

187~191

海马内非 NMDA 及 GABA-A 受体在青霉素致病及电针抗痫中的作用<sup>1</sup>

R971.6

刘俊<sup>2</sup>, 程介士<sup>3</sup> (上海医科大学医学神经生物学国家重点实验室, 神经生物学教研室, 上海 200032, 中国)Hippocampal non-NMDA and GABA-A receptors in benzylpenicillin-induced epilepsy and electroacupuncture antiepilepsy<sup>1</sup>LIU Jun<sup>2</sup>, CHENG Jie-Shi<sup>3</sup>

(National Laboratory of Medical Neurobiology, Department of Neurobiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

KEY WORDS epilepsy; hippocampus; electroacupuncture; quinoxalines; bicuculline; N-methyl-D-aspartate receptors; GABA-A receptors

AIM: To study the effect of 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) and bicuculline (Bic) on benzylpenicillin-induced-epilepsy (PIE) and electroacupuncture (EA) antiepilepsy in rats. METHODS: Epilepsy was elicited by intra-hippocampal microinjection of benzylpenicillin in rats. The analysis of electroencephalogram (EEG) and power spectrum was used to measure the extent of convulsion. RESULTS: EA or DNQX (1  $\mu$ g) showed partial inhibitory effect on PIE. EA + DNQX caused further inhibition of PIE, and Bic attenuated EA antiepileptic effect. CONCLUSION: Antagonization of GABA-A receptor attenuated EA antiepileptic effect, and EA acted synergistically with the antagonists of non-N-methyl-D-aspartate (non-NMDA) receptors.

关键词 癫痫; 海马; 电针术; 喹啉类; 荷包牡丹碱; N-甲基-D-门冬氨酸受体;  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体

NMDA受体 GABA-A受体

目的: 研究 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) 和荷包牡丹碱(Bic)在青霉素致病及电针抗痫中的作用。方法: Wistar 大鼠( $n=53$ )海马内微量注

入青霉素 1  $\mu$ L (0.24  $\mu$ g), 以脑电记录及其功率谱分析作为癫痫发作的指标。结果: 电针和 non-N-methyl-D-aspartate (非 NMDA)受体竞争性拮抗剂 DNQX 能部分抑制癫痫发作, 电针和 DNQX 1  $\mu$ g 合用时能加强对癫痫的抑制; 而 Bic 可使电针对癫痫的抑制减弱。结论: 海马内 GABA-A 受体拮抗剂能部分翻转电针的抗痫作用, 而电针和非 NMDA 受体拮抗剂有协同抗痫作用。

我室以往工作表明电针对青霉素致病及电惊厥均有抑制作用<sup>[1-2]</sup>, 其抗痫的机制中有海马内阿片肽系统及氨基酸类递质系统的参与<sup>[3-5]</sup>。在青霉素致痫的模型上, 海马内微量注入 NMDA 受体竞争性拮抗剂 AP5 能部分抑制癫痫, 且 AP5 与电针有协同抗痫作用<sup>[5]</sup>, 谷氨酸脱羧酶抑制剂 3MP 能部分抑制电针的抗痫作用<sup>[6]</sup>。至于非 NMDA 受体及 GABA-A 受体在癫痫及电针抗痫中的作用, 迄今未见文献报道, 本实验在青霉素致病模型上进一步观察海马内非 NMDA 受体和 GABA-A 受体在癫痫及电针抗痫中的作用。

## MATERIALS AND METHODS

青霉素致病模型 Wistar 大鼠 53 只, 雌雄不拘, 体重 180-220 g, 戊巴比妥钠(32  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; ip)麻醉, 用立体定向仪按 Paxinos 大鼠图谱定位。套管尖端定位在  $P_3R_2H_{2.3}$ , 外套管外径 0.75 mm, 内套管外径 0.4 mm, 内套管下端较外套管长 0.5 mm。术后饲养 3-4 d, 实验时将 1  $\mu$ L 青霉素钠盐 0.24  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  用微量注射器在 10 min 内匀速注入一侧海马以造成癫痫样发作。青霉素注完后 2-5 min 脑电即出现高频高幅的痫样放电<sup>[5]</sup>, 行为上出现翘尾、嘶叫、四肢抽搐、手术对侧前肢阵挛和湿狗样颤(wet dog shakes)。注药后 20 min 左右脑电波即趋稳定。

