

黄连治疗癫痫的协同作用及对P-糖蛋白介导的抗癫痫药脑转运的调节作用

王凌¹, 庄波阳², 王少明^{1,3}, 阮君山^{1,3*} (1.福建省立医院, 福州 350001; 2.福建省药品检验所, 福州 350001; 3.福建医科大学省立临床医学院, 福州 350001)

摘要: 目的 考察黄连协同抗癫痫药治疗癫痫的疗效及黄连对P-糖蛋白介导的抗癫痫药透过血脑屏障的影响, 评价黄连对癫痫的防治作用。方法 选用P-糖蛋白抑制剂维拉帕米和常用抗癫痫药卡马西平, 使用戊四唑和土的宁制备小鼠癫痫模型, 观察并对比卡马西平单用与联用低、中、高剂量黄连的小鼠潜伏期、惊厥率和死亡率的差异。小鼠分组并灌胃卡马西平、卡马西平加黄连及卡马西平加维拉帕米后, 测定脑组织卡马西平浓度并比较。结果 黄连可显著增强卡马西平对抗戊四唑、土的宁所引起的癫痫作用, 延长潜伏期和降低惊厥率($P<0.05$), 明显提高卡马西平的脑浓度($P<0.05$)。结论 黄连对癫痫的治疗有良好的增效作用。

关键词: 黄连; 卡马西平; 癫痫; P-糖蛋白; 血脑屏障

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)06-0660-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.06.004

Study of Coptidis Rhizoma on the Synergism to Epilepsy and the Regulation to Brain Delivery of Antiepileptic Drugs Mediated by P-glycoprotein

WANG Ling¹, ZHUANG Boyang², WANG Shaoming^{1,3}, RUAN Junshan^{1,3*} (1.Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China; 2.Fujian Provincial Institute for Drug Control, Fuzhou 350001, China; 3.Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the efficacy of Coptidis Rhizoma combined with antiepileptic drugs on epilepsy and the effect of Coptidis Rhizoma on the passing of antiepileptic drugs through blood-brain barrier mediated by P-glycoprotein, thus evaluate the preventive and therapeutic effect of Coptidis Rhizoma on epilepsy. **METHODS** Verapamil as a P-glycoprotein inhibitor and carbamazepine as a common antiepileptic drug were selected. The mice epilepsy models were prepared by pentylene-tetrazole and strychnine, respectively. The seizure latency, convulsion rate and mortality of the mice intragastrically administrated carbamazepine alone or with low, middle and high dose of Rhizoma Coptidis were observed and contrasted. Mice were divided into groups and orally administrated carbamazepine, carbamazepine with Coptidis Rhizoma and carbamazepine with verapamil, and then the brain concentration of carbamazepine was determined and compared. **RESULTS** Coptidis Rhizoma significantly enhanced the antagonism of carbamazepine to pentylene-tetrazole and strychnine, which prolonged the seizure latency and reduced the convulsion rate($P<0.05$). The brain concentration of carbamazepine was also markedly raised by Coptidis Rhizoma($P<0.05$). **CONCLUSION** Coptidis Rhizoma has good synergetic effect on the treatment of epilepsy.

KEY WORDS: Coptidis Rhizoma; carbamazepine; epilepsy; P-glycoprotein; blood brain barrier

癫痫是神经系统的常见疾病, 我国的癫痫患者平均每年新增 40 余万例, 且 18 岁以下患者高达 75%~80%^[1]。临床采用的抗癫痫药物 (antiepileptic drugs, AED) 尽管对许多患者具有明显疗效, 但仍有 30%~40% 癫痫患者经一定时期适当治疗后仍未达到无发作或长期用药后出现药物抵抗^[2]。国内外学者发现^[3-4], P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 与此相关, 其可介导 AED

泵出脑组织或阻止 AED 进入脑内, 所以抑制 P-gp 的表达及功能是开发新型癫痫药物及治疗方法的新途径。但目前治疗癫痫的 P-gp 抑制剂的研发主要集中于西药领域, 如环孢素、PSC-833、VX-710 等, 由于这些药物存在不良反应大、选择性差或亲和力低等缺点^[5-6], 至今未被批准用于临床癫痫的治疗^[7]。中药因具有不良反应小、多靶点、多途径的综合调节作用等先天优势, 成为开发的新契机。

