

· 论著 ·

# 中药补脑止痫散对癫痫大鼠海马神经元凋亡基因 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

龚誉华 程光宇 程为平

**【摘要】 目的** 通过观察中药补脑止痫散对戊四氮化学点燃癫痫模型大鼠海马神经元凋亡基因 Bax 和 Bcl-2 表达的影响,探讨补脑止痫散治疗癫痫的相关机制。**方法** 从 78 只正常 Wistar 大鼠中随机选取 10 只列为正常组,剩余 68 只大鼠腹腔注射戊四氮制作癫痫点燃模型,再随机选取 50 只造模成功大鼠随机分为 5 组:模型组、丙戊酸钠组、补脑止痫散高剂量组、补脑止痫散中剂量组和补脑止痫散低剂量组,每组 10 只。用免疫组化法检测药物治疗各组大鼠与正常组和模型组比较海马中神经元凋亡基因 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的变化。**结果** 各治疗组大鼠海马 Bax 和 Bcl-2 蛋白阳性目标面密度值与模型组相比分别出现明显降低和升高 ( $P < 0.05$ ),而补脑止痫散低剂量组大鼠海马 Bax 和 Bcl-2 蛋白阳性目标面密度值改变不明显 ( $P > 0.05$ ),并且补脑止痫散高剂量组和中剂量组比较,以及此二组与丙戊酸钠组相比大鼠海马 Bax 和 Bcl-2 蛋白阳性目标面密度值改变均无明显差异 ( $P > 0.05$ )。**结论** 中药补脑止痫散高、中剂量能调整癫痫患者海马神经元凋亡基因 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达,从而抑制癫痫发作。

**【关键词】** 癫痫; 神经元凋亡基因 Bax 和 Bcl-2

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.02.007

**Effect of Bunaozhixian Powder on neuronal apoptosis genes Bax and Bcl-2 expression in the hippocampus area of epileptic rats** GONG Yu-hua, CHENG Guang-yu, CHENG Wei-ping. Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China

Corresponding author: CHENG Wei-ping, E-mail: cwp1958@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of the Bunaozhixian Powder on treatment of epilepsy, we observe the effect of Bunaozhixian Powder on neuron apoptosis genes Bax and Bcl-2 expression in the hippocampus area of epileptic rats induced by pentylenetetrazol (PTZ). **Methods** Select 10 rats from 78 normal wistar rats randomly as the normal group. The remainder 68 rats are injected abdominally with PTZ as epileptic model. Then randomly select 50 epileptic rats, divide these rats into 5 groups: the model group, the sodium valproate group, high dosage of Bunaozhixian Powder group, medium dosage of Bunaozhixian Powder group and low dosage of Bunaozhixian Powder group. Every group has 10 rats. 5 groups are injected with PTZ as epileptic model except the normal group. Examine the hippocampus cerebral tissues Bax, Bcl-2 protein expression with enzyme immunoassay method in every group. **Results** Compared with the model group, the positive Bax and Bcl-2 protein density value of hippocampus neuron area of rats with medical treatment get significant lower and higher respectively ( $P < 0.05$ ), but low dosage of Bunaozhixian Powder group have no significant change ( $P > 0.05$ ). Besides, high dosage is compared to medium dosage of Bunaozhixian Powder group, and these two groups are compared to the sodium valproate group, the positive Bax and Bcl-2 protein density value have no significant change ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The high and medium dosage of Bunaozhixian Powder can change the neuronal apoptosis genes Bax and

基金项目:哈尔滨市科技创新人才研究专项资金(优秀学科带头人项目)(2010RFXXS034)

作者单位:150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学[龚誉华(博士研究生)];香港浸会大学中医药学院(程光宇);黑龙江中医药大学附属第一医院神经内科(程为平)

作者简介:龚誉华(1983-),2009 级在读博士研究生。研究方向:中西医结合治疗神经内科疾病。E-mail:scallen9401@sina.com

通讯作者:程为平(1958-),主任医师,教授,博士生导师。研究方向:中西医结合治疗神经内科疾病。E-mail:cwp1958@163.com

文献标引格式:

龚誉华,程光宇,程为平.中药补脑止痫散对癫痫大鼠海马神经元凋亡基因Bax和Bcl-2表达的影响[J].环球中医药,2012,5(2):105-107.

