

化浊解毒疏肝方对戊四氮致痫模型大鼠学习记忆能力及 AC-cAMP-CREB 通路的影响

平 鑫^{1,2}, 秦少坤², 刘书宁², 芦 晔¹, 曹亚飞², 张延红², 赵亚男², 裴 林^{1*}, 张少丹^{3*}

(1. 河北省中医药科学院, 河北 石家庄 050031; 2. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200; 3. 河北医科大学第二医院, 河北 石家庄 050073)

摘要:目的 研究化浊解毒疏肝方对戊四氮致痫模型大鼠学习记忆能力及 AC-cAMP-CREB 通路的影响。方法 60 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组, 模型组, 丙戊酸钠组, 化浊解毒疏肝方低、高剂量组, 每组 12 只。戊四氮化学点燃法诱导建立癫痫大鼠模型, 采用行为学实验评估各组大鼠学习记忆能力, 免疫荧光法和 Western blot 法检测大鼠海马组织中 AC、cAMP、CREB、pCREB 蛋白表达。结果 与模型组比较, 化浊解毒疏肝方高剂量组和丙戊酸钠组大鼠癫痫发作情况得到改善 ($P<0.05$), 学习记忆能力提升 ($P<0.05$), 海马组织中 AC、cAMP、CREB、pCREB 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与化浊解毒疏肝方低剂量组比较, 化浊解毒疏肝方高剂量组和丙戊酸钠组大鼠学习记忆能力提升 ($P<0.05$, $P<0.01$), 海马组织中 AC、cAMP、CREB、pCREB 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 化浊解毒疏肝方可能通过调节 AC-cAMP-CREB 通路相关蛋白表达, 影响突触可塑性, 从而改善癫痫大鼠的学习记忆能力损伤。

关键词: 化浊解毒疏肝方; 癫痫; 学习记忆能力; AC-cAMP-CREB 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1938-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.038

癫痫是一种大脑神经元异常同步放电, 导致出现中枢神经功能障碍的疾病。我国癫痫患者约有 1 000 万^[1], 而其中约 30% 癫痫患者出现了学习记忆能力障碍, 严重降低患者的生活质量^[2]。

癫痫患者发生学习记忆功能损伤的机制尚不明朗, 且影响因素较复杂, 目前较多研究认为其机制与神经递质异常、脑组织受损、氧化应激等有关^[3-6]。环磷酸腺苷 (cAMP) 是由激活腺苷酸环化酶 (AC) 催化腺嘌呤核苷三磷酸水解而生成, 其核蛋白——环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 (CREB) 是产生转录变化的传导因子, 在调控信号通路中起到关键作用, 其活化后参与了调节突触可塑性和长期记忆形成的过程, 在调节工作和学习记忆等生物学功能中发挥着重要作用^[7-8]。

化浊解毒疏肝方, 原名调肝解毒方, 是基于“浊毒”理论研究的中药复方, 认为“痫病”可归因于风、火、痰、瘀、五脏功能失调, 之后内生毒并伏于脑络, 引发元神失控、癫痫抽搐。此方采用“化浊毒、调脏腑”的治则要点, 通过观察其改善癫痫大鼠学习记忆功能障碍的药理效应并探索作用机制, 以期对抗癫痫及改善学习记忆障碍的治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只, 体质量 100~120 g, 购自河北医科大学动物实验中心, 饲养于正常规格聚鼠笼, 室温恒定于 22 ℃, 相对湿度 60%。

1.2 试剂与药物 化浊解毒疏肝方由黄芩 12 g、柴胡 12 g、绞股蓝 12 g、石菖蒲 9 g、罗勒 6 g、荷梗 9 g 等组成, 由安国市伊康药业有限公司提供, 批号 190103。丙戊酸钠片 (批号 181003, 湖南省湘中制药有限公司); 戊四氮 (批号 P6500-25G, 美国 Sigma-Aldrich 公司); AC 兔抗大鼠多克隆抗体 (批号 TA322232, 美国 OriGene 公司); cAMP 兔抗大鼠多克隆抗体 (批号 ab76238, 英国 Abcam 公司); CREB、pCREB 兔抗大鼠多克隆抗体 (批号 9197、9198, 美国 Cell Signaling Technology 公司); 增强酶标山羊抗兔 IgG、10% 山羊血清、TA-09 β -actin、Western blot 鲁米诺化学发光试剂 (北京中杉金桥生物技术有限公司); BS-0061R β -actin (北京博奥森生物技术有限公司)。无水乙醇、二甲苯 (天津市永大化学试剂有限公司)。

1.3 仪器 电子天平 (德国 Sartorius 公司); 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 微量加样器 (法国 Gilson 公司); RM2016 型切片机 (德国 Leica 公司); KD-T 型摊烤片机

收稿日期: 2021-08-17

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1701701); 河北省政府资助临床医学优秀人才项目 (360601)

