综述

文章编号:1000-5404(2005)03-0268-03

褪黑素在实验性癫痫中的抗惊厥作用

Anticonvulsive effect of melatonin on experimental models of epilepsy

张映琦 综述,廖维宏 审校 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第三研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

褪黑素(melatonin, MLT)化学名为N-乙酰-5-甲氧色胺,是一种在生物进化过程中高度保守的物质,存在于藻类到人类的多种不同生物中,而哺乳动物主要是由松果体合成分泌,是一种吲哚类神经内分泌激素。褪黑素的分泌呈现昼低夜高的规律,分泌的量和节律与人类健康状态及年龄密切相关。研究表明褪黑素具有广泛的生理作用,它能维持昼夜节律、促进睡眠、增强人体免疫功能、抑制肿瘤细胞生长,并对生长、发育、性功能和许多器官起调节作用。近年来,褪黑素的其他重要功能也陆续被发现,包括自由基清除、神经保护和在多种癫痫动物模型中的抗惊厥作用。其中对外源性褪黑素抗惊厥作用的研究已经引起国内外同行的高度重视。本研究简述了褪黑素在多种癫痫动物模型中的抗惊厥作用及其可能的作用机制。

1 褪黑素在各种实验性癫痫模型中的抗惊厥作用

近20年来的研究已经证实,褪黑素在多种实验性癫痫动物模型中具有抗惊厥作用,包括戊四氮,喹啉酸盐、海人酸盐、谷氨酸盐、N-甲基天冬氨酸盐,L-半胱氨酸,氰化物,3-巯基丙酸,最大电休克,和电点燃杏仁核等引起的癫痫发作。此外,一些作者还证明松果体切除可诱发沙鼠的癫痫活动,且该活动能被事先给予褪黑素所翻转。

1.1 点燃模型(kindling model)

通过电刺激杏仁核,增加边缘系统癫痫发作的敏感性——大鼠杏仁核点燃模型,是一种适合的颞叶癫痫模型。Mevissen等[1]研究发现,腹腔内注射褪黑素75 mg/kg或100 mg/kg后30 min,杏仁核点燃模型大鼠癫痫后放电的阈值可被显著升高,从而明显降低了大鼠癫痫发作的敏感性。但是全面性发作只有高剂量的褪黑素(150 mg/kg)才能消除,而此种剂量的褪黑素可产生镇静作用和共济失调。而低剂量的褪黑素和常规抗癫痫药物的联合应用可能有助于更好的控制癫痫。近年来,在点燃模型中的研究已经证实,药物的联合应用,可通过相互作用增强它们的抗惊厥作用同时不伴有副作用的增加[2]。

总之,对大鼠杏仁核点燃模型的研究发现,褪黑素的抗惊厥作用不仅表现为增加癫痫后放的阈值,降低癫痫发作的敏感性;还表现为减弱癫痫发作的严重程度以预防癫痫活动在脑中的播散。要获得这一效果的褪黑素的剂量对治疗来说也许太高,并可产生镇静作用和共济失调,但是低剂量褪黑素和常规抗癫痫药物的联合应用有助于更好的控制癫痫。

1.2 匹罗卡品致痫模型

匹罗卡品是一种毒蕈碱胆碱能的促效药,它所诱导的动物癫痫模型在某些方面类似于人类颞叶癫痫,如脑电图波形,行为改变和形态学等。Leticia等[3]用褪黑素(10~50 mg/kg)于每日08:00或17:00给2月龄雌性大鼠经腹腔给药,持续1周,发现褪黑素可延长匹罗卡品诱导的癫痫发作模型中首次惊厥发作的潜伏期,证明褪黑素对匹罗卡品诱导的癫痫大鼠有一定的抗惊厥作用,且这种作用呈时间依赖性,在17:00注射时功效最大。

事实上,褪黑素给药时间对它的作用有一定的影响。已有研究证实褪黑素对3-巯基丙酸诱发的惊厥,焦虑的减弱作用在白天黑夜交替时最明显,此时褪黑素在啮齿类动物的神经内分泌生理方面是最有效的;但Champney等[4]发现褪黑素对戊四氮诱发的癫痫发作的抗惊厥作用不与注射时间相关,激素在早上(8:30)与在白天黑夜交替(17:00)时注射具有同样的功效。Borowicz等[5]也提出褪黑素对电休克诱发惊厥的抗惊厥作用没有时间依赖性。由此推测,褪黑素的抗惊厥作用是否具有时间依赖性可能与所选择的癫痫动物模型有关。

