

[J]. 中国实用医药, 2010, 5(1): 24-25.

[12] Rodrigues S F, Almeida-Paula L D, Granger D N. Synergistic effects of high blood cholesterol and hypertension on leukocyte and platelet recruitment in the cerebral microcirculation[J]. *Hypertension*, 2014, 63(4): 747-752.

[13] Liu Y, Gutterman D D. Vascular control in humans: focus on the coronary microcirculation[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(3): 211-227.

[14] Galle M, Kladniew B R, Castro M A, *et al.* Modulation by geraniol of gene expression involved in lipid metabolism leading to a reduction of serum-cholesterol and triglyceride levels[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(7-8): 696-704.

[15] Tai C J, Choong C Y, Shi Y C, *et al.* Solanum nigrum protects against hepatic fibrosis via suppression of hyperglycemia in high-fat/ethanol diet-induced rats[J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 269-280.

[16] Tu Y, Sun D, Zeng X, *et al.* Piperine potentiates the hypocholesterolemic effect of curcumin in rats fed on a high fat diet[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(1): 260-266.

[17] Eguchi K, Ujiwara Y, Hayashida A, *et al.* Manzanamine A, a marine-derived alkaloid, inhibits accumulation of cholesterol ester in macrophages and suppresses hyperlipidemia and atherosclerosis *in vivo* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(13): 3831-3838.

[18] Rouhi-Boroujeni H, Rouhi-Boroujeni H, Heidarian E, *et al.* Herbs with anti-lipid effects and their interactions with statins as a chemical anti-hyperlipidemia group drugs: A systematic review[J]. *ARYA Atheroscler*, 2015, 11(4): 244-251.

麝香酮对戊四氮慢性点燃大鼠癫痫模型脑内 c-Fos 表达的影响

程记伟¹, 白宇^{1*}, 张晓菁², 张利军¹, 赵卿¹
(1. 上海中医药大学附属普陀医院神经内科, 上海 200062; 2. 上海中医药大学附属普陀医院神经电生理室, 上海 200062)

摘要: **目的** 探讨麝香酮 (muscone) 抗痫作用及可能的作用机制。**方法** 将健康雄性 SD 大鼠 90 只随机分成 6 组, 即正常对照组, 模型对照组, 麝香酮小、中、大剂量组 (10、50、100 mg/kg), 丙戊酸钠组, 每组各 15 只。通过免疫组化、Western blot 及 qRT-PCR 方法观察大鼠癫痫发作程度与脑内 c-Fos 表达情况, 以及麝香酮对其干预作用。**结果** 正常对照组大鼠无癫痫发作, 脑组织中仅有少量 c-Fos 表达, 而模型对照组及麝香酮小剂量组大鼠癫痫发作级别较高, 脑皮质及海马中有大量 c-Fos 表达, 麝香酮中、大剂量组大鼠癫痫发作级别较模型对照组低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), c-Fos 表达较模型对照组减少 ($P < 0.01$)。与麝香酮中剂量组比较, 大剂量组大鼠癫痫发作级别更低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), c-Fos 表达减少更加明显 ($P < 0.01$)。**结论** 麝香酮具有一定的抗痫作用, 且呈量效关系, 可能与阻断脑内 c-Fos 表达有关。

关键词: 麝香酮; 癫痫; 点燃模型; c-Fos

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)07-1443-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.07.002

Influence of muscone on c-Fos expression in brains of rat kindling model of epilepsy chronically induced by pentylenetetrazol

CHENG Ji-wei¹, BAI Yu^{1*}, ZHANG Xiao-jing², ZHANG Li-jun¹, ZHAO Qing¹

(1. Department of Neurology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200062, China; 2. Department of Nerve Electrophysiology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200062, China)

收稿日期: 2015-12-30

基金项目: 上海市“杏林新星”计划资助项目 (ZYSN XD011-RC-XLXX-20130002); 上海中医药大学 (预算内) 课题资助项目 (2013JW56); 上海中医药大学第五批后备业务专家培养计划资助项目 (B-X-80)

作者简介: 程记伟 (1980—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为癫痫及脑血管疾病的中西医防治。Tel: 13818606517, E-mail: chengjiwei1@126.com

***通信作者:** 白宇 (1960—), 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为癫痫及脑血管疾病的中西医防治。Tel: 13788938062, E-mail: baiyu_bb@sina.com

