

抗惊厥剂对惊厥大鼠小脑及血浆中环核苷酸含量的影响¹

蒋滋慧、程桂芳、陈嘉、王利平、周廷冲 (军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100800)

提要 用放射免疫法测定 cGMP 及蛋白质结合法测定 cAMP。观察了抗惊厥剂对双环磷酸酯和索曼致惊大鼠小脑及血浆中环核苷酸含量的影响。此两种惊厥剂均能使小脑中 cGMP 及血浆中 cAMP 升高。氯安定能阻止双环磷酸酯引起的 cAMP 及 cGMP 的升高。安定能阻止索曼引起的小脑中 cGMP 的升高。

关键词 惊厥药; 抗惊厥药; 环核苷酸; 血浆; 小脑; 索曼; 4-异丙基-2,6,7-三氧杂-1-磷双环(2,2,2)辛烷-1-氧化物; 有机磷化合物

有机磷抗胆碱酯酶药, 例如索曼, 使大鼠中毒后, 除了抑制胆碱酯酶活力外, 还引起大鼠惊厥。双环磷酸酯是一类不抑制胆碱酯酶活力的有机磷化合物, 但大鼠中毒后也导致惊厥。有报道, 有机磷中毒时, 小脑中环核苷酸含量发生变化。安定可以阻止小脑中因毒剂引起的环磷酸鸟苷(cGMP)的升高, 并且可控制惊厥的产生^(1,2)。本文目的在于观察惊厥剂及抗惊厥剂对小脑和血浆内环磷酸腺苷(cAMP)及 cGMP 含量的影响, 为探索索曼中毒惊厥发生机理提供环核苷酸方面的资料。

材料与方 法

4-异丙基-2,6,7-三氧杂-1-磷双环(2,2,2)辛烷-1-氧化物(双环磷酸酯或 IPTBO)由防化所赠送。索曼由军事医学科学院药理毒理研究所提供。安定为北京制药厂生产的注射用针剂。氯安定为美国 Hoffmann-La Roche 公司试剂产品。东莨菪碱为从洋金花中提取的氢溴酸盐(三〇七医院提供)。cAMP 及 cGMP 测定所用试剂均由本实验室和其它单位协作制备。

实验动物用体重为 $194 \pm SD 17$ g 的♂性大鼠。IPTBO、安定、氯安定及东莨菪碱均为

ip, 索曼为 sc。IPTBO 及氯安定的溶剂为丙二醇, 其它的溶剂为水。对照大鼠注射溶剂代替药物。注射抗惊厥剂 30 min 后注射惊厥剂, 惊厥动物在惊厥发生后 2 min 断头。未惊厥动物在惊厥剂注射 1 h (IPTBO 组) 或 1/2 h (索曼组) 断头。对照组实验最后进行, 以惊厥大鼠断头的平均时间作为对照组断头时间。各组大鼠断头后立即收集血液, 以 EDTA 0.5 mol/L 抗凝, 并取出小脑, 投入 0.4 mol/L 过氯酸液中制成匀浆, 小脑及血浆中 cAMP 及 cGMP 分别用无水乙醇及过氯酸提取。血浆 cAMP 及 cGMP 直接用乙醇提取物测定。小脑 cAMP 及 cGMP 进一步用阴离子交换树脂分离纯化。为了进一步消除样品中杂质的影响, 在测定小脑 cGMP 时, 样品及 [³H]cGMP 都经过乙酰化, 使所得结果比较准确。

蛋白质测定用酚试剂比色法⁽³⁾。

cAMP 测定用蛋白质结合法⁽⁴⁾。cGMP 测定用放射免疫法⁽⁵⁾。

结 果

双环磷酸酯及氯安定对大鼠血浆及小脑环核苷酸含量的影响 IPTBO 及氯安定对大鼠血浆及小脑 cAMP 及 cGMP 含量测定结果见表 1。从表中可以看到, 大鼠注射 IPTBO 后血浆中 cAMP 及小脑中 cGMP 升高。氯安定对血浆及小脑中环核苷酸无明显影响, 但它能阻止 IPTBO 引起的血浆中 cAMP 及小脑中 cGMP 的升高, 同时也制止了惊厥的发生。

安定药及抗胆碱药的抗惊厥作用 安定药及抗胆碱药东莨菪碱的抗索曼的惊厥作用都不强, 所以在观察时, 把大鼠惊厥的程度分为轻度(尾颤动)、中度(前肢向上, 有时抽动)和重度(四肢抽动, 有时跳起)三级。索曼中毒后, 大鼠发生重度惊厥较多, 安定或东莨菪碱预防

