

吲哚醌对大鼠杏仁核点燃的抑制作用

李丰桥*, 岳 旺, 南 胜¹, 张 健, 刘占涛

(青岛大学医学院药理教研室, 青岛 266021; ¹ 日本国北海道医疗大学, 北海道 061-02)

摘要 目的: 研究吲哚醌对大鼠杏仁核点燃发作的影响及其抗惊厥作用。方法: 建立大鼠杏仁核点燃模型, 观察发作的电生理指标和行为学变化; 在小鼠最大电休克惊厥、戊四唑惊厥和氨基脲惊厥模型计数惊厥发生率。结果: ip 吲哚醌 50~200 mg·kg⁻¹ 均可升高杏仁核点燃大鼠的局灶性后放电阈值, 降低发作强度和全身性发作 (stage 5) 百分率; 可剂量依赖性地对抗小鼠最大电休克发作, 并能取消戊四唑惊厥和氨基脲惊厥的强直相, 降低戊四唑惊厥的死亡率。结论: 吲哚醌对癫痫发作有抑制作用, 其机制与抑制 MAO-B 活性、升高发作阈值有关。

关键词 吲哚醌; 单胺氧化酶抑制剂; 点燃效应; 杏仁核; 癫痫

吲哚醌(isatin, ISA), 又名靛红, 是近年发现存在于人和动物体内的一种内源性活性因子^[1], 脑内海马等部位有较高分布; 实验证明对单胺氧化酶 B (MAO-B) 有较强的选择性抑制作用, 可影响脑内单胺类神经递质 NE, DA 和 5-HT 水平^[2,3]。前文^[4]曾报道, 去甲肾上腺素系统在癫痫模型的重要影响。ISA 作为 MAO-B 抑制剂有较强的中枢药理活性, 可降低自发性听源惊厥大鼠的发作强度^[5], 而在大鼠的杏仁核点燃模型和其它惊厥模型如小鼠的戊四唑惊厥和氨基脲惊厥模型上的作用尚未见报道。本文在以上模型上进一步验证 ISA 的抗癫痫作用, 并探讨有关机制。

材 料 和 方 法

动物 Wistar 大鼠♀, 体重(180±10) g; 昆明种小鼠, ♀♂兼有, 体重(21±3) g, 由青岛市药品检验所动物中心提供。

药品 吲哚醌(ISA), 北京化工厂生产; 二甲基亚砜(DMSO), 江苏洪声化工厂生产; ISA 实验前溶于 DMSO, 给药容量为小鼠 5 ml·kg⁻¹, 大鼠 1 ml·kg⁻¹。戊巴比妥钠, Union 公司进口分装; 戊四唑(PTZ)、盐酸氨基脲(SCZ)均为日本 Nakalai Tesque Co. 产品。以上药品均为分析纯, 临用前溶于生理盐水。

仪器 电子刺激器, SEN-3201; 隔离器, SS-102J, 日本光电公司产品; 脑立体定向仪, 江湾 I 型 C; SMUP-PC 生物信号处理系统, 上海医科大学生理教研室研制; 生理药理多用仪, YSD-4 型, 蚌埠无线电二厂生产。

大鼠杏仁核点燃实验 ip 戊巴比妥钠 40 mg·kg⁻¹ 麻醉后固定于江湾 I 型脑立体定位仪上, 按照 König 图谱确定大鼠左右杏仁核, 坐标为前囟后 3.0 mm, 旁开 4.8 mm, 硬脑膜下 8.8 mm, 插入两根直径为 0.25 mm 的绝缘双极电极, 尖端分开约 0.25 mm, 另一端分别焊接一微型插头; 电极和微型插头用牙托粉固定在颅骨表面。术后连续 3 d ip 青霉素钠 10 万 u, 预防感染。

