



口服补液盐降低氯化锂-匹罗卡品惊厥持续状态大鼠死亡率的研究

韩慰, 蒋莉*, 何蓉, 宋晓洁, 程莉

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室,
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】 目的 探讨通过胃管灌胃改良口服补液盐(oral rehydration salts, ORS)降低氯化锂-匹罗卡品诱发惊厥持续状态(status epilepticus, SE)模型的死亡率的方法。**方法** 选用成年组(60 d)SD大鼠30只和幼年组(20 d)SD大鼠45只,随机分为成年SE+ORS组、成年SE组、幼年SE+ORS组、幼年SE组、幼年血糖组各15只。经腹腔注射氯化锂和匹罗卡品,诱发大鼠惊厥发作,惊厥60 min后,给予安定止惊。各ORS组于SE后1、12、24 h根据不同年龄予以不同剂量改良ORS灌胃。其余各组不给予处理。记录实验大鼠惊厥发作情况,惊厥前后体重变化及死亡情况;血糖测定组于SE后8 h取血检测血糖,探索降低该模型死亡率的方法。**结果** (1)各组惊厥后体重均降低,约占体重的5%~8%。(2)氯化锂-匹罗卡品惊厥持续状态模型死亡率较高,幼年组40.00%,成年组57.14%;死亡发生时间集中在惊厥后24 h内,72 h后死亡数趋于平稳。(3)SE后实验大鼠血糖明显降低,给予ORS液灌胃后,血糖趋于正常水平。(4)以改良ORS灌胃后,幼年组和成年组72 h内死亡率明显降低。**结论** SE后改良ORS液灌胃有效改善实验动物死亡率,是有效提高其生存率的方法。

【关键词】 氯化锂-匹罗卡品;惊厥持续状态模型;大鼠;死亡率

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0243-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.005

Mortality of rat models of LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus can be reduced by oral rehydration salt solution

HAN Wei, JIANG Li*, HE Rong, SONG Xiao-jie, CHENG Li

(Department of Neurology, Children Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

【Abstract】 Objective To explore a new method of reducing the mortality of rat models of LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus (SE) by oral gavage of rehydration salts (ORS) liquid. **Methods** Forty-five young SD rats (20-day-old) and 30 adult SD rats (60-day-old) were enrolled in this study. They were randomly divided into five groups; the adult SE rats received ORS gavage (adult SE + ORS), adult SE rats (adult SE) and young SE rats received ORS gavage (young SE + ORS), young SE rats (young SE) and young blood glucose group. Seizures were induced in both young and adult SE groups with i. p. LiCl-pilocarpine was injected i. p. to induce SE, which was interrupted by diazepam at 60 minutes after SE onset. ORS gavage was conducted in all the ORS groups in different doses according to their ages at 1 hour, 12 hours or 24 hours after the onset of SE. The other groups were not given any treatment. The latency of seizure onset, changes in body weight, level of blood glucose at 8 hours after SE onset and finally the death rate of the rats were recorded. **Results** (1) The body weight of the rats with seizures was reduced by 5%~8%. (2) The mortality rate of the SE groups was high, especially at 24 hours after the SE onset, which was 40% in the young group and 57% in the adult group. (3) The blood glu-

【基金项目】国家自然科学基金(NO. 81371452);重庆市科委自然科学基金重点项目(cstc2013jjB0031);教育部博士点基金课题(20125503110011)。

【作者简介】韩慰(1990-),女,研究生,研究方向:小儿神经疾病 Email: hanweitqx@126.com

【通讯作者】蒋莉(1964-),女,教授,研究方向:小儿神经系统疾病 Email: dr_jiangli@126.com

cose level was significantly decreased in the SE rats, and ORS gavage made the blood glucose returning to normal in the SE rats. (4) ORS gavage apparently decreased the mortality rate of young and adult groups during the 72 hours after seizure onset. **Conclusions** ORS gavage effectively reduces the mortality of SE rats, and is an effective method to improve the survival of SE rats.

