

人参皂苷 C-K 对匹罗卡品致痫大鼠发作的影响

曾祥昌¹, 周露萍¹, 陈露露¹, 罗伟¹, 李超鹏¹, 高青¹,
王亚芹¹, 王欣桐¹, 胡凯², 沈杰³, 欧阳冬生¹

¹中南大学湘雅医院临床药理研究所, 中南大学临床药理研究所,

遗传药理学湖南省重点实验室, 长沙 410078, 湖南;

²中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008, 湖南; ³皖南医学院药学院, 芜湖 241001, 安徽

摘要 目的:探讨人参皂苷 C-K 对癫痫大鼠行为学影响及其与拉莫三嗪的协同作用。方法:取 70 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、拉莫三嗪组、人参皂苷 C-K 低、中、高剂量组、拉莫三嗪与人参皂苷合用组, 各组大鼠多次给药后腹腔注射氯化锂-匹罗卡品造模, 观察大鼠行为变化, 利用 Racine 分级标准评估癫痫发作强度, 记录癫痫发作潜伏期。结果:与癫痫模型组相比, 人参皂苷 C-K 显著延长癫痫发作潜伏期, 降低癫痫发作后体质量丢失 ($n=10, P<0.05$)。人参皂苷 C-K 与拉莫三嗪合用显著降低癫痫发作强度, 进一步延长癫痫发作潜伏期 ($n=10, P<0.05$)。结论:人参皂苷 C-K 具有抗癫痫作用, 与拉莫三嗪合用具有协同增强抗癫痫作用。

关键词 人参皂苷 C-K; 拉莫三嗪; 癫痫; 发作

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-2501(2017)02-0139-05

癫痫是一种以大脑神经元异常放电导致的以

反复性癫痫发作为特征的慢性脑部疾病。全球约有 6 500 万癫痫患者, 且每年新发病例达 240 万^[1]。我国约有 900 万癫痫患者, 其中活动性癫痫患者约有 600 万, 同时每年有 40 万左右的新发癫痫患者。临床上抗癫痫药物仅能控制癫痫发作, 20%~30% 癫痫患者无法得到有效控制, 伴有突然死亡、并发精神和神经障碍以及药物不良反应风险^[2], 严重影响患者的健康和生活质量。因此, 寻找新的抗癫痫药物成为防治癫痫的重要目标。

人参皂苷是人参的主要活性成分, 研究显示含人参皂苷 Rb1 和 Rb3 的人参提取物具有抗癫痫作用^[3]。人参皂苷 C-K 是一种四环三萜达玛烷型人参皂苷, 也是人参皂苷 Rb1、Rb2 和 Rc 在机体肠道的主要降解产物, 是天然二醇型人参皂苷在体内吸收和发挥活性的关键实体。人参皂苷 C-K 具有抗癌、抗炎、降糖、保肝、保护心肌等多种药理活性^[4]。近年来研究发现, 其在神经系统中发挥重要作用, 具有改善脑缺血再灌注和认知障碍作用^[5]。也有研究显示人参皂苷 C-K 能促进神经元释放 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)^[6], 增强 GABA 受体活性而抑制 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR) 活性^[7]。然而, 人参皂苷 C-K 是否具有抗癫痫作用尚未有报道。鉴于人参皂苷 C-K 是人参皂苷 Rb 类的主要代谢产物及其促进 GABA 介导的神经抑制效应, 推测人参皂苷 C-K 具有抗癫痫作用。本研究利用氯化锂-匹罗卡品诱导的癫痫模型探讨人参皂苷 C-K 抗癫痫活性及其与

2016-10-17 收稿 2016-12-7 修回

国家自然科学基金(81301106, 81503236, 81641141); 湖南省自然科学基金(14JJ4006); 湖南省自然科学基金(2016JJ4116); 安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2015A155)

