

· 针灸推拿 ·

穴位埋药线对难治性癫痫大鼠癫痫样波的 发放及大脑海马和颞叶皮质多药耐药 相关蛋白 MRP₁、P-gp 表达的影响

宋祖丽¹, 李振光², 王净净^{3*}, 李智雄³, 谢静涛³, 左亚杰⁴, 张 曦³, 肖 瑶³(1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005; 2. 湖南省脑科医院, 湖南 长沙 410007;
3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 4. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

〔摘要〕 **目的** 探讨穴位埋药线对难治性癫痫大鼠癫痫样波的发放及大脑海马和皮质中多药耐药相关蛋白 MRP₁、P-gp 表达的影响。**方法** (1)造模: 大鼠海马区注射红藻氨酸(KA), 经过点燃和再次亚惊厥剂量点燃造模, 且脑电图检测有癫痫样波发放者筛选为造模成功耐药难治性癫痫模型鼠。(2)分组与处理: 普通线组(PTX组)与药线组(YX组), 先埋一侧穴位, 间隔15 d后埋对侧穴位。拉莫三嗪组(LTG组)按照人用拉莫三嗪剂量换算灌胃大鼠, 每日2次; 空白对照组(Normal组)和模型组(Model组)给予灌胃同体积的蒸馏水, 均灌胃30 d。(3)采用VEEG-1518K型数字化视频脑电监测分析系统检测脑波基本节律的波幅与频率变化。(4)标本处理与检测: 采用免疫组织化学技术, 检测多药耐药相关蛋白 MRP₁、P-gp 在海马与颞叶皮层不同部位的表达。**结果** 各组治疗前比较差异无统计学意义($P>0.05$); 各组治疗后, YX组、LTG组分别与Model组、PTX组比较差异有统计学意义($P<0.05$), YX组与LTG组比较差异无统计学意义($P>0.05$); 与Model组相比, LTG组和YX组干预后能降低致痫鼠 EEG 痫波放电持续时间与发放频率以及海马区和颞叶皮质区多药耐药蛋白 MRP₁、P-gp 的表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$); YX组与PTG组比较差异无统计学意义($P<0.05$)。**结论** (1)埋药线使KA致痫鼠 EEG 痫波放电持续时间缩短, 发放频率减少。(2)KA点燃难治性癫痫模型大鼠大脑海马区存在多药耐药蛋白 MRP₁、P-gp 的表达较皮质区明显升高。(3)埋药线逆转与降低致痫鼠海马区多药耐药蛋白 MRP₁、P-gp 的表达水平, 可能是其抗癫痫生物学作用机制之一。

〔关键词〕 穴位埋药线; 难治性癫痫; 癫痫样波; MRP₁; P-gp

〔中图分类号〕R245.9*1

〔文献标识码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.10.020

Effects of Acupoint Embedding Therapy on Epileptiform Wave of Intractable Epilepsy Rats and the MRP₁, P-gp Protein in Hippocampus and Temporal Cortex

SONG Zuli¹, LI Zhengguang², WANG Jingjing^{3*}, LI Zhixiong³, XIE Jingtao³, ZUO Yajie⁴, ZHANG Xi¹, XIAO Yao³

(1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China; 2. The Brain Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To discussion the acupoint embedding therapy on epileptiform wave of intractable epilepsy rats and the multidrug resistance protein 1 (MRP₁), P-gp protein in hippocampus and temporal cortex. **Methods** (1) Making models: The rats were injected with kainic acid (KA) in hippocampus region, which kinded and rekinded of sub-convulsant dose