ABSTRACT: AIM To explore the antiepileptic effect of muscone and its possible mechanism of action. **METHODS** Ninety healthy male SD rats were randomly divided into six groups, including normal control group, model group, low-, middle-, and high-dose muscone groups (10, 50 and 100 mg/kg) and Valproate group. There were fifteen rats in each group. The epileptic seizure level and c-Fos expression in rat brains, together with the intervention of muscone on them were observed based on behavior observation, immunohistochemistry, Western Blot and qRT-PCR. **RESULTS** No epileptic seizure and a few c-Fos positive cells were observed in the normal control group. However, higher Racine staging of epileptic seizure and more c-Fos positive cells were observed in the model group and low-dose muscone group. Racine staging of epileptic seizure and c-Fos expression in the middle- and high-dose muscone groups were lower than those in the model group and low-dose muscone group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the middle-dose muscone group, the Racine staging of epileptic seizure and c-Fos expression in the high-dose muscone group were much lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** Muscone has certain antiepileptic effect with a dose-response relationship. This effect may be related to the inhibitory effect of c-Fos expression in brains.

KEY WORDS: muscone; epilepsy; kindling model; c-Fos

癫痫是神经系统常见病。癫痫发病机制复杂,至今尚未完全明了。近十年来,基因表达异常与癫痫之间的关系越来越受关注。研究表明^[1-2],即刻早期基因(IEGs) c-Fos、c-Jun 等与癫痫发病关系密切。急则治标,缓则治本是中医的治疗大法,癫痫急性发作期要开窍醒神以治其标。麝香酮是麝香的主要成分,具有芳香开窍、通经活络、消肿止痛作用。麝香酮及其制剂是神经科极其常用的药物,《本草纲目》记载,麝香即能治“中风”、“中气”,又能治“痰厥”、“惊痫”,现代研究显示^[3],较大剂量的麝香酮具有显著抗惊厥作用,但其作用机制及量效关系尚不十分清楚。本实验以戊四氮慢性点燃癫痫大鼠作为模型,观察不同剂量麝香酮对大鼠模型脑组织中 c-Fos 表达的影响,以探讨麝香酮抗痫作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康雄性 SD 大鼠 90 只,清洁级,体质量(180 ± 20) g,上海斯莱克公司购置,许可证号 SCXK(沪) 2012-0002。动物适应环境后随机分为 6 组,分别为正常对照组、模型对照组、麝香酮小剂量组、麝香酮中剂量组、麝香酮大剂量组、丙戊酸钠组,每组 15 只。

1.1.2 实验药物及主要试剂 戊四氮(上海 Adamas 公司,批号 P1071870);麝香酮(日本 TIC 公司,批号 P1134558);丙戊酸钠片(上海 Adamas 公司,批号 P1069366);Anti-c-Fos antibody(英国 Abcam 公司,批号 ab53036);二抗试剂盒

(上海长岛抗体诊断试剂有限公司,批号 1410171);TRIZOL(美国 Invitrogen 公司,货号 10296-010);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(日本 Takara 公司,货号 RR047Q);SYBR Premix Ex Taq(日本 Takara 公司,货号 DRR420A)。

1.1.3 主要仪器设备 轮转式病理切片机(德国,型号 RM2235);光学显微镜(日本 OLYMPUS,型号 BX51TF);全自动石蜡包埋机(德国 Leica 公司,型号 EG1160);全自动石蜡切片机(德国 Leica 公司,型号 RM2235);显微镜(日本 Nikon,型号 H500S);图像分析软件(日本 Nikon,型号 NIS-Element);超微量分光光度计(美国 Thermo,型号 Nanodrop8000);定量 PCR 仪(美国 LIFE 公司,型号 ABI7500);酶标仪(美国 Bio-Tek 公司,型号 ELx800);化学发光显影仪(美国 GE 公司,型号 LAS-4000)。

1.2 方法

1.2.1 药物配制 将戊四氮用生理盐水稀释至 1%。将麝香酮用 1% 吐温-80 助溶后,用生理盐水配制成 1、5、10 mg/mL。将丙戊酸钠片用生理盐水配制成 1.5 mg/mL 混悬液。每次配制 1 周药物,所有配制好的药物均密封后 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 模型建立及药物干预 模型建立及评价:正常对照组每天腹腔注射生理盐水 3.5 mL/kg,模型对照组、麝香酮小剂量组、麝香酮中剂量组、麝香酮大剂量组、丙戊酸钠组分别每天腹腔注射亚致痫量 1% 戊四氮 35 mg/kg,连续 4 周,然后停用造