基金项目: 福建省中医药科研项目(wzzy201308)

作者简介: 王凌, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0591)88216353
主任药师 Tel: (0591)88216353 E-mail: ruanjunshan@163.com

E-mail: summerjuling@126.com

*通信作者: 阮君山, 男, 博士, 副

黄连(*Coptidis Rhizoma*, CR)是一种常用中药,有清热燥湿,泻火解毒之功效,研究发现其对 P-gp 有抑制作用^[8-9],另有报道黄连温胆汤在小儿神经系统疾病中有清热化痰解郁,开窍宁神的作用^[10],但尚无文献报道黄连联合抗癫痫药治疗癫痫的疗效以及黄连对 P-gp 介导的抗癫痫药透过血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的影响。因此,本研究借助 P-gp 抑制剂维拉帕米^[11]和常用抗癫痫药卡马西平,对上述内容展开研究,为临床癫痫病的治疗提供参考。

1 材料

1.1 药物

黄连(福建同春医药有限公司中药分公司),经福建省中医药大学阮君山副教授鉴定为毛茛科植物黄连(*Coptis chinensis* Franch.)的干燥根茎;卡马西平对照品(中国药品生物制品检定所,纯度:98%,批号:0142-9503);卡马西平片(诺华制药,每片 200 mg,批号:X0295);盐酸维拉帕米缓释片(江苏恒瑞制药有限公司,每片 0.12 g,批号:100801);戊四唑(阿拉丁试剂公司,纯度:98%,批号:P103065);士的宁(中国药品生物制品检定所,纯度:98%,批号:100240-200702);乙腈、甲醇(国药集团化学试剂有限公司,色谱纯);0.9% NaCl 注射液(福州海王福药制药有限公司);实验用水均为重蒸水。

1.2 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司);TG16-WS 台式高速离心机(湘仪仪器厂);XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);AE-240 电子分析天平(美国梅特勒公司)。

1.3 动物

KM 小鼠,清洁级,♂, (18±2)g,购自福建省医学科学研究院吴氏实验动物中心,生产许可证号:SYXK(闽)2011-0002。

2 方法

2.1 药液制备

戊四唑、士的宁使用前用生理盐水分别配置成为 8, 0.1 mg·mL⁻¹ 的溶液,4℃ 冷藏;称取黄连 2 g 于 50 mL 烧杯中,加 10 倍量水浸泡 0.5 h,煎煮 0.5 h,四层纱布过滤,滤渣再用 10 倍量水煎煮 0.5 h,四层纱布过滤,合并 2 次滤液,水浴浓缩得生药浓度为 0.2 g·mL⁻¹ 的黄连水煎剂。卡马西平和维拉帕米用生理盐水分别配置成为 8,

4 mg·mL⁻¹ 的混悬液,用前配置并摇匀使用。

2.2 戊四唑造模及处理

小鼠 50 只随机分为模型组、高、中、低剂量联用组(黄连高、中、低剂量联用卡马西平)和卡马西平组,每组 10 只。黄连的高、中、低剂量参考黄连毒性研究中小鼠的半数致死量(LD₅₀)^[12],分别为 LD₅₀ 的 1/10、1/20 和 1/40。具体按表 1 剂量灌胃给药,模型组给予等体积生理盐水,给药后 30 min,腹腔注射戊四唑 95 mg·kg⁻¹,观察小鼠的发作情况。

2.3 士的宁造模及处理

取健康小鼠 50 只,随机分为模型组、高、中、低剂量联用组(黄连高、中、低剂量联用卡马西平)和卡马西平组,每组 10 只。按表 2 剂量灌胃给药,模型组给予等体积生理盐水,灌胃后 30 min 腹腔注射士的宁 1.25 mg·kg⁻¹,观察小鼠的发作状态。

2.4 痫性发作分级及观察

采用 Racine 标准^[13],即 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。连续观察 30 min,记录各组小鼠给药后的行为学变化。

