

CCI 损伤后,培养液中的 ALT 和 AST 活性显著升高,细胞增殖活性明显降低,FACS 明显降低肝细胞 ALT 和 AST 活性,显著促进肝细胞增殖,具有促进体外培养肝细胞生长的作用,从细胞水平证实了 FACS 对肝细胞的保护作用。

References:

[1] Liu C Y, Gu Z L. The chemical constituents and pharmacological effects of *Astragalus complanatus* R. Br. [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2002, 21(2): 1-3.

[2] Liu C Y, Gu Z L, Han R, et al. Protective effect of extract in seed of *Astragalus complanatus* on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(12): 1104-1106.
 [3] Xia Z Q, Dong C, Lu S G. Method of liver perfusion for separating rat hepatocytes and primary culture [J]. *Acta Acad Med Xuzhou* (徐州医学院学报), 1999, 19(6): 458-459.
 [4] Li Y H, Wu C Z, Que L L. Danshensu for enhancing hepatocyte growth and its protective effect on drug-induced liver cell injury [J]. *Acta Acad Med Nanjing* (南京医科大学学报), 1996, 16(4): 346-348.

麻黄汤对大鼠大脑额叶皮层氨基酸类神经递质水平的影响

魏凤环,罗佳波*,谭晓梅,贺 丰

(南方医科大学 中医药学院,广东 广州 510515)

摘要:目的 研究麻黄汤(HED)对大鼠额叶皮层中天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)和γ-氨基丁酸(GABA)等氨基酸类神经递质水平的影响,及其量效和时效关系。方法 2,4-二硝基氟苯为衍生化试剂,HPLC-UV 法测定大鼠额叶皮层中氨基酸水平。结果 给药 5 d,HED 15、18 g/kg 剂量组 Asp、Glu 和 GABA 水平与空白对照组相比有显著性升高,Gly 无显著性改变。4 种氨基酸均在 ig 5 d 时,与空白对照组相比有显著性升高。结论 HED 显著升高了大鼠额叶皮层中氨基酸水平,并呈现一定的量效、时效关系。在试验剂量范围内 15 g/kg 是较敏感的剂量;给药 5 d 是最佳时间。

关键词:麻黄汤;氨基酸;量效关系

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)12-1841-04

Effect of *Herba Ephedrae* Decoction on levels of amino acid neurotransmitters in prefrontal cortex of rats

WEI Feng-huan, LUO Jia-bo, TAN Xiao-mei, HE Feng

(School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Key words: *Herba Ephedrae* Decoction (HED); amino acid; dose-effect relationship

麻黄汤(*Herba Ephedrae* Decoction, HED)由麻黄配伍桂枝、杏仁、炙甘草组成。具有发汗解表、宣肺平喘的功效。现代研究表明,麻黄中的主要活性成分左旋麻黄碱和右旋伪麻黄碱具有增强小鼠自主活动、升高动脉血压、增加心率、导致神经变性等不良反应^[1~4],在临床应用中体现的是产生失眠、震颤、心悸等。有学者认为麻黄碱致神经变性的原因,可能与谷氨酸(glutamic acid, Glu)的过量释放有关^[1]。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, GABA)及甘氨酸(glycin, Gly)是脑部重要的抑制性神经递质。本实验根据 HED 中主要成分所产

生的上述中枢神经系统的不良反应,及脑组织中氨基酸类神经递质的性能,研究了 HED 对大鼠大脑皮质额叶中氨基酸水平的影响。

1 材料

1.1 动物与试药:SPF 级 Wistar 大鼠,体重为(215±15)g,雌雄兼用,由南方医科大学实验动物中心提供。麻黄汤参考文献方法制备^[5],浓缩至含麻黄生药 1.5 g/mL,作为麻黄汤储备液。氨基酸对照品均购自 Sigma 公司;2,4-二硝基氟苯(DNFB,日本);乙腈、甲醇为色谱纯(Merck,德国);醋酸钠、冰醋酸等试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器:HP-1100 高效液相色谱仪(美国安捷

收稿日期:2005-02-12

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(30030150)

