



槐定碱致癫痫样作用研究

彭晓东, 陆钊罡, 牟青春, 侯延辉

(宁夏医科大学基础医学院药理学教研室, 宁夏银川 750004)

[摘要] 目的:观察槐定碱(sophoridine)致痫大鼠清醒核团脑电(IEEG)变化特点;研究痫样特征分类和致痫作用机制。方法:采用慢性埋藏电极记录清醒大鼠核团脑电(intracranial electroencephalography, IEEG)的方法,观察槐定碱对大鼠产生痫样放电的特点,并判断致痫原发部位;采用小鼠模型实施工具药拮抗实验,探讨槐定碱所致癫痫样发作的作用机制及类型。结果:海马齿状回(DG)内颗粒细胞对于槐定碱致痫作用最敏感,其次是内侧穿行通路(PP)和颞叶皮层(TC)。阈下催眠剂量的地西洋、催眠剂量的巴比妥钠可以对抗槐定碱引起的痫样惊厥的发生;对抗最大电休克剂量的苯妥英钠不能对抗槐定碱引起的痫样惊厥的发生,但可以减缓惊厥的发生时间和小鼠的死亡时间。结论:海马内部异常放电在槐定碱致痫作用中可能起到重要作用,海马部位可能是痫样发作的原发部位;槐定碱的致动物癫痫样发作属于临床小发作类型,地西洋是较理想的预防药物。

[关键词] 槐定碱;脑电波;癫痫;地西洋;戊巴比妥钠;苯妥英钠

槐定碱(sophoridine)是豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L.、苦参 *Sophora flavescens* Ait. 及广豆根 *Sophora subprostrata* Chun et T. Chen 等中草药的活性成分^[1]。近来^[2],槐定碱及其制剂盐酸获得国家审批,作为新型抗肿瘤药物用于临床,为豆子等宁夏地区性道地药材的药理学研究注入了新的活力。

研究表明^[3,4],槐定碱可产生中枢兴奋作用,并诱发痫样表现。但对于槐定碱致痫作用的原发部位,致痫的类型并不清楚。为了进一步研究槐定碱对中枢神经系统的作用特点,为槐定碱的合理安全临床用药提供基础研究数据。本实验采用慢性埋藏电极记录清醒大鼠核团脑电(IEEG)的方法^[5],观察槐定碱致痫大鼠痫样放电的特点,并判断致痫作用原发部位;同时,利用槐定碱致痫小鼠模型,采用抗癫痫工具药实施拮抗实验,以期探讨槐定碱所致癫痫样发作类型和相关作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性SD大鼠6只,体重220~270g。昆明小鼠40只,雄性,体重20~22g。均由宁夏医科大学实

验动物中心提供,许可证号SCXY(宁)2005-0001。

1.2 药品、试剂及仪器

槐定碱(sophoridine, $C_{15}H_{24}N_2O$),近白色鳞片状结晶,纯度不低于98.0%,购于宁夏盐池制药厂(批号021180);苯妥英钠(phenytoin sodium)、地西洋(diazepam)、戊巴比妥钠(pentobarbital sodium)均为Sigma公司产品。分别以生理盐水配制成溶液待用。

大鼠脑立体定位仪(长春锻压设备厂);AH-2型微型电钻(浙江宁波)。自制镍铬绝缘丝为材料的记录电极及连线装置(电极直径0.17mm,上海鼎阜金属材料有限公司)。USB摄像头(30万像素)。BL-420⁺生物电信号采集分析系统(成都泰盟科技有限公司);PC-奔腾4支持生物电的采集、图像摄制和数据处理。

