

惊厥和癫痫时
脑脊液氨基酸介质与cAMP的变化

(临床病儿和实验动物研究)

(摘要)

指导教师 左啟华教授
研究生 张宗昊

北京医学院

1981年1月

3
-1
3728

北京医学院
图书馆
PDG

惊厥是儿科常见病，在7岁以下儿童中，5·7%至少发生过一次惊厥〔1〕。国内癫痫发病率为0·78—1·75%，儿童更高〔2〕。惊厥和癫痫都是各种原因引起的中枢神经系统(CNS)某种部位的神经元发生同步异常放电〔3, 4〕，但目前的治疗并不令人满意，如能针对造成不同类型异常放电的生理生化障碍进行特异治疗，疗效必然提高〔4, 5〕。因此，神经生化的研究有重要的临床意义。近年来，癫痫生化的研究主要集中于中枢介质〔5〕，尤其氨基酸介质被许多学者所重视，认为可能与癫痫关系最密切〔6~8〕，但至今尚无肯定的结论。所以这方面的研究仍是当前小儿神经系统疾病中一项重要而又迫切的课题。

在临床可能得到的标本中，以脑脊液(CSF)最能直接反映CNS的病况。近年的大量研究表明，尽管目前还不能对CSF中各种氨基酸含量的意义一一阐明，但CSF中氨基酸介质含量在一定程度上是可能反映其在脑组织中代谢水平的〔4, 9~21〕。CSF中环一磷酸腺苷(CAMP)也是同样，可以被看成是估计CNS中GAMP水平的初步临床指标〔22~30〕。

材料和方 法

本文包括临床和动物实验两部分。

(一) 临床研究 本文49例均为一九七九年十月至一九八〇年六月，我院儿科住院病儿，分为癫痫组和对照组〔表1〕。癫痫组(26例)为近二周内发生过一次或一次以上惊厥的病儿和各种类型癫痫的病儿。对照组包括具有各种神经系统表现，但病史中始终无惊厥的病儿。所有病儿由腰穿取CSF，均有明确的腰穿指证。除急症病儿外，腰穿均在进食后3小时，卧床12小时后进行〔30, 31〕，腰穿流出的第1、2毫升CSF供常规、生化检查，第3毫升供本实验测定，以排除不同流出部分中生化成份的差异〔11〕。凡因穿刺

损伤造成血染或白细胞 $>10/0.1\text{ml}$ 的CSF标本除外。

(二) 动物实验 选用北医农印权报告的家兔癫痫模型〔32〕：选体重 $2.5 \sim 3.5\text{kg}$ 健康成年家兔，性别不限。先抽取延髓池CSF 0.6ml 作为自身对照〔33〕，埋藏皮层电极并在颅骨上钻给药孔〔图1〕。饲养一周，待其皮层电图(EOG)恢复正常，再进行实验，先记录EOG作为对照，接着从给药孔注射 $\text{FeSO}_4 500\mu\text{g}/\text{kg}$ (容量 $30\mu\text{l}$)至脑室，注射后30—40分钟开始每10分钟描记EOG，待出现癫痫样放电而家兔还无惊厥行为，即“惊厥前状态”时，再抽取CSF；后待家兔出现阵挛惊厥行为后20—30分钟，即“惊厥后”，再抽取CSF和描记EOG〔照片1〕。凡一只家兔的三份CSF标本中有一份因穿刺损伤而明显血染的，不作为本文研究对象，最后完成全部实验的家兔第一组共8只，同时测定CSF中GAMP和氨基酸含量；第二组共9只，只测定CSF中氨基酸介质的含量。