曾祥昌, 男, 在读硕士, 研究方向: 中药与天然药物药理学。

Tel: 18274802795 E-mail: zxchang45168@163.com

欧阳冬生, 通信作者, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 临床药理学及天然药物研究。

Tel: 0731-84805380 E-mail: ouyangyj@163.com

拉莫三嗪合用对癫痫行为的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠70只,体质量180~220 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。许可证号:SCXK(湘)2011-0003。大鼠实验前适应性喂养1周。

1.2 药品与试剂 人参皂苷C-K由浙江海正药业股份有限公司提供,纯度 $\geq 98\%$,批号:S150701-M;拉莫三嗪购于浙江华海药业股份有限公司,批号:5629-16-001;盐酸氯化锂(货号:62476-100G-F)、盐酸匹罗卡品(货号:P6503)购于Sigma公司。溴甲基东莨菪碱来源于中国药品生物制品检定所,批号:100476-200301。水合氯醛溶液购于中南大学湘雅医院。

1.3 分组与给药 70只大鼠按体质量随机分为正常对照组、模型组、拉莫三嗪组、人参皂苷C-K低、中、高剂量组、拉莫三嗪+人参皂苷C-K组,每组10只。拉莫三嗪组灌胃40 mg/kg (0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制,浓度为4 mg/mL),一日1次,连续给药5 d;人参皂苷C-K低、中、高剂量组分别灌胃80、160、320 mg/kg (0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制,浓度分别为8、16、32 mg/mL),一日2次,连续给药5 d。人参皂苷C-K与拉莫三嗪合用组灌胃拉莫三嗪40 mg/kg,隔30 min后给予人参皂苷C-K 160 mg/kg,其中拉莫三嗪一日1次,人参皂苷C-K一日2次,连续给药5 d。正常对照组和模型组给予相同体积的生理盐水。大鼠多次给药后1 h腹腔注射匹罗卡品溶液。

1.4 癫痫模型制备 氯化锂-匹罗卡品诱导癫痫持续状态模型^[8]。大鼠称重后腹腔注射氯化锂溶液(i.p., 127 mg/kg, 生理盐水配制), 18~20 h后给予匹罗卡品溶液(i.p., 30 mg/kg, 生理盐水配制)。给匹罗卡品前30 min给予溴甲基东莨菪碱溶液(i.p., 1 mg/kg, 生理盐水配制)以减轻匹罗卡品引起的外周反应。大鼠给予匹罗卡品后利用视频监控系统密切观察大鼠行为变化。

1.5 行为评估 利用Racine标准^[9]对大鼠癫痫发作行为进行评估:0级:无发作反应;1级:口角、面部肌肉抽动阵挛;2级:节律性点头;3级:全身震颤、单侧前肢阵挛;4级:双侧前肢阵挛伴竖立;5级:全身强直阵挛发作伴跌倒。大鼠腹腔注射

匹罗卡品后观察记录大鼠发作强度、潜伏期。大鼠发作24 h后称重,记录发作前后大鼠体质量变化。

1.6 统计分析 所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 19.0统计软件进行数据处理,癫痫发作潜伏期和体质量利用单因素方差分析, LSD检验法进行多组间两两比较,癫痫发作强度采用非参数Mann-Whitney U检验法进行两组间比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷C-K对氯化锂-匹罗卡品癫痫模型的行为学影响 与模型组相比,人参皂苷C-K中、高剂量组大鼠显著延长阵挛性发作潜伏期($P < 0.05$),见Fig. 1。人参皂苷C-K低、中、高剂量组大鼠癫痫发作率具有降低的趋势(90%, 70%, 70% vs. 100%),对癫痫发作强度无明显影响,见Tab. 1。结果表明人参皂苷C-K具有一定的抗癫痫作用。

Tab. 1 Effect of ginsenoside C-K and its combination with lamotrigine on seizure score ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Group	Dose (mg/kg)	Seizure score
Model	-	4.5 \pm 0.5
Lamotrigine	40	3.1 \pm 0.9 ^{bc}
Ginsenoside C-K low-dose	80	4.4 \pm 0.5 ^c
Ginsenoside C-K middle-dose	160	4.3 \pm 0.5 ^c
Ginsenoside C-K high-dose	320	4.0 \pm 0.6 ^c
Lamotrigine + Ginsenoside C-K	40 + 160	2.6 \pm 0.5 ^b

Compared with model group, ^b $P < 0.05$; compared with lamotrigine + ginsenoside C-K group, ^c $P < 0.05$.

