

文章编号: 1672 - 058X(2009)01 - 0093 - 04

难治性癫痫动物模型研究进展

孔淑贞, 彭 森

(重庆工商大学 药物化学与化学生物学研究中心 重庆, 400067)

摘 要: 癫痫动物模型种类繁多, 有电刺激点燃模型, 化学点燃模型和遗传癫痫模型等多种癫痫模型, 大部分可以制备为难治性癫痫模型, 对难治性癫痫的研究和治疗药物筛选提供了有力工具; 现对不同癫痫模型的制作方法、症状表现和发病机制等方面进行综述。

关键词: 癫痫; 难治性癫痫; 动物模型;

中图分类号 R 742.1

文献标识码: A

癫痫病 (Epilepsy) 是最常见的神经系统疾病之一, 其年发病率约为 35/10 万, 患病率约 0.5%。全世界癫痫患者总数达 3 000 万人, 我国每年有 45 万新癫痫发病者, 患者总数约 650 万^[1]。其中大约有四分之一以上的病人在进行药物治疗后不能有效控制其发作, 称为难治性癫痫 (Intractable Epilepsy); 而大约有 70% 的难治性癫痫为颞叶癫痫 (Temporal lobe Epilepsy, TLE)。颞叶癫痫最显著的临床特征是长期反复出现的自发性癫痫发作 (Epileptic Seizures), 颞叶癫痫脑部出现明显的病理改变如海马硬化等, 伴随不同的临床和脑电图 (Electro-encephalogram) 的表现, 而且颞叶癫痫对大部分的抗癫痫药物具耐药性^[2], 迄今为止研究癫痫发病机理仍须依赖动物模型。癫痫的实验性研究始于 1883 年 Openchowski 等人首次采用冷冻大脑组织造成脑内致痫灶, 之后陆续有不同的方法来制备癫痫模型进行科学研究。癫痫动物模型的建立方法较多, 癫痫动物的种类各异。在此着重对难治性癫痫动物模型的制备做简要综述。

1 癫痫动物模型的制作和癫痫行为

1.1 癫痫模型的症状分级 - Racines 癫痫行为分级^[3]

前驱症状: 凝视、点头和湿狗样抖动。评价动物癫痫行为最常用的标准为 Racines 分级法, 即 0 级: 正常行为; Ⅰ级: 面部肌肉痉挛表现为咀嚼运动、眨眼、动须等, 湿狗样颤动 (wet dog shaked)。Ⅱ级: 颈部肌肉痉挛表现为点头运动。Ⅲ级: 一侧前肢阵挛。Ⅳ级: 站立伴双前肢阵挛。Ⅴ级: 在四级的基础上身体向后倒下失去平衡, 四肢抽动。判断癫痫动物模型是否符合人类癫痫的标准有两条^[4]: 模型的生物电发放和发作行为需与人类癫痫一致; 如若无发作症状, EEG 需显示有生物电异常发放, 称为癫痫样放电。难治性癫痫动物模型除具备上述特征外, 理想的动物模型还应该对大部分抗癫痫药物耐药, 而且神经病理学上特异的海马损伤与颞叶癫痫的海马硬化有关。

1.2 癫痫模型的制作

目前癫痫的实验模型很多, 据其发作情况、发作类型、制备方法可有多种分类方法, 但尚无一种模型能完美模拟人类的各种类型癫痫。

1.2.1 癫痫模型和痫性发作模型

据模型制备后的发作情况, 可分为痫性发作模型和癫痫模型。痫性发作模型指单次实验操作诱发的一

收稿日期: 2008 - 09 - 25; 修回日期: 2008 - 11 - 24。

基金项目: 重庆市教育委员会科学技术研究项目资助 (KJ 0707021)。

作者简介: 孔淑贞 (1979 -), 女, 山东省曲阜市人, 助理研究员, 从事神经退行性疾病的研究。

次急性发作模型^[5],如最大电休克模型、戊四唑模型、土的宁模型等。它们制备方法简单,在过去的一个世纪里,这些模型的应用使人们成功地发现了有效抗癫痫药。但这类模型模拟的是一次痫性发作而不是癫痫,无法研究反复发作所致的脑部病理生理的改变、发作间期状态、病灶形成过程及癫痫发病机制。故学者们又建立了癫痫模型,即可出现自发或实验诱发的反复发作,能模拟人类癫痫发作的临床和脑电图特点,并可维持一段时间的模型^[5],如氢氧化铝局部皮质植入模型、点燃模型等。

