

# 血脉通胶囊与卡马西平联用对癫痫模型小鼠的保护作用

焦 洋<sup>1\*</sup>, 魏立明<sup>2</sup>, 邱 雯<sup>2#</sup>(1.兰州大学第二临床医学院, 兰州 730000; 2.兰州大学第二医院药学部, 兰州 730030)

中图分类号 R285;R742.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4057-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.08

**摘要** 目的:研究血脉通胶囊与卡马西平(CBZ)联用对癫痫模型小鼠的保护作用。方法:第1、3、5、8、10天腹腔注射戊四唑(PTZ, 45 mg/kg),第12天腹腔注射PTZ(75 mg/kg)以复制小鼠癫痫模型。实验分为模型(等容生理盐水)组、CBZ(120 mg/kg)组、联合用药(CBZ 120 mg/kg+血脉通胶囊500 mg/kg)组。除第12天外,每次腹腔注射PTZ前30 min灌胃给药。计算小鼠轻、重度发作率和死亡率,记录小鼠癫痫轻度发作潜伏期、重度发作持续时间、发作等级,并观察脑组织病理切片。结果:与模型组比较,CBZ组与联合用药组小鼠重度发生率、死亡率显著降低,轻度发作潜伏期显著延长,重度发作持续时间显著缩短,发作等级显著降低( $P<0.01$ ),小鼠脑组织的损伤明显减轻。与CBZ组比较,联合用药组以上指标均显著改善( $P<0.05$ )。结论:血脉通胶囊和CBZ联用对小鼠PTZ慢性点燃有明显的抑制作用。

**关键词** 血脉通胶囊;戊四唑;癫痫;卡马西平

## Protective Effects of Xuemaitong Capsules Combined with Carbamazepine on Epilepsy Model Mice

JIAO Yang<sup>1</sup>, WEI Li-ming<sup>2</sup>, QIU Wen<sup>2</sup>(1.The Second Clinical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Dept. of Pharmacy, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the protective effects of Xuemaitong capsules combined with carbamazepine (CBZ) on epilepsy model mice. METHODS: Mice were given intraperitoneal injection of pentylenetetrazole (PTZ, 45 mg/kg) on 1st, 3rd, 5th, 8th and 10th day, and then given intraperitoneal injection of PTZ (75 mg/kg) on 12th day to induce epilepsy kindling model. Model mice were divided into model group (constant volume normal saline), CBZ group (120 mg/kg) and drug combination group (CBZ 120 mg/kg+Xuemaitong capsules 500 mg/kg). They were given relevant medicines intragastrically 30 min before modeling except 12th day. The mild attack rate, the severe attack rate, death rate were calculated. The latent period of mild attack, the duration of severe attack, attack level were recorded, and pathological section of cerebral tissue was observed. RESULTS: Compared with model group, the severe attack rate and death rate were decreased significantly, the latent period of mild attack was prolonged significantly, the duration of severe attack was shortened significantly, attack level was decreased significantly ( $P<0.01$ ). The damage of cerebral tissue was reduced significantly in CBZ group and drug combination group. Compared with CBZ group, the index were better in drug combination group ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: CBZ combined with Xuemaitong capsules can inhibit PTZ-kindling seizures in mice.

**KEY WORDS** Xuemaitong capsules; Pentylenetetrazol; Epilepsy; Carbamazepine

癫痫是大脑神经元突发性异常放电,导致大脑短暂功能障碍的慢性疾病,是发作性意识丧失的主要原因<sup>[1]</sup>。目前,抗癫痫药物(AEDs)约有20余种,约2/3的患者通过已知的AEDs治疗可获得良好的效果,但仍有约1/3的癫痫患者症状无法控制,从而发展成为顽固性癫痫或难治性癫痫(Intractable epilepsy, IE or Refractory epilepsy, RE)。RE是目前临床上的难题之一,其主要原因可能是血脑屏障(Blood-brain barrier,

BBB)上存在的多药转运体(Multidrug transporters)构成了一道屏障<sup>[2]</sup>。P糖蛋白(P-gp)是首先被发现的多药转运体,其由MDR基因编码,大部分AEDs都是它的底物药物,如卡马西平(CBZ)、苯巴比妥等<sup>[3-4]</sup>。多药转运体P-gp高表达时,可以借助主动能量依赖转运过程,阻止AEDs进入脑组织,或将已进入BBB的药物泵回血液中,从而降低脑组织中AEDs的量,使AEDs无法有效发挥治疗效果<sup>[3]</sup>。若尝试使用P-gp抑制剂与

[14] 王平, 缪舒益, 孟宪丽, 等. 反相离子对色谱法同时测定大鼠血浆中五种大黄蒽醌的方法学研究[J]. 中药药理与临

\* 本科生。研究方向: 临床药学。电话: 0931-8942753。E-mail: 245928852@qq.com

# 通信作者: 副教授。研究方向: 临床药学。E-mail: 119231570@qq.com

床, 2009, 25(5): 47.

