

复方丹参滴丸对卡马西平在正常大鼠及难治性癫痫大鼠脑内分布的影响

贾晨^{1,2}, 刘玉亭¹, 尹稳², 曹博群¹, 党翔吉², 牛倩倩², 焦海胜^{2*}

1. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 兰州大学第二医院 药学部, 甘肃 兰州 730030

摘要: **目的** 研究复方丹参滴丸(CDDP)与卡马西平(CBZ)合用对CBZ在正常和难治性癫痫(RE)大鼠脑内分布的影响。**方法** 将Wistar雄性大鼠随机分为正常大鼠及造模大鼠;正常大鼠分为CBZ对照组及CDDP+CBZ组,造模大鼠分为CBZ模型组、CDDP+CBZ组及维拉帕米+CBZ组,造模大鼠采用脑立体定位技术向大鼠海马体内微量注射红藻氨酸建立RE模型,待模型成功点燃后,正常大鼠及造模大鼠中CDDP+CBZ组均给予CDDP(85 mg/kg),造模大鼠中维拉帕米+CBZ组给予维拉帕米(20 mg/kg),在连续ig给药10 d后各组ig给予CBZ(100 mg/kg)。在不同时间点采集大鼠脑组织样品,通过HPLC-MS/MS法测定CBZ脑药浓度。**结果** 单用CBZ,正常大鼠脑内CBZ浓度明显高于RE模型大鼠;连续给予CDDP 10 d后,与单独给予CBZ相比,正常大鼠及RE模型大鼠所取的脑组织中CBZ浓度均有明显升高。在RE模型大鼠中,CDDP对CBZ脑药浓度的改变与经典的P-糖蛋白(P-gp)抑制剂维拉帕米对CBZ脑药浓度的改变趋势基本一致。**结论** CDDP可提高正常及RE模型大鼠血脑屏障(BBB)对CBZ的通透性,增加CBZ在脑内的分布。

关键词: 卡马西平; 复方丹参滴丸; 难治性癫痫; 脑内分布; HPLC-MS/MS; 血脑屏障

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)18-3768-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.016

Effect of Compound Danshen Dripping Pills on distribution of carbamazepine in brain of normal and refractory epilepsy rats

JIA Chen^{1,2}, LIU Yu-ting¹, YIN Wen², CAO Bo-qun¹, DANG Xiang-ji², NIU Qian-qian², JIAO Hai-sheng²

1. College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2. Department of Pharmacy, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Compound Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) Dripping Pills (CDDP) on the distribution of carbamazepine (CBZ) in the brain of normal and refractory epilepsy rats. **Methods** Wistar male rats were divided into normal and model rats. Normal rats were divided into control group and CDDP group. Model rats were divided into control group, CDDP group and verapamil group. The animal model of refractory epilepsy was induced by intrahippocampal injection of kainic acid. After the success of modeling, CDDP group was given CDDP (85 mg/kg), verapamil group was given verapamil (20 mg/kg) for 10 d, then each group was given CBZ (100 mg/kg) respectively. Brain tissue samples were collected at different time points. After the samples were pretreated, the concentration of CBZ in the brain tissue was detected by HPLC-MS/MS. **Results** When using carbamazepine alone, the concentration of CBZ in normal rats was obviously higher than epileptic rats. Compared with using carbamazepine alone, CDDP could significantly increase the concentration of CBZ in normal and epileptic rats. For the epileptic rats, the enhancing effect of CDDP to the cerebral distribution of CBZ was similar to that of P-glycoprotein inhibitor verapamil. **Conclusion** CDDP could enhance the permeability of blood-brain barrier to CBZ and increase the cerebral distribution of CBZ in normal and epileptic rats.

