文章编号:1000-5404(2005)06-0521-04

论著

褪黑素对匹罗卡品致痫模型鼠行为改变的影响

张映琦,廖维宏,李应玉,龙在云,杨恒文 (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)

提 要:目的 探讨褪黑素在匹罗卡品致痫大鼠模型中的抗癫痫作用及其机制。**方法** 采用匹罗卡品癫痫模型,观察长期给予褪黑素对匹罗卡品致痫大鼠原发性癫痫反复发作、海马神经元丢失,苔癣纤维轴突发芽的影响。**结果** 给予褪黑素后匹罗卡品致痫大鼠原发性癫痫反复发作出现的潜伏期延长,发作程度和频率均降低($P<0.01$);给予褪黑素治疗的大鼠海马 CA1 区 Nissl 染色和 Timms 染色评分均明显低于未用褪黑素处理的致痫大鼠($P<0.01$)。**结论** 褪黑素能明显降低匹罗卡品致痫大鼠原发性癫痫反复发作的频率和程度,该作用可能与褪黑素对海马神经元损伤的保护及对苔癣纤维轴突发芽的抑制作用有关。

关键词:癫痫;海马;褪黑素;匹罗卡品;苔癣纤维轴突发芽
中图法分类号:R-332; R749.17; R977.1 **文献标识码**:A

Effects of melatonin on behavioral changes in epileptic rats induced by pilocarpine

ZHANG Ying-qi, LIAO Wei-hong, LI Ying-yu, LONG Zai-yun, YANG Heng-wen (Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the anticonvulsant activity of melatonin on pilocarpine-induced chronic temporal lobe epilepsy in rats. **Methods** Model of epilepsy induced by pilocarpine was employed. The effects of melatonin on pilocarpine-induced spontaneous recurrent epileptic seizure (SRS), cell loss, and intensity of supragranular mossy fiber sprouting (MFS) in the hippocampus were observed. **Results** The latency increased, but the frequency and degree of SRS decreased after treatment with melatonin ($P<0.01$). The grade of Nissl and Timms staining in hippocampus were lower in rats treated with melatonin than those without melatonin treatment ($P<0.01$). **Conclusion** Melatonin could decrease the frequency and degree of SRS, which may be associated with its protective effect on cell loss in hippocampus and its inhibitory effect on MFS.

Key words: epilepsy; hippocampus; melatonin; pilocarpine; mossy fiber sprouting

颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy, TLE)是人类最常见的癫痫类型,其主要的临床特征是逐渐进展的原发性癫痫反复发作(spontaneous recurrent epileptic seizure, SRS)。TLE 通常在早期经历了如脑外伤,癫痫持续状态,发热惊厥等损伤,并在经过数月至数年的潜伏期后,才发生 SRS。匹罗卡品(pilocarpine, PILO)是 M 型胆碱能受体激动剂,它所诱导的癫痫动物模型是国际上公认的用于观察 TLE 的进展和神经病理的理想动物模型,它最初经历的剧烈损伤是由癫痫持续状态(status epilepticus, SE)产生,同人类 TLE 类似,SE 可引起海马神经元丢失,苔癣纤维轴突发芽(mossy fiber sprouting, MFS)和 SRS[1]。

褪黑素(melatonin, MEL)化学名为 N-乙酰-5-甲氧色胺,是一种主要是由松果体合成和分泌的激素。近年来的研究发现 MEL 在多种癫痫动物模型中具有抗惊厥作用,如戊四氮、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、具有最大电休克和电点燃杏仁核等引起的癫痫发作[2,3]。但这些研究均只局限于 MEL 在急性癫痫模型中的抗惊厥属性,长期给予 MEL 是否能有效的预防或减轻 SRS 尚无文献报道。因此,在本研究中我们选用 PILO 建立慢性 TLE 模型,观察了 MEL 对 SRS 的影响及其与 PILO 所致海马神经元损伤、MFS 的关系。

1 材料与方法

1.1 动物的选择和分组

健康雄性 Wistar 大鼠 50 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),体质量 200~250 g,采用随机数字

