服务中心(任艳艳)

作者简介: 陈会(1985-), 女, 博士, 住院医师。研究方向: 小儿癫痫及肺系疾病。E-mail: chenhui8586@163.com

通信作者: 李新民(1964-), 博士, 教授, 博士生导师。研究方向: 小儿癫痫及肺系疾病。E-mail: tjtcmlxm@163.com

MDR1mRNA expression of each group was detected. **Result** Real-time RT-PCR results showed that: comparing with normal control group, the expression of MDR1mRNA in the rest groups were up-regulation. Comparing with model group, the expression of MDR1mRNA of the CBZ group, *Xifeng* middle-dose group, *Xifeng* middle-dose + CBZ group and *Xifeng* middle-dose + 1/2 CBZ group was declined ($P < 0.05$). Comparing with CBZ group, the expression of MDR1mRNA of *Xifeng* middle-dose + CBZ group and *Xifeng* middle-dose + 1/2 CBZ group was declined ($P < 0.05$). **Conclusion** The CBZ group, *Xifeng* middle-dose group, *Xifeng* middle-dose + CBZ group and *Xifeng* middle-dose + 1/2 CBZ group had inhibitory effect on the expression of MDR1mRNA, and *Xifeng* middle-dose group, the inhibitory effect of *Xifeng* middle-dose + 1/2 CBZ group is more obvious than CBZ group.

【Key words】 Chinese herbal; Intractable epilepsy; MDR1mRNA; *Xifeng* capsule

难治性癫痫 (intractable epilepsy, IE) 是指频繁的癫痫发作, 每月至少 4 次以上, 应用适当的一线抗癫痫药物 (anti-epilepsy drugs, AEDs) 正规治疗, 药物稳态血浓度在有效治疗范围内, 无严重的药物不良反应; 至少观察 2 年, 发作仍不能控制, 影响日常生活; 无进行性中枢神经系统疾病或占位性病变。IE 死亡率比一般癫痫高 4 ~ 7 倍, 已成为危害公共健康的一个主要疾病。多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是指由单一药物诱发, 同时对其他多种不同作用机制的药物产生交叉耐药的现象。IE 表现为对多种 AEDs 产生耐药, 临床治疗效果欠佳。本实验采用氯化锂—匹罗卡品大鼠模型, 通过检测熄风胶囊对大鼠脑组织多药耐药基因 MDR1mRNA 表达的影响, 从基因水平进一步探讨难治性大鼠耐药的机制。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级健康雄 SD 大鼠 150 只, 体重 (45 ± 10) g, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (军) 2012-0004。

1.2 药品、试剂与仪器

氯化锂 (100 g/瓶, 美国 Sigma, 公司批号: 115K1308)、阿托品 (5 mg/mL, 天津金耀氨基酸有限公司, 批号: H12020384)、盐酸匹罗卡品 (5 g/瓶, 美国 Sigma 公司, 批号: 066k1730)、地西洋注射液 (5 mg/mL, 天津金耀氨基酸有限公司, 批号: 0804032)、熄风胶囊 [院内制剂, 药物组成: 紫河车 12 g、石菖蒲 12 g、天麻 8 g、僵蚕 4 g、郁金 8 g、全蝎 4 g、姜半夏 8 g, 0.33 g/粒, 天津中医药大学第一附属医院杏林药厂, 批号: Z20010252、卡马西平 (200 mg/片, 北京诺华制药公司, 批号: H11022279)。

无 RNA 酶的 Eppendorf 管、液氮、-80℃ 冰箱、

超纯 RNA 提取试剂盒、HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒、Ultra SYBR Mixture、DNase I 均购自 CW bio 公司、荧光定量 PCR 仪 (Bio-rad IQ5)。

1.3 造模方法

参照 Honchar^[1] 和余倩等^[2] 人的方法: 小剂量反复 ip 匹罗卡品制备难治性大鼠模型。将 150 只大鼠随机分成两大组, 正常对照组 10 只, 其余 140 只用于模型的建立。氯化锂按 127 mg/kg 剂量进行腹腔注射, 18 小时后硫酸阿托品 1 mg/kg 腹腔注射以减少外周胆碱能作用, 30 分钟后匹罗卡品 30 mg/kg (浓度 1%, 首次 20 mg/kg, 30 分钟后 10 mg/kg) 腹腔注射, 大鼠出现癫痫持续状态 1 小时后, 再给予腹腔注射地西洋 10 mg/kg 解除抽搐, 如痫性发作不能缓解, 可重复注射地西洋 1 ~ 2 次, 直到痫性发作被解除。