(三) 氨基酸分析 ①仪器和方法：用“日立”(HITACHI) 835-50型氨基酸自动分析仪，以测量蛋白水解液的条件和方法完成〔34〕。以分离满意的15种氨基酸作为指标，包括5种氨基酸介质(谷、天门冬、甘氨酸、牛磺酸和 γ -氨基丁酸(GABA))和10种非介质氨基酸〔图5〕。因CSF中GABA含量很低，很多标本含量在仪器最小检测量以下，故对GABA测定结果采用给分法：凡含量在最小检测量以上的标本得2分，在其以下的为1分。②标定处理〔4, 11, 14~16, 35~39〕：用无菌小瓶收集CSF，取 0.4ml 立即或在 -20°C 储存6小时内去蛋白：加磺基水杨酸5% (W/V)，混匀5分钟后 4°C 下4000转/分离心20分钟，取上清液封入无菌安瓿，液氮(-195°C)保存不超过6个月。

(四) cAMP 测定 ①仪器和方法〔40~42〕：按 Gilman 蛋白结合法用 [^3H] - cAMP 在国产 FJ-353G₁ 双道液体闪烁计数器上完成。②标本处理〔28, 43, 44〕：用无菌小瓶收集 CSF 后在室温下 4000 转/分离心 20 分钟，取上清液在 -20℃ 保存不超过二周，不再去蛋白直接测定 cAMP。

结果和讨论

(一) 癫痫与 CSF 中氨基酸介质的关系

文献中很多实验资料提示氨基酸介质含量的改变可能造成癫痫放电和惊厥行为〔3, 6, 7, 9, 45~48〕。但在不同临床病人和不同动物模型，结果有不同〔4, 49~50〕。

(1) 谷氨酸 本文第一组动物实验显示谷氨酸在惊厥前状态时较对照值增高 ($0.05 > P > 0.01$)，而惊厥后与惊厥前状态相比，不再有明显改变 ($P > 0.05$)，但与对照值仍有显著性差异 ($0.05 > P > 0.01$)〔图 2〕；第二组动物也得到同样的结论〔表 7〕，说明异常脑电活动的出现与 CSF 中谷氨酸增多同时出现；而在异常脑电活动发展为全身惊厥行为的“扩布”过程中，谷氨酸不再有明显改变。本文临床实验没有发现癫痫病儿和对照病儿 CSF 的谷氨酸含量有差异 ($0.5 > P > 0.2$)〔图 3〕。目前一般认为谷氨酸是一种重要的 CNS 兴奋性介质，于癫痫过程中仅对始动机制起重要作用〔4, 9〕，文献中曾报告惊厥过程中谷氨酸从脑细胞释出到细胞外多在异常放电之前或同时发生〔4, 7~9, 51, 52〕这与本文动物实验结果是一致的。关于癫痫病人 CSF 中谷氨酸含量的变化，文献中有作者报告增高〔17, 53, 55〕，也有人发现减少〔56〕，本文结果则无明显变化，这些矛盾的结果说明癫痫病人 CSF 中氨基酸介质的改变是复杂的，可能受许多因素影响〔4, 17〕。

(2)GABA 本文第一组动物实验显示虽然惊厥前状态时CSF中GABA含量较对照值低,但无统计学意义($P > 0.05$),唯有惊厥行为出现后,GABA才表现为有意义的降低($0.05 > P > 0.025$)〔图2〕;第二组动物则未发现GABA有意义的改变〔表7〕。本文临床研究提示:高热惊厥病儿CSF中GABA含量较其他类型惊厥病儿高($P = 0.045$)〔表2〕。目前一般认为GABA作为CNS中重要的抑制性介质主要与癫痫病灶阵发异常放电的扩布过程有关〔7〕,这与本文第一组动物实验结果一致。文献中有关癫痫病人CSF中GABA含量的研究很多。曾有人报告大发作和精神运动型发作患者CSF中GABA含量比局限性感觉/运动发作患者更低〔57〕,这可能与GABA抑制效应有关。但文献中尚未见有关高热惊厥与其他类型惊厥GABA含量比较的资料。由于高热惊厥与其他类型惊厥的一个显著不同就是一次病程中一般只发作一次,预后较好,而本文实验结果提示其GABA含量较高,可能也与其抑制效应有关,这是否能具有临床意义,还有待更多病例说明。