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:2004-07-20;修回日期:2004-11-08

表法将大鼠分为3组，即对照组10只，PILO组20只，PILO+MEL组20只。所有动物在笼子里饲养，保持在7:00/19:00，亮/暗周期；室温22～24 ℃，自由进食和水。

1.2 主要试剂

PILO，MEL为Sigma公司产品；其它试剂均为国产分析纯级。

1.3 给药方法

MEL注射前用2%吐温80生理盐水配制，PILO注射前用生理盐水配制，注射容量为4 ml/kg；PILO+MEL组予MEL 10 mg/kg静脉注射，30 min后予PILO 300 mg/kg静脉注射。PILO组和PILO+MEL组出现SE 1 h后用安定（4 mg/kg，肌肉注射）以降低这一时期的高病死率，此后PILO+MEL组予MEL 10 mg/kg静脉注射1/d。对照组大鼠接受2%吐温80生理盐水肌肉注射，1次/d代替MEL。凡SE持续时间未达预定要求或中途死亡者从本实验中排除。

1.4 大鼠行为观察

参照Racine[4]的（0～Ⅴ级）评价标准，0级：无任何发作迹象；Ⅰ级：凝视，头面部轻微颤动；Ⅱ级：点头或湿狗样抖动（wet dog shakes，WDS）；Ⅲ级：前肢局限性惊厥；Ⅳ级：具有后肢站立的全身强直性惊厥；Ⅴ级：具有站立伴摔倒的全身强直-阵挛性发作。达到Ⅲ级改变以上者定为癫痫发作。

SRS行为监测：依据文献[5]报道首次SRS在PILO腹腔注射后4～44 d出现，且在亮/暗周期中的白昼时相中发作频率显著升高。因此我们选择对PILO所致慢性癫痫组从SE后4 d开始，每天8:00～17:00监测SRS 9 h，连续监测约8周。

1.5 Timms组化法评价MFS

PILO慢性癫痫组大鼠于SE后8周，腹腔注射1%戊巴比妥钠40 mg/kg，麻醉成功后立即暴露心脏，经左心室插管至升主动脉，快速灌注PBS 250 ml，接着灌注硫化钠（5.85 g NaS+5.95 g NaH_2PO_4+500 ml蒸馏水）100～150 ml，随后灌注4%多聚甲醛-PB液500 ml（0.1 mol/L，pH 7.4）进行内固定，然后取含海马结构的2～3 mm厚脑块（冠状切面），25%蔗糖液中过夜，次日，取背侧海马做连续冠状冰冻切片，片厚40 μm，参照Sloviter等的方法行Timms染色。内分子层苔癣纤维发芽密度的评分标准为0～3分：0分，颗粒上层无染色；1分，颗粒上层有轻度染色；2分，颗粒上层有中度染色；3分，颗粒上层强染色。

1.6 Nissl染色评价海马神经元损伤

每张切片锥体细胞层内神经元缺失的评分标准为0～3分：0分，无病变；1分，CA1/2或CA3轻微病变；2分，CA1/2或CA3区细胞缺失但保存有一些正常的细胞结构和成分；3分，正常细胞结构和组成被完全破坏。

1.7 统计学分析

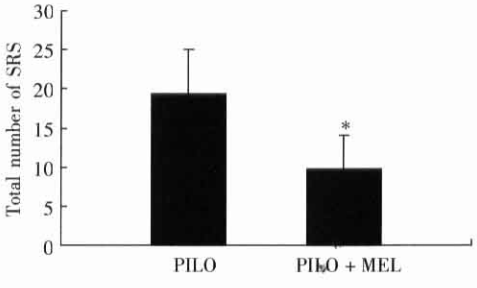
采用SPSS 10.0统计软件。行为观察结果中SRS发作潜伏期、数量及Timms染色、Nissl染色评分均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 t 检验。

