

电刺激点燃癫痫大鼠的皮层脑电及行为学研究

张瑞华¹, 王玉平²

(1. 首都医科大学附属北京潞河医院, 北京 101149; 2. 首都医科大学宣武医院, 北京, 100053)

【摘要】 目的 应用 Sprague-Dawley (SD) 大鼠建立难治性癫痫杏仁核电刺激点燃癫痫模型, 观察电刺激点燃模型的皮层脑电变化。**方法** 用雄性 SD 大鼠, 将双极电极立体定向植入大鼠右侧杏仁核, 术后 2 周测定大鼠后放电阈值 (after discharge threshold, ADT), 用快速点燃方案建立杏仁核电刺激点燃癫痫模型。2 周后再次点燃。应用皮层脑电图 (electrocorticogram, ECoG) 记录动物皮层脑电变化, 应用视频监测仪记录大鼠的行为学改变。结果大鼠在测 ADT 过程中表现 1~3 级发作, ECoG 显示异常放电; 电刺激点燃时大鼠首先表现出 1~3 级发作, 发作程度逐渐加剧直到出现 4~5 级发作, 脑电图显示棘波、尖波、棘-慢波和尖-慢波等。统计学结果: 首次点燃 ADT: $(82.33 \pm 21.29) \mu\text{A}$, 2 周后 ADT: $(83.17 \pm 15.76) \mu\text{A}$, $P = 0.923$, 差异无统计学意义; 首次点燃电刺激点燃动物出现第一个 4 级发作所需要的电脉冲串的个数: (4.41 ± 2.27) , 2 周后: (5.58 ± 3.96) , $P = 0.231$, 差异无统计学意义。结论 快速点燃癫痫动物模型是一个有效的癫痫模型, 其稳定性在 2 周内持续存在。

【关键词】 电刺激点燃; 难治性癫痫; 杏仁核点燃; 皮层脑电图; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 12-0054-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.011

Electrocorticogram and behavior of electrically kindled epileptic rats

ZHANG Rui-hua¹, WANG Yu-ping²

(1. Beijing Luhe Hospital, Capital Medical University, Beijing, 101149, China;

2. Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100053)

【Abstract】 Objective The current study was aimed to establish an electrically amygdala kindling model of refractory epilepsy in Sprague-Dawley rats, and to study their changes of electrocorticogram (ECoG). **Materials and methods** Male Sprague-Dawley rats were used in the experiment. Two-polar electrode was implanted into the right amygdala stereotactically. Two weeks after the surgery, electrical stimulations were given to elicit the grade 4 seizure in all animals with the fast kindling protocol. Rekindling was administrated after the first kindling. The after discharge threshold (ADT) and the number of stimulus were reassessed in the two kindling protocols. ECoG and the behavior of the animals were recorded during the whole experiment. **Result** The changes of ECoG and behavior: Animals showed stage 1-3 seizure when the ADT was assessed. While during the kindling period, the animals showed generalized convulsion with stage 4-5 seizure. ECoG showed sharp waves, spike waves, sharp-slow waves and spike-slow waves. Statistical analysis showed that the ADT was not significantly increased at two weeks after kindling (from $83.33 \pm 22.29 \mu\text{A}$ to $84.17 \pm 16.76 \mu\text{A}$, $P = 0.923$). The number of stimulus given to elicit the stage 4 convulsion was not significantly increased as well (from 4.41 ± 2.27 to 5.58 ± 3.96 , $P = 0.231$). **Conclusions** Rapid kindling model of epilepsy in rats is an effective epilepsy model, which is stable for 2 weeks.

[作者简介] 张瑞华 (1971-), 女, 副主任医师, 硕士学位, 研究方向: 神经病学, 神经电生理。

[通讯作者] 王玉平 (1961-), 男, 主任医师, 博士学位, 研究方向: 神经电生理, 认知神经科学。

【Key words】 Microinjection; Refractory epilepsy; Amygdala Kindling; Electrocorticogram; Rat

癫痫动物模型的建立方法有多种,其中电刺激点燃模型与人类颞叶癫痫的发生、形成具有高度的相似性,并且具有精确的致痫灶,易于监测痫性发作,尤其适于难治性癫痫方面的研究^[1-3]。电刺激点燃模型由 Goddard 首先引入医学领域,通过应用惊厥阈值下的电流反复刺激前脑的某一区域,使其惊厥阈值不断下降,中枢神经系统的兴奋性逐渐增加,动物的行为学出现改变,直到出现爆发性同步异常放电,诱导出全身性惊厥发作。动物一旦点燃,其异常放电可以长久保持,很难逆转^[4,5]。20 世纪 80 年代,Lothman 和 Holmes 改变了电刺激参数,应用缩短的刺激间隔和较大的惊厥下电流刺激,可以在短时间获得点燃成功^[6,7]。本实验应用快速点燃方案,建立大鼠杏仁核电刺激点燃模型,观察 2 周内癫痫模型的易感稳定性。

