

对抗大鼠氟西泮抗癫痫耐受性药物及其机制的研究

边凤芝 王丽 王云秀 王颖慧

(北京大学第一医院儿科,北京 100034)

[摘要] 目的 苯二氮卓类药物对各种癫痫均有疗效,长期应用容易产生耐受性,本实验目的是寻找逆转氟西泮抗癫痫耐受性的药物,探讨神经肽 Y(NPY)在此过程中的作用。**方法** 建立对氟西泮抗癫痫耐受性的大鼠模型。模型建立后,根据干预药物的种类分为7组:氟西泮耐受组(无药物干预)、硝苯地平组、左乙拉西坦组、托吡酯组、氟马西尼组、L-NAME组、维生素 B6 组。通过尾静脉注射戊四唑来检测其耐受性,记录其戊四唑致惊厥的潜伏期和惊厥阈值。运用免疫组化法检测海马中 NPY 表达,通过 RT-PCR 检测 NPY2 受体 mRNA 的改变。**结果** 与空白对照组相比,氟西泮耐受组的潜伏期缩短、惊厥阈值降低,海马中神经肽 Y 表达、NPY2 受体的 mRNA 减少。而逆转耐受性后,托吡酯组的潜伏期延长了 2 倍,惊厥阈值升高了 2 倍,硝苯地平、左乙拉西坦、氟马西尼组潜伏期延长了 1 倍,惊厥阈值升高了 1 倍。氟马西尼组、硝苯地平组和托吡酯组 NPY2 受体 mRNA 与氟西泮耐受组比较,增加了 1~2 倍,差异有显著性意义, $P<0.01$ 。**结论** 硝苯地平、左乙拉西坦、托吡酯、氟马西尼能够逆转氟西泮抗癫痫的耐受性,NPY 可能是介导其逆转耐受性因素之一。 [中国当代儿科杂志,2010,12(1):56-61]

[关键词] 氟西泮;耐受性;神经肽 Y;神经肽 Y2 受体;大鼠

[中图分类号] R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)01-0056-06

Drugs and the mechanism for reversing the tolerance of flurazepam in rats

BIAN Feng-Zhi, WANG Li, WANG Yun-Xiu, WANG Ying-Hui. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China (Wang L, Email:wangli5000@126.com)

Abstract: Objective Benzodiazepines (BDZ) have many effects on various kinds of epilepsies, but long-term treatment with BDZ often leads to drug tolerance. This study aimed to seek drugs which can reverse the tolerance of flurazepam (FZP), and to explore the role of neuropeptide Y (NPY) in the reversal effect. **Methods** A rat model of anticonvulsant tolerance to FZP was prepared. The rats with FZP tolerance were randomly assigned to seven groups: FZP-tolerance, and nifedipine, levetiracetam, topiramate, flumazenil, L-NAME and pyridoxamine treatment groups. The tolerance to FZP was evaluated through pentylenetetrazol (PTZ) infusion into a tail vein. The latency to onset of clonic seizure and the PTZ threshold were recorded. The mRNA of NPY receptor Y2 in the hippocampus was determined by RT-PCR, and the distribution of NPY in the hippocampus was examined by immunohistochemistry. **Results** In comparison with the blank control group, the average latency to the onset of clonic seizure was shortened, the average PTZ threshold decreased and the expression of NYT and NPY receptor Y2 mRNA decreased significantly in the FZP-tolerance group ($P<0.01$). In comparison with the FZP-tolerance group, the average latency to onset of clonic seizure was prolonged by 2 times and the average PTZ threshold doubled in the topiramate treatment group. The average latency to onset of clonic seizure was prolonged by 1 time and the average PTZ threshold increased 1 time in the nifedipine, the levetiracetam and the flumazenil treatment groups. The mRNA expression of NPY receptor Y2 increased by 1 or 2 times in the flumazenil, the nifedipine and the topiramate treatment groups when compared with the FZP-tolerance group. **Conclusions** Nifedipine, levetiracetam, topiramate and flumazenil can reverse the anticonvulsant tolerance to flurazepam. NPY may play a role in mediating the reversal effect. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(1):56-61]

Key words: Flurazepam; Tolerance; Neuropeptide Y; Neuropeptide Y2 receptor; Rats

苯二氮卓类药物具有广泛的镇静、抗焦虑、肌松等作用,对各种原因引起的癫痫有显著疗效。但是连续应用 3 个月后有 2/3 的病人可产生耐受性,即抗痫作用逐渐减弱至消失,使原已控制的癫痫复发,限制了苯二氮卓类作为一线抗癫痫药物的临床应用。目前对苯二氮卓类耐受性发生机制的研究,主要集中在 GABA_A 受体^[1]、NMDA 受体的亲和力、基因表达以及神经递质代谢的改变^[2]。一氧化氮合

