

### 3种癫痫模型的制备及应用分析

陈中玮, 周鑫, 王丽琨, 伍国锋

(贵阳医学院, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨不同癫痫模型的制备及其在癫痫研究方面的应用。方法: 选择成年雄性SD大鼠60只随机分为杏仁核慢点燃组、杏仁核快点燃组、注射匹罗卡品组, 每组20只动物, 观察各组大鼠的点燃率, 模型大鼠癫痫发作级别及癫痫行为Racinel评分, 同时观察模型大鼠癫痫发作时的脑电图。结果: 成功获得各组癫痫模型动物, 各组Racinel评分差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 其中慢点燃组动物持续时间较长, 快点燃组出现典型癫痫行为较早, 匹罗卡品组动物存活时间长。结论: 与杏仁核电点燃模型相比, 匹罗卡品点燃癫痫动物成功率高, 癫痫行为保持时间较长, 能更好的为临床所应用, 但匹罗卡品所致癫痫大鼠痫性发作持续时间变异较大, 这可能为临床筛药带来了一定的不便。

**[关键词]** 癫痫; 疾病模型, 动物; 匹罗卡品; 大鼠, Sprague-Dawley

**[中图分类号]** R742.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)05-0482-04

### Analysis of Preparation and Application of 3 Epilepsy Models

CHEN Zhongwei, ZHOU Xin, WANG Likun, WU Guofeng

(Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the preparation of different epilepsy models and its application in epilepsy research. **Methods:** Sixty adult male SD rats were randomly divided into amygdala kindling slow group, amygdala kindling fast group, and pilocarpine injection group with 20 rats in each. Observing seizure grade of epilepsy rats and epileptic behavior Racinel scores, and EEG of rats during seizure. **Results:** Various epilepsy animal models were successfully obtained, Racinel scores were significantly different among each group ( $P < 0.05$ ). In which, epilepsy of slowly burning animals continued for a longer time, quick burning group showed typical epileptic seizure behavior earlier, and the pilocarpine animals lived longer time. **Conclusion:** The pilocarpine injection group showed higher success rate and epilepsy behavior lasted longer, which can better serve clinical purpose. However, pilocarpine triggered epileptic seizure time varies greatly, which might cause certain inconvenience for clinical screening.

**[Key words]** epilepsy; disease models, animal; pilocarpine; rats, Sprague-Dawley

癫痫是一种以大脑局部病灶突发性的异常高频放电并向周围组织扩散为特征的大脑功能障碍, 同时可伴随短暂的运动、感觉、意识及自主神经功能异常, 具有病因多样性、发作反复性、症状复杂性、表现形式刻板性等特点<sup>[1]</sup>。据不完全统计, 全世界有5千万的癫痫患者, 且其平均每年发病率为0.5%~1%<sup>[2]</sup>。发作时的临床表现可分为全面强直-阵挛发作(大发作)、单纯部分发作、复杂部分

发作、失神发作(小发作)、癫痫持续状态<sup>[3-5]</sup>。既往多采用苯巴比妥、丙戊酸钠等药物治疗癫痫, 但服药期间部分病例出现了认知功能障碍及肝脏损害等严重不良反应, 因此, 寻求疗效满意且不良反应小的广谱抗癫痫药物, 成为目前研究的热点<sup>[6-7]</sup>。本研究结合目前癫痫模型制备常用的技术手段, 拟采用同批次SD大鼠实验动物, 通过不同方式获得癫痫模型, 分析模型动物的表现、脑电

图描记数据及模型动物的存活时间等,以期发现不同制备方法获得的癫痫模型的特征,为临床药物研究和治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物及分组

60 只成年雄性 SD 大鼠均购自动物研究中心,7~8 周龄,平均体质量( $223.5 \pm 1.3$ )g,随机分为杏仁核慢点燃组、杏仁核快点燃组、注射匹罗卡品组,每组 20 只动物,所有动物均首先置于实验室独立空间内,保持屋内温度湿度恒定,采用单笼喂养,自由进食的方式饲养 1 周让动物适应环境,开始实验前至少禁食 12 h。

