

柴贝止痫汤影响大鼠脑微血管内皮细胞 乳腺癌耐药蛋白、核因子 p65 表达的研究

鄢泽然 张青 王潇慧 王越 聂莉媛 刘金民

【摘要】 目的 探索中药柴贝止痫汤对离体大鼠脑微血管内皮细胞乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 和核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) p65 表达的影响。**方法** 培养原代大鼠脑微血管内皮细胞,传至 3 代时分为正常组、模型组和中药组,正常组常规培养,模型组用 100 nmol/L 的地塞米松作用细胞 24 小时,诱导细胞膜上 BCRP 表达增加;中药组在造模基础上分别用柴贝止痫汤四个浓度 (10 μ g/ml、100 μ g/ml、500 μ g/ml、1 mg/ml) 干预模型细胞 24 小时。Western blot 检测各组细胞 BCRP、NF- κ B p65 的表达,差异比较采用方差分析;Real-time PCR 检测 Bcrp mRNA 的扩增,相对定量法比较各组间扩增差异。**结果** 柴贝止痫汤 10 μ g/ml、100 μ g/ml 组 BCRP 表达及 Bcrp mRNA 的扩增均较模型组降低 ($P < 0.05$);柴贝止痫汤 1 mg/ml 组 NF- κ B p65 的表达较模型组降低 ($P < 0.05$)。**结论** 柴贝止痫汤可以下调地塞米松诱导的大鼠脑微血管内皮细胞 BCRP 及 Bcrp mRNA 的表达;可能对 NF- κ B p65 的表达有下调作用。

【关键词】 柴贝止痫汤; 乳腺癌耐药蛋白; 大鼠脑微血管内皮细胞; 难治性癫痫

【中图分类号】 R277.7 **【文献标识码】** A doi: 10.3969/j.issn.1674-1749.2014.04.001

Role of Chaibei Zhixian Decoction on regulating the expression of BCRP and NF- κ B p65 in rat brain microvascular endothelial cells YAN Ze-ran, ZHANG Qing, WANG Xiao-hui, et al. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: LIU Jin-min, E-mail: jmvip@vip.163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of Chaibei Zhixian Decoction on regulating the expression of breast cancer resistance protein (BCRP) and nuclear factor-kappaB (NF- κ B) p65 in rat brain microvascular endothelial cells. **Methods** Primary culture of brain microvascular endothelial cells were prepared from rats. The 3rd passage cells were exposed to dexamethasone (100 nmol/L) for 24h to up-regulate the expression of BCRP. After dexamethasone administration, the cells were treated with increasing concentrations (10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 500 μ g/ml and 1 mg/ml) of Chaibei Zhixian Decoction for 24h. BCRP and NF- κ B p65 protein expression were assessed by Western blot analysis and data were measured with analysis of variance. Real-time PCR was performed for Bcrp mRNA amplification and differences among groups were assessed by relative quantitative assay. **Results** Exposure to Chaibei Zhixian Decoction (10 μ g/ml, 100 μ g/ml) resulted in significant decrease in protein and mRNA levels of BCRP ($P < 0.05$); While BCRP was down-regulated, NF- κ B p65 expression was decreased by Chaibei Zhixian Decoction (1 mg/ml) ($P < 0.05$). **Conclusion** Chaibei Zhixian Decoction down-regulate both protein and mRNA expression of BCRP and probably decrease the levels of NF- κ B p65 in rat brain microvascular endothelial cells.