[收稿日期]2009-05-13;[修回日期]2009-07-03
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No 30170994)。
[作者简介]边凤芝,女,硕士,住院医师。
[通信作者]王丽,教授。

酶^[3]及钙通道^[4]也可能介导了苯二氮卓类的耐受性。但是其确切的耐受性机制仍未明确,目前尚缺乏避免或拮抗苯二氮卓类耐受性的有效方法。

神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 含 36 个氨基酸,是 1982 年 Tate Moto 从猪脑提取液中分离出的,在中枢神经系统主要分布在大脑皮层、海马、丘脑、下丘脑及脑干等处,在海马内浓度最高。氟西泮(flurazepam, FZP) 耐受时,海马内 NPY 的蛋白表达明显下降。目前发现 NPY 至少有 6 个受体亚型^[5],这些受体属于 G 蛋白受体偶联家族。NPY 可以通过增加 GABA 抑制作用或降低谷氨酸系统的兴奋性来实现对大鼠海马兴奋性的抑制作用^[6]。多数研究认为 NPY 主要通过 Y2 受体发挥作用,通过钙离子通道抑制谷氨酸的内流,降低神经元的兴奋性^[7]。我们的前期工作提示 NPY 系统可能是参与苯二氮卓类耐受性的机制之一^[8]。为了寻找有效的逆转苯二氮卓类抗痫耐受性的药物,本研究探讨了 NPY 及其 Y2 受体的作用。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

Sprague-Dawley (SD) 大鼠购于北京大学动物部,氟西泮购于上海大众制药有限公司,硝苯地平、DMSO 购于 Sigma 公司,胰酶、L-NAME 购于华美公司,左乙拉西坦由比利时优时比公司提供,托吡酯由西安杨森制药有限公司提供,维生素 B₆ 由天津金耀氨基酸有限公司提供,兔抗大鼠神经肽 Y 抗体、山羊血清购于北京博奥森生物科技有限公司,DAB 显色试剂盒购于北京中杉公司。

1.2 动物模型的建立及分组

1.2.1 氟西泮抗痫耐受性大鼠模型的建立 按照 Rosenberg^[9] 方法建立氟西泮抗痫耐受性大鼠模型。成年雄性 SD 大鼠,体重 150 ~ 170 g,2 d 适应期后随机分为 2 组:第一组为空白对照组,饮用水为 0.02% 糖精水;第二组为氟西泮耐受组,饮用水为含有氟西泮的 0.02% 糖精水;饲养 1 周,其中氟西泮的浓度为:前 3 d 100 mg/L,后 4 d 150 mg/L。由于氟西泮味苦,部分大鼠可能因此饮水量减少,以致氟西泮的摄入量不足,耐受性降低,为了确保能产生耐受性,7 d 内平均氟西泮用量未达 100 mg/kg 的予以排除。经过 1 周处理后,停喂氟西泮,饮用水换为 0.02% 糖精水。停喂氟西泮后 12 h 进行耐受性的检测。检测方法为:各组动物腹腔注射氟西泮 20 mg/kg,30 min 后,从一侧尾静脉以 0.5 mL/min

的速度匀速静脉推注 20 g/L 的戊四唑(PTZ,生理盐水配制)。记录从 PTZ 静推开始到引起前腿阵挛的时间,这个值为潜伏期。计算所需的 PTZ 剂量,这个值与体重的比为 PTZ 惊厥阈值。实验组与对照组平行进行检测。耐受性表现为引起阵挛所需 PTZ 阈值的明显下降。

1.2.2 氟西泮耐受性逆转实验分组 氟西泮耐受组又分为 7 组:氟西泮耐受组($n=12$),氟马西尼组($n=9$),硝苯地平组($n=12$),左乙拉西坦组($n=12$),维生素 B₆ 组($n=10$),L-NAME 组($n=9$)及托吡酯组($n=13$)。在耐受性检测前 30 min 空白对照组、氟西泮耐受组、氟马西尼组、维生素 B₆ 组和托吡酯组分别腹腔注射生理盐水 2 mL/kg、生理盐水 2 mL/kg、氟马西尼 1 mg/kg、维生素 B₆ 40 mg/kg 和托吡酯 30 mg/kg;在耐受性检测前 60 min 硝苯地平组和左乙拉西坦组分别腹腔注射硝苯地平 25 mg/kg 和左乙拉西坦 100 mg/kg;在耐受性检测前 120 min L-NAME 组腹腔注射 L-NAME 8 mg/kg,其中氟马西尼和硝苯地平的溶剂为二甲基亚砜和生理盐水 4:6 的混合液,其余各药物溶于生理盐水。与氟西泮耐受组相比,如果药物干预组 PTZ 阈值明显增加,即为逆转耐受性。大鼠检测后根据检测方式的不同采取不同的处理措施。

