

矿物药青礞石对 PTZ 点燃癫痫大鼠脑组织中 氨基酸神经递质含量的影响

刘圣金¹, 吴露婷¹, 吴德康¹, 王 瑞¹, 喻 斌¹, 王宇华¹, 刘 培¹, 杨文国²

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023;

2. 南京中医药大学信息技术学院, 江苏 南京 210023)

摘要:建立了超高效液相色谱-三重四极杆-线性离子阱质谱(Qtrap-UPLC-MS/MS)法同时测定大鼠脑组织中4种氨基酸类神经递质,研究了矿物药青礞石原药材粉末、水煎液、药渣对戊四氮(Pentylenetetrazol, PTZ)点燃癫痫模型大鼠脑组织中氨基酸类神经递质含量的影响。在ESI⁺电离模式下,采用多反应监测扫描方式测定脑组织(皮层,海马)中谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、天冬氨酸(Asp)及 γ -氨基丁酸(GABA)的含量。结果表明:4种氨基酸的线性关系良好,精密性、准确度均符合生物样品的分析要求。大鼠给予青礞石不同样品后,脑组织皮层和海马中兴奋性神经递质Glu、Asp水平显著降低。与模型组相比,皮层中Gly占氨基酸总含量的百分比均增加,Asp/Gly值、Glu/Gly值均降低;海马中,各组Glu、Asp、Gly、GABA的浓度均降低。这说明,矿物药青礞石能有效降低PTZ点然大鼠脑内兴奋性氨基酸递质含量,调节皮层和海马区Gly含量。

关键词:超高效液相色谱-三重四极杆-线性离子阱质谱(Qtrap-UPLC-MS/MS);矿物药;青礞石;癫痫;氨基酸递质;海马;皮层

中图分类号:O657.63 文献标志码:A 文章编号:1004-2997(2016)06-0533-09

doi:10.7538/zpxb.youxian.2016.0040

Effect of Mineral Chinese Medicine Chloriti Lapis on Amino Acid Content in Brain Tissues of Pentylenetetrazol-Kindled Epileptic Rats

LIU Sheng-jin¹, WU Lu-ting¹, WU De-kang¹, WANG Rui¹, YU Bin¹,

WANG Yu-hua¹, LIU Pei¹, YANG Wen-guo²

(1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization,
School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Information Technology College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: The method of Qtrap-ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (Qtrap-UPLC-MS/MS) was established for simultaneous determina-

收稿日期:2016-02-24;修回日期:2016-05-09

基金项目:国家自然科学基金项目(81303178);江苏省自然科学基金项目(BK20130957);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(二期);江苏高校品牌专业建设工程项目(PPZY2015A070)资助

作者简介:刘圣金(1978—),男(汉族),安徽金寨人,讲师,从事中药鉴定及质量标准 and 矿物药研究。E-mail: 13770653305@139.com

通信作者:吴德康(1951—),男(汉族),江苏宜兴人,教授,从事中药鉴定及质量标准 and 矿物药研究。E-mail: wudekang2008@126.com

网络出版时间:2016-09-01;网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20160901.1515.006.html>

tion four amino acid neurotransmitters in rat's brain tissue. The effects of powder, water decoction and dregs of Chloriti Lapis on amino acid content in PTZ-kindled epileptic rat's brain tissue were studied. The contents of Glu, Gly, Asp and GABA in rat's brain tissue (cortex and hippocampus) were detected by multiple reactions monitoring (MRM) scan mode in positive electrospray ionization (ESI⁺). The result shows that the four amino acids have good linear relationship, the RSDs of precision and accuracy conform to the requirements of analysis in biological samples. After rats were treated with different samples of Chloriti Lapis, excitatory neurotransmitter Glu, Asp in cerebral cortex and hippocampus decreased significantly. Compared with the model group, the content of Gly in cerebral cortex is increased in the percentage of total amino acid-contents, while the ratio of Asp/Gly and Glu/Gly are decreased. The contents of Glu, Asp, Gly and GABA in other groups display reduction in hippocampus compared with the model group. This shows that mineral Chinese medicine Chloriti Lapis can effectively reduce the excitatory amino acid contents in PTZ-kindled rat's brain, and effectively regulate the content of Gly in the cortex and hippocampus.

Key words: Qtrap-ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (Qtrap-UPLC-MS/MS); mineral Chinese medicine; Chloriti Lapis; epilepsy; amino acid neurotransmitters; hippocampus; cortex

青礞石(Chloriti Lapis)为变质岩类黑云母片岩(Biotite Schist)或绿泥石化云母碳酸盐片岩(Mica Carbonate Schist by Chloritization),是一种主要含 K、Mg、Fe、Al 等元素的硅酸盐 $[K(Mg \cdot Fe)_2(AlSi_3O_{10})(OH, F)_2]$,其中 Si、Fe、Mg、Al、Ca、K、Na 等 7 种元素为主要成分,累积贡献率达到 90.700%,此外尚含 Ti、Mn、Zn、V、Co、Sn、Ni、P 等多种元素^[1-2]。青礞石是常用矿物药之一,性甘、咸、平,归肺、心、肝经,具有坠痰下气、平肝镇惊之功效^[3],临床上常用于治疗癫痫疾病。近年来,已有文献对青礞石的成分、质量控制、炮制工艺及药理作用等方面的研究进行了系列报道^[2,4-6]。