2 结果

2.1 MEL对PILO致痫大鼠行为学的影响

20只PILO组大鼠中3只对PILO无反应，既未出现急性SE也未出现SRS，5只在行为监测期间死亡，在给予安定控制SE前，所有大鼠均不能自主停止抽搐。12只存活致痫大鼠连续监测约8周以观察SRS发生频率，时间和级别。在经过3～5 d的毒性阶段（对外界环境无反应及运动不能）后，存活大鼠行为逐渐恢复正常。首次SRS在PILO给药后4～40 d内出现，其平均"潜伏期"为（14.42±11.43）d。在"潜伏期"内未观察到任何痫性发作迹象。慢性阶段SRS以每周每只大鼠2～5次发作频率出现。SRS发作级别从Ⅰ级（轻微的面部抽搐等）至Ⅴ级（全面性强直-阵挛发作）在观察期中均出现。7只大鼠（7/12）在20～41 d后，其SRS发作频率逐渐增加，高发期持续10～40 d。

20只PILO+MEL组大鼠中4只对PILO无反应，3只在行为监测期间死亡，与PILO组类似，在给予安定控制SE前，所有大鼠均不能自主停止抽搐，经过3～5 d的毒性阶段后，存活大鼠行为逐渐恢复正常。PILO+MEL组大鼠首次SRS在PILO给药后5～46 d内出现，其平均"潜伏期"为（17.08±12.26）d与PILO组比较潜伏期延长，但差异无显著性（$P>0.05$）。慢性阶段SRS以每周每只大鼠1～3次发作频率出现。SRS发作级别多为Ⅰ～Ⅲ级，在整个观察期间未出现高发期，以较恒定的低频率出现SRS。两组SRS数量比较差异有显著性（$P<0.01$）。对照组大鼠无上述行为改变。见图1。



*：$P<0.01$，*vs* PILO

图1 MEL对PILO致痫大鼠SRS发作数量的影响

Fig 1 Total number of SRS in PILO and PILO+MEL groups from post-SE 4 to 60 d (8-week experiment)

2.2 MEL对PILO致痫大鼠海马神经元损伤和MFS的影响

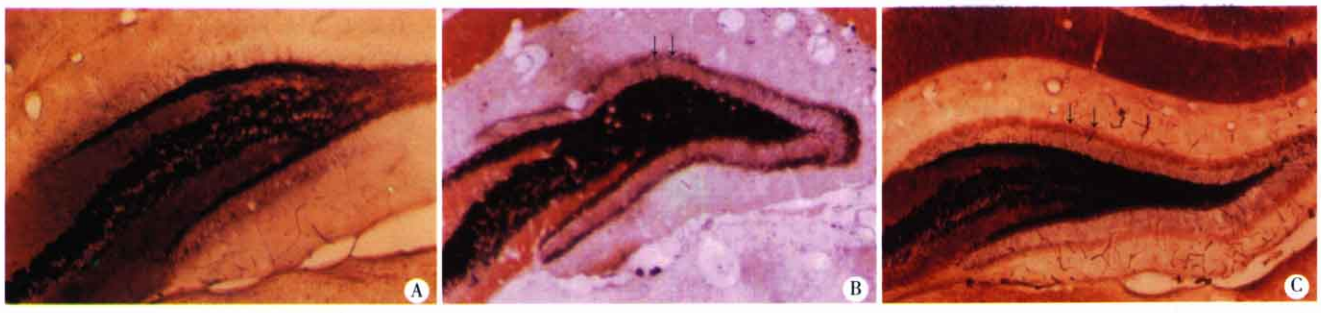
在监测期结束后，对PILO组大鼠进行脑形态学分析，发现海马、丘脑、杏仁体、隔核、嗅结节、梨状皮质、内嗅皮质、新皮质及黑质等部位出现典型的癫痫相关损伤，尤其以海马CA1区的锥体细胞层损伤明显，主要表现为神经元的丢失。PILO+MEL组大鼠虽也表现出上述部位的损伤，但损伤程度较PILO组轻，两组海马CA1区Nissl染色评分比较，差异有显著性（$P<0.01$），说明MEL对PILO致痫大鼠海马神经元损伤具有明显保护作用。除海马神经元丢失外，颗粒上内分子层MFS也是人类颞叶癫痫的一个重要病理特征。在8周的监测期结束后，我们发现PILO组大鼠内分子层Timms染色强度比对照组明显增强，PILO+MEL组大鼠Timms染色强度虽然也比对照组增强，但比PILO组弱，两组Timms染色评分比较差异有显著性（$P<0.01$）。见图2、3，表1。



