

小儿抗痫胶囊对癫痫大鼠脑内 GABA-T 活性影响的实验研究*

田淑霞, 李新民

摘要:[目的] 观察中药小儿抗痫胶囊对癫痫大鼠戊四唑点燃模型的影响,进一步从调节 γ -氨基丁酸(GABA)代谢的角度探讨小儿抗痫胶囊的作用机制。[方法] 动物模型采用大鼠戊四唑点燃模型。采用微量紫外比色法,观察大鼠大脑皮质、双侧海马 γ -氨基丁酸转氨酶(GABA-T)活性的变化。[结果] 中药组、西药组、模型组体质量与正常对照组相比有显著性差异($P<0.01$),模型组体质量显著低于正常组,中药组较西药组体质量显著升高($P<0.01$);模型组较正常对照组大鼠脑内GABA-T活性显著升高($P<0.01$),中药组显著低于模型组($P<0.01$)。[结论] 抗痫胶囊对大鼠戊四唑点燃发作有显著对抗作用,其作用机制可能与其降低病模大鼠脑内GABA-T活性、谷氨酸(GLU)含量及增加GABA含量,影响脑内GABA代谢有关。

关键词: 小儿抗痫胶囊;癫痫; γ -氨基丁酸

中图分类号:R541.61 文献标识码:A 文章编号:1673-9043(2009)01-0024-03

Effect of children kangxian capsule on GABA-T activity in the brain of rats with epilepsy

TIAN Shu-xia, LI Xin-min

(Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] On the basis of past researches in the traditional Chinese medicine the effect of children anti-epilepsy capsule was observed in pentylenetetrazol (PTZ)-kindled model of rats and the mechanism of anti-epilepsy capsule was investigated at an angle of regulating metabolism of γ -aminobutyric acid (GABA). [Method] The model of pentylenetetrazol (PTZ)-kindled epilepsy was used in the experiment. The activity of γ -aminobutyric acid -transaminase in homogenized brain tissue of the rats was measured with microultraviolet spectrophotometry. [Results] The body weight of the anti-epilepsy capsule group, sodium valproate group and the PTZ model group were significantly different when compared with the control group ($P<0.01$). The weight of the anti-epilepsy capsule group was significantly different compared with that of the PTZ model group ($P<0.01$). the activity of γ -aminobutyric acid -transaminase in the brain of model group was significantly higher than that in normal group($P<0.01$). The activity in group treated with Chinese medicine was obviously lower than that in model group($P<0.01$). [Conclusion] The mechanism of anti-epilepsy capsule on epilepsy may be related to decreasing the GABA-transaminase activity and the level of Glu in the cortex and hippocampus of the rats and to increasing the level of the GABA in the cortex and hippocampus of the rats.

Key words: children anti-epilepsy capsule; epilepsy; γ -GABA

小儿抗痫胶囊具有广谱的抗癫痫作用,抗痫胶囊由太子参、茯苓、陈皮、半夏、石菖蒲、胆南星、枳

壳、桔梗、天麻、川芎、沉香等组成。以往笔者曾做过小儿抗痫胶囊的药理研究,结果显示:小儿抗痫胶囊可显著对抗土的宁、戊四唑、最大电休克发作引起的小鼠惊厥发作和死亡,其效果随剂量的增加而增强。除此以外,笔者还对小儿抗痫胶囊的安全性进行了实验,给药过程中实验动物均未见任何毒性反应。笔者还作了小儿抗痫胶囊对癫痫大鼠脑内谷氨酸(GLU),n-甲基天冬氨酸受体(NMDA)受体活

* 基金项目:天津市卫生局中医、中西医结合基金资助课题(97034)。

作者单位:300193 天津中医药大学(田淑霞)

300193 天津中医药大学第一附属医院(李新民)

作者简介:田淑霞(1973-),女,硕士研究生,主治医师,主要从事儿科癫痫病研究工作。

性改变及药物的影响。结果显示:小儿抗痫胶囊可显著降低氨基丁酸转氨酶合成前体谷氨酸(GLU)受体n-甲基天冬氨酸受体(NMDA)的活性,从而可治疗和控制癫痫发作。为了进一步从调节 γ -氨基丁酸(GABA)代谢的角度探讨抗痫胶囊的作用机制,进行了本实验研究。

1 实验材料

1.1 实验动物 选用健康SD雄性大鼠,58只,体重(150±10)g,由中国医学科学院动物研究所提供。

1.2 主要试剂及检测设备 主要试剂:戊四唑、GABA、 α -酮戊二酸、磷酸吡哆醛(PLP)、谷胱甘肽(GSH)、酰胺酰嘌呤二核苷酸(NAD⁺)、总蛋白液体试剂盒、乙二胺四乙酸(Na₂EDTA)、磷酸氢二钾/磷酸二氢钾(K₂HPO₄/KH₂PO₄)