模剂 1 周, 于第 5 周末次给予造模剂点燃测试, 凡显示连续 5 次达到 2 级及以上发作者为模型点燃成功^[4]。药物干预: 各干预药物自造模开始之日起同时给予, 干预药物先于造模剂 30 min 给予; 正常对照组及模型对照组均灌胃生理盐水 10 mL/kg; 麝香酮小、中、大剂量组分别灌胃麝香酮 10、50、100 mg/kg; 丙戊酸钠组灌胃丙戊酸钠混悬液 15 mg/kg, 各干预药物连用 5 周。

1.2.3 行为学观察 自实验之日起, 每天在给予造模剂之后, 按 Smialowki 6 级评分法^[5] (0 级, 没有行为上的发作; 1 级, 节律性点头或头部震颤; 2 级, 阵挛性咀嚼; 3 级, 头部颤搐加前肢阵挛性抽搐; 4 级, 袋鼠姿势; 5 级, 跌倒; 6 级, 强直性惊厥) 观察记录大鼠行为学表现 1 h, 第 5 周末行点燃测试。

1.2.4 脑组织的收集与处理 实验结束时, 随机选取 6 只大鼠, 麻醉后, 剖开腹腔, 于腹主动脉放置静脉留置针, 然后剪开下腔静脉, 每只大鼠快速灌注 200 mL 左右的生理盐水, 直至流出澄清液体, 开颅取脑, 分离脑皮质及海马, 冻存管 -80 ℃ 保存, 以备 Western blot 及 PCR 检测。将剩余大鼠同法处死取脑, 置于 4% 多聚甲醛溶液中, 放入 4 ℃ 冰箱保存, 以备免疫组化检测。

1.2.5 免疫组化检测 c-Fos 阳性细胞数 将脑组织冠状切片, 厚约 2 mm, 切片包括大脑皮质和海马。常规酒精梯度脱水, 石蜡包埋。将蜡块连续冠状切片, 厚约 4 μm。按 SP (链霉菌亲和素-过氧化物酶法) 两步法进行 c-Fos 阳性细胞测定, 镜下观察, 阴性细胞核为蓝色或浅蓝色, 阳性细胞核为黄色或棕黄色, 采用日本 Nikon 图像分析软件进行阳性细胞计数, 每张切片的皮质和海马相应部位各随机选取 3 个等面积不重复的视野 (200 倍), 计数阳性细胞, 分别将其平均值作为该只大鼠皮质和海马的阳性细胞数。

1.2.6 Western blot 检测 c-Fos 蛋白表达 取少量皮质及海马组织剪碎, 裂解, 匀浆, 离心, 吸取上清。检测蛋白浓度。然后上样, 电泳, 转膜。封闭液封闭后, 加入一抗过夜。次日漂洗膜后, 加入二抗。将硝酸纤维素膜置于 ODYSSEY 红外成像系统中进行扫描, 保存图像。采用光密度扫描分析软件 Image J 6.0 进行分析, 得到 c-Fos 相对平均吸光度值。

1.2.7 qRT-PCR 检测 c-fos mRNA 表达 取少量冻存皮质及海马, 液氮中研碎, 加 1 mL TRIZOL 溶

液, 混匀, 按说明书提取脑 RNA。通过分光光度计测定总 RNA 的量, 根据分光光度计 260 nm/280 nm 处的比值测定纯度, 满意后取样品 RNA 5 μg 进行反转录合成 cDNA。再取待测样品 cDNA 按说明书配制成总体积为 20 μL 的 RT-PCR 反应体系。7500 全自动荧光定量 PCR 仪 95 ℃, 30 s; 95 ℃, 5 s; 60 ℃, 34 s; 95 ℃, 15 s; 60 ℃, 60 s; 95 ℃, 15 s 反应条件循环 40 次进行实时定量 PCR 反应, 退火温度 57 ℃。以 *Gapdh* 作为内参基因 (内参序列为正向 5'-CATCAACGACCCCTTCATTG-3', 反向 5'-GAAGATGGTGATGGGTTTCC-3')。引物序列为正向 5'-CGGGTTTCAACGCGGACTA-3', 反向 5'-TTGGCACTAGACACGGACAGA-3'), 所有反应均设立 3 个复孔。记录每个反应管中标本的 Ct 值, 实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。 ΔCt = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值, $\Delta\Delta Ct$ 值 = 实验组 ΔCt - 对照组 ΔCt 。

