

· 基础研究 ·

低频经颅磁刺激对匹罗卡品致痫大鼠癫痫发作及海马细胞神经肽 Y 表达的影响

王永利 霍小林 张建宁 翟煜

【摘要】 目的 观察低频经颅磁刺激(LF-TMS)对匹罗卡品(PLO)致痫大鼠皮质脑电图及大鼠海马各区神经肽 Y(NPY)表达的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为对照组(PLO 组)、干预组(PLO + LF-TMS 组)。各组给予相关干预处理后腹腔注射 PLO 建立癫痫模型,观察皮质脑电图及海马 HE 染色、NPY 免疫组化染色观察。**结果** 两组间皮质脑电图指标比较,发现磁刺激干预后潜伏期延长,痫波频率及大发作次数降低。HE 染色显示,对照组海马各区神经元显著变性、死亡,以海马 CA3 区明显;干预组海马各区神经元损害减轻。NPY 的免疫组化染色显示对照组各时间点海马各区 NPY 阳性细胞增多,明显高于干预组,差异有统计学意义。**结论** LF-TMS 不仅可以延迟 PLO 癫痫点燃的形成,还可以缓解点燃后的癫痫发作程度;LF-TMS 可明显影响海马各区 NPY 阳性细胞数。NPY 与癫痫发作程度相关,提示 NPY 表达与癫痫之间关系紧密,NPY 可能具有抗痫和神经保护作用。

【关键词】 低频经颅磁刺激; 癫痫; 海马; 神经肽 Y; 匹罗卡品; 大鼠

Low frequency transcranial magnetic stimulation changes seizure and neuropeptide Y expression of hippocampal neurons in rats epilepsy induced by pilocarpine WANG Yong-li, HUO Xiao-lin, ZHANG Jian-ning, ZHAI Yu. Department of Neurosurgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin300052, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of low frequency transcranial magnetic stimulation (LF-TMS) on the electroencephalogram (EEG), expression of NPY in hippocampus in pilocarpine (PLO)-induced epileptic rats. **Methods** Forty male Sprague-Dawley rats (240-260 g) were used to establish a model of epilepsy by intraperitoneal injection of pilocarpine, and then randomized into 2 groups: a control group and an intervention group. The control group was treated by sham LF-TMS, while the intervention group was treated by LF-TMS once daily for 7 days. I group simply celiac inject pilocarpine. II group celiac inject PLO after LF-TMS. The EEG was recorded in both groups and the checked pathology. Pathological item include HE staining, NPY immunohistochemical staining. **Results** The latency for seizure attack was significantly lengthened, while the frequency of seizure attack and times of major seizure attack were significantly decreased in the intervention group. The HE staining revealed significant degeneration and necrosis of neurons in the hippocampus, especially in the CA3 region, in rats in the control group. The pathologic changes were significantly less severe in the intervention. Immunohistochemical staining showed a significantly higher expression of NPY in the hippocampus as compared with the intervention group. **Conclusion** Using the PLO-induced epilepsy model, LF-TMS could not only postpone the generation of kindling but also inhibit the progress of epilepsy. The increased NPY expression in the hippocampus in the intervention group implied a close relationship between NPY and epilepsy attack.

【Key words】 Low frequency transcranial magnetic stimulation; Epilepsy; Hippocampus; Neuropeptide-Y

磁刺激是一种能够在神经深层处产生感应电流,从而影响相应脑部神经细胞的无创方法,它具有穿透力强、非侵入性和无痛感等优点。从 20 世纪末,已应用于神经科学基础和临床研究、疾病诊治等方面。本实验通过观察低频经颅磁刺激(low frequency transcranial magnetic stimulation, LF-TMS)对匹罗卡品(pilocarpine, PLO)致痫大鼠脑电和海马区神经肽 Y(neuropep-

tide Y, NPY)表达的影响,以探讨 LF-TMS 对癫痫的作用。

材料与方法

一、实验动物和分组

健康纯系 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 59 只,雄性,体重(240 ± 20) g,动物级别 II 级,实验动物质量合格证编号为:0046906。体重(240 ± 20) g,由北京军事医学科学院实验动物中心提供。常规分笼饲养,自然照明,随意饮水和取食。随机分为对照组(PLO 组)20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目批准号 50307013)

