

## ◆方药研究◆

# 钩藤碱对惊厥持续状态幼年大鼠血清 SOD 水平和海马组织 TLR4 表达的影响

王常普<sup>1</sup>, 蔡小平<sup>2</sup>

1. 濮阳市中医院, 河南 濮阳 457001; 2. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004

**[摘要]** 目的: 观察钩藤碱对惊厥持续状态幼年大鼠血清超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和海马组织 Toll 样受体 4 (TLR4) 表达的影响。方法: 160 只幼年 SD 雄性大鼠随机分成正常组、模型组和钩藤碱低、中、高各剂量组, 每组 32 只, 各组再按不同时间点分为 4 h、24 h、48 h 和 72 h 4 个亚组。采用腹腔注射氯化锂-匹鲁卡品复制幼年大鼠惊厥持续状态模型, 钩藤碱低、中、高剂量组于造模后分别给予钩藤碱 [10、20、40 mg/(kg·d)] 腹腔注射, 每天 1 次, 连用 3 天, 正常组、模型组腹腔注射等体积生理盐水。羟胺法检测大鼠血清中 SOD 活性, 免疫组化法检测大鼠海马组织中 TLR4 的表达情况。结果: 模型组大鼠惊厥后 4 h 时血清 SOD 活性降低, 海马组织 TLR4 的表达增加, 48 h 达到峰值, 4 个时间点模型组大鼠血清 SOD 值均低于正常组, 海马组织 TLR4 的表达均高于正常组 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 钩藤碱各剂量组大鼠血清 SOD 活性均显著升高, 以 24 h、48 h 和 72 h 时较明显; 钩藤碱各剂量组大鼠海马组织 TLR4 的表达均显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 钩藤碱各剂量组大鼠血清 SOD 活性随着钩藤碱剂量增大而增强, 海马组织 TLR4 的表达随着钩藤碱剂量增大而减少。结论: 钩藤碱可增加惊厥持续状态幼年大鼠血清 SOD 活性, 下调海马组织 TLR4 的表达, 提示钩藤碱可能对持续惊厥引起的脑损伤有保护作用。

**[关键词]** 惊厥持续状态; 钩藤碱; 超氧化物歧化酶 (SOD); Toll 样受体 4 (TLR4); 动物实验; 大鼠

**[中图分类号]** R741 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 03-0006-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.03.002

## Rhynchophylline Has Effect on Level of Serum SOD and Expression of TLR4 in Hippocampus of Young Rats after Status Convulsion

WANG Changpu, CAI Xiaoping

**Abstract:** **Objective:** To observe the effect of rhynchophylline on activity of serum superoxide dismutase (SOD) and expression of Toll-like receptors 4 (TLR4) in hippocampus of young rats after status convulsion. **Methods:** Divided 160 male SD young rats randomly into the normal group, the model group, as well as the low, middle, and high dose of rhynchophylline groups, 32 rats in each group. Each group was further divided into four subgroups according to different time points: 4 h subgroup, 24 h subgroup, 48 h subgroup and 72 h subgroup. Adopted intraperitoneal injection of lithium chloride-pilocarpine to replicate the model of young rats after status convulsion. After the establishment of model, the low, middle, and high dose of rhynchophylline groups were respectively given 10 mg/(kg·d), 20 mg/(kg·d) and 40 mg/(kg·d) of rhynchophylline by intraperitoneal injection once a day for 3 days. The normal group and the model group received intraperitoneal injection of the same volume of saline. Activity of serum SOD of rats was detected by hydroxylamine method and expression of TLR4 in hippocampus of rats was detected by immunohistochemical method. **Results:** Activity of serum SOD of rats in the model group was decreased at 4 h after convulsion, while expression of TLR4 in hippocampus of rats was increased and reached the peak at 48 h. Activity of serum SOD of rats in the model group at 4 time points was respectively lower than that in the normal group, while expression of TLR4 in hippocampus of rats in the model group was higher than

