

丁苯酞对癫痫小鼠脑内氨基酸的影响

韩琳(徐州市儿童医院药学部,江苏徐州 221002)

[摘要] 目的 观察丁苯酞对癫痫小鼠脑内氨基酸含量的影响。方法 小鼠腹腔注射丁苯酞溶液 30 min 后制作急性癫痫模型,对癫痫小鼠脑内的 4 种氨基酸(天冬氨酸、 γ -氨基丁酸、谷氨酸、甘氨酸)的含量变化进行观察。结果 丁苯酞能降低兴奋性氨基酸谷氨酸的含量,并能降低 Glu/GABA 的比值(模型组 38.78;丁苯酞高剂量组 5.52),与模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 丁苯酞可以调节大脑中兴奋/抑制系统的平衡,从而可能缓解癫痫的发作。

[关键词] 丁苯酞;癫痫;氨基酸

[中图分类号] R971+.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)04-0283-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.04.012

The influence of butylphthalide on amino acid in epileptic mice's brain

HAN Lin(Department of Pharmacy, Children's Hospital of Xuzhou, Xuzhou 221002, China)

[Abstract] **Objective** Aim to investigate the influence of butylphthalide (NBP) on amino acid content in epileptic mice's brain. **Methods** NBP was intraperitoneally injected (ip) mice and acute epileptic mice models were made after 30 min. The change of the four amino acid(aspartic acid, gamma-aminobutyric acid, glutamate, glycine) content in brain of epileptic mice was investigated. **Results** For NBP treated epileptic mice, when compared with model group, the contents of glutamate and glutamate/gamma-aminobutyric acid(model group;38.78;NBP hige dose group;5.52) were reduced ($P < 0.05$) in brain of epileptic mice. **Conclusion** NBP could regulate the balance of excitement and inhibition systems which might relieve seizures.

[Key words] NBP; epilepsy; amino acid

丁苯酞(butylphthalide, NBP)是国家一类新药,具有神经保护作用,多用于脑缺血的治疗^[1,2]。另外,NBP对多种急性癫痫模型有效^[3-5]。中枢神经系统内的氨基酸类物质是独具特色的神经递质,以其对突触后神经元的兴奋性或抑制性作用又可分为两类,两者分别以谷氨酸和 γ -氨基丁酸为其典型代表。一般认为 γ -氨基丁酸能神经元功能降低和(或)谷氨酸能神经元功能增强均可导致癫痫^[6]。本实验通过研究丁苯酞对癫痫小鼠脑内氨基酸含量的影响,进一步探讨其对癫痫的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 药品 聚乙二醇 400(PEG 400,上海试剂总厂),丁苯酞胶囊(石药集团恩必普药业有限公司,批号 080722),地西洋注射液(江苏济川制药有限公司,批号 080429),戊四唑(pentylentetrazol, PTZ Bioszune 公司,批号 200802),氨基酸标准品、邻苯二甲醛、2-巯基乙醇均购自 Sigma 公司;甲醇(色谱纯,

美国 Fisher Scientific 公司);双蒸水,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津制作所);RF-10AXL 荧光检测器(日本岛津制作所);HW2000 色谱数据工作站(南京千谱软件科技有限公司);低温高速离心机(eppendorf AG, Centrifuge 5804R);FA25 超声匀浆机(上海弗鲁克流体机械制造有限公司);自动双重纯水蒸馏器(型号 SZ-93,上海亚荣生化仪器厂);梅特勒托利多 AE240 电子天平(1/100 000,瑞士 Mettler Toledo)。

1.3 动物 体重 20~30 g 的健康昆明种小鼠,雌雄各半,由徐州医学院动物实验中心提供[SYXK(苏)2007-0037],符合国家健康一级动物标准。小鼠均以标准饲料喂养,自由摄食、饮水,自然光照射,换气扇通风,室温保持在 22℃左右,实验时避免噪声干扰。

1.4 实验分组与给药 按分层随机区组设计,将小鼠分成 7 组,每组 14 只,使各组小鼠的性别比例和平均体重相似。丁苯酞胶囊用 30% 的 PEG 400 配制成丁苯酞溶液。生理盐水组(NS 组);溶媒组(PEG 组,30% PEG 400);模型组(MG 组,30% PEG

