

· 基础研究 ·

低频脑深部电刺激对大鼠杏仁核点燃的抑制作用及其相关机制探讨

王乃东 赵永波 陈英辉 吕登俊 张芳 岳旺

【摘要】目的 采用大鼠杏仁核点燃模型研究低频脑深部电刺激的抗癫痫作用及其相关机制。方法 首先建立大鼠杏仁核电刺激点燃模型,观察低频脑深部电刺激对其点燃发作的抑制作用,并通过联合应用抗癫痫药物(如丙戊酸钠、尼卡地平)观察其协同功效。**结果** 低频电刺激(持续刺激 15 min,频率为 1 Hz,波宽为 0.1 ms,强度为 100~350 μ A)能够有效抑制大鼠杏仁核点燃发作($P < 0.05$);将对杏仁核点燃无明显影响的低能量低频电刺激与低剂量丙戊酸钠或尼卡地平联合应用,发现在抑制杏仁核点燃发作方面具有协同效应,能显著抑制杏仁核点燃发作($P < 0.05$)。**结论** 低频脑深部电刺激能有效抑制大鼠杏仁核点燃发作,与丙戊酸钠或尼卡地平联用具有协同功效。

【关键词】 低频电刺激; 杏仁核点燃; 癫痫; 大鼠

The inhibitive effect of low frequency electric brain stimulation on amygdale kindling in rats and its possible mechanisms WANG Nai-dong*, ZHAO Yong-bo, CHEN Ying-hui, GUO Deng-jun, ZHANG Fang, YUE Wang. * Emergency Department, the Affiliated Hospital of Qingdao Medical College, Qingdao 266003, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of low frequency electric deep brain stimulation on amygdale kindling in rats. **Methods** The amygdale kindling model of rats was established by operation on the brain. The effects of low frequency deep brain electric stimulation used alone or in combination with anti-epilepsy drugs were observed in terms of severity of seizure attack reflected by Racine's scale and afterdischarge duration recorded in electroencephalogram. **Results** Fifteen minutes of low frequency electric stimulation at 1 Hz and 100 to 350 μ A effectively inhibited amygdale kindling as demonstrated by a significant decrease of afterdischarge duration, and decreased the severity of seizure attack ($P < 0.05$). The combination of low frequency stimulation with valproate sodium or nicardipine showed synergic effect. **Conclusion** Low frequency deep brain stimulation can significantly inhibit amygdala kindling in rats, and has synergic effects with valproate sodium and nicardipine.

【Key words】 Low frequency stimulation; Amygdala kindling; Epilepsy; Rat

人们尝试将脑深部电刺激(deep brain stimulation, DBS)用于治疗癫痫已有较长历史,早在 1978 年就有学者报道,于硬膜下刺激小脑可减少癫痫患者的发作频率,但后来由于种种原因该研究一度被中断。80 年代后期及 90 年代随着 DBS 在治疗运动障碍性疾病和慢性疼痛领域中的广泛应用,其在癫痫治疗尤其是难治性癫痫干预方面的作用再度受到人们重视,但是最佳的刺激模式、频率、强度、靶位、适应证以及电刺激治疗确切机制等目前还不十分清楚^[1]。本研究利用与人类复杂部分性癫痫相似的慢性大鼠杏仁核电点燃模型,观察局灶性应用 DBS 的抗癫痫作用,同时对其抗癫痫机制进行探讨。现将结果报道如下。

材料与方法

一、实验动物与设备

本研究共选取健康雄性 Wistar 大鼠 150 只,体重 200~250 g,由上海市第一人民医院动物实验中心提供。实验开始前,将大鼠置于实验室内适应性喂养 1 周(单笼饲养),保持饲养室内安静,温度稳定在(20±2)℃,相对湿度为 60%,光照时间为 12 h/d,清洁饮水,标准饲养。主要实验设备包括脑立体定向仪(江湾 I 型,由第二军医大学生产)和 Powerlab 信号记录系统;电子刺激器(SEN-3201 型)和刺激隔离器(SS-102J 型,日本光电公司产)。

