

引用:刘书宁,秦少坤,平鑫,张延红,曹亚飞,裴林,张少丹.黄芩对癫痫大鼠行为学和脑内AMPA受体GluR1表达的影响[J].中医导报,2020,26(15):17-21.

实 验

# 黄芩对癫痫大鼠行为学和脑内AMPA受体GluR1表达的影响\*

刘书宁<sup>1</sup>,秦少坤<sup>2</sup>,平鑫<sup>2</sup>,张延红<sup>3</sup>,曹亚飞<sup>3</sup>,裴林<sup>4</sup>,张少丹<sup>5</sup>

(1.华北理工大学中医学院,河北唐山063210;

2.河北大学中医学院,河北保定071051;

3.河北中医学院,河北石家庄050031;

4.河北省中医药科学院附属医院,河北石家庄050031;

5.河北医科大学第二附属医院,河北石家庄050051)

[摘要] 目的:观察黄芩对癫痫大鼠的学习记忆行为学和脑内AMPA受体GluR1表达的影响。方法:45只SD大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、黄芩低剂量组、黄芩高剂量组和丙戊酸钠组,每组9只。通过腹腔注射35 mg/kg戊四氮(PTZ)诱发癫痫模型,观察各组治疗前后的发作等级、发作潜伏期;Morris水迷宫及Y-迷宫实验观察大鼠行为学变化;免疫组化法检测脑内AMPA受体GluR1的表达水平。结果:黄芩高剂量组和丙戊酸钠组大鼠的发作等级明显低于模型组( $P<0.01$ ),发作潜伏期时长长于模型组( $P<0.05$ );在Morris水迷宫实验中,黄芩高剂量组和丙戊酸钠组大鼠的逃避潜伏期时长短于模型组( $P<0.05$ ),穿越平台次数多于模型组( $P<0.05$ );在Y-迷宫实验中,黄芩高剂量组和丙戊酸钠组大鼠的错误回避次数少于模型组( $P<0.01$ )。免疫组化显示黄芩高剂量组大鼠脑内GluR1的表达低于模型组( $P<0.05$ )。结论:黄芩对戊四氮诱发的大鼠惊厥模型具有保护作用,其作用机制可能与调节脑内GluR1表达相关,黄芩有可能成为一种预防和治疗癫痫及癫痫引起的脑损害的辅助用药,值得进一步研究。

[关键词] 黄芩;癫痫;AMPA受体;GluR1;学习记忆;戊四氮;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2020)15-0017-05

DOI:10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2020.15.003

## Effect of Huangqin (Scutellaria) on Behavior and Expression of AMPA Receptor GluR1 in Epileptic Rats

LIU Shu-ning<sup>1</sup>, QIN Shao-kun<sup>2</sup>, PING Xin<sup>2</sup>, ZHANG Yan-hong<sup>3</sup>, CAO Ya-fei<sup>3</sup>, PEI Lin<sup>4</sup>, ZHANG Shao-dan<sup>5</sup>

(1.School of Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan Hebei 063210,

China; 2.School of Chinese Medicine, Hebei University, Baoding Hebei 071051, China; 3.Hebei University of

Chinese Medicine, Shijiazhuang Hebei 050031, China; 4.Affiliated Hospital of Hebei Academy of Traditional

Chinese Medicine, Shijiazhuang Hebei 050031, China; 5.The Second Affiliated Hospital of Hebei Medical

University, Shijiazhuang Hebei 050051, China)

[Abstract] Objective: To observe the effects of Huangqin (Scutellaria) on the learning and memory behavior of epileptic rats and the expression of AMPA receptor GluR1 in the brain. Methods: A total of 45 SD rats were divided into blank group, model group, Huangqin (Scutellaria) low-dose group, Huangqin (Scutellaria) high-dose group and sodium valproate group according to the random number table method, with 9 rats in each group. The epilepsy model was induced by intraperitoneal injection of 35 mg/kg pentylenetetrazol (PTZ), and the seizure grade and seizure latency of each group were observed before and after treatment. Morris water maze and Y-maze experiments were used to observe the behavioral changes of rats. The expression level of AMPA receptor GluR1 in the brain was detected by immunohistochemistry. Results: The level of seizures of rats in Huangqin (Scutellaria) high-dose group and sodium valproate group was significantly lower than that of the model group ( $P<0.01$ ), and the onset latency was longer than that of the model group ( $P<0.05$ ). In the Morris water maze experiment, the duration of escape latency of rats in Huangqin (Scutellaria) high-dose group and sodium valproate group was shorter than that of the model group ( $P<0.05$ ), and the number of crossing platforms was more than