2.2 人参皂苷C-K及其与拉莫三嗪合用对氯化锂-匹罗卡品癫痫模型的行为学影响 与模型组相比,拉莫三嗪能显著延长癫痫发作潜伏期。与人参皂苷C-K或拉莫三嗪单用相比,拉莫三嗪与人参皂苷C-K合用显著延长癫痫发作潜伏期,降低癫痫发作强度,见Tab. 1、Fig. 2,表明人参皂苷C-K与拉莫三嗪合用具有协同抗癫痫作用。

2.3 人参皂苷C-K对癫痫大鼠发作后体质量丢失的影响 大鼠癫痫发作后体质量出现减轻现象。与模型组相比,人参皂苷C-K高剂量组显著减轻体质量丢失($P < 0.05$),与拉莫三嗪合用进一步降低体质量丢失,见Fig. 1-2,表明人参皂苷

C-K 能改善癫痫发作后体质量减轻。

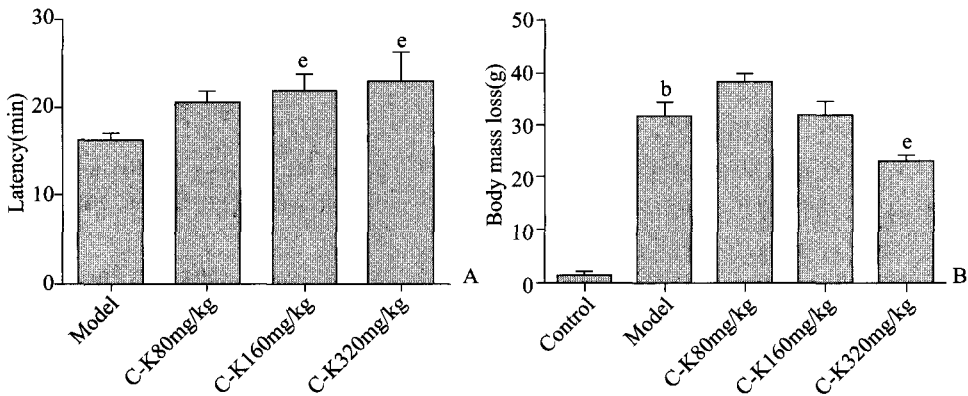


Fig. 1 Effect of ginsenoside C-K on seizure latency and body mass loss in epileptic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

C-K: Ginsenoside C-K; compared with control group, ^b $P < 0.05$; compared with model group, ^e $P < 0.05$.