1.2.2 电刺激模型、化学模型和遗传模型

据制备方法,主要有电刺激模型、化学模型和遗传模型3种。

(1) 电刺激点燃模型。用双极漆包镍铬电极(或针灸针)植入大鼠一侧海马、杏仁核等部位,给予电流波长1ms,频率60Hz持续1s,不同实验动物选用的刺激参数不同,刺激强度不宜太强,间隔时间以24h1次最好。重复不变的亚抽搐剂量的电刺激,导致癫痫活动强度逐渐增加,最终出现全身性癫痫发作成为点燃。实验中一旦出现摔倒伴全身性抽搐即可认为动物点燃成功^[6]。点燃形成后,即使不再给予刺激,异常的EEG规律性放电可维持1a年以上,再次给予电刺激会引起阵挛性发作。一般认为低于10Hz的电刺激不易引起点燃现象^[7]。

电刺激脑许多部位可以引起点燃,杏仁核、苍白球、梨状皮质、嗅区、前新皮质、鼻内侧皮质、嗅球、隔区、视前区、尾壳核和海马等部位进行电刺激都可以引起点燃,但杏仁核是最容易引起点燃的结构^[8],目前用于难治性癫痫研究的主要是杏仁核点燃模型。点燃是在脑内形成一个致痫灶,该灶是功能性的,目前技术尚未观察到刺激部位有任何病理损伤^[9]。电点燃引起的自发性边缘系统癫痫与人类颞叶癫痫在症状学、神经病理学和行为学方面均很相似。人类癫痫发作高峰在白天的15:00以后,电点燃模型的发作高峰期在17:00,比较接近;两者都存在颞叶损伤;从刺激到自发性癫痫形成都有一个潜伏期;都有记忆和情绪缺陷存在^[10]。而且脑区电刺激点燃模型有很多优点,其操作对脑组织直接损害小,无神经毒副作用;动物模型的痫性行为稳定,与脑电变化同步;而且在电刺激的对侧脑区会出现“镜灶现象”,和人类癫痫的病理变化一致^[11]。

另外,还可以采用角膜电极,频率6Hz,波宽1ms,电流50 μ A,持续时间3s,反复刺激可制成失神发作模型。Matagne等人证明角膜电休克点燃小鼠适合于抗癫痫药物活性的基本筛选,并证明大量快速电刺激点燃小鼠并伴有持续癫痫发作的现象,类似于人类部分发作。但不能观察小鼠连续的痫性行为,死亡率高,未作为难治性癫痫动物模型应用。

(2) 化学模型包括海人酸(Kainic acid, KA)模型、PTZ模型、青霉素模型、贝美格模型等。海人酸模型,海人酸又称红藻氨酸或海藻氨酸,是从日本的一种海藻中天然提取的兴奋性氨基酸-谷氨酸的结构类似物(其神经兴奋作用比谷氨酸强30~100倍),曾被作为驱虫剂使用。最初由于其可以选择性损害脑细胞和少量轴索而引起科学家的注意。后来发现KA在海马局部应用或全身注射均有特别严重的毒性作用,在远离海马的其他脑区应用也能损伤海马;而且当其剂量很小不至于产生海马损伤时,也可以诱导海马出现痫样发作。因此,海人酸模型成为国内外广泛应用的一种癫痫动物模型。海人酸制作大鼠癫痫模型,其给药方式有两种。一种是局部给药,包括脑室内给药(剂量为0.4~1.5 μ g/kg)和脑内局部注射(海马、杏仁核、梨状叶或纹状体等)给药(剂量为0.8~2.0 μ g/kg);另一种是全身给药、皮下、静脉或腹腔内注射(剂量为4~12mg/kg)。不同的大鼠模型对海人酸的反应存在种属和个体的差异,Wistar大鼠对海人酸的敏感性要强于SD大鼠^[12];老龄大鼠要敏感于年轻的大鼠^[13]。全身或局部给药20~30min,动物出现凝视、点头和湿狗样抖动(wet dog shakes),持续约30min。于0.5~2.0min,出现反复发作的咀嚼、面部抽搐、上肢抖动、后退、站立跌倒和旋转等,发作间期渐短,发作期渐长;约2h后动物出现反复自发癫痫发作(癫痫持续状态),4h后逐渐减弱,8h后完全缓解。海人酸模型应用广泛,其特点是具有理想的颞叶癫痫的共同特征:对大部分抗癫痫药物耐药;与人类颞叶癫痫相似的癫痫发作行为特点;神经病理学上特异的海马损伤与颞叶癫痫的海马硬化有关。而KA癫痫动物模型的皮层和皮层下结构的脑电图改变可分为3期:第1期,海马局部的集丛放电。第2期,放电扩散到边缘系统的其他结构。第3期,放电继续扩散至边缘系统外的结构,如皮层等。根据症状表现可分为急性期(KA后4~7d)、潜伏期(急性期后10~30d)、慢性期。