Tab 1. Effects of clonazepam on cyclic nucleotide contents in plasma and cerebellum increased by 4-isopropyl-2,6,7-trioxo-1-phosphabicyclo(2,2,2)octane 1-oxide (IPTBP). Number of rats in parentheses, $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Drugs	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Plasma level (pmol/ml)		Cerebellar level (pmol/mg protein)		Convulsion
		cAMP	cGMP	cAMP	cGMP	
Control		32 \pm 14 (11)	7 \pm 5 (11)	110 \pm 50 (11)	4.0 \pm 1.1 (11)	
IPTBO	0.26	30 \pm 12* (4)	7.2 \pm 2.5*(4)	100 \pm 60*(4)	6.5 \pm 2.9** (4)	No
		70 \pm 40*** (8)	10 \pm 4* (8)	72 \pm 20*(8)	30 \pm 5*** (8)	Yes
IPTBO	0.47	27 \pm 3* (2)	4.2 \pm 0.9*(2)	77 \pm 4* (2)	8.8 \pm 2.3*** (2)	No
		80 \pm 30*** (7)	8 \pm 4* (7)	70 \pm 30* (7)	27 \pm 13*** (7)	Yes
Clonazepam	9.50	24 \pm 10* (8)	4.1 \pm 1.9*(8)	90 \pm 30*(8)	3.6 \pm 0.9* (8)	
IPTBO + Clonazepam	0.47 9.50	34 \pm 23* (8)	3.5 \pm 1.3*(8)	120 \pm 50*(8)	4.0 \pm 1.9* (8)	No

Tab 2. Effects of anticonvulsants on convulsions induced by soman.

Drugs	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	n	Severe	Convulsions Moderate	in rats Mild	None
Soman	0.49	8	4	1	2	1
Soman + Diazepam	0.49 17.6	8		3	3	2
Soman	0.33	5	2	1	2	
Soman + Scopolamine	0.33 4.16	6	3		1	2
Soman + Diazepam + Scopolamine	0.33 17.6 4.16	7			3	4

Mild; Tremor of tail, Moderate; Four limbs upturned and twitched occasionally, Severe; Four limbs twitched and whole body jumped up occasionally.

时, 惊厥动物数稍有减少, 惊厥程度亦减轻 (见表 2)。安定、东莨菪碱与索曼伍用时, 大鼠惊厥程度均属轻度。以上结果指出, 安定对索曼的抗惊厥作用不明显, 如与东莨菪碱伍用, 抗惊厥作用有所增加。

索曼、安定及东莨菪碱对大鼠血浆及小脑环核苷酸含量的影响 测定结果见表 3。从表 3 可见, 索曼引起惊厥的大鼠小脑中 cGMP 含量升高。安定对血浆及小脑中环核苷酸均无明显影响, 但能防止索曼引起的小脑中 cGMP 的升高。安定预防组中, 惊厥大鼠血浆 cAMP 升高, 而未惊厥大鼠则无明显变化。

东莨菪碱对血浆及小脑 cAMP、cGMP 均无明显影响, 可阻止索曼引起的小脑中 cGMP 的升高, 但几乎无抗惊厥作用。安定及东莨菪碱使用时, 小脑中因素曼导致的 cGMP 升高受

到抑制, 惊厥也得到一定程度的控制。

讨 论

不同方式处理大鼠, 对组织中环核苷酸的含量有一定影响。常用的处理方法有断头、液氮速冻、微波照射、麻醉等。液氮速冻后, 在冻结状态下, 不易将小脑与周围组织分清, 如将冻块略加融化, 再取小脑, 则环核苷酸含量已受影响。小脑中 cGMP 含量远远超过周围组织的含量, 因此, 在冷冻状态下取小脑, 如染有周围组织, 足以影响测定结果。本文采用断头快速取脑, 立即投入过氧酸中, 从多次试验结果来看, 对小脑 cGMP 含量影响不大, 对 cAMP 含量有一定影响。但我们实验组和对照组在相同条件下进行, 所得结果仍能反映惊厥剂及抗惊厥剂对环核苷酸含量的影响。

Tab 3. Effects of diazepam and scopolamine on cyclic nucleotide contents in plasma and cerebellum increased by soman. Number of rats in parentheses, $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Drugs	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Plasma level($\mu\text{mol/ml}$)		Cerebellar level($\mu\text{mol/mg protein}$)		Convulsion
		cAMP	cGMP	cAMP	cGMP	
Control		46 \pm 18 (6)	8.4 \pm 2.8 (6)	110 \pm 40 (6)	5.3 \pm 1.0 (6)	
Soman	0.49	90 \pm 40** (7) 89.6 (1)	13 \pm 6* (7) 13.1 (1)	90 \pm 50* (7) 119.7 (1)	12 \pm 4*** (7) 5.98 (1)	Yes No
Soman	0.33	110 \pm 50** (3)	18 \pm 5*** (3)	132 \pm 26* (3)	8.9 \pm 0.5*** (3)	Yes
Scopolamine	4.16	64 \pm 15* (6)	15 \pm 4*** (6)	140 \pm 40* (6)	8 \pm 3* (6)	
Diazepam	17.6	39 \pm 19* (7)	7.1 \pm 1.0* (7)	100 \pm 50* (7)	4.0 \pm 2.0* (7)	
Soman + Diazepam	0.49 17.6	195 \pm 8*** (6) 27 \pm 11* (2)	12 \pm 6* (6) 8 \pm 4* (2)	74 \pm 10* (6) 125 \pm 13* (2)	4.1 \pm 1.6* (6) 5.3 \pm 0.2* (2)	Yes No
Soman + Scopolamine	0.33 4.16	66 \pm 26* (4) 42 \pm 19* (2)	24 \pm 17* (4) 14 \pm 4* (2)	100 \pm 40* (4) 120 \pm 50* (2)	5.3 \pm 2.2* (4) 6 \pm 4* (2)	Yes No
Soman + Diazepam + Scopolamine	0.33 17.6 4.16	69 \pm 19* (3) 47 \pm 9* (4)	6.4 \pm 2.4* (3) 10.8 \pm 1.9* (4)	130 \pm 30* (3) 150 \pm 40* (4)	6 \pm 3* (3) 5 \pm 3* (4)	Yes No

