论著·基础研究

黄连解毒汤对丙戊酸钠在氯化锂-匹罗卡品致癫痫大鼠体内的减毒增效作用*

周海云[1]，李品军[1]，王　强[2]，黄明春[2]，刘　耀[2]
（1.重庆市石柱县人民医院内三科　409100；2.第三军医大学第一附属医院药剂科，重庆 400038）

摘　要：目的　研究黄连解毒汤（HLT）对丙戊酸钠（SVA）在氯化锂-匹罗卡品致癫痫大鼠体内减毒增效作用。**方法**　采用腹腔注射氯化锂-匹罗卡品制备癫痫大鼠模型。比较未用药、单用 SVA 及联合用药对大鼠行为学，血清谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST），谷胱甘肽过氧化酶（GSH-Px）活性和丙二醛（MDA）水平以及肝脏组织学变化的影响，同时监测 SVA 血药浓度。**结果**　SVA 联合 HLT 能减少大鼠的癫痫行为，拮抗癫痫大鼠服用 SVA 导致的 ALT、AST 活性升高（$P<0.01$）、GSH-Px 活性下降（$P<0.01$）和肝组织病理改变，并同时降低 SVA 血药浓度（$P<0.01$）。**结论**　HLT 能增强 SVA 的抗癫痫作用，并降低其肝毒性。

关键词：丙戊酸钠；黄连解毒汤；肝毒性
doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2014.06.019　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1671-8348(2014)06-0689-03

Synergistic effect of Huang Lian Jie Du Decoction on sodium valproate in epileptic rats induced by lithium chloride-pilocarpine*

Zhou Haiyun[1]，*Li Pinjun*[1]，*Wang Qiang*[2]，*Huang Mingchun*[2]，*Liu Yao*[2]
（1.*Department of Neurology*，*People's Hospital of Shizhu*，*Chongqing* 409100，*China*；2.*Department of Pharmacy*，*the First Affiliated Hospital of Third Military Medical University*，*Chongqing* 400038，*China*）

Abstract：Objective　To investigate synergistic effect of Huang Lian Jie Du decoction（HLT）on sodium valproate（SVA）in epileptic rats by epileptic rats induced by lithium chloride-pilocarpine. **Methods**　Epileptic rats were induced by intraperitoneal injection of lithium chloride and pilocarpine. The synergistic anti- epilepsy effect of HLT and SVA was investigated. The level of ALT，AST，SVA in serum，GSH-Px and MDA were determined at the end of a 4 week adminstration. Then the ultrastructure alteration of the liver were also observed by transmission electon microscope. **Results**　The adminstration of SVA together with HLT can reduce behavior of epileptic rats. Significant decrease in the level of ALT，AST，and SVA in serum of rats and noticeable increases in the activity of GSH-Px were observed in the co-administered groups compared with administere SVA alone group（$P<0.01$）. At the same time，light microscopic study indicates rats in co-administered SVA and high-dose HLT group has intacthepatic histology. **Conclusion**　HLT could has synergistic anti-epileptic effect and relieve the hepatotoxoicity of SVA when co-administered.

Key words：sodium valproate；Huang Lian Jie Du Decoction；hepatotoxicity

丙戊酸钠（sodium valproate，SVA）为临床一线广谱抗癫痫药物，其作用机制与抑制 γ-氨基丁酸转氨酶活性，增强谷氨酸脱羧酶活性，升高脑内 γ-氨基丁酸有关[1-2]。但长期服用 SVA 可导致共济失调、学习记忆能力下降、肝功能受损等[3]。黄连解毒汤（HLT）可泻火解毒，临床上常用于各种热症、阿尔茨海默病等[4]。临床研究发现 HLT 同 SVA 等抗癫痫药物合用，对缓解癫痫发作时的阵挛及焦躁精神状态有一定效果。本研究对 SVA 联合 HLT 对 SVA 的解毒增效作用及其机制进行初步研究，为 SVA 的临床使用提供参考，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料　选取 SPF 级 Wistar 大鼠，全为雄性，5 周龄，体质量（210.2±9.2）g，由重庆市中药研究院实验动物研究中心提供，动物合格证号 SCXK（渝）2009-0001。

