

丁二酸及丁烯二酸几何异构体的抗惊厥作用

章鸣玉 张士善 (河北医学院, 石家庄 050017)

提要 比较几种丁二酸类似物抗小鼠最大电休克ED₅₀和95%可信限: ip时, 反丁烯二酸(6.3 ± 1.3 mmol/kg) < 丁二酸(9.3 ± 1.4 mmol/kg), 顺丁烯二酸无效; icv时, 反丁烯二酸(8.9 ± 1.8 nmol) < GABA(71 ± 10 nmol) < 丁二酸(86 ± 25 nmol) < 顺丁烯二酸(276 ± 82 nmol). 抗氨基脲惊厥强度为反丁烯二酸 = 丁二酸 > 顺丁烯二酸. ip 丁二酸 10 mmol/kg 可使正常小鼠脑内 GABA 含量提高 19.2%, 并能拮抗氨基脲惊厥鼠脑内 GABA 水平的下降. 结果证明, 丁二酸类似物抗惊厥作用与脑内 GABA 含量升高有关.

关键词 丁二酸; 反丁烯二酸; 顺丁烯二酸; 电休克; 氨基脲; 抗惊厥; γ -氨基丁酸

丁二酸(琥珀酸)具有多方面的中枢抑制作用⁽¹⁾. 反丁烯二酸也有较好的抗电休克及协同戊巴比妥的作用⁽²⁾. 顺丁烯二酸有无类似作用, 未见报道. 鉴于它们的分子结构与 γ -氨基丁酸(GABA)接近, 而 GABA 又是中枢神经系统主要的抑制性递质, 因此, 本文探讨了丁二酸类似物抗惊厥作用的构效关系及对脑内 GABA 水平的影响.

1981年5月28日收稿 1981年10月5日修回

方法和结果

1. 抗小鼠最大电休克 ED₅₀ 的比较 实验用体重 17-23 g 小鼠, ♀♂ 兼有, 药物均以重蒸馏水配制, 用 4 N NaOH 调至 pH 6.4, 剂量按游离酸计, 给小鼠 ip 30 min 后, 用 100 V 交流电通过耳电极刺激 0.3 s, 以后肢伸直为惊厥指标⁽³⁾。实验均在上午进行, 室温 18-22°C。抗电休克半数有效量系用机率单位法计算。

生理盐水组抗电休克率为 0.2, 因此, 低于此值即视为无效。

在受试药物中, 丁酸(10-24.4 mmol/kg) 和 r-羟基丁酸钠(2.5-20 mmol/kg) 出现明显肌松作用, 抗电休克率分别为 0.4 和 0.5-0.7, 无剂量反应关系。后者在剂量为 20 mmol/kg 时产生麻醉作用, 低于 2.5 mmol/kg 时无效。

丙二酸、戊二酸和顺丁烯二酸在剂量为 2, 4, 8, 16 mmol/kg 时均无效。

丁二酸和反丁烯二酸的 ED₅₀±95% 可信限分别为 9.3±1.4 和 6.3±1.3 mmol/kg, P<0.01。

2. 溶液 pH 值对丁二酸抗电休克作用的影响 丁二酸溶液以 4 N NaOH 调节至 pH 4.1, 给小鼠 ip, 方法同上。测得 ED₅₀±95% 可信限为 2.658±0.58 mmol/kg, 比 pH 6.4 时作用有非常显著增强 (P<0.001)。同时以 Tris-HCl 缓冲液 (pH 4.1)、1% NaH₂PO₄ (pH 4.4) 和生理盐水 (pH 6.4) 作比较, 每鼠 ip 0.3 ml, 测得抗电休克率分别为 10/30、7/30 与 5/30, 差异不显著 (P>0.05)。

结果提示, 酸性环境本身虽有一些抗惊厥作用, 但主要是增强有机酸的作用。

3. 脑室注射 (icv) 和 ip 时抗电休克 ED₅₀ 的比较 小鼠体重 18-23 g, ♀♂ 皆用。药物用生理盐水配制, 用前调整至 pH 7.2。每鼠 icv 10 μl, 10 min 后电刺激, 测得 ED₅₀ 如表 1。

以上结果表明, icv 时抗电休克作用强度

Table 1. ED₅₀ of succinate analogues against maximal electroshock seizures in mice

	ED ₅₀ ±95% confidence limits		icv/ip dose ratio
	icv(nmol)	ip(mmol/kg)	
GABA	71±10		
fumarate	8.9±1.8**	6.3±1.4*	1:14135
succinate	86±25*	9.3±1.3	1: 2155
maleate	276±82**		