术后两周, 每日一次恒流刺激右侧杏仁核, 参数为 400 μA 单相方波, 波宽 1 ms, 频率 60 Hz, 持续时间 1 s。记录脑电变化及放电潜伏期(latency)、后放电时程(afterdischarge duration, ADD)和发作强度(seizure severity)。放电潜伏期为刺激结束到刺激核团出现高幅棘波放电的时间; 后放电时程是指刺激后杏仁核 EEG 波幅至少为刺激前的两倍和频率在 1 Hz 以上的放电持续的时间; 发作强度根据 Racine 氏法^[6]进行行为分期: I. 不动、闭眼、胡须动、嗅; II. 点头、咀嚼伴有面部抽搐; III. 一侧前肢抬起, 阵挛; IV. 站立并伴有两侧前肢的阵挛; V. 站立、跌倒, 伴有全身性阵挛发作。连续 5 次出现第 V 期反应即为完全点燃, 用于下述实验。

ISA ip 25, 50, 100 及 200 mg·kg⁻¹ 后 30 min 测定后放电阈值(afterdischarge threshold, ADT)。测定 ADT 用恒压刺激, 其它参数不变。从 1 V 开

收稿日期: 1997-10-27

* 现地址: 北京医科大学神经科学研究中心, 北京 100083

Tel: (010)62091150, E-mail: nrc@mail.djmu.edu.cn

始,每隔 2 min 刺激强度增加 0.2 V,直至引起至少持续 3 s 的异常放电所需最低刺激电压为 ADT,记录在 ADT 刺激下的放电潜伏期、后放电时程和发作强度。给药前 3 d ip DMSO 测定对照条件下的上述指标,与药物处理后所得结果作自身对照。为防止药物蓄积,给药间隔至少为 3 d。

分别于给药 ISA 100 mg·kg⁻¹后 15, 30, 45, 60, 90, 120 及 180 min 测定以上参数,以研究其时间—效应关系。每次用药测定 ADT 的前 3 d 测定对照条件(单纯 ip DMSO)下的 ADT,计算 ISA 处理后的 ADT 增加值。

ISA 抗小鼠最大电休克实验 提前一周筛选动物。用生理药理多用仪通过角膜电极给予 130 V, 0.5 s, 50 Hz 交流电刺激,以出现强直性惊厥为阳性动物。取阳性动物 60 只,♀♂ 各半,随机分成 6 组,分别 ip DMSO 或 ISA 50, 70, 100, 140, 200 mg·kg⁻¹, 30 min 后按上述方法电刺激,记录屈曲、强直、阵挛和昏睡相时间,计算强直发生率。以抑制强直发生率为指标计算 ISA 抗最大电休克发作的 ED₅₀。

ISA 抗小鼠戊四唑惊厥实验 小鼠 30 只,♀♂ 各半,随机分成 3 组,分别 ip DMSO 或 ISA 50, 200 mg·kg⁻¹ 预处理。30 min 后 sc 戊四唑 85 mg·kg⁻¹。以出现阵挛性惊厥为指标记录潜伏期和 120 min 内惊厥发生率、强直发生率及死亡率。

ISA 抗小鼠氨基脲惊厥实验 小鼠 30 只,♀♂ 各半,随机分为 3 组,分别 ip DMSO 或 ISA 50, 200

mg·kg⁻¹, 然后立即尾静脉 iv 氨基脲 200 mg·kg⁻¹。以出现狂奔和后肢强直惊厥为指标,计数氨基脲后 180 min 惊厥潜伏期、强直发生率和死亡率。

统计学处理 ISA 影响杏仁核点燃大鼠发作参数的统计学处理采用配对 *t* 检验,其它计量资料采用组间 *t* 检验,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示;计数资料用比较两样本率差别显著性的方法进行统计学处理;ED₅₀ 的计算采用寇氏法。

结 果

1 ISA 对大鼠杏仁核点燃效应的影响

每日一次按上述方法刺激右侧杏仁核。刺激后左右杏仁核均出现高幅高频的病性放电,随刺激次数增加,后放电时程进行性延长,由开始刺激时的(10±2.1) s 到首次出现第 V 期反应时的(45.3±5.4) s(*n* = 12, *P* < 0.01);至完全点燃需刺激次数为 13.3±4.2(*n* = 12)。

