论著

文章编号:1000-5404(2007)10-0872-04

红藻氨酸快速点燃大鼠癫痫模型的建立及其海马神经发生

马玉新[1],阴金波[1],范晓棠[2],徐海伟[3],安 宁[1],万子兵[3],李志方[3],刘国龙[3],张永海[3],杨 辉[1] (第三军医大学:[1]新桥医院神经外科,重庆 400037,[2]基础医学部神经生物学教研室,[3]基础医学部生理学教研室、重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 建立红藻氨酸(kainite acid, KA)快速点燃癫痫模型,观察行为学、脑电图(electroencephalogrom, EEG)、海马病理改变及其神经发生。**方法** 立体定向连续注射KA于侧脑室致痫。视频监测、深部EEG、Nissl染色、BrdU免疫组化染色。**结果** 大鼠行为学及深部EEG呈急性期、静止期和慢性期3个阶段性变化。根据Racine行为学分级法,Ⅴ级8只,Ⅳ级12只,Ⅲ级2只,Ⅱ级2只;深部电极描记出起始于海马并向杏仁核、额叶皮质等传导癫痫样波;病理变化提示长期癫痫发作会导致海马锥体细胞逐渐变性、坏死、丢失。BrdU标记细胞主要分布于海马齿状回,并在癫痫发作后显著增多($P<0.01$)。**结论** KA快速点燃大鼠模型为模拟颞叶癫痫的理想动模型,癫痫发作后神经发生显著增高。

关键词: 红藻氨酸;颞叶癫痫;立体定向;神经发生

中图法分类号: R-332;R338.26;R749.17 **文献标识码:** A

Establishment of kainic acid induced temporal lobe epilepsy in rat and study of its neurogenesis

MA Yu-xin[1], YIN Jin-bo[1], FAN Xiao-tang[2], XU Hai-wei[3], AN Ning[1], WAN Zi-bing[3], LI Zhi-fang[3], LIU Guo-long[3], ZHANG Yong-hai[3], YANG Hui[1] ([1]Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Department of Neurobiology, [3]Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish kainite quickly induced emporal epilepsy rat model. **Methods** Kainic acid was continuously injected into right lateral ventricle of rat *via* stereotactic technique to make an epileptic focus. The behavior of the rats was recorded by a video camera. EEG signal was recorded by an EEG polygraph. The pathologic changes were observed with Nissl and BrdU staining. **Results** The changes in behavior and EEG experienced three phases, which were acute, silent and chronic. According to Racine's scale, 8 rats were classified as type Ⅴ, 12 as type Ⅳ, 2 as type Ⅲ and the other 2 as type Ⅱ. The spike waves originated from hippocampus and spread to amygdala and frontal lobe. Pathologic changes showed that prolonged seizures induced pyramid cell loss in the hippocampus. BrdU labeled cells mainly localized in dentate gyrus($P<0.01$). **Conclusion** The kainic acid induced rat model is an ideal animal model to simulate human temporal lobe epilepsy. Development of epilepsy is accompanied by enhanced neurogenesis in the hippocampus.

Kep words: kainic acid; temporal lobe epilepsy; stereotactic technique; neurogenesis

建立动物癫痫模型用于人类癫痫发病机制的研究以获取相关信息是目前最流行的方法。最常用的动物模型如最大电休克模型、戊四氮模型、士的宁模型等,严格说来只是痫性发作模型而不是癫痫模型。点燃模型的实验成功,提供了迄今为止最理想的人类癫痫模型。但常规的点燃模型需较长时间才能建立,不利于目前的科研需要,因此,如何在短期内建立理想、稳定的点燃模型,更好地应用于癫痫发病机制的探索,进行快速点燃模型的研究就显得十分必要。目前关于采用红藻氨酸(kainic acid, KA)建立快速点燃模型的研究,鲜有报道。鉴此,本实验采用立体定向技术KA作为化学致痉剂。在大鼠侧脑室连续注射亚惊厥剂量的KA以诱发癫痫发作建立快速点燃模型,对大鼠颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy, TLE)的建立方法及行为学、脑电活动、海马病理改变和神经发生进行研究,现