A: Control group; B: PILO group; C: PILO + MEL group; Cellular loss in CA1 with complete disruption of normal cellular architecture and components (arrow in B); Cellular loss in CA1 with some preservation of cellular architecture and some normal cellular components (arrow in C); GCL: Granule cell layer; HIL: Hilus

图 2　MEL 对 PILO 诱导大鼠海马神经元丢失的影响（Nissl 染色 × 40）

Fig 2　Effects of MEL on PILO induced cell loss in hippocampus of rats（Nissl staining × 40）



A: The lowest Timm score of MFS intensity for control group; B: The highest Timm score of MFS intensity for PILO group; C: The score obtained in the PILO + MEL group was lower than that in the PILO group

图 3　MEL 对 PILO 致痫大鼠海马 MFS 的影响（Timms 染色 × 100）

Fig 3　Effects of MEL on PILO induced MFS in hippocampus of rats（Timms staining × 100）

表 1　MEL 对 PILO 诱导的海马细胞丢失和 MFS 的影响（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Effects of melatonin on pilocarpine-induced cell loss and intensity of supragranular MFS in the hippocampus（$\bar{x} \pm s$）

Group	n	Cell loss in CA1	Intensity of supragranular MFS
PILO	12	2.68 ± 0.38	2.71 ± 0.32
PILO + MEL	13	1.99 ± 0.48 **	1.95 ± 0.29 *

** : $P < 0.01$, *vs* PILO

3　讨论

已有研究证实 MEL 对 PILO 所致急性癫痫大鼠有一定的抗惊厥作用，并且 MEL 的这种作用呈剂量、时间依赖性，MEL 在 17:00 给药时功效最大[6]。那么长期使用 MEL 是否能有效的预防 SRS 的发生呢？为了回答这个问题，我们观察并记录了长期给予 MEL 后，对 PILO 所致慢性 TLE 大鼠 SRS 发生的潜伏期、发生频率和海马结构病理改变的影响。结果显示 MEL 虽然对抗 PILO 所致急性癫痫发作的作用比较微弱，但长期使用 MEL 可延长 SRS 发生的潜伏期，并可明显减少 SRS 的数量，提示 MEL 在 PILO 所致慢性 TLE 模型中具有抗癫痫作用。另外，研究还表明 MEL 对 PILO 所致海马神经元损伤具有明显保护作用，对 MFS 具有明显的抑制作用。

以往的研究所提出的一个重要假设是海马神经元丢失和 MFS 可能在 TLE 的产生和发展中起着关键性的作用[7,8]。这个假设得到许多证据的支持，如：有证据表明在实验性癫痫动物模型和人类 TLE 中，海马主要细胞的损伤通常与记忆缺损相关，而齿状回门区细胞的缺失也许是惊厥阈值降低的原因。切除部分有神经元损伤的海马，可使许多患者惊厥发作的频率明显减少或消失。而齿状回颗粒细胞轴突——苔癣纤维，在实验性癫痫动物模型和人类颞叶癫痫中均经历了网络重建。Parent 对点燃大鼠海马片的研究证明内分子层中的确存在新的多突触电流，与完全点燃动物模型组织学上存在的 MFS 相关。在海人酸致痫模型中发现，点燃前如果海人酸已经导致苔癣纤维突触重组，则很容易发生点燃；若用秋水仙碱破坏颗粒细胞和苔癣纤维，则不易发生点燃。提示 MFS 与内分子层的颗粒细胞树突建立了突触联系即突触重建，形成了兴奋性