Key words: carbamazepine; Compound Danshen Dripping Pills; refractory epilepsy; distribution in brain; HPLC-MS/MS; blood-brain barrier

癫痫是一种慢性反复发作性短暂脑功能失调综合征,全世界有1%~2%的人患有癫痫^[1]。虽然大部分癫痫能被常用抗癫痫药物(antiepileptic drugs,

AEDs)如卡马西平、丙戊酸钠、拉莫三嗪等有效控制,但仍有20%~30%的患者得不到有效治疗发展为难治性癫痫(refractory epilepsy, RE)^[2-3]。P-糖

收稿日期: 2017-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81550048); 中央高校科研基金资助项目(862434)

作者简介: 贾晨(1988—),女,硕士研究生,药师,研究方向为药动学与临床药学。Tel: 13609312631 E-mail: jiachen.12@163.com

*通信作者 焦海胜(1962—),男,教授,主任药师,研究方向为药物新剂型与临床药学。Tel: (0931)8942571 E-mail: Ldeyjh@souhu.com

蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是与RE耐药密切相关的蛋白,现已证实许多抗癫痫药物都受P-gp的影响,血脑屏障(BBB)上P-gp的过度表达与癫痫的多药耐药紧密相关,在病理状态下,或者长期服用AEDs均可以使P-gp过度表达^[4-5]。

复方丹参滴丸(Compound Danshen Dropping Pill, CDDP)是由丹参、三七、冰片3种药物组成的中药复方,具有活血化瘀、理气止痛等功效,在临床上广泛被用于治疗冠状动脉粥样硬化、心绞痛、高脂血症和其他心血管疾病^[6]。卡马西平(carbamazepine, CBZ)是临床常用经典抗癫痫药物,但其自身可诱导P-gp合成增多、活性增强,使进入脑内的药物外排而产生耐药。现有临床研究表明CDDP与AEDs有抗癫痫协同作用,且对RE治疗有效^[7-8]。动物实验表明CDDP与CBZ联合使用可以改善RE发作及其伴随的认知功能障碍^[9]。其作用机制可能与CDDP抑制P-gp、增加CBZ脑内分布有关。但目前有关CDDP对CBZ脑内分布的影响未见报道。本实验在红藻氨酸诱导的RE大鼠模型^[10-11]基础上,建立一种高效灵敏的检测大鼠脑组织CBZ浓度的HPLC-MS/MS方法,用于研究CDDP与CBZ联合使用对CBZ在正常大鼠和RE模型大鼠脑内分布的影响,评价CDDP对BBB上P-gp的抑制作用,为RE的治疗提供依据。

1 材料

1.1 药物及试剂

CBZ(江苏鹏鹤药业有限公司,规格0.1 g,批号1504011);CDDP(天津天士力有限公司,规格每丸27 mg,批号151204);维拉帕米(天津中央药业有限公司,规格40 mg,批号150801);红藻氨酸(Sigma公司,货号K0250),10%水合氯醛(兰州大学第二医院药剂科,批号160624),卡马西平对照品(中国食品药品检定研究院,批号100142-199503,质量分数>98%),氯硝西洋对照品(中国食品药品检定研究院,批号1227-9701,质量分数>98%),甲酸、甲醇和乙腈为色谱纯试剂,其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

Wistar雄性大鼠100只,SPF级,体质量(220±20)g,购于兰州大学实验动物中心,合格证号SCXK(G)2013-0002,饲养于兰州大学第二医院药剂科动物实验室,饲养温度为18~22℃,自由饮水和摄食。

1.3 仪器

Ultimate 3000 UHPLC-TSQ Quantum Access Max 高效液相色谱-三重四级杆质谱系统(Thermo Finnigan公司);DY89-11电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技有限公司);TG18-WS高速离心机(长沙维尔康湘鹰离心机有限公司);XK96-A快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司);ME2325S型电子分析天平(德国赛多利斯仪器系统有限公司);68001大鼠脑立体定位仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

2 方法

2.1 RE大鼠模型制备

大鼠称体质量后用10%水合氯醛(0.35 g/kg)ip麻醉后固定于脑立体定位仪上,采用脑立体定位技术向大鼠右侧海马体内微量注射0.8 μL(1.0 μg/μL)红藻氨酸诱导RE模型,坐标为前囟后5.6 mm、中线右旁开4.5 mm,深度距颅骨表面5 mm。术后大鼠自然恢复30 d后,于每天9:00~18:00时观察大鼠癫痫发作强度,按Racine分级标准^[12]评定癫痫发作等级,连续3次出现III级或以上判定为完全点燃,以此作为癫痫模型制作成功的标准,并将成功的模型用于后续实验。