作者单位:300052 天津,天津医科大学总医院神经外科

只,干预组(PLO + LF-TMS 组)20 只。两组动物中,分别取其中 5 只进行皮质脑电图检测,另 15 只行病理检测。两组动物均腹腔注射 250 mg/kg 体重剂量的 PLO,建立颞叶癫痫模型(参考 Racine 的标准,根据动物行为表现将癫痫发作分为 5 级:Ⅰ级,节律性的嘴和面部运动(咀嚼、头部阵挛);Ⅱ级,点头;Ⅲ级,前肢阵挛;Ⅳ级,身体上举;Ⅴ级,身体上举并跌倒)。将Ⅲ级以上发作定为癫痫模型成功的标准,未达标准动物从组中剔除,另行补充。

二、药品和试剂

PLO、多聚甲醛均购自 Sigma 公司;PBS 磷酸盐缓冲液,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;NPY 多克隆抗体(1:80)、羊抗兔 IgG(1:150)均购自 Sigma 公司;水合氯醛,分析纯,购自天津市化学试剂厂。

三、经颅磁刺激方法

应用美国 Cadwell 公司的 MES210 型磁刺激器,刺激线圈为“8”字形,尺寸为 5 cm × 9 cm。将“8”字线圈中心对准动物矢状缝上的中央点,使线圈平面平行于顶骨,线圈表面紧贴头皮。刺激频率为 0.5 Hz,强度 0.4 T,磁刺激时程 0.2 ms,每次刺激 40 s,每天 1 次。干预组大鼠连续刺激 7 d,对照组大鼠不予经颅磁刺激,只予同样刺激次数的声音相似的“假性”刺激。

四、皮质脑电图检测

两组各取 5 只大鼠安置脑电记录电极[水合氯醛腹腔注射麻醉(300 mg/kg 体重)]后,将大鼠固定于立体定位仪上,双侧额叶皮质、顶叶皮质相对应部位的颅骨上各开一个直径为 1 mm 的骨孔,放置一个直径为 1 mm 的银、氯化银球形记录电极。参考电极置于前囟后 2 mm)。于术后休养 3 d,对照组于手术 3 d 后给予假性刺激 7 d;干预组于手术 3 d 后给予磁刺激 7 d。刺激 7 d 后,2 组均即刻观察皮质脑电图,连接记录装置,检查脑电图记录正确,可靠后,腹腔注射 250 mg/kg 体重剂量的 PLO 建模,然后,连续记录 2 h 皮质脑电图。

五、皮质脑电图分析指标

①潜伏期:从腹腔注射 PLO 开始到脑电图首次出现痫波[包括(尖)波、棘(尖)-慢波、多棘慢波]的时间;②痫波频率:每间隔 12 min 计数 1 个时程为 1 min 的脑电图中棘波/尖波的数值,2 h 脑电图共采集 10 个数值,其均数作为平均每分钟痫波频率;③大发作次数:脑电图为连续痫波且时间超过 10 s 视为 1 次大发作。每组数据均计算其平均值与标准差。

六、病理观察

对照组余 15 只大鼠给予假性刺激 7 d;干预组余 15 只大鼠给予磁刺激 7 d。2 组均在刺激 7 d 后,即刻以 250 mg/kg 体重剂量腹腔注射 PLO 建模。于建模

成功后 24, 48, 72 h 每组各取 5 只大鼠,用水合氯醛腹腔注射(350 mg/kg 体重)麻醉后,开胸行升主动脉灌注(4℃生理盐水 250 ml, 4℃ 4%多聚甲醛 250 ml),取脑,于 4%多聚甲醛液中固定过夜,取海马最大剖面冠状切开,石蜡包埋,做厚度为 6 μm 切片,行 HE、NPY 免疫组化染色。

七、NPY 检测

检测原理:应用 Histontain-SP(链霉卵白素-过氧化物酶)试剂盒检测,采用第二代 LAB-SA 技术。采用亲和纯化的二抗和链霉卵白素-过氧化物酶耦合物,检测已结合于组织细胞抗原上的一抗,所形成的抗原/抗体/酶复合物通过酶催化底物反应,从而确定抗原的位置和分布。检测步骤从略。NPY 阳性细胞计数:在光学显微镜下,齿状回、CA1 区、CA3 区在高倍视野(在目镜 10 倍,物镜 20 倍)下以 130 μm × 130 μm 网格随机取 6 个面积各为 0.0169 m² 内的 NPY 阳性细胞数,用图像分析系统检测颗粒细胞层 NPY 阳性反应密度比值,每组数据均计算其平均值与标准差。