基金项目: 国家自然科学基金(30500148, 30571770)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500148, 30571770)

作者简介: 马玉新(1963-),男,江苏省南通市人,博士研究生,副主任医师,主要从事癫痫的基础与临床方面的研究。电话:(023)68752253-276,E-mail: 07myx323@mail.tmmu.com.cn

通讯作者: 杨 辉,电话:(023)68755610,E-mail: huiyang64@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-12-04;**修回日期:** 2006-12-30

报告如下。

1　材料与方法

1.1　材料

Sprague-Dawley(SD) 雄性 2 月龄大鼠 32 只，体质量 200 ~ 250 g，由本校实验动物中心提供。饲养在 12 h 昼夜循环光照恒温的动物室，自由进食和水至少 1 周。实验设 TLE 模型组(实验组，$n=24$)与对照组($n=8$)。KA 为 Sigma 公司产品，用生理盐水配成 0.4 μg/μl 溶液，用前 2 h 新鲜配制；立体定向仪为江湾Ⅰ型 C 动物立体定向仪；深部电极描记采用由成都仪器厂生产的 RM6240BD 型多道生理信号采集处理系统记录并分析。5-溴脱氧尿核苷(5-bromo-2'-deoxyuridine，BrdU)及小鼠抗 BrdU 抗体均为 Sigma 公司产品。SABC 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒为武汉博士德公司产品。

组织切片制作：BrdU 溶于无菌生理盐水中，终浓度为 10 mg/ml。大鼠处死前 2 d 进行腹腔注射，100 mg/kg，2 次/d、间隔 4 h，注射 2 d 共 4 次，最后 1 次 BrdU 注射后 24 h 处死动物。常规麻醉、灌注、固定、断头取脑、冰冻切片，片厚 40 μm。待 BrdU 免疫组化染色用。

1.2　方法

1.2.1　建立 TLE 模型　　大鼠麻醉后，固定在立体定向仪上，选择右侧侧脑室为靶点，具体定位参考包新民等[1]编著的《大鼠脑立体定位图谱》，置入不锈钢导管(外径 0.7 mm，内径 0.4 mm)，常规肌注 3 d 青霉素，以牙托粉 + 502 胶固定于颅骨上，术后 7 d 开始试验。进行脑内注射时，将清醒大鼠固定于敞式装置上，在埋植的导管内插入注射内管，其下端超出套管 0.5 mm，另一端经塑料管与微量进样器连接，将 KA 1 μl (浓度为 0.4 μg/μl)注射入侧脑室内，注射时间不少于 10 min。每天 1 次，连续 5 d，每次给药均在 8:00 ~ 10:00 进行。停止给药后 1 周，再以 KA 相同剂量测试癫痫发作情况。对照组在右侧侧脑室内注射相同容量的生理盐水，其他均与实验组相同。做预实验时，曾注入 20 g/L 滂胺天蓝(pontamine sky blue)，核对给药部位。

1.2.2　脑电描记　　在埋植不锈钢导管的同时，双侧置入深部电极针，其靶点：海马 CA_3 区、杏仁核内的中心点、前额叶皮质。通过计算机对脑电活动和大鼠行为学表现连续记录 2 h。注药后 6、12 h、1 d、1、2、3、4、6、8、12 周，每次抓取 2 只大鼠，对海马、杏仁核、前额叶皮质进行脑电描记。在对照组以相同的方法进行脑电描记。电极位置在实验后均经组织学证实无误。

1.2.3　行为学观察　　视频摄像机监视大鼠行为学变化，根据 Racine 分级[2]，大鼠 TLE 发作分为 6 级，即 0、Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ级。出现Ⅳ级或Ⅴ级痫性行为也称为充分点燃。充分点燃后，在停止给药后 4 周，再用 KA 相同剂量测试，以观察大鼠是否仍保持其癫痫点燃状态。

1.2.4　病理学检查　　在连续注射 KA 停止后 1、2、3、4、8、12 周每次抓取 3 只有癫痫发作的大鼠，经麻醉灌注后断头取脑，Nissl 染色后在显微镜下观察海马的病理变化。