癫痫是一种常见的神经系统疾病,癫痫的发生是由中枢神经系统兴奋与抑制间的不平衡导致的^[7]。中枢神经系统的氨基酸递质分为兴奋性与抑制性两类。其中,谷氨酸(glutamic acid, Glu)和天冬氨酸(aspartic acid, Asp)是脑部重要的兴奋性神经递质; γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA),甘氨酸(glycine, Gly)是脑部重要的抑制性神经递质^[8]。因氨基酸无紫外吸收,故多采用邻苯二醛(OPA)柱前衍生 HPLC 法结合荧光检测器或其改良法进行测定^[9-10],但该方法耗时长,且氨基酸荧光衍

生产物不稳定。超高效液相色谱-三重四极杆-线性离子阱质谱法(Qtrap-UPLC-MS/MS)测定氨基酸具有对待测物分离要求低、用量少、操作简单、且无需衍生化处理等优点。

本研究拟采用 Qtrap-UPLC-MS/MS 法测定大鼠脑组织中 4 种氨基酸类神经递质,并对神经递质含量或比例变化进行检测,以期探讨青礞石治疗癫痫的作用机制奠定基础。

1 实验部分

1.1 主要仪器与设备

Qtrap 5500 串联四极杆质谱仪:美国 AB Sciex 公司产品;LC-20AD XR 型液相色谱仪:日本 Shimadzu 公司产品;Bioprep-24 生物样品均质仪:杭州奥盛仪器公司产品;Allegra™ X-22R 型冷冻离心机:德国 BeckMan 公司产品;MDF-U32V(N)型超低温保存箱:日本 SANYO 公司产品;KQ-500 型超声仪:昆山市超声仪器有限公司产品;JE2002 型电子天平:上海浦春计量仪器有限公司产品;MS105DU 型十万分之一电子天平:梅特勒托利多仪器(上海)有限公司产品。

1.2 样品与试剂

青礞石药材(批号:20140412):由亳州矿石专

营店提供,经南京大学地球科学与工程学院孔庆友教授鉴定为黑云母片岩 Biotite Schist;卡马西平片(国药准字 H11022279);北京诺华制药有限公司产品;戊四氮(批号 1001603974), γ -氨基丁酸(GABA);美国 Sigma 公司产品;谷氨酸(Glu);Camycal 公司产品;甘氨酸(Gly)、天冬氨酸(Asp);美国 Amresco 公司产品;乙腈(质谱纯);德国 Merck 公司产品;对照品含量均不小于 99%;水为超纯水;其他试药均为市售分析纯。

1.3 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠:由上海杰思捷实验动物有限公司提供,合格证编号:2010002600592,共 90 只,体重 150~170 g。购回大鼠后,在适宜条件下适应性喂养一周,自由饮食。

1.4 动物模型的建立

PTZ 点燃癫痫大鼠模型的制备^[11-13]:用生理盐水将 PTZ 配制成 1 g/100 mL 溶液^[14],每日固定时间给大鼠腹腔注射 PTZ 溶液,剂量按亚致惊量 35.0 mg/kg^[15] 标准进行造模,持续 4 周;停药 1 周后,再用相同剂量 PTZ 测试,凡显示连续 5 次 II 级或 II 级以上惊厥的大鼠被认为达到了点燃标准^[16]。采用 Racine^[17] 标准对大鼠癫痫性发作进行分级:0 级为无抽搐发作;I 级为面部抽搐和孤立性肌痉挛;II 级为全身性痉挛抽搐;III 级为全身性痉挛呈无明显间歇的癫痫持续状态或抽搐致死;IV 级为全身性强直痉挛抽搐,伴站立和跌倒;V 级为同 IV 级反复发作呈无明显间歇的癫痫持续状态或抽搐致死。其中,大鼠若出现持续 V 级发作,需给予 1 mL 7% 水合氯醛缓解发作。

1.5 给药样品的制备

青礞石原药材样品的制备:将青礞石药材在玛瑙研钵中磨成细粉后过药典 6 号筛,用 PEG400^[18] 调匀,使每 10 mL PEG400 中含 5 g 青礞石粉。

青礞石水提液样品的制备:取青礞石药材置于煎煮容器内,第一次加入 10 倍量水,煮沸 1.5 h 后用纱布过滤,所得药液为头煎药液;向过滤后的药渣中加入 8 倍量水继续加热,煮沸 1 h 后用纱布过滤,所得药液为二煎药液;将两次煎药液合并,浓缩至每 10 mL 药液相当于 5 g 生药,即为低剂量水煎液,浓缩至每 5 mL 药液相当于 5 g 生药,即为高剂量水煎液。

