



牛黄、唑吡坦单用及合用对大鼠脑纹状体中 2 种抑制性氨基酸递质含量的影响

刘萍^{1*}, 何新荣¹, 郭美²

(1. 解放军总医院 药品保障中心 中药房, 北京 100853;

2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] **目的:**探索中药牛黄及西药唑吡坦单用或合用与脑内 2 种抑制性氨基酸递质变化的相关性。**方法:**利用微透析技术从给药大鼠脑纹状体中取样,运用邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生反相高效液相色谱法,结合荧光检测器检测对照品和样品中 2 种抑制性氨基酸递质甘氨酸(Gly)、 γ -氨基丁酸(GABA)的含量并进行统计分析。**结果:**与生理盐水组相比,牛黄组脑纹状体透析液中 GABA 的含量极显著增高($P < 0.01$);唑吡坦组 GABA 的含量也显著增高($P < 0.05$);牛黄与唑吡坦合用组 GABA 的含量同样显著增高($P < 0.05$);牛黄组 GABA 的含量高于合用药组($P < 0.05$),唑吡坦组 GABA 的含量与合用组没有显著性差异。单用牛黄或单用唑吡坦与生理盐水组、联合用药组相比,Gly 的含量均显著增高($P < 0.05$)。**结论:**牛黄单独用药组、唑吡坦单独用药组和 2 药合用组大鼠脑纹状体透析液中 2 种抑制性氨基酸递质均显著增高,且单独给药组较联合用药组增高幅度大。表明牛黄与唑吡坦合用后,2 种抑制性氨基酸递质未呈现加强效应,推测其可能作用机制是二者竞争同一受体。因此,在临床镇静治疗环节中主含牛黄的中成药与唑吡坦类西药合用没有重要意义,同时也验证了牛黄不作为开窍药使用的中医理论的正确性。

[关键词] 微透析;唑吡坦;牛黄;联合用药;抑制性氨基酸递质;开窍药

牛黄 *Calculus Bovis* 为牛科动物牛 *Bos taurus domesticus* 的胆结石,为了与人工牛黄相区别,也称作天然牛黄。具有中枢抑制作用,可减少小鼠的自主活动和踏轮活动,增强阈下量戊巴比妥钠对小鼠的催眠作用^[1]。天然牛黄的中枢抑制作用机制是否与促进 2 种抑制性氨基酸递质增高相关,尚未见文献报道。酒石酸唑吡坦(zolpidem tartrate)为一种新型咪唑吡啶类催眠药,选择性作用于大脑的苯二氮 \blacksquare 受体亚型。唑吡坦口服后吸收迅速,0.5~2 h 达 C_{max} ,大多数药物与血浆蛋白结合,经肝脏迅速代谢为失活产物。能改善病人的睡眠潜伏期和睡眠效率^[2]。这 2 种均对中枢神经有抑制作用的中西药物若同用是否会加深抑制需要进一步探讨。近些年发展起来的微透析(microdialysis, MD)技术为这一研究提供了可能性。该技术联用高效液相色谱、毛细管电泳、电化学及生物传感器、质谱^[3-5]检测技术等,使得进行活体体内的某些待测组分实时、连续、在线的检测成为可能,正在被广泛地应用于药物代谢和

神经生化分析等研究中。

本实验采用微透析技术检测 2 种抑制性氨基酸递质 GABA 和 Gly 在大鼠脑纹状体中的含量变化,探索天然牛黄与唑吡坦的单独应用或联合应用与抑制的神经递质变化的相关性,希望发现牛黄的作用机制以及与精神系统西药合用后产生的相互影响。

1 材料

1.1 仪器与设备

WK-2 型脑立体定位仪(国营西北光学仪器厂);CMA 12 微透析探针(BR-4,瑞典 CMA 公司);CMA-400 型微量注射泵(瑞典 CMA 公司);Agilent1200 型高效液相色谱仪(含 G1311A 系列四元梯度泵,G1329A 自动进样器,G1321A 荧光检测器,Agilent chemstation B0301 化学工作站,美国 Agilent 公司);色谱柱为 Alltima C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m);SHZ-III 循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药品与试剂

