

·方药研究·

愈痫灵方及其加味方对戊四氮致痫鼠海马组织中 TLR4、MyD88 表达的影响

钟乔青¹, 石学慧², 王净净^{3*}, 李智雄³, 杨 晖², 曹 夏¹, 张尚波¹, 陶 琳¹, 刘宇哲¹, 吴彬才¹

(1.湖南中医药大学研究生院, 湖南 长沙 410208; 2.湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005;
3.湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的 探讨愈痫灵方及其加味方对痫性大鼠海马组织中 TOLL 样受体 4 (toll-like receptor4, TLR4) 与髓样分化蛋白 D88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 的影响。方法 取健康雄性 SD 大鼠 130 只, 从中随机选取 10 只作为正常对照组; 选取 10 只作为假手术组, 腹腔注射生理盐水; 其余大鼠用戊四氮造模, 将符合模型标准的大鼠随机分为模型组、丙戊酸钠组、愈痫灵方组、愈痫灵加银花组, 每组 10 只。灌胃后断头取脑, 采用逆转录荧光实时定量聚合酶链反应 (reverse transcription PCR, RT-PCR) 检测各组大鼠海马中 TLR4 mRNA 的表达, 免疫组化法检测各组大鼠海马中 CA3 区 MyD88 蛋白的表达。结果 TLR4 mRNA 和 MyD88 表达, 模型组与正常对照组、假手术组比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$); 愈痫灵方组、愈痫灵加银花组、丙戊酸钠组分别与模型组比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$); 愈痫灵方组和愈痫灵加银花组分别与丙戊酸钠组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 海马组织中 TLR4 mRNA、MyD88 表达的增多在癫痫发生发展过程中具有很重要的作用, 愈痫灵方可能通过下调致痫鼠海马中 TLR4 mRNA、MyD88 的表达来改善痫性大鼠海马损伤程度。

[关键词] 癫痫; 戊四氮致痫鼠; 愈痫灵方; TLR4; MyD88; 金银花

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.06.009

Effects of Yuxianling and its Modified Decoction on the Expressions of TLR4 and MyD88 in the PTZ-induced Epileptic Rats

ZHONG Qiaoqing¹, SHI Xuehui², WANG Jingjing^{3*}, LI Zhixiong³, YANG Hui², CAO Xia¹, ZHANG Shangbo¹,
TAO Lin¹, LIU Yuzhe¹, WU Bincai¹

(1. Graduate School of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China;

3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To explore the influence of Yuxianling and its modified decoction on the expressions of Toll-like receptor 4 (TLR-4) and the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) in hippocampus of epileptic rats. **Methods** The 130 male healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group ($n=10$), sham-operation group ($n=10$), pentylenetetrazole (PTZ) group ($n=110$). The sham operation group were injected with equivalent saline, and the rats of PTZ group were intraperitoneal injected with pentylenetetrazole. The standard epileptic rats were randomly divided into model group, valproate group, Yuxianling decoction (YXL) group, modified Yuxianling decoction (MYXL) group, 10 rats in each group. The expression of TLR4 mRNA protein in rat hippocampus were detected by RT-PCR, and the expression of MyD88 protein was tested by immunohistochemical method. **Results** The expression of TLR4 mRNA and MyD88 protein in model group was significantly higher than control group and sham-operation group ($P < 0.01$), the expressions in YXL, MYXL and valproate groups comparing with the model group were statistically significant ($P < 0.01$), the expressions in YXL and MYXL groups comparing with the valproate group were statistically significant. There was no significant differences between control group and sham-operation group ($P > 0.05$); the expression of TLR4 mRNA and MyD88 protein in YXL and YXLH was much weaker than that in

[收稿日期] 2016-03-07

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(14JJ2111)。

[作者简介] 钟乔青, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治癫痫。

[通讯作者] * 王净净, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: wangjingjing1954@163.com。

valproate group ($P < 0.05$). **Conclusion** The increased expression of TLR4 mRNA and MyD88 protein in epileptic rats hippocampus may play an promotion role on the development of the hippocampus injury. Yuxianling decoction can down regulate the expression of TLR4 mRNA and MyD88 protein and lessen the pathologic changes of hippocampus.

