

# 四种致惊剂及其抗惊剂对大鼠小脑 $\gamma$ -氨基丁酸和谷氨酸含量的影响

任蕴芳 金道山 周廷冲 (军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100800)

**提要** 用纸电泳比色法测定: 索曼、异丙基双环磷酸酯及印防己毒素中毒惊厥大鼠的小脑内 GABA 含量不变, 而异烟肼中毒惊厥大鼠的 GABA 含量明显下降; 安定或氯硝安定完全阻断双环磷酸酯、印防己毒素、异烟肼的致惊作用, 部分对抗索曼的致惊作用, 而不影响 GABA 的含量, 氨基氧乙酸使 GABA 含量明显升高, 并缓解异烟肼或索曼引起的惊厥; 四种致惊剂及其抗惊剂均不影响谷氨酸的含量。

**关键词** 纸电泳;  $\gamma$ -氨基丁酸; 索曼; 异丙基双环磷酸酯; 印防己毒素; 异烟肼; 氯硝安定; 氨基氧乙酸

$\gamma$ -氨基丁酸(GABA)是哺乳动物中枢神经系统的一种抑制性递质。惊厥发作可能与谷氨酸脱羧酶(GAD)的活性及 GABA 水平有关<sup>(1)</sup>。谷氨酸是 GABA 的前体,可能是脑内一种兴奋性递质。索曼、异丙基双环磷酸酯(IPTBO)、印防己毒素都是强致惊剂,抗结核药异烟肼在较大剂量也可致严重惊厥。为了探讨 GABA 系统在惊厥发生中的作用,本文以纸电泳比色法测定了这四种致惊剂及其抗惊剂氨基氧乙酸(AOAA)、安定或氯硝安定对大鼠小脑内 GABA 和 Glu 含量的影响。

## 材料和 方法

**毒品、药品** 索曼是军事医学科学院药理毒理所赠。IPTBO 是王崇铨同志赠。印防己毒素购自天丰化学制药厂,批号 600517。异烟肼是上海第七制药厂静脉注射制剂。安定购自北京制药厂,批号 79120913。氯硝安定是美国 SIGMA 化学公司产品, Lot 014049。AOAA 是美国 SIGMA 化学公司产品, Lot 118 C-0070。标准 GABA 及 Glu 购自上海试剂供应站,经本实验室多次重结晶纯化,纸电泳为一点。

**大鼠分组及实验处理** 体重  $195 \pm (SD) 20$  g 的  $\delta$  大鼠,随机分组。中毒组分别 ip(或 sc) 1 个  $CD_{50}$  剂量的致惊剂,于首次发生惊厥时断头取脑,不惊厥大鼠于给毒剂 1 h 后断头取脑。对照组大鼠在中毒组首次惊厥时断头取脑。抗惊剂组分别在 ip 氯硝安定或安定 30 min 后、ip AOAA 1 h 后断头取脑。惊厥作用观察是用给致惊剂后 1 h 内大鼠惊厥所得的分数来表示:不惊厥不得分,轻度惊厥(+)得 1 分,中度惊厥(++)得 2 分,重度惊厥(+++)得 3 分,各组平均得分按总分/鼠数计算。

**脑组织提取液的制备** 大鼠快速断头取出小脑,迅速投入 6 ml 预冷的 0.4 N HClO<sub>4</sub> 中,用玻璃匀浆器磨成匀浆,离心(2000  $\times$  g, 20 min),沉淀按 Folin 酚试剂法定量蛋白质<sup>(2)</sup>,上清液以 4 N KOH 中和至 pH 6.5-7.0, 4 $^{\circ}$ C 放置 2 h 再离心(2000  $\times$  g, 10 min)后取全部上清液 80 $^{\circ}$ C 烤干,以 150  $\mu$ l 双蒸水溶解全部残渣并再离心,取上清液测定。

**纸电泳比色测定** 用国产新华层析滤纸,点样 10  $\mu$ l,以 10 nmol 标准 GABA 和 GLU 为平行对照,电压 300 V,电位梯度 15 V/cm,电流强度 2 mA/cm,温度 15 $^{\circ}$ C  $\pm$  2 $^{\circ}$ C,电泳 1 h,晾干挥尽吡啶,以 0.1% 醋酸镉-1% 茚三酮丙酮液(临用前新鲜配制)喷雾显色,80 $^{\circ}$ C 烘 10 min 后剪取欲测氨基酸色点,以 85% 乙醇浸泡洗脱 30 min,在 721 型分光光度计(波长 505 nm)比色测定 OD,计算公式为:脑组织 GABA (或 Glu) 含量 = (样品 OD  $\times$  150 / 标准 OD / mg protein)

