

氯硝西洋抗惊厥作用耐受及停药后 大鼠脑内 NMDA 受体放射自显影观察

廖建湘* 王 丽 左启华

(北京医科大学第一医院儿科 100034)

氯硝西洋是一种常用的抗癫痫药,但容易诱发耐受,而耐受后撤药又会导致撤药症状,从而限制其应用^[1]。癫痫点燃动物模型脑组织及手术获得的人类癫痫性脑组织 NMDA 受体功能增强^[2]。抑制 NMDA 受体兴奋也是寻找新的抗癫痫药的一个重要途径^[3]。然而,苯二氮革类药物耐受性及依赖性机制研究中,迄今尚未见有直接研究 NMDA 受体的报道。本文用放射自显影技术观察了氯硝西洋抗惊厥作用耐受及停药后大鼠脑内 NMDA 受体的变化,旨在了解 NMDA 受体与氯硝西洋抗惊厥作用耐受性及依赖性的关系。

材 料 和 方 法

1 主要制剂与材料

[³H] TCP, [(N-(1-thienyl) cyclohexyl) piperidine(噻吩环己哌啶), NMDA 受体特异性拮抗剂] NEN 1864.8 GBq·mmol⁻¹, 美国 Du Pont 公司。氟片(LKB ³H ULTROFILM), 原子核乳胶,(核-4 型), 北京原子能研究所。

2 大鼠杏仁核电点燃癫痫模型的建立

Sprague-Dawley 大鼠, ♀ ♂ 不拘。参考 Rose-nberg 等^[4]的方法。自制双极锰、镍、硅、铜、铬合金电极。电刺激参数: 单向方波, 80 Hz, 波宽 5 ms, 强度为 100 μ A, 持续时间 2 s。每日刺激 2 次(8 AM 与 6 PM)。观察大鼠行为惊厥及刺激后放电。行为惊厥达 5 期时称被

点燃, 获连续 5 次 5 期惊厥称被完全点燃。本组完全点燃所需时间为 15.5 ± 3.1 d($\bar{x} \pm s$, $n = 31$)。

3 氯硝西洋处理

耐受组, 完全点燃大鼠 5 只, 每日 3 次(8 AM, 2 PM 和 7 PM) ig 氯硝西洋, 每次 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。溶剂组(对照) ig 溶剂丙二醇每日 3 次, 每次 $2 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。耐受性检测方法参见 Rosenberg 等^[4]的实验。sc 氯硝西洋 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 开始时能控制完全点燃大鼠惊厥, 用药 4 周后, 相同量的氯硝西洋不再有抗惊厥作用, 即大鼠已对其抗惊厥作用耐受。溶剂组无耐受。

4 NMDA 受体放射自显影术

4.1 标本制备 末次用氯硝西洋后 2 h 断头处死大鼠, 冰上完整取出脑组织, 速冻。恒冷箱切片机制片, 片厚 10 μm 。

4.2 受体结合 先去除内源性配体: 用蔗糖 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tris-HCl 缓冲液 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.7, 室温(20 $^{\circ}\text{C}$) 孵育 1 h。然后用 Tris-HCl 缓冲液(含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖) $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 室温洗涤 20 min。

4.3 受体与配体结合 参考文献及预试验确定理想的受体结合条件为: [³H] TCP $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tris-HCl 缓冲液 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.7, 室温(20 $^{\circ}\text{C}$) 孵育 1 h。冷缓冲液洗脱游离配体, 每张载片用 20 ml, 25 s 洗涤完毕。冷风吹干。

4.4 特异性检验 孵育条件同上, 但加 MK-801, 终浓度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。洗脱后冷风吹干。切片刮下液闪计数或用于自显影制备。

本文于 1996 年 1 月 25 日收到。

* 现单位: 深圳市人民医院儿科(邮编 518020)

4.5 自显影 宏观自显影,接触法,感光材料用氟片。光学显微镜自显影,绞链接触法,感光材料用“核-4”乳胶。曝光。D-19b 显影液显影,F-5定影液定影。切片固定,克紫染色,封固^[6]。

5 结果分析与统计处理

宏观自显影氟片用 IBAS 20000 图像分析系统(德国)测吸光度(A),耐受组与对照比较,统计学处理用 t 检验。光学显微镜自显影:目镜中放已知面积的网格,低倍镜下辨认组织结构,油镜下计数每 $100 \mu\text{m}^2$ 面积上的银粒数。变异系数控制在 1%~2%,用 t 检验统计学处理耐受组与对照结果。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1 NMDA 受体的分布

宏观放射自影见海马结构受体分布密度高,皮质尤其是小脑皮质分布密度低。小脑主要见颗粒细胞层显影。

2 NMDA 受体最大受体数目的变化

光学显微镜微观放射自显影发现,氯硝西洋抗惊厥作用耐受时右侧海马 CA_1 区多形细胞层 NMDA 受体数目增多($P < 0.05$),而小脑半球颗粒细胞层 NMDA 受体数目减少($P < 0.05$)。宏观放射自显影观察耐受组与对照组无明显差异($P > 0.5$)。宏观与微观放射自显影观察,氯硝西洋停药 7 d 时 NMDA 受体数目不再变化($P > 0.05$)。可见,氯硝西洋抗惊厥作用耐受及停药后大鼠脑内最大 NMDA 受体数目变化脑区局限。