1.2.8 统计学处理 用 SPSS 14.0 统计软件进行统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组计量资料比较采用单因素方差分析, 组间两两比较, 方差齐时用 LSD 法, 方差不齐时选用 Games-Howell 法。大鼠脑组织阳性细胞数与癫痫发作级别相关性作 Spearman 等级相关分析。以 $P < 0.05$ 作为差异有显著性的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学观察结果 在实验第 1 周, 除模型对照组较麝香酮大剂量组及丙戊酸钠组发作级别较高 ($P < 0.05$), 其余组大鼠癫痫发作级别比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。随后, 各组大鼠发作级别不断提高, 而模型对照组及麝香酮小剂量组发作级别提高较快, 麝香酮大剂量组及丙戊酸钠组级别提高较慢, 麝香酮中剂量组介于中间 (除模型对照组及麝香酮小剂量组第 4~5 周大鼠数量为 14 只外, 其余均为 15 只)。见表 1。

2.2 大鼠脑皮质及海马中 c-Fos 阳性细胞数比较 正常对照组皮质及海马中仅有少量 c-Fos 阳性细胞, 模型对照组皮质及海马中 c-Fos 阳性细胞数均明显多于麝香酮中、大剂量组及丙戊酸钠组 ($P < 0.01$)。麝香酮小剂量组皮质及海马中 c-Fos 阳性细胞数亦明显多于麝香酮中、大剂量组及丙戊酸钠组 ($P < 0.01$)。麝香酮中剂量组阳性细胞数多于麝香酮大剂量组及丙戊酸钠组 ($P < 0.01$)。麝香酮大剂量组及丙戊酸钠组阳性细胞数比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 2、图 1~2。

表 1 大鼠每周癫痫发作级别比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Weekly comparison of Racine stagings of epileptic seizure in rats ($\bar{x} \pm s$)

分组	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
模型对照组	0.47 ± 0.52	1.60 ± 0.63	2.93 ± 0.89	4.57 ± 0.85	3.79 ± 0.70
麝香酮小剂量组	0.40 ± 0.52	1.67 ± 0.62	3.07 ± 0.80	4.50 ± 0.76	3.71 ± 0.73
麝香酮中剂量组	0.07 ± 0.26	1.33 ± 0.62	2.67 ± 0.49	3.80 ± 0.68 * ▲	2.80 ± 0.68 **▲▲
麝香酮大剂量组	0.00 ± 0.00 *	1.00 ± 0.85 * ▲▲	2.00 ± 0.93 **▲▲△	3.00 ± 1.00 **▲▲△	1.53 ± 1.13 **▲▲△△
丙戊酸钠组	0.00 ± 0.00 *	0.80 ± 0.68 **▲▲△	1.93 ± 0.71 **▲▲△	3.13 ± 0.92 **▲▲△	1.73 ± 1.03 **▲▲△△

注：与模型对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与麝香酮小剂量组比较，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$ ；与麝香酮中剂量组比较，△ $P < 0.05$ ，△△ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠脑皮质及海马中 c-Fos 阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Numbers of c-Fos positive cells in rat cortex and hippocampus in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	阳性细胞数/(个·HP ⁻¹)	
		皮质	海马
正常对照组	9	14.89 ± 3.10 **	14.11 ± 2.71
模型对照组	8	171.13 ± 27.85	203.25 ± 22.73
麝香酮小剂量组	8	141.38 ± 27.31	212.13 ± 20.63
麝香酮中剂量组	9	89.22 ± 9.37 **▲▲	89.44 ± 4.88 **▲▲
麝香酮大剂量组	9	41.33 ± 5.24 **▲▲△△	40.44 ± 5.08 **▲▲△△
丙戊酸钠组	9	41.33 ± 5.41 **▲▲△△	37.33 ± 5.45 **▲▲△△

注：与模型对照组比较，** $P < 0.01$ ；与麝香酮小剂量组比较，▲▲ $P < 0.01$ ；与麝香酮中剂量组比较，△△ $P < 0.01$

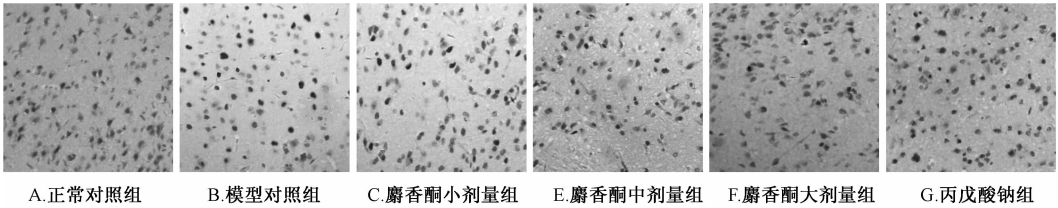


图 1 各组大鼠脑皮质中 c-Fos 阳性细胞图（免疫组化染色，×200）

Fig. 1 Images of c-Fos positive cells in rat cortex in each group (IHC, ×200)

