

· 基础研究 ·

低频重复经颅磁刺激预处理对匹鲁卡品致痫大鼠的影响

黄敏 余巨明 王晓明 王莉

【摘要】目的 探讨低频经颅磁刺激(TMS)对匹鲁卡品致痫大鼠痫性发作的影响。**方法** 共选取 50 只成年雄性清洁级 Wistar 大鼠,根据预先设定的磁刺激频率将其分为 0 Hz 组(假刺激组)、0.3 Hz 组、0.5 Hz 组、0.8 Hz 组及 1.0 Hz 组,各组大鼠经相应频率磁刺激预处理后,将其制成氯化锂-匹鲁卡品急性癫痫模型。观察各组大鼠在注射匹鲁卡品 90 min 内痫性发作的潜伏期及痫性发作行为学表现。**结果** 与假刺激组比较,各磁刺激组癫痫发作潜伏期均明显延长,与假刺激组间差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01);与 0.3 Hz 组及 1.0 Hz 组比较,0.5 Hz 组及 0.8 Hz 组潜伏期延长更显著,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与假刺激组比较,0.3 Hz 组及 1.0 Hz 组大鼠癫痫发作程度与其无明显差异($P > 0.05$),但 0.5 Hz 组及 0.8 Hz 组癫痫发作程度较其明显减轻,癫痫严重程度评分显著低于另外 3 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 0.3 ~ 1.0 Hz 低频 TMS 预处理均可有效延长大鼠癫痫发作潜伏期,并且以 0.5 Hz 及 0.8 Hz 低频 TMS 的抗癫痫作用较为显著。

【关键词】 经颅磁刺激; 癫痫; 潜伏期; 痫性发作; 锂-匹鲁卡品

The effects of pretreatment with low-frequency transcranial magnetic stimulation on rats with pilocarpine-induced seizures HUANG Min, YU Ju-ming, WANG Xiao-ming, WANG Li. Department of Neurology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

Corresponding author: YU Ju-ming, Email: huangmin_1979@qq.com

【Abstract】Objective To study the effects of low-frequency transcranial magnetic stimulation (TMS) on rats with seizures induced by lithium-pilocarpine. **Methods** Rats were randomly divided into five groups and pretreated with TMS at 75% of the stimulator's maximum output, but at 0 Hz (the sham group), 0.3 Hz, 0.5 Hz, 0.8 Hz and 1.0 Hz, respectively. After stimulation every day for 2 weeks, a model of acute epilepsy was induced using lithium-pilocarpine. Subsequent behavior and the latencies of seizures were observed, and the severity of the seizures was quantitatively evaluated for 90 min. **Results** The seizure latencies were significantly prolonged in all the other groups relative to the sham group ($P \leq 0.05$). The prolongation in the 0.5 Hz and 0.8 Hz groups was significantly greater than in the 0.3 Hz and 1.0 Hz groups. The severity of seizures in the 0.3 Hz and 1.0 Hz groups was not significantly different from that in the sham group, but most of the rats in the 0.5 Hz group and the 0.8 Hz group experienced much lighter seizures, with seizure severity scores significantly lower than those in the other 3 groups. **Conclusions** Pretreatment with TMS at 0.3 to 1.0 Hz led to a longer latency of seizure onset. 0.5 Hz and 0.8 Hz gave the longest latencies and showed conspicuous antiepileptic effects.

【Key words】 Transcranial magnetic stimulation; Epilepsy; Latency; Epileptic seizures; Lithium-pilocarpine

癫痫是一组以脑部神经元异常放电导致中枢神经系统突然反复或短暂功能失常为主要特征的临床综合征,系神经系统常见多发病之一。近年来,寻找安全、高效、无依赖性的癫痫治疗方法一直是国内外

临床研究的热点课题。经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)是一种能够在脑深部诱发感应电流并影响相应部位神经细胞功能的无创干预手段,它具有穿透力强、非侵入性及无痛感等优点。自 20 世纪末以来, TMS 已广泛应用于神经科学基础和临床研究等多个领域。有关 TMS 治疗癫痫方面的研究国内报道甚少,国外也处于早期探索阶段。目前初步研究结果表明,低频重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)具有抑痫作