**[收稿日期]** 2017-09-14

**[作者简介]** 王常普 (1959-), 男, 副主任医师, 研究方向: 中医药治疗慢性病。

**[通信作者]** 蔡小平, E-mail: wzhl269@126.com。

that in the normal group( $P < 0.01$ ). Comparing with that in the model group, activity of serum SOD of rats in each dose group of rhynchophylline was increased obviously and was most obviously at 24 h, 48 h and 72 h. Expression of TLR4 in hippocampus of rats in each dose group of rhynchophylline was obviously decreased( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Activity of serum SOD of rats in each dose group of rhynchophylline was enhanced with the increase of concentration of rhynchophylline, while expression of TLR4 in hippocampus of rats was decreased with the increase of concentration of rhynchophylline. **Conclusion:** Rhynchophylline can increase activity of serum SOD and down-regulate expression of TLR4 in hippocampus of young rats after status convulsion, indicating that rhynchophylline may have protective effect on brain injury caused by status convulsion.

**Keywords:** Status convulsion; Rhynchophylline; Superoxide dismutase (SOD); Toll-like receptors 4 (TLR4); Animal experiment; Rats

惊厥是儿科较常见的急症,好发于6个月~5岁儿童,惊厥反复发作或处于持续状态而未能有效治疗时,可造成进行性脑损伤,给家庭及社会带来沉重负担<sup>[1]</sup>。钩藤碱是钩藤的主要有效成分之一,化学结构属于吲哚类生物碱<sup>[2]</sup>,钩藤碱的药理作用广泛,具有降低血压、收缩外周血管、降低血管阻力、抗血小板聚集、镇静以及抗惊厥等作用<sup>[3]</sup>,但对惊厥性脑损伤是否有保护作用未见报道。本研究通过建立惊厥持续状态大鼠模型,观察惊厥并给药后大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)水平和海马 Toll 样受体 4(TLR4)表达的动态变化,为临床治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 18日龄SD大鼠,SPF级,雄性,160只,体质量60~70g,河南省实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(豫)2015-0004,适应性饲养1周后进行实验。SPF级实验室由河南省中医药研究院实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK(豫)2012-0009。

**1.2 实验试剂** 钩藤碱(成都德思特生物技术有限公司);匹鲁卡品、氯化锂(美国Sigma公司);硫酸阿托品注射液(湖北科伦药业有限公司);SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所);兔抗TLR4多克隆抗体、SABC试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

**1.3 实验仪器** 680型酶标仪(美国Bio-Rad公司);RM2245型病理切片机(德国徕卡公司);GL-20B型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

**1.4 分组与模型制备** SD幼年大鼠腹腔注射氯化锂(120 mg/kg),18 h后腹腔注射阿托品(1 mg/kg)以拮抗匹鲁卡品外周胆碱能反应,30 min后腹腔注射匹鲁卡品(100 mg/kg),观察并记录大鼠惊厥发作级别。0级:无发作迹象;1级:面部抽动;2级:点头、湿狗样抖动;3级:前肢阵挛抽搐;4级:全身强直伴后肢

站立;5级:全身强直痉挛。惊厥发作4级以上且时间持续达30 min,惊厥缓解后状态良好的大鼠为合格大鼠模型<sup>[4]</sup>。模型复制成功大鼠随机分为模型组、钩藤碱低剂量组、钩藤碱中剂量组、钩藤碱高剂量组4组,每组32只,另取32只正常幼年大鼠作为正常组,各组再按时间点随机分为4 h、24 h、48 h和72 h 4个亚组,每个亚组8只。钩藤碱低、中、高剂量组于造模后分别给予钩藤碱[10、20、40 mg/(kg·d)]腹腔注射,每天1次,连用3天,正常组、模型组腹腔注射等体积生理盐水。