青礞石药渣样品的制备:将水煎后的青礞石药渣烘干,采用与青礞石原药材相同的制备方法制得药渣样品。

阳性药卡马西平样品的制备:用生理盐水配制每 100 mL 含 2 g 卡马西平的溶液。

1.6 分组及给药

将生理盐水处理过的大鼠作为空白对照组(CG);造模成功的大鼠随机平均分为 8 组,即卡马西平组(PG)、原药材高剂量组(PH)、原药材低剂量组(PL)、药渣高剂量组(RH)、药渣低剂量组(RL)、药液高剂量组(WH)、药液低剂量组(WL)、模型对照组(MG)。按照人和动物体表面积折算等效剂量,CG、PG、PH、PL、RH、RL、WH、WL 和 MG 组分别予以 5、5、4、1、4、1、5、2.5、5 mL/kg 灌胃。连续灌胃给药 4 周,每周称量 2 次体重,并根据体重调整用药剂量。

1.7 实验条件

1.7.1 色谱条件 色谱柱:XBridge Amide (2.1 mm×50 mm×3.5 μ m);流动相:A 相为乙腈,B 相为 6 mmol/L 乙酸铵(含 0.1% 冰醋酸);梯度洗脱程序:0~3 min、98% B,3~6 min、98%~85% B,6~9 min、85%~70% B,9~12 min、70%~50% B,12~13 min、50%~98% B,13~15 min、98% B;柱温 40 $^{\circ}$ C;流速 0.8 mL/min;检测波长 254 nm;进样量 1 μ L。

1.7.2 质谱条件 Turbo Spray 离子源,ESI⁺ 电离模式,多反应监测(MRM)采集方式,离子化温度 550 $^{\circ}$ C,喷雾电压 5 500 V,雾化气(GS1)流速 55 L/min,辅助气(GS2)流速 55 L/min,气帘气流速 35 L/min。用于定量的离子分别为:Glu 母离子 m/z 148,子离子 m/z 84;Gly 母离子 m/z 76,子离子 m/z 30;Asp 母离子 m/z 134,子离子 m/z 74;GABA 母离子 m/z 104,子离子 m/z 8。

1.7.3 标准储备液的配制 取 4 种氨基酸对照品各 100 mg,精密称定,分别置于 100 mL 容量瓶中,用纯水溶解并稀释至刻度,得 4 种氨基酸标准品储备液。

1.7.4 标准曲线及线性范围 取不同体积的各氨基酸标准储备液,用超纯水稀释并定容至 10 mL 容量瓶中,得一系列浓度梯度的混合对照品溶液,详情列于表 1。以峰面积 y 对浓度 x (mg/L) 进行线性回归,结果列于表 2。

表 1 不同浓度梯度的氨基酸标准品在 10 mL 容量瓶中的加入量

Table 1 Amount of different concentrations of amino acid standards added into 10 mL volumetric flask

标准品	加入量/ μL								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
谷氨酸	1500	1000	800	600	400	200	150	120	100
甘氨酸	600	500	400	300	200	100	50	20	10
天冬氨酸	1500	1000	800	600	400	200	150	120	100
γ -氨基丁酸	1500	1000	800	600	400	200	150	120	100

表 2 各种氨基酸的标准曲线及线性范围

Table 2 Standard curves and linear ranges of amino acid

氨基酸	标准曲线	线性范围/(mg/L)	最低检测限/(mg/L)	相关系数 r
谷氨酸	$y=9.35 \times 10^5 x - 3.67 \times 10^5$	10~150	0.06	0.9991
甘氨酸	$y=7.17 \times 10^4 x - 2.42 \times 10^4$	1~60	0.21	0.9996
天冬氨酸	$y=2.93 \times 10^5 x - 1.71 \times 10^6$	10~150	0.57	0.9995
γ -氨基丁酸	$y=8.1 \times 10^5 x + 4.69 \times 10^6$	10~150	0.16	0.9947

1.7.5 海马、皮层样品的处理 大鼠冰上断头取脑,分离皮层及海马,在冷生理盐水(4℃)中洗去血液,用滤纸吸干水分,称其质量;按料液比 1:9 加入 0.4 mol/L 高氯酸沉淀蛋白,匀浆机匀浆,彻底混匀组织液;以 12 000 r/min 低温离心 15 min,取上清液,于 -80℃ 冰箱保存,待测。测定前用稀氨水调至 pH 中性,过 0.45 μm 微孔滤膜。

2 结果与讨论

2.1 方法学考察

2.1.1 专属性实验 精密量取 1.7.3 节配制的标准品储备液适量,制成适当浓度的混标溶液,在 1.7.1 和 1.7.2 节条件下检测,并与脑组织样本的色谱图进行比较,结果示于图 1。可见,各色谱峰的保留时间在 7~8 min 之间,无杂质干扰,峰型良好。

2.1.2 精密度实验 日内精密度:取同一混合对照品溶液,于同一天不同时间段每隔 2 h 进样 1 次,连续进样 6 次,计算得 Glu、Asp、Gly 和 GABA 峰面积的 RSD 分别为 3.29%、3.25%、2.88%、2.41%。