八、统计学分析

两组的皮质脑电指标、2 组各时点海马各区 NPY 表达阳性细胞数以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 10.0 统计软件分析,按单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、为完成检测样本数值,对照组共使用 29 只大鼠建模,未达标剔除大鼠 9 只,建模成功率为 69% (20/29);干预组共使用 28 只大鼠建模,未达标剔除大鼠 8 只,建模成功率为 71% (20/28)。组间建模成功率比较, $P > 0.05$, 无统计学差异。

二、皮质脑电图指标

对照组建模后 2 ~ 10 min 内出现痫波放电,开始为散发性出现,20 ~ 30 min 后癫痫波频率增加,建模后 1 h 左右发作达到高峰状态,经 2 h 左右逐渐缓解。干预组建模后,其痫样放电出现的潜伏期明显延长,痫波放电频率和大发作次数明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 对照组和干预组的潜伏期、痫波频率和大发作次数比较 ($\bar{x} \pm s$)

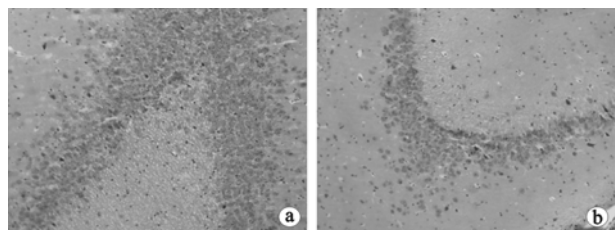
组 别	n	潜伏期 (s)	痫波频率 (次/min)	大发作次数
对照组	5	117.6 ± 37.13	386.68 ± 60.38	94.20 ± 23.20
干预组	5	169.40 ± 65.47 ^a	278.30 ± 54.60 ^a	69.30 ± 9.63 ^a

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$

三、对照组与干预组海马区 HE 染色的比较

对照组海马神经元普遍受到损伤,尤以 CA3 区神

神经元受损严重。细胞体积明显变小,细胞排列不整齐、稀疏,细胞间隙增大,胞体不规则,细胞突起明显减少,胞核固缩,核仁不明显,损伤严重者细胞轮廓不明显。在 CA1 区可看到死亡的细胞散布其间,这些死亡的细胞胞核裂解,细胞浆消失。干预组经 LF-TMS 干预后,CA1、CA3 区细胞损伤现象减少(图 1)。



注:a. 对照组动物 CA3 区神经元;b. 干预组动物 CA3 区神经元

图 1 对照组、干预组 CA3 区神经元比较(HE 染色, $\times 100$)

四、NPY 检测

建模后对照组各区 NPY 阳性细胞数增多,以 CA3 区阳性细胞数最多,建模后随着时间延长,CA1、CA3 区 NPY 阳性细胞数持续增加,在齿状回 NPY 阳性细胞数平稳。干预组海马各区均有少数 NPY 阳性细胞,以 CA3 区数量最多,建模后随着时间延长,各区的阳性细胞数保持稳定。两组间数据比较,对照组各区各时点阳性细胞数均明显高于干预组, $P < 0.05$,差异有统计学意义(表 2、图 2)。

表 2 对照组、干预组大鼠各时间点海马各区 NPY 阳性细胞计数(个, $\bar{x} \pm s$)

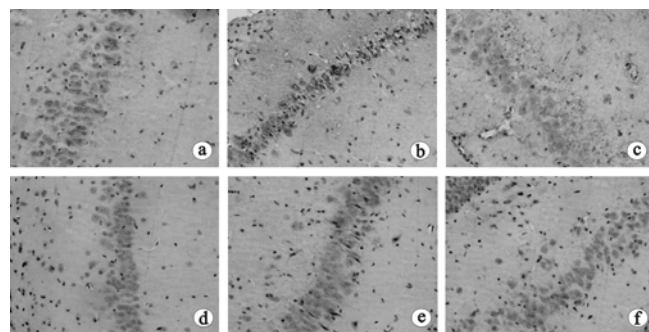
组 别	CA1 区	CA3 区	齿状回
对照组($n=15$)			
24 h($n_1=5$)	37.60 ± 4.98	49.20 ± 10.38	31.20 ± 3.83
48 h($n_2=5$)	55.20 ± 4.09	64.60 ± 11.10	31.60 ± 1.14
72 h($n_3=5$)	60.00 ± 1.00	80.67 ± 8.39	29.33 ± 1.53
干预组($n=15$)			
24 h($n_1=5$)	27.40 ± 3.35	34.60 ± 2.13	22.80 ± 1.79
48 h($n_2=5$)	32.60 ± 1.14	45.00 ± 5.52	22.90 ± 0.84
72 h($n_3=5$)	33.40 ± 3.05	48.40 ± 1.95	22.20 ± 2.17

