维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0063-03

氯化锂-重复低剂量匹罗卡品致大鼠癫痫模型制作

张小东,黄 敏,许 可,王顺先,刘 新,余巨明

(川北医学院附属医院神经内科,南充 637000)

【摘 要】目的:建立氯化锂-重复低剂量匹罗卡品致痫大鼠模型。方法:雄性成年 SD 大鼠 173 只,随机分为对照组、非药物干预组和药物干预组。氯化锂 3mEq/kg 腹腔注射(IP),19h 后给予低剂量匹罗卡品 10mg/kg,每隔 30min 1 次,重复 2~4 次。观察大鼠行为、脑电、模型成功率、死亡率、自发性癫痫发作及其潜伏期和发作的严重程度。结果:氯化锂-重复低剂量匹罗卡品大鼠癫痫模型在匹罗卡品 1~4 剂后发生癫痫持续状态,痫性发作距离注射时间平均为 16min,成功率 73%,匹罗卡品用量平均 25.9mg/kg,持续 90min 被终止者死亡率低于 10%。自发性癫痫发作平均每天 2.4~5.7 次,潜伏期平均 40 天。发作程度均达到Ⅲ级以上的痫性发作,绝大多数为Ⅳ/Ⅴ级,脑电类似人类颞叶癫痫。对照组大鼠均为 0 级发作。结论:氯化锂-重复低剂量匹罗卡品诱导的大鼠癫痫模型具有制作方便、致痫成功率高和动物死亡率低特点,同人类癫痫持续状态和颞叶癫痫有相似的行为和脑电图改变。

【关键词】氯化锂;重复低剂量匹罗卡品;癫痫模型

【中国图书分类法分类号】R743.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-06-01

Establishment of rat model of epilepsy induced by lithium-repeated low-dose pilocarpine

ZHANG Xiao-dong, et al

(*Department of Neurology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College*)

【ABbstract】*Objective*: To estabhish rat model of epilepsy induced by the Lithium-repeated low-dose pilocarpine. *Methods*: A totol of 173SD male rats were divided into the normal control group, seizure-induced group and Chloral Hydrate group randomly. Lithium chloride was injected at a dose of 3 mEq/kg intraperitoneally (ip) 19h prior to the administration of pilocarpine. Rats were injected with pilocarpine, 10mg/kg ip, every 30min, and this injection was repeated for 2~4 times. We then determined the rat activity, EEG, the percentage of rats exhibiting status epilepticus (SE), the mortality rate, the proportion of rats developing spontaneous seizures, the latency for the first spontaneous motor seizure, and the frequency of the spontaneous recurrent seizures. *Results*: The lithium-repeated low-dose pilocarpine resulted in SE after 1~4 injections; the average period between seizure and injection was 16min and the success rate was 73%. The mean dose of pilocarpine needed to induce SE was 25.9mg/kg. When SE was interrupted after 90min, mortality rate was below 10%, Spontaneous seizure occurred 2.4~5.7 times a day averagely, and average latency to the first spontaneous seizure was approximately 40days. All seizure incidence was over level Ⅲ and most were level Ⅳ/Ⅴ; EEG was similar to that of human temporal epilepsy; seizure of rats in control group was level 0. *Conclusion*: Lithium-repeated low-dose pilocarpine induced rats model of epilepsy is characterized by easy building, with high successful rate and lower mortality of the animal. This model has mimic features of human status epilepticus and temporal epilepsy in seizure behavior and electroencephalographic findings.

【Key words】 Lithium; Repeated low-dose pilocarpine; Epileptic model

癫痫是神经系统疾病中仅次于脑卒中的第二大常见病,颞叶癫痫是成年期最常见的难治性癫痫,部分病因及发病机制至今未明。由于伦理问题,很难用人脑进行研究,近几十年来制作了大量的癫痫模型来模拟人类癫痫进行研究,各个模型均有其优缺点。本实验参照 Glien 等[1]于 2001 年报道的氯化锂-重复低剂量匹鲁卡品大鼠癫痫模型,进行了

作者介绍:张小东(1972-),男,讲师,硕士,
主要研究方向:神经电生理及脑血管病研究。

基金项目:四川省教育厅科研项目重点项目(2005A085)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

部分改良及探讨,现汇报如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

取体重 190～260g 雄性健康 SD(Sprague-Dawley)大白鼠 173 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),随机分为对照组(N),诱发成功后干预 A 组(90min 给药),干预 B 组(30min 给药)和 C 组(60min 给药),共 4 组,每小组分别为 3、60、50、60 只。