### 1.2 动物模型制备

**1.2.1 杏仁核慢点燃模型** 将大鼠用 10% 的水合氯醛腹腔注射(4 mL/kg)麻醉后固定于脑立体定位仪上,在右侧杏仁基底外侧核的颅骨表面投射点钻孔,将直径为 0.1 mm 的双极螺旋漆包镍铬电极植入右侧杏仁基底外侧核(杏仁核坐标定位:前囟后 2.8 mm,中线旁开 4.9 mm,颅骨表面下 8.6 mm)术后第 7 天,开始对大鼠右侧杏仁核进行电刺激。刺激强度从 20  $\mu$ A 开始,每次在原来刺激强度的基础上增加 20%,刺激频率 60 Hz,波宽 1.0 ms,串刺激;间隔 5 min 刺激 1 次,直至出现时程 >3 s 的杏仁核后放电,此时电流强度即为点燃前后放电阈值(ADT)。测定 ADT 后 10 min 进行点燃刺激,大鼠连续出现 3 次 5 级发作定义为点燃成功。动物连续出现 3 次大发作间歇 24 h 后,用点燃前方法测定点燃后 ADT。根据 Racine 分级法进行发作强度判定。

**1.2.2 杏仁核快点燃模型** 手术同前,刺激强度从 20  $\mu$ A 开始,每次在原来刺激强度的基础上增加 20  $\mu$ A,刺激频率 16 Hz,波宽 1.0 ms,串刺激;间隔 2 min 刺激 1 次,直至出现时程 >3 s 的杏仁核后放电,此时电流强度即为 ADT。测定 ADT 后 10 min 进行点燃刺激,刺激方式为串刺激,刺激频率 16 Hz,波宽 1.0 ms,波间隔 61.50 Hz,强度 500  $\mu$ A,间隔 7 min 再次刺激,直至大鼠连续出现 3 次 5 级发作,定义为点燃成功。根据 Racine 分级法进行发作强度判定。

**1.2.3 匹罗卡品模型** 大鼠腹腔注射氯化锂 125 mg/kg,18~20 h 后再给予匹罗卡品 30 mg/kg 腹腔注射,30 min 后如无发作按同样剂量注射,直

至发 4~5 级大发作,最多可注射 4 次药,发作 90 min 后用安定进行镇静。

### 1.3 观察指标

**1.3.1 行为学观察** 按照 Racine 经典的癫痫发作行为评分标准进行评分:无任何癫痫发作行为记 0 分;凝视发作记 1 分;规律性点头或湿狗样抖动,伴有或不伴有面部抽动记 2 分;出现一侧前肢震颤记 3 分;站立、双前肢震颤及持续性点头记 4 分;双前肢震颤加重,失去平衡跌倒而出现全身性强直一阵挛性发作记 5 分;发作衰竭导致死亡记 6 分<sup>[8]</sup>。各组大鼠给予视频录像监测,连续观测 30 d,统计 1 d、3 d、7 d、14 d 的动物行为并评分记录。

**1.3.2 脑电图观察** 在模型动物大脑植入电极接入刺激装置,参考电极放置右耳,连接于生理记录仪。杏仁核快点燃模型制备完成,大鼠休息 1 星期时,开始刺激大鼠,分别记录大鼠点燃前正常脑电,后放电脑电及点燃后 4 级以上发作脑电;快慢杏仁核点燃模型,均按此记录脑电;匹罗卡品组制备前、后 1 h 记录动物的脑电变化,每组大鼠接受处理前后各描记脑电图 1 h,首先连续记录 15 min,然后每隔 5 min 记录 10 min,1 h 内完成。脑电图资料用随机软件计算出痫样放电潜伏期、频率和波幅。根据 Racine 分级,4 级以上发作,脑电图在尖波或棘波的基础上出现阵发性或持续性异常放电为模型成功,以成功率表示。