作者简介:魏凤环(1976-),女,山东人,博士生,研究方向为方剂配伍规律及中药新药的研究开发。E-mail: awag8486@sohu.com

* 通讯作者 罗佳波 Tel: (020) 61648266 E-mail: ljb@fimmu.com

伦), ODS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 10 μm, 中国科学院大连化学物理研究所), UV 检测器; Sonicator XL2020 细胞超声粉碎仪 (美国); Beckman J 221 低温高速离心机 (美国); 410A 型 pH 计 (美国 ORION); Denver AB250D 分析天平 (美国); Eppendorf 定量移液器 (德国)。

2 方法与结果

2.1 HED 对大鼠额叶皮层氨基酸水平影响的量效关系: 取大鼠 42 只, 雌雄各半, 随机分为 7 组, 每组 6 只。给药组剂量以麻黄生药计分别是 6、9、12、15、18、24 g/kg (按 16 mL/kg 分别稀释麻黄汤储备液), ig 给药, 对照组 ig 等体积水。连续给药 5 d, 在末次给药 1 h 后, 处死动物, 快速断头, 在冰台上快速剥离脑, 取两侧额叶并快速称重, 迅速放于冰箱 -20 °C 保存。

2.2 HED 对大鼠额叶皮层氨基酸水平影响的时效关系: 取大鼠 48 只, 雌雄各半, 随机分为 8 组, 每组 6 只。由量效关系试验结果选取在该剂量范围内最佳剂量, 分别 ig 给药 1、3、5、7、9 d, 同时分别设有对照组, ig 等体积水, 于末次给药 1 h 后处死动物, 同上法操作。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取 Asp 6.38 mg、Glu 17.64 mg、Gly 2.40 mg、GABA 4.94 mg, 置 10 mL 量瓶中, 0.1 mmol/L 盐酸稀释至刻度, 即得混合对照品储备液。

2.4 样品溶液的制备: 取大鼠大脑额叶样品, 加 0.1 mmol/L 稀盐酸 (1:5), 超声粉碎 (温度: 4 °C; 间隔: 运行 2 s、停 5 s; 强度: 20%, 共 15 次)。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 200 μL, 加入 0.1 mol/L NaHCO₃ 100 μL 和 2,4-二硝基氟苯衍生试剂 20 μL, 涡旋混匀, 置 60 °C 水浴 60 min, 加入 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液稀释至 1 mL^[6], 混合后 12 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 待测。

2.5 色谱条件: 色谱柱 ODS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 10 μm), 流动相: 乙睛 (A) 和 0.1 mol/L 醋酸钠 (冰醋酸调 pH 6.40) (B), 梯度洗脱 (表 1), 波长 360 nm, 柱温 21 °C, 进样量 5 μL, 运行 26 min。

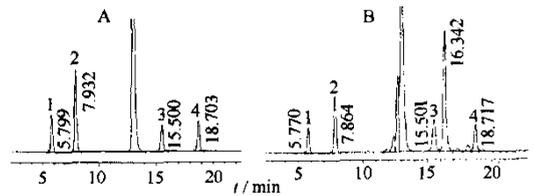
2.6 标准曲线的制备: 取混合对照品储备液逐次稀释, 分别得 Asp: 0.06、0.12、0.24、0.48、0.96 μmol/mL; Glu: 0.15、0.30、0.60、1.20、2.40 μmol/mL; Gly: 0.04、0.08、0.16、0.32、0.64 μmol/mL; GABA: 0.06、0.12、0.24、0.48、0.96 μmol/mL 的系列对照品溶液。依次取 200 μL 对照品溶液, 其余

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Conditions of gradient elution

时间/min	A/%	B/%	体积流量/(mL · min ⁻¹)
0	10	90	0.8
12	25	75	0.8
13	10	90	0.6
18	10	90	0.6
19	80	20	0.8
20	80	20	0.8
24	10	90	0.8

