

6 Hz 角膜点燃耐药癫痫小鼠模型改良及 3 种中药方剂的作用

陆海美¹, 谢美娟¹, 李 珊¹, 于 捷¹, 周 佳¹, 陈 忠^{1,2}, 许正浩^{1*}

(1. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 耐药是癫痫治疗领域一大难题, 而中药方剂可能有效治疗耐药癫痫。本研究建立改良的 6 Hz 角膜点燃耐药癫痫小鼠模型, 验证其对 4 种抗癫痫药物的耐药情况, 并利用该耐药癫痫模型对 3 种中药方剂进行药效学研究。研究发现: ① 80% C57BL/6J 小鼠经过 21 天电流强度为 44 mA 的 6 Hz 角膜点燃刺激后被完全点燃, 而相同刺激条件下的 ICR 小鼠和电流强度为 24 mA 的 C57BL/6J 小鼠均无法被完全点燃; ② 苯妥英钠 (50 mg·kg⁻¹)、丙戊酸钠 (100 mg·kg⁻¹) 和拉莫三嗪 (15 mg·kg⁻¹) 对 6 Hz 角膜点燃的 C57BL/6J 小鼠耐药癫痫发作没有明显作用, 而左乙拉西坦 (100 mg·kg⁻¹) 明显降低其发作等级 ($P < 0.05$) 和大发作几率 ($P < 0.05$); ③ 柴胡加龙骨牡蛎汤 (9.36 或 28.08 g·kg⁻¹) 和天麻钩藤饮 (14.82 或 44.46 g·kg⁻¹) 对 6 Hz 角膜点燃的 C57BL/6J 小鼠耐药癫痫发作没有明显作用, 而风引汤 (19.11 g·kg⁻¹) 显著降低动物发作等级 ($P < 0.01$) 和大发作几率 ($P < 0.05$)。本研究结果表明, C57BL/6J 小鼠 6 Hz 角膜点燃模型是潜在耐药癫痫模型, 而风引汤对其有一定治疗作用, 可能是临床治疗耐药癫痫的潜在中药方剂。

关键词: 癫痫; 耐药; 耐药癫痫; 点燃; 中药

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 07-1048-06

Modification of 6 Hz corneal kindled mouse model for drug-resistant epilepsy and its treatment by three traditional Chinese medicine prescriptions

LU Hai-mei¹, XIE Mei-juan¹, LI Shan¹, YU Jie¹, ZHOU Jia¹, CHEN Zhong^{1,2}, XU Zheng-hao^{1*}

(1. Basic Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Drug-resistance is a challenge in the treatment of epilepsy, and traditional Chinese medicine (TCM) prescription may have a potential in therapy of the epilepsy. Here we established a modified 6 Hz corneal kindled mouse model of epilepsy, and verified its drug-resistance to four commonly used western medicines. We evaluated the efficacy of three classical TCM prescriptions in this drug-resistant epilepsy model. The results showed that: ① most C57BL/6J mice with stimulation current intensity at 44 mA (8 out of 10) were fully kindled, while none ICR mice with stimulation current intensity at 44 mA or C57BL/6J mice with stimulation current intensity at 24 mA were fully kindled. Fully kindled mice exhibited epileptic electroencephalograms after 44 mA and 6 Hz corneal kindling stimulation and increased activation of astrocytes in the hippocampus (by staining the glial fibrillary acidic protein); ② 50 mg·kg⁻¹ phenytoin sodium, 100 mg·kg⁻¹ valproic acid sodium and 15 mg·kg⁻¹ lamotrigine had no significant effects on the drug-resistant seizures in 6 Hz corneal kindled

收稿日期: 2018-02-22; 修回日期: 2018-03-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673623, 81603088); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY16H280005); 浙江省中医药科技计划 (2018ZZ007).