1.4 模型评价及制备情况

惊厥评分采用 Racine 评分法^[3]: 痫性发作达到 IV 级及以上, 持续时间超过 30 分钟, 解除痫性发作后状态良好的大鼠为合格的模型。

本实验造模前大鼠共 140 只, 其中 34 只出现 0 ~ III 级发作, 表现为无反应、耳面部抽搐、肌阵挛或不伴直立位等, 为点燃不成功大鼠, 予以剔除。造模后达到 IV 级及以上的大鼠共 116 只, 在造模过程中由于癫痫频繁发作死亡 25 只, 在接下来的一周, 大鼠的主要表现为精神萎靡、进食活动少、消瘦, 暂不给予药物及生理盐水等灌胃处理, 予葡萄糖盐水及水果碎片饲养加强营养支持。期间 7 只大鼠相继死去, 对剩余存活且精神状态良好的 84 只大鼠, 每组 12 只, 分为 7 组, 加空白组 10 只, 共 8 组。

1.5 动物分组及灌胃计量

将造模成功的 84 只随机分成 7 组, 分别为模型对照组 (模型组)、熄风胶囊低剂量组 (熄低组)、熄风胶囊中剂量组 (熄中组)、熄风胶囊高剂量组 (熄

高组)、卡马西平治疗组(CBZ 组)、熄风胶囊中剂量+卡马西平组(熄卡组)、熄风胶囊中剂量+1/2 卡马西平组(熄卡低组),每组大鼠 12 只。造模前随机选取 10 只大鼠,作为正常对照组(空白组)。

其中熄低组:熄风胶囊 0.33 g,浓缩剂 2 mL;熄中组:熄风胶囊 0.66 g,浓缩剂 2 mL;熄高组:熄风胶囊 0.99 g,浓缩剂 2 mL;CBZ 治疗组:CBZ 20 mg/kg;熄卡组:熄风胶囊 0.66 g,浓缩剂 2 mL 和 CBZ 20 mg/kg;熄卡低组:熄风胶囊 0.66 g,浓缩剂 2 mL 和 CBZ 10 mg/kg;空白组和模型组给予生理盐水 2 mL。每天上午灌胃一次,共持续 60 天。

1.6 标本制备及检测方法

治疗结束后,各组随机选取 4 只大鼠,将大鼠迅速断头,剪开颅顶部皮肤,剥除颅骨,用高温高压消毒过的器械将鼠脑剝出,置于无菌冰盘,迅速剥离出双侧海马及皮层置于无 RNA 酶的 EPpendorf 管中,标记后放入液氮罐之内暂存。随后保存于 -80℃ 冰箱。

采用超纯 RNA 提取试剂盒提取总 RNA;于样品中加入 1 mL 上样缓冲液,溶解后的 RNA 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,待溴酚蓝迁移至凝胶长度 2/3 时停止电泳,取出凝胶在紫外透射仪上观察 5、18 和 28 秒条带并摄影记录。荧光实时定量多聚酶链反应,根据小鼠全基因序列,在 NCBI 网上查找相关基因序列和内参,利用 Beacon designer 7 软件设计引物,以 ABCB1A 为目的的基因,以 GAPDH 为内参。用 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,总反应体系 20 μL。反转录条件是:37℃ 孵育 40 分钟,反应结束后 85℃ 保温 5 分钟。反转录产物 -20℃ 保存备用。采用荧光定量 PCR 仪,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据的相对定量分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 q 检验。设置 $\alpha=0.05$ 双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠癫痫性发作行为观察结果

空白组未见抽搐发作,其余各实验组大鼠行为学都呈不同程度的改变,空白组未见反复自发性发作(spontaneous recurrent epileptic seizure, SRS)发作,

其余各实验组均有 SRS 发作;与模型组比较,各治疗组 SRS 发作次数均低于模型组($P<0.05$);与 CBZ 组比较,熄卡组、熄卡低组 SRS 发作次数均低于 CBZ 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 熄风胶囊对 IE 大鼠 SRS 次数影响的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	SRS 发作次数
空白组	10	0
模型组	12	25.22±4.21 ^a
熄高组	12	14.16±3.66 ^{ab}
熄中组	12	16.18±2.02 ^{ab}
熄低组	12	17.12±2.67 ^{ab}
熄卡组	12	11.80±3.21 ^{abc}
熄卡低组	12	5.66±2.12 ^{abc}
CBZ 组	12	14.80±3.94 ^{ab}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 CBZ 组比较,^c $P<0.05$ 。