酒石酸唑吡坦片(杭州赛诺菲公司,批号 0812028);天然牛黄(购自同仁堂,由解放军总医院中药房提供);天门冬氨酸(DL-aspartic acid, Asp)、

[收稿日期] 2009-09-16

[通信作者] * 刘萍, E-mail: liuping0707@yahoo.com.cn



谷氨酸(*L*-glutamic acid, Glu)、甘氨酸(glycine, Gly)批号均为624-200104; γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA, 批号026K0736); 邻苯二甲醛(phthalaldehyde, OPA), β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, 2-MCE), 磷酸氢二钠(Sigma公司); 甲醇为色谱纯, 硼酸、磷酸等均为国产分析纯; 人工脑脊液(aCSF)(NaCl 126 mmol · L⁻¹, CaCl₂ 1.1 mmol · L⁻¹, NaHCO₃ 27.5 mmol · L⁻¹, MgCl₂ 0.85 mmol · L⁻¹, KCl 2.4 mmol · L⁻¹, Na₂SO₄ 0.5 mmol · L⁻¹, KH₂PO₄ 0.5 mmol · L⁻¹, pH 7.4)自行配制, 作为脑内微透析灌流液; 义齿基托树脂液剂(上海珊瑚化工厂); 义齿基托聚合物(牙托粉, 长治市健齿齿科器材有限公司)。

1.3 动物

健康 Wistar 雄性大鼠 20 只, 体重(285 ± 10) g, 合格证号 SCXK(京) 2005-0013, 由解放军总医院实验动物中心提供。

2 方法

2.1 动物分组和给药

将大鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 生理盐水组(I)给生理盐水; 牛黄组(II)每只单纯给牛黄 8.2 mg · d⁻¹; 唑吡坦组(III)每只单纯给酒石酸唑吡坦 1.4 mg · d⁻¹; 联合用药组(IV)每只牛黄 8.2 mg · d⁻¹ + 酒石酸唑吡坦 1.4 mg · d⁻¹ 混合给药。均灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 7 d。

2.2 样品收集

大鼠用 10% 的水合氯醛, 按 3.45 mL · kg⁻¹ 剂量腹腔注射麻醉后, 置于脑立体定位仪上固定大鼠头部, 切开头皮, 暴露头骨, 参照《大鼠脑立体定位图谱》在颅骨上钻孔, 在脑立体定位仪引导下旋转垂直臂将微透析探头导引管植入脑纹状体区, 并在钻孔周围颅骨区域呈三角对称拧入 3 颗微螺钉后用牙托粉整体固定。然后将大鼠单独饲养, 保持清洁充足的饮水及食物, 术后恢复 1 d; 将微透析系统处备用。实验时在麻醉状态下取下大鼠头颅导引管塞, 向纹状体内插入探针, aCSF 做为灌流液, 调节流速为 2.5 μ L · min⁻¹, 平衡 60 min 后用 EP 管以固定流速收集透析液, 每份间隔时间为 20 min, 共收集 7 份。将收集的样品即刻置入 -70 °C 冰箱冷藏。实验结束后, 将大鼠麻醉处死后断头取脑, 快速找到纹状体, 验证探针所插入部位是否准确。

2.3 氨基酸含量测定

2.3.1 衍生试剂的制备 精密称定 12.5 mg OPA, 加 0.25 mL 甲醇溶解, 加入 2.5 mL 硼酸缓冲液(0.4 mol · L⁻¹, pH 9.5), 涡旋混匀, 再加入 20 μ L β -巯基乙醇, 冰箱中保存备用。

2.3.2 色谱条件 Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m); 流动相磷酸氢二钠缓冲液(A)(0.1 mol · L⁻¹, pH 6.86)-甲醇(B)梯度洗脱比例见表 1。流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C; 发射波长 340 nm, 检测波长 450 nm。