作者简介: 平 鑫 (1993—), 男, 硕士, 从事中药研发与脑病研究。E-mail: 15075181182@163.com

* 通信作者: 裴 林 (1961—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药研发与脑病研究。E-mail: 13831190309@163.com

张少丹 (1962—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事中药研发与小儿脑病研究。E-mail: 13653115066@163.com

(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); 高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 电泳仪和转膜仪 (北京六一仪器厂); Morris 水迷宫、八臂迷宫 (上海洛维生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 60 只大鼠随机分为正常组, 模型组, 丙戊酸钠组, 化浊解毒疏肝方低、高剂量组, 每组 12 只。参考文献 [9] 报道, 除正常组外, 其余各组大鼠均建立癫痫模型, 每天腹腔注射戊四氮 40 mg/kg, 另设正常组, 每天腹腔注射等体积生理盐水, 共 28 d, 腹腔注射后密切观察大鼠痫性发作行为 1 h。大鼠痫性发作评价采用 Lado 分级标准^[10], 见表 1。造模周期内连续 5 d 出现 3.5 级以上的痫性发作表现, 即视为造模成功。28 d 造模结束后, 第 29 天进入灌胃给药阶段, 给药周期为 4 周。化浊解毒疏肝方低、高剂量组大鼠每天灌胃给予药物 2.7、5.4 g/kg, 丙戊酸钠组大鼠每天灌胃给予药物 189 mg/kg, 正常组和模型组大鼠每天灌胃给予生理盐水 10 mL/kg。

表 1 Lado 分级标准

分级/级	行为表现
0	未发作
1	机械性咀嚼
2	摇头
3	单侧前肢阵挛
3.5	双侧前肢交替性阵挛
4	双侧前肢阵挛伴后退
5	双侧前肢阵挛伴后退、直立和翻倒
6	嘶叫、狂奔
7	全身强直性痉挛

2.2 行为学测试

2.2.1 Morris 水迷宫实验 末次给药后第 2 天, 通过 Morris 水迷宫实验开展学习能力和记忆能力测试。每组选取 10 只大鼠, 实验开始后依次将大鼠从各个象限墙壁中心位置入水, 要求 120 s 内搜索水下隐藏平台, 待大鼠爬上平台则单次测试结束。若时间截止大鼠仍未爬上平台, 则在下次测试前将大鼠放置平台上适应 30 s。前 4 天测试为定位航行实验, 记录大鼠寻找平台的逃避潜伏期, 第 5 天测试为空间探索实验, 当撤掉水下平台后, 记录大鼠穿越原平台位置的次数。

2.2.2 八臂迷宫实验 Morris 水迷宫实验完成后第 2 天, 通过八臂迷宫实验评估大鼠的空间学习记忆能力^[11]。每组选取经过 Morris 水迷宫实验的 10 只大鼠, 在正式实验开始前进行环境适应性训练 2 d, 每天 2 次, 每次训练 10 min, 以便大鼠熟悉迷宫环境及建立摄食策略。为保证大鼠足够的摄食动力, 正式测试前所有大鼠均被禁食 24 h。将八臂迷宫实验的 1、2、4、7 号臂放入饲料且固定为喂食臂。观察大鼠 10 min 内的摄食活动并记录大鼠重复进入喂食臂总数为工作记忆错误次数, 重复进入非喂食臂总数为参考记忆错误次数, 两者之和为总错误次数。每次测试结束后, 将八臂迷宫实验用 75% 乙醇擦拭、晾干, 以防止气味信号

对大鼠的干扰作用。

2.3 免疫荧光法检测海马神经元 AC、cAMP、CREB 表达 每组选取 5 只经过行为学测试的大鼠, 深度麻醉后解剖暴露心脏, 从心尖处插管依次进行生理盐水冲洗和 4% 多聚甲醛固定, 全脑取材并石蜡包埋后, 制备 8 μ m 的冠状连续切片。脑切片在二甲苯中脱蜡后, 依次在梯度乙醇中脱水, 0.3% 过氧化氢孵育。抗原提取采用 10% 柠檬酸钠缓冲液 98 $^{\circ}$ C 加热, 冷却后孵育山羊血清。组织切片用 AC、cAMP、CREB 兔抗大鼠多克隆抗体孵育于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。加入二抗避光孵育和 DAPI 复染, 封片。每 1 个标本选取 5 个切片, 每 1 个切片随机选取 5 张视野图像, 观察海马 CA1、CA3、DG 区的表达。