2.2 分组及给药

Wistar大鼠随机分为正常大鼠及模型大鼠,正常大鼠分为CBZ对照组及CDDP+CBZ组,模型大鼠分为CBZ模型组、CDDP+CBZ组及维拉帕米+CBZ组,每组20只大鼠,模型大鼠按“2.1”项方法造模并成功点燃后,各组大鼠分别ig给予相应药物。根据Meeh-Rubner公式将临床用量按体表面积折算为大鼠给药剂量^[13],正常大鼠及模型大鼠中CDDP+CBZ组均ig给予CDDP(85 mg/kg),模型大鼠中维拉帕米+CBZ组ig给予维拉帕米(20 mg/kg),CBZ对照组和CBZ模型组大鼠ig给予等量生理盐水,连续给药9 d;并于第10天给药30 min后各组ig给予CBZ(100 mg/kg,CBZ给药前动物禁食12 h,自由饮水),分别于CBZ给药后30、60、120、240、480 min(每个时间点取4只大鼠),颈椎脱臼处死后采集脑组织,测定脑组织中CBZ质量浓度。

2.3 脑组织中CBZ定量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为Thermo Hypersil GOLD C₁₈柱(100 mm×2.1 mm,1.9 μm);流动相为0.05%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:

0~1 min, 10% B; 1.1~4.0 min, 10%~70% B; 4.1~5.0 min, 10%~70% B; 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 °C, 进样体积 5 μ L。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子 (ESI) 源; 正离子化选择性反应监测 (SRM) 扫描模式; 电喷雾电压 3 500 V; 毛细管温度 320 °C; 碰撞气压力 0.13 Pa; 鞘气压力 241 kPa; 辅助气体流量 2.3 L/min; SRM 检测离子: CBZ m/z 237.00 $\rightarrow$ 194.40, 碰撞能 19 eV; 氯硝西洋 m/z 316.01 $\rightarrow$ 270.00, 碰撞能量 26 eV。

2.3.3 溶液的配制 精密称取 CBZ 对照品适量, 加乙腈溶解并定容, 摇匀, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液, 即得 CBZ 对照品储备液。将储备液置于 4 °C 冰箱中保存。临用时分别精密吸取上述对照品储备液适量, 用乙腈稀释成系列 CBZ 对照品溶液。精密称取内标氯硝西洋对照品适量, 加乙腈溶解并定容, 摇匀, 制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的溶液, 即得内标溶液, 置于 4 °C 冰箱中保存待用。

2.3.4 样品处理 将采集的脑组织称质量, 用生理盐水漂洗, 除去残留的血液, 用滤纸吸干水, 按 1 : 2 质量体积比加入生理盐水, 搅碎匀浆, 14 000 r/min

离心 5 min。精密吸取大鼠脑组织匀浆上清液 200 μ L, 加入 20 μ L 的内标溶液及 300 μ L 乙腈, 涡旋混合 30 s, 14 000 r/min 离心 10 min, 去除蛋白质, 吸取上清液适量, 用初始比例流动相稀释 10 倍后经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取 5 μ L 进样分析。

2.3.5 方法的专属性 在上述色谱及质谱条件下, 取 200 μ L 正常大鼠空白脑组织上清液, 除不加内标 (用乙腈代替) 外, 按“2.3.4”项下方法操作, 进样分析, 得空白脑组织样品色谱图; 将 20 μ L 内标溶液加入 200 μ L 空白脑组织上清液中, 同法操作获得空白脑组织+内标色谱图; 将含有内标的 CBZ 对照品溶液加入空白脑组织上清液中同法操作, 得空白脑组织+CBZ 对照品+内标色谱图; 取 CBZ 对照组给予 CBZ 120 min 后所采集的大鼠脑组织样品, 同法操作, 得正常大鼠给予 CBZ 后脑组织样品+内标色谱图。SRM 扫描色谱图见图 1。由图 1 可知 CBZ 和内标保留时间分别为 2.50 和 2.55 min。CBZ 和内标峰形良好且在保留时间处均无内源性杂质干扰测定, 具有很好的专属性。