1.3 慢性电极埋植

大鼠按 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,ip实施麻醉后,将大鼠俯卧于脑立体定位仪上,沿大鼠头顶正中中线做矢状切口,暴露前、后囟及冠状缝、矢状缝等骨性标志。依据图谱^[6],分别埋植电极于海马齿状回(dentate gyrus, DG)颗粒细胞层[前囟后3.5mm,旁开2.0mm,电极长度 $(3.0\pm 0.2)\text{ mm}$];内侧穿行通路[medial perforant path, PP, 前囟后7.8mm,旁开4.0mm,电极长度 $(3.2\pm 0.2)\text{ mm}$];颞叶皮层[temporal cortex, TC, 前囟后7.0mm,旁开6.1mm,电极长度 $(4.5\pm 0.2)\text{ mm}$]。人字缝后1.5~2.0mm、旁开

[收稿日期] 2009-08-20

[基金项目] 宁夏2007自然科学基金项目(NZ0785);宁夏自治区教育厅2006年度高等学校科学研究项目

[通信作者] 彭晓东,副教授,硕士研究生导师,研究方向为神经精神药理学。Tel: (0951) 6980123, E-mail: pengxd@nxmu.edu.cn



2.0 ~ 3.5 mm 植入电极装置作为记录脑电波的公共地线。依法确定电极所处 DG 和 PP 的位置^[6],即刺激 PP 区域,待 DG 处记录记录到特征波形后,即为电极在 DG 颗粒细胞层和 PP 的准确定位。医用齿科水泥固定电极装置,消毒处理手术创面,清醒后常规分笼饲养,术后 7 d 进行 IEEG 记录。

1.4 槐定碱对清醒大鼠的同步 IEEG 记录

将慢性埋植电极成功的 4 只大鼠(2 只电极脱落),分别皮下注射(sc) 50 mg · kg⁻¹ 致病剂量的槐定碱^[4],观察记录 2 h 的大鼠 IEEG 变化。并参照 Racine 分级标准^[8],对痫样发作 IEEG 进行分析。

1.5 抗癫痫药物对槐定碱致小鼠痫样发作的拮抗实验

随机将 40 只小鼠分为 4 组,每组 10 只。按每 10g 体重 0.1 mL,每组分别腹腔注射(ip) 给予地西洋 7.5 mg · kg⁻¹、戊巴比妥钠 50 mg · kg⁻¹、苯妥英钠 50 mg · kg⁻¹ 和相应容积的 NS 作为槐定碱致痫的阳性对照组。30 min 后各组分别 ip 80 mg · kg⁻¹ 剂量的槐定碱,观察给药后 24 h 小鼠的痫样发作变化,并计算致痫/死亡率,判断药物对槐定碱致痫作用的影响。

1.6 统计学分析

采用单因素方差分析 One-way Analysis of Variance (ANOVA) 进行各组均数与对照组的比较,并采用 Dunnett Multiple Comparisons Test 判断差别, $P < 0.05$ 判断差别具有显著性。率的比较采用 Fisher 确切概率法 (Fisher's exact test) 比较, $P < 0.05$ 为有统计学差异。结果采用 GraphPad InStat (Instant Biostatistics Version 3.06) 软件实施分析。

2 结果

2.1 清醒大鼠对槐定碱致痫作用的行为及同步 IEEG 描记表现

供试 4 只大鼠在 sc 槐定碱后均出现强度可达 IV 级以上的痫样发作,平均诱导期在 (9 ± 7) min, 2 h 记录时间内反复出现阵挛-强直的间隔在 (10 ± 6) min 左右。其中 2 只行 ip 7.5 mg · kg⁻¹ 剂量的地西洋救治, 2 ~ 5 min 后发作终止。IEEG 同步记录表明,诱发初期海马内 DG 区颗粒细胞对于槐定碱致痫作用敏感,表现 DG 区记录痫样放电早于其他记录区域,强度也强与 PP 和 TC 区的记录,并随作用时间继续通过 PP 波及到 TC 区域(图 1)。阵挛-强直期表现出明显同步化的连续巨型棘波放电。行地