同 2.4 项: “加入 0.1 mol/L NaHCO₃ 100 μL……用 0.45 μm 滤膜滤过” 操作, 按照 2.5 项色谱条件测定, 色谱图见图 1。以浓度 (X) 对应峰面积 (Y) 进行回归, 分别得如下线性关系。Asp: Y = 1 317.8 X + 16.792 (r = 0.999 4), 线性范围: 0.06 ~ 0.96 μmol/mL; Glu: Y = 1 244.8 X + 18.5 (r = 0.999 8), 线性范围: 0.15 ~ 2.40 μmol/mL; Gly: Y = 1 934.7 X + 0.583 3 (r = 0.999 9), 线性范围: 0.04 ~ 0.64 μmol/mL; GABA: Y = 1 205.3 X + 23.833 (r = 0.999 2), 线性范围: 0.06 ~ 0.96 μmol/mL。



A-对照品 B-样品 1-Asp 2-Glu 3-Gly 4-GABA
A-reference substances B-sample
1-Asp 2-Glu 3-Gly 4-GABA

图 1 Asp、Glu、Gly、GABA 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Asp, Glu, Gly, and GABA

2.7 加样回收率试验: 把对照组剩余的匀浆液混匀, 取出 9 份, 每份 200 μL, 分成 3 组, 分别加高、中、低 3 种质量浓度的混合对照品液各 20 μL。按照 2.4 项下“加入 0.1 mol/L NaHCO₃ 100 μL……用 0.45 μm 滤膜滤过”操作, 按照 2.5 项下色谱条件测定。结果低、中、高 3 种质量浓度的回收率 Asp: 92.7% ~ 99.8%, RSD = 3.46%; Glu: 90.5% ~ 102.6%, RSD = 2.59%; Gly: 89.3% ~ 96.5%, RSD = 3.79%; GABA: 94.7% ~ 106.7%, RSD = 3.79%。

2.8 精密度试验: 取对照组样品一份, 12 h 内连续测定 4 次, 采用标准曲线法测定浓度, 得氨基酸样品的日内 RSD, Asp: RSD = 1.58%; Glu: RSD = 2.68%; Gly: RSD = 1.23%; GABA: RSD = 2.03%。取对照组样品一份, 72 h 内连续测定 4 次, 用随行标准曲线进行分析, 得氨基酸样品的日间

RSD。Asp: RSD=3.08%; Glu: RSD=4.05%; Gly: RSD=3.13%; GABA: RSD=2.03%。

2.9 重现性试验:将各组剩余匀浆液上清液混合,取出 5 份,分别按照样品处理方法进行处理、分析。测得各氨基酸浓度,Asp: 6.23 μmol/mL, RSD=2.04%; Glu: 15.60 μmol/mL, RSD=1.64%; Gly: 7.34 μmol/mL, RSD=1.64%; GABA: 7.46 μmol/mL, RSD=3.08%。

2.10 样品测定:将 2.1 项和 2.2 项得到的匀浆样

品按照 2.4 项方法处理,按照 2.5 项色谱条件测定,色谱图见图 1。

量效结果表明,将相邻剂量组结果分别进行 *t* 检验,其中 15 g/kg 剂量组与相邻的两个剂量组 12、18 g/kg 均有统计学差别 ($P<0.05$),提示该剂量范围是导致 Asp、Glu 水平变化较大的给药区间,说明 15 g/kg 是使兴奋性氨基酸水平变化较敏感的剂量组,为进一步开展时效试验提供了最佳给药剂量。见表 2。

表 2 HED 不同给药剂量对氨基酸类神经递质的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effects of HED in different doses on amino acid neurotransmitters ($\bar{x}\pm s, n=6$)

剂量/(g·kg ⁻¹)	Asp/(μmol·g ⁻¹)	Glu/(μmol·g ⁻¹)	Gly/(μmol·g ⁻¹)	GABA/(μmol·g ⁻¹)
0	5.79±0.65	16.22±0.94	7.29±0.29	7.57±0.49
6	6.64±0.49	17.33±1.68*	7.94±0.51	9.56±0.82
9	4.82±0.45 [△] *	15.70±0.92*	7.36±0.33	6.93±0.76
12	5.54±0.56*	17.30±1.31*	7.62±0.54	7.65±0.92*
15	6.80±0.82 [△]	20.07±3.11 [△]	8.39±1.10	9.34±1.64 [△] *
18	7.73±1.43 [△] *	24.07±2.55 [△] *	8.27±0.49	10.06±1.11
24	5.78±0.91*	21.21±2.55 [△]	7.92±0.78	9.02±1.24