由表 1 可见, ip ISA 50, 100, 200 mg·kg⁻¹ 均可显著升高点燃大鼠的 ADT,其中引起最大效应的剂量为 100 mg·kg⁻¹,可升高阈值约 20%。在 ADT 刺激下,动物均表现 V 期发作。用 ISA (50~200) mg·kg⁻¹ 处理显著抑制 V 期发作百分率(*P* < 0.01);平均 Racine 氏评分较各自对照组也显著降低,其中作用最明显的是 100 mg·kg⁻¹ (*P* < 0.01),这与该剂量升高 ADT 作用一致。

ISA ip 100 mg·kg⁻¹ 给药后(15~180) min 均升高 ADT,作用峰值时间为 1 h(图 1)。

Tab 1 Effects of different doses (25~200 mg·kg⁻¹, ip) of isatin on seizure parameters in fully kindled rats. The afterdischarge threshold (ADT) was determined 0.5 h after isatin or vehicle(DMSO) treatment by administering a series of stimulations at 2 min intervals beginning at 1 V and increasing in steps of 0.2 V. The threshold was defined as the lowest intensity producing afterdischarge with a duration of at least 3 s

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Number /n	Seizure parameter		Stage 5 seizure protection
			ADT/V	Seizure severity	/%
DMSO		9	3.91±1.61	5	0
ISA	25	9	4.00±1.54	3.33±2.50	33.3
DMSO		9	3.91±1.61	5	0
ISA	50	9	4.28±1.69*	1.89±2.31**	77.8**
DMSO		11	3.61±1.66	5	0
ISA	100	11	4.22±1.78***	1.18±1.99***	88.9**
DMSO		9	3.89±1.39	5	0
ISA	200	9	4.22±1.70*	1.67±2.50**	50.0**

$\bar{x} \pm s$. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001 vs individual vehicle controls.

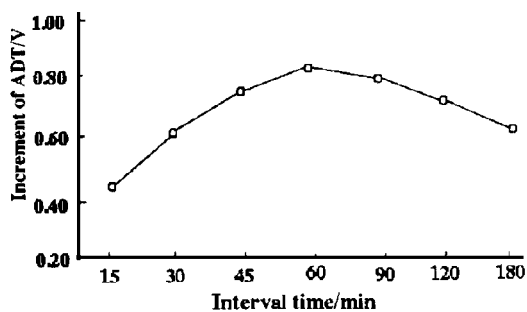


Fig 1 Time-course of afterdischarge threshold (ADT) increment after a single dose (100 mg·kg⁻¹, ip) of isatin. The increment of ADT between isatin treatment and individual vehicle control in the same rat was calculated and showed as means of nine rats.

2 ISA 对小鼠最大电休克的影响

ISA 显著抑制小鼠最大电休克发作, 抑制发作强直相并呈剂量依赖关系, ED₅₀ 为 (123 ± 31)

mg·kg⁻¹; 对阵挛相无效, 200 mg·kg⁻¹ 时甚至延长阵挛时间 ($P < 0.05$)。

3 ISA 对小鼠戊四唑和氨基脲惊厥的影响

ip ISA 200 mg·kg⁻¹ 显著降低戊四唑惊厥和氨基脲惊厥中强直发生率和死亡率, 而低剂量的 ISA 50 mg·kg⁻¹ 不具有这种保护作用, 反而促进惊厥的发生, 表现为惊厥潜伏期缩短 (表 2, 3)。

Tab 2 Effect of isatin (ip) on pentylenetetrazole (PTZ, 85 mg·kg⁻¹, sc)-induced seizure in mice

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Latency /min	Tonic seizure /%	Death /%
Control		21.7 ± 8.7	90	90
ISA	50	11.8 ± 7.0*	100	90
	200	21.1 ± 13.9	0**	40*