**1.5 血清 SOD 测定** 按照预定时间点用乌拉坦麻醉大鼠,腹主动脉取血,3 000 r/min离心10 min,分离血清,羟胺法测定血清SOD活性。

**1.6 海马组织 TLR4 的表达测定** 取大鼠脑组织后快速分离海马组织,4%多聚甲醛固定,脱水、石蜡包埋后切片,二甲苯脱蜡后乙醇水化,修复抗原,灭活内源性过氧化氢酶,正常山羊血清封闭,TLR4一抗孵育过夜,滴加生物素化二抗,37℃孵育,滴加SABC,孵育,DAB显色后复染,显微镜下观察并采集图像。用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统分析TLR4免疫反应阳性的平均光密度值(Mean Optical Density, MOD)。每张切片随机取3个视野分析,取其平均值。

**1.7 统计学方法** 采用SPSS17.0软件对结果进行统计分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD检验。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠血清 SOD 水平比较** 见表1。模型组大鼠惊厥后4 h血清SOD活性降低,48 h达到峰值,4个时间点模型组大鼠血清SOD值均低于正常组( $P < 0.01$ )。与模型组比较,钩藤碱各剂量组大鼠血清SOD活性均显著升高,以24 h、48 h和72 h时较明

显( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 钩藤碱各剂量组大鼠血清 SOD 活性随着钩藤碱剂量增大而增强, 呈剂量依赖关系。

表 1 各组大鼠血清 SOD 水平比较( $\bar{x} \pm s$ ) U/mL

组别	n	SOD			
		4 h	24 h	48 h	72 h
正常组	8	137.93±8.58	136.04±7.61	137.85±8.09	136.39±8.20
模型组	8	125.63±7.25 <sup>①</sup>	104.06±6.92 <sup>①</sup>	96.84±5.53 <sup>①</sup>	101.85±6.56 <sup>①</sup>
钩藤碱低剂量组	8	129.77±6.38	115.37±5.80 <sup>②</sup>	113.25±6.64 <sup>②</sup>	118.27±7.34 <sup>②</sup>
钩藤碱中剂量组	8	132.25±6.81	123.72±6.27 <sup>③</sup>	121.32±7.53 <sup>③</sup>	126.43±6.81 <sup>③</sup>
钩藤碱高剂量组	8	135.38±7.04 <sup>②</sup>	127.31±6.85 <sup>③</sup>	130.06±6.82 <sup>③</sup>	134.33±7.05 <sup>③</sup>

与正常组比较, ① $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$ , ③ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠海马组织 TLR4 表达比较 见表 2。模型组大鼠惊厥后 4 h 海马组织 TLR4 的表达增加, 48 h 达到峰值, 4 个时间点模型组大鼠海马组织 TLR4 的表达均高于正常组( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 钩藤碱各剂量组大鼠海马组织 TLR4 的表达均显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 钩藤碱各剂量组大鼠海马组织 TLR4 的表达随着钩藤碱剂量增大而减少。

表 2 各组大鼠海马组织 TLR4 表达比较( $\bar{x} \pm s$ ) 平均光密度值

组别	n	TLR4 的表达			
		4 h	24 h	48 h	72 h
正常组	8	0.124±0.026	0.131±0.024	0.128±0.025	0.129±0.026
模型组	8	0.241±0.043 <sup>①</sup>	0.327±0.046 <sup>①</sup>	0.473±0.058 <sup>①</sup>	0.406±0.069 <sup>①</sup>
钩藤碱低剂量组	8	0.193±0.031 <sup>②</sup>	0.242±0.041 <sup>③</sup>	0.344±0.047 <sup>③</sup>	0.281±0.054 <sup>③</sup>
钩藤碱中剂量组	8	0.166±0.029 <sup>③</sup>	0.189±0.033 <sup>③</sup>	0.212±0.038 <sup>③</sup>	0.172±0.028 <sup>③</sup>
钩藤碱高剂量组	8	0.146±0.024 <sup>③</sup>	0.155±0.025 <sup>③</sup>	0.169±0.028 <sup>③</sup>	0.150±0.026 <sup>③</sup>