表 1 溶剂梯度洗脱比例

<i>t</i> /min	A	B
0	70	30
20	40	60
21	40	60
25	60	40
30	70	30
40	70	30

2.3.3 标准曲线绘制 精密称量 Gly, GABA 各 1 mg, 用 0.1 mol · L⁻¹ 的盐酸溶液定容至 1 mL。再用盐酸稀释, 精密配制成标准液 0.062 5, 0.125, 0.250, 0.500, 1.000 mg · L⁻¹。以进样量为横坐标、峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。Gly: $Y = 507.670X + 2.9167$, $r = 0.9991$ 。GABA: $Y = 382.64X + 4.5083$, $r = 0.9996$ 。2 种氨基酸在 30 min 内得到很好的分离, 在 0.062 5 ~ 1.00 mg · L⁻¹ 有良好的线性关系。

2.3.4 精密度测定 将混合氨基酸样品以上述色谱条件连续进样 5 次, 测得 Gly 和 GABA 峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.2%, 峰迁移时间的 RSD 分别为 0.2%, 0.1%。

2.3.5 探针回收率测定 取样前将探针置于加有 0.1 mmol · L⁻¹ 混合对照品的 aCSF 液中, 以与体内微透析同样的温度、速度和间隔收集体外透析液, 并按上述色谱条件进行测定体外, 探针回收率 Gly 为 16.0%, GABA 为 18.9%, 用以折算大鼠脑内该 2 种氨基酸神经递质的真实浓度。

2.3.6 样品含量测定及统计学分析 以 2.3.3 项下标准曲线, 计算每只动物给药后各时间点所取样品中 GABA 和 Gly 的浓度, 统计并以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 所测数据使用 SPSS9.0 统计软件进行分析, 采用组间 *t* 检验并进行方差分析比较。透析液样品和氨基酸对照品色谱图见图 1。

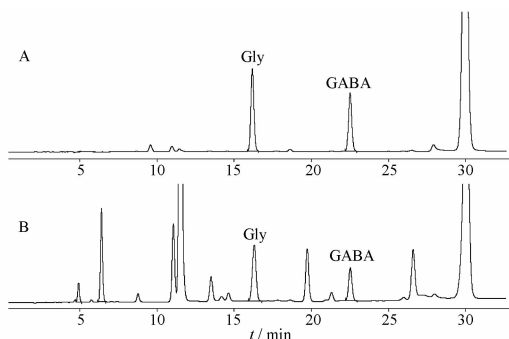


图 1 大鼠脑纹状体透析液样品(B)和氨基酸对照品(A)色谱图

3 结果

与生理盐水组相比,单用牛黄组大鼠脑纹状体中 GABA 的含量极显著增高 ($P < 0.01$);单用唑吡坦后 GABA 的含量显著增高 ($P < 0.05$);牛黄与唑吡坦合用后 GABA 的含量也显著增高 ($P < 0.05$)。单用牛黄组的 GABA 含量高于联合用药组 ($P < 0.05$),单用唑吡坦组的 GABA 含量与联合用药组相比没有显著性差异,见表 2。与生理盐水组、联合用药组相比,单用牛黄组,单用唑吡坦组的 Gly 含量均增高,有显著性差异 ($P < 0.05$),见表 3。

表 2 牛黄、唑吡坦单用及合用对大鼠脑纹状体 γ -氨基丁酸的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

$\times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	平衡后采样时间/min						
	20	40	60	80	100	120	140
I	0.62 ± 0.72	0.44 ± 0.41	0.41 ± 0.35	0.31 ± 0.33	0.19 ± 0.24	0.22 ± 0.29	0.20 ± 0.19
II	1.86 ± 0.55 ¹⁾	1.64 ± 0.48 ²⁾	1.65 ± 0.46 ^{2,3)}	1.87 ± 0.68 ^{1,3)}	1.77 ± 0.64 ^{2,3)}	1.69 ± 0.64 ²⁾	1.38 ± 0.35 ^{2,3)}
III	1.63 ± 0.83	1.36 ± 0.54	1.38 ± 0.64	1.36 ± 0.78	1.45 ± 0.89 ¹⁾	1.52 ± 0.89 ¹⁾	1.92 ± 1.32 ¹⁾
IV	1.09 ± 0.18	0.90 ± 0.20	0.83 ± 0.18	0.86 ± 0.20 ¹⁾	0.85 ± 0.15 ¹⁾	0.92 ± 0.12 ²⁾	0.77 ± 0.22 ¹⁾