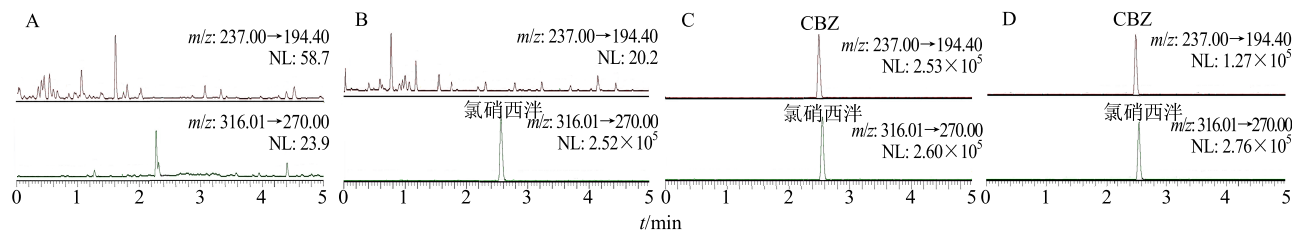


图 1 空白脑组织 (A)、空白脑组织+内标 (B)、空白脑组织+CBZ 对照品+内标 (C) 和正常大鼠给予 CBZ 后脑组织样品+内标 (D) SRM 扫描色谱图

Fig. 1 SRM scan chromatograms of blank brain tissue (A), blank brain tissue with internal standard (B), blank brain tissue with reference substance and internal standard (C), and brain sample after oral administration of CBZ with internal standard (D)

2.3.6 标准曲线 取 200 μ L 空白脑组织上清液, 依次加入不同质量浓度的 CBZ 对照品溶液 20 μ L, 配制成质量浓度分别为 0.05、0.1、0.4、1、5、10、20、40、80 μ g/mL 的系列对照品溶液, 分别加入内标溶液 20 μ L 及 280 μ L 乙腈后按“2.3.4”项下方法处理, 记录 CBZ 色谱图及峰面积。以 CBZ 和内标物的峰面积之比为纵坐标 (Y), 以 CBZ 的质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 计算出 CBZ 在大鼠脑组织的标准曲线方程为 $Y=0.141\ 3\ X-0.022\ 9$, $r=0.999\ 6$ 。定量下限为 0.05 μ g/mL。结果表明, CBZ 在 0.05~80 μ g/mL 线性关系良好。

2.3.7 绝对回收率与精密度 取空白脑组织上清液 200 μ L, 按“2.3.6”项下方法配制 CBZ 低、中、

高 3 个质量浓度 (0.1、5、40 μ g/mL) 的质控样本, 每一质量浓度各 5 份, 按“2.3.6”项下方法处理, 进样测定, 代入线性回归方程计算质量浓度, 以测得值与加入值的比值计算绝对回收率, 得低、中、高 3 个质量浓度的绝对回收率分别为 92.95%、95.28%、97.44%。取空白脑组织上清液 200 μ L, 按“2.3.6”项下方法配制 CBZ 低、中、高 3 个质量浓度 (0.1、5、40 μ g/mL) 的质控样本, 每一质量浓度各 5 份, 按“2.3.6”项下方法处理, 进样测定, 以 1 d 内每一质量浓度各 5 份样品测得的 CBZ 质量浓度计算日内精密度; 每天制备上述质量浓度各 5 份样品连续测定 3 d, 计算日间精密度。结果日内精密度 RSD 分别为 6.59%、3.81%、4.22%; 日间

精密度 RSD 分别为 8.09%、4.74%、5.57% ($n=5$)。

2.3.8 提取回收率 取空白脑组织上清液 200 μL ，按“2.3.6”项下方法配制 CBZ 低、中、高 3 个质量浓度 (0.1、5、40 $\mu\text{g/mL}$) 的质控样本，每一质量浓度各 5 份，分别加入内标溶液 20 μL 及 280 μL 乙腈后按“2.3.4”项下处理，进样测定，得 CBZ 与内标峰面积比值 (A)；另取空白脑组织上清液，先分别加入内标溶液 20 μL 及 280 μL 乙腈后按“2.3.4”项下处理，再加入与质控样本理论进样浓度相同的 3 个质控浓度基质对照品溶液即未经提取处理的相应质量浓度标准溶液，进样分析，得 CBZ 与内标峰面积比值 (B)，以 A/B 计算提取回收率，得 CBZ 在 3 个质量浓度下样品的提取回收率分别为 87.8%、92.4%、90.9%；同法计算内标的提取回收率为 91.5%。