〔收稿日期〕2016-04-04

〔基金项目〕湖南省教育厅重点科研课题(11A084); 湖南省科学技术厅科技计划一般项目(2012SK3132)。

〔作者简介〕宋祖丽, 女, 硕士, 研究方向: 针灸对神经系统疾病防治的研究。

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

to making model. The rats with EEG epileptiform wave are screened as successful modeling refractory epilepsy rats. (2) Grouping and treatment: Buried ordinary wire line group (PTX group) and the drug line group (YX group) were firstly buried side points, spaced 15 days buried in the contralateral acupoints. Lamotrigine (LTG) group rats were fed 2 times a day. The model group were administered the same volume gavage of distilled water for 30 days. (3) The changes of EEG basic rhythm amplitude and frequency were detected by using VEEG-1518K type digital video EEG monitoring and analysis system. (4) Selecting and detecting specimens: The expressions of multi-resistant related protein MRP₁ and P-gp in the hippocampus and temporal lobe cortex were detected. **Results** The expressions of each group before treatment had no significant difference ($P>0.05$). After treatment, The YX group and LTG group were compared with Model group and PTX group, respectively, the difference was statistically significant ($P<0.05$), while YX group and LTG group had no significant difference ($P>0.05$). Compared with model group, LTG group and YX group can reduce epileptiform EEG wave discharge duration and frequency of issuance in epileptic rats and the multidrug resistance protein MRP₁, P-gp expression level in hippocampus and temporal cortex ($P<0.05$ or $P<0.01$), the difference between the YX group and PTX group was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** (1) Embedding medicine can short the EEG wave discharge duration time and reduce the frequency of epileptic rats induced by KA seizures. (2) The expression of multidrug resistance related protein MRP₁ and P-gp in hippocampus were obviously higher than that in cortical areas of KA induced epileptic rats. (3) The reversal and reduction of the expression levels of multidrug resistance gene hippocampus of epileptic rats may be one of the mechanisms of embedding medicine on anti-epilepsy.

[**Keywords**] acupoint embedding; refractory epilepsy; epilepsy wave; MRP₁; P-gp

抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs)是治疗癫痫的主要方法,但约 1/3 的患者经多种治疗无效,成为药物难治性癫痫(drug resistant epilepsy, DRE)又称难治性癫痫(refractory epilepsy, RE)^[1]。2010 年国际抗癫痫联盟(international league against epilepsy, ILAE)与相关专家达成共识,提出 DRE 新定义^[2]:对两种能够耐受、选择恰当的抗癫痫药物(单药或联合)治疗,仍未能达到持续无发作称作 DRE。研究发现 RE 患者脑内特别是血脑屏障部位存在多药转运体和药物靶酶的高表达^[3],可能参与了 RE 的耐药。多药转运体(multidrug transporters, MDTs)是一类 ATP 结合蛋白质超家族,能够识别多种作用机制不同的抗癫痫药物,能够主动将药物泵出到血脑屏障以外。此机制中对多药耐药基因(MDR₁)的研究较为深入^[4],其转录的多药耐药相关蛋白(MRP₁)与 P-糖蛋白(P-gp)本质上是一种药物转运体,血脑屏障上 MDR₁、MRP₁ 及 P-gp 的过度表达,可将进入脑组织内的药物泵出,致使脑细胞外液和或神经细胞内药物量不足。近年来,在 RE 患者外周血检测发现 MRP₁ 过度表达^[5],有望成为早期诊断癫痫药物敏感性的指标,亦提示 MRP₁ 与 RE 耐药关系密切。为探讨 RE 患者脑内 MRP₁、P-gp 表达的临床意义,我们进行了难治性癫痫大鼠的相关研究。前期实验研究显

示埋药线抗癫痫效果显著^[6-7],为进一步探讨埋药线对大脑海马及颞叶皮质内多药耐药蛋白 MRP₁、P-gp 表达的影响,本研究将其可能作用机制报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供),许可证:SCXK(湘)-2011-003, SPF 级,鼠龄 6~8 周,体质量(200±10) g,共 120 只。室温 18~20 °C,湿度为 65%~70%,自由进食饮水。