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.04.004

基金项目:四川省科技厅攻关课题(05SCT022-016)

作者单位:637000 南充,四川省南充市川北医学院附属医院神经内科

通信作者:余巨明;Email:huangmin_1979@qq.com

用^[1,2],而高频 rTMS 则具有致病作用^[3,4]。本研究采用一系列低频(0.3 Hz、0.5 Hz、0.8 Hz 和 1.0 Hz) TMS 分别预处理实验大鼠,然后再将其制成匹鲁卡品急性癫痫模型,以探讨低频 TMS 预处理是否对其致病作用有影响,并从中筛选出可能的最佳刺激频率,进而为 TMS 用于癫痫临床治疗提供参考数据。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及药物

共选取健康成年雄性清洁级 Wistar 大鼠 50 只,体重 200~250 g,均购于四川大学实验动物中心,所有大鼠在室温、自然光照(自然昼夜循环)环境下摄食、饮水。上述大鼠于实验开始前饲养 1 周,观察期间无自发性癫痫发作者入选。本研究用到的主要药品如下:匹鲁卡品(5.0 g/瓶)、东莨菪碱(5.0 g/瓶)均购于美国 Sigma 公司,氯化锂(500 g/瓶)及 10% 水合氯醛均购于上海生物技术有限公司。

二、实验动物分组及处理

将上述大鼠按预先设定的磁刺激频率(0 Hz、0.3 Hz、0.5 Hz、0.8 Hz 及 1.0 Hz)随机分为 5 组(每组 10 只),其中 0.3 Hz 组大鼠磁刺激参数如下:选用 Maglite-r25 型磁刺激仪,选择“8”字形磁刺激线圈(线圈尺寸为 5 cm×9 cm),将“8”字形线圈中心对准大鼠矢状缝中央点,并使线圈平面与顶骨面平行,确保线圈表面紧贴大鼠头皮组织,设置磁刺激频率为 0.3 Hz,调整磁刺激仪输出量为 75%,连续刺激 100 次为 1 个序列,每个刺激序列间隔 2 min,每天共刺激 5 个序列,连续刺激 14 d;0 Hz 组为假刺激组,只施予同等数量的“假性”磁刺激,期间设置磁刺激仪无能量输出;其它各磁刺激组大鼠除磁刺激频率不同以外,其它磁刺激参数均与 0.3 Hz 组一致。

三、急性癫痫大鼠模型制作及行为学观察

各实验组大鼠经连续 14 d 磁刺激预处理后,随即按 3.175 ml/kg 体重腹腔注射氯化锂(浓度为 30 mg/ml),注射 16~24 h 后按 1 mg/kg 体重腹腔注射东莨菪碱,30 min 后按 30 mg/kg 体重腹腔注射匹鲁卡品。根据 Rudge 等^[5]制定的标准观察大鼠注射匹鲁卡品后 90 min 内的行为学表现,并对其癫痫发作程度进行评分:0 分表示大鼠行为正常;1 分表示大鼠耳、面部抽搐;2 分表示大鼠全身轻微颤抖;3 分表示大鼠全身显著颤抖、尾巴强直、行走困难;4 分表示大鼠前肢阵挛;5 分表示大鼠四肢强直、阵挛伴跌倒;6 分表示大鼠呈癫痫持续状态;7 分代表大鼠死亡。以大鼠注射匹鲁卡品至首次出现耳、面部抽搐

的时间作为痫性发作潜伏期,出现频繁或持续 30 min 以上的肢体阵挛或全身性强直阵挛即认定达到癫痫持续状态。当大鼠癫痫状态持续时间达 60 min 时,腹腔注射 10% 水合氯醛(300 mg/kg 体重)终止癫痫发作。所有观察大鼠行为的研究人员均经过严格培训,熟悉大鼠癫痫发作时的行为学表现及评分标准,并对大鼠具体分组情况不知情。

四、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 版统计学软件包进行数据处理,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用方差齐性检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠痫性发作潜伏期比较