2.5 黄连对卡马西平透过 BBB 的影响

2.5.1 分组与给药 小鼠 30 只随机分为阴性对照组、黄连组和阳性对照组,每组 10 只。黄连组按黄连 0.07 mg·g⁻¹·d⁻¹ 和卡马西平 0.1 mg·g⁻¹·d⁻¹ 的剂量灌胃;阳性对照组按同剂量卡马西平及维拉帕米 42 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃;阴性对照组用同剂量的卡马西平和生理盐水灌胃。实验期间各组小鼠置于安静环境分笼饲养,自由摄食饮水,每天根据小鼠体质量调整剂量,于 9:00 给药,连续灌胃 5 d。第 6 天 8:55,将小鼠颈椎脱臼处死,在冰块上取出脑组织。

2.5.2 色谱条件 色谱柱为 Inertsil ODS-SP (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(40:60);流速为 1.0 mL·min⁻¹;柱温为 30℃;检测波长为 235 nm。

2.5.3 样品处理 取小鼠脑组织,用生理盐水冲洗脑组织表面的血。将脑组织样品保存于-20℃ 冰箱中;室温融化,称重,置于研钵中,加入 1 g:1.5 mL 生理盐水,研磨为匀浆液,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上清液 100 μL,加入乙腈 200 μL,

涡旋震荡 5 min, 16 000 r·min⁻¹ 高速离心 15 min, 取上清液 20 μL 进样。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件处理实验所得数据, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 潜伏期的比较采用方差分析, 惊厥率和死亡率的比较用 χ^2 检验, 脑浓度的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄连对戊四唑小鼠的影响

卡马西平单用或联用黄连低、中、高剂量各组小鼠的惊厥潜伏期均显著增长, 惊厥率和死亡率显著降低。但联用与单用卡马西平相比, 可以更为明显地延长惊厥潜伏期, 且黄连高剂量可明显减少惊厥率, 差异具有统计学意义。结果见表 1。

表 1 药物抗戊四唑致惊厥疗效($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The therapeutic effect of drugs against convulsion induced by pentylenetetrazole($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	黄连/ mg·g ⁻¹ ·d ⁻¹	卡马西平/ mg·g ⁻¹ ·d ⁻¹	潜伏期/ s	惊厥率/ %	死亡率/ %
模型组	—	—	46.8±9.08	100	100
卡马西平组	—	0.1	113.4±8.93 ³⁾	60 ¹⁾	20 ³⁾
低剂量联用组	0.07	0.1	162.9±17.16 ³⁾⁶⁾	40 ²⁾	10 ³⁾
中剂量联用组	0.15	0.1	165.2±16.22 ³⁾⁶⁾	30 ²⁾	10 ³⁾
高剂量联用组	0.30	0.1	179.5±0.00 ³⁾⁵⁾	10 ³⁾⁴⁾	0 ³⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; 与卡马西平组比较, ⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; compared with the carbamazepine group, ⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.001$ 。

3.2 黄连对士的宁小鼠的影响

与模型组比较, 卡马西平单用或联用低、中、高剂量的黄连均可显著对抗士的宁诱发的小鼠发作, 单用卡马西平可使潜伏期明显延长, 但惊厥率无统计学差异, 卡马西平联用黄连的作用优于单用卡马西平, 能显著延长潜伏期和减少小鼠惊厥的发作率, 差异具有统计学意义。卡马西平单用或联用低、中、高剂量的黄连都可以明显降低死亡率, 但单用或联用间无显著性差异。结果见表 2。

3.3 黄连对卡马西平透过 BBB 的影响

黄连组和阳性对照组的卡马西平脑浓度均明显大于阴性对照组, 但黄连组的浓度低于阳性对照组, 提示黄连可显著提高卡马西平的 BBB 透过率, 但作用较维拉帕米弱。结果见图 1。

表 2 药物抗士的宁致惊厥疗效($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The therapeutic effect of drugs against convulsion induced by strychnine($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	黄连/ mg·g ⁻¹ ·d ⁻¹	卡马西平/ mg·g ⁻¹ ·d ⁻¹	潜伏期/ s	惊厥率/ %	死亡率/ %
模型组	—	—	142.3±25.72	100	100
卡马西平组	—	0.1	481.1±31.43 ³⁾	70	30 ²⁾
低剂量联用组	0.07	0.1	598.5±40.45 ³⁾⁵⁾	30 ²⁾	20 ³⁾
中剂量联用组	0.15	0.1	646.3±89.43 ³⁾⁵⁾	20 ³⁾⁴⁾	10 ³⁾
高剂量联用组	0.30	0.1	683.8±94.56 ³⁾⁶⁾	20 ³⁾⁴⁾	10 ³⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; 与卡马西平组比较, ⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; compared with the carbamazepine group, ⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.001$ 。