与 HED 0 g/kg 组 (对照) 比较: $\Delta P<0.05$; 与 HED 15 g/kg 组比较: * $P<0.05$

$\Delta P<0.05$ vs HED 0 g/kg group; * $P<0.05$ vs HED 15 g/kg group

时效实验结果表明,给药后 5 d 时,给药组 Asp 水平与空白对照组相比有显著性升高 ($P<0.05$),且给药后 5 d 的 Asp 水平显著高于给药后 1、3 d 的

水平 ($P<0.05$),而与 7、9 d 的水平相比差异不显著 ($P<0.05$),所以推测给药 5 d 时,已使大鼠额叶 Asp 的水平达到较高点。见表 3。

表 3 HED 不同给药时间对氨基酸类神经递质的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effects of HED at different administration time on amino acid neurotransmitters ($\bar{x}\pm s, n=6$)

给药时间 /d	组别	兴奋性氨基酸		抑制性氨基酸	
		Asp/(μmol·g ⁻¹)	Glu/(μmol·g ⁻¹)	Gly/(μmol·g ⁻¹)	GABA/(μmol·g ⁻¹)
1	对照	4.59±0.34	16.23±1.69	6.63±0.36	6.11±0.47
	HED	5.22±0.65*	20.46±1.82 [△]	7.67±0.60 [△]	8.02±1.00 [△]
3	对照	5.41±0.27	17.81±1.91	7.12±0.51	6.69±0.70
	HED	5.56±0.55*	19.58±1.29*	7.92±0.36 [△]	8.13±0.81 [△]
5	对照	5.79±0.65	16.22±0.94	7.29±0.29	7.57±0.49
	HED	6.80±0.82 [△]	20.91±3.11 [△]	8.39±1.10 [△]	9.34±1.64 [△]
7	对照	5.90±0.63	18.96±0.93	7.69±0.31	7.52±0.60
	HED	6.19±0.65	21.83±1.88 [△]	8.53±0.83 [△]	9.71±1.23 [△]
9	对照	6.78±0.61	18.84±2.89	7.64±0.69	9.21±0.68
	HED	6.66±1.14	20.49±3.51	7.86±0.68	9.30±1.09

与相同时间对照组比较: $\Delta P<0.05$; 与给药 5 d 时 HED 组比较: * $P<0.05$

$\Delta P<0.05$ vs control group at same time; * $P<0.05$ vs HED group administered for 5 d

3 讨论

3.1 本实验首次从氨基酸神经递质这个层面上研究了 HED 对中枢神经系统的影响。4 种氨基酸衍生化产物的分离,采用等度洗脱,无法使 Gly 和 GABA 与前后干扰色谱峰达到基线分离,本实验的梯度洗脱能使 4 种氨基酸快速达到基线分离。

3.2 分离结果表明,在一定的剂量范围内 HED 能显著升高大鼠额叶兴奋性氨基酸的水平;结合以前的实验:即 HED 能增加小鼠自主活动的作用,推测

HED 使兴奋性氨基酸神经递质升高,是其兴奋中枢的机制之一。其机制是由于促进氨基酸的合成、释放,还是抑制了神经末梢的胶质细胞上高亲和性摄取系统的重要摄取功能,有待进一步研究。

3.3 量效关系表明,HED 使健康大鼠兴奋性神经递质升高是有限度的;其中抑制性氨基酸升高可能是健康动物一种自我调节、自我保护的应激反应。

3.4 从药效学角度研究方剂的配伍给药量和给药时间是非常关键的环节,如果选择不当可能易导致

假阳性或假阴性结果的产生。尤其在量效关系中应该选取呈现线性关系剂量范围内敏感度最大的剂量(即减少或增加给药都会使效应指标有统计学改变)。本实验为下一步研究 HED 配伍应选用的给药时间和给药剂量提供了参考。

References:

[1] Bowyer J F, Hopkins K J, Jakab R, et al. L-Ephedrine-induced neurodegeneration in the parietal cortex and thalamus of the rat is dependent on hyperthermia and can be altered by the process of *in vivo* brain microdialysis [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 125(1-3): 156-166.