1 材料和方法

SD 大鼠:雄性,6~8 周龄,体重(300~350)g,共 20 只,SPF 级。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2002-2003。实验前大鼠在宣武医院标准动物饲养室里分隔喂养,12 h 昼夜循环光照(7 am. ~ 7 pm. 光照时间),自由进食水,实验动物许可证号:SYXK(京)2010-0013。所有动物均由首都医科大学宣武医院动物中心提供,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

实验设备:所用设备包括电刺激器(Grass-88 型,美国 Grass 公司);电流隔离器(Grass S12 型,美国 Grass 公司);脑电图机(UL-16A 型,北京中科新拓仪器有限责任公司);游标型小动物脑立体定位仪(美国 TPI 公司)等。

双极刺激电极包括并列粘合在一起的两极:正极和负极。正极采用针灸针($\Phi 0.25$ mm)外镀特氟龙绝缘,尖端裸露 0.5 mm;负极采用 4.5 号一次性使用静脉输液针,正极尖端比负极尖端长 1 mm。两极分别通过导线和电流隔离器相连。将直径长 5 mm 的银丝($\phi 0.5$ mm)一端用酒精喷灯烧成银球,另一端焊接电脑串口连接器的插针,做记录电极。电极使用前用生理盐水将银球表面镀上氯化银。

外科手术:10% 水合氯醛,剂量 4 mL/kg,腹腔注射,深度麻醉大鼠。麻醉成功后,用耳棒固定大鼠头部,门齿平面低于耳根平面 2.4 mm^[8]。常规应用 2% 碘酒消毒头部皮肤,用 75% 的酒精脱碘两次,

铺无菌孔巾,露出头部皮肤。剪去头顶部长径 20 mm,短径 10 mm 的椭圆形皮瓣,用手术刀的刀柄刮除骨膜,用 30% 双氧水去除颅骨表面的脂类,充分暴露颅骨和前囟。参照大鼠脑立体定向图谱,确定右侧杏仁核的位置(前囟后 2.0 mm,右侧旁开 5.0 mm,颅骨表面下 8.0 mm)。用小型颅骨钻钻透颅骨,将双极电极立体定向插入到右侧杏仁核部位。在额骨中线部位钻透颅骨,在硬膜外放置银球电极做参考电极;在双侧顶骨(前囟后 4 mm,左右各旁开 2 mm)钻透颅骨,在硬膜外放置银球电极做记录电极^[8]。在双侧额骨及左侧顶骨各固定一个眼镜螺丝。用牙托粉将所有电极与螺丝一起固定在颅骨,防止脱落。同时固定一直径 1.5 cm、高 2 cm 的带盖透明塑料管,将所有电极圈住以保护电极不被撞断。术后观察动物 30 min,待动物醒转,各项生理指标如呼吸、心率、肤色等恢复正常后,将大鼠放回笼中单独饲养。术后(1~3) d 给大鼠腹腔注射庆大霉素 8 万单位/d 以防治感染,同时给牛奶、蛋黄等营养补充。

手术后两周,大鼠状态恢复正常,给予电刺激点燃。根据以前文献报道和预实验结果^[6,7],电刺激点燃各项参数设定如下:测 ADT 的参数设定:单向方波脉冲串,频率 16 Hz,波长 1 ms,脉冲串长 10 s,电流强度自 40 μ A 开始,每隔 2 min 增加 20 μ A 实施下一次刺激,直到出现 3 s 以上的后放电。第一次电刺激点燃参数设定:单向方波脉冲串,频率 16 Hz,波长 1 ms,脉冲串长 10 s,电流强度 400 μ A,刺激间隔 10 min。两周后再次电刺激点燃。