2.2 熄风胶囊对 IE 大鼠脑组织 MDR1mRNA 表达水平的影响

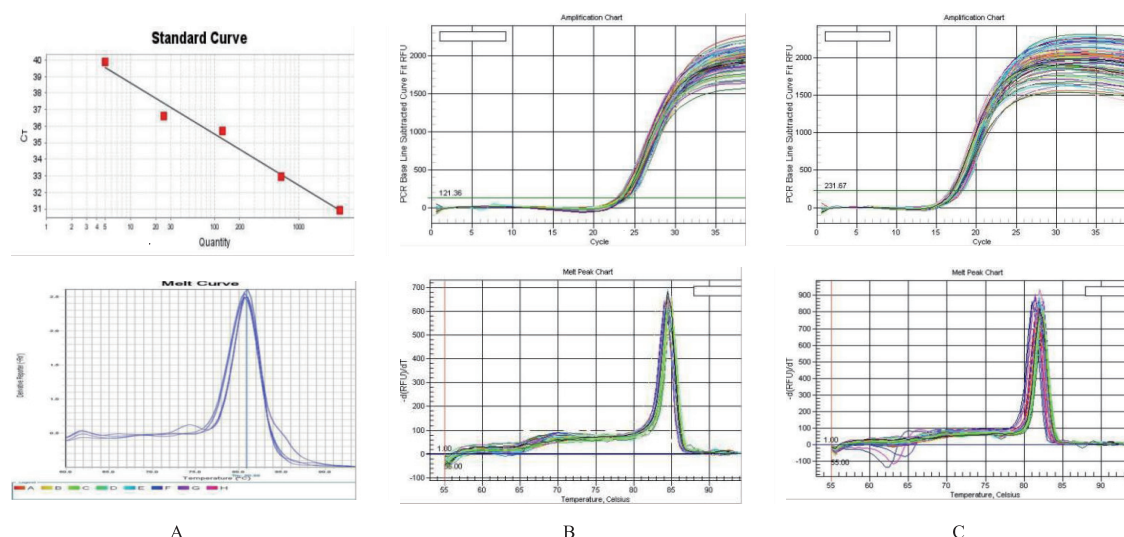
2.2.1 基因扩增的标准曲线 选取样本 cDNA 进行 5 倍梯度稀释,稀释后样品各取 2 μL 作模板,分别目的基因用 ABCB1A 引物和内参基因 GAPDH 引物进行扩增,同时在 60~95℃ 进行溶解曲线分析。从图可见,标准曲线的 R^2 均达到 0.99,说明线性相光度很高,而且扩增效率均在 90% 以上,因此可以采用这种方法和上述引物对后续样本进行扩增分析。见图 1。

2.2.2 熄风胶囊对 IE 大鼠脑组织 MDR1mRNA 表达水平的影响比较 与空白组比较,其余各组大鼠 MDR1mRNA 的基因表达均上调($P<0.05$);与模型组比较,熄中组、熄卡低组、熄卡组 and CBZ 组的 MDR1mRNA 表达均下降($P<0.05$);与 CBZ 组相比,熄卡低组和熄卡组的基因表达均明显降低($P<0.05$)。见表 2。

表 2 熄风胶囊对 IE 大鼠脑组织 MDR1mRNA 表达水平的影响比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	MDR1mRNA
空白组	4	0.49±0.14
模型组	4	1.00±0.00 ^a
熄高组	4	0.92±0.13 ^a
熄中组	4	0.81±0.13 ^{ab}
熄低组	4	0.90±0.16 ^a
熄卡组	4	0.76±0.06 ^{abc}
熄卡低组	4	0.71±0.10 ^{abc}
CBZ 组	4	0.92±0.06 ^{ab}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 CBZ 组比较,^c $P<0.05$ 。



注:A: ABCB1A 基因标准曲线图及产物溶解曲线图:上为标准曲线图,横坐标代表标准品拷贝数对数值,纵坐标代表循环次数,下为溶解曲线图,横坐标代表溶解温度,纵坐标代表荧光信号值;B: ABCB1A 基因实时扩增曲线图与产物溶解曲线图,上为实时扩增曲线图,横坐标代表扩增循环数,纵坐标代表扣除背景荧光后的荧光强度,下为溶解曲线图,横坐标代表溶解温度,纵坐标代表单位时间内的相对荧光强度;C: 组织内参 GAPDH 基因实时扩增曲线图:上为实时扩增曲线图,横坐标代表扩增循环数,纵坐标代表扣除背景荧光后的荧光强度,下为产物溶解曲线图,横坐标代表溶解温度,纵坐标代表单位时间内的相对荧光强度。

图1 ABCB1A 基因标准曲线图及产物溶解曲线图

3 讨论

多药转运体的过量表达,是 IE 耐药形成的重要分子机制^[4-5]。多药耐药基因表达产物的作用主要是将一些大分子亲脂性物质由胞内转运到胞外,这是一个 ATP 依赖过程。很多治疗药物都是亲脂性的,能够成为此类基因表达产物的底物,被泵出胞外,从而导致细胞内药物浓度降低,称为多药转运体^[6-7]。

