

## 基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.015

## 早期母子隔离应激对幼鼠不同癫痫模型易感性的影响

周浩<sup>1</sup>, 梁锦平<sup>2</sup>

(1. 贵州省人民医院儿科, 贵阳 550002; 2. 重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 重庆 400014)

**【摘要】**目的:探讨早期母子隔离应激对幼鼠氯化锂-匹罗卡品和杏仁核电刺激点燃诱导癫痫模型易感性的影响。方法:66 新生 SD 大鼠幼鼠用于实验,随机分成 3 组( $n=22$ ):正常对照组、母子隔离 15 min 组、母子隔离 3 h 组。在生后 16/18 d 对 3 组幼鼠分别行氯化锂-匹罗卡品/杏仁核电刺激诱导的惊厥实验。结果:与正常组比较,P2~P15/17 幼鼠每天母子隔离 3 h 应激组,氯化锂-匹罗卡品诱导惊厥发作的潜伏期明显缩短( $P<0.05$ );杏仁核点燃惊厥阈值明显降低、完全点燃所需刺激次数明显减少( $P<0.05$ ),而 P2~P15/17 幼鼠每天母子隔离 15 min 应激组与正常组幼鼠在上述几个方面比较,则差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:早期母子隔离 3 h 的应激可通过缩短氯化锂-匹罗卡品诱导惊厥发作的潜伏期、降低杏仁核点燃惊厥阈值、减少完全点燃所需的刺激次数,导致 2 种幼鼠癫痫模型的易感性增加。

**【关键词】**应激;氯化锂-匹罗卡品;杏仁核点燃;癫痫

**【中国图书分类法分类号】**R725

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2011-09-12

## Influence of early maternal isolation stress on the susceptibility of different epilepsy models in infantile rats

ZHOU Hao<sup>1</sup>, LIANG Jinping<sup>2</sup>

(1. Department of Pediatrics, the People's Hospital of Guizhou Province;

2. Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To explore the influence of early maternal isolation stress on the epilepsy susceptibility of li-pilocapine and amygdala kindling induced-seizures models in infantile rats. **Methods:** Totally 66 newborn SD rat pups were enrolled and randomly divided into three groups ( $n=22$ ): the normal control group, the maternal separating 15 minutes group and the maternal separating 3 hours group. All rats were performed with li-pilocapine and amygdala kindling induced-seizures experiment at 16/18 days after the birth. **Results:** The latency period of li-pilocapine induced-seizures was obviously shortened and the convulsive threshold of amygdala kindling as well as the stimulating number needed for full kindling were markedly decreased in the maternal separating 3 hours group compared with those in the normal control group at 2~15/17 days after the separation ( $P<0.05$ ). However, there was no significant difference in the above indicators between the normal control group and the maternal separating 15 minutes group at 2~15/17 days after the separation ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** The stress of early maternal separating for 3 hours can shorten the latency period of li-pilocapine induced-seizures, decrease the threshold of amygdala kindling and the stimulating number needed for full kindling thus enhance the susceptibility of the two seizure models in infantile rats.

**【Key words】**stress; li-pilocapine; amygdala kindling; epilepsy

惊厥性疾病是婴幼儿时期常见的中枢神经系统疾病,这主要是由于该年龄期神经系统发育尚未成熟,惊厥阈值低。然而,流行病学资料显示<sup>[1]</sup>,人类婴幼儿时期遗传性癫痫相对较少,而由各种脑损伤或应激诱发的惊厥占绝大多数。因此,应激与未成熟脑癫痫的关系已成为目前神经科学研究的热点

之一。

文献报道<sup>[2]</sup>:适当的游泳应激可以提高戊四氮点燃模型的惊厥阈值,而母子隔离 1 h 的应激可以增加氯化锂-匹罗卡品点燃模型的易感性<sup>[3]</sup>。目前,尚无成熟稳定的应激实验方法,各种应激方法对不同癫痫模型易感性的影响仍存在争议。因此,本文采用与人类非常相近的自然应激源,对早期(P2~P15/17)幼鼠进行母爱剥夺,制作应激实验,建立 2 种经典的癫痫模型:氯化锂-匹罗卡品与杏仁核电