脑电 在颅外相当于两侧感觉运动区部位的颅骨上各插一根针形电极引导脑电, 将脑电信号输入到 LMS-2B 型的二道生理记录仪, 用描笔记录。记录仪的时间常数为 0.2 s, 灵敏度 20  $\text{mV}\cdot\text{m}^{-1}$ , 高频滤波 100 Hz。从记录仪输出端引出的信号经 A/D 转换板输至 IBMpc386 兼容计算机进行联机观察和脑电的分析处理, 数据处理采用脑电功

<sup>1</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39170897.

<sup>2</sup> Now in Department of Physiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China

<sup>3</sup> Correspondence to Prof CHENG Jie-Shi.

Received 1995-09-22

Accepted 1996-12-04

率谱程序。处理的参数为:采样时间 40 s, 每帧采样点数为 8192, 采样周期为 2.5 s, 频率 200 Hz, 放大系数为 10, 计算 1-30 Hz 的总功率, 并绘制功率谱阵图及平均功率谱图。功率谱阵图反映每个样本在不同的频段对应的能量, 平均功率谱反应总的能量分布情况, 它直观定量地显示各频段波所对应的功率, 有时为了更直观地反映脑电能量的变化, 将脑电图及对应的平均功率谱描记在同一帧图上。另外, 也可将信号输至示波器进行脑电的连续观察。

**穴位电针** 用电针治疗仪(上海医用电子仪器厂, G-6805 型)在大鼠枕骨下凹陷“风府”穴及第九、第十胸椎棘突间“筋缩”穴进行电针, 频率 100 Hz, 强度 6 mA。

**资料处理** 脑电信号经计算机分析处理后所得数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 作 *t* 检验。

**定位** 每次实验结束后取脑作 50  $\mu\text{m}$  厚切片检查, 以鉴定注药套管尖端的确切位置。

**药品** 荷包牡丹碱 bicuculline (Bic)系美国 Sigma 公司产品。6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX)系美国 RBI 公司产品。青霉素钠盐系上海先锋药业公司产品。

## RESULTS

**非 NMDA 受体** Wistar 大鼠 20 只分 3 组: A) 对照组, 青霉素致痫, 以 NS 注入海马并加电针 ( $n=8$ ); B) 青霉素致痫加 1  $\mu\text{L}$  DNQX 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  注入海马加电针组 ( $n=6$ ); C) 青霉素致痫加 1  $\mu\text{L}$  DNQX 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。DNQX 或 NS 在海马注入青霉素前 15 min 注入海马; 在注入青霉素 30 min 后施加电针, 持续 30 min。

对照组致痫时脑电的相对功率单位 (relative power unit, RPU) 比正常的明显增大,  $P < 0.01$ ; 海马注入 1  $\mu\text{L}$  DNQX 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  后 RPU 与正常时相比则无显著差别, 且青霉素引起的痫样放电减少很多, 与对照组致痫时 RPU 相比亦显著降低,  $P < 0.01$ ; 当海马微量注入 1  $\mu\text{L}$  DNQX 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  后, RPU 与正常相比仍无显著差别, 而青霉素引起的痫样放电大大减少, 与对照组相比亦显著减小,  $P < 0.01$  (Tab 1)。对照组致痫再加电针后 RPU 比致痫时明显降低,  $P < 0.01$ ; 海马注入 1  $\mu\text{L}$  DNQX 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  再加电针后, RPU 降低非常显著, 与对照组电针后相比, 也有显著降低。