主要设备:722型分光光度计、电子分析天平、高速冷冻离心机、微量振荡器、超声匀浆器

1.3 药物 小儿抗痫胶囊:购自天津中医药大学第一附属医院中药房,制成生药含量分别为1.5g/mL、0.75g/mL。

丙戊酸钠:湖南省湘中制药有限公司产品,配制药液浓度为0.1kg/L。

2 实验方法

2.1 造模方法 参考王丽^[1]的方法:用PTZ亚惊厥剂量32mg/kg,腹腔注射,1次/d连续28d。停药1周后,再用相同剂量的PTZ测试,凡显示连续5次Ⅱ级以上(发作时间无限制)连续惊厥的大鼠,被认为达到点燃标准。惊厥评分采用7点评分法^[2]。

2.2 分组与给药

2.2.1 实验分组 随机取正常对照组10只,余48只用于制备模型,惊厥发作均达到Ⅱ级以上,其中因严重惊厥死亡4只。惊厥模型大鼠随机分为4组,即:小儿抗痫胶囊Ⅰ组(中药高剂量组)11只、小儿抗痫胶囊Ⅱ组(中药低剂量组)11只、丙戊酸钠组11只、病模对照组11只、正常对照组10只。

2.2.2 给药方法 抗痫胶囊Ⅰ、Ⅱ组:分别灌服抗痫胶囊浓煎液10g/kg、5g/kg,2次/d,持续28d。丙戊酸钠组:连续28d灌服丙戊酸钠400mg/kg,每日2次,持续28d。正常对照组、病模对照组:连续28d灌服生理盐水,2次/d,1mL/次,持续28d。

3 观察指标与研究方法

3.1 抗痫胶囊对癫痫模型大鼠饮食、体质量等一般情况的影响 分别于实验前1d,实验第7、14、21、28天上午8点给各组大鼠称质量,并观察大鼠毛

色、精神状态,作好记录。

3.2 大鼠大脑皮质、海马 γ -氨基丁酸转氨酶(GABA-T)活性检测

3.2.1 (GABA-T)活性组织样品制备^[3] 将实验大鼠迅速断头,快速取出脑皮质、双侧海马(置于冰块上),称取湿质量,加入10倍冰冷的缓冲剂匀浆。匀浆后7000r/min,4℃离心15min,收集上清夜待测酶活性。

3.2.2 取样品匀浆上清 30 μ L加入到570 μ L,pH8.75的磷酸钠缓冲液中,30℃保温30min,测340nm的吸光度值。并取样品匀浆上清按总蛋白液体试剂盒产品说明书方法检测样品蛋白含量。

3.3 酶活性的计算 GABA-T的活性以/(mg·min)蛋白样品催化生成的NADHnmol数表示。

$$U = \Delta OD \times 1/t \times 106 / \sum NADH_{340} \times V \times 1/v \times 1/p = 278 \times \Delta OD/p$$

ΔOD :样品紫外比色读数的增加值,t:反应时间(min), $\sum NADH_{340}$:NADH的摩尔消光系数 4.795×10^3 ,V:反应总体积(mL),v:样品体积(mL),P:样品蛋白含量(g/L)。

3.4 统计学处理 实验结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计方法采用SPSS 10.0软件包处理,其中计量资料用t检验、计数资料用 χ^2 检验等。

4 实验结果

4.1 戊四唑点燃模型大鼠的一般情况 造模期间,4组大鼠均出现惊厥发作。大鼠连续注射PTZ32mg/(kg·d),12d后陆续出现级别不等的痫性发作,一般为Ⅰ~Ⅲ级,发作程度逐渐增高。实验结果显示持续时间随着时间的推移逐渐延长。一般表现为由自由活动状态进入安静或伏卧,随后眼神呆滞,出现点头、头部抽搐,渐次出现更高级别发作,于第26天全部点燃。期间,4只因癫痫持续状态而死亡。另外,造模期间还观察了大鼠体质量的变化,笔者观察到正常组大鼠平均每日体质量增长3g左右,中药治疗组大鼠体质量增长近于正常组大鼠增长,而模型组大鼠体质量增长缓慢,西药治疗组大鼠呈负增长。同时,观察到,模型组和西药组大鼠毛色晦黯,体质较差,精神状态明显较中药治疗组和正常对照组差。

4.2 小儿抗痫胶囊对戊四唑点燃大鼠饮食、体质量等一般情况的影响 小儿抗痫胶囊对戊四唑点燃大鼠体质量的影响见表1。实验开始时,4组之间体质量无显著差别,但与正常对照组相比有显著性差

表 1 小儿抗痫胶囊对戊四唑点燃大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	实验前	实验第 1 周末	实验第 2 周末	实验第 3 周末	实验第 4 周末
正常组	276.8± 6.0(10)	293.0±11.2(10)	308.2±12.0(10)	322.7±11.0(10)	346.0±10.5(10)
中药高	257.5±21.0(11) ^{##}	284.8±26.1(11)	300.0±34.3(11)	317.0±33.0(11)	333.1±29.5(11) ^{##}
中药低	258.2±20.5(11) ^{##}	270.1±21.5(11)	285.5±21.7(11)	299.0±23.6(11)	322.7±26.4(11) ^{##}
西药组	255.4±17.1(11) ^{##}	255.9±22.6(11)	245.7±22.7(10)	239.2±22.5(9)	233.9±22.6(9)
模型组	247.8±15.5(11) ^{##}	246.5±17.3(11)	245.9±16.6(10)	248.8±18.0(9)	251.9±21.1(9) ^{##}