[15] Tang W, Wan M, Zhu Z, et al. Simultaneous determination of eight major bioactive compounds in Dachengqi Tang (DT) by high-performance liquid chromatography [J]. *Chin Med*, 2008, 3(5): 1.

(收稿日期: 2012-11-09 修回日期: 2013-03-05)

AEDs合用,则可能增加其透过BBB的量,有利于RE的治疗。血脉通胶囊主要成分为葛根、川芎、丹参、栀子等,而川芎嗪和葛根素都具有抑制P-gp的作用<sup>[5-6]</sup>,同时使用葛根素和川芎嗪可明显增加BBB的通透性<sup>[7]</sup>,理论上可增加CBZ进入脑组织的量,有利于癫痫的治疗。本研究选用抗癫痫药CBZ与血脉通胶囊联用,考察其对戊四唑(PTZ)诱导小鼠癫痫的保护作用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

TP-L型摊片机、HP-C型烘片机(天津市久圣医疗电子仪器有限公司);BX-50型光学显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.2 药品与试剂

CBZ片(上海中西三维药业有限公司,批号:20111013);血脉通胶囊(贵州益康制药有限公司,批号:20120301);PTZ(美国Sigma公司);5%水合氯醛溶液(兰州大学第二医院制剂室自制);4%多聚甲醛(北京赛驰生物科技有限公司);苏木精-伊红染色试剂由兰州大学基础医学院提供。

### 1.3 动物

SPF级昆明种小鼠30只,♂,体质量18~22g,由兰州大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(甘)2009-0004]。饲养于兰州大学第二医院药学部动物实验室,饲养温度为18~22℃,自由饮水。

## 2 方法

### 2.1 复制模型与分组、给药

将30只小鼠随机分为模型(等容生理盐水)组、CBZ(120mg/kg)组与联合用药(CBZ120mg/kg+血脉通胶囊500mg/kg)组。每组小鼠均于第1、3、5、8、10天ip PTZ(45mg/kg),第12天ip PTZ(75mg/kg)以复制癫痫模型。除第12天外,每次ip PTZ前30min ig给药。

### 2.2 癫痫发作等级评价

每次ip PTZ后连续观察30min小鼠发作行为,记录小鼠痫性发作潜伏期(未发作的潜伏期按1800s计算),发作行为等级、次数和发作总持续时间,第12天观察小鼠发作率及死亡率。癫痫发作等级参照Racine标准<sup>[8]</sup>:0级,无发作反应;1级,节律性口角、耳或面部肌肉抽动阵挛;2级,点头并伴随更严重的面部肌肉抽动阵挛;3级,出现前肢阵挛但不伴随直立;4级,前肢阵挛伴随直立;5级,全身强直阵挛发作而跌倒。

### 2.3 病理学检查

采用水合氯醛(5%,1ml/kg)深度麻醉小鼠后,剪开胸腔,暴露心脏,经左心室插入灌注针头,穿入主动脉内,同时剪开右心耳,快速灌注生理盐水约20ml,然后接换4℃4%多聚甲醛30ml继续灌注,直至小鼠四肢强直、发白。此时固定完毕,开颅取脑,4%多聚甲醛固定24h,制作石蜡切片,然后苏木精-伊红染色。

### 2.4 统计学方法

计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 13.0统计软件分析数据,多样本均数的比较及均数的两两比较采用方差分析检验(LSD),等级资料用非参数检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 联合用药对模型小鼠癫痫发作的抑制作用

与模型组比较,CBZ组与联合用药组小鼠重度发生率、死亡率显著降低,轻度发作潜伏期显著延长,重度发作持续时间显著缩短,发作等级显著降低( $P < 0.01$ ),小鼠脑组织的损伤明

