

# 柴贝止痫汤及其吸收成分贝母素甲对大鼠脑内卡马西平含量的影响及其机制

刘冲冲<sup>1</sup>, 孙江燕<sup>2</sup>, 董笑克<sup>1</sup>, 王凯悦<sup>1</sup>, 李中浩<sup>1</sup>, 吴婧<sup>2</sup>, 黎莉莉<sup>1</sup>, 刘金民<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学 东方医院, 北京 100078;

2. 北京中医药大学 第三附属医院, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**观察柴贝止痫汤及贝母素甲(Peimine)对难治性癫痫大鼠脑内卡马西平(CBZ)含量及P-糖蛋白(P-gp)和多药耐药基因1(MDR1)表达的影响,了解贝母素甲在该复方中抗难治性癫痫的贡献度。**方法:**该研究采用侧脑室注射海人酸的方法制备难治性癫痫大鼠模型,造模成功的大鼠随机分为模型组,CBZ组( $0.12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),柴贝止痫汤+CBZ组( $8.39\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}+0.12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),贝母素甲+CBZ组( $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}+0.12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),并设假手术组,治疗60d后,采用蛋白免疫印迹法(Western blot),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),液相色谱-质谱联用(LC-MS)方法检测大鼠脑内皮层中P-gp/MDR1的表达,及脑内CBZ,10,11-环氧化卡马西平(CBZE)含量的变化。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠皮层中P-gp/MDR1表达明显升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ );与模型组比较,CBZ组大鼠皮层中P-gp/MDR1表达升高;柴贝止痫汤+CBZ组和贝母素甲+CBZ组大鼠皮层中P-gp/MDR1表达降低;与CBZ组比较,柴贝止痫汤+CBZ组和贝母素甲+CBZ组大鼠皮层中P-gp/MDR1表达明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),贝母素甲+CBZ组大鼠脑内CBZ和CBZE含量升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),柴贝止痫汤+CBZ组大鼠脑内CBZE含量明显升高( $P<0.05$ );与柴贝止痫汤+CBZ组比较,贝母素甲+CBZ组大鼠脑内CBZ和CBZE含量升高,差异没有统计学意义。**结论:**柴贝止痫汤及贝母素甲可能通过降低难治性癫痫大鼠皮层P-gp/MDR1表达,增加脑内CBZ和CBZE含量。

**[关键词]** 难治性癫痫;柴贝止痫汤;贝母素甲;P-糖蛋白;10,11-环氧化卡马西平

**[中图分类号]** R2-0;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)19-0032-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191939

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190618.1733.011.html>

**[网络出版时间]** 2019-06-19 10:56

## Effect of Chaibei Zhixian Decoction and Its Absorption Component Peimine on Content of Carbamazepine in Rat Brain and Investigation of Its Mechanism

LIU Chong-chong<sup>1</sup>, SUN Jiang-yan<sup>2</sup>, DONG Xiao-ke<sup>1</sup>, WANG Kai-yue<sup>1</sup>,

LI zhong-hao<sup>1</sup>, WU Jing<sup>2</sup>, LI li-li<sup>1</sup>, LIU Jin-min<sup>1\*</sup>

(1. Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

2. Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Chaibei Zhixian decoction and peimine on Carbamazepine (CBZ) concentration, P-glycoprotein (P-gp) and multi drug resistance 1 (MDR1) expression in the brain tissues of rats with refractory epilepsy, and to understand the contribution of Peimine in the compound prescription to treat the refractory epilepsy. **Method:** Epilepsy rat models were established by injecting kainic acid (KA) in the lateral ventricle. The successfully modeled rats were randomly divided into model group, CBZ group ( $0.12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),

**[收稿日期]** 20190321(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81774277)

**[第一作者]** 刘冲冲,在读博士,从事中医药防治癫痫的临床与基础研究,E-mail:liuchongchong2017@126.com

**[通信作者]** \*刘金民,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事中医药防治癫痫及急症的临床与基础研究,E-mail:jmvip@vip.163.com

Chaibei Zhixian decoction + CBZ group ( $8.39 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} + 0.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), peimine + CBZ group ( $0.01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} + 0.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and sham operation group. After 60 days of intervention, the expression levels of P-glycoprotein (P-gp) and MDR1b mRNA in the brain cortex were detected by Western blot and quantitative real-time fluorescence polymerase chain reaction (Real-time PCR), the contents of CBZ and 10, 11-epoxidation of carbamazepine (CBZE) were measured by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Result:** Compared with sham group, the expression of P-gp/MDR1 in the cortex of model group was significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with model group, the P-gp/MDR1 level in CBZ group was increased. The expression of P-gp/MDR1 in the cortex of Chaibei Zhixian decoction + CBZ group and peimine + CBZ group was reduced. Compared with CBZ group, The expression of P-gp/MDR1 was significantly decreased in the cortex of Chaibei Zhixian decoction + CBZ group and peimine + CBZ group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the content of CBZ and CBZE in the brain of peimine + CBZ group was significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the content of CBZE in the brain of the Chaibei Zhixian decoction + CBZ group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the Chaibei Zhixian decoction + CBZ group, the content of CBZ and CBZE in the brain of the peimine + CBZ group was increased in rats, but the difference was not statistically significant. **Conclusion:** Chaibei Zhixian decoction and peimine may increase the content of CBZ and CBZE in the brain tissues in rats with intractable epilepsy by reducing the expression of MDR1/P-gp in the cortex.

