

不同首剂匹罗卡品制作颞叶癫痫大鼠模型的研究*

宋延民¹ 杨国帅² 龙莉莉^{3△} 洪秀琴¹ 邓景贵¹

(1 湖南省老年医院 神经内科 湖南 长沙 410016 2 中南大学湘雅医学院附属海口医院 神经内科 海南 海口 570208 ;

3 中南大学 湘雅医院 神经内科 湖南 长沙 410008)

摘要 目的 研究不同首次剂量匹罗卡品对氯化锂-匹罗卡品颞叶癫痫大鼠模型诱发成功率、死亡率的影响。方法:90只SD大鼠随机分为三组,每组首次使用匹罗卡品剂量:A组10mg/kg、B组20mg/kg、C组30mg/kg,随后采用多次注射10mg/kg匹罗卡品,比较3组癫痫持续状态诱发成功率、死亡率的差异。结果:A、B、C组癫痫持续状态诱发成功率分别为66.7%、90%、93.3%。其中A组与B组之间诱发成功率差异有统计学意义, $P < 0.05$;C组与B组之间相比,差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。三组死亡率分别为20%、23.3%、57.1%,其中A组与B组之间差异无统计学意义, $P > 0.05$,C组与其它两组相比较差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。结论:首次剂量20mg匹罗卡品,然后10mg多次反复注射,癫痫持续状态诱发成功率高、死亡率低,是一种理想的颞叶癫痫模型。

关键词 匹罗卡品 氯化锂 颞叶癫痫模型

中图分类号 Q95-3, R742.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 17-3217-04

Using Different Initial Doses of Pilocarpine to Establish the Temporal Lobe Epilepsy Model*

SONG Yan-min¹, YANG Guo-shua², LONG Li-li^{3△}, HONG Xiu-qin¹, DENG Jing-gui¹

(1 Department of Neurology, Hunan Province Geriatric Hospital Changsha, 410016;

2 Department of Neurology, Haikou Hospital of Xiangya Medical School of Central South University, 570208;

3 Department of Neurology, Xiangya Hospital of Central South University Changsha, 410008, China)

ABSTRACT Objective: We use different initial doses of pilocarpine after Lithium injections to establish the temporal lobe epilepsy models, observe the effects of different initial dose of pilocarpine on percentage of rats being induced successfully and the mortality rate. **Methods:** 90 SD rats were randomly divided into 3 groups, different initial doses of pilocarpine were used in every group: A group with 10mg/kg; B group with 20mg/kg and C group with 30mg/kg, followed later by repeated application of low dose pilocarpine 10 mg/kg, and observe the difference in percentage of rats exhibiting SE and the mortality rate between A, B and C. **Results:** Percentage of rats exhibiting SE of A, B and C group were 66.7%, 90%, 93.3% respectively. There was significant difference between A and B ($P < 0.05$), but no difference between C and B ($P > 0.05$). Mortality rate of A, B and C were 20%, 23.3%, 57.1% respectively; there was no difference between group A and group B ($P > 0.05$), but group C showed difference in mortality rate with the other two groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** It is a good way to establish the temporal lobe epilepsy model with 20 mg initial dose of pilocarpine followed later by repeated application of 10 mg/kg pilocarpine, which could induce more rats exhibiting SE successfully and had lower mortality rate.

Key words: Pilocarpine; Lithium; Temporal lobe epilepsy

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R742.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 17-3217-04

前言

颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy)是最常见的难治性癫痫,其病因和发病机制复杂,一直是癫痫治疗的难点及热点^[1,2]。氯化锂-匹罗卡品持续状态后模型在行为、EEG、病理以及药理特性上与人类颞叶癫痫非常类似,并且具有制作简单、诱发迅速、表现典型、痫性发作容易确认、轴突出芽、突触重建明显等优点,因此近年来一直被认为是一个理想的颞叶癫痫模型而被用于癫痫发病机制和抗癫痫药物的研究^[3,4]。但传统的制作方法癫痫持续状态(status epilepticus, SE)诱发率低,死亡率高,不利