1.3 引物及探针序列

NPY2 引物和探针用 Primer Premier 5.0 软件设计,由上海生工合成。Y2 F: 5'-TTCAAGAGCAT-GCGCACAGTA, Y2 R: 5'-AGGCACAGGCTGTTAC-CAA。NPY2 的探针, Y2-TaqMan: 5'-AACTTTTT-TATTGCCAACCTGGCTGTGGC。NPY2 的外引物序列, Y2S: 5'-AGAGCCCGAGCTCATAGACA, Y2 A: 5'-CACCAAATGGCACAAAACCTG。Actin 的引物序列, Actin F: ACCCGCGAGTACAACCTTCTT, Actin R: TATCGTCATCCATGGCGAACT。

Actin 的探针序列: CCTCCGTCGCCGGTCCACAC。

1.4 免疫组化检测海马中 NPY 的表达

10% 水合氯醛麻醉大鼠后,经左心室插注射针头至主动脉,以生理盐水和 4% 多聚甲醛灌注后取出完整脑组织。用海马冠状位冰冻切片(6 μ m)作免疫组化。一抗为兔抗大鼠 NPY 抗体(1:200),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 Ig 抗体,DAB 显色,苏木素复染。PBS 代替一抗作为阴性对照。每只大鼠,均选取 3 张连续切片,取其均值。比较海马的 C1、C3、DG 区蛋白表达差异。比较其阳性细胞个数、阳性反应面积、相对光密度。图像处理采用

Image-pro plus 6.0。

1.5 RT-PCR 法检测 NPY2 受体 mRNA 的表达

1.5.1 RNA 提取 检测后立刻断头处死,在冰上分离脑组织,剥离海马,用锡箔纸包起,置于液氮中,然后放于-70℃冰箱中保存。取小于50 mg 的低温保存的海马组织,放入液氮冷却的研钵,加入1 mL的 Trizol 充分研磨。将组织匀浆吸入1.5 mL 的 Eppendorf 管中,放置5 min。15 000 rpm,离心3 min。取上清移入另一 Eppendorf 管中。加氯仿0.2 mL,用力震荡2 min,放置2 min,15 000 rpm,离心10 min。吸取上清液,留1~2 mm 上清,把上清移至另一1.5 mL 管中。在吸取的上清液中加乙丙醇0.5 mL,用力振荡,放置10 min。15 000 rpm,离心10 min。去上清,留沉淀。加入75%乙醇1 mL,15 000 rpm,离心10 min,再吸尽上清。空气中干燥,至RNA 成透明,加入DEPC 处理水30 μL。混匀,55℃加热5 min。紫外分光光度法测定RNA 的纯度并定量,OD 260/280 比值在1.7~2.0 之间,RNA 浓度(μg/μL) = OD × 40 × 500/1 000。

1.5.2 逆转录 总RNA 2 μg、oligo(dt)15 1 μL,加水至17.75 μL,70℃,5 min。冰上放置,短暂离心,将水甩至管底。5 × 缓冲液5 μL、10 mmol dNTP 1.25 μL、MMLV-TR 1 μL,42℃,60 min。

1.5.3 实时荧光定量PCR ①标准品及标准曲线的制作:用外引物进行PCR,反应体系和PCR 体系相同。得到的产物电泳后,切胶纯化,用玻璃奶提纯。所得的DNA 作为标准品。把标准品稀释成10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰,取5 μL 作为PCR。②实时荧光定量PCR:PCR 体系为10 × 缓冲液5 μL、10 mmol dNTP 1 μL、上下游引物混合液(5 pmol/μL)2 μL、Taq Man 探针(5 pmol/μL)2 μL、cDNA 模板5 μL、Taq DNA 聚合酶0.5 μL、ROX 1 μL,加水至50 μL。充分震荡,离心。反应温度:95℃,5 min,一个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。