突触环路,它可能导致痫性发作易感性增加。

结合文献报道,本实验的结果提示 MEL 对 PILO 致痫大鼠 SRS 的减弱作用可能与其对海马神经元损伤的保护及对 MFS 的抑制作用有关。但 MEL 又是通过何种机制起到神经保护和抑制 MFS 的作用,目前还不是很清楚,将在今后的研究中进一步探索。

总之,本研究首次发现长期使用 MEL 可明显减少 PILO 所致慢性 TLE 大鼠 SRS 的发生频率并减弱 SRS 的程度,这一发现将对预防其它情况所致的癫痫发作(如脑炎,脑卒中,脑外伤等)具有重要的意义。

参考文献:

[1] Bonan C D, Walz R, Pereira G S, *et al*. Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy[J]. Epilepsy Res, 2000, 39(3): 229 - 238.

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

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

[4] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. Ⅱ. Motor seizure[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 281 - 294.

[5] Scharfman H E, Sollas A L, Goodman J H. Spontaneous recurrent seizures after pilocarpine-induced status epilepticus activate calbindin-immunoreactive hilar cells of the rat dentate gyrus[J]. Neuroscience, 2002, 111(1): 71 - 81.

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

[7] Brandt C, Glien M, Potschka H, *et al*. Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats[J]. Epilepsy Res, 2003, 55(1-2): 83 - 103.

[8] Longo B, Covolan L, Chadi G, *et al*. Sprouting of mossy fibers and the vacating of postsynaptic targets in the inner molecular layer of the dentate gyrus[J]. Exp Neurol, 2003, 181(1): 57 - 67.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)06-0524-01

36例颅内蛛网膜囊肿的诊断和治疗

Diagnosis and treatment of 36 cases of intracranial arachnoid cyst

王玉玉,刘同华,李 刚,李 毅,犹春跃,肖顺武,张学军 (遵义医学院附属医院神经外科,遵义 563003)

颅内蛛网膜囊肿(intracranial arachnoid cyst, IAC)是脑实质外囊性良性占位性病变,如能早期诊断和采取适当的外科治疗,预后良好。总结我院1992年1月至2003年6月治疗的36例,就诊断和治疗问题讨论如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

本组36例,男24例,女12例,<4岁20例,4~7岁11例,8~18岁4例,>19岁1例;囊肿部位:中颅凹27例,前颅凹6例,后颅凹3例,大脑凸面2例;病程1个月至6年,平均(1.3±2.5)年,8例有外伤史,其中7例为偶然发现,2例有脑膜炎病史。

1.2 临床表现及体征

36例有颅内高压症状者30例,癫痫发作8例,局限性颅骨隆起7例,肢体轻瘫2例,共济失调1例,18例无明显阳性体征。

1.3 辅助检查

本组病例均行CT检查,其中8例行MRI证实。表现为囊肿形态不一,边界清楚,与脑脊液密度基本一致,局部可见脑组织受压萎缩,周围脑组织无水肿。8例癫痫症状的EEG检查示局限性棘慢波。

1.4 手术方式和病理学检查

29例行囊肿及病灶切除术+脑池、蛛网膜下腔交通术,3例行多处软膜下横纤维切断术,2例在神经内窥镜下行囊肿壁大部切除+脑池(脑室)交通术,2例无临床症状随诊观察。术后囊液成份理化特性与脑脊液(CSF)相同,4例囊液呈淡黄色,蛋白含量增高;囊壁病理学检查为纤维结缔组织。

2 结果

随访3个月至1年,本组病例手术效果良好,复查CT示30例囊肿明显缩小或消失,34例临床症状明显改善,5例癫痫症状得以控制,3例服药量减少,2例失访。

3 讨论

大多数作者认为IAC是一种颅内占位性良性病变,儿童多见,约占颅内占位性病变的1%。可发生在幕上和幕下,以幕上

(下转528页)

作者简介:王玉玉(1970-),男,贵州省织金县人,主治医师,主要从事神经外科方面的研究。电话:13007872690

收稿日期:2005-02-05;修回日期:2005-03-25