*通讯作者 Tel: 86-571-86613587, E-mail: xuzhenghao@zcmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0158

C57BL/6J mice, while 100 mg·kg⁻¹ levetiracetam significantly reduced the seizure stage ($P < 0.05$) and incidence of generalized seizure ($P < 0.05$) in it; ③ TCM prescriptions, Chai-Hu Plus Long-Gu Mu-Li decoction (9.36 or 28.08 g·kg⁻¹) and Tian-Ma Gou-Teng decoction (14.82 or 44.46 g·kg⁻¹), had no significant effects on the drug-resistant seizures in 6 Hz corneal kindled C57BL/6J mice, while TCM prescription Feng-Yin decoction (19.11 g·kg⁻¹) significantly reduced both the seizure stage ($P < 0.01$) and incidence of generalized seizure ($P < 0.05$) in it. Thus, the modified 6 Hz corneal kindled C57BL/6J mouse model is an excellent drug-resistant epilepsy model, Feng-Yin decoction have antiepileptic effects on it, suggesting Feng-Yin decoction may be an effective TCM prescription for clinical treatment of drug-resistant epilepsy.

Key words: epilepsy; drug resistance; drug resistant epilepsy; kindling; traditional Chinese medicine

癫痫是神经科最常见疾病之一, 其以脑神经元的异常放电引起的反复性的癫痫发作为特征, 在全世界大概有 6 500 万患者^[1]。虽然大部分患者可以通过服用常规抗癫痫药物控制癫痫发作, 但约 40% 患者会对多种抗癫痫药物耐药而成为耐药性癫痫患者^[2]。耐药性癫痫一般定义为对两种或两种以上的抗癫痫治疗方案失败 (不论是单药治疗还是多种药物的组合) 的癫痫, 并且每种方案均是患者能够耐受的和根据患者发作情况正确选择的合适治疗方案。耐药性癫痫患者中仅小于 1% 会接受手术治疗, 绝大部分患者依然期待药物治疗^[3]。不受控制的癫痫反复发作不但影响患者日常生活而且还可能导致患者认知功能受损甚至突发性死亡^[4, 5]。因此耐药性癫痫依然是神经科重大难题, 有必要进一步寻找新的耐药性癫痫治疗方法。

癫痫属于中医“痫病”范畴, 早在《内经》、《千金要方》等古籍上就有记载, 且有不少方药流传至今或被历代医家改良^[6, 7]。不少临床及基础研究也表明中药方剂可能对耐药性癫痫有潜在治疗作用^[8]。然而由于中医对癫痫的证候诊断特殊性等原因, 中药方剂对耐药性癫痫的作用及其机制尚不清楚, 有待进一步研究。疾病动物模型是筛选疾病治疗新药的重要方法, 通过建立可靠的耐药性癫痫模型将有助于筛选新的抗癫痫药物及相关机制研究。以往常见的癫痫动物模型包括遗传性癫痫模型、化学模型和杏仁核电点燃模型等, 但是这些模型往往耐药比例较低、过于费时费力或存在药物相互作用干扰等缺点^[9-11]。最近, 研究者发现通过 6 Hz 角膜电刺激可以在 NMRI 品系和 CF1 品系小鼠建立角膜电点燃癫痫模型, 该模型不但制作相对简单而且可能对多种抗癫痫药物耐受^[12, 13]。然而 NMRI 品系和 CF1 品系小鼠国内尚未普及, 若采用国内常用 C57BL/6J 和 ICR 小鼠品系进行造模, 其刺激参数及造模后的耐药情况尚不明确。因此, 本研究拟在 C57BL/6J 和 ICR 小鼠品系采

用不同的刺激参数尝试建立和优化 6 Hz 角膜点燃模型, 并就 4 种常用西药耐药情况和 3 种传统中药方剂的药效学进行研究。

材料与方法

动物 选用 8 周龄 C57BL/6J 和 ICR 雄性小鼠 [由浙江中医药大学实验动物中心提供, 实验动物使用许可证号 SYXK (浙) 2013-0184]。小鼠的饲养环境相同, 控制环境温度 (22 ± 1) °C, 控制湿度 (50 ± 5) %, 自由饮水饮食。所有的动物实验严格遵照浙江中医药大学动物实验中心的动物伦理学条例及国家实验动物饲养和使用指南。