二、大鼠杏仁核电点燃模型制备及实验操作

1. 大鼠杏仁核电点燃模型制备:采用戊巴比妥钠按 40 mg/kg 体重腹腔注射麻醉大鼠,待麻醉剂生效后,将大鼠固定于脑立体定向仪上,参照 Konig 图谱确定大鼠右侧杏仁核位置^[1],于大鼠前囟后 3.0 mm、右侧旁开 4.8 mm、颅骨表面下 8.8 mm 处插入双极绝缘镍

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370511);上海市卫生局青年基金资助项目(034Y04)

作者单位:266003 青岛,青岛大学医学院附属医院急诊神经内科(王乃东);上海交通大学附属第一人民医院(赵永波、陈英辉、吕登俊);青岛大学医学院药理教研室(张芳、岳旺)

铬电极(直径 0.16 mm),电极另一端分别焊接微型插头,然后将电极、微型插头等用牙科水泥固定于颅骨表面,术后大鼠每日腹腔注射青霉素 10 万 U,连用 3 d 以预防感染。实验大鼠于手术结束 7 d 后给予电刺激,点燃电刺激参数为 60 Hz,矩形方波,波宽 1 ms,强度 100~400 μ A,持续时间 1 s,每日电刺激 1 次;低频电刺激(low-frequency stimulation, LFS)参数为 1 Hz,矩形方波,波宽 0.1 ms,强度 100~400 μ A,每次持续作用 15 min,每日 1 次。点燃及 LFS 均由同一刺激器产生,通过同一对电极输出。当电刺激开始后,采用 Powerlab 信号记录系统记录、分析大鼠脑电活动,将后放电时程(afterdischarge duration, ADD)及行为发作强度作为本研究重点观察指标,其中 ADD 指电刺激后大鼠杏仁核脑电波幅至少为刺激前 2 倍且频率在 1 Hz 以上的放电持续时间;行为发作强度则根据 Racine 分级法划分为 5 级^[2],I 级表示大鼠闭眼、胡须抖动、嗅、面部抽搐;II 级表示大鼠点头、咀嚼伴面部抽搐;III 级表示大鼠一侧前肢抬起阵挛;IV 级表示大鼠站立伴两侧前肢阵挛;V 级表示大鼠站立跌倒伴全身痉挛,其中 IV、V 级发作可作为继发性全身性癫痫模型制作成功的判定标准,若实验大鼠连续出现 3 次 V 级发作反应即视为完全点燃。

2. LFS 对大鼠杏仁核点燃发作的影响:取实验大鼠 32 只,按照上述方法每日给予 1 次单纯点燃电刺激,直至实验大鼠完全点燃。将完全点燃的实验大鼠随机分为 4 组,每组各 8 只。于每次点燃电刺激前,先给予 LFS 15 min,每日 1 次,共刺激 20 次,各组大鼠的 LFS 强度分别是 50, 100, 250 及 350 μ A,记录各组大鼠 ADD 数据及发作分级,与实验前数据进行自身对照。

3. LFS 和丙戊酸钠联用对大鼠杏仁核点燃的影响:取实验大鼠 24 只,按照上述点燃方法每日给予 1 次单纯点燃电刺激,直至实验大鼠完全点燃。将完全点燃的实验大鼠随机分为 3 组,每组各 8 只。第 1, 2 组大鼠分别按 200, 500 mg/kg 体重给予丙戊酸钠,记录给药前、后 ADD 数据和发作分级并进行自身对照;另一组则选择对 ADD 及癫痫发作分级均无明显影响的相应剂量丙戊酸钠与强度为 50 μ A 的低频电联合作用点燃大鼠。记录干预前、后大鼠点燃发作的 ADD 数据及发作分级并进行自身对照。