于用于癫痫模型的研究^[5,6]。因此本研究拟在注射氯化锂后,使用不同首剂量的匹罗卡品制作颞叶癫痫大鼠模型,比较大鼠的行为学特征、SE诱发成功率、死亡率,以寻找最佳的颞叶癫痫大鼠模型制作策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

6~8周龄健康雄性SD大鼠,体重(250±20)g,90只,由中南大学湘雅医学院实验动物学部提供,在室温18~25℃、相对湿度(50~60)%、人工12小时昼/夜循环照明环境中用全价营

* 基金项目 卫生部属医院临床学科重点项目(2007-353) 中南大学自由探索计划青年教师助推专项(201012200171)

作者简介 宋延民,男,硕士,主治医师,主要研究方向 神经系统疾病的临床与康复研究

△通讯作者 龙莉莉, E-mail: longlili1982@yahoo.cn

(收稿日期 2011-11-24 接受日期 2011-12-28)

养饲料分笼饲养,大鼠能自由摄食及饮水。每日定时清洗笼舍。90 只大鼠随机将分为三组:A 组 (n=30)、B 组 (n=30) 和 C 组 (n=30)。

1.2 癫痫动物模型制作及处理

大鼠腹腔注射氯化锂(LiCl,美国 Sigma 公司) 3mEq/kg(约 125mg/kg),18~24 小时后给予匹罗卡品(PILO,美国 Boehringer Mannheim 公司)腹腔注射,匹罗卡品的首剂量分别为 A 组 10mg/kg、B 组 20mg/kg、C 组 30mg/kg,若无病性发作或病性发作未达到 Racine^[7]制定的病性发作标准 III~V 级者,每隔 30 分钟可重复腹腔注射匹罗卡品 10mg/kg/次,直至出现病性发作。发作程度按 Racine 制定的标准进行分级,达到 III~V 级的大鼠进入癫痫持续状态(status epilepticus,SE),归于致病成功组;未达到 III~V 级的大鼠继续注射 PILO 直至次数达到 6 次,其间达 III 级以上的动物也归于致病成功组;6 次后仍未达到标准的归于致病不成功组。致病成功后从第一次大发作开始 SE 50 分钟以上者,以 10%水合氯醛 3ml/kg 终止。急性诱发 SE 后,每天观察动物行为,观察时间为 8AM~8PM。

1.3 脑电图描记

三组在急性期(2h)、静止期(7d)分别进行脑电图描记。记录方法为:大鼠麻醉后,用橡皮套套住大鼠的四肢,固定于木板上,再用细麻绳套住大鼠门齿以固定头部。参考导联描记,一根电极插入颞部头皮下,另一根电极插入对侧乳突皮下,在日本光电 5210 型脑电图机上描记脑电活动。

1.4 灌注取材

1.4.1 取材 三组均于急性期(2h)、静止期(7d)常规用 10%水合氯醛(剂量 3.5ml/kg)麻醉动物。沿肋弓剪开腹部皮肤、肌肉、腹膜,剪断肋骨,剪开膈肌,此时小心勿刺中心脏,剪至第二肋骨,轻分离心脏与胸壁,用止血钳翻开肋骨固定于鼠嘴皮肤,再用镊子分离心脏前筋膜,暴露主动脉弓;左手食指、拇指夹住心脏,用 12 号磨钝针头从心尖部刺入心脏后,轻握针寻找主动脉出口,切忌用力穿破心脏,进入主动脉后夹上动脉夹。同时灌注生理盐水和剪开右心耳,灌注生理盐水约 15 分钟,即 400mL 左右,见右心耳流水变清亮、肝脏变苍白色,随后灌注 4℃4%的多聚甲醛,即可见四肢颤动,灌注先快后慢(约 150mL+150mL),必要时可夹住腹主动脉,并让鼠头稍低,以保证鼠脑充分灌注,表现为鼠前后肢、尾、颈僵硬,约灌注 300~400mL 后,停止灌注。断头取脑,沿枕骨下剪断鼠头部,然后剪开头皮、尽量分离,用大剪刀剪开鼠枕骨,再用止血钳撬开头骨,完全暴露脑组织,小心勿损及脑组织,轻用止血钳插入颅底分离出脑组织,大脑