日间精密度:取同一混合对照品溶液,于第 1、2、3、4、5 天分别进样,计算得 Glu、Asp、Glyp

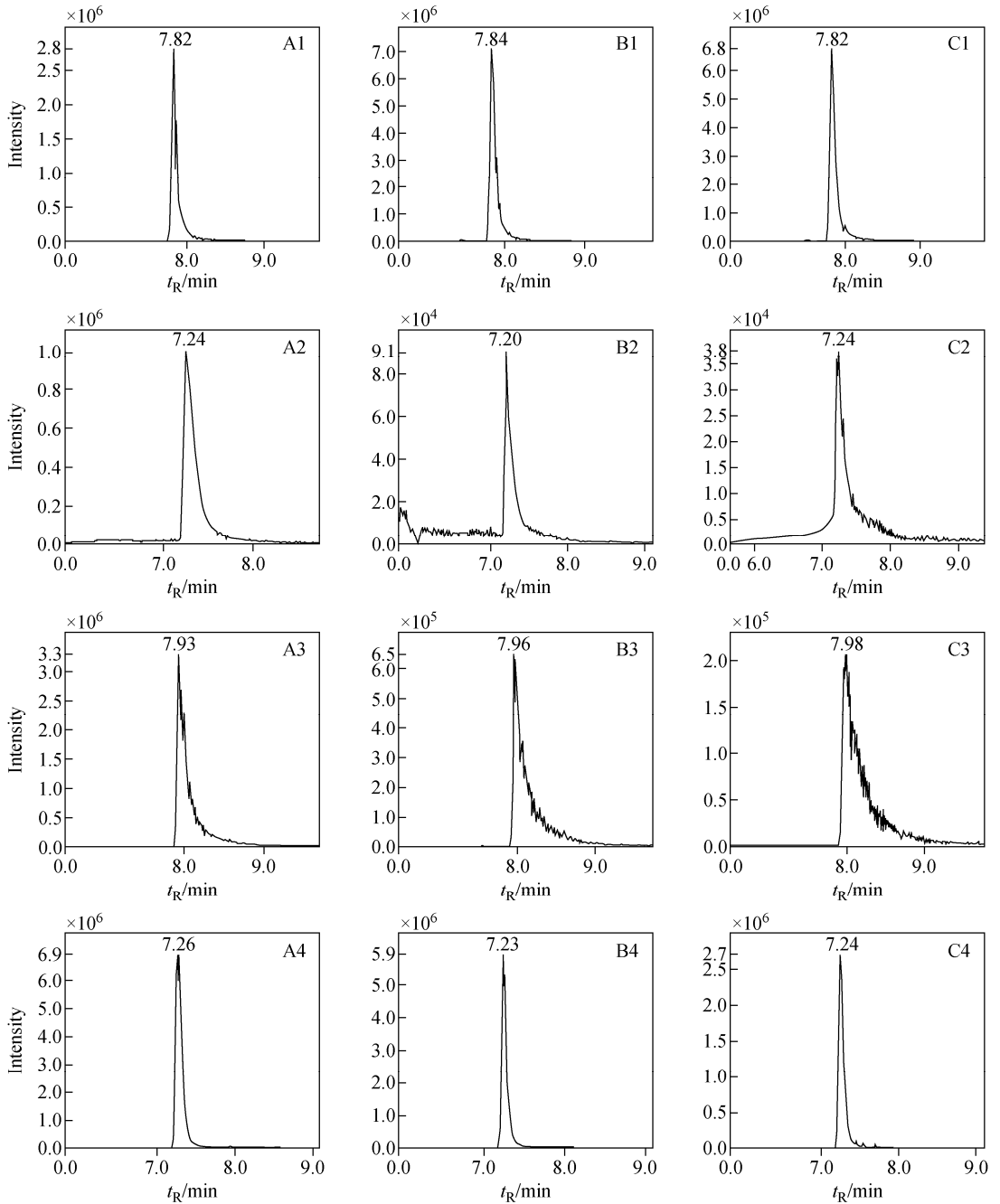
和 GABA 峰面积的 RSD 分别为 3.19%、2.63%、3.04%、2.25%。

2.1.3 准确度实验 取同一组织匀浆,按 1.7.5 节条件处理脑样品,平行制备 5 份样品,进行 LC-MS/MS 分析,计算得皮层样品和海马样品的 Glu、Asp、Gly、GABA 峰面积的 RSD 分别为 1.47%、1.61%、3.47%、2.39% 和 4.36%、1.87%、2.11%、3.14%,均符合生物样品的分析要求。

2.1.4 稳定性实验 取 2.1.2 节配制的同一混合对照品溶液,于 4℃ 保存,分别在 0、6、12、24 h 进样分析。结果表明,在 4℃ 条件下,样品在 24 h 内稳定性较好。取 1.7.5 节的皮层及海马样品各 3 份,于 -80℃ 保存,每 3 周测定 1 份,比较各种氨基酸在不同时间点的含量变化。结果表明,保存于 -80℃ 的样品较稳定,在 2 个月内无明显降解。