1.6 统计学处理

模型的检验用独立样本资料*t* 检验。药物干预组与氟西洋耐受组比较采用ANOVA 检验。方差不齐者采用非参数检验。

2 结果

2.1 模型的检验

氟西洋耐受组与空白对照组相比,潜伏期明显缩短,惊厥阈值明显降低,*t* 值分别为3.675 和

4.806,*P* < 0.01, 差异有显著性意义,模型成立。

2.2 药物干预对氟西洋耐受大鼠的影响

与氟西洋耐受组比较,硝苯地平组、左乙拉西坦组和托吡酯组潜伏期延长,差异有显著性意义,*P* < 0.01;氟马西尼组、L-NAME 组及维生素B₆ 组的潜伏期与氟西洋耐受组比较差异无显著性*P* > 0.05。与氟西洋耐受组PTZ 惊厥阈值比较,硝苯地平组、左乙拉西坦组、托吡酯组及氟马西尼组的惊厥阈值明显增加,差异有显著性意义,*P* < 0.01;L-NAME 组和维生素B₆ 组的惊厥阈值无明显改变,*P* > 0.05。见表1。

表1 氟西洋耐受及逆转耐受后潜伏期、惊厥阈值的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	潜伏期(s)	PTZ 惊厥阈值(mg/kg)
空白对照组	15	80.3 ± 35.8	55.7 ± 14.0
氟西洋耐受组	12	39.2 ± 16.1 ^a	34.5 ± 8.7 ^a
氟马西尼组	9	70.3 ± 38.8	62.5 ± 9.3 ^b
硝苯地平组	12	101.6 ± 47.3 ^b	76.4 ± 16.2 ^b
左乙拉西坦组	12	95.2 ± 69.1 ^b	81.9 ± 41.8 ^b
维生素B6 组	10	32.3 ± 20.4	38.0 ± 18.3
L-NAME 组	9	26.7 ± 17.4	31.2 ± 18.5
托吡酯组	13	135.7 ± 53.1 ^b	90.0 ± 30.2 ^b

a:与空白对照组比较,*P* < 0.01; b:与氟西洋耐受组比较,*P* < 0.01

2.3 NPY 阳性物质的改变

氟西洋耐受组(*n* = 4)与空白对照组(*n* = 6) 比较,阳性细胞个数明显减少,阳性反应面积减少,相对光密度值降低。硝苯地平组(*n* = 4)、左乙拉西坦组(*n* = 4)和托吡酯组(*n* = 5)与氟西洋耐受组相比,阳性细胞计数、阳性反应面积及相对光密度值增加,差异均有显著性意义。见图1,表2、3、4。

表2 氟西洋耐受及逆转耐受后海马 NPY 阳性细胞数的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CA1	CA3	DG
空白对照组	6	47.9 ± 5.1	43.9 ± 6.1	143.9 ± 3.3
氟西洋耐受组	4	19.3 ± 1.7 ^a	19.0 ± 2.1 ^a	47.8 ± 4.8 ^a
硝苯地平组	4	41.0 ± 1.8 ^b	41.5 ± 0.4 ^b	74.7 ± 4.1 ^b
左乙拉西坦组	4	49.0 ± 4.8 ^b	43.3 ± 1.2 ^b	94.0 ± 7.1 ^b
妥泰组	5	48.5 ± 3.8 ^b	43.0 ± 4.3 ^b	90.5 ± 5.4 ^b