Leticia等[3]的研究显示褪黑素25 mg/kg,连续给药7 d,对匹罗卡品诱发的癫痫,在2个月龄和21 d鼠中都表现出最大功效。而急性给予褪黑素则无明显效果,这些数据表明褪黑素的重复注射是在低剂量情况下提高功效所必需的,与Raghavendra等[4,6]的研究相类似,证实褪黑素的神经保护作用依赖于治疗的持续时间。

1.3 海人酸致痫模型

谷氨酸盐和相关的兴奋性氨基酸的过量释放在神经损伤的病理机制上起着重要的作用。海人酸是强有力的兴奋性氨基酸促效药,可刺激脑神经递质谷氨酸的亲离子受体导致跨膜的离子失衡,尤其是引起钙内流,由此可产生活性氧簇如H_2O_2,超氧阴离子和羟基。这些活性氧簇攻击神经元内的大分子,导致膜脂质过氧化和DNA断裂。给予海人酸能触发特征性边缘系统癫痫发作和海马CA1和CA3区内选择性神经细胞死亡。

Mohanan等[7]的研究显示,褪黑素(10 mg/kg)对海人酸(10 mg/kg)诱导的癫痫发作的严重程度有减弱作用,但是褪黑素并没有显示有效的抗惊厥属性,即使高剂量的褪黑素(45 mg/kg)对海人酸诱导的癫痫发作也没有完全的预防作用。但是,褪黑素可减少由海人酸触发的兴奋毒性脑损害。褪黑素还可抑制海人酸、氰化物和百草枯诱导的鼠脑脂质过氧化和DNA损伤[7]。

1.4 电惊厥模型(electroconvulsant model)

电惊厥模型是研究抗惊厥及抗癫痫药物的常用模型。Borowicz等[8]发现,在测试前60 min,给予褪黑素50 mg/kg腹腔注射可显著提高小鼠的电惊厥阈值。褪黑素50 mg/kg腹腔注

作者简介:张映琦(1975-),女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事癫痫的发病机制和治疗方面的研究。电话:13983673798

收稿日期:2004-02-10;修回日期:2004-08-17

射在电惊厥阈值试验中的保护作用可被氨茶碱,印防己毒素和荷包牡丹碱所翻转。使用低于保护剂量的褪黑素 25 mg/kg 腹腔注射对抗电惊厥,可增强卡马西平和苯巴比妥的抗惊厥作用,但不增强丙戊酸盐和苯妥英的抗惊厥作用,在比较了 8 个月和 12 个月的结果后,发现这种作用与一年中的季节有关。褪黑素引起的苯巴比妥和卡马西平抗电惊厥作用的增强被荷包牡丹碱翻转(1 mg/kg)但不被氨茶碱翻转(5 mg/kg),这提示褪黑素可增加中枢神经系统 GABA 能传递,最终导致苯巴比妥和卡马西平抗惊厥作用的增强。

1.5　其它致痫动物模型

褪黑素(150 ~ 200 mg/kg)腹腔给药可有效对抗戊四氮点燃的大鼠癫痫发作,并且剂量 100 ~ 200 mg/kg,可减轻癫痫发作的严重程度。每日给予褪黑素持续 10 周可减少戊四氮诱发癫痫发作的数量和严重程度[9]。褪黑素(20, 100, 345 mg/kg,皮下给药)对氰化物诱发小鼠癫痫发作和急性致死性表现出保护作用。这一保护作用呈剂量依赖性。氰化钾(8 mg/kg,皮下注射)可引起脂质过氧化的增加,当提前给予褪黑素终止氰化物诱发的癫痫发作后脂质过氧化被完全消除。这些结果表明褪黑素也许通过它的自由基清除功能保护氰化物引起的神经毒性损伤。

2　褪黑素抗惊厥作用的可能机制

2.1　褪黑素对 GABA 能递质的正性调节作用

γ-aminobutyric acid(GABA)是中枢神经系统内一种重要的抑制性神经递质。许多 $GABA_A$ 受体的正性或负性调节剂,如苯二氮䓬类、巴比妥类、类固醇、多价阳离子和乙醇能调节 $GABA_A$ 受体以诱导 GABA 反应,这对脑功能有深远的意义。研究已经证实,使用可增加 GABA 浓度或提高神经组织内 $GABA_A$ 受体上 GABA 作用的制剂可有效的治疗癫痫。

