

电针和 7-硝基吡啶对癫痫的效应 及其与脑内一氧化氮的关系*

黄志农 杨 茹 陈 刚 程介士**

(上海医科大学神经生物学教研室, 医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032)

摘 要 为进一步探索 NO 在癫痫诱导和发作以及针刺抗痫中的作用, 本文采用特异性 nNOS 阻断剂 7-硝基吡啶(7-NI)观察 NO 合成减少时青霉素致痫的诱导和发作的变化, 并使用 NO 敏感电极实时连续记录青霉素致痫及穴位针刺和注射 7-NI 时大鼠海马内 NO 的变化。结果表明, 癫痫使发作脑电总功率剧烈升高。穴位针刺后发作明显减弱, 各时间点脑电总功率与青霉素注射时有显著差别。7-NI 使诱发时间缩短, 阈值降低, 但发作程度减轻, 在各时间点脑电总功率均低于对照组。癫痫发作时海马内 NO 浓度明显升高, 注射 7-NI 和穴位针刺均使 NO 浓度减低。结果提示, 神经源性 NOS 可增强癫痫的发作, 但延长其诱导期。穴位针刺可能通过降低 nNOS 水平, 减少 NO 的生成而抑制癫痫发作。

关键词: 癫痫; 一氧化氮; 电针; NO 敏感电极; 7-硝基吡啶; 海马

学科分类号: Q424

癫痫是一种常见的神经系统疾病, 以在病程中反复发作的神经元异常放电所致的暂时性中枢神经系统功能失常为特征。癫痫的发生主要与 γ -氨基丁酸抑制作用和谷氨酸兴奋作用, 及内阿片肽中脑啡肽和强啡肽的失平衡有关。体内一氧化氮(nitric oxide, NO)作为血管舒张因子于 70 年代被发现, 80 年代作为可能的神经递质备受人们关注, NO 在癫痫中的作用也得到广泛的研究^[1], 但 NO 是致病还是抗痫呢? 由于各研究室采用的方法不同, 并且多数使用间接检测方法致使实验结果分歧很大。另外有些报道中没有将 NOS 的各种类型分别探讨, 也影响了研究的深入。针刺抗痫的机理可能与海马兴奋性和抑制性氨基酸及内阿片肽系统的参与有关^[2,3]。针刺可影响 nNOS mRNA 表达的变化^[4], 但由 nNOS 促使生成的 NO 是否参与针刺抗痫呢?

我室以前的工作采用特异性 nNOS 阻断剂 7-NI 并使用 NO 敏感电极实时连续记录了脑片上青霉素致痫时海马内 NO 的变化^[5]。本工作在整体水平上使用同样的方法观察了 nNOS 减少时青霉素诱导癫痫的时间、阈值和发作程度的改变, 及穴位针刺时大鼠海马内 NO 的变化, 试图对上述问题作进一步探索。

1 材料和方法

1.1 实验动物及青霉素致痫模型 雄性 Wistar 大鼠, 体重 200 ~ 220 g (中国科学院实

1998-12-07 收稿 1999-02-08 修回

*国家自然科学基金资助项目 (No.39570886)

**联系作者. Tel: 64041900 - 2521; E-mail: jscheng@shmu.edu.cn

验动物中心提供)。实验室温度 25℃。实验共分 8 组, 每组 6~8 只, 分别是正常组、假手术组、癫痫对照组、致病加针刺组以及致病加 7-NI 组(0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.025%)。大鼠经戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉后, 用立体定向仪按 George Paxinos 图谱定位。在左/右海马及左侧脑室对应位置的颅骨上各钻一小孔, 并埋入微量注射用套管(海马 P3.0 mm, L/R 2 mm, H3.7 mm; 侧脑室 P 0.7 mm, L 2 mm, H4.2 mm)。用 502 胶水加牙托粉固定。术后饲养 3~5 d, 进行实验。将 1.5 μ l 青霉素(Pen. 200 U/ μ l)缓慢注入右侧海马内制造癫痫模型, 一般注药开始后 7~8 min 脑电出现典型棘状波。

