

4-氨基吡啶和3,4-二氨基吡啶对兔实验性自身免疫重症肌无力的治疗¹

李莉, 章元沛 (浙江医科大学药理学系药理教研室, 杭州 310006, 中国)

R 971.8

Therapy of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits with 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine¹

LI Li, ZHANG Yuan-Pei

(Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT The autoimmune myasthenia gravis (AMG) in rabbits was produced by intradermal injection of *N*-AChR-rich membrane vesicles isolated from the electric organ of *Narcine limlei*. After iv 4-aminopyridine (4-AP) 0.8 mg·kg⁻¹ to 8 AMG rabbits, their general posture improved promptly, the features of gastrocnemius compound action potentials and toe twitches elicited by 4-Hz stimuli applied to the sciatic nerve returned to normal, and the tetanic plateau evoked by 50-Hz indirect stimulation was again well sustained. This improved condition lasted 9.1 ± 2.5 h. Other 8 AMG rabbits given 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) 0.4 mg·kg⁻¹ showed a similar improvement for 9.3 ± 3.1 h. These results indicated that 4-AP and 3,4-DAP were effective in treating the AMG in rabbits, they may be useful in the clinical treatment of myasthenia gravis patients.

KEY WORDS pyridines; myasthenia gravis; autoimmune diseases

A 摘要 以 *N*-AChR 膜微囊免疫家兔, 造成重症肌无力模型。iv 4-AP 0.8 mg·kg⁻¹ 后病兔

Received 1993-08-18

Accepted 1993-11-17

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 3870896.

的肌无力症状迅速缓解。以 4 Hz 电流刺激坐骨神经, 腓肠肌复合肌电位和足趾收缩即由递减变为整齐; 50 Hz 电流引起的强直收缩能保持。作用维持 9.1 ± 2.5 h。iv 3,4-DAP 0.4 mg·kg⁻¹ 可获相似效果, 持续 9.3 ± 3.1 h。两药有明显的对症治疗作用。

关键词 吡啶类; 重症肌无力; 自身免疫疾病

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是一种以神经肌接头传递功能障碍为特点的自身免疫性疾病, 目前临床上采用抗胆碱酯酶药、免疫抑制药、胸腺切除术等措施进行治疗, 效果未臻理想^[1]。鉴于 4-氨基吡啶(4-AP)在神经肌接头处能促进冲动诱发的乙酰胆碱(ACh)释放, 改善传递功能^[2-4], 曾试用于 MG 的治疗^[5], 而其同类药 3,4-二氨基吡啶(3,4-DAP)^[3-4]则未见对 MG 疗效的报道, 我们乃一并在实验性自身免疫重症肌无力(AMG)兔身上进行了试验。

MATERIALS AND METHODS

兔 日本大耳白兔 40 只, 体重 2.1 ± 0.3 kg, ♂, ♀ 兼用, 由本校实验动物中心供应。

药品 *N*-乙酰胆碱受体(*N*-AChR)富集膜微囊, 从丁氏双鳍电鳐的发电器官分离而得, 由北京军事医学科学院毒物药物研究所惠赠, 比活性 1170 ± 115 pmol 结合点/mg 蛋白; 4-AP (Alfa); 3,4-DAP (Sigma); 戊巴比妥钠(上海试剂二厂); 氯化筒箭毒碱(*α*-tubocurarine chloride, *α*-TC, 注射液, 上海第十制药厂); 甲基硫酸新斯的明(注射液, 上海信谊药厂)。

仪器 YSD-药理、生理多用仪(蚌埠无线电二厂); RS3400 多功能生理记录仪(Gould Inc.)。

免疫接种 将 *N*-AChR 富集膜微囊悬液(9.8 mg 蛋白·ml⁻¹^[6])与等量 Freund 氏完全佐剂混合, 制成

乳剂,以背部皮内多点注射法免疫兔,于免疫的 d 1, d 15及 d 56注射3次,逐日观察兔的变化。

症状分级 观察兔的体重、食量、呼吸、姿势和活动情况。参照标准^[7,8]将 MG 症状分为四级:(1)基本正常;没有肯定的肌无力表现。(2)轻度肌无力:四肢力量较弱、前肢打滑,活动减少。(3)中度肌无力:肌无力明显,动作不协调,不能在15°光滑斜面上停留,食量下降,体重不增。(4)严重肌无力:肌无力严重,不能维持蹲姿,不能在15°光滑斜面上停留,食量明显下降,肌肉萎缩,呼吸困难。