基金项目:国家自然科学基金(81072771);教育部博士学科点专项科研基金(20120013110011);北京中医药大学科研创新团队资助项目(2011-CXTD-23)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院脑病科[鄢泽然(博士研究生)、张青(博士研究生)、王潇慧(硕士研究生)、聂莉媛(博士研究生)、刘金民];天津中医药大学第二附属医院急诊科(王越)

作者简介:鄢泽然(1985-),2011 级在读博士研究生。研究方向:中医药调节难治性癫痫耐药蛋白表达的作用及机制。E-mail: yanzeran@126.com

通讯作者:刘金民(1965-),博士,教授,主任医师。研究方向:中医内科急症及发作性脑病的中医药治疗。E-mail: jmvip@vip.163.com

【Key words】 Chaibei Zhixian Decoction; Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2);

Rat brain microvascular endothelial cell; Intractable epilepsy

难治性癫痫对多种抗癫痫药物交叉耐药,其可能的机制是血脑屏障上表达增加的多药转运体逆浓度梯度将抗癫痫药物分子泵出血脑屏障,降低病灶处的药物浓度,使药物疗效降低甚至失效,引起癫痫反复发作。长期使用抗癫痫药物和癫痫反复发作均可增加多药转运体的表达。抑制血脑屏障上多药转运体的表达可能提高难治性癫痫的疗效。

乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)属于三磷酸腺苷依赖性膜转运蛋白超家族成员,广泛分布在脑微血管、小肠、肝脏、胎盘等组织和器官中^[1],与药物的吸收、分布和代谢有密切关系。脑微血管内皮细胞上过度表达的 BCRP 可降低透过血脑屏障的抗癫痫药物浓度。故在血脑屏障结构和功能完整的前提下,抑制 BCRP 的表达可以增加抗癫痫药物在脑组织中的浓度,对难治性癫痫的治疗有重要意义。

柴贝止痫汤是刘金民教授在《医学心悟》“定痫丸”的基础上,继承、吸收王永炎院士临床经验化裁而成,全方由柴胡、浙贝母、法半夏、天麻、石菖蒲、牡蛎、地龙七味药物组成,主要功效是疏肝解郁,理气化痰,开窍定痫。临床应用发现,在抗癫痫药物治疗的基础上添加中药柴贝止痫汤可以抑制难治性癫痫患者的痫性发作,减少发作频次,减轻发作程度,其疗效优于单用抗癫痫药,因此推测其机制可能与二者协同增效有关。为探索柴贝止痫汤增敏抗癫痫药物的机制,本研究拟采用地塞米松孵育大鼠脑微血管内皮细胞建立 BCRP 高表达模型,观察中药柴贝止痫汤对 BCRP 及 BCRP 可能的调节因子核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)p65 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

每批原代脑微血管内皮细胞需要 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 5 只,体重 60 ~ 80 g,购自军事医学科学院实验动物中心。动物许可证号:SCXK-(军)2012-0004;出笼单号:0000770、0001240。

1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养基(Gibco,12100-038),胎牛血清(Gibco,10099-141),II 型胶原酶(Sigma,C6885),

0.25% 胰酶(含乙二胺四乙酸)(Sigma,T4049),L-谷氨酰胺(Sigma,G6392),噻唑蓝(methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide,MTT)(Sigma,M5655),A 型明胶(Sigma,G2625),地塞米松(Sigma,D4902),肝素钠(北京索莱宝科技有限公司,H8060-1),胰岛素(Sigma,I5500),内皮细胞生长支持物(Sigma,E2759);TRIzol 试剂(Invitrogen,15596-026);逆转录 cDNA 试剂盒(Fermentas,K1622);Real-time PCR 预混荧光染料(TOYOBO,QPK-212)。

1.3 抗体及引物

兔抗 VIII 因子抗体(Santa Cruz,sc-33584)、兔抗 BCRP 抗体(Santa Cruz,sc-25822)、兔抗 NF- κ B p65 抗体(Santa Cruz,sc-372)、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(Santa Cruz,sc-25778)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记 anti-Rabbit 抗体(Santa Cruz,sc-2004)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记 anti-Rabbit 抗体(Sigma,F0382)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 受试药物