4. LFS 和尼卡地平联用对大鼠杏仁核点燃的影响:选取实验大鼠 24 只,按照上述点燃方法每日给予 1 次单纯点燃电刺激,直至实验大鼠完全点燃;再将点燃大鼠随机分为 3 组,每组各 8 只,联合应用对点燃无明显影响的低剂量尼卡地平 2 mg/kg 体重^[3]和强度为 50 μ A 的低能量 LFS 作用实验大鼠,记录干预前、后大鼠 ADD 数据及发作分级并进行自身对照。

5. LFS 对大鼠点燃过程的影响:取实验大鼠 40 只,将其随机分为 5 组,每组各 8 只。每组大鼠分别于点燃电刺激前,分别给予强度为 0, 50, 100, 250, 350 μ A 的 LFS,持续时间为 15 min,每日 1 次,共刺激 20 次,记录大鼠的 ADD 数据及发作分级。将上述所得数据与单纯点燃电刺激组大鼠进行比较。

各组实验大鼠于实验结束后采用灌注盐水及 4% 多聚甲醛方式将其处死,经断头取脑并将脑组织于 4% 多聚甲醛内固定 24 h 后行冠状切片(片厚 50 μ m),经 HE 染色后置于光镜下观察电极位置。

三、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用配对 *t* 检验对大鼠干预前、后各项指标进行分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

各组实验大鼠脑组织标本经光镜观察后发现,其电极均埋藏在杏仁核中央及基底外侧部。单纯电点燃组大鼠随电刺激次数增加,其行为由开始时的局部异常向全身性阵挛、惊厥过渡,该组大鼠经平均刺激(18 ± 3.0)次出现点燃发作的 Racine V 级反应。

一、LFS 对大鼠杏仁核电点燃发作的影响

通过预先给予完全电点燃大鼠强度分别为 350, 250, 100 及 50 μ A 的 LFS,发现能够缩短点燃电刺激引发的 ADD($P < 0.05$),降低 Racine 分级($P < 0.05$),抑制杏仁核点燃发作;其中实验大鼠经强度为 350 μ A 电刺激后,其癫痫发作从未达到 V 级,但是部分大鼠经该强度电刺激时出现烦躁表现,而强度为 50 μ A 的 LFS 对大鼠杏仁核电点燃发作无显著影响($P > 0.05$),具体结果详见表 1。

表 1 LFS 对大鼠杏仁核电点燃发作的影响($\bar{x} \pm s$)

LFS 强度 (μ A)	<i>n</i>	ADD (s)		Racine 分级	
		刺激前	刺激后	刺激前	刺激后
50	8	80.1 $\pm$ 11.7	75.4 $\pm$ 6.9	5.0 $\pm$ 0.0	5.0 $\pm$ 0.0
100	8	82.1 $\pm$ 12.4	60.3 $\pm$ 8.9 ^a	5.0 $\pm$ 0.0	3.8 $\pm$ 1.1 ^a
250	8	68.4 $\pm$ 10.1	25.4 $\pm$ 18.4 ^a	5.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.9 ^a
350	8	78.7 $\pm$ 16.8	15.9 $\pm$ 14.2 ^a	5.0 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 1.1 ^a

注:与刺激前比较,^a $P < 0.05$

二、LFS 与丙戊酸钠联用对大鼠杏仁核电点燃发作的影响

与给药前比较,单纯给予丙戊酸钠 500 mg/kg 体重能缩短电点燃大鼠的 ADD、降低其 Racine 分级($P < 0.05$),而 200 mg/kg 体重的丙戊酸钠剂量对杏仁核电点燃无明显影响,具体数据详见表 2。将对点燃无明显影响的低剂量丙戊酸钠(200 mg/kg 体重)与强度为 50 μ A 的 LFS 联合作用实验大鼠,发现能够显

著缩短电点燃大鼠的 ADD、降低 Racine 分级 ($P < 0.05$), 具体数据详见表 2。

表 2 丙戊酸钠及 LFS 联合应用对大鼠杏仁核电点燃发作的影响 ($\bar{x} \pm s$)

