

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.08.014

柴贝止痫汤及其主要入血成分柴胡皂苷 a 对癫痫模型大鼠卡马西平脑内分布的影响

孙江燕¹, 刘冲冲², 袁斯远¹, 王潇慧³, 刘金民^{2*}

(1. 北京中医药大学第三附属医院, 北京市朝阳区安定门外小关街 51 号, 100029; 2. 北京中医药大学东方医院; 3. 青岛市海慈医疗集团)

摘要 目的 观察柴贝止痫汤及柴胡皂苷 a 治疗难治性癫痫的可能作用机制。方法 88 只大鼠随机分为空白组 12 只及模型组、卡马西平组、柴贝止痫汤 + 卡马西平组、柴胡皂苷 a + 卡马西平组 19 只。除空白组外, 其余各组采用侧脑室注射海人酸制备癫痫大鼠模型。卡马西平组给予卡马西平混悬液 0.75 ml/(100 g · d), 柴贝止痫汤 + 卡马西平组给予柴贝止痫汤 0.5 ml/(100 g · d) 和卡马西平混悬液 0.75 ml/(100 g · d), 柴胡皂苷 a + 卡马西平组给予柴胡皂苷 a 混悬液 0.25 ml/100 g 和卡马西平混悬液 0.75 ml/100 g, 模型组及空白组给予等量羧甲基纤维素钠混悬液。给药 60 天后比较各组海马 P 糖蛋白、Mdr1a mRNA 表达及全脑卡马西平 (CBZ)、10, 11-环氧化卡马西平 (CBZE) 含量。结果 与空白组比较, 模型组海马 P 糖蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 卡马西平组、柴胡皂苷 a + 卡马西平组海马 P 糖蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 柴贝止痫汤 + 卡马西平组海马 P 糖蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与卡马西平组比较, 柴贝止痫汤 + 卡马西平组和柴胡皂苷 a + 卡马西平组海马 P 糖蛋白表达均降低 ($P < 0.05$), 柴贝止痫汤 + 卡马西平组和柴胡皂苷 a + 卡马西平组海马 P 糖蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组 Mdr1a mRNA 表达较空白组升高。卡马西平组的 Mdr1a mRNA 表达高于空白组 ($P < 0.05$), 空白组、模型组 MDR1a mRNA 表达分别为卡马西平组的 0.36 倍、0.87 倍。柴贝止痫汤 + 卡马西平组较卡马西平组 Mdr1a 含量降低 ($P < 0.01$), 为卡马西平组的 0.14 倍。与卡马西平组比较, 柴贝止痫汤 + 卡马西平组 CBZE 含量升高 ($P < 0.01$), 柴胡皂苷 a + 卡马西平组 CBZE 含量降低 ($P < 0.01$), 且柴贝止痫汤 + 卡马西平组和柴胡皂苷 a + 卡马西平组 CBZ 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与柴贝止痫汤 + 卡马西平组比较, 柴胡皂苷 a + 卡马西平组 CBZ、CBZE 含量均降低 ($P < 0.01$)。结论 柴贝止痫汤联合卡马西平可降低癫痫模型大鼠海马 Mdr1a/P 糖蛋白表达, 促进 CBZ、CBZE 入脑, 对 CBZE 作用突出, 柴胡皂苷 a 在其中不发挥主要作用。

关键词 难治性癫痫; 柴贝止痫汤; 柴胡皂苷 a; P 糖蛋白; Mdr1a; 卡马西平; 10, 11-环氧化卡马西平

癫痫是临床常见的中枢神经系统慢性疾病。目前癫痫患者中约 50% 可用单一药物完全控制, 15% ~ 25% 通过更换或添加抗癫痫药物而治愈, 但仍有 20% ~ 30% 应用适当抗癫痫药物后仍不能缓解, 从而发展为难治性癫痫 (intractable epilepsy, IE)^[1], 亦称耐药性癫痫。研究发现, 癫痫的反复发作及抗癫痫西药的长期摄入均可导致以 P 糖蛋白为代表的耐药蛋白高表达, 从而阻止抗癫痫药物吸收入脑发挥效用^[2]。鉴于抗癫痫西药的主导治疗

地位, 如何提高 IE 患者对抗癫痫药物的敏感性成为当前研究的主要困境。虽然目前多药转运体人造抑制剂的合成开发已历经三代, 但其疗效不确定性以及无法避免的全身毒副作用限制其临床运用。越来越多的研究倾向于发现特异性强、毒副作用小的天然多药转运体抑制剂以及多角度的联合治疗策略以解决当前困境。