[ **Key words** ] intractable epilepsy; Chaibei Zhixian decoction; peimine; P-glycoprotein; 10, 11-epoxidation of carbamazepine

癫痫是神经内科常见的慢性神经系统疾病。全球大约有 7 000 万癫痫患者<sup>[1]</sup>。临床上,药物治疗是治疗癫痫主要手段,但 20% ~ 30% 的患者合理运用 2 种或 2 种以上抗癫痫药物仍不能控制发作而成为难治性癫痫 (IE)<sup>[2]</sup>。目前多药转运体学说是难治性癫痫的主要耐药机制之一<sup>[1]</sup>,而多耐药基因及其编码的 P 糖蛋白 (P-gp) 高表达是其主要原因<sup>[3]</sup>。脑组织中的多药耐药蛋白可以将 AEDs 泵出脑组织外,导致脑内药物浓度降低而产生耐药性。近年来,尽管一些药物(如地尔硫卓、类固醇等)能抑制 P-gp 的表达,但 P-gp 抑制剂可增加各种外源性化合物进入中枢神经系统,并产生蓄积毒性,此外,P-gp 对脑组织细胞凋亡具有一定的保护作用<sup>[4-5]</sup>。因此,应用 P-gp 抑制剂可能会加速脑细胞的凋亡,从而限制了临床应用。目前,学者主要专注于从中药或天然植物药中寻找高效且无害的 P-gp 抑制剂。贝母素甲是柴贝止痫汤中浙贝母的主要活性生物碱,研究表明,贝母素甲可以抑制乳腺癌细胞的增殖,诱导其凋亡,并对乳腺癌细胞具有显著的多药耐药逆转活性<sup>[6]</sup>。贝母素甲可以抑制人白血病细胞 (HL-60) 和 K562 的增殖,逆转 HL-60/ADR 和 K562/A02 的多药耐药活性,可能是通过增加细胞内药物浓度,抑制耐药细胞 P-gp 蛋白表达来实现的<sup>[7-8]</sup>。贝母素甲能降低 P-gp 和多药耐药相关蛋白 (MRP) 的表达,说明贝母素甲很可能具有更广泛的多药耐药逆转活

性<sup>[9]</sup>。课题组前期预实验使用液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 技术对柴贝止痫汤成分血浆动力学浓度进行了检测,结果显示贝母素甲是主要吸收成分之一,贝母素甲可能具有广泛的多药耐药逆转活性,因此笔者推测贝母素甲可能是柴贝止痫汤的药效基础。

中医治疗癫痫历史悠久,在辨证论治的前提下治疗癫痫经验丰富。本团队在《伤寒论》柴胡加龙骨牡蛎汤和《医学心语》定痫丸的基础上,加减化裁了柴贝止痫汤治疗 IE。前期临床发现,柴贝止痫汤单用或柴贝止痫汤联合卡马西平治疗 IE 具有较好的临床效果<sup>[10-11]</sup>。前期基础实验表明,复方联合抗癫痫西药能降低 P-gp 及其多药耐药基因 1 (MDR1) 表达<sup>[12]</sup>。研究发现复方中药具有多成分、多环节、多靶点的作用,药物的复杂成分及药效物质基础不明。实验研究表明,贝母素甲可能具有广泛的多药耐药逆转活性<sup>[11]</sup>,因此笔者推测贝母素甲可能是柴贝止痫汤的药效基础。本实验拟以脑内 P-gp/MDR1 的表达量及脑内卡马西平的含量为效应指标,通过在体实验,对比柴贝止痫汤及其吸收成分贝母素甲对抗癫痫西药的协同效用,进一步挖掘逆转耐药的天然药物。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 Wistar 大鼠 110 只,42 ~ 62 d,体质量 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

实验动物中心 SPF 级动物室。合格证号 SCXK(京)2016-0006。动物实验的开展得到了北京中医药大学东方医院实验动物伦理委员会批准(伦理批号 201803)。