2.2 数据处理与分析

2.2.1 分析方法 采用 SPSS18.0 软件进行数据处理,用线性回归方法分别计算氨基酸类神经递质(Glu、Asp、Gly、GABA)所对应的回归方程,并计算各氨基酸含量。所有指标结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示所测数据的差异有显著统计学意义, $P < 0.01$ 表示有非常显著统计学意义。



注:A. 对照品;B. 皮层样品;C. 海马样品;1. Glu;2. Gly;3. Asp;4. GABA

图1 4种氨基酸对照品与脑样品的LC-MS/MS图

Fig. 1 LC-MS/MS spectra of four amino acids in references and brain samples

2.2.2 测定结果 在皮层中,与MG组比较,其他各组Gly含量占总氨基酸含量的比例明显升高,其中CG和PG组具有极显著性差异($P < 0.01$),RH、RL组具有显著性差异($P < 0.05$);Asp/Gly含量明显降低,其中CG、PG及PH组具有极显著性差异($P < 0.01$),RL、WH和WL组具有显著性差异($P < 0.05$);

Glu/Gly含量明显降低,其中CG、PG、RH和RL组具有极显著性差异($P < 0.01$),WH组具有显著性差异($P < 0.05$);PH和PL组具有明显的量效关系,结果列于表3。

在海马中,与MG组比较,其他各组Glu浓度均降低,其中RH、RL、WH和WL组具有极显著性差异($P < 0.01$);Asp浓度均降低,其中

PG 组具有极显著差异 ($P < 0.01$), CG、PH、RH 和 RL 具有显著性差异 ($P < 0.05$); Gly 浓度均降低, 其中 CG、PG、PH 和 RL 组具有极显著差异 ($P < 0.01$), RH 和 WH 组具有显著性差异 ($P < 0.05$); GABA 浓度均降低, 其中 CG、

PG、PH、PL、RH、RL 和 WL 组具有极显著差异 ($P < 0.01$), WH 组具有显著性差异 ($P < 0.05$); PH 组对 Asp、Gly、GABA 的干预作用最强; PH 和 PL 组具有明显的量效关系, 结果列于表 4。

表 3 皮层中, Gly、Asp/Gly 和 Glu/Gly 水平 ($\bar{x} \pm s, n \geq 7$)
Table 3 Levels of Gly, Asp/Gly and Glu/Gly in cortex ($\bar{x} \pm s, n \geq 7$)

组别	甘氨酸 [#]	天冬氨酸/甘氨酸	谷氨酸/甘氨酸
空白组 CG	0.0727 ± 0.0055 **	3.7595 ± 0.4798 **	5.4003 ± 0.8385 **
卡马西平组 PG	0.0627 ± 0.0037 **	4.1668 ± 0.3551 **	6.6856 ± 0.6391 **
青礞石原药高剂量组 PH	0.0590 ± 0.0089	4.1784 ± 0.8064 **	7.9020 ± 1.0482
青礞石原药低剂量组 PL	0.0542 ± 0.0094	4.8574 ± 0.7400	8.3011 ± 1.1338
青礞石药渣高剂量组 RH	0.0613 ± 0.0070 *	4.5565 ± 0.4360	7.1658 ± 1.3483 **
青礞石药渣低剂量组 RL	0.0617 ± 0.0056 *	4.3183 ± 0.5113 *	7.1944 ± 0.7316 **
青礞石水煎液高剂量组 WH	0.0551 ± 0.0145	4.3282 ± 0.5187 *	7.6605 ± 1.6127 *
青礞石水煎液低剂量组 WL	0.0570 ± 0.0060	4.4748 ± 0.6167 *	8.0853 ± 1.6001
模型组 MG	0.0515 ± 0.0116	5.2462 ± 1.4018	9.4059 ± 3.2937

注: # 表示 Gly 占氨基酸总含量的百分比; * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$

表 4 海马中, Glu、Asp、Gly 及 GABA 含量 ($\bar{x} \pm s, \text{mg/L}, n \geq 7$)
Table 4 Contents of Glu, Asp, Gly and GABA in hippocampus ($\bar{x} \pm s, \text{mg/L}, n \geq 7$)

组别	谷氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	γ -氨基丁酸
空白组 CG	1336 ± 206	314 ± 42 *	119 ± 17 **	323 ± 88 **
卡马西平组 PG	1339 ± 117	269 ± 74 **	127 ± 19 **	322 ± 92 **
青礞石粉末高剂量组 PH	1303 ± 191	297 ± 57 *	114 ± 12 **	305 ± 116 **
青礞石粉末低剂量组 PL	1319 ± 94	359 ± 95	164 ± 21	427 ± 112 **
青礞石药渣高剂量组 RH	1127 ± 270 **	302 ± 38 *	155 ± 21 *	413 ± 114 **
青礞石药渣低剂量组 RL	1150 ± 177 **	304 ± 47 *	125 ± 23 **	334 ± 92 **
青礞石水煎液高剂量组 WH	1155 ± 111 **	329 ± 72	159 ± 16 *	453 ± 68 *
青礞石水煎液低剂量组 WL	1144 ± 363 **	325 ± 109	164 ± 45	428 ± 134 **
模型组 MG	1468 ± 194	394 ± 62	184 ± 27	596 ± 171