注:与正常组比较^{##} $P<0.01$,与西药组比较^{##} $P<0.01$ 。

异($P<0.01$)。于第 4 周末,模型组与正常组相比,有显著性差异($P<0.01$)。于实验第 4 周末中药高剂量组、中药低剂量组较西药组显著升高($P<0.01$)。

4.3 小儿抗痫胶囊对戊四唑点燃大鼠大脑皮质、海马(GABA-T)活性的影响 抗痫胶囊对戊四唑点燃大鼠脑组织内 GABA-T 活性的影响见表 2。模型组较正常对照组海马和皮质都有显著性差异 ($P<0.01$)。用小儿抗痫胶囊、丙戊酸钠治疗后,中药高剂量组、西药组与模型组比较,中药低剂量组皮质与模型组皮质比较有显著性差异($P<0.01$)。而中药高剂量组与低剂量组比较有显著性差异(海马 $P<0.01$ 、皮质 $P<0.05$),表明小儿抗痫胶囊在降低 GABA-T 活性方面也与剂量有正相关关系。而同组海马与皮质之间比较无显著性差异。

表 2 小儿抗痫胶囊对戊四唑点燃大鼠脑组织内

组 别	n	GABA-T 活性的影响($\bar{x}\pm s$) (nmol)	
		海马	皮质
中药高剂量组	11	18.1±1.9 ^{##} $\Delta\Delta$	17.9±1.7 ^{##} Δ
中药低剂量组	11	21.4±3.5 ^{##}	19.3±2.1 ^{##}
西药组	9	17.2±3.7 ^{##}	17.7±2.4 ^{##}
模型组	9	23.6±2.4 ^{##}	23.7±3.9 ^{##}
正常组	10	19.0±3.1	18.3±2.1

5 讨论

癫痫为一发作性神志异常的疾病。小儿癫痫的基本病机主要责之于脾虚痰伏、气逆风动,治疗宜以健脾顺气、豁痰熄风为主,小儿抗痫胶囊为其有效治疗方剂。抗痫胶囊由太子参、茯苓、陈皮、半夏、石菖蒲、胆南星、枳壳、桔梗、天麻、川芎、沉香等组成。方中除石菖蒲、胆南星豁痰祛痰外,更以太子参、茯苓、陈皮、半夏等仿六君子汤之意,以绝生痰之源。

实验在以往研究基础上,以戊四唑点燃大鼠为研究对象,通过观察小儿抗痫胶囊的抗惊厥作用及

从其影响脑内 GABA 代谢方面进一步探讨药物的作用机制。近年来,GABA 作为中枢神经系统最主要的抑制性神经递质,受到人们普遍重视。 γ -氨基丁酸是由脑内含量极高的谷氨酸经谷氨酸脱羧酶脱羧而成。GABA 分解代谢首先由 GABA-T 将 GABA 的氨基除去,生成琥珀酸半醛(SSA),后者再经琥珀酸半醛脱氢酶(SSADH)氧化成琥珀酸(SA),参与三羧酸循环,或经琥珀酸半醛还原酶(SSAR)还原成 GABA,由于 SSADH 活性极强因而上述两反应中氧化反应生成琥珀酸占优势,其失去的氨基主要被 α -酮戊二酸接受,重新生成 GLU。而 GABA-T 是催化 GABA 生成琥珀酸的关键酶,其活性的高低直接影响到 GABA 的水平。 γ -氨基丁酸作为中枢神经系统主要抑制性神经递质与癫痫发病关系密切。有临床研究表明:癫痫患者脑内抑制性递质 GABA 却有不同程度的降低,其后发现顽固性癫痫脑脊液中 GABA 水平较正常人少 40%。另有研究表明:多种致病药物引起发作与其阻断脑内 GABA 代谢有关。根据 GABA 的代谢过程,进行了实验。结果表明,小儿抗痫胶囊能显著抑制大鼠戊四唑点燃发作,其疗效与药物剂量成正相关关系,其作用机制可能与其降低 GABA-T 的活性,影响 GABA 的代谢有关。至于 GABA 的代谢如何影响到癫痫患者发病,其具体机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王 丽.大鼠戊四唑点燃模型的建立[J].药学学报,1993,28(7):486-489.
- [2] Ono J.Electrocorticographic observation of seizures induced by pentylenetetrazol injection in rats[J]. Functional Neurol,1990,5:345-347.
- [3] 胡元元,何善述. γ -氨基丁酸转氨酶活性的动力学特征及其测量法的改良[J].同济医科大学学报,1999,28(1):7-9.

(收稿日期:2008-10-10)