我们在柴胡加龙骨牡蛎汤及定痫丸的基础上结合多年经验加减化裁为柴贝止痫汤用于 IE 的临床治疗, 发现该复方辅助抗癫痫西药可降低 IE 患者的发作频次及发作严重程度^[3-4]。采用 LC-MS 进一步检测该复方发现, 方中君药柴胡的主要成分柴

基金项目: 国家自然科学基金(81774277); 北京中医药大学研究生校级自主课题(2018-JYBZZ-XS239)

* 通讯作者: jmvip@vip.163.com, (010) 67689618

胡皂苷 a (Saikosaponin A, SSa) 作为柴贝止痛汤的主要入血成分,可以直接作用于血脑屏障毛细血管内皮细胞。由此推测,柴贝止痛汤可能通过抑制耐药蛋白/基因提高脑内抗癫痫西药的浓度,而 SSa 可能在其抗耐药中发挥主要作用。本实验以耐药基因 Mdr1 (Multi-Drug Resistance 1)、P 糖蛋白表达量及抗癫痫西药含量为指标,对比柴贝止痛汤与 SSa 对抗癫痫药物的协同效用并探索其可能作用机制。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 120 只,体重 200 ~ 220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于北京中医药大学东方医院实验中心动物房。实验动物许可证号: SCXK (京) 2016-0006。

1.2 药物

柴贝止痛汤组成: 北柴胡 12 g, 浙贝母 9 g, 天麻 15 g, 法半夏 9 g, 石菖蒲 9 g, 地龙 6 g, 煅牡蛎 30 g 等,北京中医药大学东方医院药剂科制备,每剂药生药量为 90 g,水煮浓煎约 54 ml,浓度折合生药量 1.678 g/ml。浓煎静置装袋,置于 4℃ 冰箱备用。卡马西平混悬液: 称取卡马西平 (CBZ) 标准品粉末 (上海源叶生物科技有限公司,批号 H21M7L11256,纯度 ≥ 98%) 4474 mg,加入 8% 羧甲基纤维素钠溶液 500 ml,搅拌,配置成浓度为 14.9136 mg/ml 的均匀混悬液。柴胡皂苷 a 混悬液: 称取 300 mg 柴胡皂苷 a 标准品粉末 (成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-47050105,纯度 98.35%),加入 15 ml 8% 羧甲基纤维素钠溶液研磨混匀,配置成 20 mg/ml 的均匀混悬液。奥卡西平 (OXC) 标准品 (中国食品药品检定研究院,批号 100657-201102,99.8%),10,11-环氧化卡马西平 (CBZE) 标准品 (Sigma,批号 SLBT7644,≥ 98%)。青霉素注射液 (华北制药集团动物保健品有限责任公司,批号: 171102)。

1.3 主要试剂和仪器

海人酸 (Sigma 公司,批号 MKCD0368); 羧甲基纤维素钠溶液 (批号 1113F022)、RIPA 裂解液 (批号 20180305)、5 × Loading Buffer (批号 20180119)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 20180314)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (批号 20180410)、电泳液 (批号 20180227)、电转液 (批号 20180129)、PBS (批号 20180307)、吐温-

20 (批号 822L0422)、脱脂奶粉 (批号 1030D056)、ECL 超敏发光液 (批号 20180330),均为 Solarbio 公司产品; 无水甲醇 (北京化工厂,批号 20180228); Trizol (Invitrogen,批号 10296028); 无水乙醇 (批号 10009218)、异丙醇 (批号 40064360)、水合氯醛 (批号 20170421),国药集团化学试剂有限公司产品; SuperScript III RT 反转录试剂盒 (Invitrogen 公司,批号 11752050); 乙酸乙酯 (北京化工厂,批号 20180108); 兔抗鼠 P 糖蛋白单克隆抗体 (Abcam 公司,批号 GR 217576-39); 兔抗鼠 GAPDH 多克隆抗体 (Proteintech 公司,批号 00061352); 羊抗兔 IgG (HRP) 多克隆抗体 (Abcam 公司,批号 GR3192725-1)。

ECL 成像仪 (SynGene 公司,型号: GeneGenome), 小动物脑立体定位仪 (STOELTING,型号 51600), 微量进样器 (HAMILTON,型号 80365), 高速颅钻 (SAESHIN,型号 STRONG90/120), 低温高速离心机 (Eppendorf,型号 5417R), 酶标仪 (Bio-Tek,型号 ELX-800), Mini 垂直电泳系统 (Bio-Rad,型号 TY0417), 往复式脱色摇床 (QILINBEIER,型号 TS. B-408), PCR 仪 (Applied biosystems,型号 7900 Fast), Synaptg2 型超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱仪 (美国 Waters 公司,型号 UPLC-Q-TOF/MS)。