[Key words] LiCl-pilocarpine; Statue epilepticus; Rat; Mortality

Corresponding author: Jiang Li, Email: dr_jiangli@126.com

氯化锂-匹罗卡品诱发大鼠惊厥持续状态模型具有与人类颞叶癫痫相似的行为和脑电图改变,是研究惊厥持续状态较为理想的动物模型。由于惊厥持续状态要求足够长的发作时间,实验大鼠的死亡率高,国内外学者从匹罗卡品剂量的选择、使用 M 胆碱能样受体拮抗剂进行预处理、采用不同止惊剂适时中止发作等方面对该模型进行改良^[1-4],但实验动物急性期死亡率仍可高达 55%^[5]。

目前的改良方法多集中在惊厥发作期如何止惊,而在惊厥后处理方面研究甚少。惊厥持续状态可造成全身缺氧致代谢性酸中毒、糖代谢紊乱、脱水、窒息等病理生理改变。惊厥持续状态大鼠予以止惊剂后处于昏睡状态,而清醒后活动减少、反应迟钝、精神欠佳,进食能力减弱、体重明显减少。我们认为这可能是造成惊厥后急性期大鼠死亡的重要原因。因此,惊厥后处理对降低其死亡率有重要意义。

口服补液盐(oral rehydration salts, ORS),简称 ORS 液。本实验用改良的 ORS 液纠正大鼠惊厥持续状态后水盐代谢紊乱,补充血糖,探讨能否降低急性期实验大鼠死亡率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组

20 日龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 75 只,其中,体重在 35~52 g 的 45 只;体重在 180~230 g 的 30 只,均来源于重庆医科大学实验动物中心【SCXK(渝)2012-0001】,在重庆医科大学附属儿童医院动物中心 SPF 级屏障实验设施中进行【SYXK(渝)2012-0015】。

根据大鼠日龄和 SE 后是否用改良 ORS 处理采用随机数字法分为以下 5 个组:成年 SE + ORS 组、成年 SE 组、幼年 SE + ORS 组、幼年 SE 组、幼年血糖测定组各 15 只。其中血糖测定组又分 3 个亚组,分别是正常对照组、SE 组、SE + ORS 组各 5 只。

1.1.2 试剂

氯化锂、匹罗卡品(美国 Sigma-Aldrich 公司);

硫酸阿托品、安定(天津金耀氨基酸有限公司);口服补液盐 III(ORS)液(西安安健药业有限公司),每袋成分:氯化钠 0.65 g、枸橼酸钠 0.725 g、氯化钾 0.375 g、无水葡萄糖 3.375 g。实验用改良配方:葡萄糖 10 g + 1 袋 ORS + 250 mL 蒸馏水。

1.2 模型建立方法

采用氯化锂-匹罗卡品建立惊厥持续状态模型,幼年组(20 d)、成年组均在腹腔注射氯化锂 127 mg/kg,18~20 h 后,分别采用腹腔注射匹罗卡品 30、50 mg/kg。按照 Racine^[6]分级法进行惊厥分级,当发作达到 IV 级或 V 级并持续 60 min 为惊厥持续状态,惊厥发作 15 min 后腹腔注射硫酸阿托品(10 mg/kg)拮抗其 M 胆碱能样作用,发作 60 min 后给予安定(10 mg/kg)止惊。腹腔注射匹罗卡品 30 min 后,未达到 IV 级发作者,等量追加 1 次,若仍未达到 IV 级发作者退出实验。血糖组的对照组,予以腹腔注射等量生理盐水。

幼年和成年 SE + ORS 组的实验大鼠均于 SE 后 1、12、24 h 以改良 ORS 液灌胃,剂量分别以每只 0.5、2.0 mL。血糖(SE + ORS)组于 SE 后 1 h 灌胃改良 ORS 液,剂量为每只 0.5 mL。其余实验大鼠不给予该处理。SE 前后各组均用普通饲料喂养。记录各组实验大鼠惊厥前后体重及发作情况,分别以 SE 后 1、12、24、48、72、96、120 h 等 7 个时间点观察各组实验动物死亡数。血糖组于 SE 后 12 h 采用眼底静脉取血方法取血约 1 mL,然后离心取血清送本院检验科检测血糖。

1.3 统计学方法

用 SPSS17.0 软件包对数据进行统计学处理,所有计量资料均用均数 ± 标准差表示,各组实验动物的死亡率采用卡方检验,惊厥前后体重均值比较采用配对 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

腹腔注射匹罗卡品后,各组实验大鼠均出现相似的表现,即不同程度的胆碱能反应:流涎、稀便、结膜充血出血、全身湿润等;以及不同程度的痫性发作

表现:早期出现竖毛、搔抓症状,后出现面部抽搐、节律性点头和咀嚼,继之出现双侧前肢抬起阵挛,全身强直阵挛伴站立和跌倒、翻滚甚至尖叫等。

2.1 惊厥发作情况

各组大鼠均在匹罗卡品注射后 30 min 左右达到 V 级发作。幼年组注射安定后 1~11 min 完全止惊,成年组约在给药后 1~28 min 终止发作。各组惊厥发作情况详见表 1。幼年 SE + ORS 组有 1 只实验大鼠在达到 V 级发作后持续 20 min 后死亡,成功建模 14 只。幼年 SE 组 15 只实验大鼠均造模成功。成年 SE + ORS 组成年造模 13 只,其中 1 只在