**1.2 药物与试剂** 柴贝止痫汤由柴胡 12 g, 浙贝母 9 g, 法半夏 9 g, 石菖蒲 9 g, 牡蛎 30 g, 地龙 6 g, 天麻 15 g 组成, 所有药材由北京中医药大学东方医院中药房提供, 经北京中医药大学东方医院药剂科主任华国栋鉴定为正品; 卡马西平(CBZ)粉末(上海源叶生物科技有限公司, 批号 H21M7L11256, 纯度  $\geq 98\%$ ); 贝母素甲(成都克洛玛生物科技有限公司, 批号 CHB170317, 纯度  $\geq 98\%$ ); 海人酸(美国 Sigma 公司, 批号 MKCD0368); 兔抗鼠 P-gp 单克隆抗体, 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 多克隆抗体(英国 Abcam 公司, 批号分别为 GR217576-39, GR3192725-1); 小鼠  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体(美国 Proteintech 公司, 批号 66009); HRP 标记的抗鼠 IgG(美国 Easybio 公司, 批号 80921227); 羧甲基纤维素钠, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国 Solarbio 公司, 批号分别为 1113F022, 20180227); 总蛋白提取试剂盒(美国 Invent 公司, 批号 SD-001/SN-002); 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒(美国 Invitrogen 公司, 批号 11752050); PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。应用 Premier 5.0 软件进行引物设计, MDR1b 引物: 上游 5'-ACTCG GGAGCAGAAGTTTGA-3', 下游 5'-AGTTCTCG TGCCACCAAGTA-3', 长度 20 bp; MDR1a 引物: 上游 5'-TTTGACTCGGGAGCAGAAGT-3', 下游 5'-AAACC GGAAACAAGCAGCAT-3', 长度 20 bp; GAPDH: 上游 5'-GTTACCAGGGCTGCCTTCTC-3', 下游 5'-GGGT TTCCCGTTGATGACC-3', 长度 19 bp。

**1.3 仪器** 51600 型小动物脑立体定位仪(美国 Stoelting 公司); STRONG90/120 型高速颅钻(韩国 Saeshin 公司); VORTEX-5 型漩涡振荡器, KD200 型可视氮吹仪, D160 型电动均浆器, MTV-100 型漩涡混合仪, 5427R 型高速冷冻离心机, ELX-800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); HWS-12 型电热恒热水浴锅, DYCZ-40D 型电泳仪, Mini TY0417 型垂直电泳系统(美国 Bio-Rad 公司); TS. B-108 型往复复脱色摇床(江苏其林贝尔仪器制造有限公司); 7900 Fast 型 PCR 仪(美国 Thermo 公司); C<sub>1</sub>Box xx9 型化学发光成像系统(中国基因有限公司); Synapt G2 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)。

## 2 方法

**2.1 造模** 110 只大鼠适应性饲养 7 d, 100 只采用侧脑室注射海人酸方法建立慢性自发性癫痫动物模型<sup>[13]</sup>。术前 12 h 禁食, 用 10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉后, 剪去头部毛发, 碘酒消毒, 沿头部切开前正中中线切开头皮, 将大鼠头部固定在脑立体定位仪上, 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。用大鼠立体定位仪进行侧脑室定位: 于前囟后 0.8 mm, 旁开 1.6 mm, 以高速颅钻在相应位置钻孔。在钻孔处操作脑立体定位仪使微量注射器下针 3.7 mm, (硬膜下 3.7 mm), 以  $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  速度缓慢向侧脑室注射  $3 \mu\text{L}$  海人酸溶液( $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 注射结束后留针 5 min, 缓慢退针。碘酒消毒用, 缝合皮肤, 碘酒再擦拭。假手术组于侧脑室注射  $3 \mu\text{L}$  生理盐水。术后每只大鼠连续注射青霉素  $80 \text{ 万 U}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  5 d, 以预防感染。按照 Racine 分级<sup>[14]</sup>标准评定: I 级, 咀嚼、眨眼、立须等面部肌肉的抽搐; II 级, 以点头运动为主的颈部肌肉抽搐; III 级: 单支前侧阵挛抽; IV 级, 双侧前肢阵挛、抽搐伴身体立起; V 级, 双侧后肢强直, 身体背曲强直, 跌倒伴全身阵挛。造模后出现 IV 级以上发作为成功的癫痫持续状态模型, 未达到 IV ~ V 级发作的归为造模不成功弃用。