### 1.4 统计处理

应用 SPSS 13.0 软件分析数据,计量资料间的比较采用 *t* 检验,各组之间两两比较用 LSD 检验,各组成功率两两比较用  $\chi^2$  检验,检验水准取  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 动物模型结果

慢点燃组 20 只大鼠,电极掉落 3 只,麻醉死亡 2 只,点燃 10 只,未点燃 5 只,平均点燃周期 20 d;快点燃组 20 只大鼠,电极掉落 5 只,麻醉死亡 1 只,未点燃 2 只,点燃 12 只,平均点燃周期 5 d;匹罗卡品组 20 只大鼠,17 只当天 3~5 级发作,1 只死亡,2 只未点燃,1 周后死亡 2 只,有自发性癫痫的有 15 只(有自发性点燃确定为点燃),各组癫痫模型点燃率的比较见表 1,匹罗卡品组的点燃率明显高于其它两组( $P < 0.05$ )。

表 1 3 种方法癫痫模型点燃率比较  
Tab. 1 Comparison of epilepsy burning rates among the three methods

组别	实验动物数(n)	点燃数量(n)	点燃率
慢点燃组	20	10	50% <sup>(1)</sup>
快点燃组	20	12	60% <sup>(1)</sup>
匹罗卡品组	20	15	75%

<sup>(1)</sup>与匹罗卡品组比较,  $P < 0.05$

### 2.2 行为学观察

各组癫痫发作级别及行为评分结果见表 2、表 3 所示,第 1 天慢 3 组大鼠行为评分结果与未点燃组比较差异有统计学意义,快点燃组评分明显高于其它各组 ( $P < 0.05$ ),提示 3 种方法均能获得成

表 3 3 各组大鼠 Racinel 行为评分

Tab. 3 Racinel behavior scores of rats in the three groups

组别	癫痫造模				P
	1 d	3 d	7 d	14 d	
各组未点燃大鼠	1.51 ± 1.10	1.88 ± 0.45	1.68 ± 0.56	1.78 ± 0.46	0.078
慢点燃组	27.83 ± 5.55 <sup>(1)(2)</sup>	48.90 ± 5.05 <sup>(1)</sup>	49.51 ± 0.44 <sup>(1)</sup>	52.51 ± 0.44 <sup>(1)</sup>	0.065
快点燃组	46.43 ± 4.4 <sup>(1)</sup>	48.64 ± 4.2 <sup>(1)</sup>	42.94 ± 4.3 <sup>(1)</sup>	36.82 ± 4.5 <sup>(1)(3)</sup>	0.053
匹罗卡品组	26.63 ± 5.45 <sup>(1)(2)</sup>	37.77 ± 4.47 <sup>(1)</sup>	39.77 ± 4.45 <sup>(1)</sup>	35.75 ± 5.35 <sup>(1)(3)</sup>	0.099
P	0.012	0.035	0.045	0.038	

<sup>(1)</sup>与同时期未点燃组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>与同时期快点燃组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(3)</sup>与同时期慢点燃组比较,  $P < 0.05$