1.2　仪器与试剂　CM3050S 型冰冻切片机（德国 Leica 公司）；Viva-E 血药浓度分析仪（德国 Siemens 公司）。谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、谷胱甘肽过氧化酶（GSH-Px）、丙二醛（MDA）检测试剂盒购自江苏南京建成生物工程公司，批号分别为 20120616，20111218，20120908 和 20121015；Emit 2000SVA 定量检测试剂盒购自德国 Siemens 公司，批号 20120612；匹罗卡品注射液（2 mg/mL），购自天津金耀氨基酸有限公司，批号 20120310；氯化锂（含量大于 98%）购自大连美罗生物科技有限公司，批号 20120608；氢溴酸东莨菪碱注射液（0.3 mg/mL）购自成都第一制药有限公司，批号 20100816；SVA 购自江苏恒瑞医药股份有限公司，批号 20120915。HLT 制备：取黄连、栀子、黄柏和黄芩 4 种中药饮片均购自太极集团重庆中药饮片有限公司，按 1.5∶1.5∶1.0∶1.0 加水煎煮 3 次，每次 30 min，过滤，合并滤液，60 ℃减压浓缩至 1.5 g/mL（按生药计）。

1.3　方法

1.3.1　动物分组、造模与给药　实验动物造模参照文献[5-6]。造模成功后将癫痫模型大鼠分为 5 组（$n=10$）：模型组、SVA 组、SVA 联合 HLT 低剂量治疗组、SVA 联合 HLT 中剂量治疗组和 SVA 联合 HLT 高剂量治疗组。另选取 10 只健康大鼠为正常对照组。4 个治疗组药物均用 1 mL 0.9%氯化钠溶液溶解稀释后灌胃给药。其中，SVA 组按 100 $mg \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$ 给予 SVA，低、中、高 3 个 SVA 联合 HLT 给药

*　**基金项目：**国家科技部重大新药创制专项（2010ZX09401-306-1-3）。　**作者简介：**周海云（1972－），主治医师，主要从事缺血性脑卒中与癫痫治疗的研究。

大鼠则分别同时灌胃给予 100 mg·g^{-1}·d^{-1}剂量 SVA 及 25、50 和 100 mg·g^{-1}·d^{-1} HLT。对照组和模型组灌胃给予 1 mL 0.9 %氯化钠溶液，连续给药 4 周。末次给药后观察 15 min 内大鼠出现癫痫反应次数。

1.3.2 血液及肝脏标本采集、匀浆 大鼠在观测行为学指标后继续给药 48 h 后，腹腔注射 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉，下腔静脉取血后，处死，摘取肝脏标本，取右叶以 0.9%冰冷氯化钠溶液冲洗后，部分干冰速冻保存。其余部分洗净后匀浆，匀浆液用 2 倍量 0.9 %冰冷氯化钠溶液和丙酮反复洗涤至上清无血色后，用 3 000 r/min 离心 15 min 沉淀，备用。

1.3.3 血清 ALT、AST 活性和 SVA 血药浓度测定 ALT、AST 活性测定参照试剂盒使用说明进行，均采用赖氏比色法。SVA 血药浓度测定按定量试剂盒说明书进行。

1.3.4 GSH-Px 活性和 MDA 水平检测 GSH-Px 活性和 MDA 水平均参照试剂盒使用测定。GSH-Px 活性测定采用而巯基比色法，MDA 测定用硫代巴比妥酸比色法。

1.3.5 肝组织病理学检查 剪取大鼠肝右叶相同部位，冷冻切片机切片，10%中性甲醛液固定，石蜡包埋、切片(厚 4 μm)，苏木素-伊红(HE)染色。在每张切片上选取 10 个视野进行观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用单因素方差分析方法，组间比较采用 Tuckey 法。单向有序计数资料采用 Wilcoxoh 秩和检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 合用 SVA 和 HLT 对癫痫大鼠行为学的影响 对照组大鼠没有出现癫痫行为，模型组大鼠全部出现癫痫行为症状，按 Racine 分级判定，均为Ⅱ级以上表现，且各组半数($n=5$)表现Ⅲ级发作症状。SVA 治疗后，大部分实验大鼠仍有痫样行为，但 Racine 分级表现有所降低，Ⅲ级以上表现仅 4 只大鼠，没有大鼠发生Ⅴ级表现，但统计学分析差异无统计学意义($P>0.05$)。同时服用 SVA 和不同剂量 HLT 处理的大鼠，其癫痫表现行为较模型组和 SVA 组进一步改善，SVA 联合 HLT 高、中剂量治疗，均未观察到大鼠Ⅲ级及Ⅲ级以上癫痫发作症状，但与模型组及 SVA 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 合用 SVA 和 HLT 对癫痫大鼠行为学的影响(n)