处理方法	n	ADD(s)		Racine 分级	
		刺激前	刺激后	刺激前	刺激后
丙戊酸钠					
200 mg/kg 体重	8	80.5 ± 13.4	78.6 ± 7.9	5.0 ± 0.0	4.5 ± 1.0
500 mg/kg 体重	8	89.4 ± 13.1	45.1 ± 18.9 ^a	5.0 ± 0.0	2.1 ± 1.5 ^a
LFS + 丙戊酸钠	8	81.4 ± 12.6	38.7 ± 19.4 ^a	5.0 ± 0.0	3.1 ± 1.5 ^a

注: LFS + 丙戊酸钠联合干预的剂量分别为 50 μ A 和 200 mg/kg 体重; 与刺激前比较, ^a $P < 0.05$

三、LFS 及尼卡地平联用对大鼠杏仁核电点燃发作的影响

将强度为 50 μ A 对大鼠杏仁核电点燃无显著影响的 LFS 与同样对杏仁核电点燃无显著影响的低剂量尼卡地平 (2 mg/kg 体重) 联合作用实验大鼠, 发现能显著缩短电点燃大鼠的 ADD, 降低其 Racine 分级, 对大鼠杏仁核电点燃发作具有明显抑制效应, 具体数据详见表 3。

表 3 LFS 与尼卡地平联用对大鼠杏仁核电点燃发作的影响 ($\bar{x} \pm s$)

处理方法	n	ADD(s)		Racine 分级	
		刺激前	刺激后	刺激前	刺激后
LFS	8	80.1 ± 11.7	75.4 ± 6.9	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
尼卡地平	8	78.7 ± 12.5	69.6 ± 16.7	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
LFS + 尼卡地平	8	72.5 ± 15.2	36.8 ± 11.4 ^a	5.0 ± 0.0	3.6 ± 1.4 ^a

注: LFS 的强度为 50 μ A, 尼卡地平的剂量为 2 mg/kg 体重; 与刺激前比较, ^a $P < 0.05$

四、LFS 对大鼠杏仁核电点燃进程的影响

在实验大鼠杏仁核电点燃过程中, 于点燃刺激前, 预先给予强度分别为 250, 350 μ A 电刺激后, 发现只有 1 只大鼠出现了 V 级发作, 其它大鼠均没有达到点燃状态; 如预先给予实验大鼠强度分别为 50, 100 μ A 的电刺激后, 发现大鼠需要更多的点燃次数才能达到杏仁核点燃发作; 如预先给予大鼠强度为 100 ~ 350 μ A 的电刺激 (其它刺激参数同上) 后, 发现实验大鼠 ADD 明显缩短, Racine 分级显著降低 ($P < 0.05$), 具体数据详见表 4。

表 4 LFS 对大鼠杏仁核电点燃进程的影响 ($\bar{x} \pm s$)

LFS 强度 (μ A)	n	ADD (s)	Racine 分级	点燃次数 (次)
0	8	73.4 ± 10.5	5.0 ± 0.0	14 ± 5.4
50	8	58.5 ± 7.8 ^a	5.0 ± 0.0	18 ± 3.4
100	8	45.2 ± 9.2 ^a	4.6 ± 0.5	20 ± 6.8
250	8	19.4 ± 13.2 ^a	1.9 ± 1.4 ^a	—
350	8	14.5 ± 9.0 ^a	1.3 ± 1.1 ^a	—

注: 与强度为 0 μ A 的 LFS 比较, ^a $P < 0.05$

讨 论

大鼠杏仁核电点燃模型因可快速点燃故被科研及临床广泛采用, 它所表现出的脑电异常活动及惊厥与人类癫痫发作较类似, 是目前国际公认的研究癫痫及寻找抗癫痫新药的理想动物模型, 本研究正是利用该模型来观察低频脑深部电刺激对癫痫发作的抑制作用。

