

芹菜甲素保护脑细胞的作用

于澍仁 高南南 李玲玲 王致瑜* 陈晔* 王文宁*

(中国医学科学院药用植物资源开发研究所, 北京; *北京神经外科研究所)

提要 以每周定时 im 马桑内酯 0.9~1.5 mg/kg 三个月为实验性癫痫慢性发作模型。ig 芹菜甲素 700 mg/kg 能明显降低大鼠癫痫发作的程度和次数, 延长潜伏期。脑形态学结果表明, 芹菜甲素对大脑顶叶皮层细胞、胶质细胞和小脑蚓部蒲肯野细胞有一定的保护作用。同时观察的安定 1.5~5 mg/kg 则无此作用。

关键词 芹菜甲素; 安定; 马桑内酯; 癫痫发作

芹菜甲素(3-正丁基苯酚, 简称 Ag-1)的抗惊作用已作报道^(1,2)。它对三种动物(大、小鼠和家兔)四种癫痫模型(最大电惊厥 MES, 最小电惊厥 MET, 戊四唑惊厥 MST 和听源性惊厥 MAS)有效, 具有广谱抗惊和毒性小⁽³⁾的特点。本文采用马桑内酯(简称 Cor)大鼠长期致痫方法, 进一步探讨其抗惊作用与脑细胞形态学之间的关系。

材料和方 法

Ag-1 纯品由医科院药物研究所杨靖华合成, 用时加阿拉伯胶混悬。马桑内酯注射液(批号 8338)每 ml 含 5 mg, 由华西医科大学制药厂生产。

一. 癫痫发作实验

(一) 潜伏期 自 im Cor 到首次癫痫发作的间隔时间。

(二) 发作程度分级 1. 失神发作(+): 头面部肌群间断地微弱抽搐, 频繁眨眼抖耳, 身体轻抖动, 时间不超过 2 s; 2. 肌阵挛性发作(++): 头面部肌群抽搐加重, 颈部肌肉紧张, 前肢伸直扑动, 身体重心下降或后移, 持续时间不超过 5 s; 3. 全身阵挛性发作(+++): 全身肌肉阵挛性抽搐、翘尾、摔倒、翻滚, 持续时间 10 s 以内; 4. 强直性发作(++++) : 角弓反张、咬牙尖叫跳窜、流涎、排便, 持续时间 10 s 以上。

二. 脑细胞形态及细胞计数

大鼠断头处死, 迅速取脑, 固定于 10% 中性福尔马林内, 2 h 后将脑冠状切成厚 2~3 mm 脑片继续固定。标本行石蜡包埋, 切片厚 6 μ , 进行 HE, Nissl 染色。在放大 400 倍的视野下以目镜测微器(面积 0.02 mm²)和目镜测微尺(长度 0.26 mm)为计数标准范围。取每只大鼠大脑顶叶冠状切片两张, 分别记数两侧 10 个标准范围内的具有细胞核的神经元以及同一区内的胶质细胞。每只大鼠取小脑蚓部矢状切片两张, 记数 12 个标准范围的具细胞核的蒲肯野氏细胞。

结 果

一. Ag-1 对 Cor 大鼠的影响

♀ Wistar 健康大鼠 40 只, 体重 140~160 g。由医科院动物中心成批供应。随机分为四

组各 10 只。除正常组外, 给药第 1 组 im Cor 0.9~1.5 mg/kg。给药第 2 组 ig Ag-1 700 mg/kg, 30 min 后 im Cor 致病, 剂量同前。给药第 3 组 ip 安定 (DZ) 1.5~5 mg/kg, 15 min 后 im Cor 致病, 剂量同前。以上各给药组每周定期致癫痫发作两次, 持续 3 个月。Cor 致病的特点是给药后 15 min 左右出现发作, 发作为间歇性, 2.5 h 左右停止。结果 Ag-1 组和 DZ 组癫痫发作的潜伏期和总发作次数明显延缓和减少。尤其是全身痉挛性和强直性发作明显减少。与 Cor 组比较有明显区别 ($P < 0.01$)。Ag-1 和 DZ 能对抗 Cor 致病作用, DZ 较 Ag-1 明显 (见表 1)。

Tab 1. Effect of ip Ag-1 on Cor induced convulsion in rats ($\bar{X} \pm SD$)

Group	Latent period (min)	Numbers of convulsion seizure	
		Total number	Grand mal
Cor	18.73 \pm 1.03	163	35
Ag-1	27.69 \pm 3.45	39	7
DZ	56.98 \pm 9.74	15	4
Ag-1:Cor	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$
DZ :Cor	$P < 0.01$		