1.2 电针和用药(7-NI) 采用 G-6805 型电针治疗仪(上海医用电子仪器厂), 青霉素致病 30 min 前在大鼠相当于“风府”、“筋缩”穴的部位(分别位于枕骨下凹陷及第九、第十胸椎棘突间)进行电针(Electro-acupuncture, E.A.), 持续 60 min, 强度为 6 mA, 频率 100 Hz。7-NI 溶解于 20% CREMOPHOR EL (均购自 Sigma 公司), 于青霉素致病 30 min 前微量注射 5 μ l 入左侧侧脑室。

1.3 脑电的引导及分析 在大鼠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。用三芯输入线将脑电信号输入 LMS-2B 型二道生理记录仪(成都电子仪器厂), 时间常数为 0.2 s, 灵敏度 0.2 mV/cm, 高频滤波 100 Hz。同时, 从记录仪输出端引出脑电信号经 A/D 转换板输至计算机, 进行快速富立埃变换。通过对频域的分析, 记录脑电总功率谱。

1.4 NO 电极的制备及测定 NO 标准溶液的配制、NO 敏感电极的制作、及电极的标定和抗干扰实验, 均与本室已发表工作相同^[5]。海马 NO 释放的测定采用三电极体系, 目标电极为上述 NO 敏感电极, 辅助电极为铂丝, 参比电极为 Ag-AgCl 电极, 目标电极置于左侧海马, 辅助电极与参比电极置于头皮。测试前, 将电极置于人工脑脊液中浸泡 1 h, 使修饰膜充分膨胀, 将三电极与恒电位仪(上海正方电子电器有限公司)输入端相联, 信号从恒电位仪输出到直流放大器, 后接记录仪(Pharmacia 公司), 恒电位仪施加 800 mV 电压于 NO 电极和 Ag-AgCl 参比电极间, 使脑组织中 NO 在目标电极上产生氧化电流, 后者通过恒电位仪中的标准电阻转换成电压信号, 输入信号放大器, 然后用记录仪记录, 并与 NO 标准浓度曲线对照, 求出待测 NO 浓度。

1.5 统计方法 阈值组间比较采用卡方检验, 样本数 $n = 10$ 。其他组间比较采用 t 检验, 样本数 $n = 6 \sim 8$, 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 青霉素致病及 7-NI 和电针作用时脑电总功率的变化

青霉素注射开始后 8~10 min, 脑电即呈现典型的高频高幅痫样棘状波, 大鼠出现咬牙、嘶叫、甩尾等症状。继而开始后肢抽搐, 甚至全身痉挛。脑电实验结果显示, 发作后 5, 10, 20, 30 min 脑电总功率较正常时剧烈升高, 至 1 h 达最高值, 统计有显著意义($P < 0.01$)。至 2 h 略有下降, 但 12 h 依然高于正常。注射 7-NI 30 min 后再注射青霉素, 癫痫发作程度明显减轻, 在青霉素注射完毕后 10, 20, 30 min, 1 h 和 2 h 五个时间点上脑电总功率大大低于单纯青霉素注射时相应各时间点的脑电总功率。但 4 h 后, 发作恢复至对照组发

作水平,表明 7-NI 的抑制作用在 2 h 后逐渐减弱,至 4 h 消失。但是不同浓度 7-NI 的作用未见显著性差别。穴位针刺后癫痫也明显减弱,各时间点脑电总功率较单纯青霉素注射时相应各时间点的脑电总功率差别有显著性(表 1, 图 1)。

表 1 穴位针刺和不同浓度 7-NI 对癫痫发作时脑电总功率的影响

Table 1 Effect of electroacupuncture (E.A.) and 7-nitroindazole (7-NI) on the total power spectrum of EEG in penicillin (Pen)-induced epilepsy