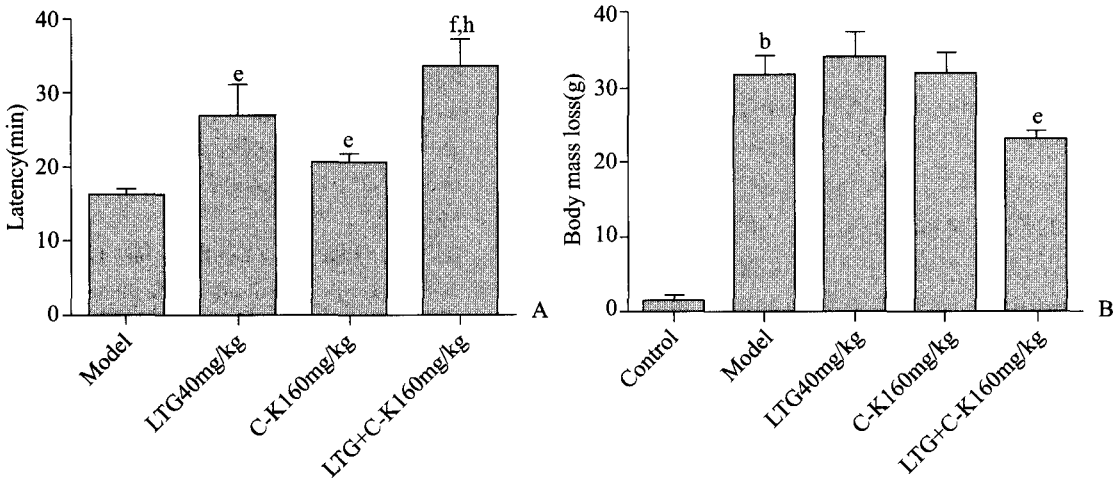


Fig. 2 Effect of the combination of ginsenoside C-K and lamotrigine on seizure latency and body mass loss in epileptic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

C-K: Ginsenoside C-K; LTG: Lamotrigine; compared with control group, ^b $P < 0.05$; compared with model group, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$; compared with ginsenoside C-K group, ^h $P < 0.05$.

3 讨论

人参是我国传统的中药材,其化学成分复杂,药理活性独特,具有“百草之王”的美称,古代多用于久病初愈大补元气和滋补养生之用。随着现代分离技术的进步,科学家认识到人参皂苷是人参的主要化学成分。目前分离的人参皂苷单体中 Rb1、Rb2、Rc、Rg1 和 Re 含量居多,约占人参皂苷的 80% 以上^[10]。研究发现人服用人参粉末后血浆中人参皂苷 Rb1 减少而人参皂苷 C-K 逐渐增加,证实人参皂苷 C-K 是人参皂苷 Rb1 在机体内肠道菌群的主要代谢产物,是人参皂苷吸收的关键实体^[11]。

早在 2002 年 Lee 等首次发现人参具有抗惊

厥作用以来^[12],科学家先后发现人参皂苷根、茎、叶提取物均无抗惊厥作用,而含有 Rb1 和 Rb3 的提取物显著抑制癫痫发作^[3]。对人参皂苷抗癫痫作用机制研究发现人参皂苷 Rb1 单体可抑制神经元凋亡、NMDA 受体介导的异常放电和抗氧化应激进而发挥抗癫痫作用^[13-14]。近年来研究显示人参皂苷 C-K 具有改善认知障碍^[15]、抑制脑缺血再灌注引起的神经损伤、对抗小神经胶质细胞介导炎症、抗抑郁^[16]等作用。有趣的是,体外研究证实人参皂苷 C-K 可促进神经元释放 GABA,促进 GABA 介导的神经抑制效应,抑制 NMDA 受体活性。然而,迄今为止,国内外尚无人参皂苷 C-K 抗癫痫作用研究报道。本研究利用人参皂苷 C-K 干预氯化锂-匹罗卡品诱导的癫