1.2.5　BrdU 免疫组化染色　　按操作说明书进行，DAB 显色。显色后常规脱水、透明和封片。替代实验，以正常山羊血清封闭液和 0.01 mol/L PBS 代替一抗孵育切片。

1.3　统计学处理

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，运用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　动物行为学表现

实验组大鼠在反复小剂量 KA 注射的过程中，逐渐出现凝视、点头、面部及头部抽搐、全身肌阵挛、跌倒，大、小便失禁及流涎，最终发生全身强直-阵挛性发作、癫痫持续状态。每次注射 KA 后 2 ~ 4 min 内，大鼠出现凝视、不动，呈阵发性。6 ~ 8 min 内偶尔出现面部肌肉和前肢的抽动，以注药对侧肢体为主，向左侧翻滚转圈。10 ~ 13 min 内面部肌肉抽搐增多时间延长，有湿狗样抖动等动作。1 ~ 6 h 内有眨眼、刻板点头、立须、咀嚼、流涎、竖尾巴等自动症出现，前肢抽动由单侧为主发展到双侧，并且还有全身肌阵挛，最终发展为全身性强直-阵挛性发作，大、小便失禁，随后出现站立跌倒等，约 5 ~ 10 min 发作 1 次，每次持续 30 s 至 2 min。6 ~ 12 h 内上述发作次数减少，程度减轻，主要为双侧前肢和面部肌肉抽搐、咀嚼、流涎。12 ~ 24 h 内，每 1 ~ 2 小时可观察到单侧肢体和面部肌肉抽搐或点头等动作，每次发作数秒。第 6 天开始，停止给药，每天仍可观察到流涎、身体旋转、站立跌倒、间断性地四肢强直抽搐，每次持续8 s至 2 min。以后每天能观察到 1 ~ 2 次的肢体和面部肌肉抽搐，点头，双下肢的站立或跌倒等发作类型。停止给药后 1 周，再用 KA 0.4 μg/μl 测试(测试了 16 只)，有 75.0% (12/16) 获Ⅳ级或Ⅴ级痫性行为。当 KA 连续注射 3 d 时已有 50% (12/24)大鼠获Ⅳ级或Ⅴ级痫性发作。连续注射 5 d 时，已有 62.5% (15/24) 大鼠获Ⅳ级或Ⅴ级痫性发作。总点燃率为 75.0% (18/24)。整个点燃过程中，大鼠死亡数为 12.5% (3/24)，均因癫痫持续状态而死亡。

停止注射 KA 后 1 周癫痫发作基本消失，大鼠精神萎靡、进食活动少，消瘦，无癫痫的自发发作表现。但在 3 ~ 4 周后，大鼠又逐渐出现癫痫的反复自发发作，如面部肌肉，头颈部抽搐，单侧前肢阵挛，很快进展至全身强直-阵挛发作，一般持续时间小于 1 min，发作均可自行终止。对照组大鼠无痫性发作。

KA 充分点燃的大鼠，有反复自发性的抽搐，其抽搐程度分级明晰，全身强直-阵挛发作十分显著，痫性行为与 EEG 异常放电同步。Ⅰ级以上痫性行为皆伴 EEG 棘波，尖波或棘慢综合波放电。为检验点燃的持久性，在停止给药后 4 周，再用 KA 测试，所有点燃大鼠仍保持其癫痫点燃状态，而且为高分级(Ⅳ级或Ⅴ级)。