2.4 Western blot 法检测海马组织 AC、cAMP、CREB、pCREB 的表达 每组另取 5 只经过行为学测试的大鼠, 麻醉处死后直接取脑, 剥离海马后称定质量, 并置于冻存管内标记, -80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。取 100 mg 脑组织, 加入液氮研碎组织, 研磨成液体状, 转至 EP 管后降温并离心, 标本取上清液胞浆蛋白, 立即 -80 $^{\circ}$ C 分装冷冻保存。根据蛋白定量结果, 加入组织总蛋白样品与凝胶电泳上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min。将样品加入凝胶孔中, 接通电源并将样品通过浓缩胶与分离胶。采用湿转法将分离的蛋白条带转印至 PVDF 膜上, 分别孵育非标记一抗及辣根过氧化物酶标记二抗。化学发光法显色, Image J 软件分析灰度值, 以 β -actin 灰度值为内参, 计算目标蛋白相对表达。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理, 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, 组间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 化浊解毒疏肝方对大鼠癫痫发作情况的影响 与模型组比较, 丙戊酸钠组和化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠癫痫发作等级降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 各给药组大鼠癫痫发作潜伏期延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 2。

表 2 化浊解毒疏肝方对大鼠癫痫发作情况的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	癫痫发作等级/级	癫痫发作潜伏期/s
模型组	5.60 $\pm$ 0.84	432.50 $\pm$ 72.10
丙戊酸钠组	4.60 $\pm$ 0.97 *	669.80 $\pm$ 70.60 **
化浊解毒疏肝方低剂量组	5.00 $\pm$ 1.05	502.40 $\pm$ 55.49 ***
化浊解毒疏肝方高剂量组	4.40 $\pm$ 0.97 **	692.10 $\pm$ 42.64 ** $\Delta \Delta$

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与丙戊酸钠组比较, *** $P < 0.01$; 与化浊解毒疏肝方低剂量组比较, $\Delta \Delta$ $P < 0.01$ 。

3.2 化浊解毒疏肝方对大鼠学习能力障碍的影响 各组大鼠在 4 d 测试中的逃避潜伏期均有缩短趋势。与模型组比较, 正常组大鼠第 3、4 天逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 丙戊酸钠组和化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠第 4 天逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 3。

3.3 化浊解毒疏肝方对大鼠记忆能力障碍的影响 与模型

组比较,正常组、丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠穿越平台次数增加 ($P<0.01$);与丙戊酸钠组比较,化浊解毒疏肝方低剂量组大鼠穿越平台次数减少 ($P<0.05$),化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠穿越平台次数增加 ($P<0.05$);与化浊解毒疏肝方低剂量组比较,化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠穿越平台次数增加 ($P<0.01$),见表 3、图 1。

表 3 化浊解毒疏肝方对大鼠学习能力障碍、记忆能力障碍的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	逃避潜伏期/s				穿越平台次数/次
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	
正常组	52.66±10.78	38.07±8.89	25.63±5.72 *	10.65±4.12 **	10.10±1.91 **
模型组	58.66±12.60	44.33±6.43	31.98±5.96	22.05±4.23	4.30±1.42
丙戊酸钠组	54.00±10.96	40.86±8.70	28.23±4.88	17.03±3.14 *	7.10±2.23 **
化浊解毒疏肝方低剂量组	56.05±10.60	41.89±6.86	29.35±5.34	19.89±5.19	5.10±2.13 #
化浊解毒疏肝方高剂量组	53.87±11.78	39.60±5.42	27.83±5.96	12.89±3.58 **	9.50±2.32 ** #△△

注:与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与丙戊酸钠组比较, # $P<0.05$;与化浊解毒疏肝方低剂量组比较, △△ $P<0.01$ 。

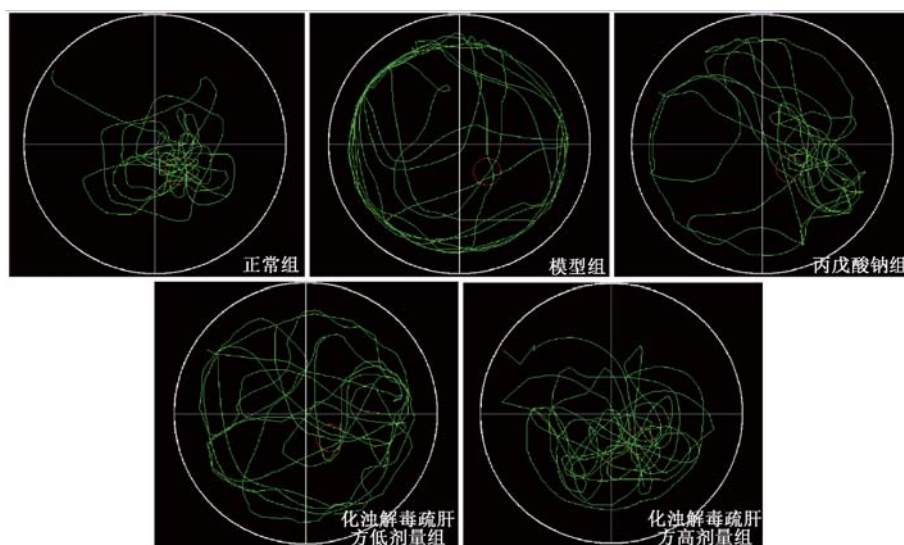


图 1 各组大鼠穿越平台活动轨迹图

3.4 化浊解毒疏肝方对大鼠空间学习记忆能力的影响 与模型组比较,正常组、丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠的工作记忆错误次数、参考记忆错误次数、总错误次数均减少 ($P<0.01$),化浊解毒疏肝方低剂量组大鼠总错误次数减少 ($P<0.05$);与丙戊酸钠组比较,化浊解毒疏肝方低剂量组大鼠的参考记忆错误次数、总错误次数

