

· 药物代谢 ·

山羊角抗惊厥活性评价及其对小鼠脑内神经递质的影响

朱昭颖, 武文星, 赵晶晶, 刘睿, 郭盛*, 段金廛*

(南京中医药大学中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 国家中医药管理局中药资源循环利用研究重点实验室, 南京 210023)

[摘要] 目的:考察山羊角抗惊厥活性及其对模型小鼠脑内主要神经递质含量变化的影响。方法:选择小鼠120只随机分为6组,分别为空白组、模型组、艾司唑仑组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、羚羊角组($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、山羊角低剂量组($1.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、山羊角高剂量组($2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。灌胃给药1次,灌胃体积均为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,空白组及模型组给予同体积0.2%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)。小鼠给药后2h给予阈值电刺激1次,以后肢出现强直性惊厥为观察指标,计算强直性惊厥恢复期、惊厥发生率及死亡率;采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)分析小鼠脑组织主要神经递质含量变化。结果:灌胃给予小鼠山羊角粉2h后可以缩短惊厥恢复期,与模型组比较可以显著降低惊厥发生率和死亡率($P<0.05$),抗惊厥效果由强到弱依次为山羊角高剂量组>羚羊角组>山羊角低剂量组;UPLC-MS/MS分析显示,与模型组比较,山羊角粉低剂量组可明显降低脑组织中谷氨酸含量($P<0.05$),山羊角粉高、低剂量组可明显降低脑组织中天冬氨酸含量($P<0.05$);山羊角低剂量组和羚羊角粉组明显提高甘氨酸含量($P<0.05$);山羊角粉高、低剂量组和羚羊角粉可明显提高 γ -氨基丁酸、5-羟色胺含量($P<0.05$)。结论:研究结果表明,山羊角对电惊厥小鼠模型具有抗惊厥作用,其作用机制可能为通过调节脑组织神经递质的含量变化改善其惊厥的发生发展。

[关键词] 山羊角;电惊厥模型;神经递质;超高效液相色谱-串联质谱法

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)03-0133-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221613

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221009.0948.001.html>

[网络出版日期] 2022-10-09 15:23:15

Anti-convulsant Activity of Goat Horn and Its Effect on Neurotransmitters in Mouse Brain

ZHU Zhaoying, WU Wenxing, ZHAO Jingjing, LIU Rui, GUO Sheng*, DUAN Jin'ao*

(National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and National Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory for Chinese Medicine Resources Recycling Utilization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-convulsant activity of goat horn and its effect on the main neurotransmitters in the brain of model mice. **Method:** A total of 120 mice were randomly divided into a blank group, a model group, a positive drug group (estazolam, $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), a Saigae Tataricae Cornu (STC, $0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and low- ($1.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high-dose ($2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) goat horn groups. Drugs were administered by gavage once at $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$. Those in the blank group and the model group were given the same volume of 0.2% sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na). The mice underwent threshold electrical stimulation once 2 h after administration. Ankylosing convulsion in the hind limbs of mice was used as the index to calculate the

[收稿日期] 2022-08-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873189, 81973450);江苏省高校自然科学研究重大项目(18KJA360006)

[第一作者] 朱昭颖,在读硕士,从事中药资源与功效物质基础研究,E-mail:1694929414@qq.com

[通信作者] *郭盛,博士,副研究员,硕士生导师,从事中药资源化学研究,E-mail:guosheng@njucm.edu.cn;

*段金廛,教授,博士生导师,从事中药资源化学与方剂功效物质基础研究,E-mail:dja@njucm.edu.cn

recovery period, convulsion rate, and mortality of ankylosing convulsion. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established to analyze the changes in the content of the main neurotransmitters in the brain tissues of mice. **Result:** Two hours after intragastric administration of goat horn powder to mice, the recovery period of convulsion could be shortened and the convulsion rate and mortality were reduced ($P<0.05$). In terms of anti-convulsant effect, the groups were ranked as follows: high-dose goat horn group > STC group > low-dose goat horn group. UPLC-MS/MS analysis showed that compared with the results in the model group, goat horn powder and STC decreased the content of glutamic acid and aspartic acid ($P<0.05$) and increased the content of glycine, γ -aminobutyric acid, and 5-hydroxytryptamine ($P<0.05$). **Conclusion:** The results showed that goat horn had a significant anti-convulsant effect on the electroshock-induced convulsion mouse model, and the underlying mechanism was presumably attributed to the improvement of the development of convulsion by regulating the changes in neurotransmitter content in brain tissues.

[Keywords] goat horn; electroshock-induced convulsion model; neurotransmitter; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

惊厥是较为常见的一种小儿多发病,全球约5%~6%的小儿曾有过1次或多次惊厥的发生^[1]。近年研究发现,惊厥发生的病理生理基础是神经元异常放电,与神经系统中兴奋性和抑制性神经递质之间的平衡失调密切相关^[2]。目前临床常用的抗惊厥药物主要有苯二氮革类和戊巴比妥类^[3],其作用机制为通过调节大脑抑制性神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)的释放,阻断谷氨酸(Glu)受体介导的兴奋性信号或控制离子通道达到调节大脑神经递质平衡的目的^[4]。但上述药物大多存在嗜睡、恶心、共济失调等不良反应,因此迫切需要寻找不良反应小的抗惊厥药物。

山羊角为牛科动物山羊的角,作为地方习用药材主要用于治疗小儿惊厥、高热神昏等疾病^[5]。也有研究提示,山羊角可作为珍稀濒危药材羚羊角的类效资源,用于肝风内动、惊痫抽搐等病证的治疗,且具有安全无毒、资源丰富的优势^[6]。现代药理研究表明,山羊角对戊四氮、硝酸士的宁致动物惊厥模型具有显著改善作用^[7-8],但其生物学机制尚不清晰,也未见与羚羊角抗惊厥作用的系统比较研究。

电惊厥动物模型作为全身强直阵挛发作的实验模型,因其实验操作简单省时,被视为是进行抗惊厥药物筛选时较为理想的动物模型^[9],其发病机制主要为GABA能神经功能降低和兴奋性神经递质敏感性增强导致的神经递质紊乱^[10]。脑组织中基质复杂,内源性成分对神经递质的测定易造成较大干扰,且大多数神经递质在体内存在浓度较低,因此神经递质含量的测定需要极低的检测限^[11]。近年来,超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/