**2.2 分组及给药** 造模成功的大鼠随机分为模型组, CBZ 组, 柴贝止痫汤 + CBZ 组, 贝母素甲 + CBZ 组。并设假手术组。假手术组和模型组给予 0.8% 羧甲基纤维素钠溶液, CBZ 组给予 CBZ 溶液, 柴贝止痫汤 + CBZ 组给予柴贝止痫汤 + CBZ 溶液, 贝母素甲 + CBZ 组给予贝母素甲 + CBZ 溶液。其中 CBZ 按  $0.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量给药, 使用时用羧甲基纤维素钠溶液混匀搅拌, 置成  $14.91 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  混悬液; 柴贝止痫汤按  $8.39 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量给药, 每剂含生药量 90 g, 水煮浓煎为 54 mL, 折合生药量含  $1.678 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 贝母素甲按  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量给药, 使用时用 0.8% 羧甲基纤维素钠溶液混匀搅拌置成  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  混悬液, 柴贝止痫汤由东方医药药剂科统一煎制,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存, CBZ 和贝母素甲均需要现用现配。CBZ 及柴贝止痫汤依据“等效剂量直接折算法”所得, 贝母素甲剂量参考文献<sup>[15]</sup>所得, 连续灌胃 60 d。

**2.3 取材** 按随机数字表每组选 6 只, 术前 12 h 禁食, 给予 10% 水合氯醛( $0.4 \text{ mL}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )腹腔注射麻醉, 断头取脑, 于冰上分离皮层, 迅速放入液氮, 后转移至  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱冻存, 以进行 Western blot 及

RT-PCR 检测。取 5 只于术前 1 h 灌胃后,麻醉,急性心脏灌注,观察肝脏颜色变为灰白色,断头取全脑,迅速放入液氮,后转移至 -80 °C 冰箱,以进行 LC-MS 检测。

**2.4 蛋白免疫 EP 迹法 (Western blot) 检测皮层 P-gp 蛋白表达** 用总蛋白提取试剂盒提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,制备 10% 的 SDS-PAGE 凝胶,以每孔 60 μg (15 μL) 蛋白量上样。接通电泳仪,160 V 电泳 15 min,待样品跑为一条直线后转为 100 V 60 min 结束电泳。进行转膜 90 min。将 PVDF 膜依据蛋白 Marker 剪开并用 5% 的脱脂奶粉封闭 90 min。加入 P-gp 一抗 (1:2 000) 及 β-actin 一抗 (1:5 万) 杂胶袋 4 °C 封闭过夜,PBST 冲洗 3 次,每次 10 min,摇床孵育 P-gp 二抗 (1:8 000) 和 β-actin 二抗 (1:1 万) 80 min,PBST 冲洗 3 次,每次 10 min,ECL 发光,图像采集,采用 Image J 1.48 v 光密度扫描软件进行分析。

**2.5 Real-time PCR 检测皮层 MDR1b mRNA 转录水平** 采用 trizol 试剂进行总 RNA 提取,并合成 cDNA。每个样本分别用 MDR1 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 Real-time PCR 上进行扩增反应。按照以下条件反应:95 °C 2 min,94 °C 20 s,60 °C 20 s,72 °C 30 s。循环 40 次,以 GAPDH 为内参基因,所有反应均设立 3 个复孔。记录每个反应管中标本的  $C_t$  值,实验结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行分析。

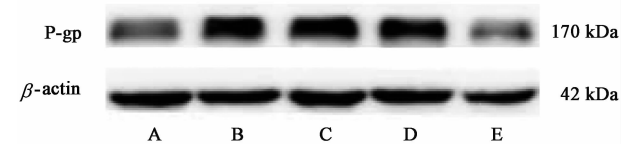
**2.6 超高效液相串联质谱仪检测全脑 CBZ 和 CBZE 含量** 采用 ACQUITY UPLC HSS C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱,流动相 0.1% 甲酸水溶液-1% 甲酸乙腈,流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 40 °C,样品温度 15 °C,进样量 10 μL;各组取右侧脑组织,精密称重,用生理盐水制备成 700 g·L<sup>-1</sup> 脑匀浆液,取样品 200 μL 进行检测,每样加入内标奥卡西平 10 μL,0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 25 μL,震荡混匀后加入乙酸乙酯 1 mL 于多管震荡仪上以 2 000 r·min<sup>-1</sup> 震荡 10 min,4 °C 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液 800 μL 于离心管内,再加入乙酸乙酯 1 mL 重复操作,取上清液 700 μL 于上述离心管内。然后进行氮吹干燥,20 °C 保存备用。建立标准曲线:将 CBZ, CBZE, OXC 分别制成质量浓度为 0.48, 2.5, 0.59 g·L<sup>-1</sup> 的对照溶液。采用甲醇将 CBZ, CBZE 对照品溶液分别按照 100, 500, 750, 1 000, 5 000, 1 万倍 6 个浓度稀释,处理方法同样品处理方法操作。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 20.0 进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组计量资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较,方差齐采用 LSD 检验,方差不齐各组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 模型制备结果** 100 只造模大鼠术后 20 ~ 30 min 后出现胡须抖动、前肢颤抖、流涎。约 1 h 时大鼠逐渐清醒,陆续出现点头,前肢抖动幅度变大,出现原地打转,站立不稳,前肢上抬幅度增大,慢慢出现双上肢抖动伴直立,严重者眼睛泛红,易激惹,突然上冲,横冲直撞。术后 3 ~ 4 h 症状减轻,6 h 基本停止发作。因未达到 IV 级以上弃用 16 只,2 周内无自主发作及发作频繁致鼠笼夹死及腹部感染死亡 16 只,造模成功率为 68%,将造模成功的大鼠随机分为模型组 17 只,CBZ 组 17 只,柴贝止痫汤 + CBZ 组 17 只,贝母素甲组 17 只,并设假手术 10 只。

