



目的: 目的: 研究代谢型谷氨酸 (mGlu) 受体拮抗剂对大鼠脑内最大电刺激致惊厥发作发展及脂质过氧化产物含量的影响。

材料与amp;方法。 实验对象为体重180—210 g的雄性Wistar大鼠87只。实验中采用了最大电击法。mGlu受体第1和第5亚型的选择性拮抗剂在最大电击前1小时给予。对照组大鼠注射等量生理盐水。脂质过氧化过程的强度通过次级产物与硫代巴比妥酸反应的水平采用分光光度法进行评估。

结果。 研究发现, 最大电击程序导致大鼠大脑皮质中明显的阵挛-强直性惊厥发作和脂质过氧化产物水平增加3倍以上。研究发现, 第5亚型受体mGlu选择性拮抗剂几乎完全阻断大鼠癫痫发作的紧张期, 并在很大程度上阻止了最大电刺激引起的脂质过氧化过程的强化。44%的实验动物在给予第1亚型选择性mGlu受体拮抗剂后出现强直性惊厥。同时, 由于电击的作用, 这种拮抗剂也部分降低了脂质过氧化产物的含量。

结论。 因此, 代谢性谷氨酸受体参与了大鼠最大电击诱发惊厥发作的发生机制。同时, 通过阻断第5亚型的mGlu受体, 观察到惊厥表现最明显的减弱, 以及最大电休克程序导致的脂质过氧化产物水平的升高。获得的数据证实了使用第5亚型的代谢受体拮抗剂作为潜在的抗惊厥药物治疗广泛性癫痫的可能性。

关键词: 代谢性谷氨酸受体; 最大电休克; 强直性惊厥; 脂质过氧化作用; 老鼠

癫痫和癫痫发作是中枢神经系统最常见和最严重的疾病之一。根据世界卫生组织的数据, 全世界有超过5000万癫痫患者登记[1]。现有的抗惊厥药物疗效不足, 且副作用众多, 对其发病机制的详细研究迫在眉睫[2, 3]。

到目前为止, 兴奋性神经递质氨基酸天冬氨酸和谷氨酸参与了癫痫和惊厥状态的发生和发展机制是毫无疑问的[4]。因此, 以前的研究表明, 在各种性质的癫痫模型中, 谷氨酸离子受体激动剂是惊厥药, 而拮抗剂则是抗惊厥药[5]。近几十年来, 旨在阐明代谢型谷氨酸 (mGlu) 受体在包括惊厥状态在内的神经毒性脑损伤中的作用的研究获得了特别的相关性[6, 7]。研究表明, mGlu受体在突触前发挥作用, 并可促进突触功能的长期变化[4]。多项研究揭示了mGlu受体调节剂在各种惊厥药物引起的实验性惊厥条件下的抗惊厥作用[7, 8]。

然而, 在我们所能获得的文献中, 我们发现只有少数研究不同亚型mGlu受体在模拟最大电刺激诱发癫痫发作中的作用的著作[9, 10]。最大电击引起的惊厥被认为是最适当的癫痫实验模型之一。由于没有实验模型能够完全充分地反映临床观察到的癫痫的发病机制和发展, 普遍接受的方法是使用发病机制不同的癫痫模型。最大电击模型也被广泛用于筛选具有潜在癫痫发作活性的新物质[11]。众所周知, 苯妥英和苯巴比妥等物质在本试验中表现出很高的抗惊厥活性 [11]。这些药物的特点是能够选择性地防止癫痫发作的紧张性延长阶段, 当使用6倍阈值电流时, 即150ma的刺激时间为0.2 s[11]。研究发现, 离子性受体拮抗剂 (disocilpine, NBQX, LY293558) 在最大电休克模型中对癫痫发作的强张期也有显著的保护作用[12]。然而, 人们发现, 所有这些物质的使用都伴随着一些负面副作用的发展[7]。

谷氨酸的神经递质功能与自由基过程的激活之间的联系, 为详细研究这些过程在惊厥、脑缺血等疾病的病理生理机制中可能的作用奠定了基础[13, 14]。在之前的一些研究中发现, 不仅n -甲基- d -天冬氨酸的调节, 而且mGlu受体也伴有明显的氧化应激, 包括实验动物脑内脂质过氧化过程的强化[15]。然而, 到目前为止, mGlu受体与脂质过氧化过程在最大电刺激引起惊厥状态机制中的可能关系仍未被探索。