MS)因其高灵敏度、低检测限、强专属性等优点,特别适用于微量复杂混合物的分离和高通量研究,已被广泛应用于复杂基质中痕量组分的分析^[12]。鉴此,本研究通过建立小鼠电惊厥模型研究山羊角抗惊厥效应,并采用UPLC-MS/MS技术对其脑组织中主要神经递质含量进行分析,以明确山羊角的抗电惊厥活性,并阐明山羊角对电惊厥模型动物脑内神经递质含量的影响,为山羊角抗惊厥生物机制的阐明提供基础,也为其临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 ACQUITY UPLC系统、Xevo TQ检测器、MassLynx™质谱工作站软件(包括四元泵溶剂系统,在线脱气机和自动进样器;美国Waters公司),VX-II型多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司),D3024R型高速冷冻离心机(大龙医疗设备有限公司),VAP抗酸型离心浓缩仪(美国LABCONCO公司),Tissuelyser-48型全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司),BT125D型1/10万电子分析天平(德国赛多利斯公司),JTC-1型惊厥及痛觉实验交流刺激器(成都仪器厂),Milli-Q纯水系统(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂 山羊角药材购自内蒙古阿拉善盟,羚羊角药材购自南京同仁堂药业有限责任公司,经南京中医药大学段金廛教授鉴定分别为牛科动物山羊*Capra hirus*、赛加羚羊*Saiga tatarica*的角;艾司唑仑片(江苏常州四药制药有限公司,批号20201020);5-羟色胺(5-HT,上海源叶生物科技有限公司,批号Z06J12H132483);L-谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)(上海麦克林生化科

技有限公司,批号分别为C13642310、C11512944、C11656840);L-谷氨酰胺(Gln)、多巴胺(DA)、GABA、甘氨酸(Gly)、甲酸铵、乙酸铵(西格玛奥德里奇上海贸易有限公司,批号分别为BCBC6452V、1420305、BCBM9830V、C10730361、BCBX5107、BCBV8695);2-氯苯丙氨酸(IS,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号D2029087);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司,批号20191203);乙腈(色谱级,德国Merck公司);甲酸(美国ACS公司,批号C11901830);生理盐水(抚州市医宝城医疗器械有限公司,批号20210103);超纯水为实验室自制。

1.3 动物 SPF级ICR小鼠,雌雄各半,体质量18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号SCXK(沪)2017-0005。动物常规饲养于南京中医药大学实验动物中心,温度保持在20~25℃,相对湿度为45%±10%,光照周期为12 h,适应性饲养3 d。动物实验方案经南京中医药大学动物实验伦理委员会审查批准(伦理编号202112A066)。

2 方法

2.1 动物模型复制及给药 取ICR小鼠160只,首先测定每只小鼠电惊厥阈值,将惊厥及痛觉实验交流刺激器输出线前端的两鳄鱼夹用生理盐水浸湿,分别夹在小鼠的两耳间皮肤和下唇,接通电源,电惊厥电压从25 V开始,频率为0.3 s/次、周期为2 s,当上述条件下小鼠未出现惊厥,以2 V的电压差增加电惊厥电压直至小鼠出现惊厥(2次电刺激间隔需大于5 s),以后肢出现强直性阵挛为指标,此刻电压为该小鼠的电惊厥阈值;若电压增加至50 V小鼠仍未出现惊厥则舍弃该小鼠^[10,13]。空白组小鼠只用电极夹住两耳间皮肤和下唇悬空10 s,不造模。

将符合上述条件的小鼠按随机数字表分组法进行随机分组,分为6组:空白组、模型组、艾司唑仑组、羚羊角组、山羊角低剂量组、山羊角高剂量组,每组20只,雌雄各半。山羊角、羚羊角磅片后经超微粉碎,筛取过200目筛的极细粉,灌胃时用0.2% CMC-Na溶液配成一定浓度的混悬液;艾司唑仑片用时研细,加0.2% CMC-Na溶液配成一定浓度混悬液。具体给药剂量为艾司唑仑组,艾司唑仑片1 mg·kg⁻¹(临床等效剂量);羚羊角组,0.2 g·kg⁻¹(临床等效剂量);山羊角低剂量组,1.25 g·kg⁻¹(临床等效剂量);山羊角高剂量组,2.5 g·kg⁻¹(临床等效剂量2倍);空白组、模型组给予等体积的0.2% CMC-Na溶液。

按上述剂量以10 mL·kg⁻¹灌胃给药,给药2 h后在对应小鼠原阈值下观察是否产生惊厥反应,如果发生惊厥及时记录小鼠从惊厥到恢复正常开始行走的时间记为强直性惊厥恢复期及是否死亡,以此评价药物的抗电惊厥作用。

2.2 UPLC-MS/MS 色谱分析条件 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相A(含5 mmol·L⁻¹甲酸铵、5 mmol·L⁻¹乙酸铵和0.2%的甲酸水溶液),B(含1 mmol·L⁻¹甲酸铵、1 mmol·L⁻¹乙酸铵和0.2%甲酸的乙腈溶液);梯度洗脱(0~3 min, 10%A;3~9 min, 10%~18%A;9~15 min, 18%~20%A;15~16 min, 20%~46%A;16~18 min, 46%A;18~20 min, 46%~10%A);流速0.40 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样量2 μL^[14]。

2.3 UPLC-MS/MS 质谱分析条件 离子化模式电喷雾正离子模式(ESI⁺);检测方式多反应监测(MRM);毛细管电压3.0 kV;离子源温度150℃;脱溶剂气温度550℃;脱溶剂气流速1 000 L·h⁻¹;碰撞气流量0.15 mL·min⁻¹;锥孔气流量50 L·h⁻¹。8种被测物质及1种内标物质质谱检测参数见表1。

表1 8种神经递质和1种内标物质主要质谱参数

Table 1 Mass spectrometry information of 8 neurotransmitters and internal standard

化合物	t _R /min	母离子 m/z	子离子 m/z	去簇电压/V	碰撞电压/V
5-HT	2.57	177.06	160.04	16	12
DA	3.21	154.02	90.96	14	20
GABA	4.92	103.96	68.62	14	10
Gly	9.73	75.91	29.90	14	12
Glu	10.49	148.03	101.91	14	8
Gln	10.79	147.05	83.99	14	14
Asn	11.25	132.89	43.38	12	16
Asp	12.05	132.01	73.87	14	12
IS	3.82	200.10	154.10	10	16