戊四氮模型。戊四氮是作用于脑干的中枢兴奋药,能直接兴奋呼吸中枢及血管运动中枢,由于其药代动力学特点,用戊四唑致痫能引起动物抽搐迅速发生,短时间内达到高峰,并持续较短时间后自动停止。首次

腹腔注射惊厥阈下剂量 PTZ (1% PTZ 生理盐水) 40 mg/kg, 10 min 后 20 mg/kg, 以后每 10 min 腹腔注射 10 mg/kg, 直至出现 或 级抽搐发作。如此反复发作 5 d 到 1 个月, 便可以诱发自发性癫痫发作^[14]。

青霉素模型。青霉素是经典的致病剂, 其急性或点燃癫痫动物模型已获公认。青霉素是临床最常用的抗菌药物, 虽然毒性低微, 但对神经组织有一定的毒性, 大剂量可引起反射增强、肌肉痉挛、抽搐、昏迷等神经系统反应。大鼠腹腔注射青霉素, 均能成功致病, 其病性发作程度较重, 均为 ~ 级。腹腔注射青霉素 300 ~ 900 万单位 /kg, 均可引起点燃。按 900 万单位 /kg 剂量腹腔注入大鼠体内, 经过潜伏期后, 大鼠出现凝视、面肌抽搐及频繁瞬目等和人类失神性发作类似的反应。多数动物由此期进入四肢及全身抽搐^[15]。

(3) 遗传模型包括光敏感狒狒、光敏感家禽、遗传癫痫易感大鼠 (genetically epilepsy prone rat, GEPR) 和 DBA/2 鼠、蒙古沙土鼠 (*Meriones unguiculatus*)、蹒跚小鼠 (tg/tg strain) 和癫痫狗。在光的刺激下, 光敏感狒狒会出现面部、颈项、四肢肌肉的反射性阵挛继之以全身强直阵挛大发作。但这种病性发作能被临床常用的抗癫痫药物如镇静安眠剂及苯二氮卓类药物所阻断^[16]。

家禽 (雏鸡) 的发作易感性是由于纯合子常染色体隐性遗传特点引起, 其自发性发作在胚胎期及此后一生中持续发作。14 次 /s 的闪光刺激可以引起癫痫发作, 主要有头颈部肌肉痉挛、腿部肌张力消失, 最后是振翅拍打和阵挛性腿抽动; 发作期间的 EEG 表现为高频低幅放电, 强声刺激会引起光敏感家禽疯狂奔跑^[17]。

遗传性癫痫易感大鼠又分为 GEPR - 3 和 GEPR - 9 两系, 它们有不同的癫痫易患体质。相同的刺激 GEPR - 3 亚群表现为单一的奔跑继之出现全身阵挛; 而 GEPR - 9 亚群却诱导出严重的强直阵挛发作。与人类癫痫发作相似的是, GEPR - 9 亚群在多次发作之后其强直期和阵挛期的会逐渐加强。有研究表明脑干和下丘脑与这种癫痫的发作产生有密切关系, 提示人们应该把皮层下结构作为研究癫痫机制和治疗癫痫的一个靶点^[18], GEPR - 3 和 GEPR - 9 大鼠对部分抗癫痫药物有效。

一种近亲交配的蒙古沙土鼠 (*Meriones unguiculatus*) 对各种不同的刺激可表现为自发运动性发作, 其病性发作行为从强直 - 阵挛发作到死亡可分为 0 ~ 6 级。Frey 发现持续 15 s 的刺激可在 84% 的沙土鼠中产生典型的病性发作, 几种传统的和新型的抗癫痫药可以有效抑制此种癫痫模型的病性发作。

将蹒跚小鼠与倾斜小鼠 (leamer mouse, LA /La) 小鼠杂交繁殖, 获得一种杂合型小鼠 (tg/tg/LA)。此种小鼠在出生后 17 d 左右出现平衡失调, 21 d 左右出现间断性局限性发作, 25 d 后发作达高峰, 发作持续时间 70 ~ 80 min /次, 主要为一种癫痫持续状态的模型。