1.4 动物分组、造模及给药

采用随机数字表法从 120 只大鼠中选取 12 只为空白组,其余大鼠参照文献 [6] 采用侧脑室注射海人酸建立慢性自发性癫痫大鼠模型。术前 12 h 大鼠禁食不禁水。术前采用 10% 水合氯醛 (0.35 ml/100 g) 腹腔注射麻醉,将大鼠头部固定在动物脑立体定位仪上,剪去部分毛发,碘酒局部消毒,沿头部正中中线切开头皮,以 30% 的双氧水清除颅骨上腱膜及颅骨外膜,暴露前囟及冠状缝。保持前后囟在同一水平面。侧脑室定位参照鼠脑图谱 [7],于前囟后 0.8 mm,旁开 1.6 mm,以高速颅钻在相应位置钻孔,注意控制力度尽量避免出血。在钻孔处操作脑立体定位仪使微量注射器下针 3.7 mm (硬脑膜下 3.7 mm),以 1 μl/min 速度缓慢向侧脑室内注射 3 μl 海人酸溶液 (0.5 μg/μl),注射结束后留针 5 min,缓慢退针。缝合皮肤,碘酒擦拭。空白组于侧脑室注射 3 μl 生理盐水。术后每只大鼠腹腔注射青霉素 80 万 U/(kg · d),共 5 天,以预防感染。按照 Racine 分级标准 [8],将造

模 24 h 内出现Ⅳ级及以上发作者视为造模成功。将造模成功的 76 只大鼠按照随机数字表法分为模型组、卡马西平组、柴贝止痛汤 + 卡马西平组、柴胡皂苷 a + 卡马西平组, 每组 19 只。

卡马西平组给予卡马西平混悬液 0.75 ml/(100 g · d), 柴贝止痛汤 + 卡马西平组给予柴贝止痛汤 0.5 ml/(100 g · d) 和卡马西平混悬液 0.75 ml/(100 g · d), 柴胡皂苷 a + 卡马西平组给予柴胡皂苷 a 混悬液 0.25 ml/(100 g · d) 和卡马西平混悬液 0.75 ml/(100 g · d)。其中卡马西平混悬液及柴贝止痛汤用量依据等效剂量直接折算公式^[8], 第 1、2 个月分别以 200 g、300 g 作为平均体重计再给药量。第 1、2 个月模型组和空白组分别给予羧甲基纤维素钠溶液 2.5、3.75 ml 灌胃。各组大鼠均采取灌胃给药, 均给药 60 天。

1.5 取材

取材前 12 h 完成最后 1 次灌胃, 禁食不禁水。每组按照随机数字表法选取 6 只, 取材前给予 10% 水合氯醛 (0.35 ml/100 g) 腹腔注射麻醉, 断头取脑, 于冰上分离海马, 迅速置于液氮, 后转移至 -80℃ 冻存, 以备 Western blot 及 RT-PCR 检测。每组再取 6 只, 取材前麻醉, 开胸暴露心脏, 采用生理盐水行全脑灌注直至肝脏颜色转为灰白, 断头取全脑, 迅速置于液氮, 后转移至 -80℃ 冻存, 以备 LC-MS 检测。

1.6 Western blot 法检测海马 P 糖蛋白表达

研磨组织提取总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 将蛋白样品变性分装, -80℃ 冻存。制备 10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 以每孔 40 μg (12 μl) 蛋白量上样。接通电泳仪 160 V 电泳 15 min, 待所有样品跑成一条直线后转为 100 V 90 min 结束。电泳仪调整为恒流 295 mA, 转膜 90 min。将 PVDF 膜依据蛋白 Marker 剪开并 5% 脱脂奶粉封闭, 摇床 90 min。将目标蛋白及内参所在 PVDF 膜分别孵育 P 糖蛋白抗体 (稀释比 1 : 2000) 及 GAPDH 抗体 (稀释比 1 : 50000), 4℃ 过夜。PBST 冲洗 4 次, 每次 5 min, 摇床孵育二抗 (稀释比 1 : 8000) 80 min, PBST 冲洗 4 次, 每次 5 min, ECL 发光, 用 ECL 成像仪进行图像采集。