已经证实许多实验性癫痫动物模型与 $GABA_A$ 受体的数量或功能变化有关。Walsh 等[10]研究显示,戊四氮诱发的惊厥与 $GABA_A$ 受体的快速变化有关。这些变化包括一些亚单位 mRNA 短暂的下降和继发的升高和受体上 GABA 与苯二氮䓬类识别位点间偶合的下降。这些作者发现如果在戊四氮处理动物后 $GABA_A$ 受体 mRNA 的减少持续时间足够长,就能导致 $GABA_A$ 受体数量的减少和 GABA 能抑制的降低。

积累的证据表明,中枢神经系统内褪黑素与 GABA 能系统之间有一定的联系。例如,褪黑素可增加下丘脑内 GABA 的浓度,在许多脑区域促进 GABA 的周转,在下丘脑处增加 GABA 诱导的氯离子内流,增强 $GABA_A$ 受体介导的电流并且引起[^{3}H]GABA 结合的增加。对麻醉动物的电生理实验也显示,褪黑素表现出 GABA 样作用并且增强 GABA 在神经元活动中的作用[11]。Leticia 等[3]的研究也显示匹罗卡品诱导的癫痫发作大鼠海马处,在褪黑素预处理后,可出现 GABA 能结合的升高。上述的研究提示褪黑素的抗惊厥作用可能与对抑制性神经递质 GABA 的正性调节作用有关。

另外,已经知道 $GABA_A$ 受体是一种超分子复合物,与中央型苯二氮䓬类受体一起,构成几种识别位点(如苯二氮䓬类、印防己毒素和 GABA 位点)。现有的实验室数据支持褪黑素的活动与脑内 $GABA_A$ 受体超分子复合物其中一些成分的异构调节相关。在体外,褪黑素能提高 GABA 促效药[^{3}H]蝇蕈醇的结合[12]。研究提示褪黑素可影响 $GABA_A$ 受体的功能,褪黑素的一些神经药理学作用如抗惊厥可能通过 $GABA_A$ 受体介导。进一步的研究显示,苯二氮䓬类拮抗药 Ro 15-1788,先于褪黑素前 15 min 给药,可抑制褪黑素对 3-巯基丙酸诱导的癫痫发作的抗惊厥作用[13]。褪黑素对抗小鼠最大电休克的功效能够被氨茶碱,印防己毒素,荷包牡丹碱翻转[5]。上述研究结果提示,褪黑素的抗惊厥作用也许不仅仅是由 $GABA_A$ 受体的一个特殊识别位点所介导,$GABA_A$ 受体上的苯二氮䓬类、印防己毒素和 GABA 结合位点也许均参与了褪黑素的抗惊厥作用。

2.2　褪黑素的自由基清除和抗氧化作用

生物氧化产生能量供生命之需。在代谢过程中,细胞内氧分子衍生的自由基反应力极强,能对其他的分子造成损伤,引起细胞功能障碍,甚至死亡。自然界需氧生物一方面需要氧来维持生存;另一方面氧的副产物却能产生毒性。这是一对矛盾,生物在漫长的进化过程中,逐渐形成了清除自由基机制以免被本身的自由基损伤。实验证明,褪黑素是一种高效的自由基清除剂。

Tan 等[14]报道,褪黑素清除羟自由基的能力大于谷胱甘肽和甘露醇,而清除过氧化自由基的能力是维生素 E 的 2 倍。褪黑素可以有效中和单线态氧,也可以清除次氯酸。除了直接清除自由基,褪黑素还可以通过提高细胞内抗氧化酶活性间接清除自由基,如褪黑素可提高中枢神经系统主要抗氧化酶谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性,并抑制能使机体产生氧化损伤的前氧化酶即一氧化氮合酶的活性。研究表明褪黑素还可以和其他抗氧化剂一起,通过刺激抗氧化酶基因表达,来间接保护机体免受自由基损伤[15]。