### 2.3 脑电图观察

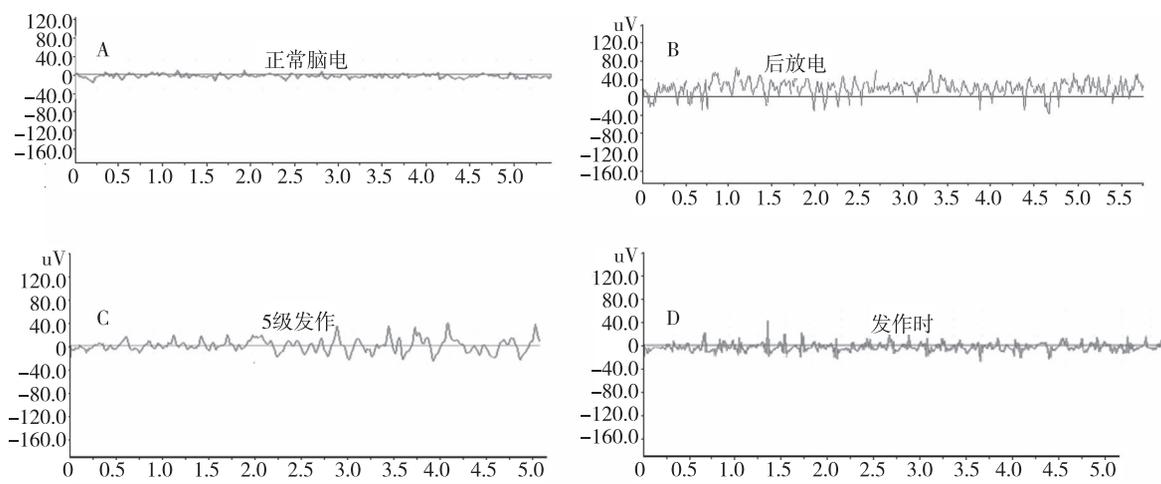
慢点燃组、快点燃组、匹罗卡品组脑电图监测异常率分别为 95%、95%、94%,所有有行为学异

功;快点燃获得模型的时间较短,癫痫行为比较典型,但是随着时间的推移,癫痫行为的表现会逐渐降低,而慢点燃组第 14 天时癫痫行为比其它各组明显,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 2 3 组大鼠癫痫点燃成功时癫痫发作情况  
Tab. 2 Epileptic seizure conditions of rats when burning successfully in the three groups

组别	大鼠数量	发作级别				
		I	II	III	IV	V
慢点燃组	20	2	2	1	6	4
快点燃组	20	0	1	1	3	7
匹罗卡品组	20	0	0	0	4	11

常表现的大鼠脑电图上均有异常表现,各组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1。



注:A 为大鼠正常脑电图, B 为杏仁核点燃大鼠癫痫发作时后放电脑电图, C 为 5 级癫痫大发作时脑电图, D 为匹罗卡品组大鼠癫痫发作时脑电图

图 1 正常大鼠及癫痫点燃模型大鼠脑电图

Fig. 1 EEG of normal rats and epilepsy burning rats

### 3 讨论

癫痫是一种以大脑局部病灶突发性的异常高频放电并向周围组织扩散为特征的大脑功能障碍,可伴有明显脑电图改变,可能伴随着短暂性的运动、感觉、意识及自主神经功能异常,癫痫模型在癫痫的病理生理研究和抗癫痫药物的研究中发挥着重要的作用<sup>[9]</sup>。

较理想的癫痫模型应具有和人类癫痫相似的发生、发展过程,才能用于相关实验研究,获得的研究数据才具有临床参考价值<sup>[10]</sup>。目前较为公认的癫痫动物模型至少应具备以下几种特点:首先具有诸如神经细胞丢失、胶质细胞增生、轴突丝状芽生和突触重建等与人类癫痫相似的病理学基础,其二是在初始刺激与自发性癫痫发作之间有较为固定的潜伏期(维持数天至数周);其三是所获得的动物模型在一定时间内保持大脑神经元兴奋性持续增高<sup>[11-15]</sup>。