ADT 为电刺激停止后出现幅度高于 2 倍基础波、时间在 3 s 或者 3 s 以上的异常放电时的电流强度。完全点燃是指大鼠出现 4 级或 5 级发作。电刺激点燃的分级标准:Racine 描述了大鼠杏仁核点燃时癫痫行为的等级标准,这一分级至今仍在沿用,即 0 级:无发作;1 级:面部肌肉痉挛,表现为咀嚼动作、面部及口角抽动;2 级:1 级发作的基础上加颈部肌肉痉挛,表现为点头运动;3 级:2 级发作的基础上加一侧前肢阵挛;4 级:3 级的基础上出现后肢站立;5 级:在 4 级的基础上出现身体向后倒下^[5]。电刺激点燃终止的标准:第一次电刺激点燃,大鼠出现 3 个 4 级或 5 级发作时停止电刺激,认为点燃成功。

点燃前先测 ADT,采用上述参数,刺激电流强度从 40 μ A 开始,每隔 2 min 增加 20 μ A 实施下一

次电刺激,直到出现 3 s 或 3 s 以上的后放电,此时的电流强度确定为 ADT。ADT 超过 200 μA 的动物放弃点燃。

数据处理:本实验所有数据都采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$),采用 SPSS/11.5 版软件进行统计学处理。比较所有入组的大鼠在第 1 次点燃和 2 周后点燃的 ADT 和电刺激点燃出现第一个 4 级发作所需要的电脉冲串个数。做配对 t 检验,以 $P \alpha = 0.05$ 作为显著性水准,判断两次点燃的差异是否具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的 ECoG 结果

在正常活动状态下大鼠的皮层脑电为频率 7 ~ 10 Hz 的正弦波,波幅在 200 ~ 400 μV 。

2.1.1 深部电极植入后但未给予电刺激点燃时的 ECoG:(图 1)

2.1.2 电刺激点燃前测定 ADT 时大鼠的 ECoG:电刺激点燃之前,常规测 ADT。当电流强度增加到一定程度,大鼠的皮层脑电出现改变,波幅增高,波形变异,当异常放电波幅超过基础波的 2 倍,持续时间在 3 s 或 3 s 以上时,该电流强度为 ADT。测 ADT

过程中动物表现 1 ~ 3 级发作(图 2)。

2.1.3 电刺激点燃时大鼠 ECoG:在电刺激点燃过程中,大鼠的 ECoG 可以记录到癫痫样异常放电,呈棘波、棘-慢波、尖波、尖-慢波等。给予电刺激后大鼠首先出现 1 ~ 3 级发作,逐渐加剧到 4 ~ 5 级发作,皮层脑电首先出现节律性后放电,呈丛集性发放,约 5 ~ 6 次/s,波幅 1 000 mV 以上,呈负性波,频率逐渐变慢,波幅逐渐降低,代之以脑电抑制,脑电抑制期大鼠发作停止。继约 5 ~ 30 秒的脑电抑制后出现脑电极性倒转,大鼠再次表现 3 ~ 4 级发作。节律性后放电及惊厥发作在两次刺激间期可以反复出现(图 3)。

2.2 统计学结果

本实验对 24 例入组的大鼠进行了观察,观察了第一次点燃和点燃后 2 周的 ADT 和达到 4 级发作的电脉冲串的个数。

首次点燃的 ADT 为:118.33 $\pm$ 37.26 μA ,电刺激点燃达到 4 级发作的电脉冲串个数:8.54 $\pm$ 6.09;2 周后点燃的 ADT:71.67 $\pm$ 22.00 μA ,电脉冲串个数:3.33 $\pm$ 2.30。24 只大鼠两周后再次点燃,均可以诱发出 4 级发作。比较两次点燃的 ADT, $P = 0.000$,有显著统计学意义。考虑在完全点燃的大

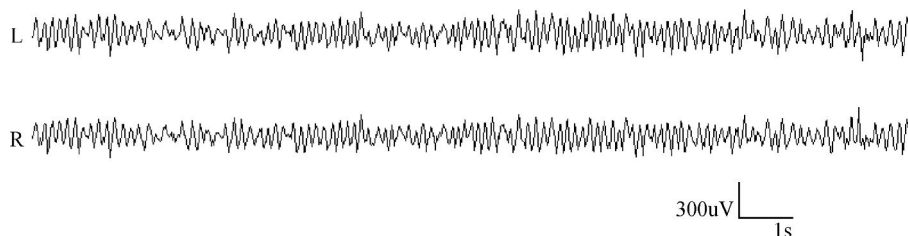


图 1 深部电极植入但未给予电刺激时脑电图。

L:左顶; R:右顶。脑电表现为 7 ~ 10 Hz 的正弦波,波幅在 200 ~ 400 μV 。

Fig. 1 ECoG after implantation of the kindling electrodes. L denotes the left parietal lobe and R denotes the right parietal lobe. The frequency and amplitude of ECoG are 7 ~ 10 Hz and 200 ~ 400 μV , respectively.