将地塞米松 10 mg 溶于 10 ml 无水乙醇,配制成 1 mg/ml 浓储液,使用时按比例稀释成所需浓度。

柴贝止痫汤中药配方颗粒(柴胡 12 g、天麻 15 g、浙贝母 9 g、法半夏 9 g、石菖蒲 9 g、牡蛎 30 g、地龙 6 g)购自北京康仁堂药业有限公司。称取 10 g 配方颗粒溶于 100 ml D-Hank's 液中,煮沸后经定量滤纸过滤,烘干滤纸称重,扣除被滤过的药物质量,调节中药水溶液浓度为 10 mg/ml,0.22 μ m 滤器过滤后备用。

1.5 大鼠脑微血管内皮细胞的培养和鉴定

按参考文献^[2]所载方法,60 ~ 80 g Wistar 大鼠 5 只,适应性饲养 3 天后断头处死。75% 的酒精浸泡头颅三次,超净台内取脑,D-Hanks 液清洗,在冲洗液(8% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、0.2 U/ml 胰岛素、40 U/ml 肝素钠及 DMEM 高糖培养基组成)中去除肉眼可见的血管和软脑膜。分离大脑皮层灰质,在冲洗液中剪成 1 mm³ 小块,研磨器研磨 25 次(上下为 1 次),研磨液用 80 目(约 178 μ m)尼龙网筛过滤后再经 200 目(约

74 μm)网筛过滤。冲洗液冲洗 200 目网筛上微血管段,洗液经 1000 rpm 离心 5 分钟后弃上清,加入 0.2% II 型胶原酶 4 ml,37℃ 消化 25 分钟,1000 rpm 离心 5 分钟,弃上清;冲洗液清洗 2 次后加入 4 ml 完全培养基(20% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、0.2 U/ml 胰岛素、40 U/ml 肝素钠、75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 内皮细胞生长支持物、2 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ L-谷氨酰胺及 DMEM 高糖培养基组成),滴管轻轻吹打均匀,接种于经 2% 明胶包被的 25 cm^2 培养瓶中。静置 3 天后第一次换液,以后每 2 天换液 1 次,7~10 天后细胞铺满培养瓶底的 80%~90%,经 0.125% 胰酶-EDTA 消化 30 秒后传代。传至第 3 代时接种至 12 孔板(预包被明胶)内爬片,接种密度为 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 。待细胞铺满 80% 玻片后,80% 冷丙酮固定 10 分钟,0.3% Triton-X100 透膜 20 分钟,2% 山羊血清(Gibco,16210-064)室温封闭 30 分钟,勿洗,滴加 anti-VIII 因子一抗(1:50 稀释)湿盒内 4℃ 过夜,滴加 FITC-anti-Rabbit 二抗(1:30 稀释)37℃ 避光孵育 30 分钟,清洗后滴加 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst33258 (Sigma, B1155)避光室温孵育 15 分钟,90% 甘油封片,荧光显微镜(紫外光、蓝光)观察染色情况。经鉴定后的细胞用于实验,传代不超过第 5 代。

1.6 地塞米松对脑微血管内皮细胞生长活力的影响

收集对数生长期的细胞,调整密度为 $4 \times 10^4/\text{ml}$ 接种至明胶包被的 96 孔板,分设空白调零孔(无细胞)、地塞米松 6 个浓度组(0 nmol/L、10 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、250 nmol/L、500 nmol/L),每组 3 个复孔。待细胞爬满孔底 80% 时换用含相应浓度地塞米松的培养基培养 24 小时。培养结束前 4 小时加入 MTT,培养结束后去除上清,加入二甲亚砜,振荡 10 分钟后酶标仪检测各孔 490 nm 处的吸光值(OD)。比较各浓度组的 OD490,选择对细胞生长活力影响较小的浓度进入下一步实验。

细胞存活率 = $[(\text{OD}_{\text{浓度组}} - \text{OD}_{\text{调零孔}})/(\text{OD}_{0\text{nmol/L}} - \text{OD}_{\text{调零孔}})] \times 100\%$