(3)牛磺酸 本文无论家兔惊厥前后或癫痫组与对照病儿之间,都未发现牛磺酸含量有意义的变化〔图2,3;表7〕。但惊厥发作后5—14天的病儿CSF中牛磺酸含量较惊厥后72小时内的病儿和对照组病儿都高(P 值均 < 0.001)〔图4〕。目前,大多数学者认为牛磺酸是一个与癫痫和小脑疾病密切有关的中枢抑制性介质〔4,45,58〕。关于其在癫痫病人CSF中的改变,有人发现无显著降低〔4,5〕,有人则报告稍增多〔55〕。已知牛磺酸除对神经细胞有直接迅速的抑制作用外,还能调节氨基酸代谢,使兴奋抑制过程恢复平衡,且这种效应出现缓慢而持久〔4,45,52,60〕。本文病儿均未给予外源性牛磺酸或影响其代谢的药物,但5—14天后牛磺酸增高是否能说明机体在惊厥后可能有一种自身恢复氨基酸代谢平衡的

机制，还有待更多病例的观察，因为本文例数尚少，不能完全排除个体差异或其他因素影响的可能性。

(4)天门冬氨酸 本文临床研究发现癫痫组病儿CSF中天门冬氨酸含量高于对照组 ($0.05 > P > 0.02$) [图3]。天门冬氨酸是ONS一种兴奋性介质 [7, 9]，文献中曾有作者报告癫痫病人CSF中含量增高 [17, 55] 但其原因和意义还不明确。

(5)甘氨酸 本文无论在动物和病儿都未发现甘氨酸含量有意义的变化 [图2, 3; 表7]。目前已证实甘氨酸是一种中枢抑制性介质 [6, 7, 45]。关于癫痫病人CSF中甘氨酸含量的改变，有人报告无明显改变 [17]，但也有人发现稍增多 [55]，其意义还有待阐明。

(6)非介质氨基酸 本文无论动物实验和病儿都未发现所测10种非介质氨基酸有意义的变化 [图5]。文献中曾有报告在具有癫痫病灶的大脑皮层，氨基酸代谢可能有广泛紊乱 [6, 9, 17, 61]。

(7)氨基酸介质的综合作用 以上分别讨论了5种氨基酸介质在惊厥时的变化，但是实际上，癫痫和其他许多行为反应一样，作为一个感觉——运动整合的复杂过程，不可能只与某一种介质相联系，必然涉及到多种介质 [7, 62~65]。目前，虽有学者主张把兴奋性和抑制性氨基酸之间的平衡关系结合癫痫放电、扩布的关系，综合进行分析 [7]，但至今还未见具体的综合分析资料。本文尝试提出氨基酸介质综合指标进行讨论： E_{AA} 为“兴奋性氨基酸介质综合水平”，即：谷氨酸含量 \times 天门冬氨酸含量； I_{AA} 为“抑制性氨基酸介质综合水平”，即：牛磺酸含量 \times 甘氨酸含量 \times GABA含量的得分；ANT为“氨基酸神经介质兴奋性指数”，即 $\frac{E_{AA}}{I_{AA}}$ 。在动物实验，为减少个体差异的影响，可按自身对照值，计算各种氨基酸的相对变化值来代

替绝对含量：某种氨基酸在惊厥前状态（或惊厥后）测定值。从理
该氨基酸的自身对照值

论上看，ANT值随兴奋性氨基酸的增多而增大，随抑制性氨基酸的增多而减小，似乎在一定程度上可能体现5种氨基酸介质的综合兴奋水平。但在这些指标中，5种介质对CNS兴奋性的影响程度被假设等同，这显然是不够精确的，但由于目前对这些介质的认识还没有达到更深入的程度，所以有待这方面有所进展后，在这些指标中再加入每种氨基酸介质作用程度的系数，使这些指标更精确、更完善。但就目前水平来看，本文实验结果初步提示ANT可能具有一定的意义：本文第一组动物实验结果显示，单独从EAA或IAA来考虑，惊厥前后的变化无意义〔表3〕，但把两者综合起来，以ANT来衡量，从〔图6〕的半对数坐标可以看出，ANT在惊厥过程中几乎以不变的速度增高，而谷氨酸和GABA含量在惊厥过程中的变化速度都是不均一的，这就提示ANT可能在一定程度上反映了惊厥过程中CNS兴奋水平不断增高的过程。有关ANT值在惊厥过程中的改变，在第二组动物也得到同样的结果〔表7〕。本文临床研究显示：惊厥后24小时内的病儿CSF中ANT值比38小时以上的病儿和对照组病儿都高（P值分别为 $0.02 > P > 0.01$ ， $0.01 > P > 0.005$ ）〔表4〕。这也提示ANT在一定程度上可能与CNS的兴奋性水平一致。如今后能在更多的临床病例证实ANT值的增高在不同介质发生代谢紊乱的病儿都存在，则ANT可能对癫痫临床治疗的药物选择和预后判断有一定价值。

