

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.18.004

蛭龙活血通瘀胶囊对氯化锂-匹罗卡品致痫大鼠海马组织炎症因子表达的影响*

吴英¹, 郑直^{2△}, 刘丽¹, 赵立志¹

(1. 西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州 646000; 2. 四川省泸州市人民医院, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 探讨蛭龙活血通瘀胶囊对氯化锂-匹罗卡品(毛果芸香碱)致痫大鼠行为学及海马组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素1b(IL-1b)表达的影响。方法 将48只健康雄性成年SD大鼠(体质量200~250g),随机分为对照组、癫痫组、蛭龙活血组及丙戊酸钠组,各12只,每24h重复腹腔注射给药1次,连续给药3次。每天记录大鼠癫痫发作级别,最后一次给药1d后处死所有大鼠,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠海马中TNF- α 及IL-1b的表达。结果 对照组无癫痫发作,蛭龙活血组、丙戊酸钠组癫痫发作程度均明显轻于癫痫组($P < 0.01$);癫痫组、蛭龙活血组、丙戊酸钠组中TNF- α 及IL-1b的表达水平均明显高于对照组($P < 0.05$),且癫痫组明显高于蛭龙活血组和丙戊酸钠组($P < 0.05$)。结论 蛭龙活血通瘀胶囊抑制癫痫发作的机制可能与其减少炎症因子表达有关。

关键词:蛭龙活血通瘀胶囊;癫痫;丙戊酸钠;大鼠;炎症因子;氯化锂;匹罗卡品

中图分类号:R285.5;R286

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)18-0011-03

*基金项目:泸州医学院自然科学基金[西南医大科[2016]4号]。

第一作者:吴英,女,硕士研究生,主治医师,主要从事临床心脑病科工作,(电子信箱)wuqiuxian789@163.com。

△通信作者:郑直,男,大学本科,副主任医师,主要从事临床骨科工作,(电子信箱)19378808@qq.com。

DADA可增加食管鳞癌放射治疗的敏感性。本研究结果显示,DADA联合放疗治疗大鼠,其肿瘤体积及质量均显著低于单用DADA及单用放疗($P < 0.05$)。

综上所述,DADA可抑制食管癌肿瘤细胞生长,促进凋亡,且抑制其迁移,与放疗联用可通过增加癌细胞中ROS水平而增加食管癌放疗的敏感性,从而更好地发挥其抗肿瘤活性。

参考文献:

- [1] 傅剑华,谭子辉. 食管癌外科治疗的现状与未来展望[J]. 中国肿瘤临床,2016,43(12):507-510.
- [2] Dong G, Qiang C, Feng J, et al. Diisopropylamine dichloroacetate enhances radiosensitization in esophageal squamous cell carcinoma by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species levels[J]. Oncotarget, 2016, 42(7):68170-68178.
- [3] 苏江卫,耿书军,张笑丹,等. 二氯乙酸二异丙胺在抗结核药物引发肝损伤治疗中的临床效果观察[J]. 中国医药,2015,10(3):359-362.
- [4] 林碧云,黎旭,张海涛. 肿瘤细胞能量代谢中潜在的治疗靶点[J]. 生命的化学,2015,35(1):45-50.
- [5] Anbalagan S, Biasoli D, Leszczynska KB, et al. In Vitro Radiosensitization of Esophageal Cancer Cells with the Aminopeptidase Inhibitor CHR-2797[J]. Radiation Research, 2015, 184(3):259-265.
- [6] Yang XX, Ma M, Sang MX, et al. Radiosensitization of esophageal carcinoma cells by knockdown of RNF2 expression[J]. International Journal of Oncology, 2016, 48(5):1985.
- [7] 闫晓欢,王婉,郑英如. 二氯乙酸盐通过促进Mcl-1降解诱导宫颈癌细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报,2016,38(7):693-696.
- [8] 乔友林. 食管癌流行病学研究的重要里程碑[J]. 中国肿瘤临床,2016,43(12):500-501.