目的是研究mGlu受体拮抗剂对大鼠最大电休克引起癫痫发作的发生发展及脑内脂质过氧化产物含量的影响。

材料与amp;方法。

实验对象为体重180-210 g的雄性Wistar大鼠。这些实验是按照Scientific Research Institute of Normal Physiology named after P.C. Anokhin的国家预算科学机构伦理委员会会议批准的《使用实验动物进行工作的规则》的要求进行的（2005年9月3日第1号议定书），以及世界动物保护协会（WSPA）和欧洲实验动物保护公约的要求。这些动物被关在笼子里，笼子里有4只动物，每只动物都可以自由取水和标准的联合饲料。为了避免昼夜节律对动物行为参数的影响，所有实验均在 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的实验室室温下进行，时间为9/14小时。

我们采用了最大电击技术（电流强度150mA，电刺激持续时间0.25 s）[9]。记录癫痫发作的以下参数：发作表现为阵挛性发作和后肢僵直的完全性强直-伸肌发作（强直伸展期）。

本研究中使用了以下mGlu受体调节剂：mGlu受体第5亚型选择性拮抗剂(mGlu5) - 6-甲基-2-(苯乙基)吡啶氢氯（MPEP; Merz, 德国），第1亚型mGlu受体的选择性拮抗剂(mGlu1) (R) - n-环庚基-6-([[(四氢-2-咪喃)甲基]氨基]甲基)噻吩[2,3-d]嘧啶-4-胺（YM-230888; R&D system Tocris, Minneapolis美国）。MGLu受体调节剂和生理盐水在最大电休克前1小时一次性腹腔注射给大鼠。未受到最大电击的动物在被斩首前1小时接受单次注射试验物质（静脉注射）。

在这项研究中，动物被分为6个实验组：

第一组（对照组，n=12）只给大鼠注射生理盐水（MEDPRO, 俄罗斯），体积为每200 g动物重量1ml；

第二组（n=15）包括大鼠，术前1小时注射生理盐水进行最大电击；

第三组（n=14）只给予mGlu5受体选择性拮抗剂MPEP 20 mg/kg的大鼠；

第四组（n=14）大鼠，注射mGlu1受体选择性拮抗剂YM-230888，剂量30 mg/kg；

第五组（n=16）大鼠，在最大电击暴露前1小时注射MPEP（20 mg/kg）；

第六组（n=16）大鼠，在暴露于最大电击前1小时注射y -230888（30 mg/kg）。

YM-230888用0.1 ml 10%聚山梨酯吐温80（PanReac AppliChem, Darmstadt, 德国）分散，然后用生理盐水配制成体积。MTEP在盐水中溶解。药物剂量的选择依据文献资料和我们既往研究的结果[16, 17]。

内容来确定二次脑组织脂质过氧化作用的产品，光下的动物被斩首乙醚麻醉后1小时测试物质的管理组织没有暴露在最大电休克（第一组、第二组、第三组）或在发展高峰时因最大电击引起的惊厥发作（第四组、第五组、第六组）。在被斩首后，大脑被冰着取出，额叶皮层被迅速分离。用于后续生化研究的组织样本储存在液氮中。脂质过氧化过程的强度是通过与硫代巴比妥酸反应的产物水平，采用公认的分光光度法来评估的[18]。将10倍量的冷却盐水加入称重的脑组织样本中，然后在玻璃特氟隆均质器（0.2 mm）中以3000转/分的杵转速均质。从所得到的悬液中，取200 μL 的匀浆，并将其放入带地面塞的试管中。对照样品含200 μl 生理盐水。0.2 ml 45%十二烷基硫酸钠溶液（Мерк, 德国），1.5 ml 20%醋酸（NevaReaktiv, 俄罗斯）和8%硫代巴比妥酸溶液（Sigma-Aldrich, Steinheim, 德国），然后将每个样品的体积加蒸馏水至4ml。在 95°C 水浴中孵育60分钟，然后冷却，在武装CH90-1S离心机中在4000 g下离心10分钟。用美国Aminco DW 2000分光光度计测定样品的光密度，波长为532 nm。样品的吸收被插值到TBCRP（TBK反应产物与2-硫代巴比妥酸反应的产物）浓度的标准曲线，nmol/g的组织。

使用Statistica 10.0（Stat Soft Inc., 美国）、Excel（Microsoft Office 2019, 美国）软件包和Bio-Plex Manager软件（version 4.1）对结果进行处理。所得数据用

平均数±平均数的标准误差表示。由于组数据样本不服从正态分布规律；对独立组采用非参数Mann-Whitney U检验进行比较统计分析。p值<0.05认为差异有统计学意义。