注:两组间各时间点海马相同区域阳性细胞计数比较,均 $P < 0.05$

讨 论

海马为癫痫发生的重要结构,在癫痫形成过程中,海马的神经细胞被激活,形成病理性神经联系,产生向边缘扩展的放电,从而发生癫痫^[1,2]。

腹腔注射 PLO 所致的大鼠癫痫模型是公认的颞叶癫痫动物模型,此模型具有与人类颞叶癫痫极为相似的病理改变。本研究利用 PLO 诱发的大鼠癫痫模型,应用 LF-TMS 予以干预,通过观察癫痫发作后脑电指标变化和海马结构中 NPY 表达的改变,旨在探讨 LF-TMS 的抗痫效果和机制。



注:a. 对照组 1 d CA3 区 NPY 阳性细胞;b. 对照组 2 d CA3 区 NPY 阳性细胞;c. 对照组 3 d CA3 区 NPY 阳性细胞;d. 干预组 1 d CA3 区 NPY 阳性细胞;e. 干预组 2 d CA3 区 NPY 阳性细胞;f. 干预组 3 d CA3 区 NPY 阳性细胞

图 2 对照组、干预组不同时间点 CA3 区 NPY 的表达(免疫组化染色, $\times 200$)

预实验阶段曾按照文献报道用 350 mg/kg 体重剂量的 PLO 造模,发现大鼠癫痫大发作频繁,动物死亡率较高。改用 250 mg/kg 体重剂量后,癫痫发生率为 70%,造模成功率稍下降,但死亡率降低明显,故本实验采用 250 mg/kg 体重剂量的 PLO 建模。

本实验中,大鼠腹腔注射 250 mg/kg 体重剂量的 PLO 后,对照组的建模成功率为 69%;干预组的建模成功率为 71%。两组间癫痫模型成功率的差异无统计学意义,说明低频经颅磁刺激不能减少 PLO 所致癫痫发生率,只是减低了发作的程度。

本实验脑电数据显示,LF-TMS 可延长癫痫潜伏期,减少痫波频率和大发作次数。文献报道 LF-TMS 在动物实验中可明显降低皮层兴奋性,延长癫痫潜伏期及抑制发作程度^[3],这与本实验结果相同。目前考虑这种作用与 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体激活,突触后去极化及细胞内钙聚集相关^[4]。NMDA 受体改变可能为 LF-TMS 降低癫痫易感性的机制。

在部分难治性癫痫的临床实验中,LF-TMS 可在短期内(2 周)明显降低癫痫发作频率及降低发作程度^[5-7]。

NPY 是由 36 个氨基酸组成的一种肽类物质,广泛分布于中枢神经系统及周围神经系统,在中枢神经系统中以海马内浓度最高。NPY 与大脑中的众多生理功能有密切联系,包括调节能量平衡、记忆与学习。在海马与大脑新皮质,几乎所有能表达 GABA 的神经元都能产生 NPY^[8]。

本研究显示,对照组主要以 CA3、CA1 区 NPY 阳性细胞数最多,磁刺激干预组大鼠海马各区 NPY 阳性细胞数明显低于对照组。这表明 NPY 的阳性表达与癫痫的发作有着非常密切的关系。众多研究表明,癫痫发作后海马区 NPY 的阳性表达增多。Akcali K 等^[11]发现致病药物注射后 12~24 h,在齿状回颗粒细

胞层和 CA1 区、CA3 区 NPY mRNA 的表达增高。Friedhelm 等^[10]发现侧脑室注入外源性 NPY 后明显延长了戊四氮致痫的潜伏期,并降低死亡率。Rudolf G 等^[9]发现 NPY 基因敲除鼠与野生鼠相比,它们的正常海马功能无变化,但若注射致痫药物后,基因敲除鼠癫痫发作的潜伏期缩短,癫痫持续时间及死亡率明显高于对照组。另有人观察了印防己毒素 (PTX) 模型及连续刺激发作模型 (STIB),发现注入外源性 NPY 后均能抑制大鼠海马内的同步化兴奋性放电^[12]。这些资料表明,癫痫发作后 NPY 含量增加有抗癫痫作用。但也有学者^[13]发现,注射致痫药物后苔藓纤维末梢 NPY 表达增多,30~60 d 后几乎覆盖整个苔藓纤维,推测其可促进苔藓纤维的出芽及突触的重建,导致癫痫易感性形成。有研究表明在慢性期随癫痫反复发作, NPY 阳性细胞数又逐渐升高^[14]。LF-TMS 干预后癫痫发作程度减轻,脑电指标显示痫样放电受到抑制,结合免疫组化结果提示, NPY 的表达增加与痫性发作有关,支持 NPY 表达增加与抗癫痫作用有关,而非促癫痫形成,是机体自我保护机制的表现。