1.7 RT-PCR 检测海马 Mdr1a mRNA 表达

采用 Trizol 试剂进行总 RNA 提取, SuperScript III RT 反转录试剂盒合成 cDNA。引物由北京泰科美生物科技有限公司合成, Mdr1a: 正向: 5'-TTT GAC TCG GGA GCA GAA GT-3'; 反向: 5'-AAA CCG

GAA ACA AGC AGC AT-3'; GAPDH: 正向: 5'-GTT ACC AGG GCT GCC TTC TC-3'; 反向: 5'-GGG TTT CCC GTT GAT GAC C-3'。每个样本分别用 Mdr1a 基因和 GAPDH 基因引物扩增, 每个反应做 3 个重复, 配置扩增体系, 于 RT-PCR 仪上进行扩增反应。

1.8 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱仪检测全脑 CBZ 及 CBZE 含量

色谱条件: 采用 ACQUITY UPLC HSS C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 内标为 OXC; 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A) —1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱 (初始 95% A, 5% B; 5 min, 50% A, 50% B; 5.1 min, 95% A, 5% B; 8 min, 95% A, 5% B), 流速 0.4 ml/min, 柱温 40℃, 样品温度 15℃, 进样量 10 μl; CBZE、CBZ 的检测离子分别是 210.09、237.10, 内标 OXC 的检测离子是 253.10。

电喷雾离子源 (ESI) 采用正离子扫描模式: 毛细管电压为 2.7 kV, 样本锥孔电压为 40 V, 分离锥孔电压为 4 V, 离子源温度为 120℃, 反向锥孔气流为 50 L/h, 脱溶剂气流为 800 L/h, 脱溶剂气温度为 500℃。

样品处理: 各组脑组织精密称重, 用生理盐水制备成 700 mg/ml 脑匀浆液, 取 200 μl, 其余冻存至 -80℃ 备用。在每一 200 μl 脑匀浆液中加入内标 OXC 10 μl, 0.1 mmol/L 盐酸溶液 25 μl, 充分震荡混匀后, 加入乙酸乙酯 1 ml, 2000 r/min 震荡 10 min, 4℃ 12000 r/min 离心, 离心半径 9.5 cm, 吸取 800 μl 上清于新 EP 管中。在沉渣中再次加入乙酸乙酯 1 ml, 同条件震荡、离心, 吸取上清 700 μl 于上述 EP 管中。将含有 1500 μl 上清液的 EP 管氮吹, -20℃ 保存备用。质谱检测前, 各样品以 150 μl 无水甲醇复融, 震荡离心后吸取上清 100 μl 至进样小瓶中待测。

配制标准品溶液: 精密称取 CBZ 4.80 mg、CBZE 25 mg、OXC 5.09 mg, 分别置于 10 ml 的容量瓶中, 用无水甲醇定容, 制备浓度分别为 0.48、2.5、0.509 mg/ml 的标准储备液。所有溶液保存于 4℃ 冰箱备用。

建立标准曲线: 采用甲醇将 CBZ、CBZE 标准品溶液分别按照原始溶液及原始溶液的 1/50、1/100、1/500、1/1000、1/5000、1/10000 7 个浓度配置标准溶液稀释液。从 7 个浓度的稀释液中吸取 20 μl 加入新的 EP 管中, 氮吹, 在 EP 管中加入空白脑匀浆液 200 μl。后续处理方法完全同“样品处理”操作。同样方法复融后用于质谱检测。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 18.0 进行统计分析。实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示, 方差齐各组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 分析; 方差不齐各组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较采用 Games-Howell 分析。设置双侧检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 模型制备情况

108 只造模大鼠术后呼吸、心跳平稳, 约 20 min 后出现胡须抖动、流涎, 严重者伴牙齿颤动、咬舌、前肢微微颤动。约 1 h 后大鼠逐渐清醒, 陆续出现凝视、呆滞、点头, 单方向原地转圈, 单侧或双侧前肢试图上抬, 但因阵挛出现站立不稳、跌倒。随着时间延长, 大鼠前肢上抬幅度增大, 阵挛明显, 站立不稳、跌倒次数增多, 严重者全身阵挛、翻转, 横竖冲撞鼠笼, 出现癫痫持续状态。术后 3~4 h 癫痫发作频率逐渐下降, 症状减轻, 活动减少, 部分大鼠呆滞不动。术后 6 h 发作基本停止, 出现饮食水等自主活动。术后 24 h 内发作 IV 级及以上并存活的大鼠共 76 只, 造模成功率达 70.4%。其余 32 只大鼠中 15 只因癫痫持续状态过久、术后呼吸不畅等原因死亡, 17 只因发作级别较低不予采用。采用侧脑室注射生理盐水的空白组 12 只大鼠术后 40 min~1 h 逐渐清醒, 醒后较快出现自主活动, 与正常大鼠无明显差异。