讨 论

NMDA 受体分布在海马结构,尤其是齿状回密度高,而小脑皮质分布极低,且以颗粒细胞层为主,这种 TCP 与 NMDA 受体结合的分布特征与文献报道相似^[5]。宏观放射自显影观察耐受组与对照组比较,NMDA 受体数目无显著差别,而微观自显影则部分脑区有差别,提示

微观放射自显影比宏观放射自显影方法更敏感。

NMDA 受体的功能增强在点燃效应及人类部分性癫痫发生中有重要作用^[7]。长期使用地西洋,导致谷氨酸等兴奋性神经递质系统的活动补偿性增强,以对抗苯二氮草类药物及 GABA 能系统的抑制功能,这样在兴奋与抑制功能间形成新的平衡^[8]。氯硝西洋抗癫痫作用耐受及撤药症状都类似癫痫发作,似是中枢神经系统兴奋性增强的表现。因此,我们曾推测耐受时,NMDA 受体的兴奋性增强。但本实验结果表明,NMDA 受体数目变化只在很局限的脑区内,且变化方向在不同的脑区相反(有的增加,而有的减少),似乎不能圆满解释氯硝西洋抗惊厥作用耐受及撤药时中枢神经系统兴奋性增强的现象。氯硝西洋抗惊厥作用耐受及依赖机理复杂,除 NMDA 外,尚涉及其它神经递质系统,NMDA 受体数目的这种变化怎样与耐受性及依赖性联系,尚有待深入研究。

出现这种结果的原因可能有:1. NMDA 受体兴奋,是涉及受体、递质及其结合等多环节的过程^[9],而不仅仅是受体数目;2. TCP 与 NMDA 受体在体外结合放射自显影,只反映出受体最大数目,不能完全代替受体功能状态;3. 耐受性与依赖性还可能涉及其它脑区。最近有报道认为兴奋性氨基酸参与地西洋抑制行为活动效应耐受及撤药症状^[8]。随着人们对兴奋性递质系统在氯硝西洋抗惊厥作用耐受性及依赖性机制中地位认识的加深,对抗氯硝西洋抗癫痫作用耐受及依赖,将会有新的途径部世。

关键词 氯硝西洋;药物耐受性;NMDA 受体;放射自显影术

参 考 文 献

- 1 Haigh JR, Feely M. Tolerance to anticonvulsant effect of benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci*, 1988, 9:361
- 2 Louvel J, Pumain R, Roux FX, et al. Recent advances in understanding epilepto-

- genesis in animal models and in human. *Adv Neurol*, 1992, **57**:517
- 3 Rogawski MA, Porter RJ. Antiepileptic drugs; pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol Rev*, 1990, **42**:223
 - 4 Rosenberg HC, Tietz EI, Chiu TU. Tolerance to anticonvulsant effects of diazepam, clonazepam, and clobazam in amygdala-kindled rats. *Epilepsia*, 1989, **30**:276
 - 5 Chaudieu I, Allaoua H, Bellaidi M, et al. Effect of amygdala kindling on the high and low-affinity ^3H -TCP binding sites of the rat CNS. *Neurosci Lett*, 1991, **313**:263
 - 6 刘鼎新编著:放射自显影技术.北京:科学出版社, 1986:55
 - 7 Olazaki MM, McNamare JO, Nadler JV. N-methyl-D-aspartate receptor autoradiography in rat brain after angular bundle kindling. *Brain Res*, 1989, **482**:359
 - 8 Steppuhn KG, Turski L. Diazepam dependence prevented by glutamate antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**:6889
 - 9 唐仲良编著:神经系统生理学.上海:复旦大学出版社, 1991:53

AUTORADIOGRAPHY OF NMDA RECEPTORS IN AMYGDALA-KINDLED RATS WITH TOLERANCE TO AND DEPENDENCE ON THE ANTICONVULSANT EFFECT OF CLONAZEPAM

JX Liao, L Wang and CH Zuo

(Department of Pediatrics, First Hospital of Beijing Medical University 100034)

ABSTRACT Mechanisms underlying tolerance to and dependence on the anticonvulsant effect of clonazepam are not clear. Autoradiography of the NMDA receptors in amygdala-kindled rats with tolerance to and dependence on the anticonvulsant effect of clonazepam was carried out. When tolerance developed, the binding of [^3H] TCP (*N*-(1-thienyl) cyclohexylpiperidine) to NMDA receptors was found to be increased at the polymorphocellular layer of the right CA₁, and decreased at the molecular layer of the cerebellar ansiform lobule. On day 7 of the discontinuation of clonazepam, the binding did not change further. These changes may be responsible for the tolerance to and dependence on the anticonvulsant effect of clonazepam. However, the exact significance of these results should be further investigated.

KEY WORDS Clonazepam; Drug-tolerance; NMDA receptor; Autoradiography