（二）癫痫与CSF中cAMP的关系 本文第一组动物实验显示：家兔惊厥前后CSF中cAMP含量的变化无统计学意义（ $P > 0.05$ ）〔表5〕，但如用自身对照值来计算cAMP的相对改变，即 R_{cAMP} ，

为 $cAMP$ 在惊厥前状态 (或惊厥后) 的测定值, 则发现惊厥前状态 $cAMP$ 自身对照值

时 R_{cAMP} 高于对照值 ($0.05 > P > 0.01$), 但在惊厥后 R_{cAMP} 与对照值比较则无显著性差异 ($P > 0.05$) (表5)。实际上, 环核苷酸在 CNS 的作用很复杂 [66~68], 作为癫痫发病分子机制的一部份, 已受到广泛研究 [69]。惊厥时 CNS 中 $cAMP$ 含量的变化在不同的动物模型可能不同 [22, 24, 70], 但大多数学者认为含量增高 [24, 70], 对其机制尚有争论, 有学者认为惊厥时细胞去极化, 神经活性物质释放而使 $cAMP$ 生成增多 [24]; 但也有人认为 $cAMP$ 的增多是惊厥时缺氧等因素造成的继发表现 [22]。本文结果不支持后一种学说, 因为 $cAMP$ 增高出现在惊厥行为之前, 而在惊厥行为出现后, $cAMP$ 反而不再维持于高水平, 所以不可能是惊厥造成缺氧的结果。

本文临床研究显示: 在对照组病儿中, 智力正常病儿 CSF 中 $cAMP$ 含量高于智力低下病儿 ($0.02 > P > 0.01$) (表6)。把癫痫组内智力正常病儿按惊厥至腰穿取 CSF 时间间隔分为两组, 发现 48 小时以内的病儿 CSF 中 $cAMP$ 高于 52 小时以上的病儿 ($0.05 > P > 0.02$) (表6)。文献中曾报告在弥漫性脑疾病 (感染、出血、外伤、变性、脑积水等) 引起的精神和运动发育障碍及昏迷的病儿, CSF 中 $cAMP$ 均减少 [23, 28-31, 71, 72]。本文结果也提示智力低下病儿含量较低。文献中还报告惊厥病人发作后三天内 CSF 中 $cAMP$ 含量增高 [25], 并发现时间间隔越近, 含量越高, 而在长期不发作的慢性癫痫病人, $cAMP$ 不见增高, 甚至反而降低 [24~28]。本文结果显示惊厥发作后 CSF 中 $cAMP$ 增高持续二天, 与文献报告大体一致。

总结以上，文献和本文的动物、临床实验结果都说明无论脑功能低于正常或异常增高时，CSF中cAMP含量都在一定程度上反映了CNS的功能活动水平。

(三) 癫痫时CSF中氨基酸介质与cAMP的关系 本文第一组动物实验显示在惊厥前状态时，家兔CSF中cAMP与ANT呈正相关($r=0.730$, $0.05 > P > 0.02$) (图7)。目前已知，cAMP是一部分介质(如单胺类)，但不是所有介质的“第二信使”[59]。关于氨基酸介质与cAMP的关系，首先发现谷氨酸、天门冬氨酸等兴奋性氨基酸可使脑组织cAMP增多[73]，此后研究甚多[54, 70, 74~76]，一般认为氨基酸介质对cAMP的影响是复杂而不是单一的[74]。本文并不研究氨基酸介质与cAMP代谢的特异联系或其机制，但cAMP是一个在一定程度上可能反映CNS功能活动水平的非特异性指标，本文探讨了cAMP的变化与ANT的相关关系，动物实验结果显示两者呈正相关，从而由另一个方面提示ANT有可能在一定程度上反映CNS兴奋性水平。