[**Keywords**] epilepsy; PTZ-induced epileptic rats; Yuxianling decoction; Toll-like receptor 4; MyD88; honeysuckle

癫痫是神经系统常见疾病,是由神经细胞异常高度同步放电所致痫性发作的一组慢性临床综合征。癫痫发病机制非常复杂,有关神经免疫调节网络失衡亦是其重要因素。现代研究发现癫痫动物模型及患者脑组织中小胶质细胞、星形胶质细胞过度增生活化,并且炎性因子表达升高,表明癫痫的发生过程中脑内存在炎症反应,这提示癫痫发病可能与炎症反应有关^[1]。TOLL样受体4(toll-like receptor4,TLR4)是构架固有免疫与适应性免疫的重要枢纽,主要分布于中枢神经系统中的星形胶质细胞、小胶质细胞和神经细胞。脂多糖与内源性配体高迁移率族蛋白1(high-mobility group box-1, HMGB1)激活TLR4后,使得核转录因子- κ B(nuclear factor κ B,NF- κ B)活化,导致多种炎性因子(例如白细胞介素-1/肿瘤坏死因子- α)的产生和释放^[2]。TLR4信号通路在癫痫发生发展中的作用,为癫痫发病机制的研究提供了新的方向。

癫痫中医学称为“痫证”,是脑病中常见的病症,其发病特点多与毒邪、伏邪类似。认为癫痫的发生多与痰浊、瘀血内生之毒有关,内生之毒西医认为主要是组织细胞功能障碍,产生毒性氧自由基、兴奋性神经毒、过敏介质、炎性介质、钙离子超载等,本研究利用戊四氮点燃癫痫模型,用RT-PCR检测各组大鼠海马组织中TLR4 mRNA,用免疫组化法检测各组大鼠海马CA3区MyD88的表达,以此探讨TLR4在癫痫发病机制中的作用,解释毒邪致痫学说的微观物质基础,以及中药的干预作用。

1 材料与方

1.1 实验动物

健康雄性SD大鼠130只,体重(200±20)g,鼠龄6~8周,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号:SCXK(湘)2013-0004。全部动物于湖南中医药大学实验动物中心实验室饲养,饲养温度18~20℃,相对湿度为40%~60%,自由饮水和饮食,12/12h昼夜循环照明。

1.2 实验药物

愈痫灵方(由川芎、牡丹皮、地龙、红花、石菖蒲、

冰片等13味中药组成),愈痫灵方加银花(愈痫灵方加金银花),均购自湖南中医药大学门诊部中药房;丙戊酸钠片(VPA),湖南省湘中制药有限公司,0.2g/片,批号:120402。

1.3 主要试剂

戊四氮(PTZ)购于美国sigma公司;大鼠MyD88免疫组化一抗试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,BA2321),PV-9000 Kir试剂(北京中杉公司),DAB显色试剂盒(武汉博士德);TLR4总RNA提取试剂盒(Invitrogen公司),逆转录试剂盒(promegaA3500公司),DNA Marker(Fermentas公司),PCR mix(vazyme公司),引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.4 主要仪器

UTP313-4型电子天平(上海花潮电器有限公司);DNP-9162型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);Shandon325型石蜡切片机(英国Shandon公司);Motic B5显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司);LEICA DM LB2型双目显微镜(德国Leica公司);Sigma3K18冰冻变速离心机(Sigma公司);7500荧光定量PCR仪(Applied Biosystems公司);DNA热循环仪(480型)(美国Perkin Elmer公司);DYCP-31C型电泳仪(北京六一仪器);MIAS医学图像分析系统(北航公司)。