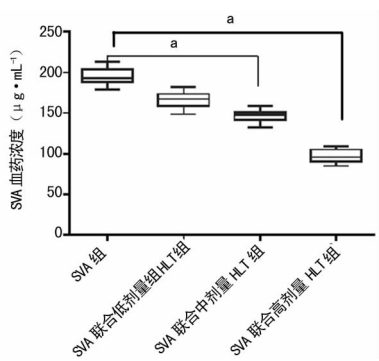
组别	Racine 分级					
	0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
对照组	10	0	0	0	0	0
模型组	0	0	3	5	1	1
SVA 组	1	4	2	3	1	0
SVA 联合低剂量 HLT 组	1	5	3	0	1	0
SVA 联合中剂量 HLT 组	3	5	2	0	0	0
SVA 联合高剂量 HLT 组	1	8	1	0	0	0

2.2 SVA 联合 HLT 对癫痫大鼠 ALT、AST、GSH-Px 活性和 MDA 水平的影响 对照组大鼠与模型组大鼠的血清 ALT、AST、GSH-Px 活性和 MDA 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。在给予 SVA 100 mg·g^{-1}·d^{-1} 4 周后，大鼠血清中 ALT、AST 活性和肝组织 MDA 水平显著增加($P<0.01$)，而肝 GSH-Px 活性明显下降($P<0.05$)。同时给予 SVA 和 HLT，ALT、AST 较单独给予 SVA 下降，且下降程度 SVA 联合高剂量 HLT 组>SVA 联合中剂量 HLT 组>SVA 联合低剂量 HLT 组。而 SVA 联合高剂量 HLT 组(100 mg·g^{-1}·d^{-1})给药较 SVA 组，对 GSH-Px 活性下降显著减少($P<0.05$)。但 SVA 和不同剂量 HLT 联合使用，对肝组织 MDA 水平没有明显影响。

表 2 合用 SVA 和 HLT 对癫痫大鼠 ALT、AST、GSH- Px 和 MDA 的影响($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	ALT(U·mL^{-1})	AST(U·mL^{-1})	GSH-Px(U·mg^{-1}·prot^{-1})	MDA(mol·g^{-1}·prot^{-1})
对照组	17.15±3.18	25.33±2.09	64.05±14.06	6.75±3.77
模型组	17.74±2.25	24.54±8.53	61.59±4.80	6.52±0.95
SVA 组	45.08±9.11^{b}	85.00±7.50^{b}	46.31±6.43^{a}	10.75±2.18^{a}
SVA 联合低剂量 HLT 组	39.86±4.19^{b}	91.35±12.55^{b}	48.29±7.39^{a}	11.57±0.68^{a}
SVA 联合中剂量 HLT 组	36.22±1.84^{bc}	67.36±10.09^{bc}	54.20±8.28	10.98±4.35^{a}
SVA 联合高剂量 HLT 组	25.72±0.86^{bd}	47.79±7.19^{ad}	52.15±10.20^{c}	10.06±1.33^{a}