	Normal	5 min	10 min	20 min	30 min	1 h	2 h	4 h
N.S. + Pen (control)	36.82 ± 7.99	1200.00 ± 90.08	1237.50 ± 180.01	1276.00 ± 73.79	1394.50 ± 418.25	2110.50 ± 550.87	1923.00 ± 486.64	547.30 ± 98.12
E.A. + Pen	51.88 ± 6.19	451.50 ± 196.44**	444.75 ± 208.83**	437.00 ± 176.11**	407.50 ± 177.69**	525.25 ± 246.74**	506.75 ± 241.32**	215.75 ± 77.58 *
0.025% 7-NI + Pen	30.00 ± 6.48	529.33 ± 352.61*	418.67 ± 169.90**	442.33 ± 197.52**	458.00 ± 282.45*	615.33 ± 316.59*	323.33 ± 273.36*	221.33 ± 159.43
0.05% 7-NI + Pen	31.40 ± 5.39	285.20 ± 139.55**	443.40 ± 200.54**	529.50 ± 107.80**	394.80 ± 75.82*	387.50 ± 102.12*	384.00 ± 150.74**	269.60 ± 96.28
0.1% 7-NI + Pen	39.50 ± 6.73	493.00 ± 274.21**	598.67 ± 325.12**	527.00 ± 228.99**	617.33 ± 396.81*	832.00 ± 482.76*	928.00 ± 471.06*	752.00 ± 406.30
0.2% 7-NI + Pen	27.07 ± 7.20	326.97 ± 14.93**	463.63 ± 73.34**	576.67 ± 116.77**	640.86 ± 359.10*	697.38 ± 350.23*	745.91 ± 541.65	446.17 ± 124.59

The time items were counted from the completion of microinjection of penicillin. Normal item indicates the quiet status of animals before drug injection or E.A. 7-NI, E.A. and control groups were pre-treated with 7-NI, E.A. and N.S. respectively 30 min before epilepsy induction. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control.

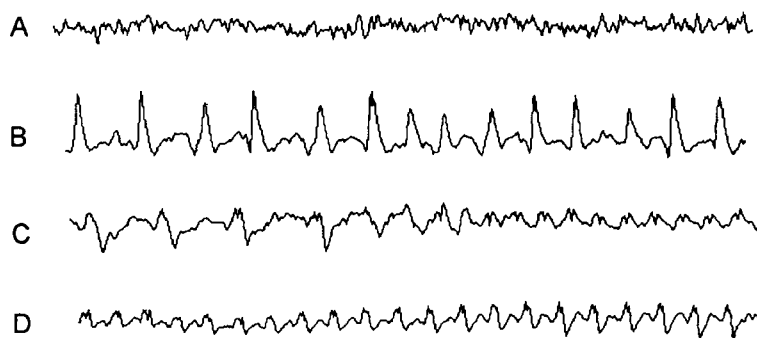


图 1 7-NI 和穴位针刺对青霉素诱导癫痫时脑电的影响

Fig.1 Effect of 7-NI and electroacupuncture on penicillin-induced epilepsy

A. Control. B. N.S. + penicillin. C. 0.1% 7-NI + penicillin. D. Electroacupuncture + penicillin.

2.2 诱发时间和阈值的变化

大鼠癫痫诱发时间(开始注射青霉素至出现典型的高频高幅痫样棘波)通常为 8 ~ 10 min。预注射 7-NI 30 min 后再注射青霉素,诱发时间大大缩短,约 2 ~ 3 min,见图 2。同时

将阈值从正常 150 U 青霉素降低到 100 U。表明 7-NI 促进了青霉素对癫痫的诱发作用。

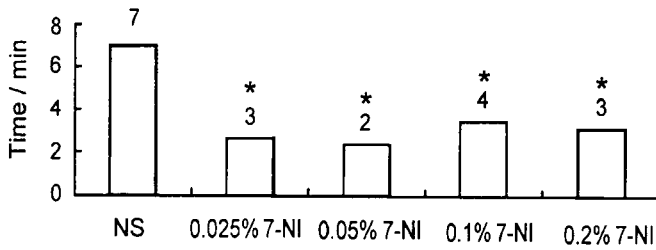


图 2 不同浓度 7-NI 对癫痫诱发时间的影响

Fig. 2 Effect of 7-NI of different concentrations on epilepsy latency measured as the gap between the beginning of penicillin microinjection and the seizure

* $P < 0.05$ vs N.S. group.