作者简介:周浩(1982-),男,住院医师,硕士,

研究方向:小儿神经病学。

通信作者:梁锦平,男,副教授,Email:LJP023@yahoo.com.cn。

刺激点燃诱导的癫痫模型,证实不同母子隔离时程的应激对不同癫痫模型的易感性有何影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物与分组 Sprague-Dawley (SD) 孕鼠购于重庆医科大学动物实验中心,幼鼠出生当天计为 P0,饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗的交替环境,自由进食。66 只新生 SD 大鼠幼鼠用于实验,根据实验需要完全随机分成 3 组 ( $n=22$ ):①正常对照组,正常喂养,每天不用母子隔离;②隔离 15 min 组;③隔离 3 h 组,其中每组有 12 只用于建立氯化锂-匹罗卡品诱导的癫痫模型,有 10 只用于杏仁核点燃诱导的癫痫模型。

1.1.2 主要材料与设备 直径 0.1 mm 镍铬合金漆包电极 (深圳瑞沃德科技有限公司)、玻璃子水门汀 (重庆广博口腔器材公司)、不锈钢眼镜螺丝、氯化锂-匹罗卡品 (上海 sigma 公司)、大鼠脑立体定位仪 (Stoelting1886)、多导生理记录仪 (iwiorx214)、刺激隔离器 (ISO-Flex)、微腹腔注射型、颅骨钻 (TX-AO50024)、数码摄像机 (SonyT500)。

### 1.2 母子隔离的应激方法与癫痫模型的制作

1.2.1 母子隔离的应激方法 隔离 15 min 组 (幼鼠出生当天计为 P0,其中用于建立氯化锂-匹罗卡品诱导的癫痫模型幼鼠从 P2 ~ P15 d 进行隔离,而用于建立杏仁核点燃诱导的癫痫模型幼鼠从 P2 ~ 17 d 进行隔离,母子隔离的具体方法:每天同一时间把幼鼠单独置于安静、保暖环境 15 min,隔离结束后放回笼中),隔离 3 h 组 (方法同前,每天隔离 3 h)。在生后 16/18 d 分别行氯化锂-匹罗卡品/杏仁核电刺激诱导惊厥实验,记录幼鼠体重,在应激过后个体差异太大的被淘汰,淘汰的不计入实验总体,被淘汰的个数后面补上,保证每组的个数相同。

1.2.2 氯化锂-匹罗卡品诱导惊厥模型的建立<sup>[4]</sup> (1) 生后 (应激结束) 16 d,详细记录幼鼠体重,按 3 mEq/kg 氯化锂腹腔注射;(2) 18 ~ 24 h 后,再经腹腔注射匹罗卡品 30 mg/kg 诱导惊厥发作;(3) 如 30 min 内未诱发 4 级以上行为,按 10 mg/kg 追加匹罗卡品,直到诱发惊厥;(4) 行为学按 Racine<sup>[5]</sup> 分级方法,0 级:无惊厥发作;1 级发作:面部阵挛,包括动须,咀嚼等;2 级发作:1 级发作行为加节律性点头;3 级发作:2 级发作行为加前肢阵挛;4 级发作:3 级发作行为加后肢站立;5 级发作:4 级发作行为加摔倒。3 级以下为局部发作,4 级以上为全面性点燃,诱发成功即出现 4 级以上发作行为。(5) 诱发成功后,用地西洋 4 mg/kg 腹腔注射终止惊厥。实验过程中死亡、未诱发出惊厥行为的幼鼠不计入实验总体,保证每组诱发的总体个数相同,最后每组有 8 只幼鼠符合要求。