注: * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$

2.3 讨论

2.3.1 供试品制备方法的优化 选取甲醇、乙腈、高氯酸这 3 种蛋白沉淀剂进行比较, 结果表明, 高氯酸的沉淀能力较强。实验对匀浆浓度 (1:4、1:9 和 1:19) 进行了比较, 结果显示, 在 1:9 时响应值最好, 但色谱峰有分岔现象。考虑到可能由于高氯酸的酸性过强, 因此采用

稀氨水调至 pH 中性, 最终获得了理想的峰型。

2.3.2 色谱-质谱条件的优化 XBridge Amide 分析柱可用于极性物质的保留分析, 耐受性较好, 可取代硅胶氨基柱, 能从根本上解决氨基键合硅胶柱不耐高 pH 值和键合相流失严重的问题, 其性能大大优于传统的硅胶基质氨基柱, 且 3.5 μm 粒径能提升柱效与分辨率。实验选择

了信噪比较低的正离子模式,同时对质谱参数中的母离子、子离子进行摸索,对裂解能量和碰撞能量进行优化。

2.3.3 给药样品的选择 为了考察不同给药样品的有效性和临床上水煎后废弃的药渣是否仍具有药效,以充分利用青礞石资源,本实验设有粉末组、水煎液组及药渣组。若粉末组最有效,水煎液组次之,药渣组效果最不明显,则说明青礞石的有效成分可通过水煎液煎出;若粉末组最有效,药渣组次之,水煎液组效果最不明显,则说明青礞石的有效成分不可通过水煎液煎出。

2.3.4 实验结果分析 GABA 通过 Glu 脱羧而成,经 GABA 转运体转运至胞内而降解;Gly 主要分布于中间神经元,在中枢神经系统的某些区域,Gly 与 GABA 呈同步性释放;而 Asp 与 Glu 同为兴奋性神经递质。文献^[19-20]报道了通过 Glu/GABA 值及 Glu/Gly 值考察兴奋性与抑制性神经递质在脑内的平衡关系,但鲜有 Asp/Gly 值的报道。本实验中,青礞石能够降低癫痫大鼠海马中兴奋性氨基酸递质 Glu 和 Asp 的含量,各组样品均能提高癫痫大鼠皮层抑制性神经递质 Gly 的比例,降低 Asp/Gly 值和 Glu/Gly 值。兴奋性氨基酸含量的降低,说明青礞石可以通过降低脑内兴奋性神经递质的毒性作用^[21]来保护神经元,从而抑制癫痫发作。对于皮层中 Gly 含量升高、海马中 Gly 和 GABA 含量降低的现象,可能有以下原因:1)虽然 Gly 通常被认为是抑制性神经递质^[22-24],但也有文献^[25-26]认为它是兴奋性神经递质,由此猜想,Gly 在皮层中可能作为抑制性神经递质,而在海马中却作为兴奋性神经递质存在;2) Gly 在皮层和海马中给药后的含量变化相反,这可能与皮层和海马的不同功能定位有关^[27];3)青礞石降低了癫痫大鼠海马 GABA 的含量,可能与癫痫发生后的体内代偿反应有关,这一现象与文献^[28-29]的结果一致。

3 结论

本研究建立了 Qtrap-UPLC-MS/MS 同时测定 4 种氨基酸神经递质的方法,分析了青礞石对戊四氮点燃癫痫大鼠脑组织(海马、皮层)中氨基酸递质含量的影响。结果表明:青礞石

药材组、药液组及药渣组对抑制癫痫均有效。由此推测:青礞石抗癫痫作用机制是在降低兴奋性神经递质含量的同时,又提高了抑制性神经递质在脑内的含量。通过减少兴奋性神经递质对神经组织的兴奋毒性作用,维持了脑内兴奋性与抑制性氨基酸之间的平衡关系,抑制了异常放电,从而达到抗癫痫的作用。本研究可为矿物药青礞石治疗癫痫疾病的作用机制提供参考。

参考文献:

- [1] 刘圣金,吴德康,刘训红,等. 青礞石的本草考证及现代研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 260-263.
LIU Shengjin, WU Dekang, LIU Xunhong, et al. Textual research and modern study on Chinese mineral drug Chloriti Lapis[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(12): 260-263(in Chinese).
- [2] 刘圣金,吴德康,林瑞超,等. 矿物药青礞石无机元素的 ICP-MS 分析[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(11): 2 067-2 074.
LIU Shengjin, WU Dekang, LIN Ruichao, et al. ICP-MS analytical studies on inorganic elements of mineral Chinese medicine Chloriti Lapis[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2010, 30(11): 2 067-2 074(in Chinese).
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015.
- [4] 刘圣金,吴德康,林瑞超,等. 青礞石的炮制工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1 508-1 513.
LIU Shengjin, WU Dekang, LIN Ruichao, et al. Studies on processing technology of Chloriti Lapis[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(8): 1 508-1 513(in Chinese).
- [5] 刘圣金,吴德康,刘训红,等. 青礞石的药理作用及临床研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(10): 109-112.
LIU Shengjin, WU Dekang, LIU Xunhong, et al. Progress on pharmacological effects and clinical research of Chloriti Lapis[J]. Chinese Journal of Informaton on Traditional Chinese Medicine, 2010, 17(10): 109-112(in Chinese).
- [6] 刘圣金,吴德康,林瑞超,等. 青礞石药材质量标准研究[J]. 中药材, 2011, 34(10): 1 532-1 534.
LIU Shengjin, WU Dekang, LIN Ruichao, et al.

- Quality standards of Chloriti Lapis[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2011, 34 (10): 1 532-1 534(in Chinese).
- [7] YU Y H, XIE W, WANG C J. Chaihushugan decoction exerts antiepileptic effects by increasing hippocampal glutamate metabolism in pentylene-tetrazole-kindled rats[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 35(6): 659-665.
- [8] 陈燕,王有志,安春志,等. LC-ESI-MS/MS测定大鼠海马和纹状体中氨基酸类神经递质的含量[J]. 今日药学,2013,23(2):65-69.
CHEN Yan, WANG Youzhi, AN Chunzhi, et al. Simultaneous determination of neurotransmitter amino acids in rat hippocampus and corpus striatum by LC-ESI-MS/MS[J]. Pharmacy Today, 2013, 23(2): 65-69(in Chinese).
- [9] 俞军龄,陈再兴,毛小元,等. HPLC法测定 tremor 大鼠脑组织中谷氨酸和 GABA 含量[J]. 中国药理学通报,2009,25(11):1 530-1 533.
YU Junling, CHEN Zaixing, MAO Xiaoyuan, et al. Determination of glutamate and GABA in tremor rat by HPLC[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2009, 25(11): 1 530-1 533(in Chinese).
- [10] 吴强恩,郑力行,谢芳,等. 反相高效液相色谱荧光法测定大鼠脑组织中氨基酸类神经递质[J]. 复旦学报:医学版,2005,32(3):355-358.
WU Qiang'en, ZHENG Lixing, XIE Fang, et al. Determination of the amino acids in rat brain by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection [J]. Fudan University Journal Medical Sciences, 2005, 32(3): 355-358 (in Chinese).
- [11] 孟喜君,王峰,李传坤. 白藜芦醇对戊四氮致痫大鼠的学习记忆能力的影响[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2013,12(3):227-231.
MENG Xijun, WANG Feng, LI Chuankun. Effects of resveratrol on learning and memory ability of pentylene-tetrazole-kindled rats[J]. Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research, 2013, 12(3): 227-231(in Chinese).
- [12] 徐国龙,杨帆,章复清,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对 PTZ 点燃型癫痫大鼠脑内氨基酸含量的影响[J]. 中国医药学报,2002,17(3):165-167.
XU Guolong, YANG Fan, ZHANG Fuqing, et al. Effect of Chaihu Plus Longgumuli Decoction on the brain amino-acid amount of PTZ-ignited epileptic rat [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2002, 17(3): 165-167(in Chinese).
- [13] 王艺,李智平,施忆贇. 戊四氮点燃大鼠慢性癫痫模型的建立及评价[J]. 复旦学报:医学版,2006,33(2):206-208,228.
WANG Yi, LI Zhiping, SHI Yiyun. The establishment and appraisal of pentylene-tetrazole-induced kindling in rats [J]. Fudan University Journal Medical Sciences, 2006, 33 (2): 206-208, 228(in Chinese).
- [14] LI Z P, ZHANG X Y, LU X, et al. Dynamic release of amino acid transmitters induced by valproate in PTZ-kindled epileptic rat hippocampus [J]. Neurochemistry International, 2004, 44 (4): 263-270.
- [15] AKSOY D, SOLMAZ V, ERBAS O. Positive effect of calcitonin on the seizures induced by pentylene-tetrazole in rats[J]. Epilepsy Research, 2014, 108(3): 390-395.
- [16] 慕宝龙,田茸,舍雅莉,等. 平痫颗粒对癫痫大鼠海马神经元细胞凋亡及基因表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(6):35-37.
MU Baolong, TIAN Rong, SHE Yali, et al. Effects of Pingxian particle on cell apoptosis of hippocampal neurons and its gene expression in epileptic rat model[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2012, 19(6): 35-37(in Chinese).
- [17] SAHU S, DUTTA G, MANDAL N, et al. Anticonvulsant effect of *Marsilea quadrifolia* Linn. on pentylene-tetrazole induced seizure: A behavioral and EEG study in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 141(1): 537-541.
- [18] 韩琳,汤道权,印晓星,等. α -细辛脑的抗惊厥、抗癫痫作用及其机制研究[J]. 中国药理学通报,2009,25(7):963-966.
HAN Lin, TANG Daoquan, YIN Xiaoxing, et al. Research oil anticonvulsive and antiepileptic effect of alpha-asarone and its mechanism [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2009, 25(7): 963-966(in Chinese).
- [19] 白宝丰,王斌,张蕴琨. 力竭运动前后大鼠脑皮质运动区递质性氨基酸含量的动态变化[J]. 南京体育学院学报:自然科学版,2008,7(3):1-5.
BAI Baofeng, WANG Bin, ZHANG Yunkun. Changes of amino acids neurotransmitter concentration in motor area of rats cortex induced by