显减轻;与CBZ组比较,联合用药组以上指标均显著改善( $P < 0.05$ )。联合用药对模型小鼠癫痫发作的抑制作用见表1、图1。

表1 联合用药对模型小鼠癫痫发作的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 1 Inhibitory effects in model seizure mice under drug combination ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	轻度发作率, %	重度发作率, %	死亡率, %	轻度发作潜伏期, s	重度发作持续时间, s	发作等级
模型组	100	100	50	128.10 ± 16.98	35.50 ± 5.10	5.0 ± 0.00
CBZ组	100	60*	10*	262.20 ± 24.93*	16.90 ± 4.64*	3.8 ± 0.79*
联合用药组	100	30**	0**	457.40 ± 38.96**	3.70 ± 2.52*	2.9 ± 0.74*

与模型组比较: \* $P < 0.01$ ; 与CBZ组比较: # $P < 0.05$   
vs. model group: \* $P < 0.01$ ; vs. CBZ group: # $P < 0.05$

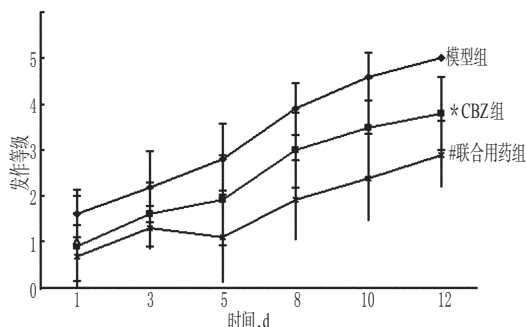


图1 联合用药对模型小鼠癫痫发作的抑制作用

与模型组比较: \* $P < 0.01$ ; 与CBZ组比较: # $P < 0.05$

Fig 1 Inhibitory effects of seizure drug combination in model mice

vs. model group: \* $P < 0.01$ ; vs. CBZ group: # $P < 0.05$

### 3.2 联合用药对模型小鼠脑组织病理形态学的影响

模型组小鼠神经元出现缺血性改变,核固缩均质化,核仁不清,碎裂溶解,胞浆空泡形成,间质疏松,细胞间隙增大;CBZ组小鼠脑组织出血明显减少,部分神经元核固缩均质化;联合用药组小鼠脑细胞坏死减轻明显,少数神经元核固缩,核仁清晰,细胞间质稍有紊乱。从病理检查结果可见,血脉通胶囊与CBZ联用可以显著抑制PTZ对小鼠脑组织的损伤,这种保护作用比单用CBZ更加明显。小鼠脑组织切片见图2。

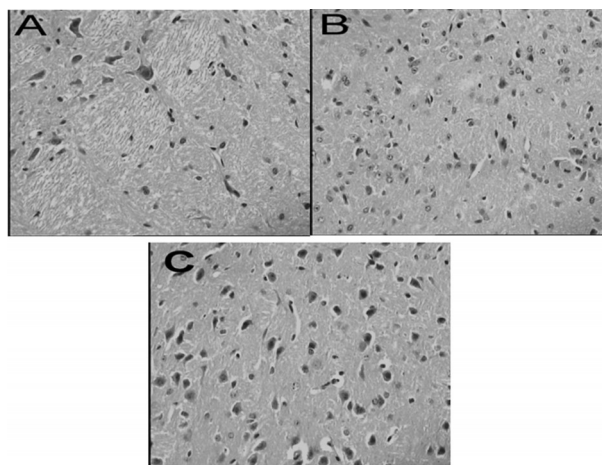


图2 小鼠脑组织切片

A. 模型组; B. CBZ组; C. 联合用药组

Fig 2 Pathological section of cerebral tissue in mice

A. model group; B. CBZ group; C. drug combination group

## 4 讨论

慢性癫痫模型的点燃是通过反复地刺激丘脑和海马等区域诱发癫痫,在脑电图上的表现是进行性癫痫样活动,在行为学上的表现则是癫痫样发作的模式<sup>[9]</sup>,这种刺激包括电刺激和化学刺激。电刺激是通过在海马区、杏仁核埋入电极,反复予以一定强度阈值下的刺激,从而制成癫痫模型;化学刺激则是通过反复注射兴奋性、毒性物质,如海人酸或PTZ,从而达到癫痫点燃效果<sup>[10]</sup>。并且慢性点燃还可以被用于研究癫痫的预防,如果被研究的药物可以抑制点燃模型诱发的自发性癫痫的发生,这就说明该药物可以预防癫痫的发作。因此,本研究对于癫痫的治疗和预防都具有一定参考。

