

## 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ED<sub>50</sub>和95%可信限: ip时, 反丁烯二酸( $6.3 \pm 1.3$  mmol/kg) < 丁二酸( $9.3 \pm 1.4$  mmol/kg), 顺丁烯二酸无效; icv时, 反丁烯二酸( $8.9 \pm 1.8$  nmol) < GABA( $71 \pm 10$  nmol) < 丁二酸( $86 \pm 25$  nmol) < 顺丁烯二酸( $276 \pm 82$  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;  $\gamma$ -氨基丁酸

丁二酸(琥珀酸)具有多方面的中枢抑制作用<sup>(1)</sup>. 反丁烯二酸也有较好的抗电休克及协同戊巴比妥的作用<sup>(2)</sup>. 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 $\gamma$ -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 ED<sub>50</sub> 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<sup>(3)</sup>。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 ED<sub>50</sub>±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 ED<sub>50</sub>±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% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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 ED<sub>50</sub> 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 ED<sub>50</sub> 如表 1。

以上结果表明, icv 时抗电休克作用强度

Table 1. ED<sub>50</sub> of succinate analogues against maximal electroshock seizures in mice

|           | ED <sub>50</sub> ±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<sup>(1)</sup> 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 N<sub>2</sub>, 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)<br><0.01(D:E) |
| E fumarate  | 18             | 16        | 12   | 135 $\pm$ 31                                    | <0.001(C:E)<br>>0.9(B:E) |

残渣,再离心,贮于4℃冰箱直至分析<sup>(4)</sup>。

含量测定按纸层析法<sup>(4)</sup>并作若干改进。用新华1号滤纸单向层析,点样25  $\mu$ l (测GABA)或5  $\mu$ 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% CuSO<sub>4</sub>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  $\mu$ g/g,丁二酸组为228  $\pm$  7  $\mu$ 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( $6.7 \times 10^{-3}$ ) > 顺丁烯二酸 ( $3.0 \times 10^{-3}$ ) > 丁二酸( $2.6 \times 10^{-3}$ )。

## 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 ( $\mu$ g/g brain) | L-GA content ( $\mu$ 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)<sup>(6)</sup>. 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<sup>(6)</sup>, 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<sup>(7)</sup>. 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 ED<sub>50</sub> 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<sup>(8)</sup>, 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