置 4℃4%多聚甲醛固定过夜后,移入 30%蔗糖置 4℃冰箱。

1.4.2 冰冻切片及贴片 脑组织在 30%蔗糖中沉底后,将冰冻切片机温度调至 -18℃~-20℃,将沉底的脑组织修材,固定于基座上,自中脑向额叶行 20μm 冠状连续切片,隔三取一,每只动物取四套,收集有海马的脑片于 0.01mol/l 磷酸盐缓冲液(PBS)中。将脑片贴片于用多聚赖氨酸处理过的载玻片上,切片充分晾干后,-80℃冰箱保存备用。

1.4.3 尼氏染色 切片自 -80℃冰箱拿出后晾干,蒸馏水漂洗,0.1%焦油紫室温下染色 10min,镜下观察,如染色过深,将切片浸入 95%乙醇中分色,镜下监视至满意效果。自来水洗,脱水(70%乙醇 3min、95%乙醇 3min、100%乙醇 1min×3 次),二甲苯透明(5min×2 次),中性树脂封片。镜下观察海马区域的病理改变。

1.5 统计学处理

各组 SE 诱发成功率、死亡率的比较,应用 SPSS 11.5 统计学软件 Fisher's exact test 进行检验。

2 结果

2.1 行为学改变

用氯化锂腹腔注射后,大鼠行为活动无变化。在匹罗卡品注射 5~30 分钟后,大鼠开始呈现外周胆碱能反应:立毛、流涎、颤抖及流眼泪,同时或先后出现刻板行为:凝视不动、咀嚼、吸鼻或探索行为、湿狗样震颤、反复头颈上仰,随后出现眨眼、面肌痉挛、点头,最后出现反复双侧前肢阵挛、伴直立、跌倒或翻转,部分动物出现四肢强直一阵挛发作。开始发作尚不频繁,随着时间延长,发作频率增高。进入 SE 状态后,部分大鼠因抽搐致死(其中 A 组 4 只、B 组 6 只、C 组 13 只),其余大鼠在 24~72 小时后进入静止期,静止期大部分大鼠行为正常,少数抽搐严重的大鼠进入静止期后活动迟钝,不能主动进食进水,数天后衰竭死亡(其中 A 组 0 只、B 组 1 只、C 组 3 只)。存活的大鼠在 15~45 天后均出现自发性发作,发作呈强直-阵挛性发作,持续时间短暂,约半分钟至 1 分钟,发作次数从 1 天数次至数天 1 次不等,慢性期内的大鼠无死亡。故 ABC 组诱发成功率分别为 66.7%、90%、93.3% 死亡率分别为 20%、23.3%、57.1%。

三组诱发成功率比较:A 组与 B 组, $P < 0.05$,有统计学意义;C 组与 B 组, $P > 0.05$,无显著统计学意义;死亡率比较:A 组与 B 组, $P > 0.05$,无显著统计学意义;C 组与 B 组, $P < 0.05$,有统计学意义。以上提示,与 A、C 两组比较,B 组诱发成功率更高,死亡率更低(详见表 1)。

表 1 动物模型制作情况统计

Table 1 Statistics of the temporal lobe epilepsy model establishment

	Rats exhibiting SE	Achievement ratio	Mortality rate
A group	20	(20/30) 66.7%*	(4/20)20.0%
B group	27	(27/30) 90.0%	(7/27)23.3%
C group	28	(28/30) 93.3%	(16/28)57.1%*

Note: Compared with B group * $P < 0.05$.

2.2 脑电图改变

三组诱发 SE 成功的大鼠脑电图均可描记出癫痫波发作。

2.3 颞叶癫痫的病理改变

三组大鼠匹罗卡品致 SE 后海马齿状回内区和 CA1、CA3

区均有不同程度的神经元减少。CA1 区和 CA3 区锥体细胞层神经元排列紊乱,可见部分神经元形态不完整,细胞肿胀或皱缩、轮廓模糊、界限不清,细胞间距加大,胞浆尼氏小体减少。齿状回颗粒细胞边界不整齐、排列松散、增宽,呈现颗粒细胞发散改变。SE 后 7d,CA 区域及齿状回均可见胶质细胞增生(见图 2,3,4)。