达到 V 级发作后 27 min 后死亡,另 1 只实验大鼠腹腔注射匹罗卡品后出现搔抓、点头症状,但 30 min 后未达到 IV 级发作,等量追加 1 次,30 min 后仍未达到 IV 级发作故退出实验。成年 SE 组有 1 只大鼠达到 V 级发作后持续 38 min 后死亡,成功造模 14 只。血糖测定组 10 只幼年大鼠造模成功。

2.2 体重变化

各组实验大鼠惊厥前后体重均减轻(详见表 2),幼年组减轻占惊厥前体重的 7%~8%,成年组体重减轻惊厥前体重的 5% 左右。造模前后体重差异有显著性($P < 0.001$)。

表 1 各组实验动物惊厥持续状态发作情况($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Status epilepticus in the experimental rats

组别 Groups	动物数 Number of rats	惊厥潜伏 时间/min Seizure latency	未成功诱 发惊厥数 Number of onset failure	达到 IV 级 发作未 持续 60 min Number of rats lasting <60 min	安定控制惊 厥发作时间 /min Time of seizure controlled by diazepam	成功建模数 Number of successful models
幼年 SE + ORS 组 Young SE + ORS	15	30.08 ± 9.42	0	1	5.84 ± 2.84	14
幼年 SE 组 Young SE	15	30.65 ± 8.43	0	0	5.74 ± 2.35	15
成年 SE + ORS Adult SE + ORS	15	41.21 ± 16.64	1	1	12.45 ± 9.44	13
成年 SE 组 Adult SE	15	39.04 ± 17.03	0	1	12.07 ± 9.32	14
血糖组 Blood glucose	10	36.06 ± 9.95	0	0	6.01 ± 2.83	10

表 2 各组实验动物惊厥前后体重变化情况($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Changes of body weight of the rats before and after status epilepticus

组别 Groups	惊厥前 体重/g Body weight before seizure	惊厥后 体重/g Body weight after seizure	减少体重/g Body weight loss	减少体重占惊厥 前体重百分比/% Body weight loss/b. w. before seizure
幼年 SE + ORS 组 Young SE + ORS	41.62 ± 3.34	38.72 ± 3.12 *	2.96 ± 0.94	7.11
幼年 SE 组 Young SE	41.60 ± 4.46	38.23 ± 4.31 *	3.36 ± 0.88	8.09
成年 SE + ORS 组 Adult SE + ORS	212.09 ± 20.65	200.46 ± 21.79 *	10.38 ± 6.74	4.94
成年 SE 组 Adult SE	221.70 ± 21.87	210.11 ± 21.43 *	11.59 ± 6.18	5.23

注: * 惊厥前体重与惊厥后体重相比, $P < 0.001$ 。

Note. * $P < 0.001$, comparison between the body weights before and after seizure.

2.3 死亡情况

SE 后 1、12、24、48、72、96、120 h 等 7 个时间点观察各组实验动物死亡数、记录死亡时间及死亡率。幼年组共死亡 7 只,成年组共死亡 10 只。幼年 SE + ORS 组和成年 SE + ORS 组死亡率分别为 7.14%

和 15.38%,明显低于幼年 SE 组、成年 SE 组。另外,幼年 SE 组与 SE + ORS 组、成年 SE 组与 SE + ORS 组之间死亡率差异具有显著性($P < 0.05$),各组实验大鼠死亡情况及死亡率见表 3。

表 3 各组实验动物死亡情况

Tab. 3 Mortality of the experimental animals

组别 Groups	不同死亡时间死亡数/ <i>n</i> Mortality at different times							死亡数/ <i>n</i> Death	死亡发生 时间/h Times of death after seizure	死亡率/% Mortality rate
	1 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h			
幼年 SE + ORS 组 Young SE + ORS	1	2	2	1	0	0	0	1	12	7.14 [▲]
幼年 SE 组 Young SE	0	0	0	1	0	0	0	6	15.34 ± 6.24	40.00
成年 SE + ORS 组 Adult SE + ORS	0	0	0	0	2	0	0	2	72	15.38 [*]
成年 SE 组 Adults SE	1	1	3	2	1	0	0	8	31.62 ± 22.87	57.14

注: [▲] Young SE + ORS 与 Young SE 组死亡率比较 $P < 0.05$, ^{*} Adult SE + ORS 与 Adult SE 组死亡率比较 $P < 0.05$ 。

Note. [▲] $P < 0.05$, comparison between young SE + ORS and young SE groups; ^{*} $P < 0.05$, comparison between adult SE + ORS and adult SE groups.