注:与 I 组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 IV 组相比³⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

表 3 牛黄、唑吡坦单用及合用对大鼠脑纹状体中甘氨酸的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

$\times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	平衡后采样时间/min						
	20	40	60	80	100	120	140
I	0.40 ± 0.51	0.43 ± 0.60	0.49 ± 0.64	0.40 ± 0.64	0.27 ± 0.45	0.32 ± 0.57	0.26 ± 0.43
II	3.87 ± 2.02 ^{1,3)}	3.42 ± 1.91 ^{1,3)}	3.39 ± 1.74 ¹⁾	3.83 ± 2.13 ¹⁾	3.42 ± 2.05 ¹⁾	3.42 ± 1.70 ^{1,3)}	2.70 ± 1.08 ¹⁾
III	2.46 ± 1.57	2.18 ± 1.00 ³⁾	2.19 ± 1.22 ³⁾	2.10 ± 1.32 ³⁾	2.25 ± 1.34 ^{1,3)}	2.16 ± 1.04 ^{1,3)}	2.74 ± 1.77 ^{1,3)}
IV	0.99 ± 0.33	0.71 ± 0.24	0.57 ± 0.19	0.68 ± 0.28	0.64 ± 0.22	0.68 ± 0.18	0.58 ± 0.23

4 讨论

Glu, Asp, GABA 和 Gly 是哺乳动物中中枢神经系统(CNS)中广泛分布的神经递质,前 2 种为兴奋性神经递质,后 2 种为抑制性氨基酸递质,在控制神经元兴奋方面发挥着重要的作用。本方法利用梯度洗脱,对照品及样品中 4 种氨基酸均在 35 min 内得到很好的分离,方法简便,灵敏度高,能满足实际测定的需要。由于 Asp, Glu 在本实验中所收集的样品中含量较低,且组间差异不明显,而慢性失眠主要与 GABA 和 Gly 活动的异常有密切关系^[6],因此,本文主要讨论 GABA, Gly 在大鼠脑纹状体中的含量及 2 种抑制性氨基酸递质在各组间含量的差别。

有文献报道,牛黄的组成中含有谷氨酸等多种氨基酸,其中谷氨酸占总游离氨基酸量的 8.05%,经人体吸收后,可由中枢神经系统中的谷氨酸脱羧酶催化生成 GABA,发挥镇静的作用^[7]。而也有文

献认为,牛黄对药物、化学物质、高压氧、缺氧、一氧化氮、低钙、听源性诱发和光诱发等多种因素所致惊厥的抑制作用是由天然牛黄中含有的牛磺酸所致^[8]。唑吡坦能特异性激动 GABA 受体 α_1 亚单位上的 BZD 受体,故引起镇静/催眠、遗忘和抗抽搐效应^[9]。从本实验研究数据来分析,认为导致天然牛黄与唑吡坦合用后 2 种抑制性神经递质未呈现加强效应,可能是牛黄与唑吡坦在脑纹状体区竞争这同一受体,当牛黄使用后,唑吡坦仅起到部分激动剂的作用。但目前还无资料证明,有待进一步研究。至于牛黄对 Gly 的浓度影响也与对 GABA 影响相似的现象也有待于今后研究。

按照传统医学理论,中药的“开窍药”皆入心经,具有通关开窍、启闭回苏、醒脑复神的作用。若心窍被阻、清窍被蒙,则神明内闭、神志昏迷、不省人事,治疗则用辛香开通心窍之品,这类中药很少单独使用,



往往伍用以增加其他药物的治疗效果。现代研究证实开窍药可能对帮助其他药物透过血脑屏障提供配伍支持^[10]。但自古以来对牛黄是否为开窍药的认识是不一致的,有的文献认为牛黄属于开窍药^[11],而传统的教材没有将其列入^[12]。本实验结果也证实,牛黄对中枢抑制性神经递质有直接影响,牛黄与唑吡坦联合用药没有重要意义,因此,牛黄不应属于开窍药范畴。本研究将会对类似药效的中西药合用产生的药物相互作用提供可行的研究思路和实验方法。