d-TC 的敏感性 用恒速注射器,从耳缘静脉 iv 0.01% d-TC 的生理盐水稀释液,1 ml·min⁻¹,测定兔的 d-TC 最小垂头剂量。

诱发肌电图和足趾收缩 兔 iv 戊巴比妥钠 25 mg·kg⁻¹,使之轻度麻醉,背位固定。在其后肢膈窝坐骨神经的通路插入以毫针改制的刺激电极二枚,将电极联接于刺激器进行试验刺激,至达到刺激时针刺点周围的肌肉收缩最轻微,后肢足趾的收缩最明显时为止,固定电极。另以二枚同样由毫针改制的记录电极插入腓肠肌的适当部位,两个插入点之间相距1 cm。将电信号输入多功能生理记录仪,以记录腓肠肌的诱发复合动作电位。在刺激坐骨神经时收缩最明显的足趾上系线,通过张力传感器输入多功能生理记录仪,以记录足趾的收缩活动。诱发复合肌电位和足趾收缩的记录同步进行。刺激参数为超强电压,波宽 0.5 ms,频率有4 Hz 持续 2 s 与 50 Hz 持续 2 s 两种。

评价神经肌接头传递功能的 D₅值 参照 Sanders 等^[9]的方法进行。以 4 Hz 持续 2 s 的脉冲刺激坐骨神经,比较每个腓肠肌复合动作电位和足趾收缩幅度的高低,观察肌电和肌缩反应有无递减现象,并按下式计算 D₅值。以 D₅值小于-10%作为诊断 MG 的标准。

$$D_5 = (V_5 - V_1) / V_1 \times 100 \%$$

V₁: 第1个反应的波幅高度

V₅: 第5个反应的波幅高度

RESULTS

兔 AMG 形成结果

1 MG 症状 对经 N-AChR 富集膜微囊抗原免疫3次并有完整记录的35只兔,按前述

标准分级,其中有轻度症状的7只,中度症状的7只,严重症状的6只。出现 MG 症状的兔共占全部免疫兔的 57%。iv 甲基硫酸新斯的明 45 μg·kg⁻¹,可使有 MG 症状的兔迅速好转。

2 对 d-TC 的敏感性 正常兔 iv d-TC 的最小垂头剂量为 175 ± 19 μg·kg⁻¹ (n = 35)。轻、中、重度症状 MG 家兔 iv d-TC 的最小垂头剂量分别为 125 ± 10 μg·kg⁻¹ (n = 7), 75 ± 7 μg·kg⁻¹ (n = 7) 和 43 ± 6 μg·kg⁻¹ (n = 6)。

3 诱发肌电图和足趾收缩 中度和严重症状的 AMG 兔13只,以 4 Hz 持续 2 s 的超强电流刺激坐骨神经时,腓肠肌的诱发动作电位和足趾的收缩幅度出现递减现象。D₅值均超出正常范围。在 50 Hz 持续 2 s 的强直刺激下,肌电位递减更快,程度更严重,有时甚至接近基线,足趾强直收缩力下降 50 ± 32%,而且难以维持。强直刺激后 20 s 内再给予 4 Hz 刺激时,其 D₅值较强直前为大,有强直后易化 (posttetanic facilitation) 现象。在强直刺激后 2 min 再施以 4 Hz 刺激,其 D₅值比强直前为小,出现强直后耗竭 (posttetanic exhaustion) 现象^[10] (Tab 1, Fig 1)。

4-AP 与 3,4-DAP 对 AMG 兔的治疗

1 4-AP 的治疗 中度和严重症状的 AMG 兔8只, iv 4-AP 0.8 mg·kg⁻¹, 7.0 ± 2.3 min 后兔的四肢肌力明显增强,可在15°光滑斜面上停留,能抬头及跳跃,活动趋于正常。轻度麻醉后在 4 Hz 间接刺激下,腓肠肌的诱发肌电位和足趾收缩力的 D₅值均提高到正常水平。给予 50 Hz 强直刺激时,肌电位的波幅由急速下降变为整齐且保持不变。相应的足趾强直收缩力也由下降 52 ± 34% 并难以维持变为张力增强,并持续保持不变。强直后的易化和耗竭现象均皆消失 (Fig 1, Tab 1)。此种改善作用维持达 9.1 ± 2.5 h。在此之前曾在同组兔上 iv 4-AP 0.4 mg·kg⁻¹ 进行试验,

Tab 1. Change of neuromuscular function indices after different treatments in rabbits.
 $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.01$ vs "Before".