西洋救治发作大鼠可观察到痫样棘波放电与行为变化同步消失,最后表现出不同与正常时脑电的低幅慢波。

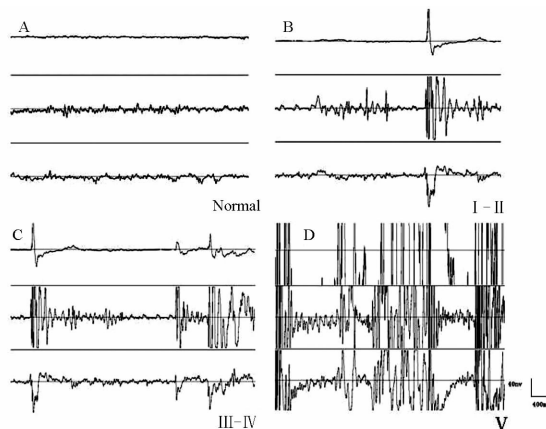


图 1 槐定碱致痫按 Racine 分级所对应 IEEG
A. 正常; B. I, II 级发作; C. III, IV 级发作; D. V 级发作; 各同步记录图示中上为 TC 区记录, 中为海马 DG 内记录, 下为 PP 区记录; 各通道参数均设定为放大倍数 2 000, 时间常数 5 s, 滤波 100 Hz, 记录速度 400 ms/DIV。

2.2 药物干预对槐定碱致痫作用的影响

对照组小鼠在 ip 给予槐定碱后,依次表现出活动减少、蜷缩、单次间歇性抽动(甩尾但不竖尾)、四肢抓地样肌张力增高,既而出现滚爬、竖尾、角弓反张、嘶叫,反复 3 ~ 4 次后强直死亡。发作后死亡时间为 (7.3 ± 3.20) min ($n = 10$)。小鼠惊厥后死亡,说明槐定碱惊厥剂量与致死剂量相近。

采用阈下催眠剂量的地西洋 (7.5 mg · kg⁻¹, 小鼠反正反射的不消失)^[9], 可以对抗槐定碱引起的 100% 惊厥情况的发生(表 1); 小鼠外观行为正常。采用小鼠催眠剂量的戊巴比妥钠 (50 mg · kg⁻¹, 小鼠反正反射的消失) 也可以对抗槐定碱引起的 100% 惊厥情况的发生。同时,小鼠部分觉醒,表现出间歇性四肢抽动,倒行等外观行为异常。

采用可以 100% 对抗小鼠最大电休克 (MES) 剂量的苯妥英钠 50 mg · kg⁻¹^[9], 不能对抗槐定碱引起的 100% 惊厥情况的发生。但可以减缓惊厥的发生时间和小鼠的致惊死亡时间。平均大发作时间 (10.2 ± 3.67) min ($n = 10$), 与对照组相比有差别 ($P < 0.01$); 平均死亡时间 (28.8 ± 6.44) min ($n = 10$), 与对照组相比有差别 ($P < 0.01$)。

3 讨论

海马与颞叶皮层的联系密切^[10], 并且共同组成



表 1 药物干预对槐定碱致痫作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	大发作时间 /min	死亡时间 /min	惊厥动物 /实验动物	惊厥率 /%
NS	-	4.3 ± 1.70	7.3 ± 3.20	10/10	100
地西洋	7.5	-	-	0/10	0 ²⁾
戊巴比妥钠	50	-	-	0/10	0 ²⁾
苯妥英钠	50	10.2 ± 3.67 ¹⁾	28.8 ± 6.44 ²⁾	10/10	100

注:与 NS 组相比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

海马-内嗅皮层-颞叶皮层环路^[11]。研究表明,过度激活海马-内嗅皮层-颞叶皮层产生的同步化电震荡是颞叶癫痫产生的主要原因^[12];内侧穿行通路(PP)-齿状回(DG)是外部信息进入海马的重要通路^[13]。所以,建立精确定位的齿状回、内侧穿行通路和颞叶皮层 3 个记录位置,观察槐定碱致痫作用的 3 点同步 IEEG 特点。