Yamamoto 等[16]研究发现,氰化钾皮下注射(6,8 和 9 mg/kg)可以引起严重的强直性癫痫发作,并呈剂量依赖方式。但是,预先给予褪黑素(20 mg/kg)腹腔注射可明显地抑制氰化钾引起的癫痫发作的发生。注射氰化钾(0.01,0.05,0.1 mmol/L)后,小鼠脑组织匀浆内脂质过氧化(39%,106%,132%)显著的增加。氰化钾(0.1 mmol/L)诱发的脂质过氧化可被褪黑素(0.1,0.5,1.0,2 mmol/L)预防,这一保护作用呈剂量依赖性。海人酸盐是一种 NMDA 受体亚型的激动药,可诱发癫痫发作,常被用做癫痫的药理研究模型。在体内,海人酸盐可引起 3 种类型的脑损伤:①最初的轴突稀疏病变;②继发的兴奋性毒性损害;③癫痫发作引起的缺氧和水肿。研究证明,将海人酸盐注射入杏仁核内,皮下注射,或腹腔内注射,均能引起海马损伤并且与 DNA 损伤相伴随。褪黑素(10 mg/kg,腹腔注射)对海人酸(10 mg/kg,腹腔注射)诱导的癫痫发作的严重程度有减弱作用并可保护线粒体 DNA 免受海人酸盐引起的损伤和减轻海人酸盐触发的鼠脑组织匀浆的脂质过氧化。上述结果提示自由基形成和随后的脂质过氧化也许参与了氰化钾、海人酸等诱导的癫痫发作的进展;褪黑素也许通过它的自由基清除功能保护氰化物、海人酸等引起的神经毒性损伤,从而起到抗惊厥的作用。

3　褪黑素与癫痫关系研究的展望

褪黑素提供了在神经保护和抗惊厥作用有趣的结合,并能在边缘系统的阵发性活动中有效预防神经元的缺失。Peled 等[17]研究显示,每日睡前口服褪黑素 3 mg 治疗 6 名顽固性癫痫发作儿童,通过多导睡眠扫描检查和观察他们的行为改变发现,在使用褪黑素的过程中患儿的癫痫发作明显改善。增加了褪黑素作为可能的抗癫痫药物在临床应用的可能性。因此,进

一步研究褪黑素抗惊厥作用的分子机制将为难治性癫痫患者的替代治疗或辅助治疗提供新的策略。

关键词：癫痫；褪黑素；海人酸盐；海马

中图法分类号：R977.1　　**文献标识码**：A

参考文献：

[1] Mevissen M, Ebert U. Anticonvulsant effects of melatonin in amygdala-kindled rats[J]. Neurosci Lett, 1998, 257(1): 13 - 16.

[2] Ebert U, Wlaz P, Loscher W. Anticonvulsant effects by combined treatment with a glycineB receptor antagonist and a polyamine site antagonist in amygdala-kindled rats[J]. Eur J Pharmacol, 1997, 322(2 - 3): 179 - 184.

[3] Costa Lotufo L V, Fonteles M M, Lima I S P, *et al*. Attenuating effects of melatonin on pilocarpine-induced seizures in rats[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2002, 131(4): 521 - 529.

[4] Champney T H, Hanneman W H, Legare M E, *et al*. Acute and chronic effects of melatonin as an anticonvulsant in male gerbils[J]. J Pineal Res, 1996, 20(2): 79 - 83.

[5] Borowicz K K, Kaminski R, Gasior M, *et al*. Influence of melatonin upon the protective action of conventional anti-epileptic drugs against maximal electroshock in mice[J]. Eur Neuropharmacol, 1999, 9(3): 185 - 190.

[6] Raghavendra V, Kaur G, Kulkarni S K. Anti-depressant action of melatonin in chronic forced swimming-induced behavioral despair in mice, role of peripheral benzodiazepine receptor modulation [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2000, 10(6): 473 - 481.

[7] Mohanan P V, Yamamoto H A. Preventive effect of melatonin against brain mitochondria DNA damage, lipid peroxidation and seizures induced by kainic acid[J]. Toxicol Lett, 2002, 29(1 - 2): 99 - 105.

[8] Borowicz K K, Kaminski R, Gasiot M, *et al*. Influence of melatonin upon the protective action of conventional anti-epileptic drugs against maximal electroshock in mice[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 1999, 9(3): 185 - 190.

[9] Champney T H, Champney J A. Novel anticonvulsant action of chronic melatonin in gerbils[J]. Neuroreport, 1992, 3: 1152 - 1154.