2.4 血糖水平

SE 组血糖 (4.69 ± 0.59 mmol/L) 较对照组 (9.37 ± 3.09 mmol/L) 明显降低, 与对照组差异具有显著性 ($P < 0.01$); SE + ORS 组 (7.12 ± 2.13 mmol/L) 血糖高于 SE 组、稍低于正常对照组, 与对照组血糖差异无显著性 ($P > 0.05$), 与 SE 组血糖差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

惊厥持续状态 (status epilepticus, SE), 是神经系统常见危重症, 可导致惊厥性脑损伤, 继发癫痫、认知障碍等后遗症。目前临床上尚没有有效的观察指标和方法, 主要借助于对动物惊厥模型的研究。氯化锂-匹罗卡品诱发大鼠惊厥持续状态模型是公认的较理想的动物模型。

本研究中, 幼年组死亡率达到 40%, 成年组甚至达 57.4%。这对需要观察惊厥后远期实验指标的研究造成了较大的工作量、较高的经济费用, 且实验一致性较低。

目前的改良方法多集中在惊厥发作期如何止惊, 而在惊厥后处理方面研究甚少。本研究发现, 尽管应用阿托品拮抗 M 胆碱能作用, 成年组体重减轻量从胡越等^[2]研究发现的每只 30 ~ 50 g 减少至 10 ~ 20 g, 但是体重仍然是明显减少的, 约占体重的 5%, 而幼年组减少量甚至占体重 7% ~ 8%。从实验大鼠惊厥发作时腺体分泌增加, 出现流涎、稀便、全身毛湿润等表现可见, 惊厥持续状态后大鼠体重减轻最可能是由于体液丢失造成。而机体处于脱水、电解质紊乱的病理状态, 这可能是 SE 后急性期实验大鼠死亡的原因之一, 因此 SE 后给予补液对

提供大鼠生存率具有重要意义。

另外, 本研究发现无论是幼年组还是成年组 SE 后死亡发生时间多集中在 SE 后 72 h 内, 尤其是 SE 后 24 h 内, 与王东梅等^[7]的报道一致。由于幼年较成年大鼠惊厥易感且耐受性更好, 因此本实验对幼年大鼠 SE 后 8 h 血糖情况作了检测发现, SE 后实验大鼠血糖水平较正常对照组明显降低。我们认为虽然 SE 后有效止惊, 但是一方面实验大鼠精神尚未恢复, 另一方面由于强直阵挛发作时间长, 有些实验大鼠自主活动严重受损, 在 SE 后 24 h 内进食能力减弱造成低血糖可能是死亡原因之一。

ORS 液是临床上较常用的口服补液盐, 对轻、中度脱水, 补充钠、钾、氯、具有治疗作用。改良的 ORS 液即加入葡萄糖, 配置成 5% 葡萄糖-ORS 液, 在 SE 后 1, 12, 24 h 根据不同年龄大鼠的胃内容量给予不同剂量灌胃后发现: (1) SE 后以改良 ORS 液灌胃可以有效升高 SE 后血糖水平, 甚至接近正常水平。 (2) SE 后给予改良 ORS 液补液可以降低实验大鼠死亡率, 幼年组降至 7.14%, 成年组降至 15.38%, 显著低于 Goodman 等^[8]发现的通过改良该模型止惊方法后的死亡率 45%。本改良方法并没有改变该模型的病理基础, Lemos 等^[9]认为大剂量匹罗卡品诱导的癫痫状态持续 60 min 者, 100% 产生反复自发性癫痫, 尽管张小东等^[4]通过重复低剂量注射匹罗卡品降低死亡率 9.7%, 接近本研究结果, 但慢性癫痫的发生率却低于该模型。 (3) 改良 ORS 液主要改善 SE 后实验大鼠急性期 (72 h) 死亡情况, 尤其是 48 h 之内, 48 h 之后, 实验大鼠进食能力基本恢复。