目前脑电刺激可作为药物治疗效果欠佳患者的一种替代治疗, 同手术相比, 电刺激治疗具有可逆性及可调节性等优点。本研究结果提示, 利用低频电流直接电刺激大鼠杏仁核, 能够有效抑制大鼠杏仁核电点燃发作。这与既往的研究结果一致。早前研究显示, 在成年及发育中大鼠以及在颞叶中央回癫痫患者中, LFS (0.9 ~ 3.0 Hz) 可对其癫痫发作产生显著抑制效应^[4-6], LFS 可提高后放电和发作阈值, 即使在停止电刺激后的几周甚至几个月内仍可保持这种抑制效应^[7]。另外本实验发现, 在大鼠杏仁核点燃进程中给予较大能量的 LFS, 能够有效缩短其 ADD 及降低发作分级, 甚至可以阻止其完全点燃, 表明 LFS 对实验大鼠点燃进程以及完全点燃的大鼠都具有阻止点燃、抑制癫痫发作的功效; 同时我们在实验中还观察到有些大鼠经强度为 350 μ A 的电刺激后, 会出现烦躁不安等表现, 有时甚至表现为不能耐受, 提示在临床实际应用 LFS 过程中, 须找到合适的电刺激强度, 既可有效抑制癫痫发作, 又能使患者耐受良好。

研究表明, LFS 对癫痫点燃状态的抑制作用主要是通过增加痫性发作阈值实现的, 但其确切机制目前仍不十分清楚。Benedict 等^[8]比较了 LFS 和高频电刺激对离体海马脑片痫性活动的影响, 结果发现持续 10 min 的低频或高频电刺激都可以抑制癫痫活动, 其中 1 Hz LFS 的抑制作用呈渐进性、持续时间较长; 而 100 Hz 高频电刺激的抑制作用表现较迅速, 但持续时间较短, 并且 1 Hz LFS 对自发性及继发性癫痫活动的长时程抑制 (long-term depression, LTD) 作用较显著, 这种抑制作用可被谷氨酸、N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂 AP5 所缓解。LFS 时 LTD 的作用非常重要, LTD 可能在降低神经元兴奋性方面具有重要作用, 因为 AP5 可以逆转这种抑制效应。1 Hz 低频电流刺激海马 CA1 区 15 min 可产生峰电位 (population spike, PS) 或者兴奋性突触后电位 (excitatory postsynaptic potentials, EPSP) 的 LTD^[9], LTD 和 EPSP 均具有钙依赖特性, 能够调节神经突触可塑性。LFS 可导致机体低钙, 能激活蛋白磷酸化酶; 而高频电刺激可导致机体高钙并激活蛋白激酶^[10]。目前研究发

现,任何一种激酶或磷酸化酶的活性增高,均可以改变其相应离子通道的导电性,其相关治疗机制是通过磷酸化和去磷酸化实现的,作用位点是谷氨酸、N-甲基-D-天冬氨酸以及 GABAA 受体^[10]。钙通道水平的改变可能是 LFS 发挥抗癫痫功效的重要因素之一。目前已知丙戊酸钠属于 GABA 能增强剂,可通过激活谷氨酸脱羧酶、提高脑内 GABA 含量而发挥抗癫痫作用;同时钙离子参与抗癫痫过程的作用机制已日益受到人们关注,既往研究发现,尼卡地平可显著抑制大鼠杏仁核点燃发作^[3]。本研究结果显示,低能量 LFS 分别与低剂量丙戊酸钠或尼卡地平联用,可以对抑制杏仁核点燃产生协同作用,提示 LFS 对大鼠杏仁核点燃的抑制作用与脑内 GABA 系统及钙通道系统具有相关性,但 LFS 与该两种系统间的确切关系还需进一步研究。

LFS 对杏仁核点燃的抑制作用还可能与改变脑内癫痫相关受体有关。López-Meraz 等^[11]研究了 LFS 对杏仁核电点燃大鼠脑内几种受体的影响,发现 LFS 的抗癫痫作用可能与 GABA-苯二氮受体系统及内啡肽系统有关,而与 α -肾上腺受体及腺苷环化酶无关。