BBB是由由于血循环与脑实质间的软脑膜、脉络丛的脑毛细血管内皮细胞(BMEC)和包于壁外的胶质膜所组成,通常认为只有分子量较小、脂溶性强的物质能够通过,极性亲水性物质、大分子物质难以通过。但有文献报道,环孢素A、长春新碱等脂溶性较强的药物在脑组织质量浓度偏低<sup>[11]</sup>,说明脂溶性药物并不是完全穿过BBB。近年研究发现,BBB血管内皮细胞膜上存在着多种药物转运体,这些转运体构成BBB的另一道屏障,且与癫痫的多重耐药性(MDR)性相关<sup>[12]</sup>。P-gp高表达时借助主动能量依赖转运过程,减少AEDs进入脑组织或已进入BBB的药物泵回血液中,从而降低癫痫灶内药物的质量浓度,使AEDs不能完全发挥其抗癫痫作用,因此P-gp表达增强可促使癫痫患者发生MDR现象。在本研究中,单用CBZ虽然可以显著抑制PTZ的诱导作用,但无法完全抑制,第12天时重度发作率依然达到60%,发作等级则为3.8,接近重度发作。该结果可能与BBB上的P-gp作用有关,而且由于PTZ的反复诱导,使BBB上的P-gp过度表达,因此CBZ难以穿过BBB达到脑组织发挥作用,所以单用CBZ抑制PTZ诱导癫痫的作用并不十分理想。

若尝试使用中药P-gp抑制剂,与抗癫痫药物合用,可能会增加AEDs进入脑组织的量,更好地发挥AEDs的药理作用,有利于难治性癫痫的治疗。川芎嗪(Tetramethylpyrazine, TMP)是川芎中提取的一种活性生物碱,即四甲基吡嗪,现已能人工合成。川芎嗪可以扩张血管,增加冠脉及脑血流量,抑制血小板聚集,且较易通过BBB<sup>[13]</sup>。同时,川芎嗪也是典型的P-gp转运蛋白中药抑制剂<sup>[6]</sup>。葛根素又称葛根黄酮,来源为野葛的根,具有提高免疫、增强心肌收缩力等作用,同样也具有抑制P-gp活性的作用<sup>[6]</sup>。同时使用葛根素和川芎嗪更可以增加BBB的通透性<sup>[7]</sup>,可以使CBZ较易透过BBB到达脑组织,更好地发挥抗癫痫作用。而血脉通胶囊的主要成分有葛根、川芎、丹参、栀子等,因此与单用CBZ比较,合用血脉通胶囊可以更好地抑制PTZ慢性点燃小鼠癫痫的过程,其机制可能是通过抑制BBB上的P-gp活性,同时增加了BBB的通透性,促使CBZ更多地进入脑组织,从而更好地发挥治疗效果。这为临

床上中药辅助治疗癫痫提供了一定的实验基础,同时为中药P-gp抑制剂的研究提供了新的理论依据。

## 参考文献

- [1] 郭玉璞,王维治.神经病学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:1 047.
- [2] Loscher W, Potschka H. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs[J]. *J Pharmacol*, 2002, 301(1):7.
- [3] Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. P-glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 327(3): 173.
- [4] Seegers U, Potschka H, Loscher W. Lack of effects of prolonged treatment with phenobarbital or phenytoin on the expression of P-glycoprotein in various rat brain regions [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 451(2):149.
- [5] Li M, Zhao M Q. Protective effect of tetramethylpyrazine and salvianolic acid B on apoptosis of rat cerebral microvascular endothelial cell under high shear stress[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2008, 38(3):177.
- [6] 李峥,庄笑梅,李素云,等.P-糖蛋白中药抑制剂的研究进展[J].*解放军药学报*, 2009, 25(4):326.
- [7] 李金辉,朱振洪,葛立军,等.体外血脑屏障的构建及川芎嗪与葛根素合用对P-gp基因表达的影响[J].*中华中医药杂志*, 2010, 25(12):2 118.
- [8] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation II Motor seizure[J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3):281.
- [9] Sun H, Dai H, Shaik N, et al. Drug efflux transporters in the CNS[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(1):83.
- [10] Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9):18 284.
- [11] Asperen JV, Mayer U, Tellingens OV, et al. The functional role of P-gp in the blood-brain barrier[J]. *J Pharm Sci*, 1997, 86(8):881.
- [12] Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, et al. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development[J]. *Pharmacol Rev*, 2003, 55(3):425.
- [13] 刘会芳.川芎嗪对心血管系统的作用及机制研究进展[J].*中国药房*, 2007, 18(9):706.

(收稿日期:2013-05-08 修回日期:2013-07-01)