## 结 果

**方法考核** 标准 GABA 及 GLU 在 50-80 nmol 和光密度呈线性关系,见图 1。复管

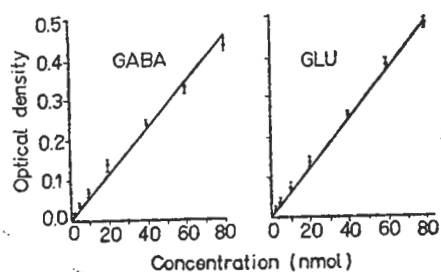


Fig 1. Standard curves for GABA and glutamic acid,  $\bar{x} \pm SD$  ( $n=3$ )

的变异系数(C. V): GABA 为 3.8—5.2%, GLU 为 2.9—4.4%。所测提取液中的 GABA 色点、GLU 色点和标准品的  $R_f$  值完全一致, 见图 2。GABA 的回收率为  $96 \pm 15\%$ , GLU 的回收率为  $88 \pm 12\%$ 。

**四种致惊剂及其抗惊剂对 GABA 和 GLU 含量的影响** 给药组大鼠小脑内 GABA 含量与对照组相比, 异烟肼中毒惊厥组 GABA 含量明显降低, AOAA 给药组 GABA 含量明显升高, 索曼、印防己毒素、IPTBO、氯硝安定或安定均不影响 GABA 含量。所有给药组大鼠小脑内 Glu 的含量均未见明显变化, 见表 1。

**三种抗惊剂的抗惊作用** 本实验中氯硝安定或安定能完全阻断异烟肼、IPTBO、印防己

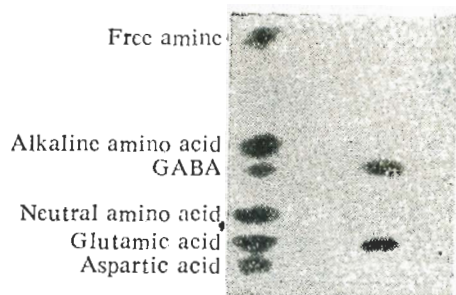


Fig 2. Paper electrophoresis of standard solution (right) and the extract from cerebellum (left).

毒素的致惊作用, 部分对抗索曼的致惊作用; AOAA 则能减轻异烟肼或索曼的中毒惊厥, 见表 2。

## 讨 论

脑组织中 GABA 的测定, 最早采用双向纸层析分光光度法, 操作费时, 灵敏度和重现性较差。近年来酶法、气相色谱—质谱等新技术很灵敏, 但要求特定的试剂和昂贵的仪器设备。我们用纸电泳比色法可以同时测定大鼠脑内 GABA 和 Glu 的浓度, 简便易行、特异性较好。一般实验室有条件做, 且可用于 GABA 或 GLU 的分离、纯化。所测动物处死方法, 宜采用微波杀生器或断头后立即投入液  $N_2$ , 以防止

Tab 1. Effects of 4 convulsants and 3 anticonvulsants on GABA and GLU contents in cerebellum of rats.  $\bar{x} \pm SD$  (number of rats) \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

Drug	Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ )	GABA (nmol/mg protein)	Glutamic acid ( $\mu\text{mol/mg protein}$ )
Distilled water*		$11.7 \pm 2.2(12)$	$0.09 \pm 0.02(12)$
Propylene-glycol**		$11.4 \pm 1.3(10)$	$0.11 \pm 0.01(10)$
IPTBO	0.47 (ip)	$12.3 \pm 1.0^*(9)$	$0.11 \pm 0.01^*(9)$
Picrotoxin	14.9 (ip)	$11.4 \pm 1.0^*(7)$	—
Isoniazid	3650 (ip)	$6.5 \pm 1.0^{***}(7)$	$0.09 \pm 0.01^*(7)$
Soman	0.49 (sc)	$12.2 \pm 1.7^*(7)$	$0.09 \pm 0.01(7)$
AOAA	336 (ip)	$17.9 \pm 0.6^{***}(6)$	$0.09 \pm 0.01^*(6)$
Clonazepam	9.5 (ip)	$10.9 \pm 1.6^*(8)$	$0.11 \pm 0.01^*(8)$
Diazepam	17.6 (ip)	$10.3 \pm 1.1^*(5)$	—

\* control for drug soluble in water. \*\* control for drug insoluble in water

Tab 2. Effects of clonazepam, diazepam and AOAA on the convulsion induced by 4 convulsants.