因此, 氯化锂-匹罗卡品诱导的大鼠惊厥持续状

态模型中,除了重复低剂量注射匹罗卡品、联用胆碱受体拮抗剂以及根据实验需要选择适当的止惊剂来提高大鼠存活率以外,对 SE 后纠正水电解质平衡的紊乱,预防低血糖对降低实验大鼠 SE 后急性期死亡率具有重要意义。SE 后 24 h 内用改良 ORS 液灌胃能有效改善实验动物死亡率,是有效提高其生存率的方法。

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] 胡越, 蒋莉. 控制氯化锂-匹罗卡品诱发惊厥持续状态发作的实验研究[J]. *儿科药杂志*, 2003, 9(4): 5 - 8.
- [3] 陈子怡, 陈树达, 周珏倩, 等. 匹罗卡品诱发癫痫持续状态模型的改良和鉴定[J]. *解剖学研究*, 2011, 33(2): 131 - 134.
- [4] 张小东, 黄敏, 许可, 等. 氯化锂-重复低剂量匹罗卡品致大

鼠癫痫模型制作[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(1): 63 - 65.

- [5] Curia G, Longo D, Biagini G, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy [J]. *Neurosci Methods*, 2008, 172(2): 143 - 157.
- [6] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281 - 294.
- [7] 王冬梅, 孙艺平, 徐静, 等. 降低氯化锂-匹罗卡品大鼠癫痫模型死亡率的实验研究[J]. *大连医科大学学报*. 2010, 32(2): 177 - 178.
- [8] Goodman JH. Experimental models of status epilepticus [M]. CRC Press; Boca Raton, 1998. 95 - 102.
- [9] Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats [J]. *Exp Brain Res*, 1995, 102(3): 423 - 428.

[收稿日期] 2015-12-29

(上接第 132 页)

织块要避免与接种部位以外的组织和器官接触,以确保肿瘤接种部位的一致性,避免肿瘤在动物腹腔内出现广泛种植。夹心法能为大批量制备肝癌原位模型节约大量时间,为肝癌原位药效学及其他生物学研究提供更便利和有效的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Yang L, Xu J, Ou D, et al. Hepatectomy for huge hepatocellular carcinoma: single institute's experience [J]. *World J Surg*. 2013, 37(9): 2189 - 2196.
- [2] Zhou GX, Gao C, Xu P, et al. Replication Methodology of Animal Models for Human Disease[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Literature Press, 2008.
- [3] 陶莹, 于玮, 王珏, 等. 裸鼠人肝癌原位移植瘤模型的建立[J]. *北京医学*, 2012, 34(12): 1065 - 1067.
- [4] 陈爽, 谢艳, 王春晖, 等. 奥曲肽致裸鼠肝癌原位移植瘤坏死的实验研究[J]. *癌症*, 2009, 28(7): 673 - 678.
- [5] 贺仕才, 仇广林, 王泽兴, 等. 小鼠左肺原位移植模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(2): 115 - 118.
- [6] 陶文照, 何德华, 康俊升, 等. 裸小鼠人肝癌移植瘤组织的体内侵袭和转移的病理观察[J]. *第二军医大学学报*, 1989,

10: 9 - 13.

- [7] 张海英, 李艳茹, 王健君, 等. 小鼠原位移植性肝癌模型的建立及生物学特性[J]. *吉林大学学报*, 2009, 35(1): 5 - 9.
- [8] 熊伟, 任正刚, 刘珊, 等. 奥沙利铂化疗对荧光 HepG2 肝癌细胞裸鼠原位移植瘤侵袭转移潜能的影响[J]. *昆明医科大学学报*, 2015, 36(8): 6 - 8.
- [9] Yamauchi K, Yang M, Hayashi K, et al. Induction of cancer metastasis by cyclophosphamide pretreatment of host mice: an opposite effect of chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 516 - 520.
- [10] 孙萍, 王怡, 孙志东, 等. 利用萤光素酶标记的肿瘤细胞建立肝癌原位移植模型及其活体成像[J]. *生物技术通讯*, 2008, 19(3): 383 - 385.
- [11] 曹阳, 韩炜, 刘洋, 等. 活体荧光成像对裸鼠肝癌细胞系 MHCC97-H 原位移植模型的动态量化分析[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(7): 1232 - 1234.
- [12] 陈惠, 李坤雨, 陈斐, 等. 用于活体成像的小鼠肝癌移植瘤模型的建立[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2012, 38(1): 10 - 15.

[收稿日期] 2015-11-23