\*基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(2020176)

通讯作者:裴林,E-mail:peilin13831190309@126.com;张少丹,E-mail:13653115066@163.com

that of the model group ( $P<0.05$ ). In the Y-maze experiment, the number of false avoidance of rats in Huangqin (Scutellaria) high-dose group and sodium valproate group was less than that of the model group ( $P<0.01$ ). Immunohistochemistry showed that the expression of GluR1 in the brain of rats in Huangqin (Scutellaria) high-dose group was lower than that in the model group ( $P<0.05$ ). Conclusion: Huangqin (Scutellaria) has a protective effect on the rat convulsion model induced by pentylenetetrazol. Its mechanism of action may be related to regulating the expression of GluR1 in the brain. Huangqin (Scutellaria) may become an auxiliary drug for the prevention and treatment of epilepsy and brain damage caused by epilepsy, which is worth further study.

[Keywords] Huangqin (Scutellaria); epilepsy; AMPA receptor; GluR1; learning and memory; pentylenetetrazole; rats

癫痫是慢性反复发作性短暂脑功能失调综合征,是以脑神经元异常放电引起反复痫性发作为特征的中枢神经系统疾病,发病原因极其复杂,是神经系统疾病中的多发病与常见病。兴奋性神经递质与抑制性神经递质失衡,神经元的失控性自发性异常放电,进而引起了癫痫的反复性发作<sup>[1]</sup>。谷氨酸受体(AMPA)是脊椎动物中枢神经系统中一类主要的兴奋性神经递质受体,广泛分布于中枢神经系统,其主要功能是介导 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 及少量 $\text{Ca}^{2+}$ 内流,通过与谷氨酸受体结合发挥作用,而AMPA受体的过度激活可以导致多种神经损伤和精神异常,癫痫即是其中之一<sup>[2]</sup>。

黄芩为唇形科(Labiatae)黄芩亚科(Scutellaria Subfamily)黄芩属植物黄芩*Scutellaria baicalensis* Georgi的干燥根,味苦,性寒,归肺、胆、脾、大肠、小肠经。黄芩清热燥湿、泻火解毒,具有清泻少阳经之浊火的功效<sup>[3]</sup>。黄芩中含有的黄芩苷,具有抗炎、解痉、降压等作用,并且有研究表明黄芩有很好的镇静和免疫调节的作用<sup>[4]</sup>。本次实验采用戊四氮(PTZ)化学点燃制模,观察黄芩对癫痫模型大鼠学习记忆行为学及脑内AMPA受体GluR1表达的影响。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 45只4~5周龄健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,体质量( $100\pm 5$ ) g,购自河北医科大学动物实验中心,动物许可证号:SCXK(冀)2013-1-003。饲养于温度( $22\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,湿度50%~60%,12 h明暗交替的受控环境,提供充足的饮水和标准饲料,实验动物饲料购自河北医科大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(冀)2018-004。本实验经河北省中医药科学院动物实验伦理委员会审查并批准。

1.2 药物与试剂 黄芩中药饮片由河北省中医药科学院附属医院提供(河北省安国市誉林药业有限公司,批号:190102,经我院药剂科邵奇研究员鉴定符合2015年版《中国药典》一部标准,标本凭证保存于河北省中医药科学院)。戊四氮(美国Sigma,批号:P6500-25G);丙戊酸钠片(湖南湘中制药有限公司,批号:H43020874);Anti-Glutamate Receptor 1(英国abcam,批号:ab31232);Goat Anti-Rabbit IgG(英国abcam,批号:ab205718);二步法免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥,批号:PV-9001)。黄芩溶液按照实验分组称取黄芩药材饮片,加入10倍量水浸泡2 h后煎煮2次,将2次煮沸的药液混合并过滤后,于60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴浓缩为1 g/mL的水提液,灌胃时按比例稀释后给药。