Treatment	n	4 Hz		50 Hz		
		D_5 (%, CMAP)	D_5 (%, Toe twitch)	CMAP voltage	Tetanic tension	
Production of AMG by immunization	13	Before	1.2 ± 2.1	2.0 ± 2.1	Equal throughout the whole train	Well sustained
		After	-34 ± 10 ^c	-25 ± 9 ^c	Marked and progressive reduction	Reduced quickly
Administration of 4-AP to AMG rabbits (0.8 mg·kg ⁻¹ , iv)	8	Before	-36 ± 13	-28 ± 10	Marked and progressive reduction	Reduced quickly
		After	-0.8 ± 2.0 ^c	1.0 ± 1.5 ^c	Equal throughout the whole train	Well sustained
Administration of 3,4-DAP to AMG rabbits (0.4 mg·kg ⁻¹ , iv)	8	Before	-35 ± 7	-26 ± 7	Marked and progressive decrement	Reduced quickly
		After	-0.2 ± 1.9 ^c	1.5 ± 2.1 ^c	Equal throughout the whole train	Well sustained

4 Hz, 50 Hz; Electric stimulation to sciatic nerve.

D_5 : % decrease of the 5th evoked response with respect to the 1st response of each train.

CMAP; Compound muscle action potential of gastrocnemius muscle.

各项指标改善不够充分, 兔反应比较参差, 作用的持续时间 2.5 ± 2.7 h.

2 3,4-DAP 的治疗 中度和严重症状的 AMG 兔 8 只(其中 4 兔曾于 7 d 前用于 4-AP 的治疗试验), iv 3,4-DAP $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. 6.5 ± 2.1 min 后四肢肌力明显增强, 可在 15° 光滑斜面上停留, 能抬头及跳跃, 活动趋于正常. 轻度麻醉后在 4 Hz 间接刺激下, 腓肠肌的诱发肌电位和足趾收缩力的 D_5 值均提高到正常水平. 给予 50 Hz 强直刺激时肌电位的波幅由急剧下降变为整齐, 相应的足趾强直收缩力也由下降 $47 \pm 26\%$, 并难以维持变为张力增强, 并持续保持不变. 强直后的易化和耗竭现象亦皆消失(Tab 1). 此种改善作用持续达 9.3

± 3.1 h. 在此之后曾在同组兔上 iv 3,4-DAP $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行试验. 各项指标改善明显, 作用持续达 14 ± 3.7 h, 但 3 兔有肌痉挛现象, 显示剂量无需如此之大.

3 与新斯的明的比较 另以新斯的明为阳性对照药, 对 4 只 AMG 兔(曾用于 4-AP 或 3,4-DAP 的治疗试验)进行疗效比较. 于 iv 新斯的明 $45 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后 5.6 ± 2.1 min, 各种 MG 症状明显好转, 刺激坐骨神经诱发的肌电和足趾收缩反应均基本恢复正常, 其情况与 iv 4-AP 或 3,4-DAP 时相似. 但作用维持时间仅 2.5 ± 0.4 h, 远较给 4-AP 或 3,4-DAP 时为短促. 该剂量的新斯的明且在兔引起唾液分泌增加等胆碱能反应.