1.2 氯化锂-重复低剂量匹罗卡品致痫大鼠模型模型的制作

参照 Glien 等文献[1],具体步骤如下:A、B、C 各组均先 IP 3mEq/kg 氯化锂,19h 后再给予匹罗卡品 10mg/kg IP,每隔 30min 1 次,重复 2～4 次,抽搐行为评价采用经 Becker 等修改后的 Racine 分级标准[2],即 0 级:无反应;Ⅰ级:耳面部抽搐;Ⅱ级:肌阵挛,但无直立位;Ⅲ级:肌阵挛,伴直立位;Ⅳ级:全身强直阵挛发作;Ⅴ级:全身强直阵挛发作,并失去体位控制。A 组大鼠匹鲁卡品急性致痫达Ⅲ级以上并持续 90min 及以上时 IP 3.5%水合氯醛(1ml/100g 鼠重),B 组大鼠在出现Ⅲ级以上发作并持续 30min 时 IP 3.5%水合氯醛;C 组大鼠在出现Ⅲ级以上发作,并持续 60min 时 IP 3.5%水合氯醛;N 组大鼠腹腔注射相同剂量的生理盐水代替匹鲁卡品,其余处理同 A 组。A、B、C 组大鼠诱发成功后观察 120d。注射匹鲁卡品后不出现急性Ⅲ级以上癫痫持续发作(即癫痫持续状态)的大鼠不纳入本研究。

1.3 行为学观察

急性致痫后,从第 4d 起,每日由接受过训练的实验人员轮流连续 8h 观察大鼠的行为学表现,注意有无自发性癫痫发作及其潜伏期和发作的严重程度。

1.4 脑电图描记

分为急性期和慢性期颅内脑电图,用 5 根电极,左右两侧颅内额叶皮质下及海马各 1 根,鼻根额窦处插入 1 根为参考电极,在二道生理记录议上描记脑电活动,1%戊巴比妥(45mg/kg)麻醉下采集脑电图,每只累计记录时间不得少于 12 h,每次连续记录时间不少于 30min,白天和晚间不同时间点均记录。

1.5 统计学分析

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数行 ANOVA 分析,各分组均数间两两比较行 q 检验。

2 结 果

2.1 氯化锂-重复低剂量匹鲁卡品大鼠模型

SD 大鼠月龄平均 2.4 月(2～4 月)体重平均 230g(190～260g),匹鲁卡品用量范围 10~40mg/kg,平均为 25.9mg/kg,实验总诱发成功率为 73%(127/173),分别 1 剂成功率占 9%,2 剂成功率占 45%,3 剂成功率占 32%,4 剂成功率占 14%。50%的大鼠仅用 2 剂便发展为癫痫持续状态。观察到 4 剂之后(5、6、7、8 剂)出现癫痫持续状态 4 只,个别 10～16 剂也未成功,因此癫痫的诱发成功率接近于全和无。SE 在 120~180min 被中断,死亡率为 46%,120min 被中断,死亡率为 40%;90min 被中断,死亡率为 9.7%,低于 10%,与 N 组、B 组、C 组比较有显著差异($P<0.01$),而 N 组、B 组、C 组 3 组间比较无差异。诱发急性癫痫发作时行为方面没有差别,SE 开始时间短平均为 16min,达Ⅳ/Ⅴ级。

2.2 自发性癫痫活动及其行为变化

癫痫持续 60min 者几乎所有大鼠发展为自发性癫痫,反复发作的占 83%,潜伏期 11～69d,平均潜伏期约 33d,癫痫发作通常为面肌部分性发作Ⅰ/Ⅱ级发展为全面性发作,达Ⅳ/Ⅴ级,通常持续 30s(平均为 27s,8～85s),发作程度绝大多数不严重,仅少数严重发作而死亡,占 6.8%。自发性癫痫发生率通常达 0～22 次/周,平均 3.8 次/周,仅 1 只大鼠每天发作 1 次。30min、60min、90min 及以上和 SE 诱发总成功率见表 1。部分自发性癫痫大鼠出现少有行为变化,如攻击行为、频繁活动、极度兴奋等。

2.3 脑电图

对照组大鼠皮层电极 EEG 无异常,98%(125 只占 122 只)模型鼠额叶皮质及海马 EEG 示频繁自发的棘波、尖波、棘慢波等发放。B 组脑电异常,C 组明显异常,A 组严重异常。

3 讨 论

表 1 氯化锂-重复低剂量匹鲁卡品模型鼠行为、潜伏期、自发癫痫和脑电情况

持续时间	诱发成功率	死亡率	潜伏期	自发癫痫发生率	自发癫痫频率	脑电图
30min	72%(36/50)	5.6%(2/36)	39d(12~73)	52%(18/34)	3.1(0~18)	异常
60min	73%(44/60)	6.8%(3/44)	33d(11~69)	83%(34/41)	3.8(0~22)	明显异常
90min	78%(31/40)	9.7%(3/31)	42d(8~97)	86%(24/28)	3.3(0~21)	明显异常
>90min	70%(14/20)	43%(6/14)	40d(30~56)	100%(8/8)	5.9(0~12)	严重异常