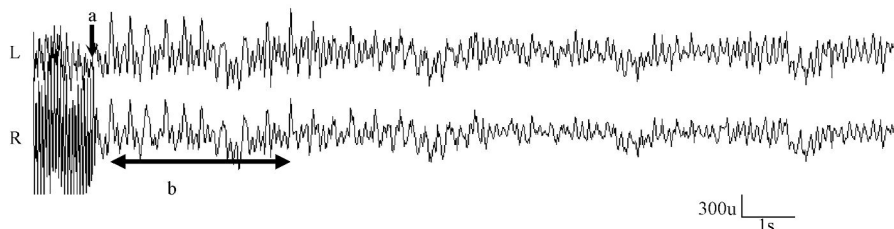


图 2 ADT 测定。L:右顶; R:右顶; a:电刺激停止; b:后放电持续时间(3.8s)。此时的电流强度(160 μA)为 ADT。

Fig. 2 ECoG ADT determination before the electrical kindling. L denotes the left parietal lobe and R denotes the right parietal lobe. Point "a" represents the end of the electrical stimulation. The duration time of post-discharge is 3.8 s and the current intensity of ADT is 160 μA .

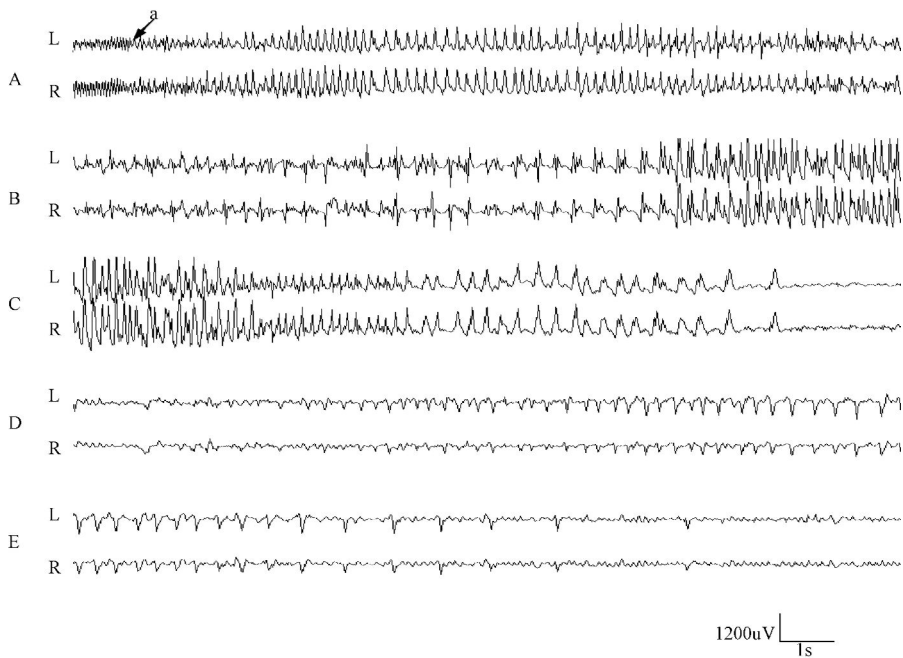


图 3 电刺激点燃. L:左顶; R:右顶; a:电刺激停止. A. 出现痫性放电,大鼠表现为 3-4 级发作,逐渐加剧. B. 痫性放电频率增快,波幅增高,大鼠表现 5 级发作. C. 痫性放电频率及波幅逐渐下降,发作停止. D. 痫性放电极性倒转,大鼠表现 4 级发作. E. 痫性放电逐渐停止,大鼠发作停止.

Fig. 3 ECoG of electrical kindling. L denotes the left parietal lobe and R denotes the right parietal lobe. Point “a” represents the end of electrical stimulation. A. Epileptic discharge emerging, seizure begins, Racine grade 3-4. B. Epileptic discharge builds up, with higher frequency of discharge, seizure continues, and Racine grade 5. C. Frequency of discharge is gradually diminishing, and seizure stops. D. Reversal of polarity of epileptic discharge, and seizure reappears. E. Epileptic discharge is gradually diminishing, and seizure stops.