2.4 对照品溶液制备 分别精密称取8种对照品适量,加20%甲醇溶解制成GABA、Asp、Gln、Glu质量浓度6 g·L⁻¹,其余各对照品质量浓度为2.5 g·L⁻¹的混合对照品储备液。精密量取上述对照品储备液适量,用20%甲醇溶液稀释Gly、Asn、DA、5-HT成质量浓度为250、125、62.5、31.25、15.625、7.812 5、3.906 2、1.953 1、0.976 6、0.488 3、0.244 1、0.122 1、0.061 0、0.030 5、0.015 3、0.007 6 mg·L⁻¹;GABA、

Asp、Gln、Glu质量浓度为600、300、150、75、37.5、18.75、9.375、4.687 5、2.343 8、1.171 9、0.585 9、0.293 0、0.146 5、0.073 2、0.036 6、0.018 3 mg·L⁻¹的系列混合对照品溶液,4℃冷藏备用。

精密称定内标IS 4 mg,溶于20%甲醇溶液制成40 mg·L⁻¹的内标储备液,后稀释至4 mg·L⁻¹冷藏备用。

2.5 脑组织样品的采集及样品溶液制备 各组动物行为学观察结束后,对存活的小鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉剂,剂量为45 mg·kg⁻¹,颈椎脱臼处死后置于冰上取全脑,惊厥致死的小鼠直接置于冰上取全脑。用生理盐水冲洗净脑组织表面血迹后用滤纸吸去水分,液氮猝灭后均置于-80℃冰箱冷冻备用。每组随机取12只小鼠称取其脑组织0.2 g于1.5 mL离心管,按照质量-体积1:2加入相应体积20%甲醇溶液,匀浆90 s,在温度4℃、11 188 ×g条件下离心10 min,精密吸取上清液200 μL,加入内标工作液(4 mg·L⁻¹)50 μL和预冷的0.1%甲酸水-乙腈(2:3)溶液750 μL,涡旋2 min,在温度4℃、11 188 ×g条件下离心10 min,取上清用0.22 μm微孔滤膜滤过后进样分析^[15]。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性考察 按照2020年版《中华人民共和国药典》第四部生物样品定量分析方法验证原则(9012)^[16],对内源性神经递质按照2.5项下所述方法制备空白小鼠脑组织样本(不加内标)及空白小鼠脑匀浆基质外加一定浓度混标和内标溶液样本的色谱图进行对比,以各离子监测通道内化合物的保留时间是否一致为依据,对其专属性进行确定。

2.6.2 标准曲线与线性范围 精密吸取2.4项下系列浓度的对照品溶液200 μL,离心浓缩至干,加入空白小鼠脑匀浆上清液200 μL复溶,再加入内标溶液50 μL和0.1%甲酸水-乙腈(2:3)溶液750 μL使得外加递质溶液浓度稀释5倍,按2.5项下方法处理并配制系列浓度的脑组织溶液,并按2.2项下和2.3项下的条件进行UPLC-MS/MS分析。将6份空白样品中待测物的峰面积与对应内标峰面积的比值平均值设为 Y_0 ,将待测物的峰面积与对应内标峰面积的比值设为 Y_n ($n=1, 2, 3, \dots$),以脑匀浆基质中加入的待测物对照品浓度(mg·L⁻¹)为横坐标(X), Y_n 减去 Y_0 的值为纵坐标(Y),进行线性回归运算,绘制标准曲线。

2.6.3 精密度与准确度 精密吸取空白小鼠脑匀浆上清200 μL,加入低、中、高3个质量浓度的对照

品溶液,得到含5-HT、DA、GABA、Gly、Glu、Gln、Asp、Asn低、中、高3个质量浓度的质控样品(QC)。按2.5项下方法处理脑组织样品,并按2.2项和2.3项下的条件进行UPLC-MS/MS分析。以精密度表示同1份样本多次分析测定结果间的接近程度,定义为测量值的相对标准差,采用准确度表示实测结果的平均值与真实浓度值之间的差异,表示为(测得值/真实值)×100%。于同日内连续进样6次,计算日内精密度和准确度;连续测定3 d,计算日间精密度和准确度。

2.6.4 提取回收率与基质效应 取2.6.3项下低、中、高3个质量浓度的QC样品,每个质量浓度平行制备6份,按2.5项下方法处理脑组织样品,并按2.2项和2.3项下的条件进行UPLC-MS/MS分析,扣除内源性递质响应,得外加递质的峰面积与内标峰面积比值 A ;按2.5项下方法处理空白小鼠脑组织样品,得含内标的空白基质,分别加入低、中、高3个浓度混合对照品,进样分析,扣除内源性递质响应,得外加递质的峰面积与内标峰面积比值 B ;除将空白小鼠脑匀浆基质换成20%甲醇溶液,其他按2.5项下方法处理,配制低、中、高3个浓度不含基质的对照品溶液,进样得待测成分峰面积与内标峰面积比值 C 。提取回收率= A/B ×100%;基质效应= A/C ×100%^[17]。

2.6.5 稳定性 精密吸取空白小鼠脑匀浆基质200 μL,配制成低、中、高3个质量浓度的QC样品,每个质量浓度平行配制6份,分别考察室温下放置2 h再处理、反复冻融循环3次、QC样品-80℃下放置21 d的稳定性。

2.7 统计学方法 采用SPSS 22.0进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较惊厥发生率及死亡率采用秩和检验,组间比较神经递质含量采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各给药组行为学观察结果分析 各组强直性惊厥恢复期、惊厥发生率及死亡率具体结果见表2。由表2可见,模型组小鼠的惊厥发生率为95.65%,死亡率为26.09%,与空白组比较惊厥发生率与死亡率均显著升高,表明小鼠电惊厥模型造模成功。给药后与模型组比较,艾司唑仑组明显缩短强直性惊厥恢复期($P < 0.05$),羚羊角组与山羊角低、高剂量组强直性惊厥潜伏期显示缩短趋势,但差异无统计学意义。与模型组相比,艾司唑仑组、羚羊角组和山羊角低剂量组可明显降低小鼠惊厥发生率($P < 0.05$,