1.5 模型制备

癫痫模型制作参考文献^[3]方法,采用戊四氮(pentylene tetrazole,PTZ)腹腔注射造模,每日同一时间以新鲜超纯水配制浓度为1.75%PTZ溶液,腹腔注射亚惊厥量(35mg/kg),诱发大鼠全身强直-阵挛发作,并在注射PTZ1h内观察动物行为变化,连续处理28d。按照Ono J分级标准^[4]将癫痫大鼠分为7级进行评判。凡连续5d惊厥程度达到4级以上的动物,停药1周,再次用相同剂量PTZ测试,如仍保持在4级以上惊厥发作的大鼠视为点燃成功大鼠。

1.6 实验分组及给药

将健康雄性SD大鼠130只,按随机数字表法从中选取10只作为正常对照组;选取10只作为假

手术组,腹腔注射生理盐水;其余 110 只用戊四氮(PTZ)造模。造模成功率为 61%,在符合模型标准的大鼠中随机选取 40 只,再随机分为 4 组,愈痫灵方组、愈痫灵方加银花组、丙戊酸钠组和模型组,每组 10 只;加正常对照组 10 只、假手术组 10 只,总计 6 组,共 60 只。

采取灌胃法给药。药物剂量换算方法参照贺石林“剂量-体表面积”换算法^[5]:以 300 g 大鼠、60 kg 成人作为用药换算的体质量参考标准,愈痫灵方以成人每天一剂、丙戊酸钠以成人每天 1.2 g 的摄入量,即愈痫灵方、愈痫灵方加银花、丙戊酸钠用药剂量分别为 3.24 g/(kg·d),3.30 g/(kg·d),31.9 mg/(kg·d),中药均为水煎。模型组、假手术组和正常对照组每天给予同等体积蒸馏水(3 mL/d)灌胃,均为每天 1 次,共 28 d。

1.7 脑组织标本的处理

灌胃 28 d 后,各组大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)进行麻醉,迅速断头取脑,在冰盘上分离海马,左侧用 4%多聚甲醛固定,包埋后切片(5 μm)用于免疫组化检测;右侧用液氮保存,用于 RT-PCR 检测。

1.8 RT-PCR 检测大鼠海马 TLR4 mRNA

称取海马组织制作匀浆,提取各组总 RNA,按试剂盒说明逆转录成 cDNA。参照 Real-time PCR mix 试剂说明扩增逆转录产物。 β 肌动蛋白(β -actin)为内参照,上游引物为 5'-AGTGGCAGCTGGA CATCCG-3',下游引物为 5'-TGGCTCTAACAGTC-CGCCTAG-3',扩增片段 166 bp;TLR-4 上游引物为 5'-TGGCATCATCTTCATTGTCC-3',下游引物为 5'-CAGAGCATTGTCCTCCCACT-3',扩增片段 115 bp。扩增反应程序:94 °C 4 min;94 °C 40 s,60 °C 30 s,40 个循环,溶解曲线分析特异性。扩增产物取 1 μL,以 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 纯度,用 Bio-Rad 化学发光凝胶成像系统显影分析。利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量比较 TLR-4 基因的表达差异:CT=基本循环数, ΔCT 值=基本循环与内参循环数的差值, $\Delta\Delta CT$ =最低样本 ΔCT 值与其它样本 ΔCT 值的差。

1.9 免疫组织化学法检测海马中 MyD88 的表达

各组大鼠海马切片常规脱蜡,用正常山羊血清封闭,滴加稀释 1:100 的一抗 4 °C 孵育过夜,滴加生物素标记的二抗,DAB 显色,苏木素复染,脱水,透

明,封片。每只大鼠取 1 张切片,每张切片随机取 5 个高倍视野镜下($\times 400$)观察。细胞浆或细胞核内出现棕黄色颗粒状物为阳性表达,用 image-pro plus 图像软件分析,测定阳性部位的平均吸光度,表示阳性部位的蛋白表达水平,计算 MyD88 核阳性细胞数。