a:与空白对照组比较,*P* < 0.01; b:与氟西洋耐受组比较,*P* < 0.01

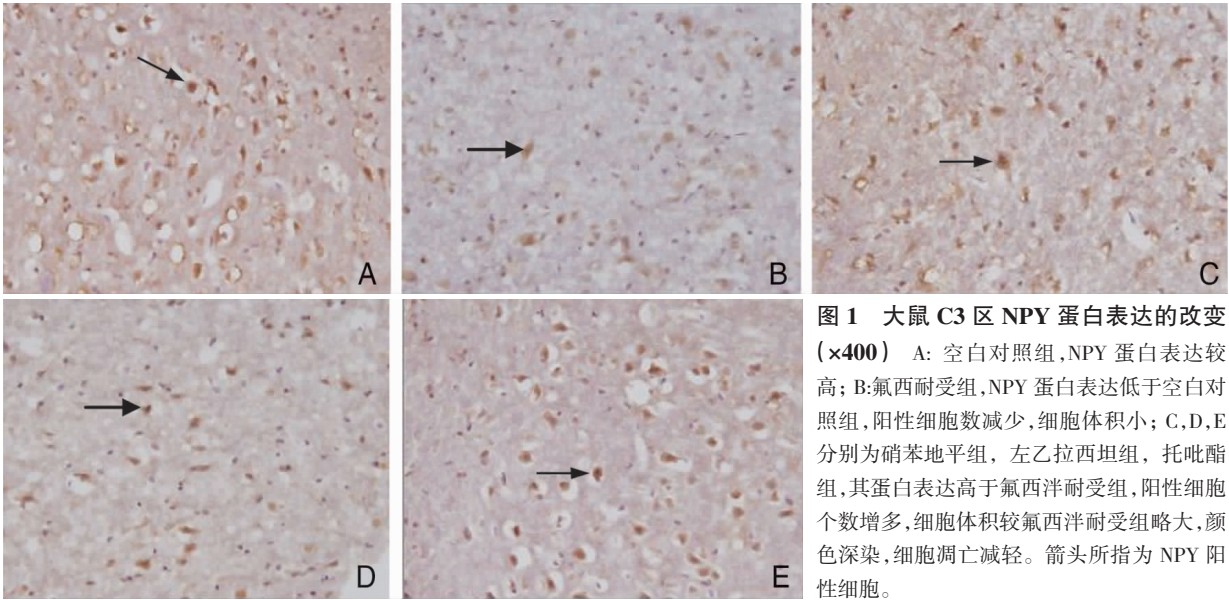


图 1 大鼠 C3 区 NPY 蛋白表达的改变 (×400) A: 空白对照组, NPY 蛋白表达较高; B: 氟西泮耐受组, NPY 蛋白表达低于空白对照组, 阳性细胞数减少, 细胞体积小; C, D, E 分别为硝苯地平组, 左乙拉西坦组, 托吡酯组, 其蛋白表达高于氟西泮耐受组, 阳性细胞个数增多, 细胞体积较氟西泮耐受组略大, 颜色深染, 细胞凋亡减轻。箭头所指为 NPY 阳性细胞。

表 3 氟西泮耐受及逆转耐受后海马 NPY 阳性反应面积的改变 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CA1	CA3	DG
空白对照组	6	8 212 ± 1 445	6 173 ± 1 640	16 538 ± 5 037
氟西泮耐受组	4	1 443 ± 278 ^a	1 426 ± 177 ^a	2 388 ± 133 ^a
硝苯地平组	4	16 633 ± 2 710 ^b	8 146 ± 5 360 ^b	9 992 ± 1 327 ^b
左乙拉西坦组	4	15 005 ± 3 304 ^b	13 697 ± 3 442 ^b	11 014 ± 910 ^b
妥泰组	5	15 474 ± 3 463 ^b	17 451 ± 6 968 ^b	15 854 ± 6 587 ^b

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b: 与氟西泮耐受组比较, $P < 0.01$

表 4 氟西泮耐受及逆转耐受后海马 NPY 阳性物质的相对光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CA1	CA3	DG
空白对照组	6	125.9 ± 9.5	116.2 ± 7.8	103.7 ± 4.2
氟西泮耐受组	4	83.7 ± 6.0 ^a	78.5 ± 9.9 ^a	77.5 ± 8.2 ^a
硝苯地平组	4	133.5 ± 3.5 ^b	124.7 ± 8.9 ^b	121.2 ± 14.0 ^b
左乙拉西坦组	4	121.0 ± 8.9 ^b	119.0 ± 11.7 ^b	103.7 ± 5.8 ^b
妥泰组	5	93.1 ± 5.2 ^b	114.8 ± 7.2 ^b	94.1 ± 5.7 ^b

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b: 与氟西泮耐受组比较, $P < 0.01$ 。

2.4 NPY2 受体 mRNA 的改变

空白对照组和氟西泮耐受组的 mRNA 分别为 19.5 ± 2.2 和 5.3 ± 1.1 , 与空白对照组比较, 氟西泮耐受组 NPY2 受体 mRNA 降低, 差异有显著性意义, $t = 19.51, P < 0.05$ 。氟马西尼组、硝苯地平组和托吡酯组 NPY2 受体 mRNA 分别为 11.9 ± 3.8 、 16.8 ± 3.0 、 17.8 ± 2.6 , 与氟西泮耐受组比较, 增加了 1 ~ 2 倍, 差异有显著性意义, $P < 0.01$ 。维生素 B6 组和 L-NAME 组 NPY2 受体 mRNA 为 5.6 ± 1.0 和 $4.7 \pm$