增加 ($P<0.05$, $P<0.01$),化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠的工作记忆错误次数、参考记忆错误次数、总错误次数均减少 ($P<0.05$, $P<0.01$);与化浊解毒疏肝方低剂量组比较,化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠的工作记忆错误次数、参考记忆错误次数、总错误次数均减少 ($P<0.01$),见表 4。

表 4 化浊解毒疏肝方对大鼠的空间学习记忆能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	工作记忆错误次数/次	参考记忆错误次数/次	总错误次数/次
正常组	10.40±1.43 **	11.20±1.75 **	21.60±2.07 **
模型组	15.90±2.02	16.90±1.66	32.80±2.44
丙戊酸钠组	13.40±1.84 **	14.10±1.85 **	27.50±2.32 **
化浊解毒疏肝方低剂量组	14.70±1.95	15.90±2.02 #	30.60±2.07 * ##
化浊解毒疏肝方高剂量组	11.10±1.66 ** ##△△	12.30±1.67 ** ##△△	23.40±2.50 ** ##△△

注:与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与丙戊酸钠组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与化浊解毒疏肝方低剂量组比较, △△ $P<0.01$ 。

3.5 化浊解毒疏肝方对大鼠海马神经元 AC、cAMP、CREB 表达的影响 与模型组比较,正常组、丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠海马神经元 CA1 区、CA3 区、DG 区的 AC、cAMP、CREB 表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);与化浊解毒疏肝方低剂量组比较,化浊解毒疏肝方

高剂量组大鼠海马神经元 CA1 区、CA3 区、DG 区的 AC、cAMP、CREB 表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表 5~7、图 2~4。化浊解毒疏肝方低剂量组与模型组、丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方高剂量组比较均无统计学意义,故不予对照图示。

表 5 化浊解毒疏肝方对大鼠海马神经元 AC 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	CA1 区	CA3 区	DG 区
正常组	0.449 5 $\pm$ 0.079 6 ^{**}	0.412 3 $\pm$ 0.074 7 ^{**}	0.249 3 $\pm$ 0.088 9 ^{**}
模型组	0.388 6 $\pm$ 0.079 2	0.357 3 $\pm$ 0.085 3	0.198 3 $\pm$ 0.069 6
丙戊酸钠组	0.414 9 $\pm$ 0.082 5 [*]	0.389 9 $\pm$ 0.062 2 ^{**}	0.228 9 $\pm$ 0.076 4 [*]
化浊解毒疏肝方低剂量组	0.399 8 $\pm$ 0.087 9	0.369 7 $\pm$ 0.070 3	0.217 4 $\pm$ 0.070 9
化浊解毒疏肝方高剂量组	0.434 9 $\pm$ 0.081 8 ^{**#$\Delta\Delta$}	0.390 5 $\pm$ 0.062 6 ^{**Δ}	0.238 6 $\pm$ 0.080 3 ^{**Δ}

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与丙戊酸钠组比较,# $P<0.05$;与化浊解毒疏肝方低剂量组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

表 6 化浊解毒疏肝方对大鼠海马神经元 cAMP 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	CA1 区	CA3 区	DG 区
正常组	0.462 8 $\pm$ 0.080 5 ^{**}	0.3882 $\pm$ 0.070 5 ^{**}	0.2593 $\pm$ 0.082 3 ^{**}
模型组	0.415 5 $\pm$ 0.079 6	0.3277 $\pm$ 0.0798 0	0.2012 $\pm$ 0.069 9
丙戊酸钠组	0.442 0 $\pm$ 0.071 2 ^{**}	0.3557 $\pm$ 0.075 0 [*]	0.2233 $\pm$ 0.078 7 [*]
化浊解毒疏肝方低剂量组	0.424 6 $\pm$ 0.081 1	0.3392 $\pm$ 0.081 2	0.2180 $\pm$ 0.075 2
化浊解毒疏肝方高剂量组	0.458 7 $\pm$ 0.078 8 ^{**$\Delta\Delta$}	0.3705 $\pm$ 0.084 0 ^{**$\Delta\Delta$}	0.2486 $\pm$ 0.070 3 ^{**#$\Delta\Delta$}

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与丙戊酸钠组比较,# $P<0.05$;与化浊解毒疏肝方低剂量组比较, $\Delta P<0.01$ 。