2.3.9 稳定性考察 配制 CBZ 低、中、高 3 个质量浓度 (0.1、5、40 $\mu\text{g/mL}$) 的质控样品各 3 份，分别在室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 下放置 12 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻 15 d 和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次条件下保存后按“2.3.4”项下方法处理样品并进行检测，考察 CBZ 在脑组织样品的稳定性。低、中、高质量浓度脑组织样品在上述条件下所得测定值的 RSD 均 $<15\%$ ，表明样品在上述 3 种条件下稳定性良好。

2.4 统计分析

采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据，计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析 (One-way

repeated measures, ANOVA) 的方法处理数据，采用 LSD 法进行两组间比较。

3 结果

3.1 行为学观察

根据行为学症状分期，海马内注射红藻氨酸诱导 RE 模型大鼠一般在注射后 24 h 内为急性期，在 30~120 min 内出现咀嚼、面部肌肉抽搐，进而出现单侧后肢抽搐，双侧后肢抽搐，身体逐渐强直，并不时伴跌倒、翻滚，后发展成癫痫持续状态。之后发作的频率和程度逐渐降低，发作间隔延长，持续时间缩短，6~9 h 后发作逐渐停止，大鼠逐渐恢复正常。2~14 d 为潜伏期，大鼠基本未见癫痫发作。从 15 d 开始为慢性期，出现慢性自发性发作表现为不同 Racine 等级，至 4~5 周完全点燃。本实验大鼠术后因癫痫发作和感染的死亡率为 10.7%，4 只因未点燃剔除，造模成功率达 84%。

3.2 正常和 RE 模型大鼠中 CBZ 的脑组织分布差异

对于单用 CBZ，正常大鼠与 RE 模型大鼠在给予 CBZ 后，其不同时间点所取的脑组织中 CBZ 质量浓度有明显区别，见表 1。CBZ 对照组在 60 min 时 CBZ 脑药浓度达到高峰，CBZ 模型组在 120 min 时脑药浓度达到高峰，在 30、60、480 min 时，CBZ 模型组与 CBZ 对照组相比 CBZ 质量浓度显著降低，120 及 240 min 时 2 组脑药浓度无显著性差异。结果显示，大鼠在 RE 的病理状态下脑内 CBZ 质量浓度低于正常生理状态下脑内 CBZ 质量浓度。

表 1 正常和 RE 模型大鼠单用 CBZ 的脑内分布对比 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Concentration of CBZ after giving CBZ alone in normal and refractory epileptic rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	CBZ/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	30 min	60 min	120 min	240 min	480 min
CBZ 对照	0.98 $\pm$ 0.15	1.28 $\pm$ 0.11	1.08 $\pm$ 0.12	0.84 $\pm$ 0.13	0.49 $\pm$ 0.08
CBZ 模型	0.72 $\pm$ 0.10*	1.05 $\pm$ 0.12*	1.21 $\pm$ 0.21	0.70 $\pm$ 0.17	0.28 $\pm$ 0.10*

与 CBZ 对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs CBZ control group

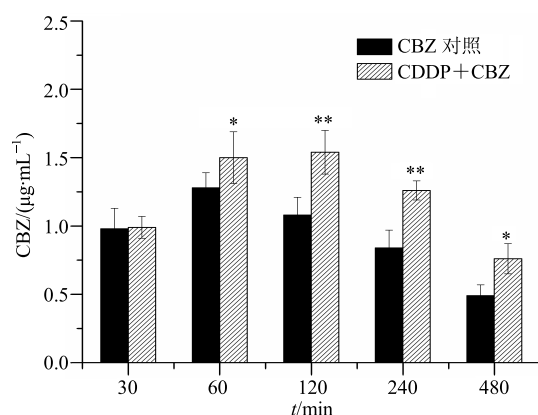
3.3 CDDP 对 CBZ 在正常大鼠脑组织分布的影响

对于正常大鼠，与 CBZ 对照组相比，CDDP+CBZ 组大鼠在连续给予 CDDP 10 d 后，其不同时间点所取的脑组织中 CBZ 质量浓度有明显变化，见图 2。在 30 min 时，CDDP+CBZ 组与 CBZ 对照组的脑药浓度无明显差异，但有升高趋势，在 60、120、240、480 min 时，CDDP+CBZ 组脑药浓度有明显升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果显示，对于正常大鼠