本文临床研究中，为排除临床因素的复杂影响，只对11例智力正常的惊厥患儿CSF测定结果作相关分析，结果显示ANT与cAMP含量呈负相关($r=-0.826$, $0.002 > P > 0.001$) (图8)，说明惊厥后CSF中cAMP含量越高的个体，ANT值越低。文献中曾报告cAMP对许多CNS神经元能产生抑制效应[24, 75]，还有资料证实cAMP能影响脑组织多种介质的代谢，而表现对神经元的抑制作用[67]，因而有人推测：大脑的惊厥放电通过直接和间接机制使CNS中cAMP含量增多，而cAMP可能再通过其水解产物(腺苷酸和腺苷)及其他机制，又对神经元的异常放电产生抑制效应[24, 75]。本文临床研究结果显示的负相关，可能就是这种抑制效应的反

映。这一结果不仅从另一个方面提示 A N T 在一定程度上反映 C N S 兴奋水平的可能性，而且也提示了对 A N T 及其与 c A M P 的关系进行深入研究可能具有一定的临床价值。

摘要

本文以病儿腰穿 C S F 和脑室内注射 $F e S O_4$ 家兔癫痫模型的脑池 C S F 为材料，讨论惊厥和癫痫神经生化机制中氨基酸介质和 c A M P 含量变化的意义：

(1) 家兔异常脑电的出现主要与 C S F 中谷氨酸增多有关，而惊厥行为的出现主要与 G A B A 含量下降有关，同时谷氨酸仍保持在高水平。临床研究提示高热惊厥病儿 C S F 中 G A B A 含量高于其他类型惊厥的病儿；惊厥后 5—14 天的病儿 C S F 中牛磺酸含量高于 72 小时以内的病儿；癫痫组病儿 C S F 中天门冬氨酸含量高于对照组病儿。

(2) 家兔惊厥过程中 C S F 的 c A M P 含量增多与异常放电有关，而不是惊厥造成的缺氧所引起的。动物和临床结果都提示 C S F 中 c A M P 在一定程度上反映了 C N S 的功能活动水平。

(3) 由于对氨基酸介质进行综合分析可能更有意义，本文尝试找出一个综合指标。动物和临床结果初步提示 A N T (“氨基酸介质兴奋性指数”)，即：
$$\frac{C S F \text{ 中谷氨酸含量} \times \text{天门冬氨酸含量}}{\text{牛磺酸含量} \times \text{甘氨酸含量} \times G A B A \text{ 含量}}$$
，可能与

C N S 兴奋性水平在一定程度上相一致：①家兔惊厥过程中 A N T 值不断增高；②临床病儿惊厥发作后 24 小时内 A N T 明显增高；③家兔在惊厥前状态时 C S F 中 c A M P 增高程度与 A N T 呈正相关；④病儿惊厥后 C S F 中 c A M P 含量与 A N T 呈负相关。这些结果提示 A N T 可能是一个值得进一步研究的指标，但仍有其局限性，有待在今后的研究中比较各种不同类型癫痫病儿 C S F 中氨基酸介质和 A N T 改变

的异同点，观察抗癫痫药物对动物模型和癫痫患儿CSF中氨基酸介质、ANT的影响，进一步提高对氨基酸介质的认识，提高临床疗效。

致

谢

本文动物模型由北医药理教研组裴印权老师指导；GAMP测定由北医生物物理教研组贺师鹏老师指导；氨基酸分析由中国科学院生物物理研究所贺宝珍老师指导；统计学处理由北医统计学教研组李天霖教授和北医临床医学研究所凌瑞珠老师指导、审阅；本文并经北医生理教研组汤健老师指导，特此致谢。