$P < 0.01$), 死亡率与模型组相比有降低趋势但差异无统计学意义; 山羊角高剂量可显著降低小鼠惊厥发生率 ($P < 0.01$), 明显降低死亡率 ($P < 0.05$), 这表明山羊角的抗惊厥作用具有一定的剂量依赖性, 高剂量表现出更好的抗惊厥效应。从惊厥发生率与死亡率指标比较, 抗惊厥效果由强到弱为山羊角高剂量组 > 羚羊角组 > 山羊角低剂量组。

表2 不同给药组强直性惊厥恢复期、惊厥发生率及死亡率 ($n=20$)
Table 2 Recovery period, incidence and mortality of convulsion in different treatment groups ($n=20$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	强直性惊厥恢复期/ $\text{s}(\bar{x} \pm s)$	惊厥发生率/%	死亡率/%
空白组			0.00	0.00
模型组		50.81 \pm 12.22	95.65 ¹⁾	26.09 ¹⁾
艾司唑仑组	0.001	34.18 \pm 14.66 ²⁾	43.48 ³⁾	8.70
羚羊角组	0.2	46.31 \pm 20.70	54.17 ³⁾	16.67
山羊角低剂量组	1.25	44.64 \pm 11.67	68.18 ²⁾	22.73
山羊角高剂量组	2.5	42.10 \pm 10.63	18.18 ³⁾	0.00 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$

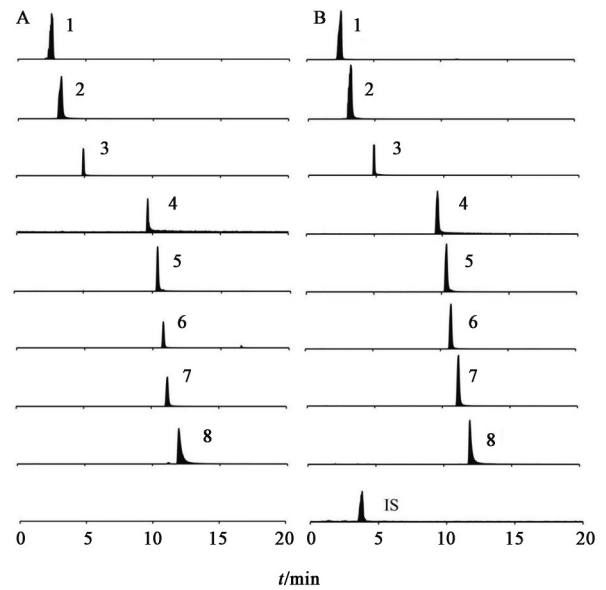
3.2 脑内神经递质分析

3.2.1 方法学考察结果

3.2.1.1 专属性 由于本实验所有待测物均为脑组织中内源性物质, 因此无法获得不含待测物的空白生物样品, 故参照文献[14]采用在小鼠脑匀浆基质外加一定浓度混标和内标溶液样本, 进行色谱图对比以考察方法的专属性。专属性考察结果具体见图1, 结果显示空白小鼠脑组织样本与外加一定浓度混标和内标溶液样本的色谱图中各待测成分保留时间一致, 且外加一定浓度混标和内标溶液样本相应成分色谱峰峰面积增加, 这表明各待测成分未受到脑匀浆基质中杂质及内源性物质的干扰, 且待测成分与内标可以实现完全分离。

3.2.1.2 标准曲线与线性范围 本实验采用背景扣除法, 即在含内源性物质的真实空白基质中添加内源性标准品, 在扣除真实基质的背景响应后, 与内源性标准品的添加浓度建立校准曲线, 以此计算生物样品的浓度。定量下限(LLOQ)是标准曲线上最低浓度点, 信噪比(S/N) > 10。各待测物质的标准曲线、线性范围及定量下限见表3, 结果显示各待测物在小鼠脑匀浆基质中线性均良好。

3.2.1.3 精密性与准确度 实验结果显示脑匀浆液基质中8种待测成分日内、日间准确度在85.07%~114.8%、精密性RSD均低于14.8%, 表明该方法满足生物样品测定的要求, 见表4。



注: A. 空白脑匀浆基质; B. 空白脑匀浆基质+混合对照品+内标溶液; 1. 5-羟色胺; 2. 多巴胺; 3. γ -氨基丁酸; 4. 甘氨酸; 5. L-谷氨酸; 6. L-谷氨酰胺; 7. 天冬酰胺; 8. 天冬氨酸; IS. 2-氯苯丙氨酸

图1 小鼠脑匀浆基质中8种主要成分及内标的MRM

Fig. 1 Multi-reaction monitoring chromatograms of eight active components and internal standard in matrix of mice brain

表3 8种神经递质在脑匀浆基质中的线性关系考察

Table 3 Results of linear relationships of 8 transmitters in matrix of mice brain

成分	线性方程	R^2	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	LLOQ/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
5-HT	$Y=37.697X+0.0529$	0.9999	0.0016~25.0000	0.0016
DA	$Y=10.302X-0.0068$	0.9995	0.0016~24.8000	0.0016
GABA	$Y=0.2175X+0.909$	0.9980	0.0038~119.2000	0.0038
Gly	$Y=0.092X+0.0288$	0.9948	0.0016~25.0000	0.0016
Glu	$Y=1.7315X+3.6434$	0.9996	0.0038~61.2000	0.0038
Gln	$Y=1.8925X+3.7202$	0.9990	0.0038~60.2000	0.0038
Asn	$Y=0.9715X+0.2282$	0.9990	0.0015~24.7000	0.0015
Asp	$Y=0.7395X+0.8333$	0.9996	0.0038~60.6000	0.0038

3.2.1.4 提取回收率与基质效应 实验结果表明, 小鼠脑匀浆基质中5-HT、DA、GABA、Gly、Glu、Gln、Asp和Asn的提取回收率在88.94%~114.41%, 基质效应在87.20%~114.35%, 见表5, 表明小鼠脑匀浆基质中的内源性物质对待测成分的影响较小, 且脑匀浆基质的提取回收率符合生物样品的测定要求。

3.2.1.5 稳定性 实验结果见表6, 小鼠脑匀浆基质中5-HT、DA、GABA、Gly、Glu、Gln、Asp和Asn在室温下放置2h再处理、反复冻融循环3次, QC样品-80℃下放置21d的RSD均<14.5%, 表明脑匀浆

表4 小鼠脑匀浆基质中8种成分的精密度与准确度分析 (n=6)