2.2 各组大鼠海马 P 糖蛋白表达比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组海马 P 糖蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 卡马西平组、柴胡皂苷 a + 卡马西平组海马 P 糖蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 柴贝止痫汤 + 卡马西平组海马 P 糖蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与卡马西平组比较, 柴贝止痫汤 + 卡马西平组和柴胡皂苷 a + 卡马西平组海马 P 糖蛋白表达均降低 ($P < 0.05$), 柴贝止痫汤 + 卡马西平组和柴胡皂苷 a + 卡马西平组海马 P 糖蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠海马 P 糖蛋白表达比较 ($/\text{GAPDH}, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	P 糖蛋白
空白组	6	$0.42 \pm 0.34^*$
模型组	6	0.75 ± 0.18
卡马西平组	6	0.79 ± 0.22
柴贝止痫汤 + 卡马西平组	6	$0.47 \pm 0.15^{*\Delta}$
柴胡皂苷 a + 卡马西平组	6	$0.48 \pm 0.15^{\Delta}$

注: 与模型组比较, $* P < 0.05$; 与卡马西平组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组大鼠海马 Mdr1a mRNA 表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组 Mdr1a mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但有升高趋势, 卡马西平组 Mdr1a mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组 Mdr1a mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与卡马西平组比较, 柴贝止痫汤 + 卡马西平组 Mdr1a mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), 柴胡皂苷 a + 卡马西平组 Mdr1a mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。柴贝止痫汤 + 卡马西平组和柴胡皂苷 a + 卡马西平组 Mdr1a mRNA 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。柴贝止痫汤 + 卡马西平组对大鼠海马 Mdr1a mRNA 抑制作用最优。

表 2 各组大鼠海马 Mdr1a mRNA 表达比较($2^{-\Delta\Delta CT}, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Mdr1a mRNA
空白组	6	0.47 ± 0.25
模型组	6	1.09 ± 0.44
卡马西平组	6	$1.34 \pm 0.67^*$
柴贝止痫汤 + 卡马西平组	6	$0.60 \pm 0.28^{\Delta}$
柴胡皂苷 a + 卡马西平组	6	$1.32 \pm 0.62^*$

注: 与空白组比较, $* P < 0.05$; 与卡马西平组比较, $\Delta P < 0.05$

2.4 各组大鼠脑内 CBZ 及 CBZE 含量比较

表 3 示, 与卡马西平组比较, 柴贝止痫汤 + 卡马西平组 CBZE 含量升高 ($P < 0.01$), 柴胡皂苷 a + 卡马西平组 CBZE 含量降低 ($P < 0.01$), 柴贝止痫汤 + 卡马西平组和柴胡皂苷 a + 卡马西平组 CBZ 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与柴贝止痫汤 + 卡马西平组比较, 柴胡皂苷 a + 卡马西平组 CBZ、CBZE 含量均降低 ($P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠脑内 CBZ 及 CBZE 含量比较($\mu\text{g}/\text{mg}, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CBZ	CBZE
卡马西平组	6	0.018 ± 0.002	0.017 ± 0.004
柴贝止痫汤 + 卡马西平组	6	0.022 ± 0.007	$0.026 \pm 0.004^*$
柴胡皂苷 a + 卡马西平组	6	$0.012 \pm 0.001^{\Delta}$	$0.006 \pm 0.001^{*\Delta}$

注: CBZ, 卡马西平; CBZE, 10, 11-环氧化卡马西平; 与卡马西平组比较, $* P < 0.01$; 与柴贝止痫汤 + 卡马西平组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

难治性癫痫兼具慢性病程、药物不敏感、反复发作等特征, 其中最常见发作类型为颞叶癫痫, 约占 50% 以上^[8]。海人酸侧脑室注射通过引起脑内神经元去极化而诱导癫痫的慢性反复发作, 且优先作用于动物海马, 使其表现出颞叶癫痫的典型特

征^[9]。尽管该模型制备方法无法直接呈现 IE 的耐药性,但多数实验已证实其能较好地表现出脑内耐药蛋白的高表达,在一定程度上较好地模拟 IE 的临床特点,且技术操作简便、动物自发发作出现较快^[9]。故本实验选用侧脑室注射海人酸进行模型制备。