1.2 药品及试剂

药线制备^[8]:由自拟愈痫灵方一剂,装入 500 mL 的广口瓶内,加入 75% 医用酒精 300 mL,盖上瓶盖浸泡 20 d,过滤,取醇浸液,置于另一 250 mL 广口瓶中,将 0/0 号的医用羊肠线剪成约 1 cm 长,浸泡于醇浸液中,浸泡 30 d,制成药线备用。拉莫三嗪片(三金集团湖南三金制药有限责任公司,批号:120805),丙戊酸钠片(湖南省湘中制药有限公司,批号:120402),卡马西平片(江苏鹏鹞药业有限公司,批号:110704),大鼠 P-gp 抗体试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),大鼠多药耐药相关蛋白 1 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),大

鼠单核细胞趋化蛋白-1 抗体试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器

脑立体定位仪(美国 Stoelting 公司, 型号: 51600), JY3002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), MIAS 医学图像分析系统(北航公司), S2-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂), Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司), DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司), Motic B5 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司), Haier 医用微波炉(Haier 集团), LEICA DM LB2 型双目显微镜(德国 LEICA 公司), HHS-2 电子恒温不锈钢水浴锅(上海南阳仪器有限公司), VEEG-1518K 型数字化视频脑电监测分析系统(日本光电公司产)。

1.4 模型制备

红藻氨酸(kainic acid, KA)点燃慢性难治性癫痫模型的制作:参照预实验与文献[8]方法,包括2次点燃阶段(首次点燃剂量浓度为的 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 红藻氨酸 $1.0 \mu\text{L}$;亚惊厥剂量为 $0.5 \mu\text{L}$),首次点燃后以卡马西平(参照文献[9]“剂量-体表面积”的换算方法给药), $D2=D1 \times R2/R1$ (查表得 $R1=7.04$, $R2=346.68$),其中以 60 kg 成年人、 200 g 大鼠作为用药换算时体质量参照标准。评价癫痫动物发作行为最常用标准为 Racine 分级法^[10],标准如下:前驱症状为凝视、点头和湿狗样抖动;0级:正常行为;I级:面部肌肉痉挛表现为咀嚼运动、眨眼、动须等湿狗样颤动;II级:颈部肌肉痉挛表现为点头运动;III级:一侧前肢阵挛;IV级:站立伴双前肢阵挛;V级:在四级的基础上身体向后倒下失去平衡,四肢抽动。癫痫持续状态(status epilepticus, SE)是癫痫连续发作之间意识未完全恢复又频繁再发,或发作持续 30 min 以上不自行停止。

1.5 分组和处理方法

将符合要求的SD大鼠120只按随机数字表法分为:空白对照组(Normal组)15只与造模组105只,造模组经模型制作成功后(预实验模型成功率60%)再随机分为模型组(Model组)、普通线组(PTX组)、药线组(YX组)、拉莫三嗪组(LTG组)共计5组,每组14~16只(详见结果)。LTG组给予灌胃拉莫三嗪[以成人剂量 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 换算,大鼠剂量

$0.102 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$],2次/d,共30 d。Nodel组和Model组给予灌胃同等体积($2 \text{ mL}/\text{d}$)的蒸馏水30 d(Normal组实验过程中死亡2只)。PTX组与YX组均取大椎、肝俞(双)、血海(双)、丰隆(双)穴进行穴位埋线^[11]。操作方法^[6]:将选定穴位先用龙胆紫标记埋线点,常规消毒。然后镊取一段约 0.5 cm 长的医用羊肠线,放置在一次性细微埋线针的前端,后接针芯,左手拇指指绷紧或捏起进针部位皮肤,右手持针,刺入到穴位后,边推针芯,边退针管,将线留在穴内(注意线不能留在皮下),出针后立即给伤口消毒,用消毒干棉球按压针孔片刻以防出血,并用创可贴固定。先埋一侧穴位,间隔15 d后埋对侧穴位。共埋线2次,计30 d。