1.7 BCRP 高表达脑微血管内皮细胞模型的建立

按参考文献^[3]所载方法和 1.6 的结果,采用不同浓度的地塞米松作用脑微血管内皮细胞 24 小时,观察各浓度作用下 BCRP、NF- κB p65 的表达情况。选择诱导 BCRP 高表达的浓度进入下一步实验。

1.8 Western blot 检测细胞 BCRP 和 NF- κB p65 的表达

调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 后接种至明胶包被

的 6 孔板,分设正常组、模型组及中药 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 mg/ml 四个剂量组,每组 3 个复孔,经造模和药物干预后收集并裂解细胞,Bradford 法测定蛋白浓度,调节样本蛋白浓度为 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,每孔上样 12 μl 进行 SDS-PAGE 电泳,转印蛋白至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,5% 脱脂奶粉封闭,一抗 4℃ 过夜(anti-BCRP 1:50 稀释,anti-NF- κB p65 1:50 稀释,anti-GAPDH 1:1000 稀释),标记二抗(1:5000 稀释),ECL 发光液显影。条带灰度值分析采用 Image J 软件。

1.9 Real time-PCR 检测细胞 Bcrp mRNA 的表达

分组同前,总 RNA 提取采用 TRIzol 试剂,cDNA 的合成采用 Fermentas 公司逆转录试剂盒。PCR 反应体系(20 μl)配置:cDNA 模板 1 μl ,上、下游引物各 1 μl ,预混荧光染料 10 μl ,蒸馏水 7 μl 。BCRP 引物设计:Forward 5'-AGT CCG GAA AAC AGC TGA GA-3',Reverse 5'-CCC ATC ACA ACG TCA TCT TG-3';GAPDH 引物设计:Forward 5'-GTG CCA GCC TCG TCT CAT AG-3',Reverse 5'-CTT TGT CAC AAG AGA AGG CAG-3'。

1.10 观察柴贝止痢汤对细胞 BCRP、NF- κB p65 表达的影响

比较中药各浓度组与模型组间 BCRP、NF- κB p65 western blot 实验电泳条带灰度值的差异,说明柴贝止痢汤对 BCRP、NF- κB p65 表达的影响;比较中药各浓度组与模型组间 Bcrp mRNA 扩增的 ΔC_T 值及 $2^{-\Delta\Delta\text{C}}$ 值,说明柴贝止痢汤对 Bcrp mRNA 扩增的影响。

1.11 统计学方法

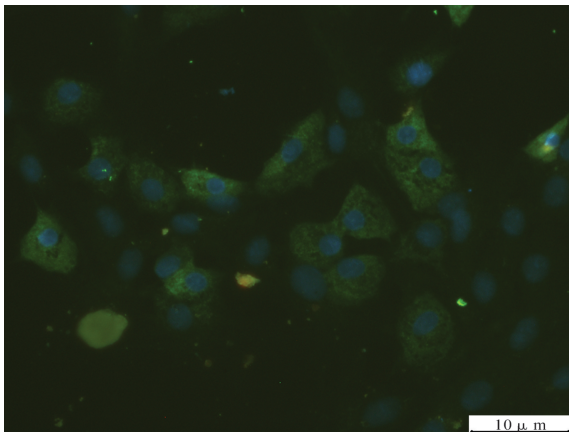
结果用 SPSS 20.0 软件统计。平均值以($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐同各组间均数的比较采用 One-Way ANOVA 分析,两两比较采用 One-Way ANOVA-LSD 分析;方差不齐时各组间均数比较采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较采用 One-Way ANOVA-Games-Howell 分析。设置双侧检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