1.10 统计学方法

计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。多组间均数比较用方差分析,方差分析前,先进行正态性、方差齐性检验,满足条件者用 F 检验, F 检验有统计学意义者,再进行两两比较;两两比较方差齐者用 SNK 法,方差不齐者用 Tampane's T_2 法。当资料不符合正态分布时,采用多个独立样本比较的秩和检验。所有数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,结果以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马组织中 TLR4 mRNA 表达的比较

正常对照组与假手术组相比差异无统计学意义($P>0.05$),提示假手术组处理并未致使大鼠产生炎症反应。与正常对照组和假手术组比较,模型组 TLR4 mRNA 的表达上升($P<0.01$),说明在 PTZ 致痫过程中 SD 大鼠脑内存在炎症反应;愈痫灵方组、愈痫灵方加银花组、丙戊酸钠组分别与模型组比较,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),各干预组的处理均对大鼠脑内炎症反应有影响;愈痫灵方组与愈痫灵方加银花组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示愈痫灵方加银花组与愈痫灵方对于致痫大鼠脑内炎症反应的影响并无差异;愈痫灵方组和愈痫灵方加银花组分别与丙戊酸钠组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),由此可见愈痫灵方能够减少 TLR4 mRNA 的表达,并能够减轻致痫鼠脑内炎症反应。见表 1。

2.2 各组大鼠海马 CA3 区 MyD88 蛋白的表达比较

与正常对照组比较,假手术组海马中 MyD88 蛋白的变化无统计学意义($P>0.05$),提示假手术处理并未激活 MyD88 依赖途径。与正常对照组、假手术组比较,模型组海马中 MyD88 的表达明显升高($P<0.01$),提示致痫鼠体内 MyD88 依赖途径被激活。愈痫灵方组、愈痫灵方加银花组和丙戊酸钠组表达均低于模型组($P<0.01$, $P<0.05$),说明三者均对 MyD88 蛋白的

表1 各组大鼠海马神经元中TLR4 mRNA表达量

组别	n	TLR4 mRNA (copies/ μ L, $\bar{x}\pm s$)
正常对照组	10	19.44 \pm 0.29
假手术组	10	18.95 \pm 0.62
模型组	10	26.84 \pm 0.54**
丙戊酸钠组	10	23.66 \pm 0.35***▲▲
愈痫灵方组	10	21.58 \pm 0.36***▲▲*
愈痫灵加银花组	10	20.84 \pm 0.59***▲▲*
F值		34.42

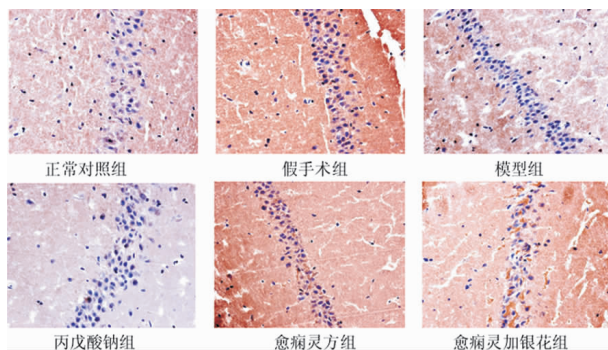
注:与正常组、假手术组比,★★ P <0.01;与模型组比,▲▲ P <0.01;与丙戊酸钠组比,* P <0.05。

表达有一定程度的抑制作用。与丙戊酸钠组比较,愈痫灵方组和愈痫灵方加银花组有明显的统计学意义(P <0.01),说明愈痫灵方对此通路的影响优于丙戊酸钠组。愈痫灵方组、愈痫灵方加银花组之间无统计学意义(P >0.05)。见表2、图1。