药品与仪器 利多卡因 (批号 Y05J6C3)、苯妥英钠 (批号 Y16N6C6003)、丙戊酸钠 (批号 Y18J7C16394)、拉莫三嗪 (批号 S29A6B2883) 和左乙拉西坦 (批号 B07N8E46912) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 柴胡加龙骨牡蛎汤 (柴胡 12 g, 煅龙骨、黄芩、生姜、桂枝、茯苓各 4.5 g, 党参 9 g, 姜半夏 6 g, 生大黄 6 g, 生牡蛎 4.5 g, 红枣 12 g, 铅丹未用)、天麻钩藤饮 (天麻片 9 g, 钩藤、川牛膝各 12 g, 石决明 18 g, 生山栀、生杜仲、黄芩、益母草、桑寄生、夜交藤、茯神各 9 g) 和风引汤 (大黄、干姜、龙骨各 12 g, 桂枝 9 g, 甘草、牡蛎各 6 g, 寒水石、滑石、赤石脂、紫石英、石膏各 18 g) 由浙江中医药大学门诊部提供; 电惊厥仪 (ECT UNIT 57800, 意大利 UGO BASLE 公司)。

6 Hz 角膜点燃刺激 将电惊厥仪刺激参数调整为 (44 或 24 mA, 0.2 ms, 3 s, 6 Hz)。角膜刺激电极先用含 0.5% 利多卡因的生理盐水浸泡后, 贴近动物眼睛直至完全接触, 解锁电惊厥仪后踩踏触发开关进行角膜刺激, 刺激结束后立即将动物放入观察箱内, 记录动物癫痫行为学发作情况。

癫痫行为学判定 根据 Racine 等级分类法判定动物癫痫行为等级^[14], 1 级: 面部抽搐; 2 级: 点头; 3

级: 单侧前肢阵挛发作; 4 级: 起身, 双侧前肢阵挛发作; 5 级: 双侧前肢阵挛发作伴倒地。1~3 级为局灶性癫痫发作, 4~5 级发作为全身性癫痫大发作。若动物出现连续 3 次或累计 10 次 4~5 级发作则认为造模成功。

6 Hz 角膜点燃模型建立及优化 采用 8 周龄 C57BL/6J 与 ICR 小鼠在电惊厥仪刺激参数 (44 或 24 mA, 0.2 ms, 3 s, 6 Hz) 的条件下进行角膜点燃, 连续 3 周, 每天 2 次, 两次间隔大于 4 h, 观察并记录 C57BL/6J 小鼠与 ICR 小鼠的癫痫行为。

手术及脑电图记录 小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉, 后固定于立体定位仪, 将电极根据小鼠脑图谱 (Paxinos and Franklin's the Mouse Brain) 坐标将不锈钢电极植入海马 (AP: -2.0 mm; L: -1.5 mm; V: -2.0 mm), 小脑上方 (AP: -4.5 mm, L: 0 mm) 作为参考电极。脑电图记录采用 Powerlab 系统 (澳大利亚 AD Instruments 公司), 采样率为 1000 Hz, 滤波范围为 0~100 Hz。

脑组织切片及免疫组化 小鼠腹腔注射水合氯醛 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 深度麻醉, 用 0~4 °C 冰浴生理盐水进行心脏灌流, 待流出液不含血色后, 换 4% 多聚甲醛溶液灌流进行前固定。之后将小鼠置于冰上, 断头取脑, 随后置入 4% 多聚甲醛在 4 °C 冰箱内固定 24 h, 30% 蔗糖脱水。完全脱水的脑组织用于冰冻切片 (MICROM HM 550, Thermo 公司), 制成 $20 \mu\text{m}$ 切片, 并进行免疫组化染色。免疫组化一抗为 anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) antibody (1 : 400, ab7260), 荧光二抗为 anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488, 1 : 200, ab150077) (Abcam 公司)。最后用含有 DAPI 的防淬灭封片液封片 (上海源叶生物科技有限公司), 并使用荧光显微镜采集图像。

药效学评价 采用 8 周龄 C57BL/6J 小鼠, 每天 2 次角膜点燃刺激 (44 mA, 0.2 ms, 3 s, 6 Hz), 两次间隔大于 4 h, 直至出现连续 3 次或累计 10 次 4 或 5 级发作即完全点燃。完全点燃动物进行每天 1 次角膜刺激, 参数同前, 动物一旦连续 3 天稳定 4 或 5 级发作, 则第 4 天被用于药效学研究。