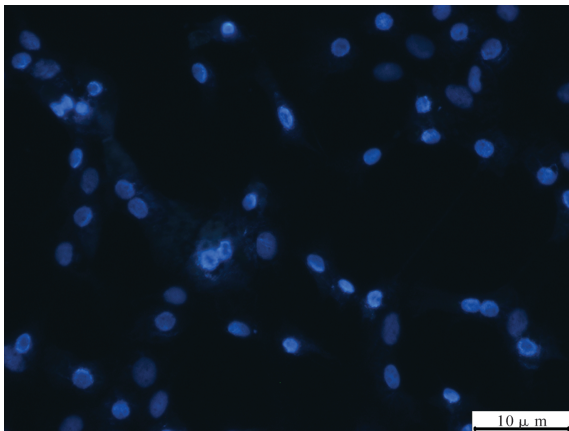
2.1 大鼠脑微血管内皮细胞的培养和鉴定

传至第 3 代时进行 VIII 因子相关抗原免疫荧光鉴定,见图 1。视野中 90% 以上的细胞质被染上黄绿色荧光,细胞核染上蓝色荧光(Hoechst 33258

衬染),符合血管内皮细胞 VIII 因子分布特点。阴性对照细胞胞质未见黄绿色光。



第 3 代大鼠脑微血管内皮细胞 VIII 因子抗原
免疫荧光鉴定(紫外光图片、蓝光图片叠合,100 ×)



阴性对照:一抗用 PBS 替代的第 3 代大鼠脑微血
管内皮细胞 VIII 因子免疫荧光鉴定(100 ×)

图 1 第 3 代大鼠脑微血管内皮细胞 VIII 因子抗原
免疫荧光鉴定

2.2 地塞米松对大鼠脑微血管内皮细胞活力的影响
地塞米松 6 个浓度(0 nmol/L、10 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、250 nmol/L、500 nmol/L)作用细胞 24 小时后的细胞活力测定结果见表 1。经 Kruskal-Wallis H 检验,组间比较具有显著性差异($\chi^2 = 33.115, P = 0.000$);经 One-Way ANOVA-Games-Howell 分析,10 nmol/L 以上浓度孵育大鼠脑微血管内皮细胞 24 小时后,细胞的生长活力较 0 nmol/L 组下降($P < 0.05$),其中 10 nmol/L、100 nmol/L、250 nmol/L 三个浓度对细胞生长活力影响较小,存活率在 70% 以上。

表 1 地塞米松对细胞活力的影响(MTT 法)

地塞米松浓度	n	OD _{490nm}	细胞存活率
0 nmol/L	9	0.545 ± 0.014	100%
10 nmol/L	9	0.431 ± 0.007 ^a	79.1%
50 nmol/L	9	0.415 ± 0.010 ^a	76.1%
100 nmol/L	9	0.395 ± 0.008 ^a	72.4%
250 nmol/L	9	0.093 ± 0.009 ^a	17.1%
500 nmol/L	9	0.060 ± 0.033 ^a	11.0%

注:与 0 nmol/L 组相比,^a $P < 0.05$

2.3 地塞米松对大鼠脑微血管内皮细胞 BCRP、NF-κB p65 表达的影响

选取地塞米松对细胞活力影响较小的三个浓度(10 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L)孵育细胞 24 小时,比较地塞米松各浓度组 BCRP、NF-κB p65 表达的情况(见图 2)。经 Kruskal-Wallis H 检验,各浓度组间 BCRP 表达有差异($\chi^2 = 8.641, P = 0.034$),经 One-Way ANOVA-Games-Howell 分析,50 nmol/L、100 nmol/L 浓度作用 24 小时后 BCRP 的表达较 0 nmol/L 组升高(P 值分别为 0.043 和 0.000)。经 One-Way ANOVA-LSD 分析,NF-κB p65 的表达较 0 nmol/L 组降低(P 值分别为 0.036 和 0.039)。50 nmol/L 与 100 nmol/L 组间 BCRP、NF-κB p65 的表达未见显著差异(见表 2)。为方便配制,后续实验选用 100 nmol/L 地塞米松作为干预浓度。