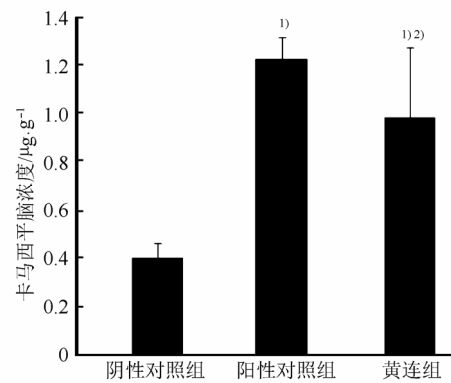


图 1 黄连对卡马西平脑浓度的影响

与阴性对照组比较, ¹⁾ $P < 0.001$; 与阳性对照组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 The influence of Coptidis Rhizoma on the brain concentration of carbamazepine

Compared with the negative control group, ¹⁾ $P < 0.001$; compared with the positive control group, ²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

抗癫痫药物的设计和开发必须利用动物癫痫模型, 实验性癫痫动物模型与人类癫痫发作存在有相似性, 其机制也接近人类发作时的病理生理状态。一般认为, 戊四唑主要作用于脑干和大脑, 是癫痫小发作常用模型; 士的宁模型常被认为是顽固性癫痫的良好模型^[14]。本研究选用这 2 种模型, 从不同侧面对黄连的抗癫痫能力进行研究, 发现黄连可显著增强卡马西平对抗戊四唑、士的宁的作用, 明显改善潜伏期和惊厥率, 说明黄连确实对癫痫有一定的防治作用, 能显著增强抗癫痫药的效果。

临床上常见许多癫痫患者血药浓度稳定, 达到有效治疗浓度范围, 但癫痫控制不良。研究表明, 这与抗癫痫药物通过 BBB 的量减少导致中枢

神经系统内药物浓度低于有效浓度有关^[15]，所以提高卡马西平等抗癫痫药在中枢神经系统内的含量将有助于增强其抗癫痫疗效。P-gp 是一种能限制抗癫痫药物透过 BBB 的多药耐药转运体，大量研究发现在难治性癫痫患者和动物模型脑组织中 P-gp 表达水平较正常脑组织明显增高^[4,16]，因此通过抑制 P-gp 可以增加脑组织对药物的吸收，这种增强药物渗透入脑的策略也许可以为逆转难治性癫痫的耐药性提供一个新的治疗方向。本实验将黄连和卡马西平联合给药，发现黄连可显著提高卡马西平的脑浓度，尽管结果显示黄连的作用较维拉帕米弱，但这可能与两因素相关：①黄连剂量，由于戊四唑和土的宁的药理实验中，黄连低、中、高剂量间的潜伏期、惊厥率和死亡率无显著性差异，无明显量效关系，所以脑浓度影响实验中采用低剂量黄连；②实验动物脑组织中的 P-gp 水平，本实验是将正常小鼠分组灌胃后初步研究黄连对 P-gp 介导的抗癫痫药脑转运的影响，而癫痫小鼠脑组织中 P-gp 水平较正常小鼠有大幅提高，黄连抵抗脑组织 P-gp 外排癫痫药物的作用可得到进一步体现。目前本研究小组正在研究更高剂量的黄连对癫痫动物 P-gp 的抑制和抗癫痫药脑浓度的增加作用并将做后续报道，黄连可能等效于甚至超过维拉帕米的作用。

在卡马西平脑浓度的测定实验中，根据临床治疗药物监测的原理，连续多次给药达稳态后，最后 1 次用药前即刻取样测定谷浓度，结果较为稳定且个体差异小，可信度高，所以本研究采用稳态谷浓度为切入点^[17]。据文献报道，卡马西平在小鼠脑组织的半衰期为 2.48 h^[18]，因此本试验给药 5 d，卡马西平可达稳态，所得谷浓度能较为准确地反映其体内状态。