抗癫痫药物 (西药) 均采用腹腔注射 30 min 后进行药效学测试, 剂量分别为苯妥英钠 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、丙戊酸钠 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、拉莫三嗪 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和左乙拉西坦 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。本部分实验中, 采用自身对照设计, 动物第 1 天给予溶剂, 第 2 天给予药物。测定 1 种药物后, 休息 3 天待药物清除后被继续重复使用。在当天给药 30 min 后立即进行 6 Hz 角膜点燃测试。

中药方剂均为水煎浓缩后采用灌胃给药, 剂量按生药量计算分别为柴胡加龙骨牡蛎汤 $9.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、天麻钩藤饮 $14.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和风引汤 $19.11 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 对照组给予相当体积的水 (0.3 mL)。每天 1 次, 给药 3 天, 在末次给药 30 min 后进行 6 Hz 角膜点燃测试。该部分实验中, 采用组间随机对照设计, 动物模型稳定后随机分入各组立即开始给药, 各组间动物不重复使用。

统计学分析 采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计分析。所有数据均表示为均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。采用非参数 Mann-Whitney 检验分析各组间的癫痫发作等级差异, 采用 Fisher 精确检验统计各组间癫痫大发作几率差异。 $P < 0.05$ 被认为有显著性差异。

结果

1 C57BL/6J 小鼠较 ICR 小鼠更适合 6 Hz 角膜点燃癫痫模型的建立

本研究比较国内常用的 ICR 和 C57BL/6J 品系小鼠在 24 或 44 mA 刺激强度下的造模成功率。实验发现, 在 ICR 小鼠中, 44 mA 的刺激强度无法诱导明显癫痫行为, 经过 21 天 6 Hz 角膜点燃刺激后所有动物均无法达到典型的 4 级或 5 级癫痫发作, 代表性行为表现如图 1A 左所示; 在 C57BL/6J 小鼠中, 经过 21 天 6 Hz 角膜点燃刺激后 24 或 44 mA 电流强度均可以诱导动物出现癫痫的 4 级或 5 级癫痫发作, 代表性行为表现如图 1A 右所示。但在 24 mA 电流强度下动物无法连续 3 次稳定诱导 4 级或 5 级癫痫发作。如图 1B 所示, 第 21 天 C57BL/6J-44 mA 组动物发作等级明显高于 ICR-44 mA 组 ($P < 0.001$) 和 C57BL/6J-24 mA 组 ($P < 0.01$)。各组动物 21 天后的造模成功率 (点燃率) 如表 1 所示, C57BL/6J-44 mA 组造模成功率明显高于 ICR-44 mA 组 ($P < 0.01$) 和 C57BL/6J-24 mA

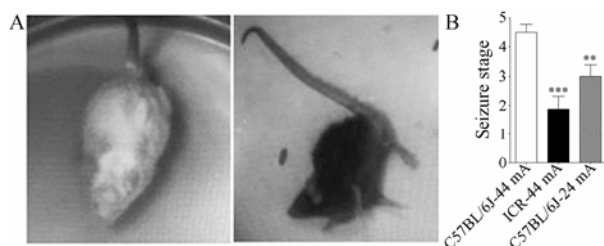


Figure 1 Behavioral seizures in ICR and C57BL/6J mice after 21 day of corneal stimulations. A: Left: a ICR mouse which got a stage 3 seizure; Right: a C57BL/6J mouse which got a stage 5 seizure. B: The mean seizure stage of each group on day 21. $n = 10, 8, 7$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs C57BL/6J-44 mA group

Table 1 The influence of mice strain and stimulation electrical current on the corneal kindled rate. Kindled rate: The percentage of mice that exhibition of three continues stage 4-5; ** $P < 0.01$ vs ICR-44 mA group; ## $P < 0.01$ vs C57 BL/6J-24 mA group

Strain	Current/mA	<i>n</i>	Kindled rate/%
ICR	44	8	0
C57BL/6J	44	10	80 ^{**##}
	24	7	0