二. Ag-1 对脑细胞形态与细胞计数的影响

在大鼠大脑皮层顶叶区, 四组大鼠均有不同程度地细胞固缩现象, 细胞深染, 核仁或胞浆与核界限不清。在 Cor 组少数的大锥体细胞顶树突呈螺旋状弯曲。胶质细胞偶见固缩, 呈深染的小体, 其周围有空隙。在少数切片上见细胞解体, 尼氏体溶解仅残存于细胞的一部分, 其周围有胶质细胞聚集。但在全部切片中未见顶叶出现灶性的细胞坏死和变性。全部情况表明癫痫长期发作时造成了慢性缺血缺氧 (见图 1~2)。以正常的有核的细胞为计数对象, 大脑顶叶第 V 层神经元的计数结果表明, Cor 组明显降低, Ag-1 组与正常组基本相同 (见表 2)。相同部位的胶质细胞计数结果, 只见 Cor 组明显增生, 其余 Ag-1 组和 DZ 组与正常组间无显著差异 (见表 2)。

四组动物中小脑蚓部蒲肯野细胞均有不同程度的变化, 有些固缩的变窄变长了的蒲肯野细胞核及胞质深染, 胞体呈多角形或棱形。有些核消失, 细胞死亡。以具有细胞核的蒲肯野

Tab 2. Effects of ip Ag-1 on the number of cerebral and cerebellar neurones in Cor-treated rats ($\bar{X} \pm SD$)

Group	Neuronal cells average No. ($0.02\text{mm}^2 \times 10/6 \mu$)	Glial cells average No. ($0.02\text{mm}^2 \times 10/6 \mu$)	Purkinje's cells average No. ($0.26\text{mm}^2 \times 10/6 \mu$)
C	93.40 \pm 5.81	131.30 \pm 5.21	25.70 \pm 3.74
Cor	85.56 \pm 6.54	153.33 \pm 9.11	19.39 \pm 3.56
DZ	85.30 \pm 5.84	128.80 \pm 3.89	22.30 \pm 1.89
Ag-1	94.67 \pm 6.04	129.20 \pm 5.82	24.87 \pm 4.32
Cor:C	$P < 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.01$
DZ:C	$P < 0.01$	$P > 0.05$	$P < 0.05$
DZ:Cor	$P > 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.05$
Ag-1:C	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
Ag-1:Cor	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$
Ag-1:DZ	$P < 0.01$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

组各 10 只。除正常组外，给药组 1 组 im Cor 0.9~1.5 mg/kg，给药组 2 组 im Ag-1 1.00 mg/kg，30 min 后，再给 Ag-1 0.5 mg/kg，1h 后，再给 Cor 0.9 mg/kg，连续 7 天。结果 Ag-1 组与正常组无差异，并和 DX 组有显著差异。DX 组与 Ag-1 组 (麦贝) 组无差异。

Tab 1. Effect of Ag-1 on the number of neurons in the cerebral cortex of rats.

Group	Mean number of neurons (x ± s)	p
Cor	10.38 ± 2.86	>0.05
Ag-1	10.38 ± 2.86	>0.05
DX	11.87 ± 1.93	>0.05
Ag-1+Cor	11.87 ± 1.93	>0.05

二、Ag-1 对神经元的影响。正常组、DX 组、Ag-1 组、Ag-1+Cor 组，其神经元数目均无显著差异。Cor 组神经元数目显著减少，且伴有神经元的退行性变和神经胶质细胞的增生。Ag-1 组与正常组无差异，且能显著减轻 Cor 组的神经元退行性变和神经胶质细胞的增生。

四、由图 1 可见，正常组、DX 组、Ag-1 组、Ag-1+Cor 组，其神经元数目均无显著差异。Cor 组神经元数目显著减少，且伴有神经元的退行性变和神经胶质细胞的增生。Ag-1 组与正常组无差异，且能显著减轻 Cor 组的神经元退行性变和神经胶质细胞的增生。

Tab 2. Effect of Ag-1 on the number of neurons in the cerebral cortex of rats.

Group	Mean number of neurons (x ± s)	p
C	10.38 ± 2.86	>0.05
Cor	10.38 ± 2.86	>0.05
DX	11.87 ± 1.93	>0.05
Ag-1	11.87 ± 1.93	>0.05

Fig 1. Cerebral section in rats (x 400, HE). (a) Control group; (b) Cor group; (c) Cor+Ag-1 group. The Cor group shows degeneration of the neurons and proliferation of the glials.