- [9] Ding YQ, Qin Q, Yan Y, et al. Improved sensitization effect of sunitinib in cancer cells of the esophagus under hypoxic microenvironment[J]. Oncology Letters, 2016, 12(6):4671-4676.
- [10] 孔雁,高红梅. 食管癌放射治疗10年生存分析及不同治疗方式的疗效比较[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(1):56-61.
- [11] 李燕,程焱,徐斌,等. 食管癌患者术前营养风险评估与干预的效果评价[J]. 中华护理杂志,2015,50(2):166-170.
- [12] Su L, Zhang H, Yan C, et al. Superior anti-tumor efficacy of diisopropylamine dichloroacetate compared with dichloroacetate in a subcutaneous transplantation breast tumor model[J]. Oncotarget, 2016, 7(40):65721-65731.
- [13] 和劲光. 增敏药联合放疗在肿瘤治疗中的效果分析[J]. 中外医学研究,2016,14(12):57-58.
- [14] 朱国栋. European Urology: 丙酮酸脱氢酶激酶抑制剂二氯醋酸调节透明细胞型肾细胞癌线粒体代谢并抑制癌细胞增殖[J]. 现代泌尿外科杂志,2016,21(7):557.
- [15] Liu D, Wang F, Yue J, et al. Metabolism targeting therapy of dichloroacetate-loaded electrospun mats on colorectal cancer[J]. Drug Delivery, 2015, 22(1):136.
- [16] 康梅,权循凤. 食管癌放疗增敏剂的临床研究[J]. 国际肿瘤学杂志,2015,42(12):932-935.
- [17] Wu L, Peng C, Zou X. Tu1615 Diisopropylamine Dichloroacetate, a Novel Pyruvate Dehydrogenase Kinase Inhibitor, As a Potential Metabolic-Targeting Therapy for Cholangiocarcinoma[J]. Gastroenterology, 2016, 150(4):S1150.
- [18] Ruggieri V, Agriesti F, Scrima R, et al. Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell carcinoma: a metabolic perspective of treatment[J]. Oncotarget, 2015, 6(2):1217-1230.

(收稿日期:2018-01-10;修回日期:2018-05-02)

Effect of Zhilonghuoxue Tongyu Capsules on the Expression of Inflammatory Factors in Hippocampus of Epileptic Rats Induced by Lithium – Pilocarpine

Wu Ying¹, Zheng Zhi², Liu Li¹, Zhao Lizhi¹

(1. Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000; 2. Luzhou People's Hospital, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: Objective To investigate the effect of Zhilonghuoxue Tongyu Capsules on the behavior and the expression of TNF- α , IL-1b in hippocampus of epileptic rats induced by lithium – pilocarpine. **Methods** Totally 48 healthy adult male SD rats (weight 200 – 250 g) were randomly divided into the control group, epilepsy group, Zhilonghuoxue Tongyu Capsules group and sodium valproate group, 12 rats in each group. All the rats were given intraperitoneal injection of repeated dose once every 24 h and 3 times continuously. The seizure levels of rats were recorded every day, all rats were sacrificed one day after the last administration. The expression levels of TNF- α and IL-1b in hippocampus were detected by ELISA. **Results** There was no epileptic seizure in the control group, the seizure levels of Zhilonghuoxue Tongyu Capsules group and sodium valproate group were significantly lighter than that of the epilepsy group ($P < 0.01$). The expression levels of TNF- α and IL-1b in epilepsy group, Zhilonghuoxue Tongyu Capsules group and sodium valproate group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), and those in the epilepsy group were significantly higher than those in the Zhilonghuoxue Tongyu Capsules group and sodium valproate group ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of suppressing seizure by Zhilonghuoxue Tongyu Capsules may be related to its reduction of the expression of inflammatory factors.

Key words: Zhilonghuoxue Tongyu Capsules; epilepsy; sodium valproate; rats; inflammation factors; lithium; pilocarpine

癫痫(Epilepsy)是脑部神经元高度同步化异常放电所致的一组中枢神经系统功能失常综合征,发病率为5%~8%。70%~80%的患者服用抗癫痫药物后可控制发作,但约30%患者对抗癫痫药物耐药^[1]。中药制剂蛭龙活血通瘀胶囊在前期动物及临床实验研究中,已证实具有保护脑细胞、改善神经功能、减少神经细胞凋亡、改善血液流变性等作用^[2-4]。本研究通过观察氯化锂-匹罗卡品(毛果芸香碱)致病大鼠脑组织中海马区细胞因子的变化,探讨蛭龙活血通瘀胶囊抗癫痫的机制。