表 7 化浊解毒疏肝方对大鼠海马神经元 CREB 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	CA1 区	CA3 区	DG 区
正常组	0.470 2 $\pm$ 0.069 3 ^{**}	0.451 3 $\pm$ 0.080 6 ^{**}	0.267 3 $\pm$ 0.088 9 ^{**}
模型组	0.426 8 $\pm$ 0.076 0	0.399 7 $\pm$ 0.072 4	0.227 9 $\pm$ 0.069 4
丙戊酸钠组	0.448 4 $\pm$ 0.072 5 [*]	0.429 6 $\pm$ 0.080 3 [*]	0.243 7 $\pm$ 0.076 3
化浊解毒疏肝方低剂量组	0.439 0 $\pm$ 0.080 4	0.418 7 $\pm$ 0.085 0	0.235 1 $\pm$ 0.070 8
化浊解毒疏肝方高剂量组	0.463 8 $\pm$ 0.082 3 ^{**Δ}	0.441 1 $\pm$ 0.085 2 ^{**Δ}	0.258 1 $\pm$ 0.082 9 ^{*Δ}

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与化浊解毒疏肝方低剂量组比较, $\Delta P<0.05$ 。

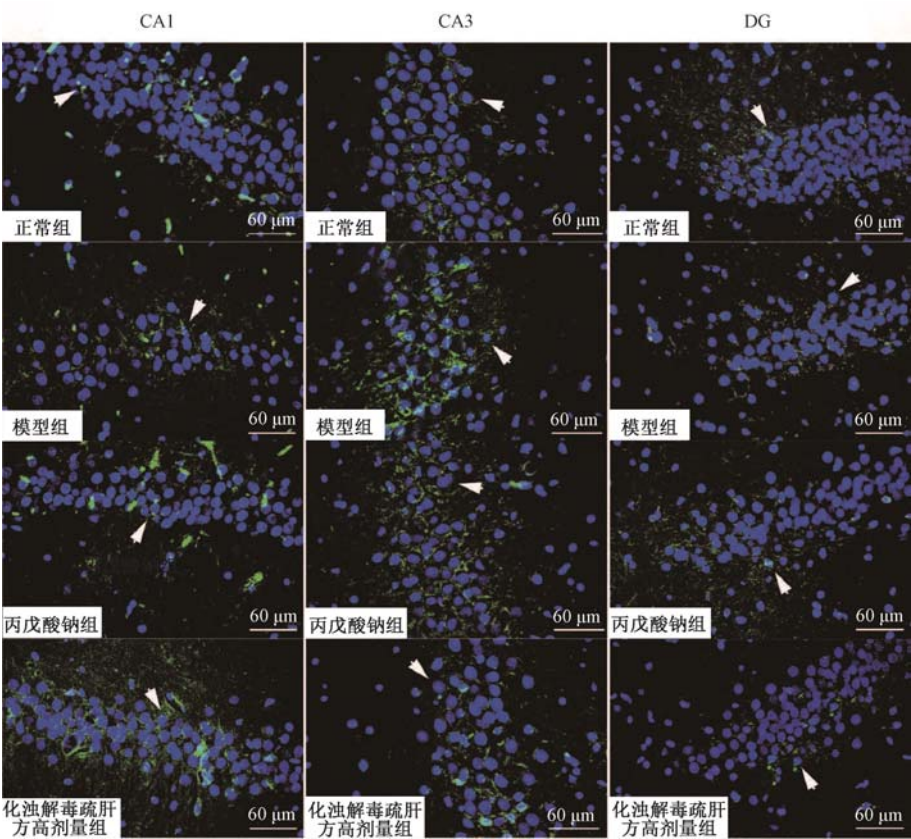


图 2 免疫荧光检测大鼠海马组织中 AC 的表达

3.6 化浊解毒疏肝方对大鼠海马组织 AC、cAMP、CREB、pCREB 蛋白表达的影响 与模型组比较,正常组、丙戊酸

钠组、化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠海马组织 AC、cAMP、CREB、pCREB 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);与化浊