结果表明,诱发初期海马内 DG 区颗粒细胞对于槐定碱致痫作用敏感,并进一步随着发作的继续,通过海马-内嗅皮层-颞叶皮层环路波及到大脑广泛区域。在阵挛-强直期表现出各记录位置的明显同步化连续棘波放电,并与行为学表现是相一致的。以上现象提示,海马内部异常放电在槐定碱致痫作用中可能起到重要作用,是致痫作用原发部位之一,并过度激活海马-内嗅皮层-颞叶皮层通路,将逐步产生同步化电震荡扩散到整个皮层,引起大发作样痫性放电。

利用槐定碱致痫小鼠模型,采用抗癫痫工具药实施拮抗实验结果得出,采用阈下催眠剂量的地西洋可以对抗槐定碱引起的 100% 惊厥情况的发生,小鼠外观行为正常,并且,槐定碱点燃之前给予地西洋,小鼠翻正反射不消失。对于槐定碱致痫大鼠模型,相同剂量的地西洋可以有效拮抗痫样反应。说明槐定碱对实验动物致痫反应可能属于临床小发作类型。类似的结果也出现在戊巴比妥钠实验组。不同之处在于,采用的戊巴比妥钠实验组剂量为催眠剂量(小鼠翻正反射消失),拮抗实验中小鼠部分行为表现异常,说明地西洋的对抗效果要优于戊巴比妥钠。

苯妥英钠临床主要用于对抗癫痫的大发作,对临床小发作没有作用。实验结果表明,可以对抗实验动物大发作剂量的苯妥英钠对槐定碱点燃效应没有本质的影响。同样说明槐定碱对实验动物致痫反应可能属于临床小发作类型。结合文献报道^[2],实

验结果进一步为临床合理选择药物对抗槐定碱中枢不良反应提供了实验支持。

文献报道^[4,14],槐定碱引起中枢神经系统 Glu 及 GABA 的平衡失调可能是导致中枢兴奋作用机制之一,并有多种体液因子的参与。地西洋与戊巴比妥钠的中枢作用机制与增强中枢 GABA 能神经功能有关^[15]。槐定碱与中枢 GABA_A受体无亲和力^[16]。所以,实验结果支持槐定碱中枢兴奋、致痫作用与中枢 GABA 能神经功能下降相关。

另外,本实验预实验表明,50 mg · kg⁻¹的槐定碱,采用 sc 给药方式,可以有效点燃大鼠的痫样放电。与文献不同^[3,4],采用 sc 给药途径可以有效避免 ip 给药可能产生的首过消除效应,用以提高槐定碱的生物利用度和致痫效力;同时,sc 给药途径药效产生较为缓慢,便于长时程观察。

有趣的是,同样采用 sc 槐定碱 50 mg · kg⁻¹剂量没有引起小鼠的痫样发作。这可能与大、小鼠种属差异有关。考虑到 sc 给药途径较 ip 给药途径起效缓慢,所以在药物拮抗槐定碱致痫实验中采用 ip 给药途径。通过预实验,确定小鼠 ip 致痫剂量为 80 mg · kg⁻¹。而文献报道^[17],静脉(iv)给予槐定碱测定的小鼠 LD₅₀为(47.6 ± 1.81) mg · kg⁻¹。虽然给药途径不同,但剂量远远大于文献值。研究表明^[18],苦参碱的实验犬的口服生物利用度为(74.55 ± 14.11)%,而苦参碱(matrine)和槐定碱(sophoridine)是同分异构体^[1],所以,实验中槐定碱 ip 小鼠致痫剂量偏大,可能是 ip 给药后槐定碱受到首过消除效应的影响,生物利用度和致痫效力降低所致。所以实验提示,槐定碱制剂经消化道给药途径的临床使用,可能会因为首过消除效应的影响而疗效下降。

[参考文献]

[1] 钟仁山. 苦豆子的研究及其应用[M]. 银川:宁夏人民出版社,1983.