[10] Walsh L A, Li M, Zhao T J, *et al*. Acute pentylenetetrazol injection reducesrat GABAA receptor mRNA levels and GABA stimulation of benzodiazepine binding with no effect on benzodiazepine binding site density[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 289: 1626 - 1633.

[11] Stankov B, Biella G, Panara C, *et al*. Melatonin signal transduction and mechanism of action in the central nervous system: using the rabbit cortex as a model[J]. Endocrinology, 1992, 130(4): 2152 - 2159.

[12] Coloma F M, Niles L P. *In vitro* effects of melatonin on [^{3}H]muscimol binding in rat brain[J]. Prog Neuro psychopharmacol Biol Psychiatry, 1984, 8(4 - 6): 669 - 672.

[13] Golombek D A, Escolar E, Burin L J. Chronopharmacology of melatonin: inhibition by benzodiazepine antagonism[J]. Chronobiol Int, 1992, 9(2): 124 - 131.

[14] Tan D X, Chen L D, Poeggeler B, *et al*. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger[J]. Endocrine J, 1993, 1: 57 - 60.

[15] Kotler M, Rodriguez C, Sainz R M, *et al*. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex[J]. J Pineal Res, 1998, 24(2): 83 - 89.

[16] Yamamoto H A, Mohanan P V. Melatonin attenuates brain mitochondria DNA damage induced by potassium cyanide *in vivo* and *vitro*[J]. Toxicology, 2002, 179(1 - 2): 29 - 36.

[17] Peled N, Shorer Z, Peled E, *et al*. Melatonin effect on seizures in children with severe neurologic deficit disorders[J]. Epilepsia, 2001, 42(9): 1208 - 1210.

（编辑　薛国文）

综述

文章编号：1000-5404(2005)03-0270-03

门冬胰岛素类似物研究概况

Advances in studies of insulin aspart analogues

杨妤欣　综述，陈　勇　审校　（重庆医科大学第一临床学院内分泌科，重庆 400010）

胰岛素（insulin, Ins）是所有1型糖尿病和多数2型糖尿病患者的主要治疗药物。理想的胰岛素应用模式是模拟生理性胰岛素分泌的情况以满足能量代谢的需要。在糖尿病（diabetes mellitus, DM）治疗中，胰岛素强化治疗已成为较为理想的治疗方法，能有效的减少或延缓1型和2型糖尿病慢性并发症的发生和发展。普通的短效人胰岛素应用广泛，但也存在较多不足，尤其是皮下注射后吸收和达到峰值速度均较缓慢，与正常个体餐后胰岛素的分泌状态不同，因而控制餐后血糖不甚理想[1]。由于药物浓度的峰值不能与餐后血糖高峰吻合，故易导致餐后高血糖和药物吸收后低血糖的发生。为减少DM不良事件的发生，使胰岛素强化治疗更为安全、有效和方便，新的短效胰岛素类似物不断得以开发。门冬胰岛素（insulin aspart, IAsp）便是其中一种快速作用的重组胰岛素类似物。

1　临床前药理学

在临床前评估中，IAsp除皮下吸收速度更快以外，其余性质被认为与人胰岛素（human insulin, HI）是相似的。其中包括胰岛素受体亲和力、胰岛素受体解聚速率、胰岛素受体酪氨酸激酶活性、IGF-1受体亲和力、促有丝分裂能力、药物代谢机制和毒理学性质等[2]。

Lindholm等[3]研究发现，IAsp在动物实验（猪）中的药代动力学及药效学特性与人的试验结果相似，其皮下吸收速度比HI更快，最大血清胰岛素浓度（maximum serum insulin concentration, $C_{max(ins)}$）更高，达到最大血清胰岛素浓度的时间（time to $C_{max(ins)}$, $t_{max(ins)}$）更短。IAsp和HI两者相比，$C_{max(ins)}$为（204±76）*vs*（122±34）pmol/L，$t_{max(ins)}$为（73±23）*vs*（99±38）min，但在大鼠与狗的试验中，IAsp与HI在吸收速率上却没有显著差别。对

作者简介：杨妤欣（1980-），女，四川省达州市人，硕士研究生，主要从事糖尿病骨质疏松方面的研究。电话：(023)68481031

收稿日期：2004-06-14；修回日期：2004-11-13