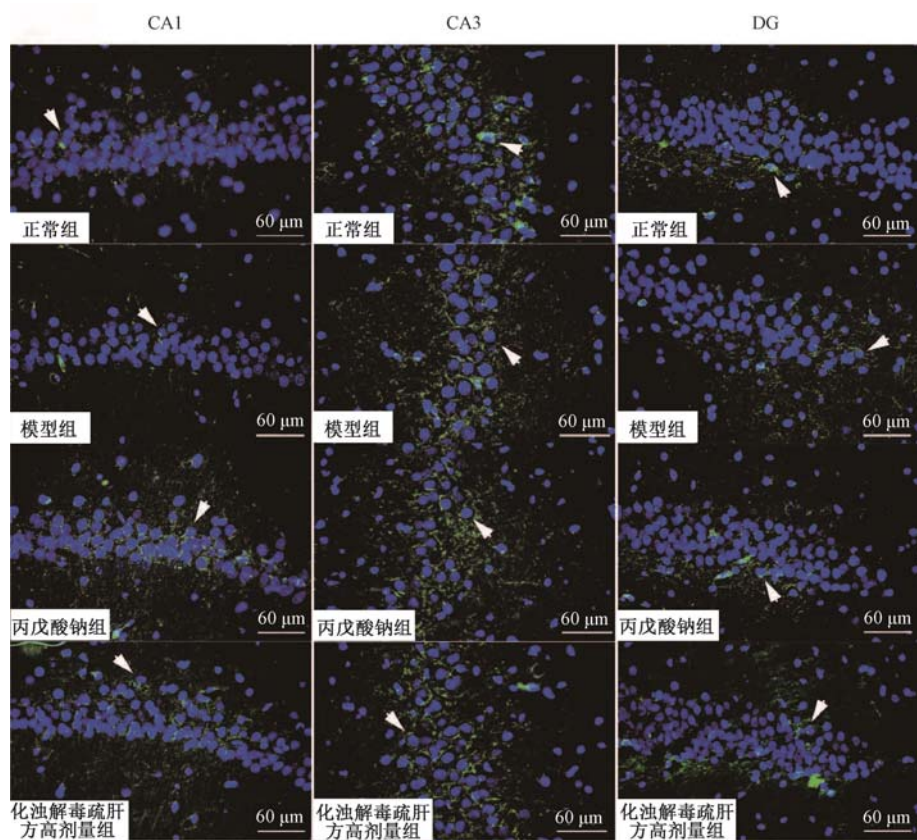


图 3 免疫荧光检测大鼠海马组织中 cAMP 的表达

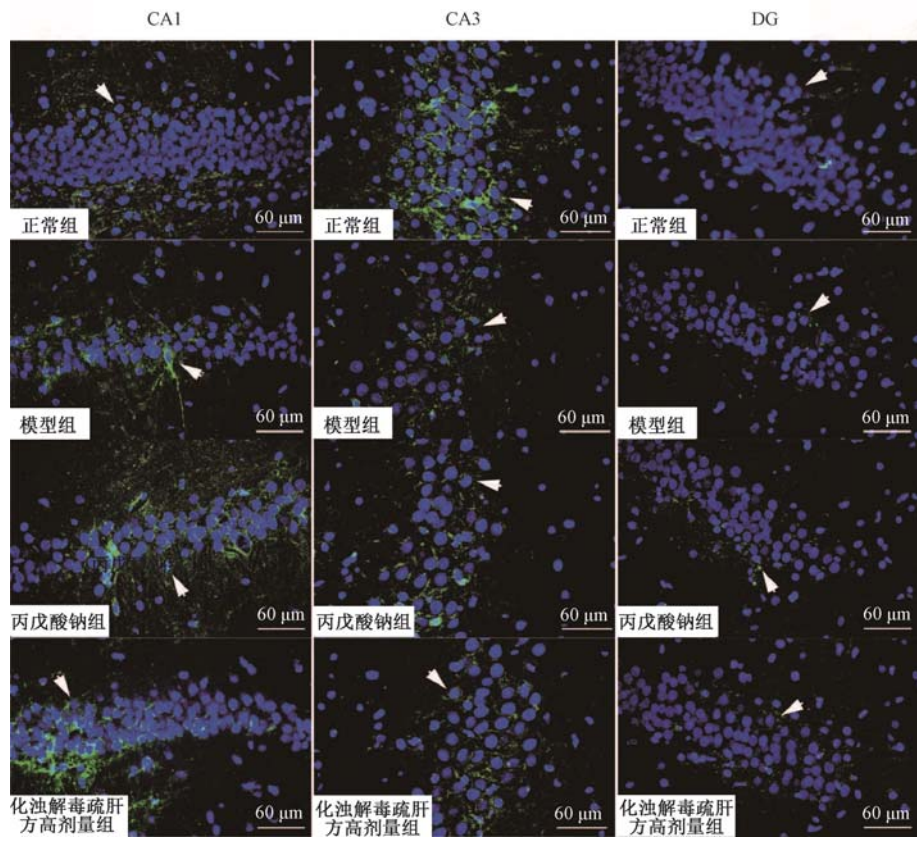
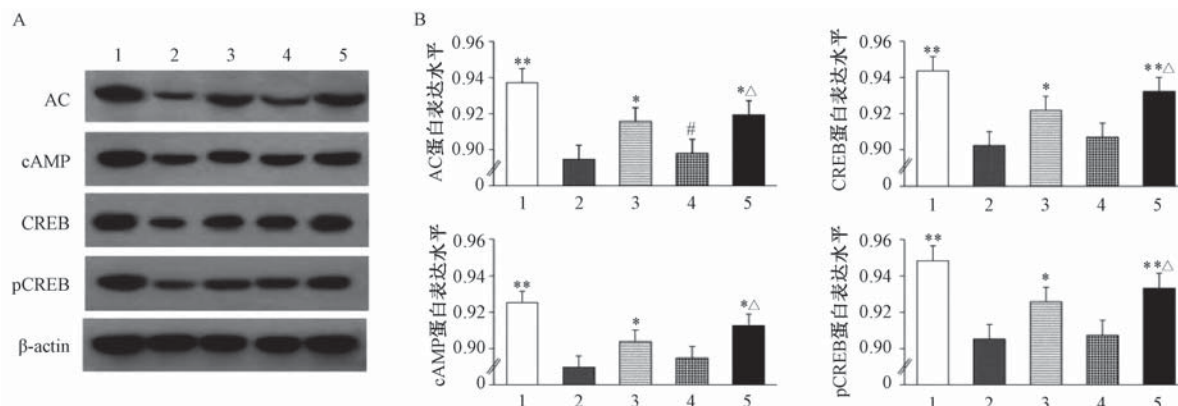