组 ($P < 0.01$)。进一步进行脑电图记录发现, C57BL/6J 小鼠在 44 mA、6 Hz 角膜点燃诱导的癫痫发作的过程中, 脑电图出现明显的癫痫样放电 (图 2)。利用免疫组化还发现 C57BL/6J-44 mA 组完全点燃的小鼠海马 GFAP 标记的胶质细胞激活明显增加 (图 3), 其为颞叶癫痫的特征病理标志之一。

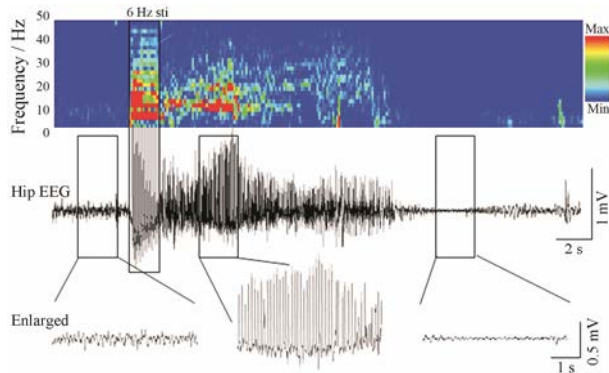


Figure 2 Represented EEG of generalized seizure in 6 Hz corneal kindled C57BL/6J mice. Upper: Power spectrum plot; Middle: Raw EEG; Under: Enlarged EEGs

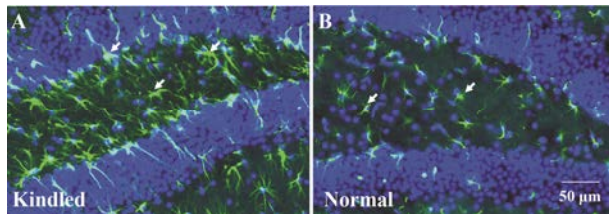


Figure 3 Increased activation of astrocytes in the dentate gyrus (DG) in 6 Hz corneal kindled C57BL/6J mice. A: 6 Hz corneal kindled mice. B: Normal control. Green fluorescence: Glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker for astrocyte activation; Blue fluorescence: 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), a marker for cell nucleus. Arrows: GFAP positive astrocytes

2 C57BL/6J 小鼠角膜点燃癫痫模型对多种抗癫痫药物耐受

为了进一步确认 C57BL/6J 小鼠角膜点燃癫痫模型对抗癫痫药物的耐药情况, 本研究观察了 4 种抗癫痫药物 (苯妥英钠、丙戊酸钠、拉莫三嗪、左乙拉西坦) 对点燃后动物癫痫发作的影响。结果表明, 苯妥英钠、丙戊酸钠、拉莫三嗪对动物发作等级及大发作

几率均没有明显影响 ($P > 0.05$), 而左乙拉西坦明显降低动物发作等级 ($P < 0.05$) 和大发作几率 ($P < 0.05$)。具体各组发作等级和大发作几率如表 2 所示。

Table 2 Efficacy of four antiepileptic drugs in corneal kindled mice. PHT: Phenytoin sodium, 50 mg·kg⁻¹; VPA: Sodium valproate, 100 mg·kg⁻¹; LTG: Lamotrigine, 15 mg·kg⁻¹; LEV: Levetiracetam, 100 mg·kg⁻¹. * $P < 0.05$ vs each control

Group	<i>n</i>	Seizure stage	Incidence of generalized seizure/%
Control	10	4.3 ± 0.2	90.0
VPA	10	4.2 ± 0.2	80.0
Control	9	4.3 ± 0.2	88.9
PHT	9	3.9 ± 0.4	66.7
Control	9	4.1 ± 0.1	100
LTG	9	4.1 ± 0.5	66.7
Control	9	4.2 ± 0.1	100
LEV	9	3.2 ± 0.4*	44.4*

3 3 种经典抗癫痫中药方剂对小鼠角膜点燃癫痫的药效学作用

在基本明确 C57BL/6J 小鼠角膜点燃癫痫模型为耐药癫痫模型后, 本研究观察 3 种中药方剂 (柴胡加龙骨牡蛎汤、天麻钩藤饮和风引汤) 对点燃动物癫痫发作的作用。结果发现, 连续 3 天给予柴胡加龙骨牡蛎汤和天麻钩藤饮对动物癫痫发作等级和大发作几率均没有明显作用 ($P > 0.05$), 而风引汤可以显著降低动物癫痫发作等级 ($P < 0.01$) 和大发作几率 ($P < 0.05$)。具体各组发作等级和大发作几率如表 3 所示。