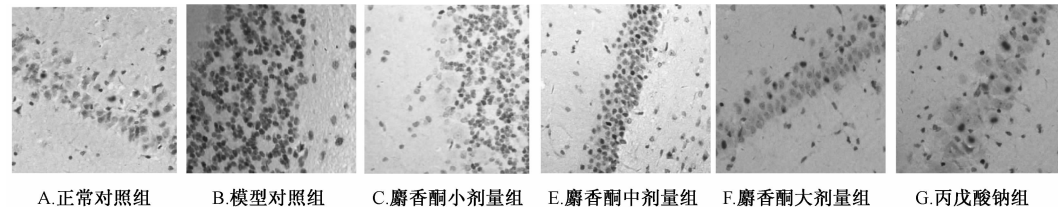


图 2 各组大鼠海马中 c-Fos 阳性细胞图（免疫组化染色，×200）

Fig. 2 Images of c-Fos positive cells in rat hippocampus in each group (IHC, ×200)

2.3 Western blot 检测 c-Fos 蛋白表达结果 正常对照组皮质及海马中仅有少量 c-Fos 蛋白表达，模型对照组皮质及海马中 c-Fos 蛋白表达明显高于麝香酮中、大剂量组及丙戊酸钠组（ $P < 0.01$ ）。麝香酮小剂量组皮质及海马中 c-Fos 蛋白表达亦明显高于麝香酮中、大剂量组及丙戊酸钠组（ $P < 0.01$ ）。麝香酮中剂量组 c-Fos 蛋白表达高于麝香酮大剂量组及丙戊酸钠组。麝香酮大剂量组及丙戊酸钠组 c-Fos 蛋白表达比较无统计学差异（ $P > 0.05$ ）。见图 3、表 3。

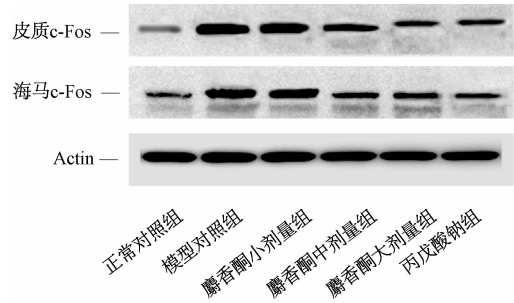


图 3 各组大鼠脑皮质及海马中 c-Fos 蛋白表达

Fig. 3 Expressions of c-Fos proteins in rat cortex and hippocampus in each group

表3 各组大鼠脑皮质及海马中 c-Fos 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Expressions of c-Fos proteins in rat cortex and hippocampus in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	c-Fos/Actin	
		皮质	海马
正常对照组	6	0.166 7 ± 0.016 3 **	0.178 3 ± 0.014 7 **
模型对照组	6	0.710 0 ± 0.101 8	0.678 3 ± 0.086 4
麝香酮小剂量组	6	0.701 7 ± 0.052 7	0.643 3 ± 0.050 9
麝香酮中剂量组	6	0.403 3 ± 0.042 7 **▲▲	0.396 7 ± 0.026 6 **▲▲
麝香酮大剂量组	6	0.263 3 ± 0.031 4 **▲▲△△	0.241 7 ± 0.024 8 **▲▲△△
丙戊酸钠组	6	0.268 3 ± 0.034 9 **▲▲△△	0.255 0 ± 0.010 6 **▲▲△△

注：与模型对照组比较，** $P < 0.01$ ；与麝香酮小剂量组比较，▲▲ $P < 0.01$ ；与麝香酮中剂量组比较，△△ $P < 0.01$

2.4 qRT-PCR 检测皮质及海马中 *c-fos* mRNA 表达结果 正常对照组皮质及海马中仅有少量 *c-fos* mRNA 表达，模型对照组皮质及海马中 *c-fos* mRNA 表达明显高于麝香酮中、大剂量组及丙戊酸钠组 ($P < 0.01$)。麝香酮小剂量组皮质及海马中 *c-fos* mRNA 表达亦明显高于麝香酮中、大剂量组及丙戊酸钠组 ($P < 0.01$)。麝香酮中剂量组 *c-fos* mRNA 表达高于麝香酮大剂量组及丙戊酸钠组 ($P < 0.01$)。麝香酮大剂量组及丙戊酸钠组 *c-fos* mRNA 表达比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表4。