Bcl-2 expression in the hippocampus area of epileptic rats. So the Bunaozhixian Powder can inhibit epileptic seizures.

【Key words】 Epilepsy; Neuronal apoptosis genes Bax and Bcl-2

癫痫(Epilepsy)是一组以脑神经元过度异常放电所引起的反复发作性突然和短暂的中枢神经系统功能异常为特征的慢性脑部疾病。本病发病机制极为复杂,近年来越来越多的科研工作开始研究细胞凋亡在癫痫发病过程中所起的作用<sup>[1]</sup>,细胞凋亡的发生是由基因调控的,Bax 和 Bcl-2 就是一对能促进和抑制细胞凋亡的代表基因<sup>[2]</sup>。中药复方补脑止痛散是治疗癫痫的临床经验方,本实验通过研究补脑止痛散对癫痫模型大鼠的海马凋亡基因 Bax 和 Bcl-2 表达的影响,探讨补脑止痛散治疗癫痫的相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

采用 SPF 级 Wistar 大鼠 78 只,体重 180 ~ 220 g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。

### 1.2 药品及试剂

补脑止痛散选用首乌、石斛、天麻、僵蚕、全蝎、远志、甘松七味中药,处方散剂各 1 g,由黑龙江中医药大学中药研究所提供;戊四氮购自美国 sigma 公司;丙戊酸钠由湖南湘中制药公司生产;Bax 和 Bcl-2 免疫组化试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。

### 1.3 戊四氮大鼠点燃模型

给予大鼠腹腔注射戊四氮(PTZ)癫痫发作阈下刺激量 35 mg/kg,每天上午 8:00 ~ 10:00 注射,注射后观察大鼠行为变化 30 分钟,根据 Racine 分级标准<sup>[3]</sup>将大鼠行为分为 6 级,分别是 0 级:正常;1 级:面部的抽搐,包括动须、眨眼、节律性咀嚼、湿狗样抖动等;2 级:颈部肌肉的抽动,主要表现为点头;3 级:单侧前肢的抽搐、阵挛;4 级:双侧前肢的抽搐、阵挛,伴有身体的立起;5 级:双侧前、后肢强直,站立后失平衡倾倒,身体背屈强直,四肢抽搐。大鼠连续 5 天出现 4 级以上发作定义为点燃成功。

### 1.4 动物分组和处理方法

将 78 只大鼠编号,用随机数字表法随机选取 10 只正常大鼠列为正常组,然后将另外 68 只大鼠用来造模,在 30 天的造模时间内笔者发现有 58 只大鼠达到点燃要求,有 6 只死亡,4 只未被点燃而淘

汰,再用随机数字表法随机选取 50 只造模成功大鼠平均分为 5 组,分别是:模型组、丙戊酸钠组、补脑止痛散高剂量组、补脑止痛散中剂量组和补脑止痛散低剂量组,每组 10 只。灌胃治疗剂量按成人与大鼠体表面积比折算成等效剂量,正常组和模型组大鼠灌服等体积生理盐水,丙戊酸钠组大鼠给予丙戊酸钠等效剂量 15.75 mg/kg,中药补脑止痛散高、中、低剂量组分别给予 1.6 g/kg、0.8 g/kg 和 0.4 g/kg 灌胃治疗。每天用药一次,连续治疗 30 天。