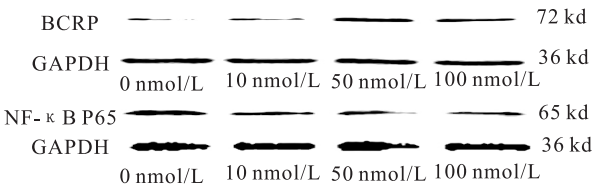


图 2 不同浓度地塞米松孵育细胞 24 小时后
BCRP、NF-κB p65 表达的 Western blot 电泳条带

表 2 不同浓度地塞米松影响细胞
BCRP、NF-κB p65 表达的情况

地塞米松浓度	BCRP/GAPDH	NF-κB p65/GAPDH
0 nmol/L	0.08 ± 0.04	0.47 ± 0.02
10 nmol/L	0.10 ± 0.04	0.37 ± 0.04
50 nmol/L	0.64 ± 0.14 ^a	0.29 ± 0.11 ^a
100 nmol/L	0.57 ± 0.04 ^b	0.29 ± 0.12 ^a

注:与 0 nmol/L 浓度组相比,^a $P < 0.05$;与 0 nmol/L 浓度组相比,^b $P < 0.01$

2.4 柴贝止痫汤对模型细胞 BCRP、NF- κ B p65 表达的影响

大鼠脑微血管内皮细胞经 100 nmol/L 地塞米松孵育 24 小时后,分别用柴贝止痫汤四个浓度梯度(10 μ g/ml、100 μ g/ml、500 μ g/ml、1 mg/ml)干预 24 小时。组间方差齐同,经 One-Way ANOVA-LSD 分析显示,10 μ g/ml、100 μ g/ml 组细胞 BCRP 的表达较模型组降低(对应 P 值分别为 0.014 和 0.043),1 mg/ml 浓度组细胞 NF- κ B p65 的表达较模型组降低($P=0.021$)。(见图 3 和表 3)

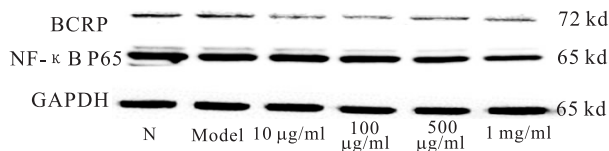


图 3 不同浓度柴贝止痫汤干预模型细胞 24 小时后 BCRP、NF- κ B p65 表达的 Western blot 电泳条带

表 3 不同浓度柴贝止痫汤影响模型细胞 BCRP、NF- κ B p65 表达的情况

组别	BCRP/GAPDH	NF- κ B p65/GAPDH
正常组	0.34 \pm 0.08	1.06 \pm 0.03
模型组	0.56 \pm 0.16 ^a	0.92 \pm 0.04 ^a
中药 10 μ g/ml 组	0.27 \pm 0.06 ^b	0.91 \pm 0.08
中药 100 μ g/ml 组	0.33 \pm 0.14 ^b	0.97 \pm 0.12
中药 500 μ g/ml 组	0.38 \pm 0.13	0.79 \pm 0.06
中药 1 mg/ml 组	0.36 \pm 0.15	0.72 \pm 0.15 ^b

注:与正常组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$

2.5 柴贝止痫汤对模型细胞 Bcrp mRNA 表达的调节作用

各组间方差齐同,经 One-Way ANOVA-LSD 分析,模型组细胞 Bcrp mRNA 的表达较正常组升高($P=0.000$),正常组的表达仅为模型组的 0.23 倍。柴贝止痫汤 10 μ g/ml、100 μ g/ml 两个浓度组 Bcrp mRNA 的表达均较模型组降低(P 值均为 0.000),分别为模型组的 0.36 倍和 0.29 倍。(见表 4)

表 4 Bcrp mRNA 的表达情况(相对定量法)