遗传性癫痫狗部分性发作类似于人类难治性癫痫表现, 但其胃肠蠕动快、药物代谢快, 不能使用缓释剂维持有效血药浓度。

基因敲除和转基因癫痫模型是利用基因打靶可以建立人类遗传性癫痫的动物模型, 即在培养的胚胎干细胞进行打靶可以诱导突变使突变的靶基因在动物身上得以遗传。理论上凡是在癫痫发作中神经元兴奋性增强、抑制性减弱的物质和结构其基因均可作为研究的候选靶点。基因敲除和转基因癫痫模型具有能研究癫痫相关基因相互作用的优点, 这是其他种类模型所不具备的; 但每种基因的表达和其所处的基因背景是相关的, 很多文献也指出敲除或植入的基因在不同的载体基因背景下有不同的表型^[19]。

2 致病机制的分析

癫痫动物海马病理改变主要指海马 CA3、CA1 区锥体细胞和海马门的中间神经元的死亡 (或称为缺失) 以及胶质细胞增生和苔藓纤维发芽。苔藓纤维是由齿状回颗粒细胞发出后支配海马 CA3 区的锥体细胞和门区的神经元。致病性损害在导致齿状回门区神经元死亡后, 苔藓纤维末梢会出现发芽, 芽生侧枝会回返性进入颗粒细胞层支配颗粒细胞, 有研究认为这种颗粒细胞神经回路是癫痫发作的结构基础。

癫痫的发病机制非常复杂, 兴奋性和抑制性神经递质的不平衡是导致后通路病性发放的原因之一。目前已知的神经递质主要有单胺类和氨基酸类, 每一类中又分为多个亚型, 研究较多且比较系统的有 - 氨基丁酸 (GABA)、谷氨酸 (Glu)、5 - 羟色胺 (5 - HT)、神经肽、一氧化氮 (NO) 等。从对神经元作用上看, 神经递质大体上可以分为兴奋性和抑制性两类。GABA 是脑内含量较高的重要抑制性神经递质, 分布于丘脑、基底神经核、海马、小脑等部位, 大脑中约有 40 % 的突触是 GABA 能突触。Glu 是中枢神经系统的一种兴奋

性神经递质,广泛分布于神经系统的大脑皮层、小脑、基底神经核等部位,其含量远远超过 GABA。Glu 是 GABA 合成的前身物质,脑内 Glu 大部分为中间代谢产物,仅有小部分为中枢性递质。癫痫发作时,兴奋性增高:谷氨酸释放增加及转运减少,海马神经元兴奋性氨基酸受体(NMDAR)上调;抑制性降低:谷氨酸脱羧酶在海马和杏仁核显著减少及抑制性的乙酰胆碱(GABA)能神经元的兴奋作用减弱;反复电刺激使脑内抑制性神经递质去甲肾上腺素耗尽,研究表明中枢肾上腺素受体参与杏仁核点燃过程;离子失衡:NMDA 调控离子通道发生 Ca^{2+} 大量内流,当能量耗竭或细胞内环境紊乱后,细胞即凋亡,神经元受损点燃^[20,21]。在 GEPR 的癫痫发作病因学中,去甲肾上腺素能神经元和泌血清素能神经元缺陷可能是主要的致病原因。

3 癫痫动物模型与人类颞叶癫痫

颞叶癫痫是人类最常见且难治的癫痫,其原因复杂,是很长的病生理过程。临床研究其病因及致病机理困难,建立动物模型加以研究是有效途径。为模拟人类颞叶癫痫,理想的动物模型应具备:在症状学上,海马、杏仁核和其他边缘结构占有中心地位;病理上特异的海马损伤与颞叶癫痫的海马硬化有关;有自发抽搐;与人类颞叶癫痫一样,对大部分抗癫痫药物耐受。在此所概述的几种癫痫模型虽然还不能完全模拟人类颞叶癫痫,但是还是代表了颞叶癫痫的不同特点,对于研究人类颞叶癫痫的发生发展机制和开发各种抗癫痫药物提供有力的工具。

参考文献:

- [1] 关逊. 癫痫和发作性疾病 [M]. 北京:人民军医出版社, 2001
- [2] 王尧,杜子威. 神经生物化学与分子生物学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1997
- [3] 孙艺平,张万琴,洪昭雄. 癫痫敏感大鼠脑内 GFAP-免疫反应活性的变化 [J]. 神经科学, 1996, 3 (2): 73 - 78
- [4] LOSCHER W. Animal models of intractable epilepsy [J]. ProgNeurobiol, 1997(53): 239 - 258
- [5] KUZNETSOVA G, COENEN A, MDZIANOVSKAJA I The slow potential shift during spike - wave discharges in generalized absence epilepsy [J]. Epilepsia, 38 (S3): 172
- [6] RACINE R. Modification of seizure activity by electrical stimulation . Motor seizure [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 281 - 294
- [7] KAJIR, KODAMA M, MAMURA A, et al Effect of ultrahigh - dose methylcobalam in on compound muscle action potentials in amyotrophic lateral sclerosis: a double - blind controlled study [J]. Muscle Nerve, 1998(21): 1 775 - 1 778
- [8] SHAW P. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease [J]. Neurol, Neurosurg, Psychiatry, 2005(76): 1 046 - 1 057
- [9] TIETZ E, ROSENBERG H, CHIU T A comparison of the anticonvulsant effects of 1, 4 - and 1, 5 - benzodiazepines in the amygdala - kindled rat and effects on motor function [J]. Epilepsy Res, 1989, 3(1): 31 - 40
- [10] BERTRAM E. Functional anatomy of spontaneous seizures in a rat model of limbic epilepsy [J]. Epilepsia, 1997, 38(1): 95 - 105
- [11] DAS A, KALITA J, MISRA U. Recurrent Guillain Barre syndrome [J]. Electromyogr Clin Neurophysiol 2004, 44(2): 95 - 102
- [12] GOLDEN G, SMITH G, FERRARO T, et al Strain differences in convulsive response to the excitotoxin kainic acid [J]. Neurol Report, 1991, 2(3), 141 - 144
- [13] DAWSON R, WALLACE, D. Kainic acid - induced seizures in Nenurol aged rats: neurochemical correlates [J]. Brain Res Bull, 1992(29): 459 - 468
- [14] HUSSENET F, BOYET S, NEHLIGA. Long - term metabolic effects of pentylenetetrazol - induced status epilepticus in the immature rat [J]. Neuroscience, 1995, 67(2): 455 - 461
- [15] SNEAD O. gamma - Hydroxybutyrate model of generalized absence seizures: further characterization and comparison with other absence models [J]. Epilepsia, 1988, 29(4): 361 - 368
- [16] FISHER R. Animal models of the epilepsies [J]. Brain Res Rev, 1989, 14: 245 - 278

(下转第 100 页)

参考文献:

- [1] 王天聪. 对高师体育专业学生裁判能力培养的理论与实践 [J]. 淮北煤炭师范学院学报, 2005, 26(4): 74 - 76
- [2] 常冬冬等. 体育专业学生篮球裁判能力的培养 [J]. 平顶山学院学报, 2005, 20(2): 96 - 98
- [3] 王霞. 浅谈普通高校篮球专项班学生裁判技能的培养 [J]. 湖北体育科技, 2006, 25(1): 122 - 123

Research into the reform of judge ability cultivation of selected basketball course of sports major

LIU Fang, XDNG Gao, LIYU - zhong, ZENG Ming - liang

(School of Physical Education, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: According to the social demand of basket judge talents, the reform is conducted on teaching guiding line, teaching content and method, and examination contents and methods of basketball course of sports major of Chongqing Technology and Business University. The combination of theoretical course with practical course creates on - spot judge practice opportunity, raises judge ability of basketball competition, raises passing rate of national second level basketball judge examination and provides the students with good platform to demonstrate their ability.

Keywords: sports education; selected basketball; judge ability; cultivation; reform

责任编辑:代晓红

(上接第 96 页)

- [17] BATNIC, TELLETM, NAQUET R, et al Branchimeras inbirds: application to the study of a genetic form of reflex epilepsy [J]. Trends Neurosci, 1996(19): 246 - 252
- [18] MATTHEW. Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders [J]. Epilepsy&Behavior, 2001. 2 201 - 2 216
- [19] ELYSE P. Complications associated with genetic background effects in models of experimental epilepsy [J]. Prog - Brain - Res 2002, 135(1): 139 - 148
- [20] 贺侃. 即刻早期基因与癫痫 [J]. 国外医学. 儿科分册, 2002, 29(1): 372 - 391
- [21] 岳旺,张芳. 肾上腺素受体拮抗对点燃的调控机理 [J]. 药学报, 2000, 35(12): 8 862 - 8 891

Research progress in intractabl seizure animal models

KONG Shu - zhen, PENG Sen

(Pharmaceutical Chemistry and Biochemical Research Center, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: There are a variety of epileptic animal models such as kindling epileptic models with electrostimulation, chemical kindling epileptic models and inherited epileptic models. Most of them are intractable epilepsy animal models and are useful for researching intractable seizure and screening effective drugs. This paper reviews making methods of different epileptic models, their symptoms and pathogenesis and so on.

Keywords: epilepsy; intractable seizure; animal model

责任编辑:代晓红