本文实验室工作由北医临床医学研究所儿科研究室王素寰同志协助完成，特此致谢。

表1 癫痫组和对照组病儿的性别年龄和智力情况

	性 别		年 令		智力和意识情况		
	男	女	(1岁~6岁)	(6岁~15岁)	正常	不正常	
癫痫组							
(26例)	17	9	7	10	9	16	10
对照组							
(23例)	18	5	1	5	17	16	7

表2. 惊厥类型与病儿CSF中GABA含量的关系

	对照组	高热惊厥组	其他类型惊厥组
病例总数	15	5	14
GABA含量得2分 ($>0.878 \text{ nmol/ml}$)的病例数	12	5	0
得2分病例所占百分率 (%)	80%	100%	42.86%
P^{Δ}	对照组与高热惊厥组比 $P > 0.25$		$P > 0.25$
	对照组与其他类型惊厥组比 $P > 0.05$		$P > 0.05$
	高热惊厥组与其他类型惊厥组比 $P = 0.245$		

Δ 均按四格表直接概率法作统计学处理

表3. 家兔CSF中 E_{AA} , I_{AA} , ANI在惊厥前后的变化

	E_{AA}			I_{AA}			ANI		
	A	B	C*	A	B	C	A	B	C
M	1.0	10.14	17.63	1.0	6.20	2.66	1.0	3.86	19.51
ISD	—	8.18	26.98	—	6.65	5.96	—	2.48	17.84
P^{Δ}	$P > 0.05$			$P > 0.05$			A与B比 $P > 0.05$		
							B与C比 $P < 0.01$		
							A与C比 $P < 0.01$		

*“A”指对照值;“B”为“惊厥前状态”;“C”为“惊厥后”

Δ 均按两因素方差分析 χ^2 检验作统计学处理。

表4 惊厥至腰穿时间间隔与病儿CSF中AMT的关系

	对照组 (n=15)	≤24小时组 (n=8)	≥38小时组 (n=11)
M	3.88	35.10	1.85
±SD	6.32	36.87	1.74
p [△]	“对照组”与“≤24小时组”比		0.01 > P > 0.005
	“对照组”与“≥38小时组”比		0.5 > P > 0.2
	“≤24小时组”与“≥38小时组”比		0.02 > P > 0.01

△均按F检验作统计学处理

表5. 家兔CSF中CAMP, RCAMP在惊厥前后的变化

	CAMP含量			RCAMP		
	A	B	C*	A	B	C
M	17.88	27.13	25.0	1.0	1.62	1.41
±SD	6.27	8.36	13.90	—	0.45	0.57
p [△] (n=8)	P > 0.05			A与B比	0.05 > P > 0.01	
				B与C比	P > 0.05	
				A与C比	P > 0.05	

*“A”为对照值；“B”为“惊厥前状态”；“C”为“惊厥后”

△均按两因素方差分析q₁检验作统计学处理

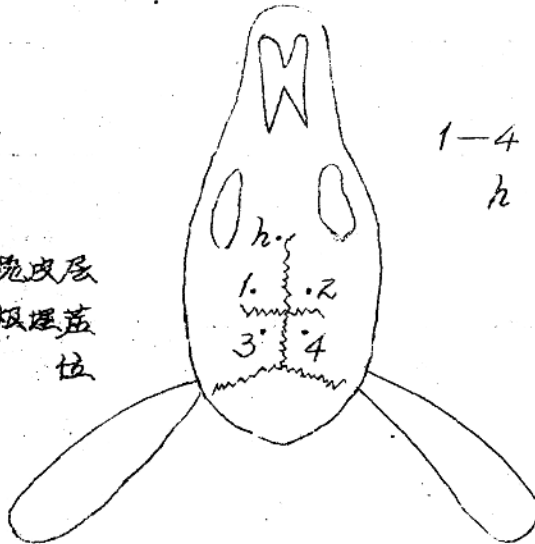
~14~

表6 癫痫组和对照组病儿CSF中CAMP含量(M±SD)的比较 (pmol/l)