正常静息状态的大鼠海马 NO 浓度为 $0.969 \pm 0.320 \mu\text{mol/L}$, 连续记录 4 h, 选择 0, 5, 10, 20, 30 min, 1, 2, 4 h 时间点, 其 NO 浓度变化值(各时间点浓度与静息时浓度之差)平均约 9 nmol/L。单纯癫痫发作时海马 NO 浓度明显升高, 各时间点 NO 浓度变化值逐渐增大, 与正常静息状态大鼠作各时间点组间 T 检验, 差别有显著意义 ($P < 0.05$)。侧脑室预先 30 min 注射 0.1% 7-NI $5\mu\text{l}$, NO 浓度逐渐减低, 至发作 10 min 降至最低, 癫痫发作明显减弱。随后 NO 浓度开始回升, 至 4 h 已接近正常对照值, 这时癫痫发作的抑制效应也基本消失。穴位针刺后 NO 浓度逐渐减低, 癫痫发作也明显减弱, 至 4 h NO 仍大大低于正常对照值, 且针刺抑制效应依旧持续(表 2)。

表 2 癫痫发作时 7-NI 和针刺对大鼠海马 NO 变化的影响

Table 2 Effect of E.A. and 7-NI on the change of NO in hippocampus during epilepsy (unit: nA)

	Normal	0 min	5 min	10 min	20 min	30 min	1 h	2 h	4 h
Control	0.00	0.00 ± 3.94	-0.20 ± 0.57	-0.10 ± 0.89	-0.10 ± 0.74	-0.20 ± 0.75	-0.20 ± 0.76	-0.50 ± 0.61	-0.50 ± 1.06
Pen + N.S.	0.00	1.43 ± 2.16	1.43 ± 2.73	1.43 ± 2.36	1.64 ± 2.42	1.71 ± 2.14	2.57 ± 2.21*	3.14 ± 2.58*	3.64 ± 3.09*
Pen + E.A.	0.00	-2.25 ± 1.44**	-2.33 ± 1.17*	-2.58 ± 1.11**	-2.67 ± 1.21**	-2.75 ± 1.86**	-2.50 ± 1.87**	-2.50 ± 2.02**	-2.67 ± 1.60**
Pen + 7-NI	0.00	-4.08 ± 3.12**	-4.25 ± 3.36**	-4.58 ± 2.97**	-4.33 ± 3.25**	-4.08 ± 3.15**	-4.08 ± 3.87**	-3.42 ± 4.12**	-1.20 ± 1.60

Control: sham operation. The time items were counted from the completion of microinjection of penicillin. Normal item indicates the quiet status of animals before the drug injection or E.A. 7-NI, E.A., and control groups were pre-treated with 7-NI, E.A. and N.S. respectively 30 min before the induction. The data in the table are the current changes recorded by NO sensitive electrode in control, E.A. and 7-NI groups compared with the quiet status. Because there is linear relationship between the ampere value and NO concentrations, the current changes represent the true NO concentration fluctuation. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (E.A. and 7-NI groups vs Pen group, Pen group vs control).

3 讨论

癫痫的发病机理复杂,癫痫与 NO 的关系也远未阐明。Smith 于 1991 年成功地将 300 ~ 800 μmol NO 注入鼠脑内,导致了短期的癫痫样肢体痉挛发作^[6]。其后 Proctor 将 NO 注入鼠的前梨状区引起了类似的发作^[7]。Smith(1996)将 SIN-1(NO 的一种供体药)注入 DBA/2 和 GEP 鼠中均有致病作用,Proctor 等将 L-Arg 直接注入前梨状区皮质深部引起了癫痫发作。Bageetta (1992)、Osonoe (1994)、Mulsch (1994)、Przegalinski (1994)和 Hara (1996)分别在 Tacrine(乙酰胆碱脂酶抑制剂)、戊四氮、海人藻酸、可卡因和荷包牡丹碱等诱导的癫痫模型中发现,癫痫的各种表现可被 L-NOArg, L-NAME 或 L-NMMA 抑制或阻断,提示 NO 可能有致病作用^[7, 8]。但是相反的结果亦存在。Marangoz 等在青霉素诱发癫痫模型中,微量注射硝普钠至皮质内可使皮质脑电明显减弱,而预先注射甲基蓝和血红蛋白 1 均可防止硝普钠的作用^[9]。Ronduin 和 Herberg 在实验中发现 L-NNA 加剧了大鼠点燃过程,并使点燃结果更为严重。这些却提示 NO 可能有抗病作用。