^{a}：$P<0.05$、^{b}：$P<0.01$，与模型组比较；^{c}：$P<0.05$、^{d}：$P<0.01$，与 SVA 组比较。



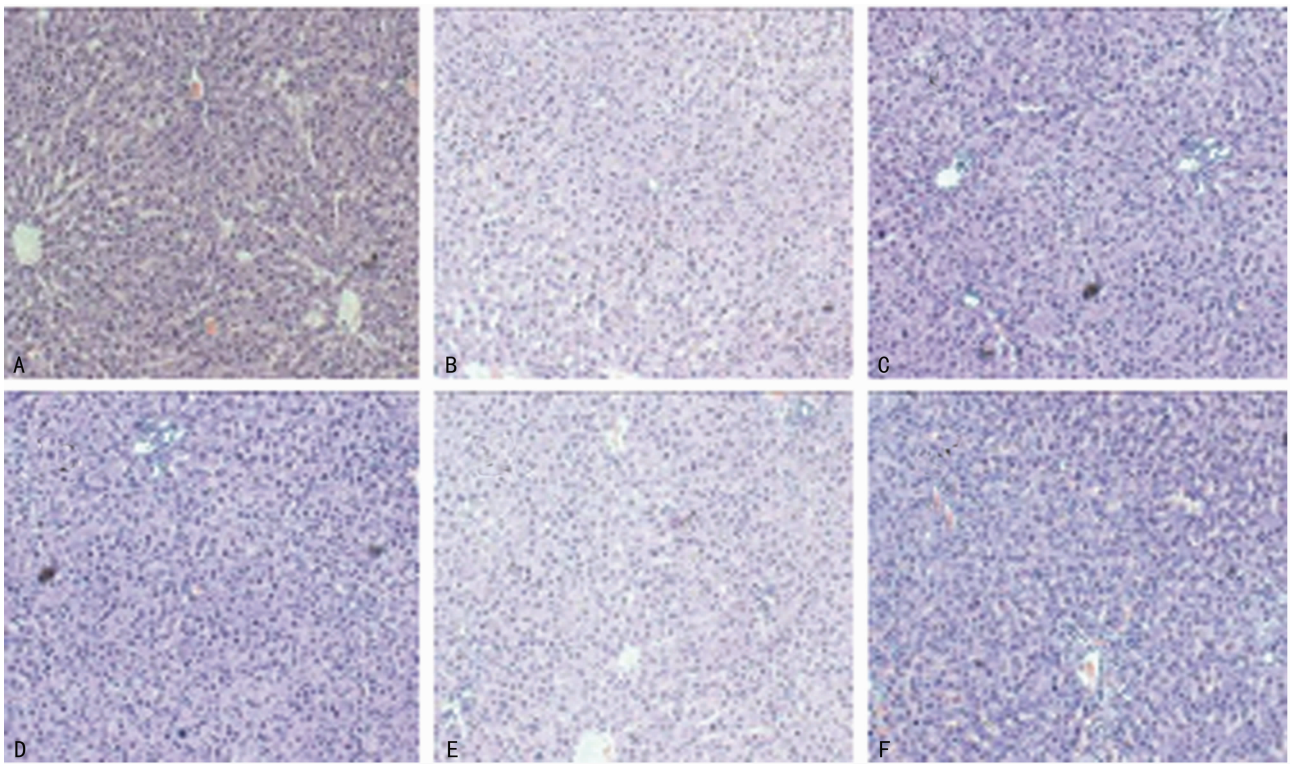
^{a}：$P<0.01$，与 SVA 组比较。

图 1 SVA 联合 HLT 对癫痫大鼠 SVA 血药浓度的影响($n=10$)

2.3 SVA 联合 HLT 对 SVA 血药浓度的影响 SVA 血药浓度测定结果见图 1。多次给药后 SVA 组大鼠血药浓度在 178.560～209.367 μg·mL^{-1}。合用 HLT 后，癫痫大鼠体内 SVA 血药浓度下降，其中 SVA 联合中剂量和 SVA 联合高剂量组 SVA 血药浓度下降明显($P<0.01$)，两组血药浓度最低分别仅 132.54 μg·mL^{-1}和 85.396 μg·mL^{-1}。

2.4 肝组织病理学观察 对照组和模型组肝病理组织学检查未见异常。SVA 组 50 %以上肝细胞水肿，核固缩，可见点状坏死和小灶性坏死，并伴有炎症浸润，可见肝中央静脉扩张(图 2C)。SVA 联合 HLT 治疗后，肝细胞状况明显改善散布。SVA 联合中剂量 HLT 组肝细胞肿胀变性明显少于 SVA 组，但汇管区仍可观察到少量炎症细胞浸润，偶见嗜酸小体形成，未发现小灶性坏死点。而 SVA 联合高剂量 HLT 组(图 2F)肝