1.2.3 杏仁核点燃模型的制作 电极的安放:按 3 ml/kg 10% 水合氯醛麻醉幼鼠,将幼鼠固定于幼鼠立体定位仪,微型颅骨钻钻孔,双侧缠绕直径 0.1 mm 镍铬合金漆包电极沿孔垂直插入左侧杏仁核基底外侧核 (Amygdala basolateral hu-

cleus, ABL), 电极尖端间距 0.10 ~ 0.15 mm。根据 Sherwood and paola<sup>[6]</sup> 婴幼儿鼠定位图谱左侧 ABL 坐标 (前囟后 1.8 mm,旁开 4.6 mm,深 7.8 ~ 8.2 mm,门齿 0.0 mm)。不锈钢微型眼镜螺丝固定于前额作为地线,另一个固定于枕骨起加强固定作用,所有电极均接入 3 孔插件。用牙科水泥混合 502 胶水固定,术后保暖,腹腔常规注射青霉素 3 ~ 5 万 U 预防感染,灌牛奶增强抵抗能力。

1.2.4 杏仁核点燃程序<sup>[7]</sup> (1) 杏仁核电点燃参数:频率 60 Hz、波宽 1 ms、串长 10 s、间隔 7 min、强度 0.4 mA、160 个恒流脉冲刺激。(2) 杏仁核后放电阈值 (Afterdischarge threshold, ADT) 的测定:在屏蔽干扰环境中用多导生理记录仪记录背景脑电 5 min 后,刺激电流从 20  $\mu$ A 开始,间隔时间 > 1 min,每次递增 20  $\mu$ A,然后检测 ADT (ADT 指波幅及频率 > 背景波幅及频率 2 倍的尖/棘波时所需要的刺激电流值)。(3) 点燃及行为分级:术后恢复 2 d,所有电刺激点燃都安排在白天 9:00 - 18:00 之间完成 (以防止发育造成电极位置的变异)。实验前将幼鼠放入 2 L 的烧杯中,保暖适应环境 10 min,检测 ADT 后休息 30 min,然后开始刺激,行为学分类仍按 Racine 分级方法,诱发 3 级以下发作行为为局灶性发作,3 级以上发作行为为全面性发作。点燃成功即稳定诱发 4 级以上发作行为。

### 1.3 统计学处理

所有数据均用 SPSS13.0 软件分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,方差齐性检验用 Levene's test,应激组与正常组的比较用独立样本的  $t$  检验,显著性水准为 0.05,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 氯化锂-匹罗卡品诱导惊厥的结果

以相同浓度的氯化锂预处理 18 ~ 24 h 内所有实验动物均没有观察到异常行为变化。大鼠腹腔注射匹罗卡品后实验动物短时间内出现外周胆碱能反应:缩瞳、竖毛、流泪、腹泻等症状。严格按幼鼠体重计算匹罗卡品的剂量,精确计时,从开始注射到诱发出惊厥行为所需时间为潜伏期,一般注射皮罗卡品后 1 ~ 15 min 内出现 1 级惊厥行为为发作。

正常组需要的潜伏期为 (15.32  $\pm$  1.34) min,母子隔离 15 min 组与正常组比较,差异无统计学意义 ( $P=1.00$ ),母子隔离 3 h 组与正常组比较,潜伏期显著性降低 ( $P=0.00$ ,见表 1)。

表 1 3 组幼鼠诱发出惊厥发作行为需要的时间 (即潜伏期,  $s, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Time of inducing seizure behavior among three groups (latency period,  $s, \bar{x} \pm s$ )

组别	幼鼠个数	潜伏期 (s)
正常	8	15.32 $\pm$ 1.34
隔离 15 min	8	16.47 $\pm$ 1.73 <sup>a</sup>
隔离 3 h	8	11.50 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>

注: a,  $t=0.00, P=1.00$ ; b,  $t=6.12, P=0.00$

## 2.2 杏仁核点燃诱导的结果

2.2.1 3 组幼鼠杏仁核点燃成功情况 正常组有 8 只点燃、1 只电极脱落、1 只麻醉死亡;隔离 15 min 组 9 只诱发成功、1 只电极脱落;隔离 3 h 组 7 只诱发成功、1 只术后死亡、2 只电极位置不正确。

2.2.2 3 组幼鼠杏仁核 ADT 的测定 正常组杏仁核平均 ADT 为:  $(110.0 \pm 15.6) \mu\text{A}$ , 隔离 3 h 组杏仁核平均 ADT 为:  $(90.0 \pm 11.4) \mu\text{A}$ , 与正常组比较 ( $P=0.02$ ) ADT 显著性降低, 而隔离 15 min 组杏仁核平均 ADT:  $(108.0 \pm 14.2) \mu\text{A}$  与正常组 ADT 比较差异无统计学意义 ( $P=0.87$ )。