痫持续状态模型发现人参皂苷 C-K 显著延长癫痫发作潜伏期,降低癫痫发作后体质量丢失,表明人参皂苷 C-K 具有抗癫痫作用且能维持正常体质量。

拉莫三嗪是一种苯三嗪衍生物,于 1991 年在欧洲首次上市,主要通过阻滞电压门控钠通道,减少钠离子内流,增加神经元的稳定性而发挥抗癫痫作用。因其疗效确切,对认知功能、睡眠、行为等方面无显著影响,国内外多份指南和共识推荐为治疗顽固部分性癫痫发作、原发性全身性癫痫、失神性发作、青少年肌阵挛性癫痫的首选药物。随着拉莫三嗪在临床上的广泛应用,其不良反应也逐渐报道,如共济失调、复视、头晕、头痛、恶心、皮疹、致畸等,尤以皮疹最为常见,发生率在 10%^[17],曾有发生罕见致命性不良反应 Stevens-Johnson 综合征和中毒性表皮坏死松解症的病例报道^[18]。研究结果显示,拉莫三嗪的药物不良反应发生与用药剂量有关。然而,减少给药剂量的同时也将降低拉莫三嗪的抗癫痫作用。有研究显示,人参皂苷 C-K 可减轻粉尘螨引起的过敏性皮炎,抑制恶唑酮引起的皮炎,表明人参皂苷 C-K 可抑制药源性过敏^[19-20]。本研究利用人参皂苷 C-K 与拉莫三嗪合用干预氯化锂-匹罗卡品诱导的癫痫模型发现两者合用进一步延长发作潜伏期,降低发作后体质量丢失,表明人参皂苷 C-K 可增强拉莫三嗪的抗癫痫作用,具有协同增效作用,从而减轻拉莫三嗪引起皮疹。

本研究首次发现人参皂苷 C-K 具有抗癫痫作用,与拉莫三嗪合用能协同增强疗效。与此同时,也存在一些不足:(1)没有进一步探讨人参皂苷 C-K 抗癫痫作用机制;(2)没有利用多个癫痫动物模型验证人参皂苷 C-K 的抗癫痫活性;(3)人参皂苷 C-K 能增强拉莫三嗪抗癫痫疗效,而未探讨人参皂苷 C-K 是否减轻拉莫三嗪的不良反应。因此,我们将针对上述存在的问题深入研究人参皂苷 C-K 的作用机制和探讨人参皂苷 C-K 与拉莫三嗪合用抗癫痫最佳比例,为开发新的抗癫痫复方制剂提供科学依据。

综上所述,人参皂苷 C-K 显著延长癫痫发作潜伏期,降低癫痫发作后体质量丢失,表明人参皂苷 C-K 具有抗癫痫作用。人参皂苷 C-K 与拉莫三嗪合用显著降低癫痫发作强度、延长发作潜

伏期,表明人参皂苷 C-K 与拉莫三嗪能协同增强抗癫痫疗效,为开发抗癫痫复方制剂提供理论基础和科学依据。

参考文献

- [1] Moshe SL, Perucca E, Ryvlin P, et al. Epilepsy: new advances[J]. *Lancet*, 2015, 385(9971):884-898.
- [2] Schmidt D, Schachter SC. Drug treatment of epilepsy in adults[J]. *BMJ*, 2014, 348:g254.
- [3] Lian XY, Zhang ZZ, Stringer JL. Anticonvulsant activity of ginseng on seizures induced by chemical convulsants[J]. *Epilepsia*, 2005, 46(1):15-22.
- [4] Yang XD, Yang YY, Ouyang DS, et al. A review of biotransformation and pharmacology of ginsenoside compound K[J]. *Fitoterapia*, 2015, 100:208-220.
- [5] Park JS, Shin JA, Jung JS, et al. Anti-inflammatory mechanism of compound K in activated microglia and its neuroprotective effect on experimental stroke in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341(1):59-67.
- [6] Bae MY, Cho JH, Choi IS, et al. Compound K, a metabolite of ginsenosides, facilitates spontaneous GABA release onto CA3 pyramidal neurons [J]. *J Neurochem*, 2010, 114(4):1085-1096.
- [7] Jang S, Ryu JH, Kim DH, et al. Changes of [3H] MK-801, [3H] muscimol and [3H] flunitrazepam binding in rat brain by the prolonged ventricular infusion of transformed ginsenosides [J]. *Neurochem Res*, 2004, 29(12):2257-2266.
- [8] Inoue O, Sugiyama E, Hasebe N, et al. Methyl ethyl ketone bloC-Ks status epilepticus induced by lithium-pilocarpine in rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(3):872-878.
- [9] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3):281-294.
- [10] 于雷,李成龙,于珊珊. 人参皂苷 C-K 的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2013(01):31-35.
- [11] Lee J, Lee E, Kim D, et al. Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 122(1):143-148.
- [12] Lee JH, Kim SR, Bae CS, et al. Protective effect of ginsenosides, active ingredients of *Panax ginseng*, on kainic acid-induced neurotoxicity in rat hippocampus [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 325(2):129-133.
- [13] Kim S, Rhim H. Ginsenosides inhibit NMDA recep-