细胞为计数对象, Cor 组蒲肯野细胞明显减少, 与正常组和 Ag-1 组有明显差异 ($P < 0.01$), DZ 组略减少(见表 2)。

讨 论

已知 ig 或 ip Ag-1 对多种不同癫痫动物模型有效。今以 im Cor 长期致病方法模拟癫痫发作⁽⁴⁾。ig Ag-1 (>500 mg/kg) 或 ip DZ (>1.5 mg/kg) 都能对抗 Cor 的致癫痫作用。使癫痫发作的总次数, 潜伏期和发作程度都得到改善。尤其是全身痉挛性发作和强直性发作明显减少。Ag-1 组结果表明口服 Ag-1 具有广谱抗惊作用, 是一种母核不含 N 原子的新型抗惊化合物, 与 DZ, DPH 等已知抗癫痫药的结构不同, 作者试验了一系列 Ag-1 的新衍生物中均有抗惊作用。

Trapani 等报道大脑的顶叶、枕叶及小脑蒲肯野细胞对实验性脑缺氧及癫痫发作最为敏感^(5,6)。本文选择了大脑皮层顶叶和小脑皮层蒲肯野细胞作观察标本。结果在四组动物中, Cor 组大鼠癫痫发作明显, 经 3 个月 im Cor 致病后大鼠的脑细胞形态改变, 大脑顶叶第 V 层神经元计数明显降低, 胶质细胞明显增生, 小脑蒲肯野细胞减少。但 ig Ag-1 组大鼠脑形态学结果得到改善, ig Ag-1 可以阻止上述现象的发生, 使 Ag-1 组各方面观察指标都与正常组大鼠相似或一致, 事实表明, Ag-1 本身不仅具有抗惊厥效果, 而且还可能具有一定的脑保护作用。防止 Cor 致病后发生的病理改变。观察结果提示, 如在癫痫的发作早期, 尤其是儿童癫痫患者, 使用口服 Ag-1 治疗时, 有可能对智力的保护或延缓智力的损伤具有临床意义^(7,8)。我们曾提供了更多的验证⁽⁹⁾。

ip DZ 时癫痫发作最少, 作用最强。然而大鼠大脑皮层顶叶神经元数目却有较明显的减少, 说明 DZ 并不具有 Ag-1 那样的保护脑细胞功能, 两药也许作用机理不同。而且, DZ 的实验剂量够大, 已经出现一时性暂短的共济失调。其他作者及我们的以往工作提示^(2,7,10) DZ 类化合物对实验动物模型具有良好的抗惊作用, 同时又能阻止癫痫棘波放电。而 Ag-1 确能完全对抗 iv 戊四唑的强直惊厥, 在行为上使动物保持清醒静止状态, 但 EEG 可表现出爆发性棘波。因此, 从这一点看可以认为 Ag-1 与 DZ 的作用方式不尽相同。

综合以上实验结果表明, Ag-1 可能具有独特的保护脑细胞作用, 对癫痫早期患者或患儿的智能有良好影响, 因此它具有一定的社会效益。有关 Ag-1 的临床观察正在进行中。

参 考 文 献

1. 于澍仁, 尤胜权. 芹菜甲素和乙素的抗惊厥作用. 药理学报 1984; 19:566.
2. 于澍仁, 等. 芹菜甲素的药理作用. 同上 1984; 19:486.
3. 于澍仁, 等. 芹菜甲素的毒性和实验治疗. 药学通报 1985; 20:187.
4. 王致瑜, 等. 马桑内酯长期致病对脑的影响. 中国神经精神疾病杂志 1987; 13:202.
5. Trapani GD, et al. Experimental acute hypoxia. brain preservation by phenobarbital pretreatment. histological study in guinea pigs. *Resuscitation* 1984; 11:47.
6. Mogens D. Number of Purkinje cells in patients with grand mal epilepsy treated with diphenylhydantoin. *Epilepsia* 1970; 11:313.
7. Arcardi J, Cherrie JJ. Consequences of status epilepticus in infants and children. In: Delgado-Escueta AV, et al. eds. *Status epilepticus: Mechanisms of brain damage and treatment*. New York: Raven Press, 1983:115.
8. Leavitt F. *Drugs and behavior*. New York: John Wiley and Sons, 1982:349.
9. 于澍仁, 等. 芹菜甲素增强学习记忆的作用. 中国药理学报 1988; 9:385.
10. Delorenzo RJ, Dashefsky LH. Anticonvulsants. In: Lajtha A, ed. *Handbook of Neurochemistry*. Vol 9. New York and London: Plenum Press, 1985:385.

THE PROTECTIVE EFFECT OF 3-BUTYL PHTHALIDE ON RAT BRAIN CELLS

SR Yu, NN Gao, LL Li, ZY Wang*, Y Chen* and WN Wang*

*(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, *Beijing Institute of Neurosurgery, Beijing)*

ABSTRACT 3-Butyl phthalide was found to have anticonvulsant activity in animal experiments. In the present study, a model of chronic epilepsy was induced by im coriaria lactone 0.9~1.5 mg/kg in rats for 3 months. Ag-1 700 mg/kg ig was shown to prolong the latent period of the epileptic seizures, reduce the severity of the seizures and the number of animals with seizures. Of particular importance is the fact that, no evidence of lesions in the cerebral neurons, glial cells and cerebellar Purkinje's cells of the Ag-1 treated animals was observed in histological studies. This result is especially encouraging as Ag-1 may have a protective effect on rat brain cells.

Key words 3-Butyl phthalide(Ag-1); Diazepam; Coriaria lactone; Epileptic seizure