Table 3 Efficacy of three traditional Chinese medicine prescriptions on drug-resistant seizures in corneal kindled mice. CLMD: Chai-Hu plus Long-Gu Mu-Li decoction, 9.36 g·kg⁻¹; TGD: Tian-Ma Gou-Teng decoction, 14.82 g·kg⁻¹; FYD: Feng-Yin decoction, 19.11 g·kg⁻¹. *n* = 10, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

Group	Seizure stage	Incidence of generalized seizure/%
Control	4.2 ± 0.1	100
CLMD	4.2 ± 0.1	100
TGD	4.1 ± 0.1	100
FYD	3.3 ± 0.2**	40*

考虑剂量的影响, 上述实验结束后动物再继续给予 3 天 3 倍剂量的柴胡加龙骨牡蛎汤和天麻钩藤饮 (将药物浓缩 3 倍) 依然没有明显的抗癫痫作用, 各给药组癫痫发作等级和大发作几率与对照组没有统计学差异 ($P > 0.05$)。具体各组发作等级和大发作几率如表 4 所示。天麻钩藤饮组有 1 例动物给药过程中死亡 (非灌胃过程中死亡)。风引汤因含矿物类药物太

多, 浓缩后药液过稠而未完成 3 倍剂量给药实验。

Table 4 Efficacy of two traditional Chinese medicine prescriptions (at three times of the clinical dose) on drug-resistant seizures in 6 Hz corneal kindled mice. CLMD: Chai-Hu plus Long-Gu Mu-Li decoction, 28.08 g·kg⁻¹; TGD: Tian-Ma Gou-Teng decoction, 44.46 g·kg⁻¹

Group	n	Seizure stage	Incidence of generalized seizure/%
Control	10	4.3 ± 0.2	90
CLMD	10	4.7 ± 0.2	100
TGD	9	3.9 ± 0.2	77.8

讨论

本研究通过比较 ICR 和 C57BL/6J 品系小鼠及不同刺激强度 (24 或 44 mA), 建立和优化了 6 Hz 角膜点燃小鼠模型, 该模型国内尚未见报道。本研究发现该模型对 3 种抗癫痫药物 (苯妥英钠、丙戊酸钠、拉莫三嗪) 和 2 种中药方剂 (柴胡加龙骨牡蛎汤、天麻钩藤饮) 存在一定耐药性, 确证其是一种潜在耐药癫痫模型。此外, 本研究还首次发现中药经方风引汤可以降低该模型动物发作等级和大发作几率, 提示其可能有助于临床耐药性癫痫治疗。

以往药物研发过程中主要采用最大电惊厥、戊四唑癫痫模型和杏仁核点燃癫痫模型等进行筛选^[15]。本研究中所使用的苯妥英钠是最大电休克模型的经典阳性药, 丙戊酸钠是戊四唑癫痫模型的经典阳性药, 左乙拉西坦是杏仁核点燃癫痫模型的经典阳性药物, 而拉莫三嗪是广谱抗癫痫药, 对部分性和全身性癫痫发作等多种类型均有效。本研究结果表明苯妥英钠、丙戊酸钠和拉莫三嗪对 6 Hz 角膜点燃模型的发作等级及大发作几率均没有明显作用, 仅左乙拉西坦明显降低动物的发作等级和大发作几率。这些结果与国外其他品系动物相关研究结果^[12, 16]及临床耐药癫痫患者类似^[17], 提示本研究建立的 C57BL/6J 小鼠 6 Hz 角膜点燃模型可能是一个较好的多药耐药的癫痫模型。

进一步与以往文献比较发现: ① 文献报道在 NMRI 小鼠 6 Hz 角膜点燃模型中丙戊酸钠的半数有效剂量 (ED₅₀) 为 92.4 mg·kg⁻¹^[12], 而本研究中 100 mg·kg⁻¹ 丙戊酸钠在 C57BL/6J 品系小鼠 6 Hz 角膜点燃模型中大发作几率为 80% (可能未达到该模型的半数有效剂量)。② 在 NMRI 小鼠 6 Hz 角膜点燃模型中左乙拉西坦的 ED₅₀ 约为 18.7 mg·kg⁻¹^[12], 给予 100 mg·kg⁻¹ 左乙拉西坦大发作几率约为 30%^[18], 而本研究中给予 100 mg·kg⁻¹ 左乙拉西坦, C57BL/6J 品系小