**3.2 对难治性癫痫大鼠皮层 P-gp 蛋白表达的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠皮层 P-gp 表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,CBZ 组较模型组大鼠皮层 P-gp 表达升高,但无统计学意义;与 CBZ 组比较,柴贝止痫汤 + CBZ 组和贝母素甲 + CBZ 组大鼠皮层 P-gp 表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1,表 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. CBZ 组; D. 柴贝止痫汤 + CBZ 组; E. 贝母素甲 + CBZ 组

图 1 大鼠脑皮质中 P-gp 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of P-gp protein expression in cortex in rat brains

表 1 柴贝止痫汤及贝母素甲对难治性癫痫大鼠皮层 P-gp 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of Chaibeizhixian decoction and peiminsu on expression of P-gp in cortex of rats with intractable epilepsy ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	P-gp/β-actin
假手术	-	0.51 ± 0.11 <sup>3)</sup>
模型	-	0.85 ± 0.20 <sup>1)</sup>
CBZ	0.12	0.93 ± 0.58 <sup>1)</sup>
柴贝止痫汤 + CBZ	8.39 ± 0.12	0.71 ± 0.16 <sup>2)</sup>
贝母素甲 + CBZ	0.01 ± 0.12	0.68 ± 0.21 <sup>2)</sup>

注:与假手术比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 CBZ 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,  
<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.3 对难治性癫痫大鼠皮层 MDR1 mRNA 表达的影响** 与假手术比较,模型组大鼠皮层 MDR1b mRNA 表达显著增多 ( $P < 0.01$ ),MDR1a mRNA 表达明显增多 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,CBZ 组大鼠皮层 MDR1 mRNA 表达增多,差异无统计学意义,与 CBZ 组比较,柴贝止痫汤 + CBZ 组和贝母素甲 + CBZ 组大鼠皮层 MDR1b mRNA 表达显著减少 ( $P < 0.01$ ),MDR1a mRNA 表达明显减少 ( $P < 0.05$ ),与柴贝止痫汤 + CBZ 组比较,贝母素甲 + CBZ 组大鼠皮层 MDR1 mRNA 降低,但差异无统计学意义。见表 2。

表 2 柴贝止痫汤及贝母素甲对难治性癫痫大鼠皮层 MDR1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Chaibeizhixian decoction and peimine on expression of MDR1 mRNA in cortex of rats with intractable epilepsy ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	MDR1b	MDR1a
假手术	-	0.35 ± 0.14	0.44 ± 0.18
模型	-	0.84 ± 0.38 <sup>2)</sup>	0.94 ± 0.58 <sup>1)</sup>
CBZ	0.12	1.01 ± 0.41 <sup>2)</sup>	1.05 ± 0.41 <sup>2)</sup>
柴贝止痫汤 + CBZ	8.39 ± 0.12	0.42 ± 0.19 <sup>4)</sup>	0.56 ± 0.25 <sup>3)</sup>
贝母素甲 + CBZ	0.01 ± 0.12	0.19 ± 0.08 <sup>4)</sup>	0.49 ± 0.21 <sup>3)</sup>