1 材料与方法

1.1 主要药物及试剂

蛭龙活血通瘀胶囊(西南医科大学附属中医医院制剂室,批号为川药Z20070528);丙戊酸钠片(湖南省湘中制药有限公司,国药准字H43020874,规格为每片0.2 g);盐酸匹罗卡品(上海迈瑞尔化学技术有限公司,批号为1538902CAS,规格为每瓶5 g);氯化锂(北京智杰方远科技有限公司,批号为B00199301,规格为每瓶100 g);硫酸阿托品(遂成药业股份有限公司,国药准字H41021257,规格为每瓶0.5 mg)。酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司)。

1.2 实验动物与分组

成年健康雄性SD大鼠48只,体质量200~250 g,由西南医科大学实验动物中心提供,动物合格证号为SYXK(川)2013-063,室温、普通饲料喂养。随机分为对照组、癫痫组、蛭龙活血组、丙戊酸钠组,各12只。

1.3 造模方法

氯化锂及匹罗卡品溶于生理盐水,质量浓度分别为42.39 g/L和10 g/L。癫痫模型大鼠首日腹腔注射

氯化锂(127 mg/kg),24 h后予以腹腔注射匹罗卡品(30 mg/kg),匹罗卡品注射前30 min,予硫酸阿托品(1 mg/kg)腹腔注射,以减轻匹罗卡品的不良反应。对照组:仅腹腔注射等量生理盐水。蛭龙活血组:蛭龙活血通瘀胶囊溶于生理盐水中,制备成100 g/L的母液,使用时按照0.8 mg/(kg·d)剂量腹腔注射给药,大鼠癫痫发作开始后2 h予以第1次给药,每24 h重复腹腔注射等量药物1次,连续给药3次。丙戊酸钠组:将200 mg丙戊酸钠加蒸馏水溶解至质量浓度为20 g/L^[5],大鼠癫痫发作开始后2 h第1次腹腔注射给药,每24 h重复腹腔注射等量药物1次,连续给药3次。根据Racine分级标准^[6],密切观察发作情况,造模成功标准为发作达IV~V级。若大鼠在造模过程中死亡,则按随机原则补足数量。

1.4 行为观察及指标检测方法

行为学观察:造模成功后使用视频监测录像记录存活癫痫大鼠行为,用苦味酸分别标记大鼠以区别。于癫痫发作开始至第3次治疗结束,观察大鼠癫痫发作的时间、形式、级别、持续时间及次数。

脑电图变化:将大鼠连接电极,置透明玻璃笼,笼子放置于屏蔽室,以避免噪声、静电及电磁信号的干扰,记录并分析脑电波形。

炎症因子:癫痫后72 h,用水合氯醛深度麻醉大鼠至对疼痛刺激无反应,0℃生理盐水50 mL心脏灌注至流出液清凉,断头处死。取大鼠海马组织加入蛋白裂解液,匀浆收集上清液,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素1b(IL-1b)检测严格按照ELISA试剂盒说明书步骤操作。

1.5 统计学处理

应用SPSS 17.0统计学软件分析。计量资料以中位

数 ± 四分位数间距表示,采用秩和检验,等级资料的统计分析采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表 1 和表 2。

表 1 各组大鼠癫痫发作程度比较(只, $n = 12$)

组别	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	5 级
对照组	12	0	0	0	0	0
癫痫组	0	0	0	1	5	6
蛭龙活血组	0	0	4	6	2	0
丙戊酸钠组	0	1	5	5	1	0

表 2 各组大鼠海马组织中炎症因子水平比较
($\bar{X} \pm s$, pg/mL, $n = 12$)

组别	TNF- α	IL-1b
对照组	679.86 $\pm$ 25.92	269.48 $\pm$ 31.61
癫痫组	759.73 $\pm$ 22.53 [▲]	425.23 $\pm$ 31.03 [▲]
蛭龙活血组	718.83 $\pm$ 23.01 ^{★●}	351.04 $\pm$ 28.46 ^{★●}
丙戊酸钠组	721.14 $\pm$ 22.87 ^{★●}	349.31 $\pm$ 29.03 ^{★●}