鼠 6 Hz 角膜点燃模型大发作几率为 44.4% (比例相对略高)。③ 苯妥英钠和拉莫三嗪的药效情况仅在 CF1 小鼠 60 Hz 角膜点燃模型中有所报道^[16], 常规剂量具有一定治疗作用 (苯妥英钠 ED₅₀ 约为 18.3 mg·kg⁻¹、拉莫三嗪 ED₅₀ 约为 9.5 mg·kg⁻¹), 而本研究 C57BL/6J 品系小鼠 6 Hz 角膜点燃模型中苯妥英钠 50 mg·kg⁻¹ 和拉莫三嗪 15 mg·kg⁻¹ 均没有明显作用。当然, 由于 6 Hz 角膜点燃模型耐药性本身可能强于 60 Hz 角膜点燃模型^[12], 因而暂时无法与本文模型进行直接比较。总之, 上述实验及他人的研究结果提示 C57BL/6J 品系小鼠 6 Hz 角膜点燃模型相对于 NMRI 品系和 CF1 品系角膜点燃模型的耐药性可能略强。

成功建立 6 Hz 角膜点燃癫痫模型并验证其耐药性后, 本研究基于以往古籍经典和临床相关研究选择了 3 种抗癫痫经典中药方剂, 分别为柴胡加龙骨牡蛎汤、天麻钩藤饮和风引汤。柴胡加龙骨牡蛎汤首载于张仲景《伤寒论》, 后历代医家逐渐发现该方可治疗癫痫。如徐灵胎《伤寒论类方》中“本方下肝胆之惊痰, 治癫痫必效。”和《类聚方广义》中“癫痫, 居常胸满上逆, 每月二三发者, 常服此方, 则免屡发之患。”特别是 Wu 等^[19]通过对 20 例难治性癫痫患者研究发现, 柴胡加龙骨牡蛎汤可能降低难治性癫痫发作频率, 提示其可能具有难治性癫痫治疗作用。天麻钩藤饮出自《中医内科杂病证治新义》, 有平肝熄风, 清热活血之功, 常用于肝阳偏亢, 肝风上扰证, 有可能有助于治疗癫痫^[20]。风引汤出自《金匮要略·中风篇》“大人风引, 少小惊痫瘈瘲, 日数十发, 医所不能治者, 此汤主之。”, 后历代医家用于主治癫痫、风瘫等^[21]。现代药理学研究表明上述中药方中钩藤、柴胡、大黄等中药成分可能作用于如丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等难治性癫痫发病相关的信号通路^[22-24]。本研究结果表明柴胡加龙骨牡蛎汤和天麻钩藤饮在临床相当剂量或 3 倍临床相当剂量下对 6 Hz 角膜点燃模型均没有明显的抗难治性癫痫作用, 而风引汤在临床相当剂量便能明显降低动物的癫痫发作等级和大发作几率。这些结果表明风引汤是耐药性癫痫治疗的潜在有效中药方, 提示在中药经典方剂中寻找对耐药性癫痫有治疗作用的药物可能可行, 值得后续进一步研究。

当然, 由于本研究存在一些干扰因素, 如: ① 所用癫痫模型与特定方剂所针对的中医证候可能不一致; ② 柴胡加龙骨牡蛎汤按目前临床惯例弃用了铅丹; ③ 动物实验与临床患者存在差异等。有关中药方剂对耐药性癫痫的治疗作用仍需要进一步考察, 尤