CDDP 可提高 BBB 对 CBZ 的通透性，增加 CBZ 在脑内的分布。

3.4 CDDP 对 CBZ 在 RE 模型大鼠脑组织分布的影响

对于 RE 模型大鼠，与 CBZ 模型组相比，CDDP+CBZ 组在连续给予 CDDP 10 d，维拉帕米+CBZ 组在连续给予维拉帕米 10 d 后，其不同时间点所取的脑组织中 CBZ 质量浓度有明显变化，见图 3。在

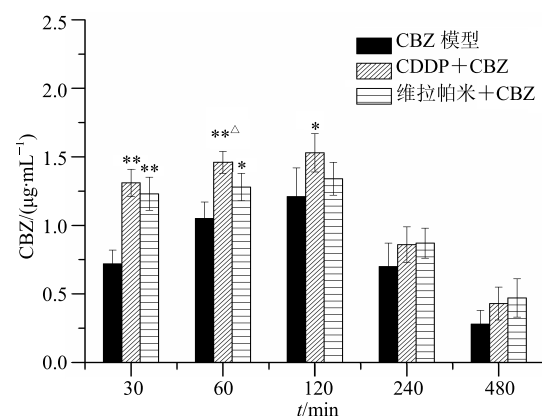


与同一时间 CBZ 对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs CBZ control group at the same time

图 2 CDDP 对 CBZ 在正常大鼠脑组织分布的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 2 Effect of CDDP on distribution of CBZ in brain of normal rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)



与同一时间 CBZ 模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与同一时间维拉帕米+CBZ 组比较: Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs CBZ model group at the same time; Δ $P < 0.05$ vs verapamil+CBZ group at the same time

图 3 CDDP 对 CBZ 在 RE 模型大鼠脑组织分布的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 3 Effect of CDDP on distribution of CBZ in brain of refractory epilepsy rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

30、60、120、240 min 时, CDDP+CBZ 组、维拉帕米+CBZ 组与 CBZ 模型组的脑药浓度相比有升高趋势, 其中 30、60、120 min 时, CDDP+CBZ 组的脑药浓度与 CBZ 模型组相比有明显差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 30、60 min 时维拉帕米+CBZ 组的脑药浓度与 CBZ 模型组相比有明显差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 但其后 480 min 时 CDDP+CBZ 组、维拉帕米+CBZ 组与 CBZ 模型组的脑药浓度相比无明显

变化, 无显著性差异。对于 CDDP+CBZ 组和维拉帕米+CBZ 组, 不同时间点两组对 CBZ 脑药浓度改变的趋势一致, 在 30、120、240、480 min 时两组间无显著性差异, 60 min 时 CDDP+CBZ 组 CBZ 质量浓度与维拉帕米+CBZ 组相比有明显升高 ($P < 0.05$)。结果显示, 对于 RE 模型大鼠 CDDP 对 CBZ 脑药浓度的改变作用可能与维拉帕米抑制 P-gp 的作用相似, CDDP 可提 RE 大鼠 BBB 对 CBZ 的通透性, 增加 CBZ 在脑内的分布。

4 讨论

HPLC-UV 法是目前最常用的 CBZ 定量检测方法, 本实验建立的 HPLC-MS/MS 法由于采用了 SRM 监测方法消除了内源性杂质的干扰, 使该方法的选择性和灵敏度显著提高并缩短了分析测试的时间, 适用于 CBZ 血药浓度的监测、生物利用度和药动学的研究。