1.3 主要仪器 CX-41型生物显微镜(日本Olympus公司);RM-2245型旋转式切片机(德国LEICA公司);YD-315型冰冻

切片机(金华市益迪医疗设备有限公司);SL-502N型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);Mini-54型微型离心机(上海民桥精密科学仪器有限公司);AG-9007型手动移液器(德国Eppendorf公司);一次性注射器(郑州康佳医疗器械有限公司,批号:20173150338);Y-迷宫(北京硕林苑科技有限公司);Morris水迷宫(北京硕林苑科技有限公司)。

1.4 造模与分组 适应性饲养7 d后,将每只大鼠单独分笼,在鼠笼外侧用记号笔进行1~45编号并称体质量。按随机数字表法抽取9只作为空白组,剩余36只大鼠作为造模组。每天上午8:00:00—10:00:00,造模组给予PTZ溶液35 mg/kg腹腔注射,空白组给予0.9%氯化钠注射液腹腔注射。每次注射后观察大鼠的行为变化,按照Lado分级法判定癫痫发作等级(见表1),在造模28 d内,连续5次出现3.5级或3.5级以上痫性发作视为造模成功<sup>[5]</sup>。剔除在造模周期内未达到痫性发作等级要求和死亡的大鼠,其中未达到痫性发作要求2只、死亡3只,将剩余32只造模成功的大鼠按随机数字表法分为模型组、丙戊酸钠组、黄芩低剂量组、黄芩高剂量组,每组8只,空白组剩余8只。整体造模成功率88.9%,死亡率6.7%。

表 1 Lado 分级

| 分级         | 行为           |
|------------|--------------|
| 0          | 无发作          |
| 1          | 机械性咀嚼        |
| 2          | 连续性点头        |
| 3          | 单侧前肢阵挛       |
| 3.5        | 双前肢交替阵挛      |
| 4          | 双侧前肢阵挛、后退    |
| 5          | 双侧前肢阵挛、后退、摔倒 |
| 6          | 狂奔、嘶叫        |
| 7          | 强直发作         |
| 癫痫持续状态(SE) | 发作达到3.5~7.0  |

1.5 实验给药 自造模完成后的第1天开始,每天对所有大鼠称重并记录后进行灌胃治疗,丙戊酸钠组大鼠灌胃给予丙戊酸钠溶液,350 mg/kg;黄芩低、高剂量组大鼠灌胃给予黄芩溶液分别为0.5、1.0 g/kg;空白组和模型组大鼠灌胃给予0.9%氯化钠注射液,10 mL/kg,1次/d,持续28 d。

## 1.6 行为学观察

1.6.1 Morris水迷宫实验 Morris水迷宫实验是一种强制性要求实验动物游泳的实验,包括定位航行实验和空间探索实验两部分,以学习寻求水中的隐藏站台为实验目标,可以测试实验动物对空间定位的感知,包括位置感和方向感,是学

习与记忆行为学研究的经典实验。Morris水迷宫是一个圆形水池,其直径为120 cm、高为60 cm,水池内壁为黑色,水池内加入清水,水位35 cm,水温保持22~24 ℃恒温,将水池等分为I、II、III、IV象限。在第IV象限正中,放一圆形透明站台,其直径为10 cm、高为32 cm。定位航行实验共进行5 d,每天训练4次,上午、下午各2次,每次开始时将实验动物按照I→II→III→IV的顺序面向池壁放入水中。实验于各组大鼠治疗完成后进行测试,规定实验动物在60 s内寻找隐藏站台,记录最后一天各组大鼠的逃避潜伏期即大鼠入水后至找到水中站台的时间。空间探索实验即在最后一次定位航行实验结束后的第2天,撤去平台,让动物在水池中自由游泳,实验动物必须在同一入水点(第II象限)入水,记录实验动物在120 s内穿越原本水中站台所在位置的次数<sup>[6]</sup>。