2.2　Racine 分级

实验组大鼠中Ⅴ级 8 只，Ⅳ级 12 只，Ⅲ级 2 只，Ⅱ级 2 只；对照组大鼠均为 0 级。

2.3　动物脑电活动改变

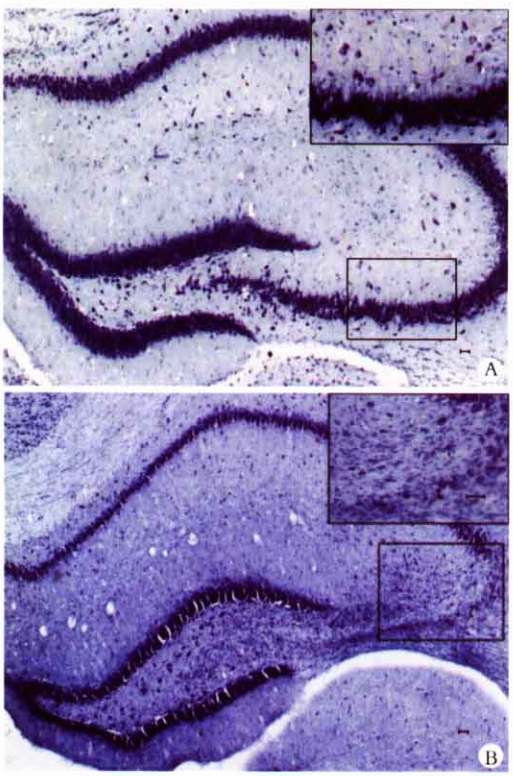
2.3.1　对照组大鼠的脑电活动　　对照组大鼠额叶皮质、海马、杏仁核脑电图显示频率为 6 ~ 10 Hz 的以 α 节律为主的低幅(小于 200 μV)脑电波，额叶皮质波幅 > 海马波幅 > 杏仁核的波幅，没有描记出癫痫波。

2.3.2　实验组大鼠的脑电活动　　注射 KA 3 ~ 5 min 后，动物出现凝视时，注药侧海马额叶皮质杏仁核描记出单个的小尖

波，对侧海马额叶皮质杏仁核叶也描记出单个的小尖波，波幅比注药侧低。10 min 后，注药侧的海马额叶皮质杏仁核描记出单个散在单个棘波。30 min 后，注药侧的散在棘波增多，波幅增高，伴有阵发性及丛集性棘波、慢波、棘-慢综合波，海马的棘波先于额叶皮质和杏仁核，波幅高于后二者；对侧海马额叶皮质杏仁核也有棘波慢波棘-慢综合波等，但波幅较注药侧低。注射红藻氨酸 1～3 h 内在双侧海马、杏仁核、额叶皮质均能描记出高幅的棘波棘-慢综合波等，当有癫痫发作时呈持续性丛集性棘波，注药侧波幅高于对侧。6 h 后双侧海马额叶皮质杏仁核的棘波较前减少，当有癫痫发作时又会出现阵发性的高幅棘波。1 d 后注药侧海马额叶皮质杏仁核描记出逐渐减少的棘波和短阵的棘-慢综合波，对侧描记出散在的尖波和棘波。1 周后上述痫样波明显减少，2 周后基本消失，只在注药侧海马还能描记到散在的棘波；3～4 周后上述部位的棘波又开始增多，痫样发作时出现丛集性棘波或棘-慢综合波，但同步性越来越差。

2.4 病理改变

实验组大鼠 KA 注射 1 周后，注药侧海马 CA_3 区内锥体细胞变性肿胀；2 周后锥体细胞崩解坏死；4 周后锥体细胞几乎消失，同时出现局部胶质细胞增生，8 周后对侧海马也出现上述病理变化，但是锥体细胞变性坏死较注药侧轻。对照组大鼠无上述改变。见图 1。