400 + PTZ); 丁苯酞低剂量组 (NL 组, 0.2 g/kg NBP + PTZ); 丁苯酞中剂量组 (NM 组, 0.4 g/kg NBP + PTZ); 丁苯酞高剂量组 (NH 组, 0.8 g/kg NBP + PTZ); 地西洋组 (DG 组, 2.5 mg/kg 地西洋 + PTZ)。除生理盐水和溶媒组外, 其余各组给药 40 min 后均给予 100 mg/kg 的 PTZ 致病。各组小鼠均按 0.2 ml/10 g 腹腔注射给药。

1.5 小鼠脑组织氨基酸含量的检测

1.5.1 小鼠脑匀浆的制备 小鼠致病 50 min 后冰上断头, 取全脑, 4 °C 冷生理盐水中洗去血液, 用滤纸吸干水分, 精密称定, 加入 2.4 ml 的 0.4 mol/L 高氯酸, 匀浆 1 min, 冰浴 30 min, 12 000 r/min 低温离心 15 min, 取上清, 按 4:3 加入 2.0 mol/L 碳酸氢钾中和, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清 -70 °C 保存待测。

1.5.2 氨基酸标准储备液配制 分别称取天冬氨酸 (aspartic acid, Asp) 10.312 mg; γ -氨基丁酸 (gam-

ma-aminobutyric acid, GABA) 10.312 mg; 谷氨酸 (glutamate, Glu) 14.713 mg; 甘氨酸 (glycine, Gly) 7.507 mg, 加水定容至 100 ml, 4 °C 保存, 备用。

1.5.3 衍生剂配制 将 40 μ l 的 2-巯基乙醇, 25 mg 的邻苯二甲醛溶于 0.5 ml 的甲醇中, 再加入 5 ml 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲液, 0~4 °C 密封避光保存。

1.5.4 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (大连依利特有限公司, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 柱温: 38 °C, 发射波长: 460 nm, 激发波长: 340 nm, 进样量: 20 μ l, 流速 0.8 ml/min。流动相: A 为醋酸钠-四氢呋喃 (95:5), B 为甲醇; 线性梯度洗脱, 洗脱程序: 0~0.01 min, 0~40% B; 0.01~8 min, 40%~60% B; 8~10 min, 60%~40% B; 10~16 min, 40%~0 B。该条件梯度洗脱可以使 4 种氨基酸基线基本分离, 峰形对称。其日内及日间精密度分别为 1.6%、1.9%、1.6%、1.8% 及 2.1%、2.2%、2.1%、1.8%。标准品及样品色谱图见图 1。