我们观察到在癫痫的发作阶段,7-NI 减低了癫痫发作强度。NO 电极实时连续记录显示海马 NO 浓度在 0 ~ 4 h 内不断升高,并且保持升高的趋势。前期的脑片记录结果显示,随着 NO 释放量增加,出现痫样放电,7-NI 降低 NO 浓度的同时可减弱痫样放电^[5],提示 NO 在此阶段可能起着促进和加强癫痫发作的作用。王布尔等发现癫痫发作时海马内 NOS mRNA 的表达随着癫痫的发作而急剧增加,并且 NMDA 及非 NMDA 受体阻断剂 AP₅ 及 GAMS 可以使之减弱^[4]。实验证明,癫痫在发作阶段伴随着胞内 Ca^{2+} 浓度升高,形成 Ca-CAM 复合物增多,激活 NOS,使 NO 产生增多,通过选择性鸟苷酸环化酶(sGC)信号转导激活 cADP 核糖化酶引起细胞内 Ca^{2+} 释放,从而使胞内 Ca^{2+} 浓度更趋升高,升高的 Ca^{2+} 一方面可以引起细胞膜去极化产生异常放电,导致癫痫的迅速传播^[10];另一方面可大量增加谷氨酸的释放,从而加剧发作的恶性循环。

本实验中使用 nNOS 的特异性阻断剂 7-NI,在预注射 7-NI 后 NO 浓度明显下降,至 4 h 方接近正常,可推知此 NO 的主要来源是 nNOS。与本工作同步进行的我们另一项 RT-PCR 实验结果显示,癫痫时海马 nNOS mRNA 的表达增加,直至 24 h 依然高于正常,而 eNOS mRNA 表达的增加却不明显,同样提示主要是 nNOS 增加导致 NO 的浓度升高。

本实验结果显示预注射 7-NI 后癫痫的诱导时间缩短,阈值降低。Kirkby 在海人藻酸致痫模型中也发现 7-NI 缩短了惊厥的潜伏期^[11]。Boda 在其氨基比林诱导的癫痫模型中观察到 NO 抑制了癫痫的诱导^[12],提示 NO 在癫痫的诱导阶段可能起着抑制癫痫产生的作用。我们另一项实验应用膜片钳技术,在急性分离的癫痫发作的海马细胞上观察 NO 供体药硝普钠可抑制 Na^+ , Ca^{2+} 电流的增加。设想海马可能存在一道“闸门”(如谷氨酸与 GABA,甘氨酸等的平衡),在“闸门”未曾开启之前,即诱导阶段,NO 起着封闭“闸门”的作用,NO 增加可竞争性阻断 NMDA 识别位点或 NMDA 受体上氧化还原位点从而对 NMDA 受体起负反馈作用。阻断 NOS 便减少了 NO,并减弱了这种负反馈作用从而促进了癫痫诱发^[13]。在“闸门”打开后,癫痫进入传播发作阶段,NO 的负反馈作用减弱或消失,这时 NO 增多起着加强发作的作用。