**1.6.2 Y-迷宫实验** Y-迷宫也称三等分辐射式迷路箱,由三个夹角120°且等长的I、II、III臂和连接部分的交界区组成,主要应用于动物的识别性学习,用于测试动物的工作记忆和空间记忆能力。实验于各组大鼠治疗完成后进行测试,采用“固定次数随机法”,共进行2 d,每天训练20次,共测试40次。第1天将大鼠放入迷宫中自由活动适应5 min,称为训练期,第2天可直接测试,称为测试期。Y-迷宫的三条臂分别命名为:起始臂、错误臂和目标臂,各臂顶端装有红色刺激信号灯,其中大鼠所在的起点迷宫臂为起始臂,红色刺激信号灯亮起的迷宫臂为目标臂。当控制面板按下相应按键时有5 s延时,随后大鼠在起始臂和错误臂时将受50~70 V的电刺激,而在目标臂则不会受到电刺激。大鼠在10 s内一次性跑入目标臂称为正确反映,否则为错误反应。大鼠从起始臂进入目标臂后可以休息30 s,此时大鼠所在的迷宫臂为下一次测试的起始臂。记录各组大鼠每次实验错误反应的次数,即“回避错误次数”<sup>[7]</sup>。

**1.7 标本采集** 行为学测试结束后,以10%水合氯醛(5 mL/kg)腹腔麻醉,起效后固定大鼠,沿着腹中线剪开腹部,分离心脏和胸壁,使心脏位置充分暴露,在右心耳下剪一小口以引流并向左心室内快速灌注0.9%氯化钠注射液,之后以4%多聚甲醛溶液固定组织后将大鼠断头,经颅前正中中线剪开头皮暴露颅骨,剪开枕骨,取全脑组织,用于免疫组化<sup>[8]</sup>。

**1.8 免疫组化** 根据《大鼠脑立体定位图谱》将脑组织切成30 μm的切片,选取同一平面有海马CA1和CA3区的脑组织,将切好的脑组织放入西林瓶中漂染。PBS冲洗5 min×3次;通透液封闭30 min;PBS冲洗5 min×3次;滴加Anti-Glutamate Receptor 1(一抗稀释倍数为1:600),置于4 ℃冰箱12 h;PBS冲洗5 min×3次;增强酶标山羊抗兔IgG(二抗稀释倍数为

1:200),室温下孵育30 min;PBS冲洗5 min×3次;DAB显色反应3~5 min, PBS冲洗10 min终止反应;最后使用梯度酒精脱水,中性树脂胶封片<sup>[9]</sup>。每只大鼠取5张脑片,显微镜下观察海马CA1和CA3区,每张取两个视野进行GluR1表达细胞数量统计。

**1.9 统计学方法** 应用SPSS 22.0软件进行统计分析,数据用“均数±标准差”( $\bar{x} \pm s$ )表示,多样本组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)和重复测量资料方差分析,两两比较采用LSD法检验。若数据不满足正态分布和方差齐等条件,则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 对PTZ致病大鼠发作等级的影响** 实验过程中空白组大鼠没有痫性发作。治疗前,各组大鼠癫痫发作等级比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。治疗后,黄芩高剂量组、丙戊酸钠组大鼠癫痫发作等级明显低于模型组( $P < 0.01$ ),黄芩高剂量组大鼠癫痫发作等级与丙戊酸钠组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。(见表2~3)

表2 治疗前各组大鼠癫痫发作等级比较 ( $n=8$ )

| 组别     | 1 | 2 | 3 | 3.5 | 4 | 5 | 6 | 7 | 秩均数   |
|--------|---|---|---|-----|---|---|---|---|-------|
| 模型组    | 0 | 0 | 0 | 0   | 1 | 2 | 3 | 2 | 20.75 |
| 黄芩低剂量组 | 0 | 0 | 0 | 0   | 2 | 3 | 1 | 2 | 19.90 |
| 黄芩高剂量组 | 0 | 0 | 0 | 0   | 1 | 3 | 2 | 2 | 19.45 |
| 丙戊酸钠组  | 0 | 0 | 0 | 0   | 1 | 2 | 3 | 2 | 21.90 |

表3 治疗后各组大鼠癫痫发作等级比较 ( $n=8$ )

| 组别     | 1 | 2 | 3 | 3.5 | 4 | 5 | 6 | 7 | 秩均数               |
|--------|---|---|---|-----|---|---|---|---|-------------------|
| 模型组    | 0 | 0 | 0 | 0   | 1 | 2 | 3 | 2 | 31.40             |
| 黄芩低剂量组 | 0 | 0 | 1 | 1   | 3 | 2 | 1 | 0 | 25.10             |
| 黄芩高剂量组 | 2 | 3 | 2 | 1   | 0 | 0 | 0 | 0 | 9.70 <sup>a</sup> |
| 丙戊酸钠组  | 1 | 4 | 3 | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 9.80 <sup>a</sup> |