Table 4 Precision and accuracy of eight components in mice brain matrix (n=6)

成分	理论质量浓度 /mg·L ⁻¹	日内		日间	
		准确度/%	精密度 RSD/%	准确度/%	精密度 RSD/%
5-HT	0.001 6	91.51	6.7	85.35	7.2
	0.195 3	101.64	6.4	103.43	5.0
	25.000 0	90.43	6.4	94.80	4.2
DA	0.001 6	103.41	7.3	98.96	10.3
	0.193 8	102.57	6.3	94.98	6.6
	24.800 0	85.07	3.6	85.12	5.3
GABA	0.003 8	93.50	8.6	86.17	5.5
	0.465 6	97.30	9.9	102.95	8.9
	59.600 0	92.52	13.1	113.66	5.0
Gly	0.001 6	101.42	10.8	92.80	14.8
	0.195 3	106.26	5.7	85.41	10.9
	25.000 0	99.57	1.9	99.53	10.2
Glu	0.003 8	98.83	11.0	90.67	12.9
	0.478 1	98.95	13.3	85.26	10.0
	61.200 0	114.71	8.4	114.80	10.0
Gln	0.003 8	109.93	14.0	98.57	14.5
	0.470 3	99.95	8.4	112.03	8.2
	60.300 0	112.94	10.4	111.42	6.4
Asn	0.001 5	88.27	13.1	103.50	13.6
	0.193 0	113.64	10.5	103.81	7.0
	24.700 0	87.32	6.8	87.92	4.3
Asp	0.003 8	88.86	9.7	84.98	4.7
	0.473 4	101.96	10.3	99.62	12.0
	60.600 0	104.57	11.8	109.53	6.4

样品在上述放置条件下均稳定,可满足分析测试要求。

3.2.2 各给药组小鼠脑内神经递质结果分析 模型组与各给药组小鼠脑内主要内源性神经递质含量测定结果见表7。与空白组比较,模型组小鼠脑组织Glu、Asp、DA含量均升高,其中DA、Asp差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);与空白组比较,模型组小鼠脑组织GABA、Gly、Asn显著降低($P<0.01$)。上述结果表明,电刺激致小鼠惊厥模型其脑组织中神经递质呈现异常释放现象。

与模型组比较,艾司唑仑组及羚羊角、山羊角不同剂量组均可回调由电惊厥所致小鼠脑组织中Glu、GABA、Asp、Gly、DA、Gln、Asn含量异常情况。艾司唑仑组Glu含量显著下调($P<0.01$),5-HT、Gly、

Gln含量明显上调($P<0.05$, $P<0.01$);羚羊角组Glu、Asp含量下调,但差异无统计学意义;5-HT、GABA、Gly、Gln含量显著上调($P<0.01$);山羊角低剂量组Glu、Asp、DA含量显著降低($P<0.01$),5-HT、Gly、GABA含量明显上调($P<0.05$);山羊角高剂量组Asp含量明显下调($P<0.05$),5-HT、GABA含量显著上调($P<0.01$)。根据给药后各神经递质回调的程度,可以发现羚羊角对Gly和Gln神经元通路更为敏感,山羊角对DA、Glu、Asp神经元通路更为敏感,同时羚羊角和山羊角均可通过调节GABA、5-HT神经元通路起到抗惊厥功效。

4 讨论

惊厥是指大脑运动神经元异常放电导致骨骼肌发生的非自主性强直与阵挛性抽搐,使用强电流刺激动物头颅会引起其全身强直性惊厥,可以建立模拟癫痫大发作的模型^[18]。本实验通过观察山羊角对强直性惊厥发生的预防作用,给药后给予原刺激发现惊厥发生率降低,提示山羊角可能通过抑制病灶放电,提高惊厥发作阈值起到抗惊厥作用。通过比较惊厥行为学指标,可发现山羊角抗电惊厥作用具有一定的剂量依赖性,山羊角低剂量抗惊厥作用弱于羚羊角粉,随着山羊角剂量增加,小鼠惊厥发生率和死亡率均下降,抗电惊厥效果强于羚羊角粉。

电惊厥模型的发生机制主要与GABA能神经系统功能降低和N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体敏感性增强相关^[19],其中脑内神经递质Glu、Asp、GABA、Gly的异常释放为惊厥发生发展的重要环节^[20]。本实验给予小鼠电刺激造模后GABA含量显著下降,Asp含量显著升高,表明与电惊厥相关的氨基酸能通路表达异常,兴奋性神经递质过度释放,抑制性神经递质含量减少,脑内神经递质紊乱,小鼠惊厥模型复制成功;给予山羊角后GABA和Asp含量均显著回调,小鼠惊厥状态得到改善,强直性惊厥恢复期缩短,死亡率降低,表明山羊角可通过缓解脑内神经递质紊乱表现出抗惊厥功效。而羚羊角粉组对Asp的回调不显著,表明羚羊角的抗惊厥作用可能不涉及Asp通路。

Glu在脑组织中含量丰富,可从谷氨酸能神经元的突触前末端释放并产生动作电位,Glu含量异常升高可造成兴奋毒性脑损伤^[2],从而导致癫痫的发生和发展。本实验中模型组Glu含量高于空白组,提示模型组中Glu含量积累过多,脑内动作电位积累过多使得小鼠惊厥发作,各给药组Glu含量均

表5 小鼠脑匀浆基质中8种成分的提取回收率与基质效应 (n=6)

Table 5 Extraction recoveries and matrix effects of eight components in mice brain matrix (n=6)