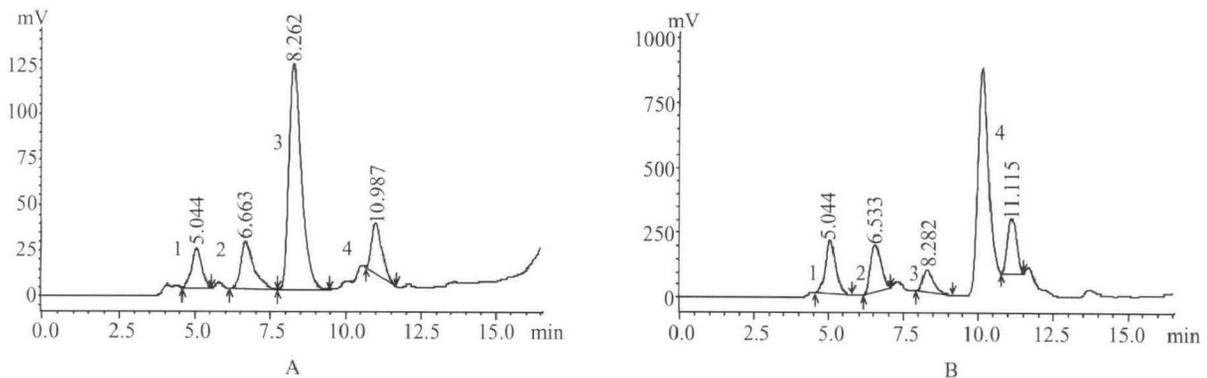


图 1 标准品 (A) 及样品 (B) HPLC 色谱图

1-Asp; 2-Glu; 3-Gly; 4-GABA

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件处理, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析和 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 线性范围考察 精密量取 1.5.2 项下标准储备液, 用双蒸水分别稀释成 0.05、0.1、0.25、0.5、5、10、20、40 μ mol/L, 按已建立的色谱条件, 取各浓度标准溶液分别进样 20 μ l 分析, 以浓度 (X , μ mol/L) 对峰面积平均值 (Y) 回归, 得 4 种氨基酸的标准曲线: Asp: $Y = 806\ 569X + 196\ 650$; Glu: $Y = 370\ 931X + 355\ 767$; GABA: $Y = 837\ 500X + 58\ 871$; Gly: $Y = 6\ 191\ 105X + 314\ 814$ 。

2.2 样品测定 取“1.5.1”项下样品等量加入衍生剂, 精确反应 120 s, 定量进样 20 μ l 后进行分析记录, 按“2.1”项下标准曲线计算 4 种氨基酸的浓度, 见表 1。由表中可见, 3 种剂量的 NBP 均能降低 Glu 的含量及 Glu/GABA 的比值 ($P < 0.05$), 而对另外 3 种氨基酸的影响不大。

3 讨论

癫痫是一种常见的神经障碍性疾病, 即使坚持长期用药仍无法根治^[7], 而外科手术治疗受到适应症的限制, 这就需要不断更新抗癫痫药物。

丁苯酞为消旋正丁基苯酞, 化学式是 C₁₂H₁₄O₂, 具有抑制谷氨酸释放, 降低细胞内钙浓度, 抑制自由基和提高抗氧化酶活性等作用^[8]。

表1 丁苯酞对小鼠脑内氨基酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	Asp ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Glu ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Gly ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	GABA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Glu/GABA
NS	4.16 \pm 1.72 ²⁾	6.74 \pm 2.54 ²⁾	0.20 \pm 0.12 ¹⁾	2.28 \pm 0.64 ²⁾	2.96 \pm 0.67 ²⁾
PEG	4.49 \pm 1.48 ^{2) 3)}	6.69 \pm 2.53 ^{2) 3)}	0.17 \pm 0.07 ^{2) 3)}	2.22 \pm 0.94 ^{2) 3)}	3.77 \pm 2.91 ^{2) 3)}
MG	10.76 \pm 2.83	20.21 \pm 7.72	0.08 \pm 0.03	0.63 \pm 0.37	38.78 \pm 19.21
NL	10.47 \pm 3.14	13.14 \pm 2.54 ¹⁾	0.08 \pm 0.02	1.07 \pm 0.61	14.41 \pm 5.15 ²⁾
NM	9.96 \pm 3.61	8.37 \pm 1.61 ^{2) 3)}	0.09 \pm 0.06	1.16 \pm 0.73	9.79 \pm 5.68 ²⁾
NH	7.12 \pm 2.13 ¹⁾	5.13 \pm 1.94 ^{2) 3)}	0.10 \pm 0.05	1.16 \pm 0.68	5.52 \pm 2.85 ²⁾
DG	1.39 \pm 0.79 ²⁾	1.98 \pm 1.21 ²⁾	0.21 \pm 0.14 ^{1) 3)}	2.26 \pm 1.25 ^{2) 3)}	1.06 \pm 0.58 ²⁾

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 与 MG 组比较; ³⁾ $P > 0.05$ 与 NS 组比较

兴奋性和抑制性神经递质的平衡失调是导致癫痫发作的主要原因之一^[9]。GABA 和 Gly 为主要的抑制性神经递质, Glu 和 Asp 都是脑内重要的兴奋性神经递质。以上实验结果表明: 丁苯酞降低了癫痫小鼠脑内 Glu 的含量及 Glu/GABA 的比值, 从而调节大脑中兴奋/抑制系统的平衡, 降低了大脑皮层的兴奋性, 提高了癫痫发作的阈值, 从而抑制癫痫的形成与发展。