注:与模型组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$

**2.2 对PTZ致病大鼠发作潜伏期的影响** 实验过程中空白组大鼠没有痫性发作。治疗前,各组大鼠癫痫发作潜伏期比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。治疗后,黄芩高剂量组和丙戊酸钠组大鼠癫痫发作潜伏期长于模型组( $P < 0.05$ );黄芩高剂量组大鼠癫痫发作潜伏期与丙戊酸钠组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。(见表4)图1为大鼠癫痫发作潜伏期估算边际均值的交互效应轮廓图,各组于治疗14 d后不再相交,表示其交互效应很小或不存在( $P < 0.01$ )。

## 2.3 大鼠行为学观察

**2.3.1 Morris水迷宫测定结果** 逃避潜伏期时长:模型组大鼠逃避潜伏期时长明显长于空白组( $P < 0.01$ );黄芩高剂量组和丙戊酸钠组大鼠逃避潜伏期时长短于模型组( $P < 0.05$ );黄

表4 各组大鼠癫痫发作潜伏期时长比较 ( $\bar{x} \pm s, s$ )

| 组别     | 动物数(只) | 治疗7 d        | 治疗14 d                    | 治疗21 d                    | 治疗28 d                    | F                 | P     |
|--------|--------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|-------|
| 模型组    | 8      | 348.33±20.18 | 336.22±24.50              | 341.51±17.68              | 323.14±11.99              | 22.889            | 0.102 |
| 黄芩低剂量组 | 8      | 346.47±17.26 | 344.63±16.72              | 367.87±15.97              | 335.58±22.08              | 36.578            | 0.063 |
| 黄芩高剂量组 | 8      | 338.54±23.17 | 382.58±19.38 <sup>a</sup> | 428.19±14.32 <sup>a</sup> | 449.26±16.09 <sup>a</sup> | 48.870            | 0.001 |
| 丙戊酸钠组  | 8      | 331.11±18.54 | 390.71±19.23 <sup>a</sup> | 433.76±20.45 <sup>a</sup> | 455.02±19.40 <sup>a</sup> | 54.237            | 0.000 |
| F      |        | 24.276       | 41.033                    | 47.901                    | 55.171                    | $F_{交互效应}=64.923$ |       |
| P      |        | 0.142        | 0.001                     | 0.001                     | 0.000                     | $P_{交互效应}=0.000$  |       |

注:与模型组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

芩高剂量组大鼠逃避潜伏期时长与丙戊酸钠组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。(见表5)

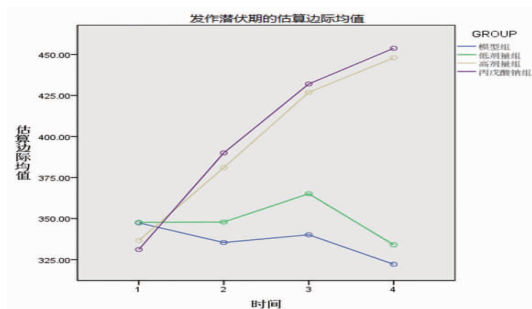


图 1 交互效应轮廓图

表 5 各组大鼠逃避潜伏期时长比较 ( $\bar{x}\pm s, s$ )

| 组别       | 动物数(只) | 给药剂量(g/kg) | 逃避潜伏期                    |
|----------|--------|------------|--------------------------|
| 空白组      | 8      | —          | 41.10±17.95              |
| 模型组      | 8      | —          | 61.03±18.35 <sup>a</sup> |
| 黄芩低剂量组   | 8      | 0.50       | 60.57±21.60              |
| 黄芩高剂量组   | 8      | 1.00       | 56.25±18.80 <sup>b</sup> |
| 丙戊酸钠组    | 8      | 0.35       | 55.71±15.10 <sup>b</sup> |
| <i>F</i> |        |            | 33.057                   |
| <i>P</i> |        |            | 0.006                    |

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

穿越平台次数:在最后一次定位航行实验结束后的第2天进行实验记录。模型组大鼠穿越平台次数明显少于空白组( $P<0.01$ );黄芩高剂量组和丙戊酸钠组大鼠穿越平台次数多于模型组( $P<0.05$ );黄芩高剂量组大鼠穿越平台次数与丙戊酸钠组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。(见表6)