组别	n	$\Delta C_T(\text{Bcrp-GAPDH})$	$\Delta \Delta C_T(\text{正常组/中药组 - 模型组})$	$2^{-\Delta \Delta C_T}$
正常组	9	9.85 \pm 0.33 ^a	2.15 \pm 0.47	0.23 (0.16, 0.31)
模型组	9	7.70 \pm 0.25	0	1
中药 10 μ g/ml	9	9.18 \pm 0.09 ^a	1.48 \pm 0.28	0.36 (0.45, 0.30)
中药 100 μ g/ml	9	9.48 \pm 0.33 ^a	1.78 \pm 0.20	0.29 (0.25, 0.33)

注:与模型组相比,^a $P < 0.01$

3 讨论

BCRP 与癫痫、肿瘤、溃疡性结肠炎等多种疾病的药物转运有关^[4-6],是继 P 糖蛋白之后发现的又一经典多药转运体。血脑屏障上的 BCRP 参与了动物颅内苯巴比妥、唑尼沙胺、加巴喷汀、噻加宾和左乙拉西坦的转运^[7],抑制 BCRP 的表达可能增加动物颅内抗癫痫药物浓度而提高难治性癫痫的疗效。本研究前期工作发现,柴贝止痫汤可以降低大鼠脑内 P 糖蛋白的表达,离体实验亦观察到柴贝止痫汤可下调经谷氨酸诱导的大鼠脑微血管内皮细胞 P 糖蛋白表达。基于中药多靶点的疗效机制,本研究探索了柴贝止痫汤对大鼠脑微血管内皮细胞 BCRP 表达的影响,发现柴贝止痫汤可抑制地塞米松诱导的 BCRP 及 Bcrp mRNA 表达。

单一培养的脑微血管内皮细胞能够较好地保持在体特征,细胞间可以形成丰富的紧密连接、具有极少的胞饮囊泡和窗孔结构、拥有大量线粒体和丰富的跨膜转运蛋白^[8],可以作为血脑屏障的单细胞体外模型。地塞米松作为孕烷 X 受体的一种配体^[9],可直接激活孕烷 X 受体信号通路上调 BCRP 的表达^[3]。因此,本研究在培养正常大鼠脑微血管内皮细胞的基础上,采用地塞米松孵育,模拟难治性癫痫血脑屏障上 BCRP 的高表达,进而观察柴贝止痫汤对 BCRP 表达的调节作用。

在某些肿瘤细胞中,促炎性细胞因子可以通过激活孕烷 X 受体而上调 BCRP 的表达,增加 BCRP 的转运活性,处于炎症因子信号通路下游的 NF- κ B 表达和活性也相应增加,提示孕烷 X 受体、BCRP、NF- κ B 三者间可能存在相关性^[10-11],而 NF- κ B 等炎症因子的活化已被证实难在难治性癫痫的病理过程中具有重要作用^[12]。因此,本研究在观察中药柴贝止痫汤影响 BCRP 表达的同时也探索了对炎症因子 NF- κ B p65 表达的影响,发现经中药柴贝止痫汤高剂量(1 mg/ml)干预后的细胞 NF- κ B p65 表达较模型组下调。

相关研究认为 BCRP 和 NF- κ B 的活化可能是疾病预后不良的标志^[13-14]。柴贝止痢汤可以通过下调 BCRP 和 NF- κ B 的表达来改善难治性癫痫的预后。药物入胃,由胃运化为精微物质后随气、血、津、液的运行布散到全身。若先天肾气和/或后天脾气不足,气、血、津、液运行不畅,出现气郁、血瘀、痰凝,可阻碍药物运化及在脑内的正常敷布。癫痫久治不愈、反复发作,往往引起气、瘀、痰的相互搏结而不易根除,更加阻碍药物转运入脑。柴贝止痢汤中柴胡疏肝理气,浙贝母、半夏合用可化难治之痰,地龙活血化瘀,石菖蒲引药入脑,天麻、牡蛎平肝熄风定痫,全方与抗癫痫药物合用,可通过改善气滞、血瘀和痰凝来增进药物在脑内的分布,进而改善难治性癫痫的预后。