[2] Paul J W, Dennis K M, Christina L L, et al. Effect of (-)-ephedrine on locomotion, feeding, and nucleus accumbens

dopamine in rats [J]. *Psychopharmacology*, 1998, 135: 133-140.

[3] Richard B W, Lawrence D F, Lance M W, et al. The effect on ephedrine prodrugs on locomotor activity in rats [J]. *Gen Pharmac*, 1996, 27(1): 109-111.

[4] Dennis K M, Jack R N, Paul J W. Sensitization of anorexia and locomotion induced by chronic administration of ephedrine in rats [J]. *Life Sci*, 1999, 65(5): 501-511.

[5] Wei F H, Luo J B, Chen F L, et al. Influence of compatibility on cinnamaldehyde in Mahuang Decoction by GC-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(6): 635-638.

[6] Wang P, Zhang L T, Shi X M, et al. The influence of Xinnao Yizhi prescription on IAAS in hippocampi, cortex and striate body of brain of SAM-P/10 [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2001, 7(4): 24-27.

抗癫痫肽重组腺伴病毒载体的构建及鉴定

王宗仁¹, 邵中军^{2,3}, 李晶华¹, 行利¹, 马静¹, 龙翎¹, 张磊², 赵艳玲¹

(1. 第四军医大学附属西京医院 中医科, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学 流行病学教研室, 陕西 西安 710032; 3. 复旦大学公共卫生学院 流行病教研室, 上海 200023)

摘要:目的 为了研究蝎毒癫痫肽对癫痫模型的治疗作用, 构建并产生重组腺伴病毒(AAV)载体。方法 将 AEP 外源性核酸片段插入 AAV-shufer 质粒 pSSHG-Neo 的 KpnI-BamH I 位点构建 AAV。用腺病毒辅助质粒 pFG140、包装质粒 pAAV/Ad 及构建的 pSSHG-AEP 三质粒磷酸钙共沉淀法在肾胚胎 293 细胞系中同源重组包装 rAAV。使用地高辛标记的斑点杂交方法测定重组病毒滴度。结果 成功构建了重组病毒质粒 pSSHG/AEP, 经蔗糖梯度离心法获得 rAAV 组分, 梯度稀释测得滴度为 1.46×10^{12} PFU/mL。结论 成功地制备了 AEP 重组腺伴病毒(rAAV/AEP)载体, 为癫痫基因治疗实验奠定了基础。

关键词:抗癫痫肽; 腺伴病毒载体; 构建

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2005)12-1844-03

Construction and identification of recombinant adeno-associated virus transducing antiepilepsy peptide gene

WANG Zong-ren¹, SHAO Zhong-jun², LI Jing-hua¹, HANG Li¹, MA Jing¹, LONG Yin¹, ZHANG Lei², ZHAO Yan-ling¹

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Epidemiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200023, China)

Key words: antiepilepsy peptide; adeno-associated virus (AAV); construction

中医采用全蝎治疗脑病已有近千年的历史^[1]。本草记载全蝎具有镇痉、熄风的作用。抗癫痫肽(antiepilepsy peptide, AEP)是从东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 中分离出的一种多肽, 由 61 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 8 300, 属于蝎毒长

链神经毒素。近年研究显示其能降低实验动物癫痫的发生率、延长癫痫发作的潜伏期、缩短癫痫发作的持续时间^[2,3], 而且能抑制癫痫的反复发作^[4,5]。本研究拟利用其生物学作用, 为进一步尝试癫痫的基因治疗奠定基础。

收稿日期: 2005-03-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671764)

作者简介: 王宗仁(1954-), 男, 河南灵宝人, 主任医师, 教授, 博士生导师, 发表文章 60 余篇, 获陕西省科技进步二等奖和军队科技进步二等奖各一项, 主要研究方向为分子药理学和心血管疾病的中药防治。

Tel: (029) 82376992 E-mail: zongren@fmmu.edu.cn