Compared with GABA * P<0.05, ** P<0.01

Compared with succinate # P<0.01

为反丁烯二酸>GABA> 丁二酸> 顺丁烯二酸, 与 ip 结果一致。

4. 抗化学性惊厥试验 17-23 g 小鼠, ♀♂ 兼用。每鼠 iv 2% 氨基脲 200 mg/kg⁽¹⁾ 的同时, 给药组分别 ip 5.9% 丁二酸、5.8% 反丁烯二酸和 5.8% 顺丁烯二酸(用 4 N NaOH 调节至 pH 6.4, 剂量均为 10 mmol/kg), 对照组 ip 等容量生理盐水, 1 h 后重复 1 次 ip。于给完氨基脲后 3 h 停止观察, 以第 1 次出现阵挛的时间作为惊厥潜伏期, 结果见表 2。生理盐水组全部出现反复阵挛, 直至死亡。顺丁烯二酸组小鼠在出现惊厥前有较长时间的震颤, 一出现惊厥即死亡。

从表 2 结果看出, 反丁烯二酸和丁二酸抗化学性惊厥作用强度相等, 而顺丁烯二酸作用仍然最弱。

5. 丁二酸抗氨基脲惊厥时脑内 GABA 和谷氨酸(L-GA)的含量测定 ♀小鼠, 22-26 g, 随机分为 3 组: (1) 正常组; (2) 生理盐水组; (3) 丁二酸组。除正常组不作处理外, 其余 2 组按方法 4 给药。

生理盐水组在出现惊厥时立即处死, 丁二酸组在给氨基脲后 1.5 h 处死。

三组小鼠分别断头, 将鼠头立即投入液 N₂, 在冷冻状态下取脑, 除去小脑, 称重, 用冰冷的 75% EtOH 制成匀浆。脑匀浆离心 (400 g/min, 20 min), 上清液置水浴上蒸干。待冷后按每 g 脑组织用 2.5 ml 重蒸馏水溶解

Table 2. Effect of succinate analogues on convulsion induced by semicarbazide

	Number of mice			Convulsion latent period (min) $\bar{x} \pm SD$	P value
	Tested	Convulsed	Died		
A NS	28	28	28	78 \pm 25	
B succinate	28	22	16	133 \pm 44	<0.001(A:B)
C NS	19	19	19	78 \pm 31	
D maleate	19	19	19	107 \pm 24	<0.01(C:D) <0.01(D:E)
E fumarate	18	16	12	135 \pm 31	<0.001(C:E) >0.9(B:E)

残渣,再离心,贮于4℃冰箱直至分析⁽⁴⁾。

含量测定按纸层析法⁽⁴⁾并作若干改进。用新华1号滤纸单向层析,点样25 μ l (测GABA)或5 μ l (测L-GA),溶剂系统为正丁醇:冰乙酸:水=3:1:5 (v/v),展开19-20 h (20-22℃),在室温下干燥后喷以0.5%茚三酮丙酮溶液,于80℃加热20 min,显色后分别剪下GABA和L-GA斑点,以0.005% CuSO₄溶液(用75% EtOH配制)2 ml浸脱,用721型分光光度计在512 nm处读得光密度。将数据代入预先测试并拟合的二条直线回归方程,分别得到GABA及L-GA含量,并作t测验。

结果,氨基脲处理组比正常小鼠脑内GABA含量下降55%($P < 0.001$);用丁二酸治疗后恢复到正常值的62%,与未经治疗组相比,差异显著($P < 0.05$)。但各组L-GA的含量并无显著差异($P \gg 0.05$)(表3)。

6. 丁二酸对正常小鼠脑内GABA含量的影响 同窝小鼠2批,体重13-17 g,按随机区组法分成2组。实验组ip 5.9%丁二酸(pH 6.4) 10 mmol/kg,对照组ip等容量生理盐

水,1 h后断头、冷冻、取脑,测GABA含量。

结果,对照组小鼠脑内GABA含量为191 \pm (SD)6 μ g/g,丁二酸组为228 \pm 7 μ g/g,比对照组平均升高19% ($P < 0.01$)。

7. 油水分分配系数的测定 0.1 N 丁二酸、顺丁烯二酸和0.01 N 反丁烯二酸水溶液分别与等容量环己烷(分析纯)振摇2 h,放置4 h (室温18℃)。待完全分层后,用与各药相当浓度的NaOH滴定水层中的有机酸,同时分别滴定等容量上述3种水溶液中的有机酸,计算出环己烷中的有机酸含量。环己烷与水层中有机酸含量之比即油水分分配系数。结果为:反丁烯二酸(6.7×10^{-3}) > 顺丁烯二酸 (3.0×10^{-3}) > 丁二酸(2.6×10^{-3})。

讨 论

丁二酸类似物抗小鼠最大电休克作用存在明显的构效关系:3碳和5碳二元酸几乎无效;4碳酸中丁酸和r-羟基丁酸具有不同的作用方式;而丁烯二酸几何异构体仅羧基的空间位置不同,作用却有很大差异。无论icv或