参 考 文 献

- [1] Mao QC, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport[J]. The AAPS Journal, 2005, 7(1): E118-133.
- [2] 李卫红,青雪梅,华茜,等.大鼠脑微血管内皮细胞条件培养液对皮层神经元活性的影响以及通络救脑注射液的干预作用[J].中华中医药杂志,2006,21(6):334-337.
- [3] Narang VS, Fraga C, Kumar N, et al. Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295(2): C440-C450.
- [4] Sukowati CHC, Rosso N, Pascut D, et al. Gene and functional up-regulation of the BCRP/ABCG2 transporter in hepatocellular carcinoma[J]. BMC Gastroenterology, 2012, 12: 160.
- [5] Liu JYW, Thom M, Catarino CB, et al. Neuropathology of the blood-brain barrier and pharmaco-resistance in human epilepsy[J]. Brain, 2012, 135(10): 3115-3133.
- [6] Englund G, Jacobson A, Rorsman F, et al. Efflux transporters in ulcerative colitis; decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1) [J]. Inflamm Bowel Dis, 2007, 13(3): 291-297.
- [7] Nakanishi H, Yonezawa A, Matsubara K, et al. Impact of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the brain distribution of antiepileptic drugs in knockout mouse models[J]. European Journal of Pharmacology, 2013, 710(1-3): 20-28.
- [8] 赵康峰,王翀,孔建,等.不同血脑屏障模型的建立及其功能特点[J].环境与健康杂志,2012,29(2):127-130.
- [9] Bauer B, Hartz AMS, Fricker G, et al. Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier[J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(3): 413-419.
- [10] Malekshah OM, Lage H, Bahrami AR, et al. PXR and NF- κ B correlate with the inducing effects of IL-1 β and TNF- α on ABCG2 expression in breast cancer cell lines[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012, 47(2):474-480.
- [11] Mosaffa F, Kalalinia F, Lage H, et al. Pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β , interleukin6 and tumor necrosis factor- α alter the expression of ABCG2 in cervix and gastric cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 363(1-2): 385-393.
- [12] Das A, Wallace IV GC, Holmes C, et al. Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors[J]. Neuroscience, 2012, 220:237-246.
- [13] Lzzo JG, Wu X, Wu TT, et al. Therapy-induced expression of NF-kappa B portends poor prognosis in patients with localized esophageal cancer undergoing preoperative chemo-radiation [J]. Dis Esophagus, 2009, 22(2): 127-132.
- [14] Lee SH, Kim H, Hwang JH, et al. Breast cancer resistance protein expression is associated with early recurrence and decreased survival in resectable pancreatic cancer patients[J]. Pathology International, 2012, 62(3):167-175.

(收稿日期:2014-02-06)

(本文编辑:黄凡)

· 信息之窗 ·

本刊“中医病案析评”栏目征稿

《环球中医药》杂志开辟“中医病案析评”栏目。希望广大读者将临床中遇到的典型病案或疑难病案整理刊发,交流心得。

本栏目文章结构分为“病历摘要”和“分析与讨论”两部分。“病历摘要”用准确简洁语言交代清楚患者主诉、病史、中医西医诊断、中医辨证、治法、用药、复诊情况等。“分析与讨论”部分要求逻辑性强、说理清楚、体现良好的中医辨证素养与临床思维模式,展示出对临床工作的实际借鉴意义。

讨论开始部分请明确指出本病案分析讨论的要点和重点。请作者给出诊断和辨证的结论或意见,所分析的病案应有西医诊断结果和确诊证据。请总结相关疾病的国内外研究作简要评述。文后列出主要参考文献。

文章形式建议由作者系统归纳,形成思路清晰、条理清楚、科学性强的临床论文;也可以采用依次发言形式或师生问答形式。

本栏目论文目的在于共同学习,请勿文过饰非,修改原始处方和病例。