1.6, 与氟西泮耐受组比较, NPY2 受体 mRNA 无明显改变, 差异无显著性, $P > 0.05$ 。

2.5 NPY2 受体 mRNA 与 PTZ 引起惊厥阈值的相关性分析

NPY2 受体 mRNA 表达量与 PTZ 引起的惊厥阈值有明显的相关性。空白对照组、氟西泮耐受组、氟马西尼组、硝苯地平组、左乙拉西坦组、维生素 B6 组、L-NAME 组、托吡酯组相关系数分别为 0.857、0.94、0.71、0.866、0.853、0.944、0.975、0.835, 氟马西尼组的 $P < 0.05$, 其余各组 $P < 0.01$ 。

3 讨论

大鼠给予氟西泮喂养, 对氟西泮产生了耐受性。氟西泮抗痫耐受时, 其潜伏期与空白对照组比较缩短了 1 半, 惊厥阈值也明显降低, 二者差异有显著性, 证明已成功复制了氟西泮抗痫耐受性大鼠模型。

研究显示, 硝苯地平 (2 mg/kg) 就能够增加戊四唑致惊厥的潜伏期^[10]。本研究结果证实, 与氟西泮抗痫耐受组相比, 硝苯地平组的潜伏期和戊四唑的惊厥阈值均增加了 1 倍, 二者差异有显著性; 免疫组化法显示, NPY 阳性细胞个数减少、阳性反应面积减少及相对光密度值降低; RT-PCR 检测, NPY2 受体 mRNA 明显增加, 差异有显著性意义。NPY2 受体 mRNA 的表达量与 PTZ 的惊厥阈值有相关性。说明硝苯地平能够逆转氟西泮抗癫痫的耐受性, NPY 可能参与了这个过程, 并通过 NPY2 受体起作用。

左乙拉西坦的研究目前多数集中于其抗癫痫作

用^[11],对于该药能否逆转氟西洋的抗痫耐受性,尚不清楚。Husum等^[12]研究发现,在杏仁核点燃的惊厥模型中预先腹腔注射左乙拉西坦,NPY的受体在C1、C3、DG区均明显增加,NPY2受体在C1、C3区上调,在齿状回没有明显改变。提示NPY可能参与了左乙拉西坦的逆转耐受机制。左乙拉西坦结合位点主要是突触小泡蛋白SV2A,通过参与囊泡的聚合与胞吐作用调节神经递质释放^[13]。它可以通过抑制N-和P/Q电压钙通道,抑制谷氨酸的释放^[14],还可以通过上调神经胶质细胞的谷氨酸运载而降低谷氨酸的浓度^[15]。在FeCl₃点燃杏仁核诱导癫痫发作的模型中,腹腔注射左乙拉西坦后,谷氨酸的释放明显减少^[15],与本研究腹腔注射左乙拉西坦后,NPY表达增加是一致的。左乙拉西坦组NPY2受体mRNA表达较氟西洋耐受组增多,进一步证实NPY参与了左乙拉西坦逆转氟西洋抗癫痫的耐受性。

托吡酯有多种作用机制:作用在GABA_A受体非苯二氮卓类位点以增强GABA活性^[16];阻滞L型高压电依赖性钙离子通道^[17];阻断电压依赖性钠通道,减少钠电流,从而阻止兴奋性氨基酸的释放,抑制神经元活化而发挥抗癫痫作用^[18]。托吡酯20~40 mg/kg能对抗戊四唑所致的惊厥作用^[17]。据此,本试验中托吡酯的用量为30 mg/kg,PTZ致惊厥的潜伏期显著增加,NPY表达增加,NPY2受体mRNA明显高于氟西洋耐受组,说明NPY可能参与托吡酯逆转氟西洋抗癫痫的耐受性。

氟马西尼是GABA_A受体BDZ位点的拮抗剂。它可逆转苯二氮卓类类的耐受性,并可降低 γ -氨基丁酸(GABA)受体的 $\alpha 1$ 、 $\gamma 2L$ 和 $\gamma 2S$ 亚单位mRNA的含量^[19],还可以减轻游离钙离子的浓度^[20]。Flaishon等^[21]在地西洋耐受模型上发现,氟马西尼能明显减轻苯二氮卓类的耐受性,并且增加苯二氮卓类受体的密度。本实验中,氟马西尼组的惊厥阈值与NPY2受体mRNA的表达亦明显高于氟西洋耐受组,两者具有相关性,但相关系数较低,说明还有其他机制参与。

L-NAME为一氧化氮合酶抑制剂,通过抑制一氧化氮合酶而抑制NO的合成。维生素B6是谷氨酸脱羧酶的辅酶,脑内的GABA是谷氨酸经谷氨酸脱羧酶脱羧生成^[22]。本实验结果显示L-NAME和维生素B6未能逆转氟西洋抗癫痫耐受性。