研究结果与讨论

由于我们的研究,发现过程的最大电休克(电流强度150毫安,电刺激持续时间0.2 s)导致100%的动物的发展明显抽搐的阵挛的补剂癫痫,以93%的大鼠后肢的补药扩展的阶段。结果表明,mGlu受体拮抗剂MPEP(20 mg/kg, i/b)或YM-230888(30 mg/kg, i/b)在未暴露于最大电击的大鼠中实际上没有出现惊厥表现(表1)。研究发现,mGlu5受体选择性拮抗剂MPEP的剂量为20 mg/kg,在最大电休克前1小时给予,几乎完全停止了癫痫的紧张期。因此,当暴露于最大电击时,与接受生理盐水的93%的大鼠相比,该组仅12%的动物记录了强直性伸展的阶段(p<0.01,表1)。MPEP在最大电击前的指定剂量也导致了出现阵挛性癫痫的动物数量的显著减少(p<0.05,表1)。反过来,在引入选择性拮抗剂mGlu1受体Ym-230888,剂量为30 mg/kg的最大电击模型上,44%的实验动物观察到强直性惊厥,而注射盐水的动物中观察到的强直性惊厥为93%(p<0.05,表1)。与此同时,mGlu1受体的抑制也导致出现阵挛性发作的动物数量显著减少(p<0.05,表1)。

当研究自由基过程的强度时发现,与对照组相比,MESH治疗过程中大鼠大脑皮质内的脂质过氧化过程产物浓度增加了3倍以上(分别为 195 ± 19 nmol/g和 63 ± 11 nmol/g, p<0.001)。mGlu受体拮抗剂(MPEP, 20 μ /kg和YM-230888, 10 mg/kg)在未施加最大电刺激的情况下,对大鼠大脑皮质硫代丙二酰缩脲产物水平无明显改变。我们发现,癫痫发作前1小时给药MPEP能显著但不是完全阻止最大电击引起的脂质过氧化产物含量的增加(图1, p<0.01)。mGlu1受体的选择性拮抗剂YM-230888也部分降低了最大电击引起的脂质过氧化过程的强化(图1, p<0.05)。

因此,研究结果表明,代谢型谷氨酸受体(mGluR1和mGluR5)参与了最大电击程序引起癫痫发作的发生机制。目前,癫痫和惊厥障碍的发展无疑是基于兴奋性和抑制性神经传递之间的不平衡[4]。然而,迄今为止,几种药物已被引入临床实践,用于治疗影响抑制性(γ -氨基丁酸能)神经递质系统的惊厥疾病[19]。<https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0>与此同时,试图创造抗惊厥药物,其作用是直接调节谷氨酸受体的活性,结果是无效的[5]。这很奇怪,但一个可能的解释是,早期抗惊厥药物的开发是为了合成阻碍离子型谷氨酸受体的分子。这些受体在中枢神经系统中提供快速的兴奋性突触传递,但也有许多严重的副作用[6]。解决谷氨酸受体配体临床应用问题的方法显然是使用非离子型谷氨酸受体调节剂[6]。因此,研究表明,mGlu1和mGlu5受体拮抗剂通过对n-甲基-d-天冬氨酸受体亚型谷氨酸受体的功能调节,削弱了谷氨酸的兴奋作用,在乙醇引起的惊厥模型中[7]。在我们的早期实验中发现[16],阻断mGlu1受体完全阻止了DBA/2小鼠对声音反应时的听源性癫痫发作和脑脂质过氧化过程的强化。而这些受体的激活导致了遗传性癫痫小鼠脑内惊厥表现强度的增加和脂质过氧化产物形成的增加[16]。当研究最大电击过程引起的癫痫模型中脂质过氧化过程和mGlu受体调节之间可能的关系时,发现mGlu5受体拮抗剂MPEP几乎完全抑制紧张性伸展的发展,并且在很大程度上,防止脂质过氧化过程的强化。值得注意的是,在本模型条件下,mGlu1受体拮抗剂YM-230888也能在较小程度上阻止大鼠强直性癫痫发作的发生,并能增加大鼠大脑皮层脂质过氧化产物的形成。结果表明,mGlu受体拮抗剂对大鼠脑脂质过氧化过程的强化有抑制作用。文献中包含了具有抗氧化作用机制的药物的抗惊厥活性的数据,如美西多[20]和褪黑素[14]。总结我们的结果和文献数据,我们可以假设脂质过氧化过程的活性降低是抗惊厥药物作用机制中的一个必要环节。

结论

因此，代谢型谷氨酸受体（mGluR1和mGluR5）参与了大鼠最大电击诱发癫痫的发生机制。同时，在最大电击模型中，mGlu5受体被阻断后惊厥表现减弱最为明显，而mGlu1受体的抑制效果较差。研究发现，给药mGlu5和mGlu1受体拮抗剂可部分抑制最大电刺激所致大鼠大脑皮质脂质过氧化产物水平的升高。