RE 是癫痫研究中的一大热点及难题, RE 患者对常用 AEDs 产生耐药的机制尚未完全明确, 其中多药耐药基因的过度表达可能是影响癫痫耐药的一种重要机制, 它的表达产物被称为多药耐药转运体^[14]。研究发现 RE 患者 BBB 上存在高度表达的多药耐药转运体, 其能识别多种不同的 AEDs 并与之相结合将 AEDs 泵出 BBB 以外, 降低其在脑内的蓄积, 从而造成癫痫耐药^[15-16]。目前研究证实与癫痫有关的主要是 P-gp 和 MRP。P-gp 由 MDR 基因编码, 大部分常用一线 AEDs 都是它的底物药物, 如 CBZ、左乙拉西坦及苯巴比妥等^[17]。本实验中对于 RE 大鼠和正常生理状态下大鼠分别单用 CBZ 后, 5 个测定的不同时间点中 3 个时间点出现了 RE 大鼠 CBZ 脑药浓度的显著降低, 剩余 2 个时间点无显著性差异, 提示大鼠在 RE 的病理状态下脑内 CBZ 质量浓度低于生理状态下脑内 CBZ 质量浓度。其原因可能是由于 RE 大鼠癫痫灶附近 P-gp 的高度表达造成 CBZ 外排使其脑内浓度降低。

在中枢神经系统, P-gp 广泛存在于脑实质的星形胶质细胞以及脑毛细血管内皮细胞上, 这些细胞上的 P-gp 参与了 BBB 的作用, 是影响部分药物透过 BBB 的主要因素之一。维拉帕米是目前使用最广泛的 P-gp 抑制剂, 其可以和 CBZ 竞争 P-gp 的药物结合位点, 减少 P-gp 对它的外排, 增加 CBZ 的脑内浓度^[18]。近年来, 一些中药及中药有效成分如柴贝止痢汤^[19]、汉防己甲素^[20]等被发现具有抑制 P-gp 的功能, 其与 AEDs 联合使用可有效地控制

RE 的发作, 提高 AEDs 的疗效。CDDP 的主要组成是丹参、三七和冰片, 其中冰片作为“佐使药”具有提高药物的生物利用度、促进药物吸收, 促进药物透过 BBB 等作用。有研究发现冰片可增加癫痫患者脑脊液中 CBZ 浓度^[21]。但冰片促进某些药物透过 BBB 的具体作用机制和靶点尚不清楚, 有研究认为冰片与 P-gp 之间的竞争性结合可能是其作用机制之一^[22-23]。本实验研究结果显示对于正常大鼠连续 ig CDDP 10 d 后给予 CBZ 与单用 CBZ 相比脑组织中 CBZ 质量浓度有明显升高, 表明对于正常大鼠 CDDP 可提高 BBB 对 CBZ 的通透性, 增加 CBZ 在脑内的分布; 对于红藻氨酸诱导的 RE 大鼠, 连续给予 CDDP 或维拉帕米 10 d 后给予 CBZ 与单用 CBZ 相比脑组织中 CBZ 浓度有明显升高, 提示对于 RE 大鼠 CDDP 或维拉帕米均可提高 BBB 对 CBZ 的通透性, 增加 CBZ 在脑内的分布; 对于癫痫大鼠, CDDP 对 CBZ 脑药浓度的改变与 P-gp 抑制剂维拉帕米对 CBZ 脑药浓度的改变趋势基本一致, 在 60 min 时其对 CBZ 浓度的升高作用要优于维拉帕米, 说明对于 RE 大鼠 CDDP 对 CBZ 脑药浓度的改变可能与维拉帕米抑制 P-gp 的作用相似, 其机制可能是抑制 BBB 上 P-gp 的表达, 降低 P-gp 对 CBZ 的外排作用, 从而促进 CBZ 透过 BBB 而增加其脑内浓度。

综上所述, 单用 CBZ, 正常大鼠脑内 CBZ 浓度明显高于 RE 大鼠, 其原因可能与 RE 大鼠癫痫灶附近 P-gp 的高度表达造成 CBZ 外排使其脑内浓度降低有关; CDDP 与 CBZ 合用, 可以明显提高 CBZ 在正常和 RE 大鼠脑内的分布, 提高 BBB 对 CBZ 的通透性, 其机制可能与 CDDP 抑制 BBB 上 P-gp 的表达, 促进 CBZ 透过 BBB 而增加其脑内浓度有关。本研究为 CBZ 与 CDDP 联合治疗 RE 提供了理论依据。