表 6 各组大鼠穿越平台次数比较 ( $\bar{x}\pm s, 次$ )

| 组别       | 动物数(只) | 给药剂量(g/kg) | 穿越平台次数                 |
|----------|--------|------------|------------------------|
| 空白组      | 8      | —          | 7.37±2.25              |
| 模型组      | 8      | —          | 5.12±1.91 <sup>a</sup> |
| 黄芩低剂量组   | 8      | 0.50       | 5.19±1.53              |
| 黄芩高剂量组   | 8      | 1.00       | 6.25±2.02 <sup>b</sup> |
| 丙戊酸钠组    | 8      | 0.35       | 6.46±2.01 <sup>b</sup> |
| <i>F</i> |        |            | 2.582                  |
| <i>P</i> |        |            | 0.021                  |

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

2.3.2 Y-迷宫测定结果 第1次测定结果:各组回避错误次数比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。第二次测定结果:模型组大鼠的回避错误次数明显多于空白组( $P<0.01$ );黄芩高剂量组和丙戊酸钠组大鼠的回避错误次数明显少于模型组( $P<0.01$ );黄芩高剂量组大鼠的回避错误次数与丙戊酸钠组比较,差异无统计学差异( $P>0.05$ )。(见表7)

表 7 各组大鼠回避错误次数比较 ( $\bar{x}\pm s, 次$ )

| 组别       | 动物数(只) | 给药剂量(g/kg) | 第1次       | 第2次                    |
|----------|--------|------------|-----------|------------------------|
| 空白组      | 8      | —          | 5.50±1.36 | 2.25±1.25              |
| 模型组      | 8      | —          | 6.12±1.01 | 4.37±0.91 <sup>a</sup> |
| 黄芩低剂量组   | 8      | 0.50       | 5.80±1.46 | 4.11±1.53              |
| 黄芩高剂量组   | 8      | 1.00       | 5.37±1.17 | 3.18±1.02 <sup>b</sup> |
| 丙戊酸钠组    | 8      | 0.35       | 5.75±0.98 | 3.22±1.12 <sup>b</sup> |
| <i>F</i> |        |            | 1.852     | 36.513                 |
| <i>P</i> |        |            | 0.215     | 0.000                  |

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$

2.4 各组大鼠脑内AMPA受体GluR1表达情况 模型组大鼠CA1区和CA3区GluR1的阳性细胞数量明显多于空白组( $P<0.01$ )。黄芩高剂量组和丙戊酸钠组大鼠CA1区和CA3区GluR1阳性细胞数量少于模型组( $P<0.05$ );黄芩高剂量组大鼠CA1区和CA3区GluR1的阳性细胞数量与丙戊酸钠组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。(见图2~3、表8)

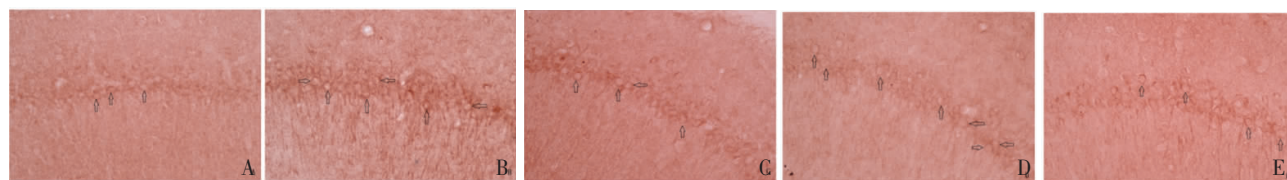
表 8 各组大鼠在海马内 CA1 区和 CA3 区 GluR1 阳性细胞数的表达情况 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | 动物数(只) | 给药剂量(g/kg) | CA1区阳性表达细胞数             | CA3区阳性表达细胞数             |
|----------|--------|------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组      | 8      | —          | 28.63±6.19              | 25.20±7.94              |
| 模型组      | 8      | —          | 43.75±7.40 <sup>a</sup> | 39.09±5.84 <sup>a</sup> |
| 黄芩低剂量组   | 8      | 0.50       | 41.13±7.67              | 39.75±8.20              |
| 黄芩高剂量组   | 8      | 1.00       | 33.25±7.40 <sup>b</sup> | 28.88±7.29 <sup>b</sup> |
| 丙戊酸钠组    | 8      | 0.35       | 31.07±5.39 <sup>b</sup> | 27.51±6.46 <sup>b</sup> |
| <i>F</i> |        |            | 15.647                  | 12.168                  |
| <i>P</i> |        |            | 0.001                   | 0.002                   |