表4 各组大鼠脑皮质及海马中 c-fos mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Expressions of c-fos mRNA in rat cortex and hippocampus in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	c-fos mRNA	
		皮质	海马
正常对照组	6	1.485 0 ± 0.265 8 **	1.426 7 ± 0.281 9 **
模型对照组	6	10.388 3 ± 2.540 7	11.676 7 ± 2.617 3
麝香酮小剂量组	6	10.901 7 ± 2.302 0	10.066 7 ± 1.881 0
麝香酮中剂量组	6	5.521 7 ± 0.979 6 **▲▲	4.321 7 ± 0.703 8 **▲▲
麝香酮大剂量组	6	3.113 3 ± 0.720 9 **▲▲△△	2.740 0 ± 0.734 6 **▲▲△△
丙戊酸钠组	6	2.850 0 ± 0.740 0 **▲▲△△	2.511 7 ± 0.443 1 **▲▲△△

注：与模型对照组比较，** $P < 0.01$ ；与麝香酮小剂量组比较，▲▲ $P < 0.01$ ；与麝香酮中剂量组比较，△△ $P < 0.01$

2.5 大鼠脑内 c-Fos 阳性表达与癫痫发作级别的相关性分析 将大鼠脑皮质及海马 c-Fos 阳性细胞数与实验终末时大鼠发作级别作 Spearman 相关分析，可以得出其相关方程及 Spearman 等级相关系数分别为 $Y_1 = 28.995X_1 + 14.05$, $r_{s1} = 0.778$; $Y_2 = 38.768X_2 + 6.570 2$, $r_{s2} = 0.795$ ，表明大鼠脑皮质及海马中 c-Fos 阳性表达水平与大鼠发作级别呈正相关。见图4。

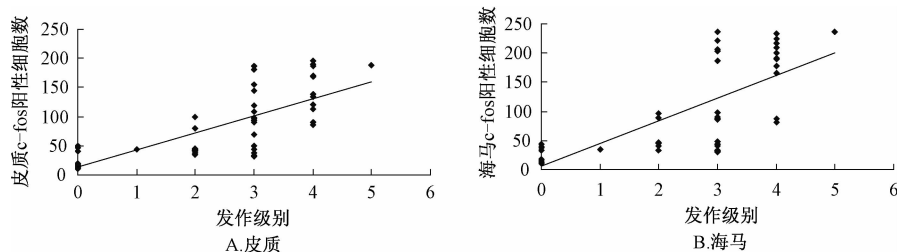


图4 大鼠脑皮质及海马 c-Fos 阳性细胞数与癫痫发作级别 Spearman 相关分析

Fig.4 Spearman correlation analysis between the numbers of c-Fos positive cells in rat cortex and hippocampus and Racine stagings of epileptic seizure

3 讨论

癫痫是以脑神经元同步异常放电引起反复痫性发作为特征的短暂脑功能失调综合症，中医称之为“羊痫风”、“羊角风”、“痫病”等。中医学对癫痫的认识由来已久，早在长沙马王堆汉墓出土的《五十二病方》中，就有“婴儿病痫”的描述。历代医家对癫痫的病因病机多有论述，但其病机不外乎惊、风、火、痰、瘀、虚等几个方面，而以痰涎壅塞，迷闷孔窍最为重要。急则治标，缓则治本 是中医的治疗大法，癫痫急性发作期要开窍醒神以治其标。麝香酮是麝香经蒸馏提取得到的活性成分之一，是麝香的主要成分，具有芳香开窍、通经活络、消肿止痛作用。药代动力学显示^[3]，无论是灌胃或静脉注射麝香酮均能迅速透过血脑屏障，进

入脑组织,并蓄积较长一段时间,这是麝香酮用于神经科急症治疗的重要药理基础。《本草纲目》记载,麝香既能治“中风”、“中气”,又能治“痰厥”、“惊痫”等症。现代医学研究^[3]发现,100~500 mg/kg剂量的麝香酮可使戊巴比妥钠引起的小鼠睡眠时间延长,并呈量效关系。另有研究表明^[6-7],麝香酮可以提高中枢耐缺氧能力,防止脑组织损伤,这是其醒脑开窍的重要机理之一。本次研究发现,中、大剂量的麝香酮能够抑制戊四氮诱发癫痫发作,降低其发作级别,随着给药时间延长,其作用愈加明显,并呈量效关系,小剂量麝香酮未显示出抗痫作用。