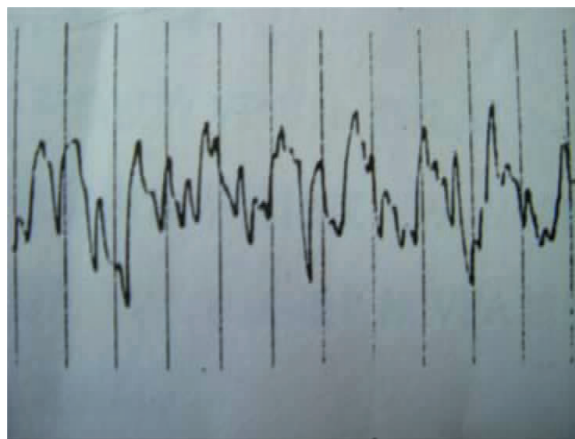


图 1 SE 2h 后脑电图

Fig.1 Electroencephalogram of 2h after SE

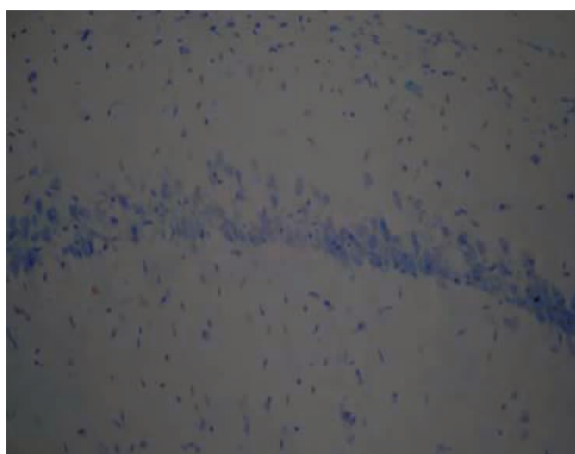


图 2 SE 后 7d 大鼠海马 CA1 区
尼氏染色× 100

Fig.2 Nissl staining in the hippocampus of 7days after SE

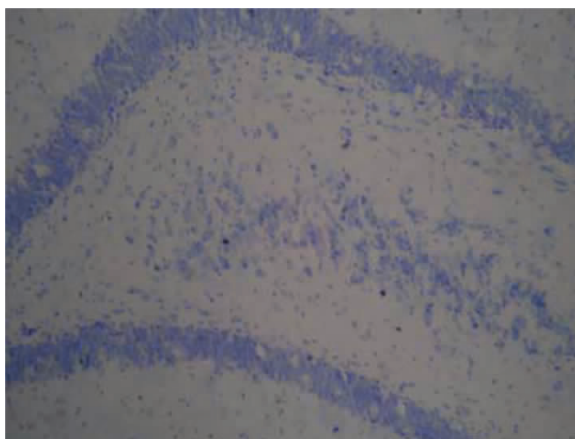


图 3 SE 后 7d 大鼠海马门区
尼氏染色× 100

Fig.3 Nissl staining in the hilus of 7days after SE

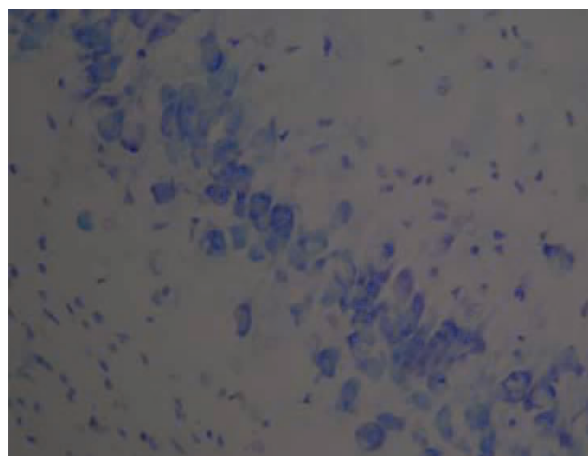


图 4 SE 后 7d 大鼠海马 CA3 区
尼氏染色× 200

Fig.4 Nissl staining in the CA3 subfield of 7days after SE

3 讨论

根据氯化锂 - 匹罗卡品致病大鼠模型的行为过程和 EEG 改变可分为三个时期:1) 急性期,即大鼠被诱发全身强直 - 阵挛发作持续状态后 24 小时内;2) 静止期,又称为潜伏期,大鼠不出现痫性发作,EEG 和行为基本正常,约 4~44 天;3) 慢性自发作期,静止期后反复出现类似于人类复杂部分性发作的自发作^[3]。该模型具有以下优点:1) 制作简单,诱发迅速;2) 有效致病剂量与致死剂量之间的跨度大,安全性好,存活率高;3) 表现典型,致病过程清晰,痫性发作的分级容易确认;4) 如急性期 SE 持续时间超过 30 分钟以上,则在慢性期可出现稳定的自发性痫性发作,轴突出芽、突触重建明显,但其病理变化的严重性与 SE 持续时间无关^[8-10]。此模型不利因素是:如致病剂量过大,持续状态不易控制,在制作过程中可能出现大量动物死亡,但如剂量过低,模型诱发成功率又不高。因此,致病剂量的选择是模型制作成功与否的关键。

氯化锂 - 匹罗卡品的致病机制尚未完全明了,匹罗卡品是 M 型乙酰胆碱受体 (MAChRs) 激动剂,主要是通过激动 MAChRs 实现的。MAChRs 同 G-蛋白耦联,G-蛋白将受体的刺激信号传递给磷脂酶 C,磷脂酶 C 水解膜磷脂 4,5 二磷酸 - 磷脂酰肌醇,使其分解为两种第二信使:三磷酸肌醇 (IP3) 和二脂酰甘油 (DG)。