1.6 脑电图描记分析方法

1.6.1 EEG记录方法 记录方法采用VEEG-1518K型数字化视频脑电监测分析系统(日本光电公司产)^[12]。Normal组在假手术后、其他组在药物干预处理前后各描记大鼠EEG1次,每次 10 min 。大鼠固定在自制简易套筒式大鼠固定器里面^[13],采用单极导联法记录EEG,以双侧耳垂部位作为参考电极,以大鼠前额中线FPz处(即:脑中线区的两目之间上 0.5 cm)作为接地电极安放点,两耳颞侧(中颞区,又称T₃/T₄区)的头皮下颅骨层外分别斜刺插入一根长约 $2\sim 3 \text{ cm}$ 的针灸毫针式电极。

1.6.2 参数设置 定标: $10 \mu\text{V}/\text{mm}$,走纸速度 3.0 cm/s ,时间常数 0.3 s ,高频滤波 30 Hz ,增益: $\times 1.0$, 50 Hz 陷波:开。每次记录前先在显示器上观察信号,待信号基线平稳后,连续描记 10 min ,同时将EEG信号保存于计算机硬盘上,以便于回放分析。

1.6.3 EEG分析方法 主要分析背景活动脑波基本节律的波幅与频率变化,以及描记单位时间内癫痫样波(尖/棘波、尖/棘慢复合波、多棘波等)发放的频率。

1.7 多药耐药蛋白MRP₁-P-gp检测

参考文献[14~16]采用免疫组织化学技术,检测多药耐药相关蛋白MRP₁-P-gp在海马与颞叶皮质不同部位的表达。标本处理:(1)脑组织标本制作;(2)石蜡切片包埋;(3)免疫组化染色;(4)免疫组化结果分析。

1.8 统计学处理分析方法

运用SPSS 19.0统计软件包进行处理。计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,计量资料满足正态性及方差齐性者多组样本均数间比较用 F 检验,两两之间比较用 q

检验,否则用秩和检验(Kruskal-Wallis H 检验)。均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 穴位埋药线对难治性癫痫大鼠痫样波发放的影响

治疗前各组致痫鼠 EEG 痫波放电持续时间与发放频率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);治疗后, YX 组、LTG 组分别与 Model 组、PTX 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), YX 与 LTG 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), PTX 组与 Model 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); PTX 组干预致痫鼠后, 痫波频率与持续时间降低, 但自身前后对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), YX 组、LTG 组自身前后比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 提示给 YX、LTG 治疗后使 KA 致痫鼠 EEG 痫波放电持续时间缩短, 发放频率减少。见表 1。

2.2 各组大鼠 MRP₁ 表达比较

与 Normal 组比较, YX 组、LTG 组、PTX 组、Model 组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); YX 组、LTG 组与 Model 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); YX 组、LTG 组与 PTX 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); YX 组与 LTG 组比较差异无统计学意义 ($P >$

表 1 各组大鼠治疗前后癫痫样波放电的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	痫波持续时间(秒)		痫波发放频率(次/min)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
Model 组	14	12.3±2.7		7.9±1.8	
LTG 组	16	12.5±3.2	6.5±2.6 ^{△*} ◆	7.8±1.7	4.3±1.4 ^{△*} ◆
PTX 组	15	11.2±2.86	9.7±1.8	7.6±1.3	6.5±1.2
YX 组	16	11.8±2.4	6.9±1.7 ^{△*} ◆	8.2±2.1	5.1±1.2 ^{△*} ◆
F 值		3.02	73.51	0.69	24.64
P 值		0.25	<0.01	0.43	<0.01