NPY的抗癫痫作用的机制包括:增加GABA抑制作用或降低谷氨酸系统的兴奋性来实现对大鼠海马兴奋性的抑制作用^[23];可能通过钙通道参与逆转苯二氮卓类的耐受性^[5,24]。NPY1、NPY2受体可以

通过L-、N-、和P-/Q钙通道调节钙内流^[25],当主要通过NPY2受体作用时,在海马区通过调节钙通道减少神经元突触前末端L型钙内流,抑制谷氨酸释放到椎体细胞^[26]。Foti等^[27]把NPY和NPY2受体激动剂通过腺病毒载体导入大鼠体内,发现二者均能减轻动物的自发性癫痫。已经公认NPY具有抗癫痫作用,根据NPY的抗癫痫机制,我们推测它可能参与了逆转氟西洋抗癫痫耐受性。本实验证明,腹腔注射硝苯地平、左乙拉西坦、托吡酯、氟马西尼后,戊四唑致惊厥阈值提高,NPY表达明显增多,NPY2受体mRNA明显高于氟西洋耐受组,且两者具有明显的相关性,显示硝苯地平、左乙拉西坦、托吡酯、氟马西尼能够逆转氟西洋抗癫痫的耐受性,NPY可能是参与逆转耐受性的机制之一。

[参 考 文 献]

- [1] 王晓东,王丽,陶成. 氯硝西洋抗大鼠听源性惊厥耐受性的受体学基础[J]. 中国药理学通报, 1996, 12(3):224-226.
- [2] Xiang K, Tietz EI. Benzodiazepine-induced hippocampal CA1 neuron alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxasole-4-propionic acid (AMPA) receptor plasticity linked to severity of withdrawal anxiety: differential role of voltage-gated calcium channels and N-methyl-D-aspartic acid receptors[J]. Behav Pharmacol, 2007, 18(5-6):447-460.
- [3] 张礼萍,王丽. 大鼠对氟西洋抗痫耐受和依赖时海马中一氧化氮合酶的变化[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(8):927-930.
- [4] Xiang K, Earl DE, Davis KM. Chronic benzodiazepine administration potentiates high voltage-activated calcium currents in hippocampal CA1 neurons[J]. Pharmacol Exp Ther, 2008, 327(3):872-883.
- [5] Blomqvist AG, Herzog H. Y-receptor subtypes—how many more? [J]. Trends Neurosci, 1997, 20(7):294-298.
- [6] Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system [J]. Prog Neurobiol, 1998, 54(5):581-618.
- [7] Silva AP, Carvalho AP, Carvalho CM and Malva JO. Functional interaction between neuropeptide Y receptors and modulation of calcium channels in the rat hippocampus[J]. Neuropharmacology, 2003, 42(2):282-292.
- [8] Zhang LP, Wang L. Changes of brain neuropeptide Y and its receptors in rats with flurazepam tolerance and dependence [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26(11):1290-1296.
- [9] Rosenberg HC. Differential expression of benzodiazepine anticonvulsant cross-tolerance according to time following flurazepam or diazepam treatment [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1995, 51(2):363-368.
- [10] Xiang K, Tietz EI. Chronic benzodiazepine-induced reduction in gabaa receptor mediated synaptic currents in hippocampal pyramidal neurons prevented by prior nimodipine injection[J]. Neuroscience, 2008, 157(1):153-163.
- [11] Kaminski RM, Gillard M, Leclercq K, Hanon E, Lorent G, Dassel D, et al. Proepileptic phenotype of SV2A-deficient mice is associated with reduced anticonvulsant efficacy of levetiracetam [J]. Epilepsia, 2009, 50(7):1729-1740.
- [12] Husum H, Bolwig TG, Sánchez C, Mathé AA, Hansen SL. Leve-

tiracetam prevents changes in levels of brain-derived neurotrophic factor and neuropeptide Y mRNA and of Y1- and Y5-like receptors in the hippocampus of rats undergoing amygdala kindling: implications for antiepileptogenic and mood-stabilizing properties[J]. *Epilepsy Behav*, 2004, 5(1):204-215.

[13] Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, et al. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(26):9861-9866.

[14] Pisani A, Bonsi P, Martella G, De Persis C, Costa C, Pisani F, et al. Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by levetiracetam and lamotrigine[J]. *Epilepsia*, 2004, 45(7):719-728.