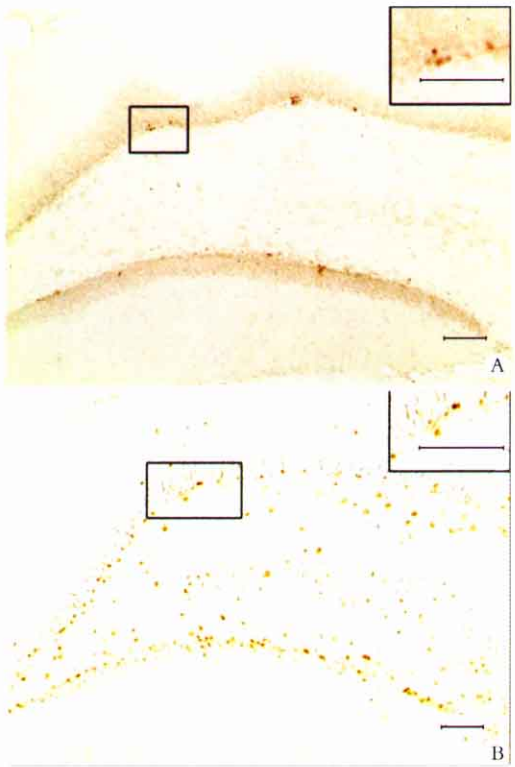


A：对照组；B：实验组

图 1 海马 CA3 区病理观察 （Nissl，标尺为 50 μm）

2.5 BrdU 免疫组化表达

实验组大鼠 KA 注射 3 周后，注药侧海马齿状回（DG）区内可见 BrdU 阳性细胞较对照组明显增多（$P<0.01$）；对侧海马 DG 区也出现 BrdU 阳性细胞，较注药侧要少，但比对照组增多。BrdU 免疫反应阳性细胞为胞核着色，基本呈圆形或卵圆形，以单个细胞多见，主要位于海马齿回颗粒下区与齿回门区的边界，门区亦有少量分布。对照组大鼠海马 DG 区仅极少量散在分布。见图 2。



A：对照组；B：实验组

图 2 海马 DG 区 BrdU 免疫组化 （SABC，标尺为 50 μm）

3 讨论

建立癫痫动物模型是研究人类癫痫发病机制和提高治疗效果的关键。大鼠是建立模型较为常用的动物。目前，点燃方法已成为制作慢性癫痫模型最常用的方法之一。点燃发作行为学表现、病理变化及 EEG 特征与人类复杂部分性发作相似[3]，模型稳定持久，且不造成病理损伤灶等优点[4]，是目前国际公认研究人类慢性癫痫的理想模型[5,6]。

KA 结构类似谷氨酸，进入脑内后与海马齿状回颗粒细胞末梢上的 KA 受体结合，增加突触末梢膜的通透性，使得颗粒细胞中的谷氨酸大量释放而重吸收减少，从而引起突触后神经元海马 CA_3 区锥体细胞过度兴奋，产生兴奋性突触后电流，最后导致 CA_3 区的锥体细胞减少、消失，从而诱发 TLE[7]。

本实验结果显示，大鼠 TLE 的痫性发作和脑电图

(EEG)呈现典型的 3 期不同的行为学表现：急性期(注射 KA 后 1 周内)、静止期(注射 KA 后 1 周至 1 个月)、慢性期(注射 KA 1 个月后)3 个阶段变化，其痫性发作形式与人类 TLE 发作时的过程相似；癫痫发作与痫样波基本同步，起始于海马并向额叶皮质杏仁核等传导的痫样波是 TLE 模型的神经电生理基础；病理变化提示长期癫痫发作会导致海马锥体细胞逐渐变性、坏死、缺失，类似于人类 TLE 的海马硬化。所以，用立体定向方法建立的 TLE 模型类似于人类的 TLE，是研究人类 TLE 发病机制、电生理特征等的理想模型。为检验这种动物模型的持久性，在点燃成功停止给药后 4 周，再用相同剂量的 KA 测试，所有点燃大鼠仍保持其癫痫点燃状态，而且为高分级(Ⅳ级或Ⅴ级)。说明该模型一旦被点燃，具有永久性特征。

本研究建模成功率高，证明本实验方法可靠；具有如下的特点：①本模型在发作潜时、痫性发作的行为反应、病理变化、脑电表现、致痫效应的稳定性和永久性等与 KA 经腹腔或皮下给药途径建立的模型相似，但建模周期较常规模型明显缩短；②本模型大鼠 TLE 的发作和脑电图表现可以从急性期、静止期、慢性期 3 个时期进行区别；③本方法所需 KA 量较小；④定位准确：通过深部电极，可直接得到相关部位的脑电信息，便于排除外界因素对脑电的干扰，利用计算机软件将脑电信号与视频图像相结合，得到类似于临床视频脑电监测的效果；⑤本模型痫样波的起源、同步和非同步较典型、明确，与人类 TLE 发作时脑电图的变化相似。大鼠 KA 快速点燃模型的成功建立对进一步观察 TLE 的发病机制和筛选抗癫痫药物提供了理想的动物模型。