综上所述,本研究结果表明,LFS 可有效抑制杏仁核电点燃大鼠的点燃发作,并与 GABA 能系统增强剂(如丙戊酸钠等)或钙通道阻滞剂(如尼卡地平)联用在控制癫痫发作方面具有协同功效,提示可针对临床上许多难治性癫痫患者(尤其是儿童患者,其发作多呈局灶性特点)于精确定位后给予局部电刺激治疗,促其疗效进一步改善;但 LFS 抗癫痫的确切机制目前尚未清楚,同时 LFS 的不良作用、尤其是刺激部位及其远隔部位的形态学及行为学改变以及对机体认知和记忆功能的影响等还需进一步深入

探讨。

参 考 文 献

- [1] William HT, Robert SF. Brain stimulation for epilepsy. *Lancet*, 2004, 3: 332-335.
- [2] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, 1972, 32: 281-285.
- [3] 岳旺,王蕾,张芳. 尼卡地平对大鼠杏仁核点燃的抑制作用. *中国药理学报*, 2001, 22: 365-368.
- [4] Vélisek L, Veliskova J, Stanton PK. Low frequency stimulation of the kindling focus delays ipsilateral amygdala kindling in immature rats. *Neurosci Lett*, 2002, 326: 61-63.
- [5] Yaumoto J, Keda A, Satow T, et al. Low-frequency electric cortical stimulation has an inhibitory effect on epileptic focus in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2002, 43: 491-495.
- [6] Jun LM, Arom B, Christopher S, et al. Local suppression of epileptiform activity by electrical stimulation in rat hippocampus in vitro. *J Physiol*, 2003, 547: 427-434.
- [7] Weiss SR, Xiu LI, Noguera EC, et al. Quenching persistent alterations in seizure and after discharge threshold following low frequency stimulation//Corcoran E, Moshe SL. *Advances in behavioral biology*. New York: Plenum Press, 1998: 101-119.
- [8] Benedict C, Albensi GA, Erin S, et al. Activation of long-term synaptic plasticity causes suppression of epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Brain Res*, 2004, 1998: 56-64.
- [9] Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993, 36: 131-39.
- [10] Coussens CM, Teyler TJ. Protein kinase and phosphatase activity regulate the form of synaptic plasticity expressed. *Synapse*, 1996, 22: 2497-2503.
- [11] López-Meraz ML, Neri-Bazán L, Rocha L. Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. *Epilepsy Res*, 2004, 22: 5995-6105.

(修回日期: 2007-03-20)

(本文编辑: 易 浩)

· 消息 ·

国家继续医学教育项目——关于举办全国言语障碍、 吞咽困难培训班通知

为了满足各单位亟待培训言语障碍训练人员的需要,北京天坛医院神经内科将于 2007 年 7 月 2 至 5 日举办为期 3 天的言语障碍、吞咽困难培训班。本培训由欧阳来祥(美籍华人)教授主讲,欧阳教授为美国加州嘉惠尔医院语言治疗部主任,双语语言治疗主任医生,曾在美国 UCLA 医院、脑伤康复中心和怀特医院等从事语言治疗工作 20 余年。讲课内容将理论与实践相结合,突出动手能力培训。本培训班为全国继续医学教育项目,培训结束将授予继续教育学分 10 分。

学员条件:具有中专或中专以上学历,热爱语言、吞咽困难康复事业。教学目的:学习言语障碍、吞咽困难的理论与训练技术,重在提高学员的实际训练能力。教学方法:理论教学、示范、实习、讨论相结合。收费标准:学费 800 元,资料费 200 元(包括言语障碍、吞咽困难康复训练示范光盘),食宿由培训班统一安排,费用自理。讲课地点:北京天坛医院教学楼阶梯教室。

联系方式:北京市崇文区天坛西里 6 号北京天坛医院神经内科,张玉梅、张婧、周筠;邮政编码:100050;电话:010-86416847, 86879887, 13811313897; E-mail: zhangyumei95@yahoo.com.cn 或 zhangfengjing73@yahoo.com.cn。