**GABA-A 受体** GABA-A 受体拮抗剂用荷包牡丹碱 Bic。实验用 Wistar 大鼠 33 只, 分成 3 组: A) 对照组, 为青霉素致痫加电针组, 以 NS 注入海马 ( $n=12$ ); B) 青霉素致痫及电针后, 海马

**Tab 1. EEG relative power unit during epilepsy. A = normal, B = 15 min after NS (or DNQX), C = 25 min after PIE, D = 30 min after EA.  $\bar{x} \pm s$ .  $^aP > 0.05$  vs A,  $^bP < 0.01$  vs B,  $^cP > 0.05$ ,  $^dP < 0.01$  vs C,  $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$  vs NS + EA. EA: electroacupuncture; NS: saline; DNQX: 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione.**

	NS + EA (8 rats)	DNQX 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (6 rats)	DNQX 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (6 rats)
A	45 ± 7	40 ± 5	34 ± 4
B	47 ± 7 <sup>a</sup>	31 ± 8 <sup>b</sup>	35 ± 6 <sup>c</sup>
C	1 236 ± 260 <sup>d</sup>	303 ± 47 <sup>e</sup>	84 ± 12 <sup>f</sup>
D	204 ± 23 <sup>g</sup>	119 ± 17 <sup>h</sup>	77 ± 15 <sup>g</sup>

内注入 2  $\mu\text{L}$  Bic 0.24  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $n=12$ ); C) Bic 组, 正常情况下海马内注入 2  $\mu\text{L}$  Bic 0.24  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $n=9$ ), A 组的 NS 及 B 组的 Bic 均在电针 30 min 后给予, 且电针仍在继续。对照组海马内注入 NS 10 min 后, RPU 与注入前电针 30 min 后相比变化无显著性意义,  $P > 0.05$ ; 药物组海马内注入 Bic 10 min 后, RPU 比注入前电针 30 min 后有所回升, 前后相比变化显著,  $P < 0.01$  (Tab 2); 海马内给予 Bic, 15 min 及 60 min 后脑电功率由正常时的 44.3 ± 3.5 RPU 变化为 46.6 ± 4.96 RPU 及 46.92 ± 5.20 RPU, 后两者与正常时相比, 均变化不大,  $P > 0.05$ 。

**Tab 2. Relative power unit after bicuculline (Bic) on electroacupuncture (EA) antiepilepsy. A = normal, B = 25 min after PIE, C = 30 min after EA, D = 10 min after saline (NS) or Bic.  $n$ : rats.  $\bar{x} \pm s$ .  $^aP < 0.01$  vs A;  $^bP < 0.01$  vs B;  $^cP > 0.05$ ,  $^dP < 0.01$  vs C.**

	EA + NS	EA + Bic
A	20 ± 4 ( $n=12$ )	20 ± 4 ( $n=12$ )
B	438 ± 123 <sup>c</sup> ( $n=12$ )	438 ± 123 <sup>c</sup> ( $n=12$ )
C	75 ± 17 <sup>d</sup> ( $n=12$ )	75 ± 17 <sup>d</sup> ( $n=12$ )
D	86 ± 20 <sup>e</sup> ( $n=5$ )	145 ± 25 <sup>f</sup> ( $n=7$ )

## DISCUSSION

脑内氨基酸类受体在癫痫的发生和发展中起着很重要的作用。兴奋性氨基酸受体拮抗剂包括非 NMDA 受体拮抗剂具有抗惊厥的作用<sup>[7,8]</sup>。本实验中, 非 NMDA 受体竞争性拮抗剂 DNQX 有部分拮抗青霉素致痫的作用; 增大 DNQX 的剂