在人类，至今仍一致公认颞叶是癫痫的好发部位，且极易成为药物难治性癫痫[8]。但只要病例选择适当，致痫灶定位精确，手术切除的疗效是肯定的，且复发率低，并发症也少[8]。由于癫痫是各种原因所致的异常神经元放电的临床综合征，脑电图尤其是视频脑电图在癫痫诊断和术前致痫灶的发现和定位上起着至关重要的作用[9]。因此采用深部电极通过对 TLE 动物模型的脑电活动进行描记分析有助于提高对 TLE 发作过程中神经电生理活动的认识。

在本癫痫模型中，癫痫诱导的海马锥体细胞损伤与癫痫患者所观察到的细胞损伤相似[10]，而这种病理改变构成了癫痫慢性自发性发作的结构基础。

近年来，BrdU 一直被作为细胞分裂的标记用于研究神经发生。本实验结果显示，实验组大鼠在 KA 注射 3 周后，注药侧海马 DG 区内可见 BrdU 阳性细胞较对照组明显增多($P<0.01$)，对侧海马 DG 区也出现 BrdU 阳性细胞，较注药侧要少，但比对照组增多，提示在癫痫的发生、发展过程中，伴随着细胞增殖现象。即有神经发生增加。新生神经元与成熟的神经元相比，具有不同的结构和功能特性。成年新生神经元具有某些不成熟的特性，而正是由于这种不成熟特性使这些新生神经元可影响海马的功能，其对海马生理特性的影响比成熟的神经元更明显：这些不成熟的神经元能够迅速形成新的突触，因而可影响海马内新的联系形成。我们推测，机体一方面为替换海马已变性、坏死、缺失的神经元，以补充并维持其正常的生理功能；另一方面，成年新生的神经元对突触可塑性的调节、异常的通路与癫痫的形成具有重要作用。探讨成年海马神经发生的调控因素，将对癫痫发病机制的研究开辟新的领域，进一步提高癫痫患者的治疗效果。

参考文献：

[1] 包新民，舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京：人民卫生出版社，1991：36.

[2] Racine R J, Steingart M, McIntyre D C. Development of kindling-prone and kindling-resistant rats: selective breeding and electrophysiological studies[J]. Epilepsy Res, 1999, 35(3): 183 - 195.

[3] Wolf O T, Dyakin V, Patel A, *et al*. Volumetric structural magnetic resonance imaging (MRI) of the rat hippocampus following kainic acid (KA) treatment[J]. Brain Res, 2002, 934(2): 87 - 96.

[4] Fisher R S. Animal models of the epilepsies[J]. Brain Res Brain Res Rev, 1989, 14(3): 245 - 278.

[5] Katzir H, Mendoza D, Mathern G W. Effect of theophylline and trimethobenzamide when given during kainate-induced status epilepticus: an improved histopathologic rat model of human hippocampal sclerosis [J]. Epilepsia, 2000, 41(11): 1390 - 1399.

[6] Kogure S, Kitayama M, Matsuda Y. Simultaneous kindling of the bilateral hippocampi: an advanced model for epilepsy research[J]. Epilepsia, 2000, 41(8): 929 - 932.

[7] Vorobyov V, Schibaev N, Kovalev G, *et al*. Effects of neurotransmitter agonists on electrocortical activity in the rat kainate model of temporal lobe epilepsy and the modulatory action of basic fibroblast growth factor [J]. Brain Res, 2005, 1051(1 - 2): 123 - 136.

[8] 刘宗惠. 癫痫外科治疗进展[J]. 中华神经外科杂志，2000，16(增刊)：67 - 70.

[9] 安　宁，杨　辉，张可成，等. 颞叶癫痫的手术治疗效果分析[J]. 第三军医大学学报，2003，25(20)：1824 - 1826.

[10] Le-Duigou C, Wittner L, Danglot L, *et al*. Effects of focal injection of kainic acid into the mouse hippocampus *in vitro* and *ex vivo*[J]. J Physiol, 2005, 569(Pt 3): 833 - 847.

(编辑　汪勤俭)