$\bar{x} \pm s$, $n = 10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

Tab 3 Effect of isatin (ip) on semicarbazide (SCZ, 200 mg·kg⁻¹, iv)-induced seizure in mice

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Latency /min	Survival time /min	Tonic seizure /%	Death /%
Control		71.9 ± 21.7	86.0 ± 23.7	90	90
ISA	50	59.7 ± 22.7	73.2 ± 42.2	100	90
	200	51.3 ± 12.0*	87.5 ± 29.9	10**	90

$\bar{x} \pm s$, $n = 10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

讨 论

点燃模型与人类精神运动性癫痫在发作行为、脑电图、痫样放电的扩散方式等方面极相似, 被认为是目前最理想的癫痫模型。临床常用的治疗精神运动性癫痫的药物苯巴比妥、卡马西平、丙戊酸钠和地西洋都可有效抑制大鼠杏仁核的点燃效应^[7]。

本结果表明: ISA 对大鼠杏仁核点燃有明显抑制作用。ISA ip (50~200) mg·kg⁻¹, 可显著升高后放电阈值, 降低发作程度; 同时第 V 期反应率显著降低, 100 mg·kg⁻¹ 剂量组可降低 89%。但 200 mg·kg⁻¹ ISA 作用反而低于 100 mg·kg⁻¹ 组, 机制尚不清楚。此外, ISA 对放电潜伏期和后放电时程无明显影响, 甚至有延长后放电时程的趋势, 说明 ISA 不能阻止异常脑电扩布, 对杏仁核点燃的抑制效应系升高癫痫灶的后放电阈值所致。

最大电休克实验发现 ISA 可剂量依赖性地对抗最大电休克发作的强直相, 与 Müller 等人报告^[8] 基本一致。在戊四唑和氨基脲惊厥模型发现: 200

mg·kg⁻¹ ISA 可完全取消上述化学致惊剂引起的强直性发作。证明 ISA 抑制惊厥的强直相, 而对阵挛相无效, 甚至有易化作用, 这与点燃模型的结果也是一致的, 提示 ISA 可能对抑制癫痫大发作有意义。

有报道, 选择性 MAO-B 抑制剂 selegiline 在点燃模型上^[9] 和最大电休克以及戊四唑惊厥模型上^[10] 有抗惊厥作用, 在对局灶性发作阈值 (ADT) 的影响方面与本文 ISA 的结果相似, 提示 ISA 抗癫痫作用与其 MAO-B 抑制作用有关。

前文报告了脑内胺类递质对癫痫有密切关系^[4,11]。肾上腺素功能增强和脑内 5-HT 水平提高有抑制癫痫作用^[6]。用 6-羟基多巴胺耗竭脑内儿茶酚胺可明显加快速点燃进程^[12]。Gordon 等报道点燃过程本身可使脑内单胺递质水平降低^[13], 而我们实验中也发现: 随着刺激次数的增加, 发作阈值 (ADT) 进行性降低, 此二者是相吻合的, 即: 在点燃过程中, 多次电刺激导致脑内单胺水平持续降低, 使 ADT 进行性降低, 从而使癫痫发作的易感性增加。ISA 作为 MAO-B 抑制剂, 恰恰可升高脑内 NE 和 5-

HT 水平^[2,3],从而升高发作阈值,发挥抗癫痫作用。

ISA 不仅存在于人和动物体内,也存在于中药青黛中^[14]。古典医著中记载青黛有抗癫痫作用,因此推测 ISA 可能是青黛抗癫痫的活性成分之一。研究 ISA 的抗癫痫作用还有开发传统中药的应用价值。

综上所述,ISA 升高点燃大鼠的发作阈值,降低发作强度和发作百分率,对抗小鼠最大电休克发作、戊四唑和氨基脲惊厥,说明 ISA 有抗癫痫作用,这种作用可能与其抑制 MAO 活性,升高脑内单胺递质水平有关。