注:与 Model 组比较[△] $P < 0.05$;与 PTX 组比较^{*} $P < 0.05$;同组自身前后比较[◆] $P < 0.05$ 。

0.05)。提示 YX、LTG 能逆转下调 KA 致痫鼠海马区、颞叶皮质区 MRP₁ 的表达。结果见表 2。

2.3 各组大鼠 P-gp 的表达比较

与 Normal 组比较, YX 组、LTG 组、PTX 组、Model 组差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$), YX 组、LTG 组与 Model 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); Model 组与 PTX 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); YX 组、LTG 分别与 PTX 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); YX 组与 LTG 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 YX、LTG 能逆转下调 KA 致痫鼠海马区、颞叶皮质区 P-gp 的表达。结果见表 3。

表 2 各组大鼠 MRP₁ 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	海马区		颞叶皮质区	
		灰度比值	阳性细胞数(个)	灰度比值	阳性细胞数(个)
Normal 组	13	0.26±0.12	5.61±2.43	0.27±0.12	6.36±2.18
Model 组	14	1.24±0.25 [△]	48.54±6.47 [△]	0.82±0.20 [△]	42.58±7.32 [△]
LTG 组	16	0.56±0.25 ^{△▲*}	25.54±5.94 ^{△▲*}	0.55±0.19 ^{△▲*}	34.24±6.54 ^{△▲*}
PTX 组	15	0.89±0.38 [△]	35.46±12.57 [△]	0.75±0.25 [△]	32.14±10.24 [△]
YX 组	16	0.44±0.18 ^{△▲*}	28.86±6.25 ^{△▲*}	0.53±0.17 ^{△▲*}	38.26±7.18 ^{△▲*}
F 值		43.467	32.901	25.831	42.932
P 值		<0.01	<0.001	<0.01	<0.01

注:与 Normal 组比较[△] $P < 0.05$;与 Model 组比较[▲] $P < 0.05$;与 PTX 组比较^{*} $P < 0.05$ 。

表 3 各组大鼠海马与颞叶皮层 P-gp 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	海马区		颞叶皮质区	
		灰度比值	阳性细胞数(个)	灰度比值	阳性细胞数(个)
Normal 组	13	0.28±0.12	7.16±2.43	0.43±0.18	6.36±2.31
Model 组	14	1.85±0.37 ^{△△}	64.85±8.74 ^{△△}	1.52±0.30 ^{△△}	55.41±9.43 ^{△△}
LTG 组	16	0.79±0.25 ^{△△▲*}	31.54±6.49 ^{△△▲*}	0.59±0.19 ^{△△▲*}	30.24±5.54 ^{△△▲*}
PTX 组	15	1.28±0.34 ^{△△}	42.46±10.45 ^{△△}	0.95±0.28 ^{△△}	38.54±9.54 ^{△△}
YX 组	16	0.76±0.22 ^{△△▲*}	34.65±5.62 ^{△△▲*}	0.67±0.16 ^{△△▲*}	32.26±6.18 ^{△△▲*}
F 值		63.083	71.934	57.903	46.301
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与 Normal 组比较^{△△} $P < 0.01$;与 Model 组比较^{▲▲} $P < 0.01$;与 PTX 组比较^{*} $P < 0.05$ 。

从表1、2、3中看出:提示药线、拉莫三嗪使KA致痫鼠EEG痫波放电持续时间缩短,发放频率减少,同时能逆转下调KA致痫鼠海马区、颞叶皮质区MRP₁、P-gp表达。

3 讨论

难治性癫痫耐药机制复杂,目前研究认为多药耐药基因及相关蛋白表达异常是主要机制之一^[17]。相关研究发现,主要是MDR₁基因编码的蛋白参与多药耐药过程,其表达产物是P-gp^[18]。目前研究认为在正常脑组织内MRP₁分布于脉络丛上皮细胞和室管膜上皮细胞,参与血-脑脊液屏障(blood-cerebrospinal fluid barrier,BCB)的保护功能,阻止有害物质或药物进入脑组织^[19]。因此,埋药线对KA致痫鼠MRP₁、P-gp表达的下调,同时提高抗癫痫药物在脑组织的浓度,使KA致痫大鼠背景EEG频率升高,波幅减慢,为难治性癫痫的治疗开辟新的治疗方法。