Table 3. Content of GABA and L-GA (glutamic acid) in mouse brain during succinate against convulsion induced by semicarbazide, $\bar{x} \pm SD$

	GABA content (μ g/g brain)	L-GA content (μ g/g brain)
A control	183 \pm 34 (n=9)***	1884 \pm 570 (n=5)*
B semicarbazide+NS	82 \pm 25 (n=7)	1598 \pm 678 (n=5)
C semicarbazide+succinate	114 \pm 27 (n=9)**	1456 \pm 475 (n=6)*

Compared with B * $P > 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

ip, 均以反丁烯二酸为最强, 顺丁烯二酸最弱, 而丁二酸介于二者之间. 抗化学性惊厥有类似的结果.

我们测得油水分配系数为反丁烯二酸 > 顺丁烯二酸 > 丁二酸. 一级解离 pKa 值为顺丁烯二酸 (1.93) < 反丁烯二酸 (3.03) < 丁二酸 (4.21)⁽⁶⁾. 烯键增大脂溶性, 但因共轭效应而促进一级解离, 顺丁烯二酸则因空间效应而更易解离. 因此, 反丁烯二酸和丁二酸比顺丁烯二酸容易进入脑内. 溶液 pH 降低时, 有机酸解离减少, 进入脑内的量相应增加, 故效应亦随之增强.

然而, 几何异构体理化性质不同导致吸收分布差异只是一方面的原因. 据报道, GABA 以部分伸展和几乎平坦的构象与 bicuculline 敏感的受体交互作用⁽⁶⁾, 各种构象中 $-\text{NH}_2$ 与 $-\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ 的距离在 2.4 Å (折迭型) 和 4.8 Å (伸展型) 之间⁽⁷⁾. 我们根据键长、键角计算, 得出顺丁烯二酸和反丁烯二酸羧基间距离分别与此接近, 而丁二酸则与这两种构象均能适合. 它们是否直接激活 GABA 受体, 有待进一步研究.

Acta Pharmacologica Sinica 1982 Mar; 3 (1): 13—16

ANTICONVULSIVE ACTION OF SUCCINATE AND GEOMETRICAL ISOMERS OF ETHYLENE-1, 2-DICARBOXYLIC ACID

ZHANG Ming-yu, ZHANG Shi-shan (Hebei Medical College, Shijiazhuang 050017)

ABSTRACT The ED₅₀ and 95% confidence limits of 4 succinate analogues against the seizure induced by electric shock were compared in mice. For ip injections, fumarate (6.3±1.3 mmol/kg) < succinate (9.3±1.4 mmol/kg) and maleate had no effect; while for intraventricular(icv) injections, fumarate (8.9±1.8 nmol) < GABA (71±10 nmol) < succinate (86±24 nmol) < maleate (276±81 nmol). The relative potencies of anticonvulsive effects against semicarbazide were fumarate =

我们的实验证明, 丁二酸抗惊厥作用与提高脑内 GABA 含量有关. 鉴于其结构与 GABA 的相似性, 以及作用时效上不同于不可逆的 GABA-T 抑制剂 r-乙炔基 GABA 等⁽⁸⁾, 可否设想丁二酸类似物系通过竞争性抑制 GABA-T 而起作用.

致谢 王兰芬和郭鸣放同志协助技术工作.

参 考 文 献

- 1 金 园、张士善. 药学学报 1980 年 12 月; 15 (12):761
- 2 王大林、马惠玲、高明珠、沈 毅、余芝龙. 中草药通讯 1979 年 12 月; 10(12):548
- 3 汤 健、裴印权. 北京医学院学报 1978 年 6 月; (2):83
- 4 Sytinski IA, Priyatkina TN. *Biochem Pharmacol* 1966 Jan; 15(1):49
- 5 Stenlake JB. Diacid acids. In: Stenlake JB, ed. *Foundation of molecular pharmacology*, vol 1. 1st ed. London: Athlone Press, 1979:326
- 6 Adrews PR, Jonston GAR. *Biochem Pharmacol* 1979 Sep; 28(18):2697
- 7 Segal M, Sims K, Smissman E. *Br J Pharmacol* 1975 Jun; 54(2):181
- 8 Metcalf BW. *Biochem Pharmacol* 1979 Jun; 28 (11):1705

succinate > maleate. Following ip injection of succinate (10 mmol/kg), the concentration of GABA in brain was elevated about 19%, and the decrease of GABA level produced by semicarbazide was antagonized, suggesting that the anticonvulsive action of succinate analogues was related to the rising of the brain GABA content.

KEY WORDS succinate; fumarate; maleate; electric shock; semicarbazide; anticonvulsion; GABA