这两种物质可以刺激神经元引起痫性放电,并且在过量的情况下也可以引起神经元的损伤。匹罗卡品可能就是通过这个机制引起持续性全身强直 - 阵挛发作^[11]。氯化锂对匹罗卡品起易化作用,它能通过抑制肌醇单磷酸酶来阻断磷酸 - 磷脂酰肌醇循环中 IP3 降解成肌醇,增加了 IP3 的含量,从而与匹罗卡品相协同,减少了 PILO 的用量,降低了致病动物的死亡率^[12]。

以海马神经元变性缺失和神经胶质增生为表现的海马硬化是颞叶癫痫的标志性病理改变^[13],约 60%~70% 的颞叶癫痫患者伴有海马硬化^[14]。本研究中匹罗卡品首剂量不同的三组大鼠模型 SE 发作时都能描记到癫痫放电波;尼氏染色结果均可显示,致病后 CA1、CA3 区锥体细胞和门区神经元大量减少,齿状回颗粒细胞部分减少,可见胶质细胞增生。以上改变均类

似于人类颞叶癫痫海马硬化的病理特征。证明三组不同首剂的匹罗卡品制作的颞叶癫痫模型是成功的。

最初的匹罗卡品致病动物模型单用匹罗卡品,其有效致病量为 320~400mg/kg^[15],动物死亡率高;后改为在用匹罗卡品前 18 小时予以 LiCl 预处理,匹罗卡品的有效致病剂量减少至 30 mg/kg,死亡率仍接近 50%^[16]。Gliem^[17]等在氯化锂预处理的基础上改用多次小剂量 (10 mg/kg) 腹腔注射 PILO 后,死亡率明显下降 (21.1%),但其癫痫诱发率不高。本研究中 B 组我们 PILO 的首次剂量应用 20 mg/kg,后仍多次小剂量给予 PILO 10mg/kg,结果显示癫痫诱发成功率大大提高,为 93.3%,较传统方法 (诱发成功率为 63%) 有明显提高,死亡率与传统方法无明显差别,为 23.3%。C 组 PILO 的首次剂量为 30 mg/kg,后仍多次小剂量给予 PILO 10 mg/kg,结果显示癫痫诱发成功率为 93.3%,但死亡率较高,为 57.1%。通过统计学分析,诱发成功率三组诱发成功率比较:A 组与 B 组有统计学意义,C 组与 B 组无显著统计学意义;死亡率比较:A 组与 B 组无显著统计学意义,C 组与 B 组有统计学意义。总之,多次小剂量的 PILO 注射方法减少了传统一次性大剂量 PILO 给药对大鼠的全身毒性作用,减少了死亡率,而相较其他首剂量,PILO 首次剂量为 20mg/kg 的,模型癫痫诱发成功率更高,死亡率更低,仍有稳定的慢性期痫性自发作率。因此匹罗卡品首剂为 20mg/kg 的多次小剂量改良法明显优于传统方法并优于其它首剂量给药法,制作的颞叶癫痫模型更加理想。此经验值得广泛推广。