癫痫属中医学“痫病、痫证”范畴,RE中医学多称为“顽痫”,本课题组前期的临床和实验研究并发表数篇相关论文^[20-22]已经证实:痰瘀则是RE的关键核心病机,其可概括为脏腑机能失调,气机逆乱,阴阳失调,导致风火痰瘀交阻脑窍,元神失控,发为癫痫。现代中药药理研究亦证实:礞石对癫痫的抑制作用可能与其所含的离子种类及含量对神经细胞内外离子浓度离子通道及金属蛋白酶的活性调节密切相关^[23]。蜈蚣现代药理研究证实具有血管舒张、抗凝血、平滑肌收缩、诱导血小板聚集、溶血活性、免疫抑制等作用^[24]。川芎的提取物、化学部位及单体成分等具有改善冠状动脉血流量、降低血流阻力及血压、抗氧自由基、抗炎、抗癌、抗血小板聚集和血栓形成、保护神经等多方面的药理作用^[25]。故方中川芎、礞石、蜈蚣等中药具有活血化瘀、通经活络、镇静和抗惊厥作用的有效成分。

在《素问·长刺节论》及《灵枢·癫狂篇》中强调了辨证选经取穴及依据病证性质不同而选用刺、灸之法,特别注重取督脉、足太阳膀胱经之穴。针刺大椎穴,能使经络疏通,调整和振奋全身的阳气。血海为脾经之穴,能化血为气,以活血化瘀。肝俞穴是足太阳膀胱经经气输注于背腰部的腧穴,《甲乙经》中有

云:“癫疾,膈俞及肝俞主之。”。丰隆穴为足阳明胃经的络穴、被古今医学家公认为治痰要穴。因此,本实验选取了大椎、血海、丰隆、肝俞穴,四穴合用,共奏豁痰熄风、活血通络、醒脑开窍之功,从而达到治疗癫痫的目的。穴位埋线治疗方法是现代医学和中医经络理论有效结合的发展产物,具有充分使用腧穴的功能特点,还具有自身优点,可经过刺激穴位(羊肠线可对机体产生化学、生物、机械性刺激),较针刺具有更加长久和有效的刺激,能抑制大脑皮层的异常放电;同时合理调节机体的其他生理功能,符合中医《内经》中“深纳而久留,以治愈顽疾”的主旨^[26]。穴位埋线方法是传统针刺及西药治疗所不具备的,即穴位埋线是预防与治疗融为一体的临床行之有效的治疗方法,且操作比较简便,可以提高患者的依从性,更容易被患者所接受。

本实验结果表明埋药线治疗难治性癫痫大鼠,使KA致痫鼠EEG痫波放电持续时间缩短,发放的频率减少,同时海马区与颞叶皮质MRP₁、P-gp的表达可明显降低。拉莫三嗪是新型抗癫痫药物对难治性癫痫治疗具有显著效果,故选为本实验的阳性对照药,拉莫三嗪组与药线组比较,差异无统计学意义,提示二者有类似的拮抗作用效应。综上所述,“穴位埋药线”可使KA致痫鼠EEG痫波放电持续时间缩短,发放频率减少,同时使海马区与颞叶皮质MRP₁、P-gp的表达可明显降低,从而提高血脑屏障的通透率,增加抗癫痫药物浓度抑制癫痫症状的发作。

参考文献:

- [1] Löscher W, Schmidt D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma [J]. *Epilepsia*, 2011, 52:657.
- [2] Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies [J]. *Epilepsia*, 51(6): 1069-1077.
- [3] Kubota H, Ishihara H, Langmann T, et al. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis [J]. *Epilepsy Res*, 2006, 68(3): 213.