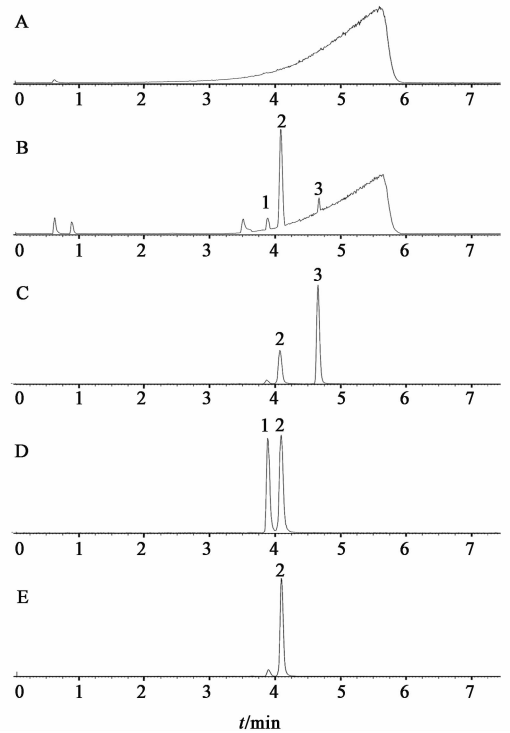
注:与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 CBZ 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.4 对难治性癫痫大鼠脑内 CBZ 和 CBZE 含量的影响** 空白组脑匀浆液中无 CBZ, CBZE, OXC 3 种物质,其对照品出峰的时间为 CBZ 4.67 min, CBZE 3.88 min, OXC 4.08 min。且其达峰是时间与对照品达峰时间基本一致。大鼠右侧脑组织 CBZ 含量与 CBZ 组相比,贝母素甲 + CBZ 组大鼠脑内 CBZ 含量显著升高 ( $P < 0.05$ )。大鼠右侧 CBZE 含量与 CBZ 组比较,柴贝止痫汤 + CBZ 组和贝母素甲 + CBZ 组大鼠脑内 CBZE 含量升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2,表 3。

#### 4 讨论

癫痫是神经内科常见的慢性疾病,药物干预是控制癫痫发作的主要手段,而 1/3 的患者因产生耐药而发展成为 IE,即使患者对抗癫痫药物没有疗效或效果不佳也会导致耐药<sup>[16]</sup>,而导致耐药的原因和机制尚不清楚,研究表明,药物外排转运体学说是抗癫痫药物耐药主要学说之一,该假说认为癫痫患者血脑屏障中 MDR1b mRNA 与其编码 P-gp 高表达

能够促进抗癫痫药物外排,产生耐药<sup>[17]</sup>。



A. 空白; B. 供试品; C ~ E. 对照品; 1. CBZE; 2. OXC; 3. CBZ

图 2 脑匀浆液离子流

Fig. 2 Ion flow diagram

表 3 柴贝止痫汤对难治性癫痫大鼠脑内 CBZ 及 CBZE 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of Chaibeizhixian decoction on CBZ and CBZE contents in brain of rats with refractory epilepsy ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	CBZ	CBZE
CBZ	0.12	4.03 ± 0.8	2.96 ± 1.19
柴贝止痫汤 + CBZ	8.39 ± 0.12	4.25 ± 1.41	5.15 ± 0.53 <sup>1)</sup>
贝母素甲 + CBZ	0.01 ± 0.12	5.27 ± 1.93 <sup>1)</sup>	7.11 ± 1.55 <sup>2)</sup>

注:与 CBZ 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

P-gp 是由 MDR1 基因编码的一种跨膜转运蛋白,其功能是作为 ATP 的外排泵<sup>[18]</sup>,能将机体产生的有毒物质和外来物质转运到细胞外。P-gp 转运广泛的结构多样性及不相关的疏水性和两亲水性化合物,已经证明能转运抗癫痫药物如苯妥英钠、苯巴比妥、拉莫三嗪、左乙拉西坦等<sup>[19-20]</sup>。在啮齿类动物中,MDR1 由 MDR1a 和 MDR1b 2 种表达形式。MDR1 的过表达使 P-gp 升高而促进药物外排和转运,使脑内药物浓度降低进而形成耐药<sup>[21]</sup>。研究发现,在难治性癫痫患者的致病组织及啮齿类动物

模型中检测到 P-gp 表达明显升高<sup>[22]</sup>。因此,降低脑组织中 P-gp 与 MDR1 的高表达是扭转耐药性的主要途径之一。在本实验中发现,模型组较假手术组相比,P-gp/MDR1 表达升高,差异有统计学意义,CBZ 组较模型组的 P-gp/MDR1b 表达高,差异无统计学意义,这一结果与前期研究结果基本一致<sup>[23-25]</sup>,佐证了癫痫的反复发作及抗癫痫药物的应用促进了 P-gp 的高表达。

