

藏药七十味珍珠丸对惊厥小鼠脑内氨基酸含量的影响

海平(青海省心血管病专科医院,青海 西宁 810012)

摘要:目的 观察七十味珍珠丸的抗惊厥作用及作用机制。方法 七十味珍珠丸 ig 给药,使用硫代氨基脲制成惊厥小鼠模型,测定惊厥开始时间、致死率;采用高压液相色谱仪测定小鼠脑内抑制性氨基酸 γ -氨基丁酸(GABA)、甘氨酸(Gly)和兴奋性氨基酸谷氨酸(Glu)、天门冬氨酸(Asp)的含量。结果 七十味珍珠丸对硫代氨基脲所致惊厥的开始时间,具有显著延迟作用,可明显减少小鼠致死率。有升高惊厥小鼠脑内 GABA,降低脑内 Glu 含量的作用趋势,但无显著差异($P > 0.05$),而对 Glu/GABA 的比值,却有明显的降低作用($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),使 Glu/GABA 保持正常动物的水平,即维持中枢神经系统兴奋和抑制状态平衡的作用,阻止惊厥发生。结论 该药具有抗惊厥作用,其作用机制可能是通过调节脑内兴奋性和抑制性氨基酸的平衡来实现的。

基金项目:本课题系国家中医药管理局科研项目(合同号 97 M003)

作者简介:海平,男,38 岁。1985 年毕业于山东医科大学药学系。任青海省心血管病专科医院(青海省高原医学研究所)副院长,副研究员

Effects of rannasangpei on level of amino acid in brain of mice with eclampsia

HAI Ping(Qing Hai Province Cardiovascular Special Hospital , Xining810012 , China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To study the effects of Rannasangpei on level of amino acid in brain of mice with eclampsia. **METHOD** The level of GABA, Gly, Glu and Asp in brain of mice, who were the model with eclampsia thiocarbamate-induced, were determined using high performance liquid chromatography (HPLC) while changes of attack time and fatal rate were examined. **RESULTS** The level of GABA was increased by administration of Rannasangpei and inversely in Glu, but no statistic difference ($P>0.05$). The value of Glu/GABA was decreased significantly ($P<0.05$ or 0.01). And the eclampsia time was delayed and the fatal rate decreased remarkably. **CONCLUSION** The Rannasangpai could decrease the value of Glu/GABA to maintain the ratio to a normal level and a balance between excitatory and inhibitory state in CNS of mice with eclampsia. **KEY WORDS:**rannasangpai/ drug effects; mice; glutamate; GABA; central nerves system; brain

藏药七十味珍珠丸的藏文译音为然纳桑培(Rannasangpei,我们将其简称为RNSP),是藏医最有代表性的名贵珍宝藏成药之一。该药最早源于藏医经典方剂二十五味珍珠丸,始载于公元八世纪藏医巨著《四部医典》中,经历代藏医药学家不断改进和完善,最后由藏医南方学派代表人物苏喀巴·年尼多杰于十五世纪中叶,在总结了前辈的研究基础上,研制成了现用的方剂,距今已有500余年的历史,十八世纪被名医葛玛·额勒丹增收载于《药方集方部》中。是藏医临床治疗各种急性脑血管及神经系统疾病最常用的药物。主要由佐太、天然珍珠、天然牛黄、羚羊角、麝香、藏红花等七十余味名贵藏药组成。具有安神、镇静、通经活络、调合气血、醒脑开窍之功效。可治疗“黑白脉病”、“龙血”不调、中风、瘫痪、半身不遂、癫痫、小儿抽搐、脑溢血、脑栓塞及植物神经功能紊乱等神经系统疾病^[1-5]。药效学研究表明,七十味珍珠丸具有明显的中枢镇静和抗惊厥作用^[6,7],但其作用机制目前尚无研究报道,本实验就该药对惊厥动物脑内氨基酸含量的影响进行了探索。

1 材料

1.1 药品与试剂:

RNSP系青海金诃藏医药集团有限公司(青海省藏药制药厂)生产,批号960816;苯妥英钠注射液由上海新亚制药厂生产,批号890817-04;硫代氨基脲由北京化工厂生产,批号781228;天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)均为Waters氨基酸分析专用标准品; γ -氨基丁酸(GABA)系美国Sigma公司产品;Waters氨基酸分析专用试剂包(AccQ•Fluor Reagent, AccQ•Tag Elvent A, AccQ•Fluor Borate Buffer等)购于美国Waters公司;色谱纯乙腈(HPLC专用)由天津四友生物医学技术有限公司生产,批号810243112。