与假刺激组比较,各磁刺激组(包括 0.3 Hz 组、0.5 Hz 组、0.8 Hz 组、1.0 Hz 组)大鼠痫性发作潜伏期均明显延长,且与假刺激组间差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01);各磁刺激组间比较发现,0.5 Hz 组及 0.8 Hz 组大鼠痫性发作潜伏期均明显长于 0.3 Hz 组及 1.0 Hz 组,组间差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);0.5 Hz 组与 0.8 Hz 组比较,组间差异无统计学意义($P > 0.05$),提示在本研究条件下,0.3 Hz、0.5 Hz、0.8 Hz 和 1.0 Hz 低频 rTMS 均能明显延长匹鲁卡品致痫大鼠的发作潜伏期,并且以 0.5 Hz 和 0.8 Hz 低频 rTMS 的癫痫抑制作用较显著,具体数据详见表 1。

表 1 各组实验大鼠痫性发作潜伏期比较(min, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	痫性发作潜伏期
假刺激组	10	12.80 ± 3.20
0.3 Hz 组	10	16.30 ± 3.10 ^a
0.5 Hz 组	10	18.60 ± 3.50 ^b
0.8 Hz 组	10	18.20 ± 3.60 ^a
1.0 Hz 组	10	15.90 ± 4.10 ^{ac}

注:与假刺激组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 0.5 Hz 组和 0.8 Hz 组比较,^c $P < 0.05$

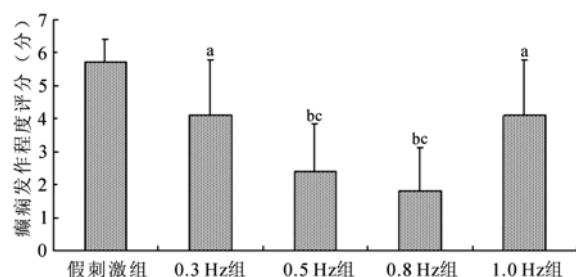
二、各组大鼠癫痫发作程度比较

在注射匹鲁卡品后 90 min 观察期内,发现各实验组大鼠均无抽搐、死亡现象。假刺激组大鼠癫痫发作程度较重,癫痫发作评分相对较高,多在 4~6 分;而各磁刺激组大鼠癫痫发作程度较轻,癫痫发作评分相对较低,多在 2~5 分,具体数据详见表 2。经统计学分析后发现,各磁刺激组大鼠癫痫发作程度均明显轻于假刺激组,其中 0.5 Hz 组及 0.8 Hz 组与假刺激组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$);各磁刺激组间比较发现,0.5 Hz 组及 0.8 Hz 组大鼠癫痫

发作程度相对较轻,与 0.3 Hz 组及 1.0 Hz 组比较,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),具体情况详见图 1。

表 2 各组实验大鼠癫痫发作程度比较(只)

组 别	只数	癫痫发作评分							
		0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	5 分	6 分	7 分
假刺激组	10	0	1	1	1	2	4	1	0
0.3 Hz 组	10	0	1	1	2	2	3	1	0
0.5 Hz 组	10	0	3	4	0	2	1	0	0
0.8 Hz 组	10	0	6	2	1	0	1	0	0
1.0 Hz 组	10	0	1	2	1	2	3	1	0



注:与假刺激组比较,^a $P > 0.05$,^b $P < 0.01$;与 0.3 Hz 组及 1.0 Hz 组比较,^c $P < 0.05$

图 1 各组大鼠癫痫发作程度比较

讨 论

匹鲁卡品是胆碱能毒蕈碱类受体激动剂,能通过兴奋胆碱能受体、激活兴奋性谷氨酸系统诱发急性癫痫发作及癫痫持续状态,并导致海马等脑易损区兴奋性毒性损伤^[6]。氯化锂对匹鲁卡品的致病过程具有协同效应,可降低其诱发性发作的阈值而减少用量及抑制毒副作用^[7]。匹鲁卡品致病模型包括急性癫痫模型和慢性癫痫模型,其中急性癫痫模型具有制作简单、发作潜伏期相对固定、行为学改变明显且稳定、癫痫持续状态发生率高(约有 60% ~ 80%)等特点^[8,9],因此急性癫痫模型易于观察和比较不同 TMS 预处理对癫痫发作的影响,从而最大程度保证研究结果的可靠性及可信度。