### 1.5 标本采集与处理

大鼠麻醉后开胸暴露心脏,经左心室穿刺至主动脉,结扎穿刺针,连接点滴管,剪开右心耳,先用生理盐水快速灌注,直至肝脏颜色变白后,改用 4% 多聚甲醛先快后慢灌注至大鼠尾巴僵硬,然后开颅取脑,固定,切取海马段脑组织石蜡包埋,切片,用免疫组化 PV 二步法参照试剂盒说明书进行操作,封片后在高倍镜下观察并摄片,用 HPIAS-1000 型医学彩色全自动图像分析仪分析阳性目标面密度值,并记录数据。

### 1.6 统计学处理

所有数据均录入 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验和单因素方差分析,显著性水平取  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 行为学改变

58 只造模成功的大鼠中有 37 只大鼠在连续 10 ~ 20 天腹腔注射 PTZ 的过程中,逐渐出现面部抽搐、湿狗样抖动、点头、单侧上肢阵挛、双上肢阵挛伴直立,最终出现全身强直一阵挛发作伴有流涎。大鼠每次惊厥发作行为表现明显,分级明确,模型点燃成功后停止刺激 5 ~ 7 天,再次给予 PTZ 刺激,仍然可以出现 4 级以上惊厥发作,此即为 PTZ 点燃成功大鼠的行为表现,在治疗过程中笔者观察到模型组大鼠仍有 3 级或 4 级惊厥发作,而治疗组大鼠随治疗次数增加,惊厥发作级别多为 3 级以下,且发作次数明显减少。

### 2.2 指标检测

各组大鼠海马凋亡基因 Bax 和 Bcl-2 表达的蛋白阳性目标面密度值统计数据结果见表 1。

表 1 各组大鼠海马 Bax 和 Bcl-2 蛋白阳性目标面密度值( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

分组	Bax 蛋白阳性目标面密度值	Bcl-2 蛋白阳性目标面密度值
正常组	0.027±0.001 <sup>a</sup>	0.071±0.018 <sup>a</sup>
模型组	0.059±0.015 <sup>b</sup>	0.016±0.012 <sup>b</sup>
丙戊酸钠组	0.020±0.004 <sup>a</sup>	0.058±0.015 <sup>a</sup>
补脑止痛散高剂量组	0.026±0.002 <sup>a</sup>	0.065±0.021 <sup>a</sup>
补脑止痛散中剂量组	0.022±0.003 <sup>a</sup>	0.066±0.008 <sup>a</sup>
补脑止痛散低剂量组	0.042±0.023 <sup>b</sup>	0.020±0.004 <sup>b</sup>

注:与模型组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与正常组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

从表 1 实验结果可以看出,模型组大鼠海马 Bax 和 Bcl-2 凋亡基因表达的蛋白阳性目标面密度值与正常组大鼠相比有明显的升高和降低( $P < 0.05$ ),提示戊四氮致病大鼠惊厥发作与海马神经元的凋亡密切相关,而经过西药丙戊酸钠和补脑止痛散治疗后,补脑止痛散高、中剂量组和丙戊酸钠组 Bax 凋亡基因表达的蛋白阳性目标面密度值与模型组相比明显降低( $P < 0.05$ ),而补脑止痛散低剂量组改变不明显( $P > 0.05$ );同样,补脑止痛散高、中剂量组和丙戊酸钠组 Bcl-2 凋亡基因的表达蛋白阳性目标面密度值与模型组相比明显升高( $P < 0.05$ ),而补脑止痛散低剂量组改变不明显( $P > 0.05$ )。另外,补脑止痛散高剂量与中剂量组比较,以及此二组与丙戊酸钠组比较 Bax 和 Bcl-2 凋亡基因表达的蛋白阳性目标面密度值均无显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