柴贝止痢汤由天麻、柴胡、浙贝母、牡蛎、清半夏、石菖蒲、地龙组成,治疗难治性癫痫属于痰气郁滞型。临床上,癫痫治分虚实,虚证多责之脾肾不足,实证多由风火痰瘀气所致,其病机特点为顽痰阻闭心窍,肝经风火内动。柴贝止痢汤对风火痰气郁滞所致癫痫较为适宜,方中柴胡功擅疏肝,肝主疏泄,肝气条达则全身气机流通,气血津液运行通畅,何瘀滞之有?浙贝母色白入肺,肺气宣降,主一身之气,肺属金而畏火,喜润而恶燥,浙贝母能清热润肺,助肺气肃降,制肝火之炽张,润燥化痰,且散心胸郁结之气。柴胡疏肝升清阳,贝母清肺降浊气,二药同用,有助于肝升肺降,可通调一身之气机。天麻熄风止痉,为治风之圣药,可熄内外之风,平肝潜阳,可治惊风抽搐、风痰上扰之证。《本草汇言》言其主“癫痫强痉,四肢挛急,语言不顺”。清半夏辛温体滑,性主降,能降胃安冲,引肺中、胃中湿痰下行;清半夏天麻同用,降逆熄风化痰,痰湿下行不上扰心神,则心主清明;牡蛎育阴潜阳以熄风止痉,咸寒软坚以散痰火之郁结;地龙咸寒,清热熄风定惊,可治因热所致惊痫、抽搐之症;石菖蒲芳香开窍,宁心安神,具化湿、豁痰、辟秽之效,善化蒙蔽心窍之痰浊;诸药合用,清热熄风,调气化痰,安神止痉。前期实验表明,柴贝止痢汤能够降低难治性癫痫大鼠的平均发作时间和发作级别<sup>[25]</sup>,结合 Western blot 及 Real-time PCR 结果,笔者猜测 P-gp/MDR1 的高表达抑制了抗癫痫药入脑,本团队以利用生物方剂分析药理研究方法为指导,利用 LC-MS 技术对柴贝止痢汤主要血浆动力学浓度进行检测,发现贝母素甲是柴贝止痢汤的主要吸收入血效用成分之一,由此推断贝母素甲可能是柴贝止痢汤药效物质基础之一。

贝母素甲作为浙贝母的主要活性生物碱,具有多种药理作用,研究显示,贝母甲具有镇咳平喘和镇痛、抗炎、逆转细菌耐药、抗肿瘤作用(抑制肿瘤增殖、逆转肿瘤耐药)等,其逆转肿瘤细胞耐药的机制是通过抑制 P-gp 和 MRP 蛋白的高表达,增加胞内柔红霉素(DNR)的蓄积来实现的<sup>[9]</sup>。胡凯文等<sup>[26]</sup>

发现贝母素甲对白血病细胞多药耐药性的逆转作用。贝母素甲通过降低耐药肿瘤细胞中 P-gp 的表达或促进 P-gp 的 ATP 酶的活性来逆转 MDR<sup>[27]</sup>。本实验中,贝母素甲能够降低大鼠脑组织皮层中 P-gp 的高表达,且其编码的 MDR1 表达降低,而脑内 CBZ 及 CBZE 表达升高,说明贝母甲通过抑制 P-gp/MDR1 的表达提高了脑内 CBZ 及 CBZE 的含量。

CBZ 是一种广泛使用的抗癫痫药物,其代谢物 CBZE 具有类似的抗癫痫活性和毒性<sup>[28]</sup>。CBZ 主要经肝脏系列的 CYP450 酶系的 CYP3A4, CYP3A5 转化为活性产物 CBZE<sup>[29]</sup>。CBZ 和 CBZE 同为 P-gp 的作用底物,本研究发现,柴贝止痢汤能同时促进 CBZ 及 CBZE 入脑,但对 CBZE 的作用突出。这可能与中药多种复杂药理成分影响 CYP450 酶系有关。贝母素甲能同时促进 CBZ 和 CBZE 入脑,可能通过降低 P-gp/MDR1 的表达水平来提高脑内 CBZ 和 CBZE 的浓度,但根据文献报道,贝母素甲能抑制促炎细胞因子[如白细胞介素(IL)-6, IL-8, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )]的产生,抑制环氧合酶-2(COX-2),前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 的表达,阻断核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路<sup>[30]</sup>,这些因素是否降低共同参与 P-gp 的表达有待进一步研究,下一步可通过脑组织病理或免疫组化探讨贝母素甲对胶质细胞或小胶质细胞的影响,进一步了解贝母素甲抗难治性癫痫的作用机制。

#### [参考文献]

- [1] TANG F, Hartz A M S, Bauer B. Drug-resistant epilepsy: multiple hypotheses, few answers [J]. Front Neurol, 2017, 8:301.
- [2] Kwan P, Arzimanoglou A, Berg A T, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc task force of the ILAE commission on therapeutic strategies [J]. Epilepsia, 2010, 51(6):1069-1077.
- [3] WANG G X, WANG D W, LIU Y, et al. Intractable epilepsy and the P-glycoprotein hypothesis [J]. Int J Neurosci, 2016, 126(5):385-392.
- [4] Gennuso F, Ferneti C, Tirolo C, et al. Bilirubin protects astrocytes from its own toxicity by inducing up-regulation and translocation of multidrug resistance-associated protein 1 (Mrp1) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(8):2470-2475.
- [5] Pallis M, Turzanski J, Higashi Y, et al. P-glycoprotein in acute myeloid leukaemia: therapeutic implications of its association with both a multidrug-resistant and an apoptosis-resistant phenotype [J]. Leuk Lymphoma,