细胞排列整齐，形态大小较一致，未见肝细胞坏死，但仍可见极少量炎症细胞浸润。



A：对照组；B：模型组；C：SVA 组；D：SVA 联合低剂量 HLT 组；C：SVA 联合中剂量 HLT 组；F：SVA 联合高剂量 HLT 组。

图 2　SVA 联合 HLT 对癫痫大鼠肝脏组织病理改变的影响(HE ×400)

3　讨　论

HLT 能改善阿尔茨海默病引起的学习记忆能力下降[7]、癫痫性精神病的情绪症状等[8]。目前对用于癫痫的研究报道较少。本实验采用匹罗卡品-氯化锂致癫痫大鼠模型，对 SVA 单用及合用不同剂量 HLT 后 SVA 药效及肝毒性进行研究。结果发现，同时服用 SVA 和 HLT 使癫痫模型大鼠的 SVA 血药浓度明显下降，说明 HLT 能影响 SVA 的体内代谢过程，但其机制不清楚。目前研究认为 SVA 在体内主要经肝细胞色素 P450 酶系代谢，主要是 CYP2s[9]。王晋朝等[9]和李丹等[10]研究发现 HLT 及其组分黄芩苷、小檗碱等能影响 CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9 的表达和活性[4]。因此合用 HLT 致 SVA 血药浓度下降可能与其影响 CYP 酶有关。

合用 HLT 导致 SVA 血药浓度下降，但其抗痫作用并未减弱。有研究发现 HLT 可促进尼莫地平在大鼠脑组织中分布增加[11]，该作用与其促进大鼠脑微血管内皮细胞对尼莫地平的摄取、改善尼莫地平在血脑屏障上的转运有关[12]。因此，HLT 这种降低 SVA 血药浓度同时未降低其治疗效果的机制可能与 HLT 改善 SVA 在血脑屏障上的转运有关。此外，另有研究发现 HLT 可改善痴呆小鼠和大鼠的学习记忆能力，改善脑部缺血状况[7-8]，影响炎症通路如 NF-κB 通路等[13-14]，因此，HLT 同 SVA 的协同作用也可能与 HLT 自身的药理机制有关。

合用 HLT 能不同程度逆转 SVA 治疗癫痫大鼠导致的 ALT、AST 上升和 GSH-Px 活性下降，表明合用 HLT 对 SVA 导致的肝损伤具有拮抗作用。ALT，AST 均属非特异性细胞内功能酶，正常时血清内含量很低；当肝细胞受损，肝细胞膜通透性增加时，其活性迅速增强。GSH-Px 活性下降，也与组织细胞氧化损伤有关。因此，HLT 对 SVA 致肝损伤的拮抗作用可能与其细胞保护作用有关。

参考文献：

[1] 张翠欣，梁丽革，田海静. 丙戊酸的合理使用[J]. 临床合理用药，2012，5(4)：97-98.

[2] Smith J，Whitehall J. Sodium valproate and the fetus：a case study and review of the literature[J]. Neonatal Netw，2009，28(6)：363-367.

[3] 宋葳，姜舟，吴惧，等. 丙戊酸钠个体化治疗对癫痫患儿血清甘油三酯影响的研究[J]. 重庆医学，2008，37(18)：2133.

[4] 张保国，程铁锋，郝锦锦. 黄连解毒汤药效学研究概况[J]. 中国药学杂志，2009，44(16)：1204-1208.

[5] Francois J，Koning E，Ferrandon A，et al. The combination of topiramate and diazepam is partially neuroprotective in the hippocampus but not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy[J]. Epilepsy Res，2006，72(2/3)：147-163.

[6] Glien M，Brandt C，Potschka H，et al.. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine：low mortality but high proportion of rats developing epilepsy[J]. Epilepsy Res，2001，46(2)：111-119.

[7] 陈国华，王月古，邱昕. 黄连解毒汤对 AD 小鼠学习记忆能力的影响[J]. 神经损伤与功能重建，2011，6(1)：99-102.