注:与对照组比较, [▲] $P < 0.01$, [★] $P < 0.05$;与癫痫组比较, [●] $P < 0.05$ 。

3 讨论

目前,越来越多的证据支持炎症和免疫反应在癫痫产生的病理生理机制中起重要作用,且癫痫持续状态所致脑损伤引起的炎症反应应答与癫痫复发有密切关系^[7-9]。炎症反应在脑组织癫痫病灶形成中的作用,已在颞叶癫痫耐药和灰质发育异常有关的癫痫患者中体现^[10-14]。动物研究证实,炎症介质包括细胞因子、补体因子等参与癫痫发作,且干预这些分子或其相应的受体可减轻癫痫发作的频率和程度^[15]。Gomes 等^[16]研究发现,长春西汀和卡马西平的抗癫痫机制可能与减少大鼠海马组织内 IL-1b 和 TNF- α 表达有关。

本研究结果发现,蛭龙活血通瘀胶囊预处理癫痫大鼠可减少癫痫发作次数和发作程度,对控制癫痫发作有较好的疗效。肖倩等^[17]研究发现,炎症因子 IL-1b 和 TNF- α 水平在癫痫发作后 6 h 内快速升高。本研究中 ELISA 检测结果也显示,蛭龙活血组大鼠海马组织中 TNF- α 和 IL-1b 表达量较癫痫组明显下降。

综上所述,蛭龙活血通瘀胶囊可能通过抑制炎症因子 TNF- α 和 IL-1b 的产生,抑制神经元变性、兴奋性增高及血脑屏障破坏,从而控制癫痫发作。

参考文献:

- [1] Perucca E, French J, Bialer M. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances[J]. Lancet Neurol, 2007, 6(9): 793-804.
- [2] 白雪, 杨思进, 江云东, 等. 蛭龙活血通瘀胶囊对老年高血

压患者踝臂指数及高敏 C 反应蛋白、同型半胱氨酸的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(1): 97-99.

- [3] 吴英, 郑直, 白雪, 等. 蛭龙活血通瘀胶囊对局灶性脑缺血大鼠脑组织促血管生成素-1 及 Tie-2 表达的影响[J]. 中国药业, 2014, 23(11): 31-33.
- [4] 杨思进, 左英, 白雪, 等. 蛭龙活血通瘀胶囊对大鼠脑缺血再灌注炎症细胞因子的影响[J]. 西部医学, 2009, 21(11): 1847-1849.
- [5] 邓元江, 刘卫英, 梁伟雄, 等. 针刺对实验性癫痫大鼠癫痫发作行为与脑电图的影响[J]. 四川中医, 2006, 24(4): 16-18.
- [6] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation cortical areas[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1975, 38(10): 1-12.
- [7] Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence[J]. Epilepsia, 2005, 46(11): 1724-1743.
- [8] Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy[J]. Lancet Neurol, 2002, 1(3): 173-181.
- [9] Bartfai T, Sanchezalavez M, Andelljonsson S, et al. Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever and neurotrauma[J]. Ann NY Acad Sci, 2007, 1113(1): 173-177.
- [10] Sheng JG, Boop FA, Mrak RE, et al. Increased neuronal β -amyloid precursor protein expression in human temporal lobe epilepsy: association with interleukin-1 α immunoreactivity[J]. J Neurochem, 1994, 63(5): 1872-1879.
- [11] Crespel A, Coubes P, Rousset MC, et al. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis[J]. Brain Res, 2002, 952(2): 159-169.
- [12] Ravizza T, Gagliardi B, Noe F, et al. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy[J]. Neurobiol Dis, 2008, 29(1): 142-160.
- [13] Ravizza T, Boer K, Redeker S, et al. The IL-1 β system in epilepsy-associated malformations of cortical development[J]. Neurobiol Dis, 2006, 24(1): 128-143.
- [14] Boer K, Jansen F, Nellist M, et al. Inflammatory processes in cortical tubers and subependymal giant cell tumors of tuberous sclerosis complex[J]. Epilepsy Res, 2008, 78(1): 7-21.
- [15] Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy[J]. Brain Behav Immun, 2008, 22(6): 797-803.
- [16] Gomes CD, Buijs RM, Sitges M. The anti-seizure drugs vinpocetine and carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1 β and TNF- α expression in rat hippocampus[J]. J Neurochem, 2014, 130(6): 770-779.
- [17] 肖倩, 赵永波. 癫痫与炎症因子[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2011, 18(1): 48-50.

(收稿日期: 2018-01-10; 修回日期: 2018-03-29)