与正常组比较, ① $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$ , ③ $P < 0.01$

### 3 讨论

惊厥是儿科常见的急症, 尤多见于婴幼儿, 表现为突然的全身或局部肌群呈强直性和阵挛性抽搐, 常伴有意识障碍, 其在儿童时期的发生率较一般人群高 5~10 倍, 发病率约为 3%~5%。一次惊厥发作持续 30 min 以上或反复多次发作且间歇期意识不恢复者称为惊厥持续状态, 其中 20% 的患者为反复发作或持续状态。惊厥反复发作或持续状态会危及患者生命或产生严重的后遗症, 影响智力发育和健康, 因此及时控制惊厥发作对患儿生长发育具有积极的意义。

惊厥常导致机体代谢明显加强, 能量消耗增加,

氧供应不足, 脑组织缺氧, 产生大量的氧自由基。氧自由基不但可以通过生物膜中多不饱和脂肪酸的过氧化反应攻击脑细胞脂质膜, 而且通过脂质氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤, 导致细胞膜构型和结构的破坏<sup>⑤</sup>。SOD 是机体清除体内氧自由基的重要酶之一, SOD 活性的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力<sup>⑥</sup>。本研究显示, 大鼠惊厥后 4 h 血清 SOD 活性开始降低, 48 h 达到最低值, 至 72 h 时血清 SOD 活性仍低于正常大鼠。

TLR4 是一种跨膜识别受体, 分为细胞外、细胞膜和细胞内 3 部分, 是 TLRs 家族中最复杂的成员, 在中枢神经系统可表达于神经细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞等。TLR4 活化后, TIR 结构域与下游接头分子 Mal/TIRAP 和 TRAM/TRIF 结合, 主要通过 TRIF 和 MyD88 依赖的两条信号通路激活 NF- $\kappa$ B, 活化的 NF- $\kappa$ B 进入细胞核发挥转录调控作用, 激活 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\beta$  等细胞因子的表达<sup>⑦</sup>, 诱导细胞凋亡。TLR4 在惊厥小鼠的脑实质、海马组织、室管膜、微脉管系统和脉络丛等周围的神经细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞均大量表达, 抑制 TLR4 后惊厥发作程度减轻。本研究显示, 大鼠惊厥后海马组织 TLR4 的表达增加, 与临床报道一致<sup>⑧</sup>。

钩藤是我国常用中药材, 对中枢神经、心血管和血液系统等具有广泛的药理作用, 钩藤对中枢神经系统主要表现为镇静、抗癫痫、抗惊厥和对神经元的保护等。钩藤碱是钩藤的主要有效成分之一, 毒性低, 副作用较小, 临床用于治疗高血压、哮喘、癫痫等疾病。本实验结果表明, 钩藤碱能降低惊厥持续状态幼年大鼠血清 SOD 水平和海马组织 TLR4 的表达, 且呈剂量依赖关系, 这可能是钩藤碱镇静抗癫痫的作用机制之一。

### [参考文献]

- [1] Kimia AA, Bachur RG, Torres A, et al. Febrile seizures: emergency medicine perspective [J]. Curr Opin Pediatr, 2015, 27(3): 292-297.
- [2] 付金娥, 龙海荣, 谷筱玉, 等. 不同产地钩藤中钩藤碱含量比较研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(12): 3000-3001.
- [3] 张丽心, 孙涛, 曹永孝. 钩藤碱的降压及舒张血管作用[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 39-41.
- [4] 熊佳佳, 蒋莉, 陈恒胜, 等. 持续惊厥后幼年大鼠海马