抗惊厥剂能制止惊厥剂引起的大鼠血浆 cAMP 和小脑 cGMP 升高, 但抗惊厥剂预防的大鼠中仍发生惊厥者, 小脑 cGMP 含量也处于正常水平。这说明血浆中 cAMP 含量升高与惊厥的关系密切, 而小脑中 cGMP 升高与惊厥的发生无直接联系。但惊厥剂既然引起小脑 cGMP 升高, 可能与环核苷酸酶系的其它方面有关。

我们还观察了另外两种抗胆碱药, 苯乙托品及羟基苯乙酸衍生物, 其效果与东莨菪碱相似。我们用较小剂量(9.5 $\mu\text{mol/kg}$)氯安定能全部对抗双环磷酸酯引起的惊厥; 而同样或更大剂量的氯安定不能对抗索曼引起的惊厥(结果未列入表)。用较大剂量的安定(17.6 $\mu\text{mol/kg}$)未能全部对抗索曼引起的惊厥(对抗 2/8), 安定与抗胆碱药伍用时, 才能提高对索曼的抗惊厥作用(对抗 4/7)。这些资料也都支持了上述观点。

参 考 文 献

1 Mattsson H, Brandt K, Heilbronn E. Bicyclic

phosphorus esters increase the cyclic GMP level in rat cerebellum. *Nature* 1977; 268 : 52

- Lundy PM, Magor GF. Cyclic GMP concentrations in cerebellum following organophosphate administration. *J Pharm Pharmacol* 1978; 30 : 251
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 中国医学科学院首都医院基础组, 中国人民解放军 59170 部队, 中国科学院原子能研究所. 环磷酸腺苷的蛋白质结合测定法. 见: 放射免疫分析及其它放射体外测定方法编辑组编. 放射免疫分析及其它放射体外测定方法. 第 1 版. 北京: 原子能出版社, 1976; 228-34
- 刘景生、李樾明、王振纲, 等. 环鸟苷酸 (cGMP) 放射免疫测定方法. *中国药理学报* 1981; 2 : 67
- Kimura H, Thomas E, Murad F. Effects of decapitation, ether and pentobarbital on guanosine 3', 5'-phosphate and adenosine 3', 5'-phosphate levels in rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1974; 343 : 519

Effects of anticonvulsants on cyclic nucleotide contents in plasma and cerebellum of convulsive rats¹

JIANG Zi-Hui, CHENG Gui-Fang, CHEN Jia, WANG Li-Ping, ZHOU Ting-Chong
(*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800*)

ABSTRACT With radioimmunoassay of cyclic GMP and protein binding radiometric assay of cyclic AMP we studied the effects of clonazepam, diazepam and scopolamine on cyclic nucleotide contents in plasma and cerebellum of convulsive rats. Bicyclic phosphoester and soman induced convulsion in rats. Both bicyclic phosphoester (0.26 $\mu\text{mol/kg ip}$) and soman (0.49 $\mu\text{mol/kg sc}$) caused the increase of cerebellar cyclic GMP from 4.0 ± 1.1 to 30 ± 5 pmol/mg protein, $p < 0.01$ and 5.3 ± 1.0 to 12 ± 4 pmol/mg protein, $p < 0.01$ respectively; plasma cyclic AMP from 32 ± 14 to 70 ± 40 pmol/ml, $p < 0.01$ and 46 ± 18 to 90 ± 40 pmol/ml,

$p < 0.05$ respectively. Clonazepam blocked the increase of plasma cyclic AMP and cerebellar cyclic GMP induced by bicyclic phosphoester. Diazepam prevented an increase of cerebellar cyclic GMP which was induced by soman.

KEY WORDS convulsants; anticonvulsants; cyclic nucleotides; plasma; cerebellum; soman; 4-isopropyl-2,6,7-trioxa-1-phosphabicyclo(2,2,2)octane 1-oxide; organophosphorus compounds

¹ Project supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences, No 152