表2 各组大鼠海马神经元CA3区MyD88蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	平均光密度	阳性核细胞数
正常对照组	10	0.26 \pm 0.27	167.80 \pm 6.66
假手术组	10	0.23 \pm 0.12	171.60 \pm 4.33
模型组	10	0.62 \pm 0.26**	253.60 \pm 6.95**
丙戊酸钠组	10	0.52 \pm 0.11***▲	237.75 \pm 7.95***▲
愈痫灵方组	10	0.36 \pm 0.13***▲▲*	201.00 \pm 6.91***▲▲*
愈痫灵加银花组	10	0.38 \pm 0.12***▲▲*	204.00 \pm 7.43***▲▲*
F值		33.67	80.77

注:与正常组、假手术组比,★★ P <0.01,★ P <0.05;与模型组比,▲▲ P <0.01,▲ P <0.05;与丙戊酸钠组比,* P <0.01。

图1 各组大鼠海马CA3区免疫组化光镜图($\times 400$)

3 讨论

现代研究显示癫痫反复发作易导致脑组织发生细胞代谢紊乱、离子跨膜障碍等病理改变,甚至神经元的死亡^[6]。大脑内的免疫炎症反应参与癫痫发作引起的脑损伤过程,癫痫发作后,脑内发生炎症反应,胶质细胞活化增生,释放大量的炎症因子,使得

神经元的兴奋性增强,导致神经元损伤、海马硬化等脑组织的病理改变,同时也增加了血脑屏障的通透性^[7-8]。

免疫细胞产生炎性介质,引起机体固有免疫和适应性免疫的激活。小胶质细胞是脑内主要的免疫细胞,激活后会释放具有神经毒性的肿瘤坏死因子、一氧化氮、白介素等炎症因子^[9],致使神经细胞损伤。TLR4是TLRs中的一个亚型,是一种重要的模式识别受体,它可以识别多种配体,募集下游接头蛋白,介导相应的信号传导,引发炎症反应,介导炎症因子的释放。李偲俊等^[10]在Sombati癫痫细胞模型上发现TLR4 mRNA表达增加,且随着时间的延长而增强。刘希金等^[11]发现颞叶癫痫大鼠及患者脑组织中的TLR4蛋白过量表达,推测其表达的上升与颞叶癫痫的发病及其反复发作有关。实验证明TLR4介导的MyD88信号转导途径参与了神经系统的炎症反应,引起TNF- α 、IL- β 和NO含量的升高^[12]。而在某种程度上干预TLR4信号通路能预防癫痫发作^[13]。

裴林^[14]认为痼病与毒邪内伏,蕴郁不解,损伤脑神有关。毒邪又有外来邪气与内生之毒的区别。现代医学研究表明外来毒邪包括各种病原微生物及其毒素、各种理化因素导致的中毒等,而内生之毒主要是组织细胞功能障碍,产生毒性氧自由基、兴奋性神经毒,过敏介质、炎性介质、钙离子超载等。这些微观领域的研究为中医毒邪学说与西医生理病理基础的结合提供了契合点。导师认为癫痫病理因素多以痰浊、瘀血为主,而痰瘀既为病理产物又可为发病因素,痰瘀交结不解,蕴郁为毒,损伤脑神,致使痼病抽搐,反复迁延难愈。由此提出毒邪致病学说,治疗内生之毒以控制癫痫发作。愈痫灵方为导师王净净教授经验方,已逾20年的临床应用,其源于经典名方“礞石滚痰丸”,奏活血祛瘀、化痰通络、止痉定痫之功效。动物实验证明其具有抗癫痫及改善癫痫认知功能障碍的作用^[15],并可以减少痼性大鼠海马组织中炎症因子的表达^[16]。而在长期的临床实践中发现,以愈痫灵方加入金银花来治疗病毒性脑炎继发癫痫患者,能更好地改善患者痼性发作^[17],而本实验未证实其优于原方,原方所含黄芩具有清热燥湿之功,推测愈痫灵方本身具有清热解毒之效,而在临床使用中加入银花可助其解毒熄风止痉,具体作用机制还待进一步研究探讨。