- 电生理学变化及脑源性神经营养因子表达变化[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(2): 155-160.
- [5] 刘利群, 毛定安, 薄涛, 等. 川芎嗪对幼鼠惊厥性脑损伤脂质过氧化及抗氧化水平的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(4): 253-256.
- [6] 付俊鲜, 杨光路. 醒脑静注射液联合高压氧治疗病毒性脑炎疗效及对血清 SOD 活性、MDA 含量及脑神经损害的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(32): 3606-3608.
- [7] Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential[J]. Clin Sci(Lond), 2011, 121(9): 367-387.
- [8] 周琴, 李光乾, 张勤. 惊厥持续状态后大鼠海马 TLR4、IL-1 $\beta$  的表达及意义[J]. 浙江医学, 2014(16): 1375-1378.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

## 肾炎消白颗粒对肾炎模型大鼠 Nephrin 蛋白表达的影响

曹尚美<sup>1</sup>, 黄雯静<sup>2</sup>, 王立范<sup>3</sup>

1. 漯河市中心医院, 河南 漯河 462000
2. 山东省莱芜市中医医院, 山东 莱芜 271100
3. 黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

**【摘要】目的:** 观察肾炎消白(SYXB)颗粒对肾炎模型大鼠肾脏组织中 Nephrin 蛋白表达的影响, 探讨其作用机理。**方法:** 100 只 Wistar 雄性大鼠随机分为空白组、模型组、洛汀新组、中药低剂量组、中药高剂量组, 每组 20 只。采用一次性尾静脉注射阿霉素制造肾炎蛋白尿大鼠模型。空白组、模型组灌胃蒸馏水 2 mL/d, 洛汀新组灌胃洛汀新 0.90 mg/kg, 中药高、低剂量组分别灌胃 SYXB 颗粒 3.60、1.80 g/kg, 每天 1 次, 1 周连续给药 6 次, 共给药 7 周。收集大鼠随机尿液, 检测尿蛋白排泄量。3 周末、5 周末分别取 3 只大鼠, 取右肾, 7 周末所有剩余大鼠取右肾, 免疫组化检测大鼠肾脏组织 Nephrin 蛋白表达情况, HE 染色观察肾脏病理组织学变化。**结果:** 与空白组比较, 模型组大鼠各时间点尿蛋白/尿肌酐比值显著升高, 肾脏组织 Nephrin 蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 洛汀新组大鼠各时间点尿蛋白/尿肌酐比值显著降低, 肾脏组织 Nephrin 蛋白表达显著升高; 中药高剂量组大鼠在第 3、4、5、6、7 周尿蛋白/尿肌酐比值显著降低, 各时间点肾脏组织 Nephrin 蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与洛汀新组比较, 中药高剂量组大鼠在第 5、6、7 周尿蛋白/尿肌酐比值降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与第 3 周末比较, 洛汀新组、中药高、低剂量组大鼠各时间点肾脏组织 Nephrin 蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论:** SYXB 颗粒可能通过上调阿霉素肾病大鼠肾脏组织中 Nephrin 蛋白表达, 从多部位修复损伤的足细胞。在阿霉素肾病大鼠蛋白尿的治疗中, SYXB 颗粒显著优于洛汀新, SYXB 颗粒高剂量组优于低剂量组。

**【关键词】** 阿霉素肾病; 蛋白尿; Nephrin; 肾炎消白颗粒 (SYXB 颗粒); 动物实验; 大鼠

**【中图分类号】** R692.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 0256-7415 (2018) 03-0009-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.03.003

## Shenyan Xiaobai Granules Has Effect on Nephrin Protein Expression of Nephritis Models of Rats

CAO Shangmei, HUANG Wenjing, WANG Lifan

**Abstract:** **Objective:** To observe the effect of Shenyan Xiaobai(SYXB) granules on Nephrin protein expression of nephritis models of rats in renal tissue, and investigate its mechanism. **Methods:** Divided 100 Wistar male rats into the blank group, the model group, Lotensin group, Chinese medicine low-dose group, and Chinese medicine high-dose group randomly, 20

**【收稿日期】** 2017-09-04

**【作者简介】** 曹尚美 (1987-), 女, 主治医师, 主要从事肾病方面的研究。

**【通信作者】** 王立范, E-mail: wlf4648374@163.com。