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

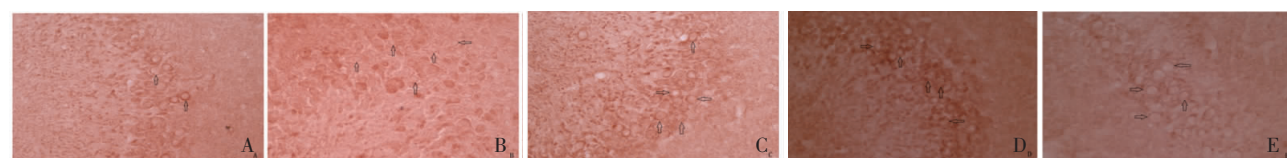
### 3 讨 论

实验发现,黄芩对PTZ诱导的大鼠癫痫模型有明显的抗



注:A.空白组;B.模型组;C.丙戊酸钠组;D.黄芩低剂量组;E.黄芩高剂量组

图 2 各组大鼠海马 CA1 区 GluR1 阳性细胞表达(免疫组化,×400)



注:A.空白组;B.模型组;C.丙戊酸钠组;D.黄芩低剂量组;E.黄芩高剂量组

图 3 各组大鼠海马 CA3 区 GluR1 的阳性细胞表达(免疫组化,×400)

惊厥作用,给予黄芩灌胃治疗后,大鼠的发作等级、发作潜伏期等均有改善,其高剂量组有统计学差异。使用临床中公认的一线抗癫痫药物丙戊酸钠作为阳性对照药,验证了中药黄芩的抗惊厥作用。Morris水迷宫被广泛应用于学习记忆、老年痴呆、海马研究等多个领域的科学研究,是行为学研究尤其是学习与记忆研究的首选经典实验<sup>[10]</sup>。Y-迷宫实验用来探究啮齿类动物的空间识别记忆能力,这种迷宫利用了啮齿类动物对新异情况探究的天然习性,不需要动物学习任何规则来避害就利,可以有效地反映出动物对新异情况的辨认记忆能力<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,与模型组比较,黄芩高剂量组大鼠逃避潜伏期时长、穿越平台次数、错误回避次数等方面均有明显改善,且与丙戊酸钠组相当,说明黄芩可以有效改善癫痫模型大鼠的学习记忆和认知功能。

谷氨酸是脊椎动物中枢神经系统最主要的兴奋性神经递质,多种致病机制均涉及谷氨酸递质及其受体异常,被认为与癫痫的关系密切。近年来的研究发现癫痫动物模型中海马的不同区域AMPA受体亚型不同表达与癫痫发生密切相关。而且选择性AMPA受体拮抗剂在临床上显示了良好的抗惊厥效果<sup>[12]</sup>。

AMPA受体是一种非NMDA型离子型谷氨酸受体,由四种基本亚基组成即GluR1-4。AMPA受体既是谷氨酸受体又是阳离子通道,可以整合多种突触后膜的可塑性和突触传递<sup>[13]</sup>。在神经系统,长时程增强(LTP)被认为是最广泛和彻底的可塑性的研究形式之一。LTP由两个必需部分组成:突触前谷氨酸释放和突触后去极化<sup>[14]</sup>。因此,当突触前细胞受刺激释放谷氨酸到去极化的突触后细胞,LTP可以被实验性的诱导出。典型的LTP诱导模式为伴随强直刺激后的兴奋性突触后电位(EPSP)振幅的长期增强,这种反馈被认为与细胞的学习和记忆相关。AMPA受体作为兴奋性氨基酸离子通道在病理情况下,活化后可对钠离子、钾离子和钙离子都通透,同时还可激活更多的NMDARs活化而导致更多的钙离子内流,从而导致钙超载<sup>[15]</sup>。神经元钙超载在癫痫脑损害中起着关键性作用,钙拮抗剂通过阻断钙通道,减少钙超载,保护神经元而最后起到抗惊厥作用也已在实验性癫痫动物模型中得到研究证实<sup>[16]</sup>。