2.2.3 对 3 组点燃率和诱发 5 级发作为时后放电 (After-discharge, AD) 时程的观察 将达到 5 级发作为时需要的刺激次数定义为点燃率, 同时记录诱发 5 级发作为时 AD 时程 (s)。正常组幼鼠平均点燃率和 AD 时程为:  $(10.5 \pm 2.3)$  次和  $(56.0 \pm 9.2)$  s; 隔离 3 h 组为:  $(8.2 \pm 1.4)$  次和  $(72.0 \pm 15.0)$  s, 二者间相比较, 差异具有统计学意义 ( $P=0.04$ ); 隔离 15 min 组为:  $(11.3 \pm 1.9)$  次和  $(57.0 \pm 11.3)$  s, 与正常组比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ , 见表 2)。

表 2 3 组杏仁核点燃参数的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Parameters of amygdala kindling among three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别及幼鼠个数	点燃率 (刺激次数)	5 级行为时 AD (s)
正常 ( $n=8$ )	$10.5 \pm 2.3$	$56.0 \pm 9.2$
隔离 15 min ( $n=9$ )	$11.3 \pm 1.9^a$	$57.0 \pm 11.3^c$
隔离 3 h ( $n=7$ )	$8.2 \pm 1.4^b$	$72.0 \pm 15.0^d$

注: a,  $t=1.05, P=0.31$ ; b,  $t=2.29, P=0.04$ ; c,  $t=0.30, P=0.77$ ; d,  $t=2.41, P=0.03$

## 3 讨论

### 3.1 氯化锂-匹罗卡品诱导的惊厥模型

氯化锂-匹罗卡品诱导的大鼠癫痫模型与人类的颞叶癫痫存在许多相似特征<sup>[8]</sup>。病理学证实氯化锂-匹罗卡品诱导的惊厥模型, 海马部位出现神经元死亡及苔藓纤维出芽的改变<sup>[9]</sup>, 与人类颞叶癫痫的病理特征非常相似<sup>[10]</sup>, 因此, 是比较理想的颞叶癫痫模型, 且颞叶癫痫约占全部癫痫的 70%, 所以, 它适用于癫痫的形成机制及药理学、分子生物学等方面的基础研究。

应激对氯化锂-匹罗卡品模型诱导惊厥易感性的影响。母子隔离产生应激的方法已广泛应用, 实验证实: P2~14 d 幼鼠母子隔离 3 h 的应激可持久地增加大鼠边缘系统癫痫的易感性<sup>[11]</sup>。氯化锂-匹罗卡品腹腔注射是近年国际公认、主要诱发边缘性癫痫发作的动物模型。它诱发出惊厥发作需要的时

间(潜伏期)是衡量惊厥易感性的客观标准。本实验采用 P2~15 d 幼鼠母子隔离 3 h 的应激, 可减少 P16 d 幼鼠惊厥诱导的潜伏期, 增加其惊厥的易感性; Lai 等<sup>[3]</sup>采用 P2~9 d 幼鼠母子隔离应激方法 (每天母子隔离 1 h), 同样增加幼鼠氯化锂-匹罗卡品诱导惊厥的易感性。然而, 母子隔离 15 min 的应激, 则对诱导惊厥潜伏期没有明显的影响, 说明只有当应激达到一定强度或超过一定时程才会增加癫痫的易感性。

### 3.2 快速幼鼠杏仁核点燃模型

本研究证实: 快速点燃模型可适用于幼鼠期, 并且这种模型能够作为研究未成熟期癫痫的良好工具。该模型拥有以下几个优点: (1) 它提供了 1 个特征明显、重复性好的动物模型; (2) 杏仁核点燃诱导的惊厥依赖于边缘系统的特殊解剖结构与功能, 它对研究边缘系统惊厥或颞叶癫痫具有重要作用; (3) 该模型具有年龄依赖性特征, 适用于年龄依赖性癫痫的神经解剖学与发病机制研究。