通过观察海马区 HE 染色的变化,发现海马 CA1 及 CA3 区在癫痫所致的神经元损伤中,病理改变最明显,这与一些国外研究相一致,从而可以推测在癫痫形成过程中这些区域起着重要作用。

本实验证实,应用 LF-TMS 可有效减轻癫痫发作及海马区损伤。现有的国内外文献对 LF-TMS 与癫痫的相关研究较多,LF-TMS 对 NPY 的干预研究鲜见报道,希望本研究为探讨癫痫的发病机制及 LF-TMS 治疗癫痫提供新的思路和策略。

参 考 文 献

- [1] Hoexer MQ, et al. Consequences of prolonged caffeine administration and its withdrawal on pilocarpine- and kainate-induced seizures in rats. *Epilepsia*, 2005, 46: 1401-1406.
- [2] Kudin AP, Debska VG, Vielhaber S, et al. The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy. *Epilepsia*, 2004, 45: 1478-1487.
- [3] Akamatsu N, et al. Decreased susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures after low-frequency transcranial magnetic stimulation in rats. *Neuroscience Lett*, 2001, 14: 153-156.
- [4] Kole MH, Fuchs E, Ziemann U. Changes in 5-HT_{1A} and NMDA binding sites by a single rapid transcranial magnetic procedure in rats. *Brain Res*, 1999, 826: 309-312.
- [5] Daniele O, Brighina F, Piazza A, Giglia G, Scalia S, Fierro B. Low-frequency transcranial magnetic stimulation in patients with cortical dysplasia-a preliminary study. *J Neurol*, 2003, 250: 761-762.
- [6] Menkes DL, Gruenthal M. Slow-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in a patient with focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, 2000, 41: 240-242.
- [7] Rossi S, Olivelli M, Bartalini S, Galli R. Reduction of cortical myoclonus-related epileptic activity following slow frequency rTMS. *Neuroreport*, 2004, 15: 293-296.
- [8] Takahashi DK, Dinday MT, Barbaro NM, et al. Abnormal cortical cells and astrocytomas in the eker rat model of tuberous sclerosis complex. *Epilepsia (Series 4)*, 2004, 45: 1525-1530.
- [9] Rudolf G, Bihoreau M, Thérèse G, et al. Polygenic control of idiopathic generalized epilepsy phenotypes in the genetic absence rats from strasbourg (GAERS). *Epilepsia*, 2004, 45: 301-308.
- [10] Schmitt FC, Matzen J, et al. Limbic self-sustaining status epilepticus in rats is not associated with hyperthermia. *Epilepsia*, 2005, 46: 188-192.
- [11] Akcali KC, et al. The role of bcl-2 Family of genes during kindling. *Epilepsia*, 2005, 46: 217-223.
- [12] Kwan P, Brodie M. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 2005, 46: 224-235.
- [13] Hashizume K, Tsuda H, Hodozuka A, et al. Clinical and experimental studies of epilepsy associated with focal cortical dysplasia. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2004, 58: 26-29.
- [14] Grabenstatter HL, Ferraro DJ, et al. Use of chronic epilepsy models in antiepileptic drug discovery: The effect of topiramate on spontaneous motor seizures in rats with kainate-induced epilepsy. *Epilepsia*, 2005, 46: 8-14.

(修回日期:2007-04-25)

(本文编辑:熊芝兰)

· 消息 ·

《中华物理医学与康复杂志》稿件远程处理和采编系统即将推出

借助于“中国科学技术协会精品期刊建设工程”资助的东风,我刊酝酿已久的电子化稿件远程处理和采编系统建设工作已正式启动。该系统建成使用后,将全面实现作者远程在线投稿、在线查询稿件的编辑处理进程,实现专家和编委在线审稿,编辑在线办公;将大大加快稿件处理速度,缩短稿件刊发周期,全面提高杂志质量。

同时,本刊网刊发布与管理系统和网站建设也正在紧张筹备之中,通过网站建设,我们将力求为本刊广大读者、作者和专家打造一个一流的交流与互动平台,实现杂志的在线即时阅读以及读者、作者、编辑、编委、主编的在线交流与沟通。