量,作用愈显著。非 NMDA 受体通道的激活是 NMDA 受体通道激活的动因,低频刺激不足以使堵塞 NMDA 受体通道的  $Mg^{2+}$  移开,却能打开非 NMDA 受体通道,使  $Na^+$  和  $K^+$  通过,而高频强直刺激时,由于非 NMDA 受体通道的作用引起突触后膜去极化,使堵塞 NMDA 受体通道的  $Mg^{2+}$  移开,从而谷氨酸即能打开 NMDA 受体通道,  $Na^+$ 、 $K^+$  和  $Ca^{2+}$  即可通过<sup>[9]</sup>。哺乳类动物视网膜双极细胞至杆状细胞的神经递质的传递也主要由非 NMDA 受体介导<sup>[10]</sup>。本实验中 DNQX 作用的结果进一步提示非 NMDA 受体较大程度参与青霉素致痫作用,这方面的结果尚未见文献报道。

本工作发现小剂量 DNQX 可增强电针抗痫作用,而当 DNQX 剂量加大,高度阻断非 NMDA 受体时,电针的抑制癫痫作用已难以表现出来,从一个侧面反映电针作用与非 NMDA 受体的密切关系。

在青霉素致痫模型电针抗痫时海马内抑制性氨基酸 GABA 的释放明显增加<sup>[5]</sup>,而本工作又在青霉素致痫模型上发现 GABA-A 受体的拮抗剂 Bic 部分翻转电针的抗痫作用,说明电针的抗痫作用有一部分可能是通过 GABA 及 GABA-A 受体起作用的。

综上所述:海马内非 NMDA 受体及 GABA-A 受体在青霉素致痫及电针抗痫中起着较为重要的作用。

## REFERENCES

- 1 He XP, Wu GC, Cao XD. Effect of electroacupuncture on penicillin-induced epileptic discharges in rabbit's cerebral cortex. *Shanghai J Acup Moxib* 1985; (2): 18-22
- 2 He XP, Cheng BY, Zhu JM, Cao XJ. Change of leu-enkephalin- and  $\beta$ -endorphin-like immunoreactivity in the hippocampus after electroconvulsive shock and electroacupuncture. *Acup Electrother Res* 1989; 14: 131-9
- 3 Wang BE, Cheng JS. Relationship between intrahippocampal dynorphin and electroacupuncture anticonvulsive effect. *Chin Sci Bull* 1992; 14: 1321-3.
- 4 Wang BE, Cheng JS. Alteration of dynorphin<sub>8</sub> and leu-enkephalin in rat hippocampus during seizure and electroacupuncture. *Acta Pharmacol Sin* 1994; 15: 155-7.
- 5 Wang BE, Cheng JS. Changes of hippocampal amino acid levels and NMDA receptor during epilepsy and electroacupuncture. *Acta Acad Med Shanghai* 1994; 21 Suppl: 10-3.
- 6 Wu DZ, Ma JY. The role of gamma-aminobutyric acid in the antiepileptic effect of electroacupuncture. *Chin J Physiol Sci* 1986; 2: 224-8
- 7 Croucher MJ, Collins JF, Meldrum BS. Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. *Science* 1982; 216: 899-901.
- 8 Turski L, Meldrum BS, Turski WA, Watkins JC. Evidence that antagonism at non-NMDA receptors results in anticonvulsant action. *Eur J Pharmacol* 1987; 136: 69-73.
- 9 Gustafsson B, Wigström H. Physiological mechanisms underlying long-term potentiation. *Trends Neurosci* 1988; 11: 156-62
- 10 Cohen ED, Miller RF. The role of NMDA and non-NMDA excitatory amino acid receptors in the functional organization of primate retinal ganglion cells. *Vis Neurosci* 1994; 11: 317-32.

## The 4th International Symposium on Ion Channels and Calcium Antagonists

1997 Sep 21-23

Shenyang, CHINA

Please contact Prof WANG Huai-Liang  
Department of Pharmacology  
China Medical University  
Shenyang 110001  
CHINA

Phone: 86-24-386-3731, Ext 5316. Fax 86-24-387-5539.