- [4] 郑兴珍,武士京.难治性癫痫的耐药性与多药耐药基因的研究进展[J].神经疾病与精神卫生,2008,8(1):74-76.
- [5] 颜博,李国良.miR-133a/b 和 MRP1 在耐药性癫痫患者外周血含量的观察[J].中国病理生理杂志,2015,31(4):680-684.
- [6] 宋祖丽,李振光,王净净,等.埋药线对 KA 致痫大鼠海马及颞叶皮质内多药耐药基因 MDR1b 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2014,34(4):41-45.
- [7] 李振光,宋祖丽,王净净,等.愈痫灵方对 KA 致痫大鼠海马及颞叶皮质内多药耐药蛋白 MDR1b 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2015,35(11):18-21.
- [8] 王海燕,张英琦,迟瑛娇,等.托吡酯对海人酸致痫大鼠海马组织 P 糖蛋白和核转录因子表达的影响[J].黑龙江医药科学,2011;34(6):7-9.
- [9] 刘涛,王净净.科研思路与方法[M].北京:中国中医药出版社,2012:97-98.
- [10] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II Motor seizures Electroencephalogram [J]. Clin Neurophysiol, 1972, 32(3):269-272.
- [11] 李忠仁.实验针灸学(第二版)[M].北京:中国中医药出版社,2007:255.
- [12] 王净净,邓元江,顾星,等.治痫灵对实验性癫痫大鼠 EEG 的作用[J].湖南中医学院学报,1999,19(4):12-14.
- [13] 王净净,李振光,邓元江.自制简易套筒式大白鼠固定装置[J].临床神经电生理学杂志,2001,10(2):39.
- [14] Wu Y, Wang XF, Mo XA, et al. Expression of laminin beta1 in hippocampi of patients with intractable epilepsy [J]. Neurosciences, 2008, 443 (3):160-164.
- [15] 李建,姜德春.难治性癫痫患者脑组织内致病灶与其周围组织 P 糖蛋白表达量的比较[J].中国药物依赖性杂志,2008,17(3):182-186.
- [16] 吕福全.癫痫病从痰论治机理析义[J].辽宁中医杂志,2005,32(1):27-28.
- [17] Bankstahl JP, Hoffmann K, Bethmann K, et al. Glutamate is critically involved in seizure-induced over expression of P-glycoprotein in the brain [J]. Neuro-pharmacology, 2008, 54(6):1006-1016.
- [18] Borst P, Schinkel AH. P-glycoprotein ABCBI: a major player in drug handling by mammals [J]. J Clin Invest, 2013, 123(10):4131-4133.
- [19] Visweswari G, Siva PK, Lokanatha V.The antiepileptic effect of Centella asiatica on the activities of Na⁺/K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺-ATPases in rat brain during pentyleneetet-razol-induced epilepsy[J]. Indian J Pharmacol, 2010, 42(2):82-86.
- [20] 王净净,李振光,邓元江,等.愈痫灵方抗癫痫作用临床研究[J].中国医师杂志,2001,3(11):821-823.
- [21] 王净净,邓元江,顾星,等.治痫灵对实验性癫痫大鼠的作用[J].湖南中医学院学报,1999,19(4):12-14.
- [22] 李智雄,谢静涛,王净净.愈痫灵颗粒对戊四氮致痫大鼠 BDNF 表达与认知障碍的影响[J].中国中医药科技,2010,17(6):484-486.
- [23] 吴露婷,刘圣金,吴德康,等.矿物药青礞石对戊四氮点燃癫痫大鼠干预作用研究[J].中药材,2016,39(1):155-159.
- [24] 罗雷,赖仞.蜈蚣毒素研究进展,生命科学[J],2016,28(1):1-6.
- [25] 金玉青,洪远林,李建蕊,等.川芎的化学成分及药理作用研究进展[J].中药与临床,2013;4(3):44-48.
- [26] 苏全德,武华清.穴位埋线配合药物治疗外伤性癫痫疗效观察[J].上海针灸杂志,2012,31(7):488-490.

(本文编辑 匡静之)