成分	理论质量浓度/mg·L ⁻¹	提取回收率/%		基质效应/%	
		$\bar{x}\pm s$	RSD	$\bar{x}\pm s$	RSD
5-HT	0.001 6	102.64±4.33	4.2	98.31±6.22	6.3
	0.195 3	99.87±0.62	0.6	100.89±1.74	1.7
	25.000 0	97.73±0.81	0.8	104.64±5.08	4.9
DA	0.001 6	97.37±4.22	4.3	101.98±13.11	12.9
	0.193 8	90.09±3.45	3.8	88.05±2.52	2.9
	24.800 0	99.24±1.03	1.0	96.50±1.63	1.7
GABA	0.003 8	89.72±7.06	7.9	87.20±6.92	7.9
	0.465 6	111.64±29.28	14.8	97.60±11.62	11.9
	59.600 0	95.76±2.81	2.9	87.32±2.93	2.2
Gly	0.001 6	107.54±12.56	11.7	107.81±15.75	14.6
	0.195 3	114.41±12.18	10.7	108.46±17.08	15.8
	25.000 0	95.86±4.65	4.9	105.12±3.63	3.5
Glu	0.003 8	99.73±14.63	14.7	111.48±12.65	11.4
	0.478 1	106.85±4.05	3.8	114.35±1.65	1.4
	61.200 0	98.53±1.40	1.4	102.51±4.82	4.7
Gln	0.003 8	101.98±14.22	14.0	90.08±12.48	13.9
	0.470 3	99.54±13.12	13.2	103.50±9.83	9.5
	60.300 0	95.64±1.45	1.5	97.62±1.65	1.7
Asn	0.001 5	104.73±9.03	8.6	113.77±14.40	12.7
	0.193 0	95.78±3.45	3.6	105.18±5.55	5.3
	24.700 0	97.18±1.18	1.2	103.06±2.21	2.2
Asp	0.003 8	111.58±13.99	12.5	96.79±7.02	7.3
	0.473 4	94.38±10.59	11.2	97.51±5.65	5.8
	60.600 0	88.94±2.47	2.8	96.51±2.00	2.1

有不同程度的下降,其中山羊角低剂量组 Glu 含量下降幅度大于羚羊角组及山羊角高剂量组,表明山羊角可能通过降低兴奋性神经递质 Glu 含量使小鼠脑内神经递质达到平衡,进而缓解惊厥的发生程度;羚羊角组给药后 Glu 含量与模型组比较无显著性差异,表明羚羊角降低兴奋性神经递质 Glu 效果较弱。

星形胶质细胞通过其细胞膜上的谷氨酸转运体可将 Glu 从突触间隙中摄取,从而防止过度兴奋。在星形胶质细胞中, Glu 通过谷氨酰胺合成酶转化为 Gln, 然后 Gln 通过谷氨酰胺酶转化回 Glu 并释放,该循环即谷氨酸-谷氨酰胺循环^[21]。谷氨酰胺合成酶在癫痫患者体内会明显降低,从而影响 Gln 的合成,减慢谷氨酸-谷氨酰胺循环,促进癫痫发生^[22],提示在惊厥发生时 Gln 合成会变少。本实验结果显示,与空白组相比模型组 Gln 含量降低,表明造模后

谷氨酸-谷氨酰胺循环可能受到抑制,使得 Glu 无法及时转化为 Gln,兴奋性神经递质 Glu 在脑内不断积累,而 Gln 含量降低,给药后各给药组 Gln 含量均升高,该研究结果与 KANAMORI 等^[23]评价大鼠癫痫模型造模前后 Glu、Gln 含量变化趋势结果相一致。据此推测,羚羊角、山羊角治疗惊厥的机制可能涉及谷氨酸-谷氨酰胺循环代谢通路。与模型组比较,山羊角低剂量组 Glu 含量显著下降,羚羊角组 Gln 含量显著上升,表明在谷氨酸-谷氨酰胺循环中,山羊角对 Glu 通路更加敏感,而羚羊角对 Gln 通路更加敏感。

在星形胶质细胞中, Glu 通过谷氨酸脱羧酶可转化为 GABA^[2], GABA 可降低神经元及兴奋性氨基酸的活性,减小神经细胞的损伤。苯二氮草类及戊巴比妥类药物主要通过增加 GABA 与其受体的结合,进而增加氯通道开放的频率、延长氯通道开

表6 小鼠脑匀浆基质中8种成分的稳定性考察 (n=6)

Table 6 Stability of eight components in mice brain matrix (n=6)

成分	理论质量浓度/mg·L ⁻¹	室温放置2 h/%		反复冻融循环3次/%		-80℃放置21 d/%	
		准确度	RSD	准确度	RSD	准确度	RSD
5-HT	0.001 6	92.51	9.8	98.75	14.1	92.47	14.4
	0.195 3	99.32	6.0	108.53	8.4	95.41	8.5
	25.000 0	92.14	6.5	88.08	4.7	92.28	3.0
DA	0.001 6	97.10	10.2	104.47	11.8	105.12	8.1
	0.193 8	97.06	7.2	102.49	7.1	97.39	8.4
	24.800 0	83.14	4.6	85.13	5.6	85.18	1.6
GABA	0.003 8	86.37	7.6	87.03	5.8	93.99	7.3
	0.465 6	90.07	12.8	102.57	11.7	101.03	13.7
	59.600 0	102.83	10.1	91.13	12.3	114.49	12.2
Gly	0.001 6	113.76	10.8	111.86	3.1	105.42	12.3
	0.195 3	104.49	5.9	101.77	8.1	115.69	9.4
	25.000 0	94.69	5.0	93.59	2.9	105.59	6.5
Glu	0.003 8	113.89	8.4	110.95	4.1	114.03	7.9
	0.478 1	87.82	9.1	89.71	13.2	94.33	13.1
	61.200 0	104.68	10.3	97.36	8.0	114.66	2.4
Gln	0.003 8	110.49	12.0	85.44	8.8	113.25	12.9
	0.470 3	107.02	12.0	111.91	11.7	99.48	7.5
	60.300 0	98.86	12.0	95.18	8.8	114.88	1.2
Asn	0.001 5	98.98	14.5	102.30	10.6	99.61	13.6
	0.193 0	99.44	11.1	90.14	8.3	107.06	6.1
	24.700 0	85.02	7.3	87.68	9.5	86.07	3.6
Asp	0.003 8	87.60	9.9	106.99	7.6	107.46	4.3
	0.473 4	101.60	9.1	94.50	12.2	110.24	7.8
	60.600 0	92.29	5.7	86.27	6.3	114.58	3.7

表7 各组小鼠脑组织神经递质含量 (x̄±s, n=12)