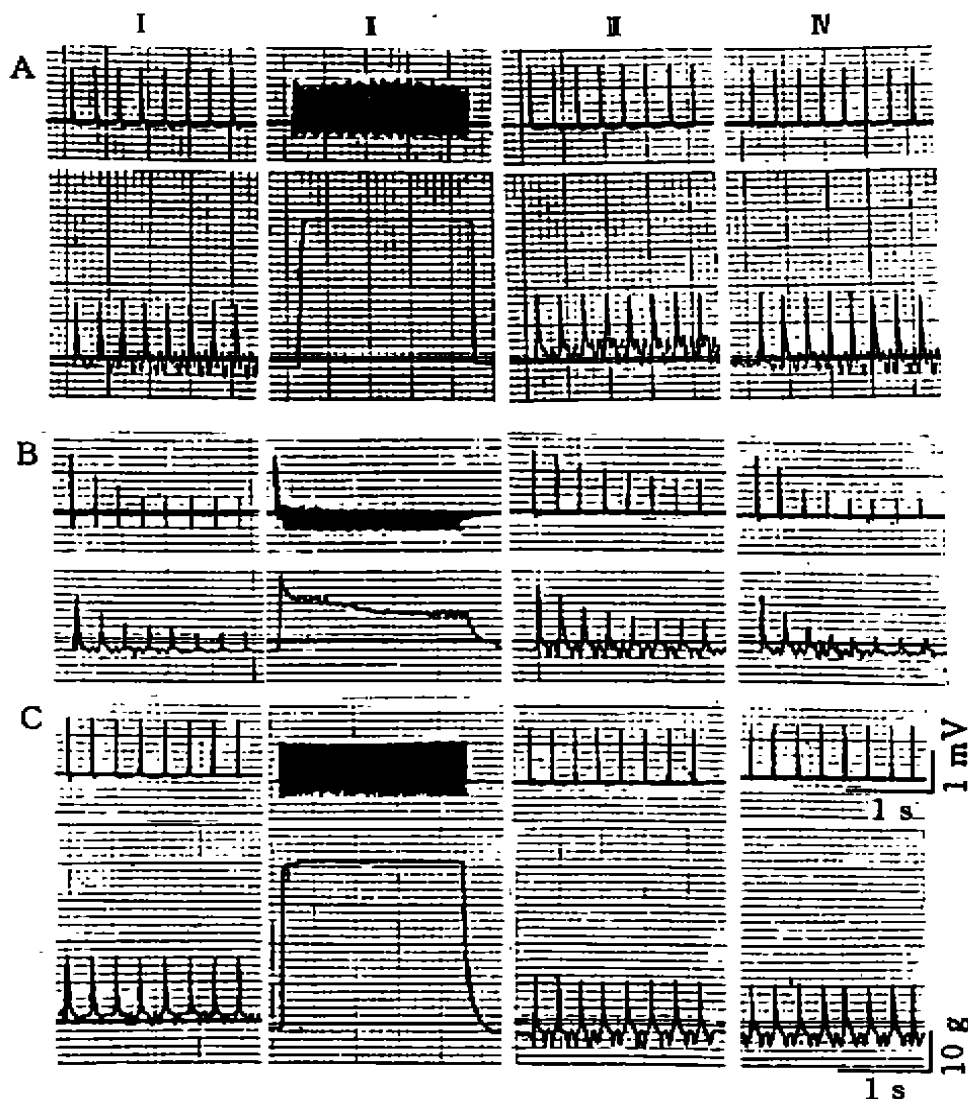


Fig 1. Compound muscle action potentials (CMAP) of the gastrocnemius muscle (upper tracing) and toe twitches (lower tracing) evoked by indirect stimulation of a rabbit. A) Before AMG was produced. B) When EAMG was formed. C) 10 min after iv 4-AP $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. I: 4 Hz, before tetanization; II: 50 Hz tetanization; III: 4 Hz, within 20 s after tetanization; IV: 4 Hz, 2 min after tetanization.

DISCUSSION

早年用于治疗 MG 的药物,如毒扁豆碱和新斯的明等,多从其抗箭毒应用扩大适应症而

来。现知由箭毒造成的神经肌接头传递阻滞与 MG 实有本质区别^[1],以箭毒化动物筛选抗 MG 药物有着较大的局限性,因而无论试验药物对 MG 的疗效^[1]还是观察药物对 MG 病况

的影响^[12], 皆已改用 EAMG 动物。然而分离纯 N-AChR 步骤繁复, 准备 AMG 的模型动物原非易事。不久前陈世铭等报道了以富集 N-AChR 的膜微囊免疫家兔, 造成 AMG 模型的经验^[6]。我们体会, 这确是一种方便而实用的方法。对动物 AMG 的鉴定, 如能再辅以血清中抗 N-AChR 抗体滴度的测定, 当属更为完善。但 4-AP 类药物, 从其作用机制推论, 恐不可能改变血清内抗 N-AChR 抗体滴度。