【参考文献】

- [1] Xu J, Wang Y, Li N, et al. L-3-n-butylphthalide improves cognitive deficits in rats with chronic cerebral ischemia[J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(7): 2423.
- [2] 李国前, 王杰华, 杨小霞, 等. 丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注损伤后凋亡相关因子表达的影响[J]. *中国临床药理学*, 2011, 27(9): 682.
- [3] 王庆学, 韩琳. 丁苯酞对癫痫小鼠保护作用的研究[J]. *徐州医学院学报*, 2010, 30(10): 661.
- [4] 王庆学, 韩琳. 丁苯酞对癫痫小鼠的防治作用[J]. *中国健康文摘*, 2011, 8(41): 204.
- [5] 王庆学, 韩琳. 丁苯酞抗惊厥、抗癫痫作用探讨[J]. *临床合理用药*, 2010, 3(20): 31.
- [6] Fritschy JM. Epilepsy, E/I balance and GABA(A) receptor plasticity[J]. *Front Mol Neurosci*, 2008, 5(1): 1.
- [7] Stephen LJ, Brodie MJ. Pharmacotherapy of epilepsy: newly approved and developmental agents[J]. *CNS Drugs*, 2011, 25(2): 89.
- [8] 鄢学芬, 詹瑾, 黄叶宁, 等. 丁苯酞的药理作用与临床评价[J]. *中国医院药学杂志*, 2008, (28)17: 1498.
- [9] Lozsadi DA, Von OJ, Cock HR. Epilepsy: recent advances[J]. *J Neurol*, 2010, 257(11): 1946.
- [10] Guo DD, Hong SH, Jiang HL, et al. Synergistic effects of Akt1 shRNA and paclitaxel-incorporated conjugated linoleic acid-coupled poloxamer thermosensitive hydrogel on breast cancer[J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 2272.
- [11] 谢峰, 杨甲梅. 原发性肝癌间质化疗的实验及临床研究进展[J]. *中华普通外科杂志*. 2010, 11, (25): 943.
- [12] Leung TW, Yu S, Johnson PJ, et al. Phase II study of the efficacy and safety of cisplatin-epinephrine injectable gel administered to patients with unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *Clinoncol*, 2003, 21(4): 652.
- [13] Mok TS, Kanekal S, Lin XR. Pharmacokinetic study of intraleisional cisplatin for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2001, 91(12): 2369.
- [14] Harbord M, Dawes RF, Barr H, et al. Palliation of patients with dysphagia due to advanced esophageal cancer by endoscopic injection of cisplatin/epinephrine injectable gel[J]. *Gastrointest Endosc*. 2002, 56(5): 644.
- [15] 药晋鹏, 戴立里, 李娟, 等. 载阿霉素的液-固相变型原位凝胶注射治疗兔 VX2 肝癌 HIFU 消融后残癌[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2012, 9(11): 34.
- [16] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74.
- [17] Strocchi P, Dozza B, Pecorella I, et al. Lesions caused by ricin applied to rabbit eyes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 1113.
- [18] Chen ZK, Lin LW, Weng XH, et al. Interstitial chemotherapy with ricin-loaded thermosensitive hydrogel in pancreatic cancer xenograft[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(4): 418.
- [19] Gao Y, Ren FZ, Ding BY, et al. A thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for sustained release of docetaxel[J]. *J Drug Targeting*, 2010, 1: 12.
- [20] Maran A, Dadsetan M, Buenz M, et al. Hydrogel-PLGA delivery system prolongs 2-methoxyestradiol-mediated anti-tumor effects in osteosarcoma cells[J]. *J Biomed Mater Res*, 2013, 1: 6.
- [21] Lee H, Mok H, Lee S, et al. Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels[J]. *Control Rel*, 2001, 119(2): 245.
- [22] Seruga B, Sterling L, Wang L, et al. Reporting of serious adverse drug reactions of targeted anticancer agents in pivotal phase III clinical trials[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 9(2): 174.
- [23] 朱卫, 徐元龙, 李学明. 智能纳米水凝胶及其药剂学研究新进展[J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(6): 518.

[收稿日期]2012-10-07

[修回日期]2013-04-08

[收稿日期]2013-05-06

[修回日期]2013-05-19

(上接第 253 页)