- [2] 李雪梅,吴运光,潘达鑫,等. 新型抗肿瘤药槐定碱[J]. 中国新药杂志,2006,15(8):654.
- [3] 李雪梅,庄文华,姜鸢滋,等. 高剂量槐定碱对大鼠神经系统长期毒性的病理形态学观察[J]. 癌症,2004,23(11s):1376.
- [4] 陈晓霞,胡淑婷,杨雪琴,等. 槐定碱致痫大鼠海马 Glu₁, GABA 及血清中 TNF, IL-2 和 IL-6 含量变化的研究[J]. 宁夏医学院学报,2007,29(5):944.
- [5] 彭晓东,许大庆,彭建中,等. 枸杞多糖对动物海马电活动的影响[J]. 宁夏医学院学报,2002,24(2):79.
- [6] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. New York: Academic Press, 1997.
- [7] 彭晓东,刘传缙. 微波照射对大鼠在体海马诱发电位长时程增强的影响[J]. 生物物理学报,2001,17(2):371.
- [8] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation II: Motor Seizure [J]. Electroencephogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3):281.
- [9] 彭晓东,闫乾顺,闫琳,等. 鹅绒藤对小鼠抗惊厥作用的观察[J]. 第四军医大学学报,2009,30(4):340.
- [10] Burwell R D, Witter M P, Amaral D G. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: A review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain [J]. Hippocampus, 1995,5(5):390.
- [11] Larry R. Squire, Craig E, et al. The medial temporal lobe [J]. Ann Rev Neurosci,2004,27:279.
- [12] 韩丹,张先荣,唐岳枫,等. 强直电刺激大鼠海马、中部颞叶新皮质诱发癫痫模型中电振荡与癫痫发生的关系研究[J]. 中国神经科学杂志,2000,16(2):108.
- [13] Witter M P. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus [J]. Prog Brain Res, 2007,163:43.
- [14] 余建强,蒋袁絮. 槐定碱对大鼠中枢谷氨酸及氨基丁酸免疫阳性细胞的影响[J]. 中药药理与临床,2006,22(2):17.
- [15] Goodman L S, Gilman A. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 8th Ed [M]. New York: MacMillan, 1993.
- [16] 王秀坤,李家实. 苦参碱等槐属六种生物碱对 GABA 受体的作用[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(supp):43.
- [17] 余建强,蒋袁絮. 槐定碱对小鼠中枢神经系统的影响[J]. 中草药,2006,37(11):8861.
- [18] 王平全,陈曙霞,周贤,等. 苦参碱在大鼠体内的药物动力学[J]. 上海第二医科大学学报, 1996, 20(4):333.

Epileptic seizure-like effect of *Sophora* alkaloid sophoridine on experimental animals

PENG Xiaodong, LU Zhaogang, MU Qingchun, HOU Yanhui

(Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the epileptic seizure-like effect of *Sophora* alkaloid sophoridine on electroencephalography (EEG) and its possible characteristic and the mechanism of the seizure-like effect. **Method:** Chronic electron implantation was employed for the intracranial electroencephalography (IEEG) recording in rat, and the traditional anti-seizure drugs were for the mechanism study in mice. **Result:** Compared with the medial perforant path (PP) area and the temporal cortex (TC), the granule cells in hippocampus dentate gyrus (DG) area is more sensitive in the kindling effect by sc sophoridine. Under-threshold hypnotic dosage of diazepam and the hypnotic dosage of pentobarbital sodium can block the sophoridine kindred seizure in mice, but the phenytoin sodium can not block the seizure, also the dosage of it can block the maximal electroconvulsive shock (MES) seizure. **Conclusion:** Sophoridine-induced synchronous oscillations in the hippocampus could elicit the generation and development of seizure. And the hippocampus might play the crucial role and be the original part of the seizure. Sophoridine kindred seizure might belong to clonic seizures, and the diazepam is the ideal agent for the treatment.

[**Key words**] sophoridine; EEG; seizure; diazepam; pentobarbital sodium; phenytoin sodium

doi: 10.4268/cjcm20100126

[责任编辑 刘 ■]