[15] Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Tokumaru J, Takaki M, Willmore LJ. Effect of levetiracetam on molecular regulation of hippocampal glutamate and GABA transporters in rats with chronic seizures induced by amygdalar FeCl3 injection[J]. *Brain Re*, 2007, 1151:55-61.

[16] Meldrum B. Action of established and novel anticonvulsant drugs on the basic mechanisms of epilepsy[J]. *Epilepsy*, 1996, 11(9):67-77.

[17] Russo E, Constanti A, Ferreri G, Citraro R, De Sarro G. Nifedipine affects the anticonvulsant activity of topiramate in various animal models of epilepsy[J]. *Neuropharmacology*, 2004, 46(6):865-878.

[18] 朱遂强,杨美兰,陈景刚,李卫华,苟玉兰,阮旭中. 托吡酯对戊四氮活化培养海马神经元的作用[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2004, 33(3):350-352.

[19] 郭文,王丽. 氟马西尼逆转惊厥易感大鼠氟西洋耐受性的分子机制[J]. *北京大学学报*, 2001, 33(5):452-456.

[20] Hertz L, Zhao Z, Chen Y. The astrocytic GABA(A)/benzodiazepine-like receptor: the Joker receptor for benzodiazepine-mimetic drugs? [J]. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2006, 1(1):93-103.

[21] Flaishon R, Weinbroum AA, Veenman L, Leschiner S, Rudick V, Gavish M. Flumazenil attenuates development of tolerance to diazepam after chronic treatment of mice with either isoflurane or diazepam [J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(4):1046-1052.

[22] Bayoumi R, Kirwan JR, Smith WR. Some effects of dietary vitamin B6 deficiency and 4-deoxypyridoxine on γ -aminobutyric acid metabolism in rat brain [J]. *J Neurochemistry*, 1972, 19(3):569-576.

[23] Patrylo PR, van den Pol AN, Spencer DD, Williamson A. NPY inhibits glutamatergic excitation in the epileptic human dentate gyrus[J]. *J Neurophysiol*, 1999, 82(1):478-483.

[24] Silva AP, Carvalho AP, Carvalho CM, Malva JO. Functional interaction between neuropeptide Y receptors and modulation of calcium channels in the rat hippocampus[J]. *Neuropharmacology*, 2003, 44(2):282-292.

[25] Silva AP, Carvalho AP, Carvalho CM, Malva JO. Modulation of intracellular calcium changes and glutamate release by neuropeptide Y1 and Y2 receptors in the rat hippocampus: differential effects in CA1, CA3 and dentate gyrus[J]. *J Neurochem*, 2001, 79(2):286-296.

[26] Colmers WF, Klapstein GJ, Fournier A, St-Pierre S, Treherne KA. Presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampal slice in vitro is mediated by a Y2 receptor[J]. *Br J Pharmacol*, 1991, 102(1):41-44.

[27] Foti S, Haberman RP, Samulski RJ, McCown TJ. Adeno-associated virus-mediated expression and constitutive secretion of NPY or NPY13-36 suppresses seizure activity in vivo[J]. *Gene Therapy*, 2007, 14(21):1534-1536.

(本文编辑:黄 榕)

· 消息 ·

新生儿专题/临床规范用药专题高研班通知

“儿科临床适宜技术应用交流会暨第九期全国儿科主任(新生儿科专题/临床规范用药专题)诊疗技术高研班”由中国医师协会和首都医科大学附属北京妇产医院北京妇幼保健院联合主办,将于2010年3月在北京举办,新生儿专题为3月6日-11日,临床规范用药专题为3月12日-17日。学习期满授予国I类10分。

新生儿专题:胎儿宫内窘迫;新生儿感染;PICC的应用;新生儿窒息与复苏;新生儿缺氧缺血性脑病;早产儿肠内外营养;新生儿重症监护及呼吸支持治疗、呼吸窘迫综合征及肺表面活性物质替代治疗、肠道感染、惊厥及癫痫、高胆红素血症;早产儿管理、用氧和视网膜病、贫血、脑损伤;新生儿胸、腹部常见疾病X线辅助检查。

规范用药专题:新生儿期、呼吸道感染、儿童哮喘、幼年特发性关节炎、感染性休克、心肺复苏、癫痫、多动障碍、贫血、小儿腹泻、儿童神经系统感染、儿童血液疾病、高热惊厥、性早熟等疾病的合理用药;抗生素、平喘药物、止咳和化痰药物、肾上腺皮质激素、生长激素的合理应用。电话:010-65286512,13391703319;传真:010-65287282;Email:cmdapx@sina.com。联系人:刘舒。