本研究用不同的方法制备癫痫模型,杏仁核是癫痫模型点燃最敏感的区域<sup>[16]</sup>。本实验在相同条件下检测癫痫模型的特点,比以往研究中观察单一模型的临床特点有了一定的进步,同时,本实验结合脑电图检测,使获得的模型及分析结果更具有客观性,排除主观因素的影响<sup>[17-20]</sup>。快点燃和慢点燃的区别主要在于刺激参数的设置及刺激间隔时间的长短,通过大量查阅文献及实验摸索找到了较准确的刺激参数。杏仁核慢点燃动物模型的癫痫行为学表现时间最长,模型稳定性好,模型点燃后自发性强,并且能最大限度的接近人类癫痫发作时脑电的特征,适合于临床耐药性、临床药物的筛选或者用剂量的研究;而快点燃模型动物出现癫痫行为较早,可用于外伤或者急性毒性药物的研究;匹罗卡品组动物损伤较小,动物存活时间长,可以用于神经性药物或急性药物对癫痫影响的研究。3种模型的同时制作和对比,能更好的帮助模拟人类癫痫发作时的发作状态及发病后大脑脑电的改变,也为往后更深入的实验提供了基础支持。

### 4 参考文献

- [1] 安宁,林峰,解锦鼎. 托吡酯与丙戊酸钠治疗癫痫的疗效对比观察[J]. 临床和实验医学杂志, 2011(10): 1357-1359.
- [2] 童武华,曹伟中,王黎恩,等. 控制性高血压对创伤性重症颅脑损伤神经预后的影响[J]. 实用医学杂志, 2005(22):2513-2514.
- [3] 辛志成,周政,龙连圣,等. 影响老年重型颅脑损伤患者预后的危险因素[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009(22):15-17.
- [4] 张曙光,潘天鸿. 颅脑损伤患者手术预后因素回归分析[J]. 中华神经医学杂志, 2007(1):69-71.
- [5] 李骊,陈志茹,宋秀娥,等. 中医治疗癫痫的药物类别研究[J]. 中医临床杂志, 2010(2):56-58.
- [6] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation after discharge threshold[J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972(32):269-279.
- [7] 杨杏林,范海鹰,胡晓航. 中药治疗不同类型癫痫失神发作[J]. 中西医结合学报, 2007(5):692-694.
- [8] Higgins GA, Breysse N, Undzys E, et al. The anti-epileptic drug lacosamide (Vimpat) has anxiolytic property in rodents[J]. *European journal of pharmacology*, 2009(2):41-49.
- [9] 向赞,许晓莉,董大翠,等. 癫痫大鼠海马 IL-1 B 变化的研究[J]. 武汉大学学报:医学版, 2004(6):630-648.
- [10] Valente MB, Valente SM. Pediatric epilepsy: primary care treatment and health care management [J]. *Nurse Pract*, 1998(11):43-44.
- [11] de Biase S, Gigli GL, Valente M, et al. Lacosamide for the treatment of epilepsy [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2014(3):459-468.
- [12] Soe NK, Lee SK. Unusual ictal foreign language automatisms in temporal lobe epilepsy [J]. *J Epilepsy Res*, 2014(2):78-81.
- [13] Ambhore A, Teo SG, Omar AR, et al. Electrocardiography series importance of QT interval in clinical practice [J]. *Singapore Med J*, 2014(12):607-612.
- [14] Ibekwe RC, Chidi NA, Ebele AA, et al. Co-Morbidity of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and epilepsy in children seen in university of Nigeria teaching hospital enugu: prevalence, clinical and social correlates [J]. *Niger Postgrad Med J*, 2014(4):273-278.
- [15] Méndez-Armenta M, Nava-Ruíz C, Juárez-Rebollar D, et al. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014(3):571-573.
- [16] Krishnan P, Chattopadhyay A, Saha M. Periventricular nodular heterotopia, frontonasal encephalocele, corpus callosal dysgenesis and arachnoid cyst: A constellation of abnormalities in a child with epilepsy [J]. *J Pediatr Neurosci*, 2014(3):273-275.