- tor-mediated epileptic discharges in cultured hippocampal neurons [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27 (5):524-530.
- [14] Shin EJ, Koh YH, Kim A Y, et al. Ginsenosides attenuate kainic acid-induced synaptosomal oxidative stress via stimulation of adenosine A(2A) receptors in rat hippocampus [J]. Behav Brain Res, 2009, 197 (1):239-245.
- [15] Tohda C, Matsumoto N, Zou K, et al. Abeta (25-35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, a metabolite of protopanaxadiol-type saponins [J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 29(5):860-868.
- [16] Zhang H, Li Z, Zhou Z, et al. Antidepressant-like effects of ginsenosides: A comparison of ginsenoside Rb3 and its four deglycosylated derivatives, Rg3, Rh2, compound K, and 20(S)-protopanaxadiol in mice models of despair [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2016, 140:17-26.
- [17] Moon J, Park HK, Chu K, et al. The HLA-A * 2402/Cw * 0102 haplotype is associated with lamotrigine-induced maculopapular eruption in the Korean population [J]. Epilepsia, 2015, 56 (10): e161-e167.
- [18] Ordonez L, Salgueiro E, Jimeno FJ, et al. Spontaneous reporting of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis associated with antiepileptic drugs [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19 (14):2732-2737.
- [19] Kim JR, Choi J, Kim J, et al. 20-O-beta-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol-fortified ginseng extract attenuates the development of atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1):365-371.
- [20] Shin YW, Bae EA, Kim SS, et al. Effect of ginsenoside Rb1 and compound K in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis [J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(7-8):1183-1191.

Effects of ginsenoside C-K on seizure activity in pilocarpine-induced epileptic rats

ZENG Xiangchang¹, ZHOU Luping¹, CHEN Lulu¹, LUO Wei¹, LI Chaopeng¹, GAO Qing¹, WANG Yaqin¹, WANG Xintong¹, HU Kai², SHEN Jie³, OUYANG Dongsheng¹

¹Department of Clinical Pharmacology, Xiangya Hospital, Central South University, Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Hunan Key Laboratory of Pharmacogenetics, Changsha 410078, Hunan, China; ²Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China; ³Pharmacy School of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China

ABSTRACT AIM: To investigate the effects of ginsenoside C-K on behavior in epileptic rats and its synergistic effect with lamotrigine. **METHODS:** 70 male SD rats were randomly divided into normal group, model group, lamotrigine group, ginsenoside C-K low, middle, high group, lamotrigine and ginsenoside C-K combination group. Rats in model group and treatment group were prepared for epilepsy animal model by intraperitoneal injection of lithium chloride-pilocarpine after administration of lamotrigine or ginsenoside C-K. Behavior changes were closely observed by video monitoring system after pilocarpine. Behavioural seizure activity was scored according to Racine grading standard and recorded seizure latency. **RESULTS:** After treatment of ginsenoside C-K, the treatment group rats exhibited sig-

nificant an increase in seizure latency compared with epilepsy model group. The loss of body weight reduced significantly in these surviving animals pretreated with ginsenoside C-K ($n = 10$, $P < 0.05$). Intriguingly, the complex of ginsenoside C-K and lamotrigine reduces seizure intensities, seizure latency was further prolonged ($n = 10$, $P < 0.05$). **CONCLUSION:** Ginsenoside C-K can exhibit an antiepileptic effect. The combination of ginsenoside C-K and lamotrigine have synergistic anti-epileptic effect.

KEYWORDS ginsenoside C-K; lamotrigine; epilepsy; seizure activity