Table 7 Transmitters content determination of mice brain tissues(x̄±s, n=12)

mg·L⁻¹

组别	5-HT	DA	GABA	Gly	Glu	Gln	Asn	Asp
空白组	0.004±0.001	0.008±0.003	47.84±18.35	17.60±5.51	33.01±11.26	35.30±8.22	1.37±0.46	18.42±7.21
模型组	0.004±0.002	0.015±0.007 ¹⁾	24.61±9.88 ²⁾	7.38±2.69 ²⁾	40.30±9.19	26.21±9.47	0.75±0.34 ²⁾	30.85±9.35 ²⁾
艾司唑仑组	0.008±0.003 ⁴⁾	0.012±0.005	29.39±13.95	10.51±2.97 ³⁾	26.75±9.39 ⁴⁾	34.63±7.74 ³⁾	0.90±0.46	26.42±10.63
羚羊角组	0.007±0.002 ⁴⁾	0.015±0.003	50.09±16.03 ⁴⁾	15.47±4.06 ⁴⁾	34.17±9.31	44.40±12.11 ⁴⁾	1.02±0.50	26.92±8.41
山羊角低剂量组	0.006±0.003 ³⁾	0.007±0.005 ⁴⁾	42.74±20.63 ³⁾	11.00±4.13 ³⁾	22.30±6.25 ⁴⁾	29.85±13.31	0.84±0.35	19.97±6.14 ⁴⁾
山羊角高剂量组	0.007±0.004 ⁴⁾	0.012±0.005	63.48±17.39 ⁴⁾	10.79±5.03	30.99±15.07	27.74±14.65	0.93±0.55	22.15±9.74 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01

放时间以达到抗惊厥作用^[24]。本实验中与空白组比较,模型组GABA含量显著下降,而不同剂量山羊角粉给药后均可显著回调惊厥小鼠脑中GABA含量,提示山羊角可通过促进抑制性氨基酸GABA的释放降低神经元过度放电造成的损伤,改善小鼠

的惊厥情况并降低死亡率。羚羊角组可显著提升GABA含量且升高幅度高于山羊角低剂量组,提示山羊角需提高剂量使GABA含量升高幅度变大进而提高抗惊厥活性。

DA属于单胺类神经递质中的儿茶酚胺和苯乙

胺家族^[2]。研究表明,多巴胺D1和D2样受体信号在癫痫发生过程中具有相反的作用,D1受体信号促癫痫,而D2受体信号抗癫痫^[25]。BABAIE等^[26]研究发现多巴胺能系统的过度活动会导致惊厥阈值降低,服用有效的抗多巴胺能药物有助于控制患者的癫痫发作。本实验中,与空白组比较模型组DA含量显著升高,随后对造模成功的小鼠给予不同剂量山羊角粉、羚羊角粉和艾司唑仑,结果表明低剂量山羊角粉可以显著降低惊厥小鼠脑内DA含量,从而减轻小鼠惊厥程度,表明山羊角可能通过抑制DA的释放起到抗惊厥作用;而羚羊角组DA含量高于模型组,提示羚羊角可能对DA能神经元通路不敏感。

5-HT是与学习、焦虑惊厥等相关的单胺类神经递质^[27],脑内5-HT能神经递质水平升高可以抑制惊厥发作,5-HT耗竭会降低惊厥发作的阈值,通常用作抗惊厥药^[28]。服用5-HT 1A受体激动剂可减少源自海马的癫痫发作,抑制成年雄性大鼠的电生理活动。而大脑中缺乏5-HT神经元的小鼠癫痫发作阈值较低,更容易在癫痫发作后死亡^[29]。本实验中,与空白组相比模型组5-HT含量降低但并无显著性差异,但给药后各给药组5-HT含量均显著升高,表明山羊角和羚羊角均可通过提高小鼠脑内5-HT含量达到抗惊厥作用,且羚羊角组升高5-HT的程度高于山羊角低、高剂量组。

Asp是脑内主要的兴奋性神经递质^[30],NMDA是Asp的高能量形式,被用来诱发实验动物的癫痫发作^[31]。多项实验表明Asp含量在造模后异常升高,给予抗惊厥药物后含量下降^[30,32-33]。本实验结果与上述文献一致,表明山羊角和羚羊角可通过降低兴奋性神经递质Asp的释放使小鼠脑内惊厥状况改善。天冬酰胺合成酶通过ATP依赖反应可将Asp转化为Asn,患有天冬酰胺合成酶缺乏症的个体会出现严重的惊厥,其血清或脑脊液中的Asn含量明显减少^[34]。Asn缺乏引起的神经损伤可能是由于大脑中天冬酰胺的消耗或天冬氨酸的积累导致兴奋性增强和神经元损伤^[35]。本实验中,Asn含量在造模后降低,给药后上升,与上述文献造模前后变化趋势一致,但不具有显著性差异。这表明山羊角和羚羊角发挥抗惊厥作用时可能对Asn代谢通路作用不显著。

Gly作为一种抑制性神经递质,其激活Gly受体后产生抑制性突触后电位^[36]。研究表明Gly在动物惊厥模型及癫痫人体样本中含量均较低,给予抗惊

厥药物后含量升高^[33,37]。本实验中造模后Gly含量极显著降低,给药后各给药组含量显著升高,与上述文献变化趋势一致,表明羚羊角及山羊角可通过增加抑制性神经递质Gly的释放使惊厥小鼠脑内兴奋性神经递质过度活跃导致的异常放电情况得到缓解,且羚羊角作用于甘氨酸能神经元通路作用强于山羊角。

综上所述,山羊角与羚羊角预防性给药后,与模型组相比,5-HT与抑制性神经递质Gly、GABA含量均显著升高;山羊角可回调兴奋性神经递质Asp、Glu的释放,而羚羊角可显著升高脑组织中Gln水平。研究结果提示,山羊角和羚羊角均可通过调节脑兴奋性及抑制性氨基酸水平使电惊厥小鼠的惊厥率及死亡率下降,进而起到抗惊厥作用,但其作用趋势及具体作用的神经递质尚有差异,其分子机制尚有待进一步探讨。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 袁晓冉,余方,何小华,等. 惊厥相关动物模型的研究进展[J]. 卒中与神经疾病,2010,17(5):312-315.
- [2] AKYUZ E, POLAT A K, EROGLU E, et al. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review[J]. Life Sci,2021,265:118826.
- [3] 施娟,姜树中,王庆华. 咪达唑仑对幼年小鼠惊厥性脑损伤的作用[J]. 重庆医学,2020,49(8):1218-1223.
- [4] 刘星宇. 常用抗癫痫药物对儿童认知功能的影响[J]. 儿科药学杂志,2017,23(12):55-60.
- [5] 武文星,刘睿,赵晶晶,等. 山羊角药用价值的研究进展[J]. 中草药,2022,53(9):2825-2838.
- [6] 陈会丛,杨海润,钟雨秋,等. 山羊角替代羚羊角后同仁牛黄清心丸的毒理学研究[J]. 中华中医药杂志,2016,31(2):668-673.
- [7] 陈芙蓉,商丹丹,姜溪,等. 山羊角替代羚羊角的实验研究[J]. 药物评价研究,2015,38(1):49-52.
- [8] 上海市药材公司中药研究室. 黄羊角、山羊角、绵羊角与羚羊角的药理比较试验[J]. 中成药研究,1978(3):18-23.
- [9] 朱飞,郎森阳,王群. 啮齿类癫痫动物模型研究进展[J]. 慢性病学杂志,2015,16(6):661-668.
- [10] 陈小飞,李建雄,王永安. 贝那替秦对最大电休克发作模型和戊四氮惊厥发作阈模型小鼠的抗惊厥作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2011,25(3):258-263.
- [11] 卢金莲,胡维民,曹卫群,等. 超高效液相色谱-串联质谱法联合衍生生化测定大鼠脑透析液中多巴胺和5-