获得的数据证实了使用第5亚型的代谢受体拮抗剂作为广泛性癫痫发作的潜在抗癫痫药物的可能性。

表 1代谢性谷氨酸受体拮抗剂对Wistar大鼠最大电休克诱发癫痫发展的影响

动物群	组号	总计, n	阵挛惊厥		强直性惊厥	
			n	%	n	%
控制 0.9% NaCl	1	12	0	0	0	0
0.9% NaCl + 最大电击	2	15	15 ^{***}	100	14 ^{**}	93
MPEP 20mg/kg	3	14	0	0	0	0
YM-230888 30mg/kg	4	14	1	7	0	0
MPEP 20 mg/kg + 最大电击	5	16	4 ^{*.#}	25	2 ^{*.##}	12
YM-230888 30mg/kg + 最大电击	6	16	10 ^{*.##}	63	7 ^{*.#}	44

注：n—组内动物数量；*—与对照组比较差异（*— $p < 0.05$ ，**— $p < 0.01$ ，***— $p < 0.001$ ）；#—与最大电击组比较（#— $p < 0.05$ ，##— $p < 0.01$ ，###— $p < 0.001$ ）

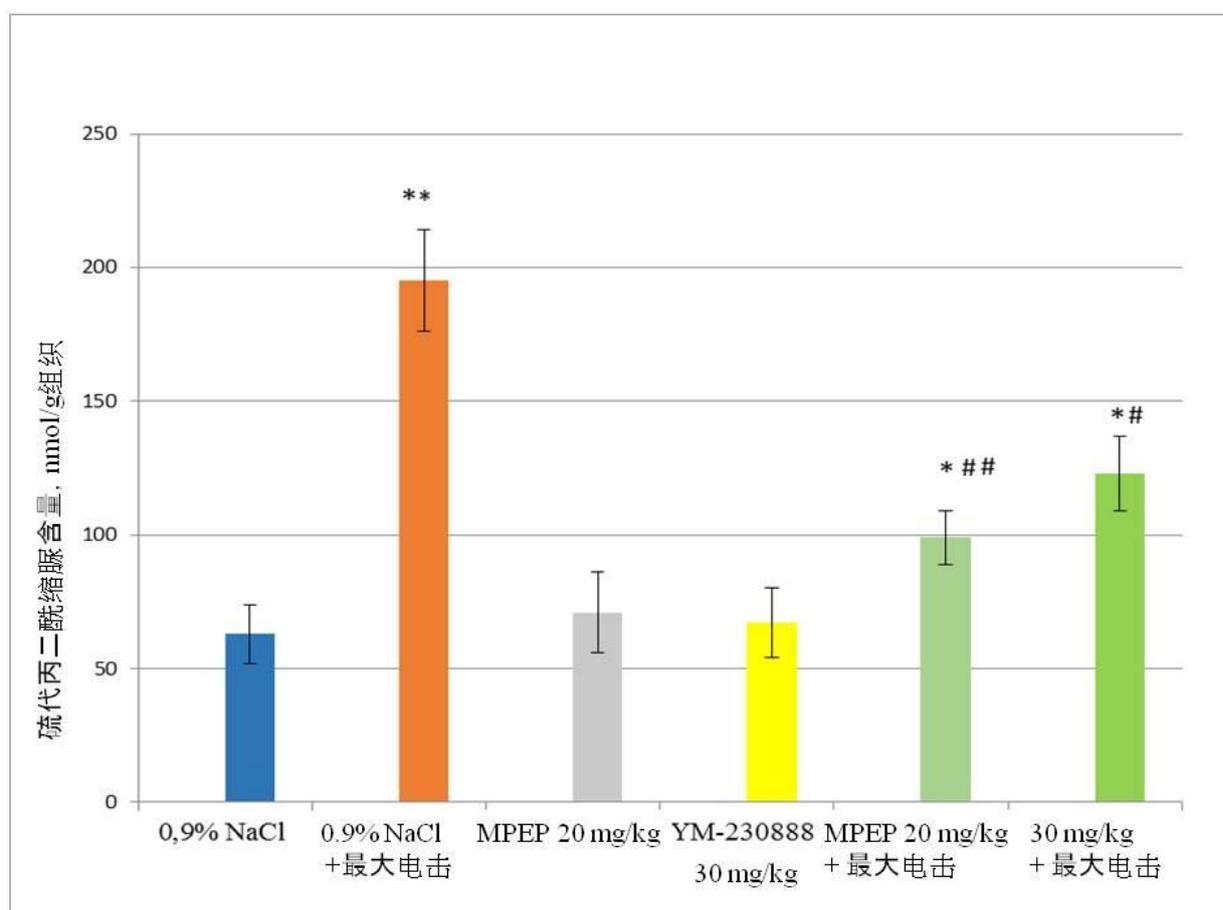


图 1代谢性谷氨酸受体拮抗剂对最大电休克模型大鼠大脑皮质脂质过氧化产物含量的影响。注：*—与对照组比较，#—与最大电击组比较（*与#— $p < 0.05$ ；##— $p < 0.01$ ）。