Drug	Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ )	Onset of convulsions(min)	Convulsions				Mean score
			none	mild	moderate	severe	
IPTBO	0.47 (ip)	12	2	0	0	7	2.3
picrotoxin	14.9 (ip)	11	0	0	0	7	3.0
isoniazid	3650 (ip)	29	0	0	0	7	3.0
soman	0.49 (sc)	12	2	0	3	7	2.3
clonazepam + IPTBO	9.5 (ip)	—	8	0	0	0	0
clonazepam + picrotoxin	9.5 (ip)	—	5	0	0	0	0
clonazepam + isoniazid	9.5 (ip)	—	5	0	0	0	0
diazepam + soman	17.6 (ip)	14	2	3	3	0	1.1
AOAA + soman	336 (ip)	21	4	2	8	0	1.3
AOAA + isoniazid	336 (ip)	51	1	0	0	4	2.4

Control groups were injected 1  $\text{CD}_{99}$  convulsants. Experimental groups were injected clonazepam (or diazepam) and AOAA 1/2 h and 1 1/2 h before injecting convulsants.

动物死后 GABA 增加效应. 我们受设备条件及液  $\text{N}_2$  冷冻后脑分区困难的限制, 采用快速断头取脑(1 min 内完成), 则死后增加不超过 18%<sup>(3)</sup>. 本实验选用大鼠的小脑是因为各脑区中以小脑对 [ $^3\text{H}$ ]GABA 的结合能力为最高<sup>(4,5)</sup>.

GABA 系统在惊厥的产生中是重要的. 本实验中见到: 异烟肼中毒惊厥大鼠的小脑 GABA 含量明显下降, 这可能是由于异烟肼能与体内的吡哆醛缩合成异烟胺而使 GAD 失活. 其余三种致惊剂均不影响 GABA 含量, 但据文献报道 IPTBO 有相当强的阻断 GABA 受体系统的作用<sup>(6)</sup>、印防己毒素阻断 GABA 诱导的  $\text{Cl}^-$  通道或 GABA 受体与离子孔之间的接点<sup>(7)</sup>、索曼中毒出现的惊厥症状并非都是由于 AChE 被抑制后 ACh 积蓄所造成的, 而可能与 GABA 功能系统有关<sup>(8)</sup>. AOAA 是一种 GABA 转氨酶抑制剂, 它具有一定的抗惊作用可能与它能明显升高大鼠小脑内 GABA 浓度相关. 氯

硝安定或安定的抗惊作用与大鼠小脑内 GABA 含量无关, 主要可能与它们具有提高 GABA 调节的突触抑制作用有关<sup>(9)</sup>, 值得进一步探讨.

### 参 考 文 献

- 1 Wood JD, Peesker SJ. *J Neurochem* 1974; 23: 703
- 2 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951; 193: 265
- 3 Balcom GJ, Lenox RH, Meyerhoff JL. *J Neurochem* 1975; 24: 609
- 4 Chan-Palay V. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 1024
- 5 Chan-Palay V, Palay SL. *ibid* 1978; 75: 2977
- 6 Bowery NG, Collins JF, Hill RG, Pearson S. *Br J Pharmacol* 1977; 60: 275
- 7 Ticku MK, Olsen RW. *Biochim Biophys Acta* 1977 Feb; 464: 519
- 8 Lundy PM, Magor G, Shaw RK. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1978; 234: 64
- 9 Costa E, Guidotti A, Mao CC, Suria A. *Life Sci* 1975; 17: 167

## EFFECTS OF 4 CONVULSANTS AND THEIR ANTICONVULSANTS ON GABA AND GLUTAMIC ACID CONTENTS IN CEREBELLUM OF RATS

REN Yun-fang, JIN Dao-shan, ZHOU Ting-chong

*(Inst Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800)*

**ABSTRACT** With paper electrophoresis and spectrophotometric method we studied simultaneously the effects of 4 convulsants and 3 anticonvulsants on GABA and Glu contents in the cerebellum of rats. The GABA contents were decreased by isoniazid, but were not affected by soman, IPTBO, picrotoxin, clonazepam and diazepam. At appropriate doses clonazepam completely blocked the seizures induced by IPTBO, picrotoxin and isoniazid. Diazepam

reduced soman convulsion. Aminoxyacetic acid reduced soman and isoniazid convulsion. It increased the GABA content significantly. All of them did not affect Glu contents.

**KEY WORDS** paper electrophoresis; GABA; soman; isopropylbicyclic phosphate; picrotoxin; isoniazid; clonazepam; aminoxyacetic acid