1.2 仪器:

600E高压液相色谱仪(HPLC)、2487紫外检测器、AccQ•Tag氨基酸柱等均系美国Waters公司产品;超速冷冻离心机系日本东芝株式会社出品。

1.3 实验动物:

昆明种小鼠由青海省实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 RNSP对硫代氨基脲致惊厥作用的影响

健康小鼠,雌雄各半,体重(22.5 ± 2.3)g,随机分为对照组、RNSP0.5g/kg组、RNSP1.0g/kg组、RNSP2.0g/kg组和苯妥英钠组0.05g/kg组。ig给药或自来水,每天1次,共10d,末次药后2h ip 硫代氨基脲16mg/kg,同时记录出现惊厥的时间(为奔跑型惊厥)以及死亡情况。结果见表1。

表1 RNSP对硫代氨基脲致惊厥作用的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of RNSP on eclampsia thiocarbamate-induced mice($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	惊厥开始时间 (min)	小鼠存活数 (只)	存活率 (%)
对照组	-	16	58.7 ± 7.2	0	0
苯妥英钠组	0.05	16	$64.9\pm6.1^{(1)}$	5	$31.3^{(1)}$
RNSP组	0.5	14	63.4 ± 7.4	5	$35.7^{(1)}$
RNSP组	1.0	12	$66.2\pm6.4^{(1)}$	4	$33.3^{(1)}$
RNSP组	2.0	16	$70.8\pm13.0^{(2)}$	6	$37.5^{(2)}$

注:与对照组相比⁽¹⁾ $P<0.05$, ⁽²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control group ⁽¹⁾ $P<0.05$, ⁽²⁾ $P<0.01$

结果表明,RNSP 1g/kg和2g/kg均对硫代氨基脲所致惊厥的开始时间,具有显著的延迟作用,且3个剂量组均可明显减少小鼠致死率($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。

2.2 RNSP对硫代氨基脲致惊小鼠脑内氨基酸含量的影响

2.2.1 分组、给药、制造模型:健康小鼠,雌雄各半,体重(22.2 ± 1.7)g,随机分为对照组、硫代氨基脲模型组、RNSP 1.0g/kg组和0.5g/kg组。ig给药或自来水,每天1次,共10d,末次药前禁食16h,药后2h ip 0.16%的硫代氨基脲16mg/kg,对照组ip同体积NS,50min后脱颈处死小鼠,在冰块上迅速取大脑部位,置液氮中待测。

2.2.2 脑内游离氨基酸的提取:取脑组织置于10mL冰冷的75%乙醇中匀浆,将匀浆倒入50mL圆底烧瓶中,再用

5 mL 乙醇冲洗匀浆器 1 次,合并后在 100 ℃水浴中回流提取 20 min,低温(4 ℃)4 000r/ min 离心 20 min,上清液在水浴中蒸发至起泡沫,于冰箱冷却 30 min 后,12 000r/ min 低温高速离心 30 min,上清液继续蒸发除去乙醇,再加 10 mL 乙醚充分混匀,分层后取水相部分,在 40 ℃水浴上蒸发乙醚,然后低温干燥即可。

2.2.3 氨基酸处理、分析:按 Waters 氨基酸分析专用试剂包

中的说明书操作。在提取的脑氨基酸干燥品内,加 0.5 mL 20 mol/ L HCl,过滤后取出 10 μ L,加 70 μ L AccQ• Fluor Borate Buffer 和 20 μ L 重新标定的 AccQ• Fluor Reagent ,立即震荡数秒,室温下放置 1 min,55 ℃下放置 10 min,降至室温后,取 10 μ L 进样,进行 GABA, Glu, Gly, Asp 等氨基酸分析。氨基酸含量测定后,乘以稀释倍数,除以脑重,即得脑内氨基酸含量(ng / g 湿脑组织)。结果见表 2。

表 2 RNSP 对硫代氨基脲致惊小鼠脑内氨基酸含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of RNSP on level of a amino-acid in brain of mice with eclampsia thiocarbamide-induce($\bar{x} \pm s$)