本实验利用PTZ制作大鼠癫痫模型,研究TLR4介导的MyD88依赖途径在癫痫发病机制中的作用,以研究中医毒邪致痫的微观物质基础。运用RT-PCR和免疫组化法分别检测海马神经元中的TLR4 mRNA和MyD88的表达。结果显示与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织中TLR4 mRNA含量以及海马CA3区MyD88蛋白表达均明显增加,这提示大鼠癫痫发作后TLR4介导的MyD88依赖途径被激活,并对海马神经元的损伤具有重要的作用,可以推测癫痫发病中大鼠脑内发生了炎症反应,而中药的干预能够下调TLR4 mRNA和MyD88的表达,说明其能够减轻脑内的炎症反应程度,更深入的研究以TLR4介导的病性发作过程中神经系统炎症反应,为中医毒邪致痫学说提供理论和实验支持,寻求更有效的中药,为治疗癫痫的研究提供新的方向与治疗措施。

参考文献:

- [1] Omran A, Peng J, Zhang C, et al. Interleukin-1 β and microRNA-46 a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2012, 53: 1 215-1 224.
- [2] Gan N, Yang, L, Omran A, et al. Myeloid-related protein 8, an endogenous ligand of Toll-like receptor 4, is involved in epileptogenesis of mesial temporal lobe epilepsy via activation of the nuclear factor-kappaB pathway in astrocytes [J]. *Mol Neurobiol*, 2014,49:337-351.
- [3] 王 丽, Jono and walson.PD.大鼠戊四氮(PTZ)点燃模型的建立[J].*药理学学报*,1993,28(7):486-488.
- [4] Ono J, Vieth RF, Walson PD. Electrocorticographical observation of seizures induced by pentylene-tetrazol injection in rats [J]. *Functional neurol*, 1990, 5:345.
- [5] 贺石林,王 键,王净净.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖南科学技术出版社,2001:48-49.
- [6] 韩雁冰,王学峰.癫痫持续状态研究热点与新问题[J].*中国现代神经疾病杂志*,2009,9(4):319-322.
- [7] Vezzani A. and A. Friedman, Brain inflammation as a biomarker in epilepsy[J]. *Biomark Med*, 2011,5(5):607-614.
- [8] Vezzani A and Viviani B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability[J]. *Neuropharmacology*,2015,96:70-82.
- [9] Minghetti L. Role of inflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Curr Opi Neurol*, 2005,18(3):315-321.
- [10] David Y, Cacheaux LP, Ivens S, et al. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis[J]. *Neurosci*, 2009, 29(34):10 588-10 599.
- [11] 刘希金,殷亚萍,杨志勇,等.TLR4蛋白在颞叶癫痫大鼠及患者脑组织中表达的改变及意义[J].*中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2013,20(3):192-196.
- [12] 张国霞,周爱玲,张贵萍,等.大鼠海马神经元TLR4介导的MyD88依赖途径在神经炎症中的作用 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2013,29(1):42-46.
- [13] 李德俊,吴 原,黄金山,等.Sombati细胞模型中Toll样受体4的表达及意义[J].*中国病理生理杂志*,2014,30(1):175-179.
- [14] 裴 林. 毒邪可伏蕴为痫 [J]. *北京中医药大学学报*,2009,32(3): 149-151,155.
- [15] 李智雄,尹 焯,王净净,等.愈痫灵颗粒对戊四氮致痫大鼠海马神经生长因子与认知功能的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2010, 16(6):184-187.
- [16] 张尚波,石学慧,王净净,等.愈痫灵方对PTZ致痫大鼠脑组织海马CA3区TLR4、NF-kB P65、TNF- α 表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2016,36(1):33-40.
- [17] 张尚波,王净净,钟金桥,等.毒邪内蕴型癫痫中医治验二则——小儿病毒性脑炎继发性癫痫[J].*数字中医药与诊断*,2014,2(2): 83-85.

(本文编辑 杨 瑛)