参考文献(References)

- [1] Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2007, 7(4):348-354
- [2] Berg AT. Defining intractable epilepsy[J]. Adv Neurol, 2006, 97:5-10
- [3] Klitgaard H, Matagne A, Vanneste-Goemaere J, et al. Pilocarpine-induced epileptogenesis in the rat: impact of initial duration of status epilepticus on electrophysiological and neuropathological alterations[J]. Epilepsy Res, 2002, 51: 93-107
- [4] Loscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy[J]. Epilepsy Res, 2002, 50:105-123
- [5] 龙莉莉,肖波,李国良,等.氯化锂-匹罗卡品致病大鼠的模型研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2010, 5(2):83-88
Long Li-li, Xiao Bo, Li Guo-liang, et al. A Rat Temporal Lobe Epilepsy Model by LiCl-pilocarpine[J]. Neural Injury and Functional Reconstruction, 2010, 5(2):83-88
- [6] 李国良,肖波,谢光洁,等.匹罗卡品颞叶癫痫大鼠模型[J]. 湖南医科大学学报, 2003, 28:29-31
Li Guo-liang, Xiao Bo, Xie Guang-jie, et al. Temporal lobe epilepsy model induced by pilocarpine in rats [J]. Bulletin of Hunan Medical University, 2003, 28:29-31(In Chinese)
- [7] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation II Motor Seizure[J]. Electroencephogr Clin Neurophysiol, 1972, 32:781-794
- [8] Proper EA, Jansen GH, Van Veelen CW, et al. A grading system for hippocampal sclerosis based on the degree of hippocampal mossy fiber sprouting[J]. Acta Neuropathol, 2001, 101:405-409
- [9] 吴志国,龙莉莉,肖波,等.匹罗卡品致病大鼠海马神经肽 Y 中间神经元数目变化及其轴突出芽[J]. 中南大学学报 (医学版), 2009, 34 (2):93-98
Wu Zhi-guo, Long Li-li, Xiao Bo, et al. Number changes and axonal sprouting of neuropeptide Y interneurons in the hippocampus of pilocarpine-induced rats [J]. Journal of Central South University (Medical Science), 2009, 34(2):93-98(In Chinese)
- [10] 龙莉莉,肖波,宋延民.皮罗卡品致病大鼠海马 PV 中间神经元数目变化及其轴突出芽[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2011, 37 (1):15-19
Long Li-li, Xiao Bo, Song Yan-min, et al. Quantitative changes and axonal sprouting of PV positive interneurons in the hippocampus of epileptic rats induced by pilocarpine [J]. Chinese Journal of Nervous and Mental Diseases, 2011, 37(1):15-19(In Chinese)
- [11] Savolainen KM, Hirvonen MR. Second messengers in cholinergic 2 induced convulsions and neuronal injury [J]. Toxicol Lett, 1992, 64: 443-445
- [12] Einet H, Kofman O, Itkin O, et al. Augmentation of lithium's behavioral effect by inositol uptake inhibitors [J]. J Neural Transm, 1998, 105:31-38
- [13] Hogan RE, Bucholz RD, Joshi S. Hippocampal deformation based shape analysis in epilepsy and unilateral mesial temporal sclerosis[J]. Epilepsia, 2003, 44 (6): 8002-8061
- [14] 吴逊. 癫痫与发作性疾病[M]. 北京:人民军医出版社, 2001:6-22
- [15] Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, et al. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures[J]. Neuroscience, 1987, 23: 953-968
- [16] Li WE, Nagy JJ. Activation of fibres in rat sciatic nerve alters phosphorylation state of connexin-43 at astrocytic gap junctions in spinal cord: evidence for junction regulation by neuronal-glia interactions[J]. Neuroscience, 2000, 97: 113-123
- [17] Gliem 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: 111-119