[参考文献]

- [1] 赵文静,郝丽莉,于庆芝. 实用动物药研究[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2003:280.
- [2] 宋洪杰,李珍,石晶,等. 酒石酸唑吡坦的药代动力学和生物利用度研究[J]. 中国临床药理学杂志,2000,16(3):122.
- [3] Carter A J, Kehr J. Microbore high-performance liquid chromatographic method for measuring acetylcholine in microdialysis samples: Optimizing performance of platinum electrodes[J]. J Chromatogr Biomed Appl,1997,692(1):207.
- [4] Tucci S, Rada P, Sepulveda M J. Glutamate measured by 6-S

resolution brain microdialysis: Capillary electrophoretic and laser-induced fluorescence detection application[J]. J Chromatogr Biomed Appl,1997,694(2):343.

- [5] Fellows L K, Boutelle M G. Rapid changes in extracellular glucose levels and blood flow in the striatum of the freely moving rat[J]. Brain Res,1993,604(1/2):225.
- [6] 刘萍,何新荣,周文斌,等. 大鼠脑纹状体微透析法研究天王补心方剂中桔梗的应用与两种抑制性氨基酸递质变化的相关性[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2830.
- [7] 柳琪,滕葳,李坚,等. 西藏产天然牛黄中19种游离氨基酸的分析及药理作用[J]. 基层中药杂志,1996,10(4):39.
- [8] 杨敬格,袁惠南. 牛黄的药理研究概况[J]. 赣南医学院学报,1989,9(3/4):123.
- [9] 喻东山. 唑吡坦的神经科应用[J]. 中国全科医学,2009,12(3B):479.
- [10] 刘煜德,孙丹逸,黄小洵,等. 冰片对BMSCs透过血脑屏障的影响[J]. 亚太传统医药,2007,3(7):46.
- [11] 陈广进. 安宫牛黄丸治疗高热昏迷的机理探讨[J]. 光明中医,2009,24(4):765.
- [12] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2002:487.

Single and combining effects of Calculus Bovis and zolpidem on inhibitive neurotransmitter of rat striatum corpora

LIU Ping^{1*}, HE Xinrong¹, GUO Mei²

(1. Traditional Chinese Medicine Pharmacy of PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation effects between single or combined administration of Calculus Bovis or zolpidem and changes of inhibitive neurotransmitter in rat striatum corpora. **Method:** Sampling from rat striatum corpora was carried out through microdialysis. The content of two inhibitive neurotransmitters in rat corpus striatum- glycine (Gly) and gamma aminobutyric acid (GABA), was determined by HPLC, which involved pre-column derivation with orthophthalaldehyde, reversed-phase gradient elution and fluorescence detection. **Result:** GABA content of rat striatum corpora in Calculus Bovis group was significantly increased compared with saline group ($P < 0.01$). GABA content of zolpidem group and Calculus Boris plus zolpidem group were increased largely compared with saline group as well ($P < 0.05$). GABA content of Calculus Bovis group was higher than combination group ($P < 0.05$). GABA content of zolpidem group was not significantly different from combination group. Gly content of Calculus Bovis or zolpidem group was markedly increased compared with saline group or combination group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Contents of two inhibitive neurotransmitters in rat striatum corpora were all significantly increased in Calculus Bovis group, zolpidem group and combination group. The magnitude of increase was lower in combination group than in Calculus Bovis group and Zolpidem group, suggesting that Calculus Bovis promoted encephalon inhibition is more powerful than zolpidem. The increase in two inhibitive neurotransmitters did not show reinforcing effect in combination group, suggesting that Calculus Bovis and zolpidem may compete the same receptors. Therefore, combination of Calculus Bovis containing drugs and zolpidem has no clinical significance. Calculus Bovis shouldn't as an aperture-opening drugs be used for resuscitation therapy.

[Key words] microdialysis; zolpidem; Calculus Bovis; natural ox gallstone; combination of medication; inhibitive neurotransmitter; resuscitation agent; aperture-opening drug

doi: 10.4268/cjmm20100723

[责任编辑 张宁宁]

• 907 •