研究表明^[2,8],c-Fos 普遍存在于中枢神经系统中,一般情况下 c-Fos 表达水平较低,但在机体受到外伤、缺血、癫痫发作等刺激后,c-Fos 表达水平就会有很大变化。c-Fos 与癫痫关系密切。一方面,癫痫发作可以导致 c-Fos 的大量表达。Peng 等^[1]研究表明,颞叶癫痫大鼠模型在发作 15 min 后,其齿状回颗粒细胞中就会有 c-Fos 的明显表达。Sng 等^[9]在红藻氨酸癫痫模型脑组织中检测到 c-Fos 蛋白快速一过性高表达。Cunningham 等^[2]在植入电极刺激迷走神经兴奋诱发癫痫的急性模型中,均检测到 c-Fos 蛋白的大量表达,急性模型中 c-Fos 表达部位主要在孤束核、下丘脑室旁核、臂旁核、纹状体腹侧核及蓝斑,而在扣带回皮质及背缝神经核未见表达,在慢性模型中所有脑组织均见 c-Fos 过度表达。Mihaly^[8]等研究表明 c-Fos 的表达对癫痫定位及示踪起着很重要的作用,机体受到刺激后 c-Fos 蛋白的表达部位往往是受癫痫影响的部位,最先表达的部位往往是癫痫的起源部位,c-Fos 的表达顺序可能是癫痫波传播的顺序。另一方面,c-Fos 的过表达又可以导致癫痫灶的形成及癫痫发病。c-Fos 与 c-Jun 等磷蛋白,通过亮氨酸拉链形成同源或异源二聚体激活蛋白-1(AP-1),AP-1 作为第三信使与许多后期反应基因(LRG)的 AP-1 结合位点结合,调节靶基因长时程的表达,这些靶基因可编码细胞的各种蛋白如神经递质、神经营养因子、神经调节因子、受体和突触结构蛋白等,进而导致神经网络的兴奋性及神经元的固有成分发生改变,最终导致癫痫灶的形成和癫痫的发病。国内学者的大量研究报道^[10-11]亦显示 c-Fos 与癫痫的发生发展有着密切关系。可见,癫痫发作能引起 c-Fos、c-Jun 的大量表达,而 c-Fos、c-Jun 长期大量的表达又最终导致癫痫灶的形

成和癫痫的发病,二者关系密切。目前,已有很多研究^[12-14]将 c-Fos 的表达用于药物抗痫疗效评价及机制探讨。因此,c-Fos 可作为中枢神经系统功能活动的代谢性标志物,它已被广泛的应用于癫痫的定位示踪,机理探讨及抗痫药物的筛选和评价中。

本次研究结果显示,模型对照组大鼠脑组织中有大量 c-Fos 基因及蛋白的表达,其表达部位主要分布在梨状皮质、额叶及海马等部位,而尤以海马齿状回及 CA1 区、CA3 区表达最为明显,而中、大剂量麝香酮能明显抑制戊四氮所致癫痫大鼠脑内 c-Fos 的表达,无论是 c-Fos 蛋白还是 c-fos mRNA 的表达均较模型对照组有明显下降,二者比较有统计学差异。在 c-Fos 表达水平与大鼠发作级别相关性分析中,我们看到二者存在较强的正向相关性,进一步说明 c-Fos 与癫痫发作之间关系密切。

由此提示,c-Fos 参与了癫痫的发病和癫痫灶的形成,而麝香酮能较好的抑制癫痫形成过程中脑内 c-Fos 的表达,有效阻止癫痫的发病及癫痫灶的形成。初步推断麝香酮的抗痫作用可能与其阻断脑内 c-Fos 的表达有关,确切机制有待进一步研究明确。

参考文献:

- [1] Peng Z, Houser C R. Temporal patterns of fos expression in the dentate gyrus after spontaneous seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy [J]. *J Neurosci*, 2005, 25 (31): 7210-7220.
- [2] Cunningham J T, Mifflin S W, Gould G G, et al. Induction of c-Fos and Delta FosB immunoreactivity in rat brain by vagal nerve stimulation [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33 (8): 1884-1895.
- [3] 侯家玉. 中药药理学[M]. 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2004: 193-194.
- [4] 王 丽, Ono J, Walson P D. 大鼠戊四唑点燃模型的建立 [J]. *药学报*, 1993, 28(7): 486-489.
- [5] Ono J, Walson P D. Lack of tolerance to anticonvulsant effects of clonazepam in a rat pentylenetetrazol induced kindled seizure model [J]. *Funct Neurol*, 1994, 9(1): 3-9.
- [6] 孙 蓉, 张作平, 黄 伟, 等. 麝香酮对完全性脑缺血大鼠的保护作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 20(3): 197-200.
- [7] 张 壮, 闰彦芳, 赵可星, 等. 麝香酮对 SH-SY5Y 神经细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤的保护作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(6): 340-343.
- [8] Mihaly A, Szakaacs R, Bohata C, et al. Time-dependent distribution and neuronal localization of c-fos protein in the rat hippocampus following 4-aminopyridine seizures [J]. *Epilepsy Res*, 2001, 44(2-3): 97-108.