维普资讯 http://www.cqvip.com

理想的颞叶癫痫动物模型[3]应具备行为学方面类似近中央颞叶硬化的自发性复杂部分发作或继发全面性发作,反复抽搐,而且脑电图、病理学特征及病理生理方面类似颞叶癫痫。氯化锂－重复低剂量匹罗卡品诱导的癫痫发作类似颞叶癫痫,可用于人类颞叶癫痫发病机制的研究。

本试验在预试验时参照 Glien 等文献[1],选择安定终止癫痫的发作,发现绝大多数大鼠连用几剂、在几十分钟内均难中止癫痫的发作,导致癫痫发作时间远大于设计的发作时间,而且因为癫痫发作时间长,短时间内用了大量的安定,导致造模之后的大鼠死亡率很高。后改用水合氯醛中止癫痫的发作,结果 100%能够在 IP 后 5min 内中止发作,之后死亡率也低,自发性癫痫的发作频率也较高,很适合该癫痫模型的制作。

改良后的氯化锂－重复低剂量匹罗卡品诱导的癫痫持续 90min 被中止的死亡率低于 10%,匹罗卡品平均用量为 25.9mg/kg,低于 Goodman 等[4]发现的氯化锂－匹罗卡品诱导的癫痫持续时间达 90min 被中止的死亡率占 45%。而且诱发成功率接近,与有关文献[1]报道一致。根据目前的资料,氯化锂－重复低剂量匹罗卡品诱导的癫痫动物模型死亡率最低,成功率相当高,其行为、脑电、病理类似人类颞叶癫痫,是一种研究颞叶癫痫的理想动物模型。

该实验观察到癫痫持续状态进入自发性痫性发作的潜伏期为 4~42d,平均约 40d。Lemos 和Cavalheiro 等[5]发现癫痫状态持续 30min 以上将会产生慢性癫痫状态,大剂量匹罗卡品诱导的癫痫状态持续 60min 者,100%产生反复自发性癫痫;而 40mg/kg 匹罗卡品诱导的癫痫持续 2h 者,占 91%,持续 1h 者占 25%,持续 30min 者占 0,与本实验差别较大,可能跟海马苔藓纤维通路重组突触重塑损伤程度有关。有趣的是,目前的研究中 80%～100%的大鼠 SE 将会发展为慢性癫痫,跟持续时间长短似乎没有明显的关系。例如:持续 60min 后 83%的大鼠发展为慢性癫痫,而文献[5]仅占 25%,差别原因可能跟遗传和性别有关。而且大剂量地西泮和戊巴比妥中止癫痫持续状态,短期内戊巴比妥对慢性癫痫的形成有阻碍作用,本实验仅用水合氯醛中止(因其镇静催眠作用较强而止惊较弱),但结果与文献[1]仅用安定中止 SE 研究中产生慢性癫痫占 50%这一结果相比较高一些,且实验癫痫模型死亡率低,慢性癫痫的产生在持续 60min 以下也并未减少,达 52%。

文献[5]报道 SE 持续 2h 或 6h 者,自发性癫痫发作频率为 2.3～2.8 次/周,而本实验发现 SE 持续1h 者自发性癫痫发作频率平均 3.8 次/周。自发性癫痫发作绝大多数开始为部分发作发展为全面性发作,达Ⅳ/Ⅴ级。总之,匹罗卡品重复仅 2～4 次的氯化锂－重复低剂量匹罗卡品诱导的大鼠模型,与重复海藻仁酸诱导的癫痫模型比较,主要是次数少、间隙时间短、易诱发成功、死亡率低。

该改良癫痫模型研制成功,为下一步观察活化素/抑制素亚基的表达及其同苔藓纤维发芽和生长相关蛋白(GAP-43)表达间的关系奠定了基础,有望阐明活化素/抑制素在苔藓纤维发芽和癫痫形成过程中的作用及其可能机制。

参 考 文 献

[1] Glien M,Brandt C,Potschka H,et al. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy[J]. Epilepsy Res,2001;46(1):111-119.

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

[3] 江澄川,俞丽云,洪 震. 颞叶癫痫[M]. 第 1 版.上海:复旦大学出版社,2003;32(3):255-310.

[4] Goodman,JH. Experimental models of status epilepticus [M]. CRC Press:Boca Raton,1998.95-102.

[5] Lemos T,Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpineinduced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats[J]. Exp Brain Res,1995;102(3):423-428.

(责任编辑:冉明会)