[8] 张丽美，李桂海. 黄连解毒汤的药理及临(下转第 695 页)

而同时测量的患者血清仅 AST 测试不合格，占 2.9%。从表 2、3 可以看出，系统 Y2 的 CK、AMY 项目与参考方法相比出现了一个较大的偏倚，对 CK、AMY 进行基质效应评价表明，5 个 CK 质评样本中仅高值表现有基质效应，而 5 个 AMY 质评样本中仅低值没有显示基质效应。本研究也发现，淀粉酶浓度较低时，其与参考方法的偏倚较小，随着浓度增高，其偏倚增大。CK 不论室间质评还是患者血清检测结果均发生了较大的正偏倚。值得注意的是，LDH 测量方法本实验将反应方向由“P→L”的反应系数按照与罗氏比对结果进行了调整，以参考方法检测结果为目标，测量室间质评和患者血清均在允许误差范围内，其中患者血清结果的偏倚小于 1/3 允许误差，即其与参考方法相关性满足临床需要，所以当方法不一致时可以通过调整系数达到与参考方法检测结果一致进而与常规化学检测结果统一的目的。

综上所述，参考方法具有较高的正确性，较小的不确定度，将其作为参比方法，应用于室间质评，有利于不同实验室不同系统不同方法之间结果的一致和可比，能够促进不同实验室之间结果的互认。

参考文献：

[1] Jansen R, Schumann G, Baadenhuijsen H, et al. Trueness verification and traceability assessment of results from commercial systems for measurement of six enzyme activities in serum: an international study in the EC4 framework of the calibration 2000 project[J]. Clin Chim Acta, 2006, 368(1/2): 160-167.

[2] Schumann G, Bonora R, Criotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 ℃. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(6): 635-642.

[3] Schumann G, Bonora R, Criotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 ℃. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(6): 643-648.

[4] Schumann G, Klauke R, Canalias F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 ℃. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase[J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44(9): 1146-1155.

[5] Schumann G, Bonora R, Criotti F, et al.. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 ℃. Part4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(9): 1439-1446.

[6] Schumann G, Bonora R, Criotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 ℃. Part5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(7): 725-733.

[7] Schumann G, Bonora R, Criotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 ℃. Part6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of γ-Glutamyltransferase[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(7): 734-738.

[8] Schumann G, Aoki R, Ferrero CA, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 ℃. Part 8. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of α-amylase[J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44(9): 1146-1155.

[9] 阳苹，张莉萍，肖勤，等. 实验室内不同检测系统比对周期及比对方案探讨[J]. 重庆医学，2011，40(3)：253-255.

（收稿日期：2013-08-18 修回日期：2013-11-27）

（上接第 691 页）

床研究进展[J]. 时珍国医国药，2007，24(4)：1635-1637

[9] 王晋朝. 黄芩苷对 CYP2B6 酶活性的影响及其与 CYP2B6 基因型的相关性[D]. 长沙：中南大学，2008.

[10] 李丹，韩永龙，余涛，等. 黄连解毒汤对人细胞色素 P450 酶 6 个亚型的体外抑制作用研究[J]. 中国临床药理学与治疗学，2012，17(2)：131-136.

[11] 张冬梅，何振伟，李杨，等. 黄连解毒汤对尼莫地平在大鼠脑内处置动力学的影响 [J]. 中草药，2007，38(1)：1681-1684.

[10] 白向荣，姜德春，王育琴，等. 基因多态性与丙戊酸的药物代谢[J]. 中国药物依赖性杂志，2007，16(4)：241-244.

[11] 李丹，韩永龙，余涛，等. 黄连解毒汤对人细胞色素 P450 酶 6 个亚型的体外抑制作用研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2012，17(2)：131-136.

[12] 梅之南，杨亚江，徐辉碧，等. 固体脂质纳米粒降低雷公藤内酯醇肝毒性的实验研究[J]. 中草药，2003，34(9)：817-819.

[13] 董秀，杜慧莲，韩兆峰，等. 黄连解毒汤对老年痴呆大鼠 SOD 活性，MDA 含量 I-κB 和 NF-κB 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志杂志，2012，30(8)：1730-1732.

[14] 付小春，陈建军，王舰平. 黄连解毒汤对大鼠心肌缺血再灌注损伤核因子 NF-κB 信号转导通路的影响[J]. 现代中西医结合杂志，2013，22(1)：18-19.

（收稿日期：2013-08-08 修回日期：2013-10-22）