P 糖蛋白是一种分子量为 170 KD 的跨膜糖蛋白,主要分布于血脑屏障毛细血管内皮细胞近血管腔的一侧,能阻止药物进入脑组织^[10]。Mdr1 作为编码 P 糖蛋白的多药耐药基因,在啮齿类动物中分为 Mdr1a 和 Mdr1b 两种亚型^[11]。Mdr1 的过度表达可促使 P 糖蛋白升高,从而增加药物转运和外排,降低脑内药物浓度导致耐药^[12]。研究发现,耐药性癫痫患者和动物模型脑内皮细胞中的 P 糖蛋白及 Mdr1 表达均明显高于药物敏感性的癫痫患者和动物模型^[13-16]。除癫痫发作外,长期服用抗癫痫西药亦是诱导 P 糖蛋白过表达的重要因素^[17]。本研究结果显示,模型组海马内 P 糖蛋白及 Mdr1a 表达均较空白组明显升高 ($P < 0.05$),CBZ 治疗进一步增加了 P 糖蛋白及其耐药基因 Mdr1a 的表达,但差异无明显统计学意义。此结果与既往文献报道^[18]基本一致,佐证了癫痫的反复发作及抗癫痫西药的长期应用增加脑内 Mdr1a、P 糖蛋白表达的结论。

前期证候学研究显示,难治性癫痫的主要证候为风痰内阻兼郁证^[19]。本团队结合难治性癫痫患者的临床发作特点将其归纳为痰气郁滞证,并拟方柴贝止痫汤进行治疗。柴贝止痫汤中柴胡疏肝解郁通畅全身气机,和顺气血熄肝风以散痰郁,为君药;浙贝母、法半夏一寒一热化痰散结,配以天麻熄风止痉,三者化痰熄风共为臣药;牡蛎平肝潜阳、地龙清热熄风止痉,共为佐药,石菖蒲化湿豁痰、开窍醒神,引药上行,为使药。全方共奏疏肝理气、化痰熄风、醒神开窍之功。其中柴胡入肝经,轻清上行,善于宣透少阳半表半里之邪,对于 IE 的反复发作具有重要的治疗作用。前期动物实验证实,该复方能够降低癫痫大鼠的平均发作时间和发作级别^[20],结合本实验 Western blot 及 RT-PCR 结果,我们推测该复方对 Mdr1a、P 糖蛋白高表达的抑制可能进一步促进了抗癫痫西药入脑。SSa 虽然不能明显抑制 Mdr1a 的高表达,但其在抑制 P 糖蛋白上与复方作用相当,是否亦能提高脑内抗癫痫西药浓度,在复方这一效用中发挥重要作用?由此我们进一步开展 LC-MS 检测以证实猜想。伴知党

障碍的局灶性发作是颞叶癫痫最常见的发作形式,其发病比例约为 76.5%^[19]。CBZ 作为其治疗的首选药物,故选用于本实验抗癫痫治疗。CBZ、CBZE 均受 P 糖蛋白阻止进入脑组织^[2,18]。因此,本实验同时检测大鼠全脑的 CBZ 和 CBZE 含量以证实复方及 SSa 的协同作用。LC-MS 结果显示,柴贝止痫汤能够同时促进 CBZ 及 CBZE 的入脑,其中对 CBZE 作用更加突出。SSa 虽然降低海马中 P 糖蛋白的高表达,但未增加脑内的抗癫痫西药及其活性代谢产物的浓度。回顾实验过程并查阅文献,分析认为:1) 这种差异可能与代谢酶如 CYP3A4 的诱导或抑制有关^[21]。CBZ 药物自身既是 CYP3A4 的底物,又是 CYP3 的诱导剂^[22]。团队前期研究发现,柴贝止痫汤能够通过下调孕烷 X 受体 (PXR) 抑制 P 糖蛋白的表达,而 PXR 的下调可抑制 CYP3A4 的转录和表达^[23]。亦有研究表明,柴胡总皂苷对 CYP3A 的活性有一定诱导作用^[24]。CBZ 和 CBZE 含量可能是在多种药物相互调节的复杂环境下形成差异。后续研究可对比动物血药浓度与脑内药物浓度并分析柴贝止痫汤对相关代谢酶的调节作用,以进一步明确机制。2) Mdr1a/P 糖蛋白仅为抗癫痫药耐药转运的机制之一,柴贝止痫汤协助 CBZ、CBZE 入脑是多个药物成分多靶点共同作用的结果。而 SSa 作用靶点单一,其虽降低 P 糖蛋白表达但未能抑制耐药基因高表达。既往研究发现,SSa 可以通过调节离子通道、抑制星形胶质细胞激活、减少脑内炎症反应等多种机制发挥抗癫痫效用^[25-27],抑制 P 糖蛋白可能是其调节相关通路的次要影响,而非核心环节。受条件限制本实验尚存不足之处,如未进行行为学观察、电生理检测而仅从蛋白、基因角度研究,尚未全面阐释柴贝止痫汤和 SSa 的抗 IE 效用及机制;LC-MS 未检测脑内复方有效成分的浓度,未研究复方自身的抗癫痫效用。未来可从以上方面进一步研究柴贝止痫汤其他入血成分的效用和机制对于深入挖掘复方,探索天然多药转运体抑制剂。