参考文献

- [1] Bell G S, Sander J W. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem [J]. *Seizure*, 2001, 10(4): 306-314.
- [2] Engel J J R, McDermott M P, Wiebe S, *et al.* Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial [J]. *JAMA*, 2012, 307(9): 922-930.
- [3] Riazi K, Galic M A, Pittman Q J. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability [J]. *Epilepsy Res*, 2010, 89(1): 34-42.
- [4] Kwan P, Brodie M J. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2005, 46(2): 224-235.
- [5] Lazarowski A, Czornyj L, Lubieniecki F, *et al.* Multidrug-resistance (MDR) proteins develops refractory epilepsy phenotype: clinical and experimental evidences [J]. *Curr Drug Ther*, 2006, 1(3): 291-309.
- [6] Yao Y, Feng Y, Lin W. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials comparing compound danshen dripping pills and isosorbide dinitrate in treating angina pectoris [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 182: 46-47.
- [7] 蒋莉娅, 黄继人, 戴建良, 等. 复方丹参滴丸联合西药治疗外伤性癫痫 59 例临床观察 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(1): 39-41.
- [8] 吴端明, 李凤英, 许甘爱. 复方丹参滴丸辅助治疗难治性癫痫 68 例疗效观察 [J]. *中国综合临床*, 2001, 17(1): 40-41.
- [9] 韩姗姗. 复方丹参滴丸联合卡马西平对红藻氨酸诱导的癫痫大鼠作用机制研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2015.
- [10] Contractor A, Swanson G, Heinemann S F. Kainate receptors are involved in short-and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus [J]. *Neuron*, 2001, 29(1): 209-216.
- [11] Alfaro-rodr G A, Gonzalezpi A R, Buenonava A, *et al.* Effects of oxcarbazepine on monoamines content in hippocampus and head and body shakes and sleep patterns in kainic acid-treated rats [J]. *Metab Brain Dis*, 2011, 26(3): 213-220.
- [12] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 269-279.
- [13] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用药量换算 [J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010(5): 52-53.
- [14] Lazarowski A, Czornyj L. Potential role of multidrug resistant proteins in refractory epilepsy and antiepileptic drugs interactions [J]. *Drug Metabol Personal Ther*, 2012, 26(1): 21-26.
- [15] Sun Y, Luo X, Kang Y, *et al.* Neural overexpression of multidrug resistance-associated protein 1 and refractory epilepsy: A meta-analysis of nine studies [J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126(4): 308-317.
- [16] Ma A, Wang C, Chen Y, *et al.* P-glycoprotein alters blood-brain barrier penetration of antiepileptic drugs in rats with medically intractable epilepsy [J]. *Drug Des Develop Ther*, 2013, 7: 1447-1454.

- [17] Lunatort S C, Fedrowitz M, Lscher W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(8): 1364-1375.
- [18] Fortuna A, Alves G, Falcão A, *et al.* Evaluation of the permeability and P-glycoprotein efflux of carbamazepine and several derivatives across mouse small intestine by the Ussing chamber technique [J]. *Epilepsia*, 2012, 53(3): 529-538.
- [19] 聂莉媛. 柴贝止痫汤治疗难治性癫痫的疗效观察及干预 P-gp 的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [20] Chen Y, Xiao X, Wang C, *et al.* Beneficial effect of tetrandrine on refractory epilepsy via suppressing P-glycoprotein [J]. *Int J Neurosci*, 2014, 125(9): 1-32.
- [21] 冯宏业, 葛朝莉. 冰片对癫痫患者血清及脑脊液卡马西平药物浓度的作用 [J]. 海南医学, 2005, 16(6): 11-12.
- [22] 朱国栋. 冰片开放血脑屏障及通过 P 糖蛋白介导的机制研究 [D]. 广州: 广州医学院, 2009.
- [23] 袁 卓, 张军平, 刘养凤, 等. P-糖蛋白与冰片促血脑屏障生理性开放的关系探讨 [J]. 天津中医药, 2006, 23(3): 261-262.