MDR 是被发现的第一个与 IE 有关的耐药基因。人类的 MDR 基因主要由 MDR1 和 MDR2 组成,其中 MDR1 起主要作用,编码一种分子质量为 170kD 的膜蛋白,即 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)。P-gp 是由多药耐药基因编码的 ATP 依赖性的药物外排泵,存在于脑毛细血管内皮细胞的腔面^[8]。在癫痫的病理状态下,血管内皮短暂破坏,引起星形胶质细胞终足部位 P-gp 过度表达,构成第二道屏障,增强血脑屏障功能,保护脑内环境相对稳定,阻止 AEDs 进入脑组织,降低 AEDs 在脑神经细胞内的稳态浓度,导致治疗失败。P-gp 的过度表达易造成癫痫耐药,故在治疗时加上 P-gp 抑制剂是治疗 IE 的一个新概念。由于 IE 是一个需要联合用药和长期治疗的疾病,所以用于治疗 IE 的 P-gp 抑制剂应当具有高度特异且无毒性,对 AEDs 及其他

药物的代谢酶应当产生最小的抑制作用。

近年来,由于中医药资源丰富及多途径、多靶点的特点,中药及中药复方的 P-gp 抑制剂成为一个新的研究方向。柴胡皂苷 a 低、中、高剂量均可以降低氯化锂-匹罗卡品致 IE 动物模型大鼠颞叶皮层、海马区 P-gp 的过度表达,其效果成剂量依赖性^[9]。刘新红等^[10]采用免疫组化方法检测各组癫痫大鼠海马 CA3 区 P-gp 和核因子- κ B p65 的表达水平,结果显示小檗碱能够延长癫痫发作潜伏期、降低其严重程度,并抑制癫痫大鼠脑组织 P-gp 的过度表达。有研究显示^[11],雷公藤内酯对海人酸致痫大鼠耐药有逆转作用,其机制与下调致痫大鼠海马区 P-gp 的表达有关。虎杖苷有一定的抗癫痫作用,下调 P-gp 表达可能是机制之一^[12]。

本实验通过 RT-PCR 方法检测 P-gp 的编码基因 MDR1mRNA 在实验大鼠脑组织的表达水平,结果提示:在基因水平上,CBZ 组、熄风胶囊单药的中剂量组、联合用药的熄卡低组和熄卡组对 IE 大鼠脑组织 MDR1mRNA 表达均具有明显的抑制作用,并且中西药联合比单用西药抑制作用更明显,这为研究 IE 耐药机制的中医药实验研究及临床治疗提供了一定的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Honchar MP, Olney JW, Sherman WR. Systemic cholinergic

- agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. [J]. Science, 1983, 220(4594):323-325.
- [2] 余倩. 小剂量反复注射匹罗卡品建立颞叶癫痫大鼠模型的研究[J]. 贵州医药, 2012, 36(2): 162-163.
- [3] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor Seizure, Electroencephalogr[J]. Clin Neurophysiol, 1972, 32:281-294.
- [4] Seegers U, Potschka H, Löscher W. Expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in brain capillary endothelial cells and brain parenchyma of amygdala-kindled rats [J]. Epilepsia, 2002, 43(7):675-684.
- [5] Kubota H, Ishihara H, Langmann T, et al. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvasculature and endothelial cells in hippocampal sclerosis [J]. Epilepsy Res, 2006, 68(3): 213-228.
- [6] Sisodiya S. Drug resistance in epilepsy: not futile, but complex? [J]. Lancet Neurology, 2003, 2(6):331.
- [7] Marroni M, Marchi N, Cucullo L, et al. Vascular and parenchymal mechanisms in multiple drug resistance: a lesson from human epilepsy[J]. Current Drug Targets, 2003, 4(4): 297-304.
- [8] Lee G, Schlichter L, Bendayan M, et al. Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 299(1): 204-212.
- [9] 谢炜, 陈伟军, 孟春想, 等. 柴胡皂苷 a 对难治性癫痫大鼠多药耐药蛋白 P 糖蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 229-232.
- [10] 刘新红, 余年, 狄晴, 等. 小檗碱对癫痫大鼠脑组织 P 糖蛋白表达的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2013, 26(3):191-194.
- [11] 王三明, 赵烨, 康乐, 等. 雷公藤内酯对癫痫大鼠 P-糖蛋白表达影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(4):21-23.
- [12] 晏玉奎, 邱彩霞, 刘泉坤, 等. 虎杖苷调节海人酸致痫鼠颞叶、海马区 P-糖蛋白表达的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(5):1164-1166.
- [13] 刘金民, 郑香春. 中药柴贝止痫汤对难治性癫痫大鼠多药耐药基因 MDR1 表达的研究[J]. 天津中医药. 2009, 26(6): 472-475.

(收稿日期: 2016-09-06)

(本文编辑: 韩虹娟)