鼠,其 ADT 明显降低。比较两次达到 4 级发作所需要的电脉冲串的个数, $P=0.000$,有显著统计学意义,说明处于点燃状态的大鼠,再次点燃达到 4 级发作所需要的电脉冲串的数量明显减少。

3 讨论

癫痫电刺激点燃模型是一种目前被公认的理想难治性癫痫动物模型,自 1969 年 Goddard 建立了经典的点燃方法以来,人们开始大量的应用点燃模型来进行癫痫的相关研究^[9]。电刺激点燃可以在一定时期内存在,有研究显示,重复刺激可以导致 NMDA 受体激活、苔藓纤维发芽、解剖结构重塑等过程的发生和发展,致病性虽然不是永久存在,但是可以维持相当长的一段时间(1~3 个月)^[10, 11]。

电刺激点燃癫痫模型具有明确的癫痫放电的激发点,便于确定靶点进行干预。异常放电首先在电刺激部位出现,继而泛化传播到对侧。随着电刺激的进行,后放电持续时间延长,波幅增加,出现棘

波、尖波、棘-慢波、尖-慢波等异常放电和行为学出现改变,发作阈值下降,由部分性发作(1~3 级)逐渐发展到全面性发作(4~5 级)^[12]。

行为学发作和脑电的异常发放是癫痫的两大特点。我们在电刺激点燃的同时对大鼠的脑电图和行为学改变进行了观察,给予电流刺激后动物首先出现部分性发作,大鼠表现为动须、咀嚼、眨眼、点头、前肢阵挛等,在此基础上发展到全面性发作,与人类颞叶癫痫表现的部分性发作继发全面性发作的过程很接近。发作后动物不会出现昏迷,但是有短暂的呆立不动,之后可以恢复正常的活动。非刺激期间对动物进行了 ECoG 监测记录,非刺激期间动物未出现自发性发作,偶有癫痫样异常放电。癫痫易感性在点燃后 2 周仍然存在,这和已往的文献报道相一致^[5]。

在大鼠电刺激点燃过程中,我们还观察到了刺激结束后首先出现的是负性节律性棘波,继之以 5~30 s 的脑电抑制,然后出现极性倒转,表现正性棘波,波幅较前增高或者降低,有时无变化,并伴有动

物 3~4 级痫性发作。这一现象未见相关的文献报道。在 Yang 等的一篇关于癫痫治疗方面的文章中曾看到癫痫放电极性倒置的现象,但是作者并未对这一现象进行更多的解释^[13, 14]。关于这一现象出现的原因和机制目前还不是十分清楚,还需要进一步设计实验加以验证。

参考文献:

- [1] McNamara JO. Kindling: an animal model of complex partial epilepsy [J]. *Ann Neurol*, 1984, 16(Suppl 1): S72-S76.
- [2] Kückler S, Töllner K, Piechotta M, et al. Kindling as a model of temporal lobe epilepsy induces bilateral changes in spontaneous striatal activity [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(3): 661-672.
- [3] Akman O, Karson A, Aker RG, et al. Hippocampal kindling in rats with absence epilepsy resembles amygdaloid kindling [J]. *Epilepsy Res*, 2008, 81(2): 211-219.
- [4] Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation [J]. *Exp Neurol*, 1969, 25(3): 295-330.
- [5] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294.
- [6] Lothman EW, Hatlelid JM, Zorumski CF, et al. Kindling with rapidly recurring hippocampal seizures [J]. *Brain Res*, 1985, 360(1-2): 83-91.
- [7] Holmes GL, Thompson JL. Rapid kindling in the prepubescent rat [J]. *Brain Res*, 1987, 433(2): 281-284.
- [8] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 人民卫生出版社, 1991: 39-41.
- [9] Potschka H, Soerensen J, Pekcec A, et al. Effect of eslicarbazepine acetate in the corneal kindling progression and the amygdala kindling model of temporal lobe epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2014, 108(2): 212-222.
- [10] Sayin Ü, Rutecki P, Sutula T. NMDA-dependent currents in granule cells of the dentate gyrus contribute to induction but not permanence of kindling [J]. *J Neurophysiol*, 1999, 81(2): 564-574.
- [11] Danzer SC, He X, Loepke AW, et al. Structural plasticity of dentate granule cell mossy fibers during the development of limbic epilepsy [J]. *Hippocampus*, 2010, 20(1): 113-124.
- [12] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation; I. After-discharge threshold [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 269-279.
- [13] Yang XF, Rothman SM. Focal cooling rapidly terminates experimental neocortical seizures [J]. *Ann Neurol*, 2001, 49(6): 721-726.
- [14] Yang XF, Duffy DW, Morley RE, et al. Neocortical seizure termination by focal cooling: temperature dependence and automated seizure detection [J]. *Epilepsia*, 2002, 43(3): 240-245.

[修回日期]2015-10-08