其需要后续大样本、随机对照及双盲的循证医学研究, 以及更深入的作用机制研究。

致谢: 衷心感谢范永升、温成平团队在中医理论和中药方剂方面的帮助, 特别感谢吴德鸿博士在中药方剂选择方面的建议。

References

- [1] Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P, et al. Epilepsy: new advances [J]. *Lancet*, 2015, 385: 884–898.
- [2] Engel J Jr. What can we do for people with drug-resistant epilepsy? The 2016 Wartenberg Lecture [J]. *Neurology*, 2016, 87: 2483–2489.
- [3] Engel J Jr. The current place of epilepsy surgery [J]. *Curr Opin Neurol*, 2018, 31: 192–197.
- [4] Kanner AM. Management of psychiatric and neurological comorbidities in epilepsy [J]. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12: 106–116.
- [5] Maguire MJ, Jackson CF, Marson AG, et al. Treatments for the prevention of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 7: CD011792.
- [6] Lai CW, Lai YH. History of epilepsy in Chinese traditional medicine [J]. *Epilepsia*, 1991, 32: 299–302.
- [7] Ma R, Liu ZH, Zhang XL, et al. Guideline for TCM pediatrics clinical diagnosis and treatment pediatric epilepsy (amendment) [J]. *J Pedia Tradit Chin Med (中医儿科杂志)*, 2017, 13: 1–6.
- [8] Zhu HR, Xie M. Research progress in traditional Chinese medicines for the therapy of epilepsy [J]. *China Pharm (中国药师)*, 2017, 20: 1583–1588.
- [9] Wang L, Zhang JT, Xu SG, et al. Effects of eight antiepileptic drugs on codiariae and electric induced convulsion and impairment of learning and memory in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 1988, 23: 490–493.
- [10] Zheng YM, Zhang JP, Tang S, et al. Establish and use of an epilepsy model in larval zebrafish [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2016, 51: 580–587.
- [11] Löscher W. Animal models of seizures and epilepsy: past, present, and future role for the discovery of antiseizure drugs [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42: 1873–1888.
- [12] Leclercq K, Matagne A, Kaminski RM. Low potency and limited efficacy of antiepileptic drugs in the mouse 6 Hz corneal kindling model [J]. *Epilepsy Res*, 2014, 108: 675–683.
- [13] Albertini G, Walrave L, Demuyser T, et al. 6 Hz corneal kindling in mice triggers neurobehavioral comorbidities accompanied by relevant changes in c-Fos immunoreactivity throughout the brain [J]. *Epilepsia*, 2018, 59: 67–78.
- [14] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32: 281–294.
- [15] Loscher W, Klitgaard H, Twyman RE, et al. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12: 757–776.
- [16] Rowley NM, White HS. Comparative anticonvulsant efficacy in the corneal kindled mouse model of partial epilepsy: correlation with other seizure and epilepsy models [J]. *Epilepsy Res*, 2010, 92: 163–169.
- [17] Muramatsu K, Sawaura N, Ogata T, et al. Efficacy and tolerability of levetiracetam for pediatric refractory epilepsy [J]. *Brain Dev*, 2017, 39: 231–235.
- [18] Walrave L, Maes K, Coppens J, et al. Validation of the 6 Hz refractory seizure mouse model for intracerebroventricularly administered compounds [J]. *Epilepsy Res*, 2015, 115: 67–72.
- [19] Wu HM, Liu CS, Tsai JJ, et al. Antioxidant and anticonvulsant effect of a modified formula of chaihu-longu-muli-tang [J]. *Am J Chin Med*, 2002, 30: 339–346.
- [20] Li Y, Xie M, Shao MS, et al. Research progress on pharmacological activities and chemical constituents of last ten years on *Gastrodia elata* blume [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2017, 35: 2987–2993.
- [21] Fang Y, Hu WB, Tong GA, et al. Advances in medical treatment of epilepsy in recent decades [J]. *Clin J Tradit Chin Med (中医药临床杂志)*, 2016, (04): 473–476.
- [22] Liu L, Zhao YH, Zeng CQ, et al. Research progress in pharmacological effects of *Uncaria Hook* on Alzheimer disease models [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2016, 51: 536–542.
- [23] Wu D, Gao Y, Xiang H, et al. Exploration into mechanism of antidepressant of *Bupleuri radix* based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2018, 53: 210–219.
- [24] Xi ZQ, Wang XF, He RQ, et al. Extracellular signal-regulated protein kinase in human intractable epilepsy [J]. *Eur J Neurol*, 2007, 14: 865–872.