参考文献

- [1] GAO L, XIA L, ZHAO FL, et al. Clinical efficacy and safety of the newer antiepileptic drugs as adjunctive treatment in adults with refractory partial-onset epilepsy: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials [J]. *Epilepsy Res*, 2013, 103(1): 31-44.
- [2] ZHANG C, KWAN P, ZUO Z, et al. The transport of an-

- tiepileptic drugs by P-glycoprotein [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(10): 930-942.
- [5] 郑香春, 李淑芳, 刘金民. 柴贝止痫汤单药及合并用药治疗难治性癫痫临床观察 [J]. *天津中医药*, 2012, 29(3): 224-227.
- [6] 聂莉媛, 鄢泽然, 张青, 等. 柴贝止痫汤添加治疗难治性癫痫复杂部分性发作的临床研究 [J]. *环球中医药*, 2015, 8(1): 13-18.
- [7] KANDRATAVICIUS L, BALISTA PA, LOPES-AGUIAR C, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2014, 10: 1693-1705. doi: 10.2147/NDT.S50371.
- [8] PAXINOS G, WATSON C. The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates [M]. New York: Academic Press, 1982: 1-104.
- [9] RACINE JR. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II Motor seizures [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 269-279.
- [10] 崔燎. 药理学实验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2011: 8.
- [11] ENGEL J JR. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? [J]. *Neuroscientist*, 2001, 7(4): 340-352.
- [12] VARMA MV, ASHOKRAI Y, DEY CS, et al. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement [J]. *Pharmacol Res*, 2003, 48(4): 347-359.
- [13] FISCHER V, EINOLF HJ, COHEN D. Efflux transporters and their clinical relevance [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2005, 5(2): 183-195.
- [14] NOBILI S, LANDINI I, MAZZEI T, et al. Overcoming tumor multidrug resistance using drugsable to evade P-glycoprotein or to exploit its expression [J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(6): 1220-1262.
- [15] DOMBROWSKI SM, DESAI SY, MARRONI M, et al. Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2010, 42(12): 1501-1506.
- [16] BARTMANN H, FUEST C, LA FOUGERE C, et al. Imaging of P-glycoprotein-mediated pharmacoresistance in the hippocampus: proof-of-concept in a chronic rat model of temporal lobe epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2010, 51(9): 1780-1790.
- [17] VOLK HA, LOSCHER W. Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures [J]. *Brain*, 2005, 128(6): 1358-1368.
- [18] 肖争, 晏勇. 大鼠耐苯妥英钠和苯巴比妥钠杏仁核点燃模型及多药耐受基因的表达 [J]. *中华神经科杂志*, 1999, 32(6): 365-368.
- [19] WEN T, LIU YC, YANG HW, et al. Effect of 21-day exposure of phenobarbital, carbamazepine and phenytoin on P-glycoprotein expression and activity in the rat brain [J]. *J Neurol Sci*, 2008, 270(1): 99-106.
- [20] WANG Y, ZHOU D, WANG B, et al. A kindling model of pharmacoresistant temporal lobe epilepsy in sprague-dawley rats induced by coriaria lactone and its possible mechanism [J]. *Epilepsia*, 2010, 44(4): 475-488.
- [21] 李淑芳. 颞叶癫痫中医证候研究及柴贝止痫汤对癫痫大鼠 GABAR、NMDAR1 表达的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2009: 58.
- [22] 王越, 刘金民. 中药柴贝止痫汤对难治性癫痫大鼠模型行为学及 P-糖蛋白和 MDR1 表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4): 1735-1738.
- [23] 牛倩倩, 陈梦钰, 曹博群, 等. 脑心清对卡马西平在癫痫大鼠体内药动学和脑组织分布的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(1): 114-117.
- [24] 卜书红, 张健, 陆晓彤, 等. 儿童癫痫患者 CYP 酶活性与血清卡马西平浓度和临床疗效的相关性分析 [J]. *医药导报*, 2010, 29(4): 430-432.
- [25] CHEN SY, WANG K, Wan YJY. Retinoids activate RXR/CAR-mediated pathway and induce CYP3A [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(2): 270-276.
- [26] 王永辉. 柴胡总皂苷对小鼠部分药物代谢酶及 P-糖蛋白的影响 [J]. 广州: 广州中医药大学, 2012: 33-35.
- [27] 谢炜, 林佳, 张作文, 等. 柴胡皂苷 a 对体外培养大鼠海马星形胶质细胞激活的抑制作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(10): 1798-1801.
- [28] YU YH, WEI X, YONG B, et al. Saikosaponin a mediates the anticonvulsant properties in the HNC models of AE and SE by inhibiting NMDA receptor current and persistent sodium current [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50694.
- [29] YE M, BI YF, DING L, et al. Saikosaponin a functions as anti-epileptic effect in pentylenetetrazol induced rats through inhibiting mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81: 281-287. doi: 10.1016/j.biopha.2016.04.012.