目前临床上即使采用新型的抗癫痫药物,也仍有 20% ~ 30% 的癫痫患者疗效不佳,且药物治疗可产生严重不良反应。受临床采用深部脑刺激治疗运动障碍性疾病及刺激迷走神经治疗难治性癫痫的启发,目前关于脑刺激治疗癫痫方面的研究正日益受到人们关注,现阶段国外正在进行反应性皮质刺激(responsive cortical stimulation)治疗难治性癫痫的疗效及安全性多中心研究^[10];但无论是刺激外周迷走神经还是刺激中枢神经都是有创性的,并且治疗技术要求高、费用昂贵,在国内不容易推广普及;而 TMS 具有穿透性强、安全性高、非侵入性等优点,能

直接在患者头皮处进行刺激,技术难度相对较低,因此研究 TMS 治疗癫痫在我国更具有现实意义。目前国外在 TMS 治疗癫痫方面已取得初步成果,如 Akamatsu 等^[1]报道采用“8”字型线圈对急性致病大鼠(由戊四氮诱发)进行 0.5 Hz,1 000 次脉冲刺激的低频 TMS 干预,发现可延长癫痫发作潜伏期,有效抑制癫痫持续状态形成。Kinohita 等^[11]对 7 例难治性颞叶外侧癫痫患者给予 0.9 Hz、90% 静息运动阈值(resting motor threshold, rMT)的 TMS 治疗,每天 2 次,每次刺激 7 min,连续刺激 5 d,2 周后发现患者复杂部分发作频率及单纯部分发作频率分别减少了 35.9% 和 7.4%。Joo 等^[12]将 35 例难治性癫痫患者分为局灶和非局灶性癫痫组,每组又根据 TMS 脉冲次数(3 000 及 1 500 次脉冲刺激)细分为 2 亚组,连续 5 d 给予 0.5 Hz、100% rMT 强度的 TMS 治疗,观察 TMS 作用后 8 周内患者每周的癫痫发作频率,并记录 TMS 刺激前后患者的脑电图情况,结果显示患者平均每周的癫痫发作频率没有明显减少,但脑电图棘尖波的发放次数明显减少,其中有 6 例患者棘尖波完全消失^[12]。上述研究结果表明 TMS 能在一定程度上抑制痫样放电及/或癫痫发作,但还有许多疑问甚至矛盾之处,可能与各研究使用的磁刺激频率、强度及作用时间等参数不同有关。

本研究给予实验大鼠不同频率的 TMS 预处理,然后观察匹鲁卡品的致病作用,结果显示 0.3 Hz、0.5 Hz、0.8 Hz 及 1.0 Hz TMS 预处理均能显著延长大鼠癫痫发作潜伏期,并且以 0.5 Hz 及 0.8 Hz 磁刺激的抗癫痫作用最显著,大鼠癫痫发作潜伏期也最长;另外本研究结果还显示,0.3 Hz 和 1.0 Hz 磁刺激虽有一定的抗癫痫作用,但大鼠癫痫发作程度与假刺激组比较,组间差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),而 0.5 Hz 和 0.8 Hz 磁刺激均具有显著抗癫痫作用,2 组大鼠癫痫发作程度整体较轻,癫痫发作程度评分多集中在 1 ~ 2 分,且无一只大鼠出现癫痫持续状态,与假刺激组比较,组间差异具有统计学意义($P < 0.01$)。以上结果表明, rTMS 预处理能显著降低实验大鼠神经元兴奋性,提高癫痫发作阈值,延缓癫痫发作时间,提示 rTMS 预处理可能诱发脑内癫痫抑制机制发挥作用,从而为临床研究癫痫发生机制提供新的手段,也为癫痫的治疗及预防提供参考依据;另一方面在磁刺激强度一定的情况下,磁刺激频率对 rTMS 生理效应影响显著,其微小变化即可明显影响治疗效果,如本研究结果显示 0.5 Hz、0.8 Hz 磁刺激能显著延长大鼠癫痫发作潜伏期及抑制癫痫发作,抗痫效果明显优于 0.3 Hz 及 1.0 Hz 磁刺激,提示在采用 rTMS 治疗及研究癫痫时,0.5 Hz 和 0.8 Hz