- 羟基色胺[J]. 生物化工, 2017, 3(3): 35-39.
- [12] 孟宪双, 白桦, 马强, 等. 超高效液相色谱-高分辨质谱测定大鼠血清中神经递质及其在电离辐射脑损伤动物模型中的应用[J]. 质谱学报, 2021, 42(3): 334-345.
- [13] 王永安, 周文霞, 刘艳芹, 等. 盐酸苯环壬酯对最大电休克发作及戊四氮惊厥模型的抗惊作用[J]. 药学学报, 2005, 40(6): 501-506.
- [14] 王倩, 刘睿, 朱悦, 等. 麋鹿角中核苷类和氨基酸类成分区域差异性分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3494-3503.
- [15] 毕欣宁, 戚婧, 黄运芳, 等. UPLC-MS/MS同时快速检测大鼠组织及血、尿样品中8种神经递质含量[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 4918-4923.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 466.
- [17] 任慧, 郭盛, 张祎盈, 等. UHPLC-MS/MS测定补肺活血胶囊中8种有效成分在大鼠体内血药浓度及药代动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(1): 215-223.
- [18] 王坤芳, 杨育同, 梁志刚, 等. 石菖蒲挥发油抗惊厥作用及对癫痫大鼠海马PKC表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 97-100.
- [19] GUAN L P, ZHAO D H, JIANG Z, et al. Evaluation of anticonvulsant activity of QUAN-0806 in various murine experimental seizure models [J]. Pharmazie, 2009, 64(4): 248-251.
- [20] 张涵彧, 胡静, 韩旭, 等. 不同工艺紫雪散抗惊厥药效特点及机制研究[J]. 药物评价研究, 2022, 45(1): 84-89.
- [21] 陈雪, 马青, 张慧明, 等. 星形胶质细胞调控的谷氨酸代谢与癫痫的关系探讨[J]. 生理科学进展, 2022, 53(2): 127-131.
- [22] FARINA M G, SANDHU M, PARENT M, et al. Small loci of astroglial glutamine synthetase deficiency in the postnatal brain cause epileptic seizures and impaired functional connectivity [J]. Epilepsia, 2021, 62(11): 2858-2870.
- [23] KANAMORI K, ROSS B D. Chronic electrographic seizure reduces glutamine and elevates glutamate in the extracellular fluid of rat brain [J]. Brain Res, 2011, 1371: 180-191.
- [24] SARLO G L, HOLTON K F. Brain concentrations of glutamate and GABA in human epilepsy: A review [J]. Seizure, 2021, 91: 213-227.
- [25] BOZZI Y, BORRELLI E. The role of dopamine signaling in epileptogenesis [J]. Front Cell Neurosci, 2013, 7: 157.
- [26] BABAIE J, SAYYAH M, FARD-ESFAHANI P, et al. Contribution of dopamine neurotransmission in proconvulsant effect of *Toxoplasma gondii* infection in male mice [J]. J Neurosci Res, 2017, 95(10): 1894-1905.
- [27] 鲍余, 陈颖, 曾贵荣, 等. 人参总皂苷对尾吊模拟微重力大鼠学习记忆损伤和焦虑的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(7): 49-56.
- [28] EDWARDS K A, ZUP S L. Serotonin pretreatment abolishes sex-specific NMDA-induced seizure behavior in developing rats [J]. Neuroscience, 2021, 463: 184-196.
- [29] JAHAN K, PILLAI K K, VOHORA D. Serotonergic mechanisms in the 6-Hz psychomotor seizures in mice [J]. Hum Exp Toxicol, 2019, 38(3): 336-346.
- [30] 王玉悦, 刘颖, 王洪发, 等. 天麻茎秆水提物的抗惊厥作用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2020, 48(11): 87-96, 103.
- [31] 王永安, 周文霞, 刘艳芹, 等. 苯环壬酯等抗胆碱药对不同致惊厥剂的对抗作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2003, 17(2): 111-116.
- [32] GAO Y, YAN H, JIN R, et al. Antiepileptic activity of total triterpenes isolated from *Poria cocos* is mediated by suppression of aspartic and glutamic acids in the brain [J]. Pharm Biol, 2016, 54(11): 2528-2535.
- [33] XIANG J, JIANG Y. Antiepileptic potential of matrine via regulation the levels of gamma-aminobutyric acid and glutamic acid in the brain [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(12): 23751-23761.
- [34] LOMELINO C L, ANDRING J T, MCKENNA R, et al. Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease [J]. J Biol Chem, 2017, 292(49): 19952-19958.
- [35] RUZZO E K, CAPO-CHICHI J M, BEN-ZEEV B, et al. Deficiency of asparagine synthetase causes congenital microcephaly and a progressive form of encephalopathy [J]. Neuron, 2013, 80(2): 429-441.
- [36] LÓPEZ-CORCUERA B, GEERLINGS A, ARAGÓN C. Glycine neurotransmitter transporters: An update [J]. Mol Membr Biol, 2001, 18(1): 13-20.
- [37] AHMAD S, AAMIR M, KIRMANI S I, et al. Association of therapeutic dose of valproic acid and plasma glycine levels in epileptic patients [J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2021, 31(9): 1020-1023.

[责任编辑 顾雪竹]