- 2002, 43(6):1221-1228.
- [ 6 ] 佟晓琳. 浙贝母主要成分血浆药代动力学及肿瘤耐药细胞抑制研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2016.
- [ 7 ] 胡凯文, 陈信义. 中药活性成分抗耐药肿瘤细胞体外筛选研究[J]. 中国医药学报, 1998, 13(2):10-12.
- [ 8 ] YIN Z, ZHANG J, GUO Q, et al. Study on reversing hematological cells multidrug resistance by verticine [J]. Am J Hematol, 2019, 20(12):33-34.
- [ 9 ] 朱晓琳, 陈渊, 赵伟. 贝母素甲药理作用的研究进展[J]. 药物生物技术, 2018, 25(6):561-564.
- [ 10 ] 聂莉媛, 鄢泽然, 张青, 等. 柴贝止痢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.
- [ 11 ] 郑香春, 李淑芳, 刘金民. 柴贝止痢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.
- [ 12 ] 王越, 刘金民. 中药柴贝止痢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.
- [ 13 ] Kandratavicius L, Balista P A, Lopes-Aguiar C, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2014, 10:1693-1705.
- [ 14 ] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. motor seizure [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3):281-294.
- [ 15 ] 归改霞. 贝母素甲对急性肺损伤小鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-10 及 PGE<sub>2</sub> 时空表达的影响[J]. 中医临床研究, 2017, 9(1):1-4.
- [ 16 ] Martin J B. Antiepileptic drug therapy the story so far [J]. Seizure, 2010, 19(10):650-655.
- [ 17 ] Tishler D M, Weinberg K I, Hinton D R, et al. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy [J]. Epilepsia, 1995, 36(1):1-6.
- [ 18 ] Ambudkar S V, Kimchi-Sarfaty C, Sauna Z E, et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism [J]. Oncogene, 2003, 22(47):7468-7485.
- [ 19 ] Cucullo L, Hossain M, Rapp E, et al. Development of a humanized *in vitro* blood-brain barrier model to screen for brain penetration of antiepileptic drugs [J]. Epilepsia, 2007, 48(3):505-516.
- [ 20 ] Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein [J]. Neuropharmacology, 2008, 55(8):1364-1375.
- [ 21 ] Lazarowski A, Czornyj L, Lubienicki F, et al. ABC transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epilepsy [J]. Epilepsia, 2010, 48(S5):140-149.
- [ 22 ] Hartz A M, Pekcec A, Soldner E L, et al. P-gp protein expression and transport activity in rodent seizure models and human epilepsy [J]. Mol Pharm, 2017, 14(4):999-1011.
- [ 23 ] 王潇慧, 鄢泽然, 张青, 等. 柴贝止痢汤调节海人酸致痫大鼠脑组织耐药蛋白 MRP2 表达的研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(12):4961-4965.
- [ 24 ] 刘金民, 郑香春. 中药柴贝止痢汤对难治性癫痫大鼠多药耐药基因 MDR1 表达的研究[J]. 天津中医药, 2009, 26(6):472-475.
- [ 25 ] 郑香春, 侯敏哲, 武晓林, 等. 针药协同对难治性癫痫大鼠动物行为学及 P-gp/MDR1 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11):5140-5142.
- [ 26 ] 胡凯文, 郑洪霞, 齐静, 等. 浙贝母碱逆转白血病细胞多药耐药的研究[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(12):650-651.
- [ 27 ] XIA X, Cole S P C, CAI T, et al. Effect of traditional Chinese medicine components on multidrug resistance in tumors mediated by P-glycoprotein [J]. Oncol Lett, 2017, 13(6):3989-3996.
- [ 28 ] Russell J L, Spiller H A, Baker D D. Markedly elevated carbamazepine-10, 11-epoxide/carbamazepine ratio in a fatal carbamazepine ingestion [J]. Case Rep Med, 2015, 2015:369707.
- [ 29 ] 朱延梅, 胡俊平, 朱雨岚, 等. CBZ 和 CBZE 血药浓度个体差异与 CYP3A5 ~ \*3 基因多态性的相关性分析[J]. 中风与神经疾病杂志, 2012, 29(9):804-807.
- [ 30 ] YI P F, WU Y C, DONG H B, et al. Peimine impairs pro-inflammatory cytokine secretion through the inhibition of the activation of NF-kappaB and MAPK in LPS-induced RAW264.7 macrophages [J]. Immunopharm Immunot, 2013, 35(5):567-572.

[责任编辑 孙丛丛]