综上所述，在卡马西平治疗基础上添加黄连，抗癫痫作用优于单用卡马西平，这意味着在临床上可以考虑通过卡马西平联用黄连的方式，使癫痫患者得到更有效的治疗，而且在保证疗效的同时可以减少全身用药量，减少药物不良反应的产生。但在推广临床应用前，仍有问题尚待探讨，如其机制可能涉及黄连与 P-gp 竞争性结合或降低脑内 P-gp 的含量，其安全用药范围需依据黄连抗癫痫的效价强度及毒性等药理学指标等等，本研究小组将对此展开进一步研究。

REFERENCES

- [1] PANG C Y, WANG X T, SUN X L. A new method of epileptic EEG identification based on improved EMD [J]. *Chin J Bio Eng*(中国生物医学工程学报), 2013, 32(6): 663-669.
- [2] ZHANG Y F, DI Q, YU N, et al. Occurrence and predictors of drug resistance in a cohort with newly diagnosed epilepsy [J]. *J Apoplexy Nerv Dis*(中风与神经疾病杂志), 2011, 28(5): 441-444.
- [3] POTSCHKA H, LUNA M H. CNS transporters and drug delivery in epilepsy [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(10): 1534-1542.
- [4] MA A, WANG C, CHEN Y, et al. P-glycoprotein alters blood-brain barrier penetration of antiepileptic drugs in rats with medically intractable epilepsy [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2013(7): 1447-1454.
- [5] YUAN Y M, WANG R H, YANG Y X. Analysis of 892 adverse drug reaction reports of antiepileptic drugs [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(11): 1264-1268.
- [6] 陈静, 郭虎, 吴春风, 等. 抗癫痫药物诱导儿童过敏反应病例分析 [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2013, 33(2): 159-160.
- [7] ZHANG X X, ZHAO J, PAN X H, et al. The reverse strategy of mdr1-induced multidrug resistance [J]. *Chin Healthcare Front*(中国医疗前沿), 2009, 4(18): 12-13.
- [8] JIN Z H, JIN J, MAO P J, et al. Pharmacological study of Huanglian Jiangtang tablets on diabetes [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(8): 823-827.
- [9] 李峥, 庄笑梅, 李素云, 等. P-糖蛋白中药抑制剂的研究进展[J]. *解放军药理学学报*, 2009, 25(4): 326-328.
- [10] 马丙祥, 张涛. 黄连温胆汤在小儿神经系统疾病中的临床应用[J]. *中医儿科杂志*, 2008, 4(3): 27-29.
- [11] IWANAGA K, YONEDA S, HAMAHATA Y, et al. Inhibitory effects of furanocoumarin derivatives in kampo extract medicines on P-glycoprotein at the blood-brain barrier [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(8): 1246-1251.
- [12] 中国药理学会药物代谢专业委员会. 第 9 届全国药物和化学异物代谢学术会议论文集, 武汉, October 23-26, 2009 [C]. 北京: 中国知网, c2009.
- [13] RACINE R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294.
- [14] 张文凤, 杨焱. 大黄酒提液防治小鼠癫痫的实验研究[J]. *长春中医药大学学报*, 2012, 28(5): 780-781.
- [15] BOLWING T G. Brain-Blood Barrier studied with special reference to epileptic seizures [J]. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 1983(345): 15-20.
- [16] AVEMARY J, SALVAMOSER J D, PERAUD A, et al. Dynamic regulation of P-glycoprotein in human brain capillaries [J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(9): 3333-3341.
- [17] ZHOU H Y, CHEN X Y. Clinical Pharmacology and Pharmacotherapeutics(临床药理学与药物治疗学) [M]. Vol 3. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2010: 43.
- [18] ANA F, GILBERTO A, PATRICIO S, et al. Pharmacokinetics, brain distribution and plasma protein binding of carbamazepine and nine derivatives: New set of data for predictive in silico ADME models [J]. *Epilepsy Res*, 2013, 107(1/2): 37-50.

收稿日期: 2014-07-13