[9] Sng J C, Taniura H, Yoneda Y. Histone modifications in kainate-induced status epilepticus[J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(5): 1269-1282.

[10] 陈 功,江澄川,杨 茹. 海马硬化型癫痫颞叶的病理学及 c-fos、c-jun 表达研究[J]. *中华神经外科*, 2005, 21(8): 464-467.

[11] 刘 玲,王维平,刘宝军. 丹参对慢性癫痫模型大鼠脑电图及脑内 c-fos 和 GFAP 表达的影响[J]. *中成药*, 2006, 28(11): 1677-1679.

[12] 黄运生,陈宝田,谢 炜,等. 柴胡疏肝汤对戊四氮致痫大鼠海马及额叶皮质 c-fos 表达的影响[J]. *中华神经医学杂志*, 2011, 10(7): 662-665.

[13] 姜广宇,董 航,廉晓宇,等. 托吡酯对慢性癫痫大鼠海马区脑组织 c-fos、c-jun 表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(15): 4189-4190.

[14] 庞伟冰,邱家琦,林晓冰,等. 痫宁喷雾剂对癫痫大鼠海马 c-fos 表达的影响[J]. *山西中医*, 2014, 30(3): 42-44.

车前子中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷降低急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平及其机制

曾金祥¹, 许兵兵¹, 王 娟¹, 毕 莹², 王晓云¹, 钟国跃¹, 任 刚¹, 朱继孝^{1*}, 李敏¹, 朱玉野¹

(1. 江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 江西 南昌 330004; 2. 南昌市第三医院, 江西 南昌 330009)

摘要: **目的** 探讨车前子中毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷对急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平的影响及作用机理。**方法** 口服氧嗪酸钾建立急性高尿酸血症模型, 80 只模型小鼠均分成模型组 (生理盐水), 低、中、高剂量毛蕊花糖苷 (50、100、200 mg/kg) 组, 低、中、高剂量异毛蕊花糖苷 (50、100、200 mg/kg) 组与别嘌呤醇 (10 mg/kg) 组, 另设正常组 (生理盐水)。连续灌胃 7 d, 观察急性高尿酸血症小鼠血清尿酸、肌酐、肝脏黄嘌呤氧化酶 (XOD) 的活性, 毛蕊花糖苷对肾脏转运蛋白 *Oat1* (有机阴离子转运体 1)、*Urat1* (尿酸盐阴离子转运体 1) 及 *Glut9* (果糖转运体 9) mRNA 表达的影响。**结果** 与正常组相比, 模型组显著增高小鼠血清尿酸与肌酐含量和肝脏 XOD 活性, 并下调肾脏尿酸转运体 *Oat1* 的 mRNA 表达, 上调肾脏尿酸转运体 *Urat1* 及 *Glut9* 的 mRNA 表达。与模型组比较, 毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷均显著降低肌酐水平, 而毛蕊花糖苷有降尿酸活性。**结论** 毛蕊花糖苷降低血尿酸水平的作用机制可能为抑制 XOD 活性, 下调肾脏转运蛋白 *Urat1* 与 *Glut9* 的 mRNA 表达。而异毛蕊花糖苷能改善肾脏功能防止肾脏损伤, 具有轻微降血尿酸作用。

关键词: 车前子; 毛蕊花糖苷; 异毛蕊花糖苷; 高尿酸血症; 痛风

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)07-1449-06

doi:10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2016. 07. 003

Hypouricemic effects of acteoside and isoacteoside from *Plantaginis Semen* on mice with acute hyperuricemia and their possible mechanisms

ZENG Jin-xiang¹, XU Bing-bing¹, WANG Juan¹, BI Ying², WANG Xiao-yun¹, ZHONG Guo-yue¹, REN Gang¹, ZHU Ji-xiao^{1*}, LI Min¹, ZHU Yu-ye¹

(1. Research Center of Chinese Medicine Resource and National Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Nanchang No. 3 Hospital, Nanchang 330009, China)

收稿日期: 2015-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81260630); 江西省卫生厅项目 (2015B047)

作者简介: 曾金祥 (1974—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础与生物传感研究。Tel: (0791) 87119065, E-mail: zjinxiang@163.com

* **通信作者:** 朱继孝 (1981—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药有效成分与作用机理研究。Tel: (0791) 87119062, E-mail: zhujx81@sina.com