对大鼠行穴位针刺可抑制癫痫发作。NO 敏感电极显示海马 NO 浓度降低, 前述 RT-PCR 实验结果也显示针刺时 nNOS mRNA 表达下降。推测穴位针刺可能通过降低 nNOS mRNA 表达而减少 NOS 的合成, 使 NO 浓度随之下落, 从而减弱癫痫发作。王布尔报道癫痫时海马内兴奋性氨基酸释放及脑啡肽表达增多, 强啡肽释放减少, 而电针时兴奋性氨基酸释放及脑啡肽表达减少, 抑制性氨基酸及强啡肽释放增加, 并提出电针抑制癫痫发作与氨基酸类递质及内阿片肽密切相关^[3,14]。有人推测 NO 的降低与内阿片肽系统亦有关, 但孰为因, 孰为果, 它们与兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸的关系如何, 尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Huang ZN (黄志农), Cheng JS (程介士). Is nitric oxide convulsant or anticonvulsant? *Progress Physiol Sci* (生理科学进展), 1998, 3: 263 ~ 266 (in Chinese).
- [2] Wang BE (王布尔), Cheng JS (程介士). The effect of electroacupuncture on the content of dynorphinlike immunoreactivity in hippocampus during penicillin-induced seizures. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1992, 14: 1321 ~ 1323 (in Chinese).
- [3] Wang BE (王布尔), Cheng JS (程介士). Changes of hippocampal amino acid levels and NMDA receptor during epilepsy and electroacupuncture. *Acta Acad Med Shanghai* (上海医科大学学报), 1994, 21 (Suppl.): 10 ~ 14 (in Chinese with English abstract).
- [4] Wang BE (王布尔), Cheng JS (程介士). Changes of NOS mRNA levels in rat brain during experimental epilepsy and acupuncture anti-convulsion. *Chin J Neuroanat* (中国神经解剖学杂志), 1997, 13 (Suppl): 285 (in Chinese).
- [5] Lu W (陆巍), Chen G (陈刚), Cheng JS (程介士). Effect of nitric oxide release on epileptiform discharge in CA1 area of hippocampal slices. *Acta Physiol Sin* (生理学报), 1998, 50 (5): 507 ~ 513 (in Chinese with English abstract).
- [6] Smith RP, Louis CA, Kruszyna R, *et al.* Acute neurotoxicity of sodium azide and nitric oxide. *Fundam Appl Toxicol*, 1991, 17(1): 120 ~ 127.
- [7] Proctor MR. The role of nitric oxide in focally-evoked limbic seizures. *Neuroscience*, 1996, 76: 1231 ~ 1236.
- [8] Smith SE, Man CM, Yip PK, *et al.* Anticonvulsant effects of 7-nitroindazole in rodents with reflex epilepsy may result from L-arginine accumulation or a reduction in nitric oxide or L-citrulline formation. *Br J Pharmacol*, 1996, 119: 165 ~ 173.
- [9] Montecot C, Borredon J, Seylaz J, *et al.* Nitric oxide of neuronal origin is involved in cerebral blood flow increase during seizures induced by kainate. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17: 94 ~ 99.
- [10] Willmott N, Sethi JK, Walseth TF, *et al.* Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J Biol Chem*, 1996, 271: 3699 ~ 3705.
- [11] Kirkby RD, Carroll DM, Grossman AB, *et al.* Factors determining proconvulsant and anticonvulsant effects of inhibitors of nitric oxide synthase in rodents. *Epilepsy Res*, 1996, 24: 91 ~ 100.
- [12] Boda B, Szenté M. Nitric oxide synthase inhibitor facilitates focal seizures induced by aminopyridine in rat. *Neurosci Lett*, 1996, 209: 37 ~ 40.
- [13] Rondouin G, Lemer M, Manzoni O, *et al.* A nitric oxide (NO) synthase inhibitor accelerates amygdala kindling. *Neuroreport*, 1992, 9: 805 ~ 808.
- [14] Wang BE, Yang R, Cheng JS. Effect of electro-acupuncture on the level of preproenkephalin mRNA in rat during penicillin induced epilepsy. *Acupuncture Electrother Res*, 1994, 19: 129 ~ 140.

EFFECT OF ELECTROACUPUNCTURE AND 7-NI ON PENICILLIN-INDUCED EPILEPSY AND THEIR RELATION WITH INTRAHIPPOCAMPAL NO CHANGES *

HUANG ZHI-NONG, YANG RU, CHEN GANG, CHENG JIE-SHI**

(National Laboratory of Medical Neurobiology, Department of Neurobiology,

Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT

In order to investigate the effect of 7-nitroindazole (7-NI) on penicillin-induced epilepsy and the relationship between NO and anti-epileptic effect of electro-acupuncture, computerized physiological polygraph and NO-sensitive electrode with potentiostat were respectively used to record the total power spectrum (TPS) of EEG and the concentration of NO in rat hippocampus pretreated with electro-acupuncture or 7-NI for 30 min before penicillin. The results showed that the TPS of EEG and concentration of NO in hippocampus increased greatly after the epilepsy induction. Treatment with electro-acupuncture inhibited the TPS of EEG sharply ($P < 0.01$). The latency and threshold of epilepsy induction were decreased by 7-NI, but paroxysm abated and the TPS was inhibited ($P < 0.05$) as compared with the control group. Both pretreatments with 7-NI and electroacupuncture decreased the NO concentration ($P < 0.01$). The above results suggest that the propagation of penicillin-induced seizures is facilitated by nNOS, but with some increase in the latency and threshold of induction. Electroacupuncture may inhibit seizure through decreasing nNOS transcription in hippocampus.

Key words: epilepsy; nitric oxide (NO); electroacupuncture; NO sensitive electrode; 7-nitroindazole (7-NI); hippocampus

* Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39570886)

** Corresponding author. Tel: 64041900 - 2521; E-mail: jscheng@shmu.edu.cn