研究证实,海马神经元凋亡既是癫痫发作的结果,也是潜伏期中环路重建导致惊厥反复发作的重要原因,因此海马神经元的凋亡在癫痫的发病中起主导作用<sup>[4]</sup>。Bax 和 Bcl-2 是一对细胞凋亡的正负调节基因,能调控中枢和外周神经系统神经元的凋亡过程。Bax 既能自身形成同源二聚体,直接导致细胞凋亡,又可以和 Bcl-2 蛋白形成异源二聚体使 Bcl-2 蛋白失活,促进细胞凋亡。而 Bcl-2 基因能阻止多种刺激和损伤导致的细胞凋亡,并能显著地抑制自由基及过氧化物增加,从而使细胞的生存期延长<sup>[5]</sup>。

目前,科研实验多是采用化学致惊剂或电刺激的方法复制癫痫动物模型,PTZ 是诱导大鼠癫痫发作的常用药物,长期反复惊厥发作阈下剂量的刺激能够建立较理想的慢性点燃模型,成功率高且操作方便。本实验结果所显示的模型组与正常组指标比较的差异能提示 PTZ 造模的有效性和可靠性,同时也提示由 Bax 和 Bcl-2 基因调控的海马神经元细胞凋亡与大鼠癫痫的发生有一定的相关性。西药

丙戊酸钠是目前国际普遍公认的高效、低毒、广谱的临床一线抗癫痫药,因其具有代表性,故选为对照西药。

经过长期临床实践及对各医家经验总结,笔者认为癫痫病因主要归于风、火、痰、瘀、郁、虚,髓海空虚,内风逆乱,元神失控,发为惊厥,初发多实,久病则虚,临床所见多为虚实夹杂之证,故立验方补脑止痛散。方中首乌具有补益精血,固肾健骨充髓之效,用以为君;石斛性甘微寒,功能养阴清热,益胃生津,为臣药;天麻能息风止痉,平抑肝阳,祛风通络,《本草纲目》记载“天麻为治风之神药”;僵蚕、全蝎合用,息风止痉,搜剔入络,二药与天麻合用加强平肝息风,通络止痉之力,共为佐药;另加一味远志,以宁心安神,祛痰开窍;一味甘松,能行气开郁,亦为佐药。七味均等为散,共成补肾充髓,养阴清热,平肝息风,宁神开窍,定惊止痛之剂。

本实验点燃模型大鼠可见分级明确的癫痫发作为学表现,经过中药补脑止痛散和西药丙戊酸钠的治疗后,笔者观察到大鼠的惊厥发作的级别和次数明显减少,提示中药补脑止痛散对于控制癫痫发作有一定的疗效。除此之外,大多数癫痫都伴有海马神经元的凋亡,从实验结果中可以看到,中药补脑止痛散对于 Bax 和 Bcl-2 这一对凋亡基因在海马的表达起到有效调控作用,从而减少海马神经元凋亡数量。这一结果也提示了中药补脑止痛散控制癫痫发作的可能机制是通过 Bax 和 Bcl-2 凋亡基因的有效调控而抑制海马神经元的大量凋亡,达到减轻癫痫发作的目的。另外,本实验是从神经病理方面对中药补脑止痛散药效作用机制进行探讨,而神经元的异常过度放电是癫痫发作的病理生理基础<sup>[6]</sup>,如何运用神经电生理方法揭示本方药理作用还需要作进一步的实验研究。

### 参 考 文 献

- [1] 王焕明,谭启富,吴波,等. 颞叶癫痫患者脑内细胞凋亡现象的研究[J]. 中华神经外科杂志,1999,15(6):333-335.
- [2] Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death[J]. Cancer Res,1999,59(7):1693-1699.
- [3] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor Seizure[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol,1972,32(3):281.
- [4] 赵文娟,黄显奋. 癫痫中细胞凋亡发生的多元调节机制[J]. 国外医学:生理病理科学与临床分册,2000,20(1):18-21.
- [5] Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl-2 family induces Bax-dependent apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(5):2432-2437.
- [6] 王维治. 神经病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:227.

(收稿日期:2011-12-02)

(本文编辑:钮丽霞)