(下转第 489 页)

因,易导致慢性营养不良的发生。因此,SGA 能够更好地反映这部分住院患者的营养状况。 $\geq 60$  岁年龄组住院患者中,在内科 MNA-SF 的诊断价值优于 SGA 和 NRS2002。MNA-SF 是 MNA 的简化形式,两者诊断结果具有显著相关性<sup>[8-9]</sup>。考虑到临床的操作问题和病人的接受度,本研究采用 MNA-SF 替代了 MNA。MNA-SF 量表中有无卧床、有无痴呆抑郁等问题是专门针对老年人的特点设置的,因此它比其它筛查工具更适用于老年人。无论是在 18 ~ <60 岁还是  $\geq 60$  岁年龄组,在外科中 NRS2002 的诊断价值均优于 SGA 和 MNA-SF。这是因为 NRS2002 易于识别早期和急性疾病导致的营养风险。外科住院患者多因疾病原因暂时处于禁食状态,手术、创伤等应激情况下代谢增加以及对营养物质需求增加所导致的营养耗损,使患者的营养风险发生率增高,这在外科尤为常见<sup>[10]</sup>。因此,NRS2002 在对外科住院患者营养风险筛查中表现出了较高的诊断价值。但内科住院患者多为慢性病,短期的体重及膳食摄入的改变却不大,可能造成了 NRS2002 在内科中的灵敏性不如外科。

从以上研究结果可以看出:单一的营养筛查工具无法对所有住院患者的营养风险及营养状况进行正确、全面的评估。在临床应用中,应根据疾病特点及年龄特征选择合适的营养筛查工具。由于本研究样本量较少,还需进一步扩大样本量进行验证。

#### 4 参考文献

[1] 翟茂东,杨俊,贾震易,等. 肝胆胰外科患者营养风险筛

查与临床结局分析[J]. 肝胆胰外科杂志, 2012(3): 179 - 182.

- [2] 夏萌,肖利,褚瑶丹,等. 心脏手术患者术前营养风险与临床结局关系的研究[J]. 心肺血管病杂志, 2014(2): 251 - 254.
- [3] 康欣,胡毅,杨涌,等. 胃肠道大手术患者营养风险筛查及营养支持效果对比研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2014(10):1259 - 1263.
- [4] 中华医学会. 临床诊疗指南 - 肠外肠内营养学分册[M]. 北京:人民卫生出版社,2008;16 - 20.
- [5] Detsky AS, McLaughlin JR, Baker JP, et al. What is subjective global assessment of nutritional status[J]. JPEN, 1987 (1):8 - 13.
- [6] Rubenstein LZ, Harker JO, Salva A, et al. Screening for undernutrition in geriatric practice; Developing the Short-Form Mini Nutritional Assessment (MNA-SF)[J]. J Gerontol, 2001 (6):366 - 372.
- [7] Abdelgadir MA, Mahadi SE, Nasr AO, et al. Role of jejunostomy feeding catheter as a model for nutritional support[J]. Int J Surg, 2010(6):439 - 443.
- [8] 汪毓诚,王新宜,吴琦,等. 不同营养评价方法在老年心血管患者中应用的比较[J]. 老年医学与保健, 2012(1):40 - 47.
- [9] 张彩华,徐奕,朱宏霞. 微型营养评定法和微型营养评定量表在老年痴呆患者营养筛查中的应用[J]. 中华临床营养杂志, 2010(3):141 - 144.
- [10] 黄蕾,张继红,宣兵,等. 两种营养风险筛查工具在心血管内科老年住院患者中应用比较分析[J]. 四川医学, 2011(8):1211 - 1214.

(2015-02-23 收稿,2015-04-09 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:刘 华

(上接第 485 页)

- [17] Liu TT, He ZG, Tian XB, et al. Neural mechanisms and potential treatment of epilepsy and its complications[J]. Am J Transl Res, 2006(6):625 - 630.
- [18] 伍国锋,洪震,高宾丽. 海马电刺激对耐药性颞叶癫痫大鼠 cal 区神经元钠通道电流的影响[J]. 中华神经科杂志, 2013(8):513 - 518.
- [19] 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.

- [20] Curia G, Longo D, Biagini G, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy[J]. Neurosci Methods, 2008 (172):143 - 157.

(2015-02-12 收稿,2015-04-03 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:赵 毅