Effects of *Chaibei Zhixian Decoction* (柴贝止痫汤) and its Constituents Migrating to Blood Saikosaponin a on Distribution of Carbamazepine in Brain in Epilepsy Model Rats

SUN Jiangyan¹, LIU Chongchong², YUAN Siyuan¹, WANG Xiaohui³, LIU Jinmin²

(1. Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Qingdao Hiser Hospital)

ABSTRACT **Objective** To observe the possible mechanism of *Chaibei Zhixian Decoction* (CBZXD, 柴贝止痫汤) and Saikosaponin a (SSa) in treating intractable epilepsy. **Methods** A total of 88 rats were randomly divided into blank group of 12 rats and every 19 rats for model group, carbamazepine (CBZE) group, the CBZXD + CBZE group, and the saikosaponin a + CBZE group. Except for the blank group, other groups used the lateral ventricle injection of kainate to prepare a rat model of epilepsy. The CBZE group was given CBZE suspension 0.75 ml/(100 g · d). The CBZXD + CBZE group was given CBZXD 0.5 ml/(100 g · d) and CBZE suspension 0.75 ml/(100 g · d). The saikosaponin a + CBZE group was given saikosaponin a suspension 0.25 ml/100 g and CBZE suspension 0.75 ml/100 g. The model group and the blank group were given the same amount sodium carboxymethylcellulose suspension. After 60 days of administration, the expression of P-glycoprotein, Mdr1a mRNA and the content of whole brain carbamazepine (CBZ) and 10, 11-epoxidized CBZE were compared. **Results** Compared with the blank group, the expression of P-glycoprotein in the hippocampus of the model group was increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of P-glycoprotein in the hippocampus of the CBZE group, saikosaponin a + carbamazepine group was not statistically significant ($P > 0.05$). The expression of P-glycoprotein in hippocampus of CBZXD + CBZE group was decreased ($P < 0.05$). Compared with CBZE group, the expression of P-glycoprotein in hippocampus of CBZXD + CBZE group and saikosaponin a + CBZE group was decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of P-glycoprotein in hippocampus between CBZXD + CBZE group and saikosaponin a + CBZE group ($P > 0.05$). Mdr1a mRNA expression in the model group was increased compared with that in the blank group. The expression of Mdr1a mRNA in CBZE group was higher than that in the blank group ($P < 0.05$). The expression of MDR1a mRNA in blank group and model group was 0.36 times and 0.87 times higher than that in CBZE group. The content of Mdr1a in the CBZXD + CBZE group was decreased when compared with that in the CBZE group ($P < 0.01$), which was 0.14 times higher than that in the CBZE group. Compared with CBZE group, CBZE content in CBZXD + CBZE group was increased ($P < 0.01$). CBZE content in saikosaponin a + CBZE group was decreased ($P < 0.01$), and there was no significant difference in CBZ between CBZXD + CBZE group and saikosaponin a + CBZE group ($P > 0.05$). Compared with CBZXD + CBZE group, saikosaponin a + CBZE group, the content of CBZ, CBZE was reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** CBZXD combined with CBZE can reduce the expression of Mdr1a/P glycoprotein in hippocampus of rats with epilepsy, promote CBZ and CBZE into the brain, and play an important role in CBZE. The saikosaponin a dose not play a major role in the above process.

Keywords intractable epilepsy; *Chaibei Zhixian Decoction* (柴贝止痫汤); saikosaponin a; P-glycoprotein; Mdr1a; carbamazepine; 10, 11-epoxidation of carbamazepine

(收稿日期: 2018-09-04; 修回日期: 2019-01-05)

编辑: 王利芬