组别	剂 量 (g/ kg)	动物数 (只)	小鼠脑内氨基酸含量(ng / g 脑)				Glu / GABA
			GABA	Gly	Glu	Asp	
对照组	-	8	135.2 $\pm$ 42.7	42.0 $\pm$ 12.6	686.0 $\pm$ 209.8	158.8 $\pm$ 53.2	5.28 $\pm$ 1.36 ¹⁾
模型组	-	10	114.8 $\pm$ 35.6	43.6 $\pm$ 11.8	747.8 $\pm$ 181.3	171.1 $\pm$ 47.1	6.69 $\pm$ 1.03
RNSP 组	0.5	8	123.8 $\pm$ 26.0	46.7 $\pm$ 22.6	611.4 $\pm$ 230.5	167.4 $\pm$ 53.6	5.06 $\pm$ 1.92 ¹⁾
RNSP 组	1.0	10	138.6 $\pm$ 42.8	43.4 $\pm$ 14.6	625.9 $\pm$ 193.3	177.1 $\pm$ 62.6	4.56 $\pm$ 0.63 ²⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Note :Compared with control group ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

2.2.4 色谱条件:按 Waters 氨基酸分析专用试剂包中的说明书操作。采用 Waters 600E HPLC,和其提供的 AccQ• Tag 氨基酸柱(¹⁸ C 反相氨基酸层析柱), 3.9 mm $\times$ 150 mm,以及 2487 紫外检测器,波长 249nm。流动相:A 为 AccQ• Tag Eluent A,B 为色谱纯乙腈,C 为色谱纯水。梯度条件:在 30 min 内 A 由 100 %降到 83 %,B 由 0 增加到 17 %;30 至 36 min B 为 60 %,C 为 40 %。经以上过程进行梯度冲洗柱子。

结果表明,RNSP ig 给药 0.5,1 g/ kg,有升高硫代氨基脲致惊小鼠脑内 GABA,降低脑内 Glu 含量的作用趋势,但无显著差异($P > 0.05$),而对 Glu/ GABA 的比值,却有明显的降低作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),使 Glu/ GABA 保持正常动物的水平,即该药具有维持中枢神经系统兴奋和抑制状态平衡的作用。

3 讨论

临床应用表明²⁾,RNSP 治疗癫痫效果甚佳。本研究证明,该药具有明显对抗硫代氨基脲引起的惊厥。惊厥是中枢神经系统紊乱的一种表现,与脑内氨基酸代谢异常有关,脑内抑制性氨基酸 GABA, Gly 含量下降,兴奋性氨基酸 Glu、Asp 含量升高均可导致惊厥。而抗惊厥药物主要通过改变脑内某些氨基酸含量而发挥作用,其中谷氨酸可能是癫痫发作的始动物质。致惊剂硫代氨基脲是谷氨酸脱羧酶抑制剂,可抑制 Glu 生成 GABA,使脑内 GABA 合成减少, Glu 含量升高,从而导致 Glu/ GABA 的比值升高,打破了脑内兴奋性和

抑制性氨基酸水平的平衡状态,引起惊厥。本研究表明,RNSP 虽然仅有升高脑内 GABA,降低脑内 Glu 含量的作用趋势($P > 0.05$),但却能明显降低由致惊剂硫代氨基脲引起的 Glu/ GABA 比值的升高,使 Glu/ GABA 保持正常动物的水平,即具有维持中枢神经系统兴奋和抑制状态平衡的作用,阻止惊厥发生。故该药的抗惊厥作用,可能是通过调节脑内兴奋性和抑制性氨基酸的平衡来实现。

参考文献

[1] 中国药典 1998 年版(一部)[S].1995:357.
[2] 兰科.藏药七十味珍珠丸治疗神经及心血管疾病 102 例疗效观察[J].中国民族医药杂志,1996,2(3):20.
[3] 旦增.藏药 70 味珍珠丸治疗中风偏瘫 1 例报告[J].中国民族医药杂志,1996,2(1):13.
[4] 曲珍.藏药然纳桑培的治疗小儿抽搐的体会[J].中国民族医药杂志,1997,3(1):18.
[5] 更登.70 味珍珠丸治疗植物神经功能紊乱的临床观察[J].中国民族医药杂志,1999,5(4):
[6] 文青杰,艾措千,海平,等.藏药 70 味珍珠丸的镇静作用研究[J].中国民族医药杂志,1998,4(2):41.
[7] 海平,周生祥,尚鸿,等.藏药 70 味珍珠丸的抗惊厥作用研究[J].中国民族医药杂志,1998,4(2):45.

收稿日期:2001-11-18