图 4 免疫荧光检测大鼠海马组织中 CREB 的表达

解毒疏肝方低剂量组比较, 化浊解毒疏肝方高剂量组大鼠海马组织 AC、cAMP、CREB、pCREB 蛋白表达升高

($P < 0.05$), 见图 5。



注: 1~5 分别为正常组、模型组、丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方低剂量组、化浊解毒疏肝方高剂量组。与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与丙戊酸钠组比较, # $P < 0.05$; 与化浊解毒疏肝方低剂量组比较, △ $P < 0.05$ 。

图 5 化浊解毒疏肝方对大鼠海马组织 AC、cAMP、CREB、pCREB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

4 讨论

戊四氮化学点燃致癫痫是经典的慢性癫痫发作模型, 表现为降低神经系统功能, 使中枢神经系统兴奋性不断升高, 同时连续降低癫痫发作阈值^[12]。学习记忆能力障碍的主要表现为长时与短时学习记忆功能受损, 注意力不集中, 思维活动缓慢, 对事物的感知能力减退等多方面功能损伤^[13]。其病理机制可能是由于反复痫性发作, 大脑发生不同程度的缺氧、代谢紊乱、兴奋性神经递质过度释放、组织酸中毒等现象, 或出现神经组织结构变异而导致的^[14]。

本研究采用 Morris 水迷宫实验和八臂迷宫实验作为评估癫痫大鼠空间及工作学习记忆能力的行为学实验方法^[15-16], 发现癫痫发作若得以控制, 学习记忆障碍也会得到改善。与正常组比较, 模型组大鼠表现出痫性抽搐、惊厥症状, 癫痫发作后, 其学习记忆能力同时降低; 给予化浊解毒疏肝方后, 大鼠的行为学测试结果有明显提升。

海马组织归属于大脑的边缘系统, 是大脑中反映短时学习记忆、空间定位、声光反应等行为能力的重要功能区域, 其中的 CA1、CA3、DG 区是癫痫领域研究的主要观察部位^[17-18]。海马与癫痫的发生发展密切相关, 啮齿类动物反复痫性发作会降低海马信息处理的突触可塑性, 对海马组织的长期记忆功能产生损伤^[19]。研究发现, AC-cAMP-CREB 通路在学习记忆领域的关系密切, 其中 cAMP 作为传递生命活动信息的“第二信使”, 具备调节胞内物质代谢、修复和活化脑细胞的功能。当具有记忆功能的 cAMP 核内蛋白 CREB 被激活, 与突触可塑性长时程增强产生和长时记忆巩固密切相关^[20], 它不仅介导短时记忆向长时记忆的转变, 还可促进维持长时记忆形成, 或激活其相关基因表达, 尤其是磷酸化的 CREB 转录活性的增强^[21-22]。

丙戊酸钠是传统抗癫痫药物中的临床一线用药, 有研究证实其对癫痫所伴随的学习记忆能力损伤具有改善作用^[23]。本实验研究发现, 与正常组比较, 模型组大鼠由于反复癫痫发作损伤导致 AC-cAMP-CREB 通路相关蛋白表达

降低; 与模型组比较, 经化浊解毒疏肝方和丙戊酸钠给药后, 大鼠相关蛋白表达均升高, 其中高剂量化浊解毒疏肝方的表达更为突出, 这表明该方可以升高 AC-cAMP-CREB 通路蛋白表达, 进而上调 CREB 转录水平改善了癫痫大鼠的学习记忆行为活动。同时也提示化浊解毒疏肝方改善癫痫大鼠学习记忆损伤的作用可能是参与上调 AC-cAMP-CREB 通路信号表达有关。

机体若有五脏失调, 加以风火痰瘀邪气蕴聚胶结, 可内发毒邪, 伏藏于脑, 损脑伤神则诱发病昏仆抽搐, 此属“浊毒证”范畴^[24]。本研究采用化浊解毒疏肝方, 可达清湿热、化浊毒、理气机、调脏腑之效, 遂使病邪去, 气血调和, 益脑养神, 学习记忆损伤得以恢复。该方已在临床研究中验证对癫痫患儿发作情况及神经功能具有改善作用, 尤其是明显改善患儿的认知功能^[25], 故深入探究该方的作用机制将有益于对癫痫患者的临床治疗。