实验结果表明,模型组大鼠的GluR1的表达水平均高于空白组,而黄芩高剂量组和丙戊酸钠组的GluR1的表达水平均低于模型组。在大脑中,兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸相互拮抗以维持大脑内环境的稳定,戊四氮为 $\gamma$ -氨基丁酸受体拮抗剂,拮抗由 $\gamma$ -氨基丁酸介导的中枢抑制作用,从而使神经元过度激动,产生惊厥发作<sup>[17]</sup>。故推断由于癫痫模型大鼠缺乏 $\gamma$ -氨基丁酸的拮抗作用,谷氨酸的激动作用相对占主导地位,并刺激突触后膜上兴奋性氨基酸受体增加以满足其需求,从而出现兴奋性氨基酸毒性而破坏神经元的现象,致使大脑组织的病理损害。

综上所述,黄芩对癫痫大鼠具有抗惊厥作用,可能是通过抑制AMPA受体GluR1的过度活化,从而减少谷氨酸的兴奋性毒性作用来发挥抗惊厥作用。癫痫的频繁发作可能引起学习和记忆方面的损害,而黄芩可能通过下调GluR1以改善这种损伤状态,以达到改善学习记忆的目的。本实验可以为黄芩对癫痫患者的临床治疗提供一定的理论或实验基础,并希

望为癫痫患者的学习记忆和认知障碍治疗提供新思路。

## 参考文献

- [1] 熊敏,苏化庆,向明钧.癫痫发病机制的研究进展[J].中国当代医药,2019,26(30):24-27.
- [2] 冯冠青,赵世刚,刘罡.AMPA受体与癫痫的关系[J].医学综述,2007,18(3):180-182.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,2005:218-219.
- [4] 苑艺蕾,汪娜,王洪玉,等.黄芩镇静作用有效组分的筛选[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2016,32(2):132-135.
- [5] LIU Y, WANG T, LIU X, et al. Overexpression of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein suppressed seizures and seizure-related neuroinflammation in pentylenetetrazol-kindled rats[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1):92.
- [6] 方松,余化霖.Morris水迷宫实验中海马相关空间学习记忆的研究进展[J].国际病理科学与临床杂志,2010,30(4):321-326.
- [7] 余建,黄育文,陈忠.经过改良的评价大鼠空间记忆能力的交替电刺激Y型迷宫[J].浙江大学学报(医学版),2003,24(2):38-42,57.
- [8] 李亚慧,赵阳,杨斌,等.红花冲泡茶对抑郁大鼠模型的安全性和有效性验证[J].中医导报,2020,26(5):45-48.
- [9] 周湘乐,肖碧跃,王海兰,等.百合地黄汤对抑郁模型大鼠炎症因子IL-1 $\beta$ 及神经递质5-HT水平变化的影响[J].中医导报,2018,24(16):30-33.
- [10] 卢艳,冯娇娇,王秀霞,等.虾青素对致病大鼠学习记忆能力的影响及机制探讨[J].脑与神经疾病杂志,2019,27(4):234-237.
- [11] FU Y, CHEN Y, LI L, et al. Food restriction affects Y-maze spatial recognition memory in developing mice [J].International Journal of Developmental Neuroscience, 2017,33(60):8-15.
- [12] LUOSCHER C, FRERKING M. Restless AMPA receptors: implications for synaptic transmission and plasticity [J].TINS, 2001,24(11):665-670.
- [13] CATARZI D, COLOTTA V, VARANO F. Competitive AMPA receptor antagonists[J].Med Res Rev,2007,27(2):239-278.
- [14] WHITLOCK J R, HEYNEN A J, SHULER M G, et al. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus[J].Science, 2006,313(57):1093-1097.
- [15] MACDONALD R L, KELLY K M. Mechanisms of action of currently prescribed and newly developed antiepileptic drugs[J].Epilepsia, 1994,35(4):S41-S50.
- [16] MACDONALD R L, KELLY K M. Antiepileptic drug mechanisms of action[J].Epilepsia, 1995,36(2):2.
- [17] 王辉,王淑湘,崔国利,等.甜菜碱对戊四氮致痫大鼠血清中同型半胱氨酸以及对海马 $\gamma$ -氨基丁酸及其受体的影响[J].中国微生态学杂志,2013,25(5):528-531,533.

(收稿日期:2020-03-03 编辑:刘颖)