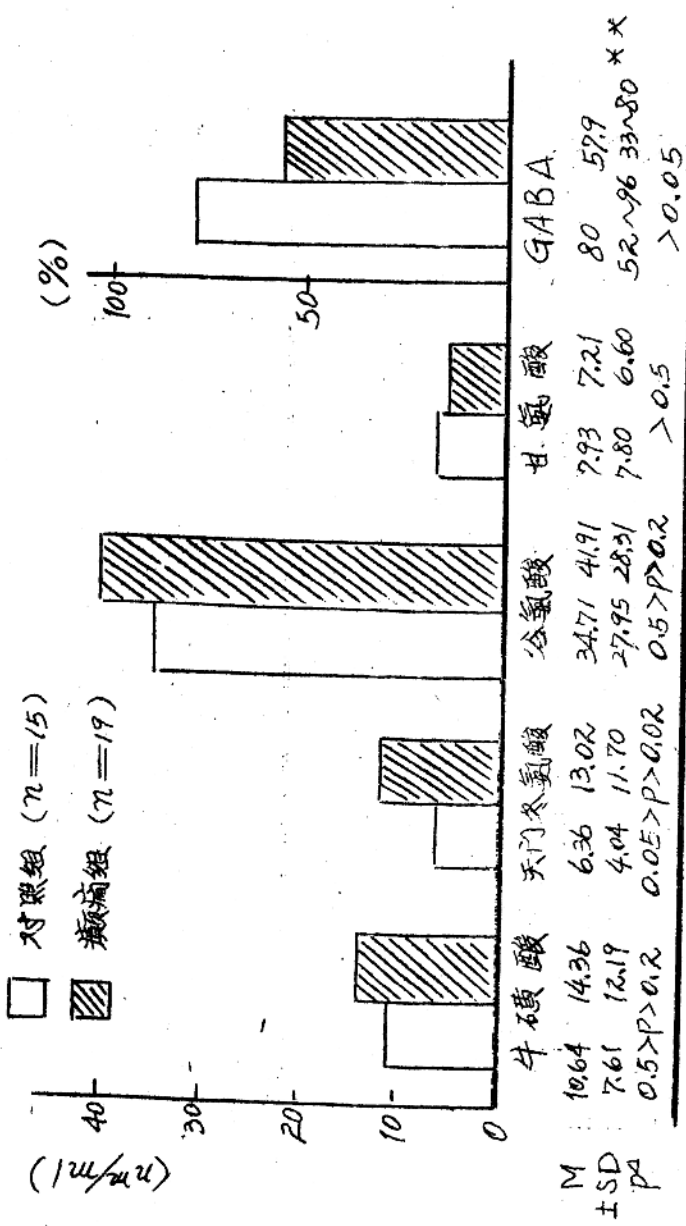
对照组 (n=23) 16.83 ± 7.95		癫痫组 (n=30) 17.67 ± 9.12	
P > 0.5			
智力低下儿 11.71 (n=7) ± 4.50	智力正常儿 19.31 (n=16) ± 6.49		
0.02 > P > 0.01			
智力低下病儿	智力正常儿 19.31 (n=16) ± 6.49	智力正常儿 21.79 (n=19) ± 8.34	智力低下病儿
0.5 > P > 0.2			
		惊厥后 ≤ 26.0 小时组 ± 5.90 (n=9)	惊厥后 ≥ 52.11 组 ± 8.63 (n=10)
0.05 > P > 0.02			
		高热惊厥组 27.0 (n=6) ± 5.7	其他类型惊厥组 19.38 (n=13) ± 8.46
0.1 > P > 0.05			

均按t检验作统计学处理

图1. 豚鼠皮层
电极埋置
部位



1-4 皮层电极
h 给药孔



* GABA以得分本所占百分比示 ** 95%可信限
 Δ除GABA用直接概率法, 其余均按t检验作统计学处理

图3 癫痫组与对照组患儿CSF氨基酸介质含量的比较