综上所述, 化浊解毒疏肝方在控制癫痫发作的同时可有效改善癫痫大鼠学习记忆损伤, 其作用机制可能是通过调节 AC-cAMP-CREB 通路相关蛋白的表达进而改善突触可塑性, 提升了学习记忆能力。

参考文献:

- [1] Ngugi A K, Bottomley C, Fegan G, et al. Premature mortality in active convulsive epilepsy in rural Kenya: causes and associated factors[J]. *Neurology*, 2014, 82(7): 582-589.
- [2] Lhatoo S D, Sander J W. The epidemiology of epilepsy and learning disability[J]. *Epilepsia*, 2001, 42 Suppl 1: 6-9.
- [3] Elshahabi A, Klammer S, Sahib A K, et al. Magnetoencephalography reveals a widespread increase in network connectivity in idiopathic/genetic generalized epilepsy [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138119.
- [4] Ding K. Review of women with epilepsy: a practical management handbook [J]. *JAMA Neurol*, 2015, 72

- (9): 1083.
- [5] Fuerst D, Shah J, Shah A, *et al.* Hippocampal sclerosis is a progressive disorder; a longitudinal volumetric MRI study [J]. *Ann Neurol*, 2003, 53(3): 413-416.
- [6] Freitas R M, Vasconcelos S M, Souza F C, *et al.* Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats [J]. *FEBS J*, 2005, 272 (6): 1307-1312.
- [7] Mertz C, Krarup S, Jensen C D, *et al.* Aspects of cAMP signaling in epileptogenesis and seizures and its potential as drug target [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(6): 1247-1255.
- [8] 张列亮, 应 俊, 华福洲, 等. 柴胡皂苷 A 通过 cAMP/CREB 信号通路对脑损伤大鼠认知功能的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(5): 484-487.
- [9] Ping X, Qin S K, Liu S N, *et al.* Effects of Huazhuo Jiedu Shugan Decoction on cognitive and emotional disorders in a rat model of epilepsy: possible involvement of AC-cAMP-CREB signaling and NPY expression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 4352879.
- [10] Lado F A, Sperber E F, Moshe S L. Anticonvulsant efficacy of gabapentin on kindling in the immature brain [J]. *Epilepsia*, 2001, 42(4): 458-463.
- [11] Olton D S. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology [J]. *Physiol Behav*, 1987, 40(6): 793-797.
- [12] Corda M, Giorgi O, Longoni B, *et al.* Decrease in the function of the γ -aminobutyric acid-coupled chloride channel produced by the repeated administration of pentylenetetrazol to rats [J]. *J Neurochem*, 1990, 55(4): 1216-1221.
- [13] Helmstaedter C, Witt J A. Epilepsy and cognition-a bidirectional relationship? [J]. *Seizure*, 2017, 49: 83-89.
- [14] 赵 爽, 张胜昌. 癫痫伴记忆认知损伤与突触可塑性的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(15): 3885-3887.
- [15] 周娇娇, 阙建宇, 于雯雯, 等. Morris 水迷宫检测动物学习记忆水平的方法学 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6274-6277.
- [16] Wang Y, Liu P P, Li L Y, *et al.* Hypothermia reduces brain edema, spontaneous recurrent seizure attack, and learning memory deficits in the kainic acid treated rats [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2011, 17(5): 271-280.
- [17] Akers K G, Chérasse Y, Fujita Y, *et al.* Concise review: regulatory influence of sleep and epigenetics on adult hippocampal neurogenesis and cognitive and emotional function [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(7): 969-976.
- [18] Lee I, Yoganarasimha D, Rao G, *et al.* Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3 [J]. *Nature*, 2004, 430(6998): 456-459.
- [19] Rankin-Gee E K, McRae P A, Baranov E, *et al.* Perineuronal net degradation in epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2015, 56(7): 1124-1133.
- [20] 娄 燕, 王维平, 李 攀, 等. CREB 和 NMDA 受体在致痫大鼠学习记忆功能改变中的变化及意义 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2007, 38(6): 949-953.
- [21] Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, *et al.* CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning [J]. *Behav Brain Res*, 2002, 133(2): 135-141.
- [22] Lonze B E, Ginty D D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system [J]. *Neuron*, 2002, 35(4): 605-623.
- [23] Jellett A P, Jenks K, Lucas M, *et al.* Standard dose valproic acid does not cause additional cognitive impact in a rodent model of intractable epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2015, 110: 88-94.
- [24] 平 鑫, 秦少坤, 刘书宁, 等. 难治性癫痫中西医诊治现状分析与临床对策 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 691-694.
- [25] 杨 雁, 裴 林, 张少丹, 等. 调肝解毒方改善癫痫儿童认知功能 132 例临床观察 [J]. 中医临床研究, 2012, 4(2): 14-15.