参 考 文 献

- Glover V, Halket JM, Watkins PJ, *et al.* Isatin: identity with the purified monoamine oxidase inhibitor tribulin. *J Neurochem*, 1988, **51**:656
- Hamaue N, Minami M, Kanamarn Y, *et al.* Endogenous monoamine oxidase (MAO) inhibitor (tribulin-like activity) in the brain and urine of stroke-prone SHR. *Biog Amines*, 1992, **8**:401
- McIntyre IM, Norman TR. Serotonergic effects of isatin, an endogenous MAO inhibitor related to tribulin. *J Neural Transm[Gen sect]*, 1990, **79**:35
- 岳旺,张士善.心得安抗惊厥的机理.药理学报, 1984, **19**:16
- Medvedev AE, Gorkin VZ, Fedotova IB, *et al.* Antiseizure effect of isatin and reduction of monoamine activity in rats with experimental audiogenic seizures. *Med Sci Res*, 1994, **22**:555
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, 1972, **32**:281
- Yue W. Effects of drugs on the development of amygdala kindling and seizure. *J Yonago Med Ass*, 1993, **44**:210
- Müller M. Vergleichende pharmakologische Studien mit Isatin. *Med Exp*, 1962, **7**:155
- Löscher W, Lehmann D. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of *L*-deprenyl (selegiline) in the kindling model of epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, **274**:307
- Löscher W, Lehmann H. *L*-deprenyl (selegiline) exerts anticonvulsant effects against different seizure types in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, **277**:1410
- 岳旺,张士善.可乐宁和育亨宾对氨基脲惊厥和电惊厥的影响.中国药理学报, 1984, **5**:79
- Corcorn ME, Mason ST. Role of forebrain catecholamines in amygdaloid kindling. *Brain Res*, 1980, **190**:472
- Gordon I, Mintz M, Rosenne E, *et al.* Long-term effects of amygdaloid kindling on striatal dopaminergic terminals. *Brain Res Bull*, 1995, **36**:235
- 李清华.青黛的化学成分.植物学报, 1987, **29**:67

THE INHIBITORY EFFECT OF ISATIN ON SEIZURE ACTIVITY IN AMYGDALOID KINDLED RATS

Li Fengqiao(Li FQ), Yue Wang(Yue W), Minami M¹, Zhang Jian(Zhang J) and Liu Zhantao(Liu ZT)

(Department of Pharmacology, Medical School of Qingdao University; Qingdao 266021;

¹Department of Pharmacology, Higashi-Nippon-Gakuen University, Hokkaido, 061-02, Japan)

ABSTRACT **AIM:** To study the effect of isatin on amygdala-kindled seizure and the anticonvulsant effect in convulsion models. **METHODS:** The electrophysiological and/or behavioral indices were observed and recorded in the amygdaloid kindling model of rat and several convulsant models of mice, ie maximal electroshock seizure, semicarbazide (SCZ)- and pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures. **RESULTS:** In fully kindled rats, isatin, tested at doses of 50 to 200 mg • kg⁻¹ ip, significantly increased the focal afterdischarge threshold (ADT), reduced the seizure severity and the percentage of generalized seizure ($P < 0.01$). In addition, isatin was shown to dose-dependently antagonize maximal electroshock seizure, with ED₅₀ of (123 ± 31) mg • kg⁻¹. Isatin at the dose of 200 mg • kg⁻¹ specifically modified the tonic component of sc PTZ or iv SCZ induced convulsion ($P < 0.01$) and thus reduced mortality in PTZ-induced seizure ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** The present data demonstrated that isatin exerted inhibitory effect on kindled seizure in fully kindled rats and on convulsions induced either electrically or by chemicals, indicating that it might possess anticonvulsant efficacy.

KEY WORDS isatin; kindling effect; monoamine oxidase inhibitor; amygdala; epilepsy