以 4-AP 与 3,4-DAP 缓解 AMG 家兔的症状, 作用明显而持久, 显示两药对于治疗 MG 可能有实际意义。其中的 4-AP 过去已由 Lundh 在临床上治疗 MG 患者 6 例现在我们又再在实验治疗中证实其结果。3,4-DAP 对 AMG 兔的疗效虽与 4-AP 相差不多, 但我们对之寄予更大希望。其理由为: (1) 该药的有效剂量比 4-AP 小, 促进神经肌接头传递作用比 4-AP 大^[4]。(2) 不易透过血脑屏障, 中枢副作用较少^[13]。(3) 已有 Lambert-Eaton 肌无力综合征患者用 3,4-DAP 连续治疗 21 个月, 效果良好而无严重不良反应^[14]的先例, 所以我们认为如果再做一些工作, 3,4-DAP 很有可能成为一种治疗 MG 的新药。

ACKNOWLEDGMENTS 军事医学科学院毒物药物研究所孙曼弄教授和池木根老师提供 N-AChR 富集膜微囊并给予指导。

REFERENCES

- 1 Havard CWH, Fonseca V. New treatment approaches to myasthenia gravis. *Drugs* 1990; **39**: 66-73.
- 2 Paskov DS, Agoston S, Bowman WC. 4-Aminopyridine hydrochloride (Pymadin). In: Kharkevitch DA, editor. *New neuromuscular blocking agents*, vol 19. Berlin: Springer, 1986; 679-717.
- 3 Thomsen RT, Wilson DF. Effects of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine on transmitter release at the neuromuscular junction. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; **227**: 260-5.
- 4 Molgò J, Lundh H, Thesleff S. Potency of 3,4-diaminopyridine and 4-aminopyridine on mammalian neuromuscular transmission and the effect of pH changes. *Eur J Pharmacol* 1980; **61**: 25-34.
- 5 Lundh H, Nilsson O, Rosén I. Effect of 4-aminopyridine in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1979; **42**: 171-5.
- 6 Chen SM, Chi MG, Yang Y, Xu XS. Isolation of N-ACh receptor-rich membrane vesicles from the electric organ of *Narcine timilei*. *Zool Res* 1987; **8**: 39-45.
- 7 陈世铭, 池木根, 胡定浩, 董华进, 许小璐. 实验性重症肌无力及福定碱的治疗. *Kexue Tongbao* 1988; **33**: 706-10.
- 8 Niemi WD, Nastuk WL, Chang HW, Plescia OJ, Plescia AM. Factors in the production of experimental autoimmune myasthenia gravis in acetylcholine receptor immunized rabbits. *Ann NY Acad Sci* 1981; **377**: 222-36.
- 9 Sanders DB, Schleifer LS, Eldefrawi ME, Norcross NL, Cobb EE. An immunologically induced defect of neuromuscular transmission in rats and rabbits. *Ann NY Acad Sci* 1976; **274**: 319-36.
- 10 Desmedt JE. The neuromuscular disorder in myasthenia gravis: I. Electrical and mechanical response to nerve stimulation in hand muscles. In: Desmedt JE, editor. *New developments in electromyography and clinical neurophysiology*, vol 1. Basel, Karger, 1973; 241-304.
- 11 Ishigaki Y, Sato T, Song DL, Hayashi K, Aoyagi T. Suppression of experimental autoimmune myasthenia gravis with new immunosuppressants, 15-deoxyspergualin and actinobolin. *J Neurol Sci* 1992; **112**: 209-15.
- 12 Eliashiv S, Wirguin I, Brenner T, Argov Z. Aggravation of human and experimental myasthenia gravis by contrast media. *Neurology* 1990; **40**: 1623-5.
- 13 Lermignan M, Millart H, Lamiable D, Molgò J, Lechat P. Evaluation of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine penetrability into cerebrospinal fluid in anesthetized rats. *Brain Res* 1984; **304**: 166-9.
- 14 Lundh H, Nilsson O, Rosén I. Treatment of Lambert-Eaton syndrome, 3,4-diaminopyridine and pyridostigmine. *Neurology* 1984; **34**: 1324-30.