刺激频率可作为优先选择。

综上所述,本研究结果初步证实了 0.5 Hz 及 0.8 Hz 低频 rTMS 预处理能显著延缓实验大鼠癫痫发作,明显减轻癫痫发作程度,为临床采用 rTMS 治疗癫痫患者提供了实验依据,也为癫痫发病机制研究提供了新的手段。

参 考 文 献

- [1] Akamatsu N, Fueta Y, Endo Y, et al. Decreased susceptibility to pentylene-tetrazol induced seizures after low frequency transcranial magnetic stimulation in rats. *Neurosci Lett*, 2001, 310:153-156.
- [2] Felipe F, Sigride TS, Felix B, et al. Antiepileptic effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with cortical malformations: an EEG and clinical study. *Stereotact Funct Neurosurg*, 2005, 83:57-62.
- [3] Anand S, Hotson J. Transcranial magnetic stimulation: neurophysiological applications and safety. *Brain Cogn*, 2002, 50:366-386.
- [4] Cantello R, Rossi S, Varrasi C, et al. Slow repetitive TMS for drug-resistant epilepsy: clinical and EEG findings of a placebo-controlled trial. *Epilepsia*, 2007, 48:366-374.
- [5] Rudge JS, Mather PE, Pasnikowski EM, et al. Endogenous BDNF protein is increased in adult rat hippocampus after a kainic acid induced excitotoxic insult but exogenous BDNF is not neuroprotective. *Exp Neurol*, 1998, 149:398-410.
- [6] Fujikawa DG. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res*, 1996, 725:11-12.
- [7] Brigitte VP, Estelle K, Hervé K, et al. Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, 2004, 17:385-402.
- [8] Cavalheiro EA, Santos NF, Priel MR. The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia*, 1996, 37:1015-1019.
- [9] Jankowsky JL, Patterson PH. Differential regulation of cytokine expression following pilocarpine-induced seizure. *Exp Neurol*, 1999, 159:333-346.
- [10] Sun FT, Morrell MJ, Wharen RE. Responsive cortical stimulation for the treatment of epilepsy. *Neurotherapeutics*, 2008, 5:68-74.
- [11] Kinoshita M, Ikeda A, Begum T, et al. Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation for seizure suppression in patients with extratemporal lobe epilepsy. *Seizure*, 2005, 14:387-392.
- [12] Joo EY, Han SJ, Chung SH, et al. Antiepileptic effects of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation by different stimulation durations and locations. *Clin Neurophysiol*, 2007, 118:702-708.

(收稿日期:2008-08-29)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

上海国际骨科康复学术会议暨第一届现代关节外科康复学讲习班会议通知

由上海交通大学医学院附属第九人民医院、上海交通大学 Med-X 研究院共同主办,上海交通大学康复医学工程研究所、上海市康复医学工程研究会共同承办,上海市残疾人联合会、香港“站起来计划”、上海市康复医学会共同指导与支持的上海国际骨科康复学术会议暨第一届现代关节外科康复学讲习班将于 2009 年 5 月 28 日至 31 日在上海交通大学浩然高科技大厦会展中心召开。参会者将授予国家级继续教育 I 类学分 8 分。

本次会议邀请来自海内外著名骨科及康复专家何兆邦(美)、陈启明(港)、冯贵游(港)、柴惠敏(台)、戴尅戎、励建安、李建军、黄东锋、严隽陶等,围绕震后康复、现代骨科康复学新进展两大主题,着重对震后康复、骨科康复治疗技术新进展、康复医学工程的前沿进展、关节稳定性训练与关节松动术、关节外科康复、脊柱外科康复 6 个专题展开深入讨论。会议后半程将同步举行“骨科转化性研究与前沿技术国际研讨会”,会议议题中骨软骨代谢的力学调节、老年骨骼健康、运动医学中的软组织问题、脊柱退变性疾病生物学治疗等与骨科康复学息息相关。大会诚挚邀请国内外康复、骨科及工程技术人员与会。

报到时间:2009 年 5 月 28 日上午;报到地点:上海交通大学浩然高科技大厦会展中心;会议注册:500 元/人,若同期参加骨科转化性研究与前沿技术国际研讨会 800 元/人;联系方式:上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科(上海制造局路 639 号,邮编:200011);联系电话/传真:(021)63139920;Email: 91guke@163.com;联系人:水汶、殷宁