- acute exhaustion treadmill running[J]. Journal of Nanjing Institute of Physical Education; Natural Science, 2008, 7(3): 1-5(in Chinese).
- [20] 李敏,孔德虎,许奇,等. 颞叶癫痫大鼠不同时期海马和皮层氨基酸类递质的变化[J]. 安徽医科大学学报,2010,45(2):135-138.
- LI Min, KONG Dehu, XU Qi, et al. Changes of amino acid neurotransmitters in temporal lobe epilepsy rats' hippocampus and cortex during different periods [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2010, 45(2): 135-138(in Chinese).
- [21] PATSOUKIS N, ZERVOUDAKIS G, GEORGIOU C D, et al. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on thiol redox state in the mouse cerebral cortex [J]. Epilepsy Research, 2004, 62(1): 65-74.
- [22] 唐洪梅,席萍,吴敏,等. 石菖蒲对小鼠脑组织氨基酸类神经递质的影响[J]. 中药新药与临床药理,2004,15(5):310-311.
- TANG Hongmei, XI Ping, WU Min, et al. Effects of *Rhizoma Acori Tatarinowii* on amino acids neurotransmitter in mice brain[J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2004, 15(5): 310-311(in Chinese).
- [23] 周磊,杨文明,孙林娟. 智脑胶囊对实验性阿尔茨海默病模型大鼠脑组织氨基酸含量的影响[J]. 中医药临床杂志,2010,22(11):1 007-1 009.
- ZHOU Lei, YANG Wenming, SUN Linjuan. Effects of Zhinao capsule on amino acid content of Alzheimer's disease rat brain[J]. Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 22(11): 1 007-1 009(in Chinese).
- [24] 王净净,黄雁,何群,等. 愈痫灵对慢性致病大鼠海马区氨基酸含量的影响[J]. 湖南中医学院学报,2004,24(6):8-11.
- WANG Jingjing, HUANG Yan, HE Qun, et al. The effects of Yuxianling Granule on the content of amino acid in hippocampus of rats with chronic epilepsy induced by pentylenetetrazol injection [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan, 2004, 24(6): 8-11(in Chinese).
- nese).
- [25] 梁树立,李安民,黎君友,等. X线照射对实验性癫痫大鼠脑皮层氨基酸递质含量的影响[J]. 解放军医学杂志,2005,30(5):408-409.
- LIANG Shuli, LI Anmin, LI Junyou, et al. Effect of X-ray on amino acid transmitters in brain of epileptic rat[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2005, 30(5): 408-409(in Chinese).
- [26] 谭来勋,孙圣刚,王细林,等. 发育期大鼠海马氨基酸类神经递质的研究[J]. 卒中与神经疾病,2005,(2):100-102.
- TAN Laixun, SUN Shenggang, WANG Xilin, et al. The amino acid neurotransmitters of the hippocampus in rats[J]. Stroke and Nervous Disease, 2005, (2): 100-102(in Chinese).
- [27] 方若鸣,方更利,柯雪红,等. 安脑片对慢性点燃癫痫大鼠脑内氨基酸递质的影响[J]. 中华中医药学刊,2007,25(11):2 388-2 390.
- FANG Ruoming, FANG Gengli, KE Xuehong, et al. Effects of Annao tablet on amino acid neurotransmitter in kindling epilepsy rats brain[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2007, 25(11): 2 388-2 390(in Chinese).
- [28] 班婷婷,吴强恩,姜楠,等. 乐果急性染毒对大鼠海马抑制性氨基酸神经递质的影响[J]. 复旦学报:医学版,2007,34(1):12-16.
- BAN Tingting, WU Qiang'en, JIANG Nan, et al. Acute effects of dimethoate on inhibitory amino acid neurotransmitters in rat hippocampus [J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2007, 34(1): 12-16(in Chinese).
- [29] 方永奇,方若鸣,方更利,等. β -细辛醚对癫痫大鼠脑皮质 Glu、GABA、GAD 的影响[J]. 中国药房,2007,18(27):2 097-2 098.
- FANG Yongqi, FANG Ruoming, FANG Gengli, et al. Effects of β -Asarone on glutamic acid, gamma-aminobutyric acid, glutamate decarboxylase in epileptic rats brain cortex[J]. China Pharmacy, 2007, 18(27): 2 097-2 098(in Chinese).