杏仁核电刺激点燃已广泛应用于成年大鼠边缘系统惊厥的动物实验, 其可重复性及精确性等优点同样适用于未成熟脑癫痫的研究, 其所测指标, 如后 ADT、点燃率大小可作为衡量癫痫易感性的客观标准。

本组实验提示: 与对照组相比较, 每天母子隔离 3 h 应激组的 P2~17 d 幼鼠, P18 d 进行杏仁核点燃能够显著地降低 ADT 及完全点燃需要的刺激次数, 增加 5 级发作为时的后放电时程, 说明 P2~17 d 母子隔离 3 h 应激可增加幼鼠癫痫的易感性。Jones 等<sup>[12]</sup>采用 P2~14 d 母子隔离 3 h 应激同样发现可以降低青春期鼠惊厥阈值, 增加癫痫易感性; 然而, Heather 等<sup>[13]</sup>报道生后母子隔离应激对癫痫易感性没有影响, 可能与应激方法或时程选择不当有关 (仅仅在生后 4~5 d, 每天母子隔离 1 h)。在脑发育、癫痫易感性等方面, P2~17 d 幼鼠母子隔离 15 min 与正常组比较, 差异无统计学意义, 与氯化锂-匹罗卡品惊厥模型的结论一致 (参考文献), 提示只有当应激刺激达到一定强度或超过一定时程时, 才会增加幼鼠癫痫的易感性。

通过建立 2 种经典的癫痫模型, 我们发现: 幼鼠早期母子隔离 3 h 的应激可通过缩短氯化锂-匹罗卡品惊厥诱导幼鼠惊厥发作的潜伏期; 降低杏仁核点

燃惊厥阈值、减少完全点燃所需刺激次数,导致幼鼠癫痫易感性的增加。这为进一步探讨应激增加幼鼠癫痫易感性的病理机制奠定了工作基础,为临床上预防母子隔离应激导致未成熟脑癫痫的发生提供了实验依据。

### 参 考 文 献

[1] Baram T Z, Hatalski C G. Neuropeptide-mediated excitability: a key triggering mechanism for seizure generation in the developing brain [J]. Trends in Neurosciences, 1998, 21 (11) :471-476.

[2] Abel E, Berman R. Effects of water immersion stress on convulsions induced by pentylenetetrazol [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1993, 45 (4) : 823-825.

[3] Lai M, Holmes G, Lee K, et al . Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats-The role of corticosterone [J]. Epilepsy Research, 2006, 68 (2) :123-136.

[4] 高旭光,冯体良,王 军. 氯化锂-匹罗卡品致大鼠急性癫痫模型 [J]. 中国血液流变学杂志, 2003, 13 (4) :308-312.

Gao X G, Feng T L, Wang J. The rat models of li-pilocapine induced-seizures [J]. Chinese Journal of Hemorheology, 2003, 13 (4) : 308-312.

[5] Racine, Ronald D. Kindling: The first decade [J]. Neurosurgery, 1978, 3 (2) :110-119.

[6] Nancy M, Paola S. Astereotaxic atlas of the developing rat brain [M]. California; University of California Press Ltd, 1970. 45-62.

[7] 常红升,沈鼎烈,杨 峰,等. 大鼠杏仁核快速点燃癫痫模型 [J]. 中华神经科杂志, 1997, 30 (5) :283-286.

Chang H L, Shen D L, Yang F, et al. The rat models of rapid amygdala kindling induced-seizure [J]. Chinese Journal of Neurology, 1997, 30 (5) :283-286.

[8] Kreak P, Mikudecka A. An animal model of nonconvulsive tatus epilepticus: a contribution to clinical controversies [J]. Epilepsia, 2001, 42 (2) :171-180.

[9] 张 莉,徐利军,池志宏,等. 锂-匹罗卡品致颞叶癫痫小鼠模型的建立及苔藓纤维出芽的实验研究 [J]. 解剖科学进展, 2007, 13 (2) : 158-160.

Zhang L, Xu L J, Chi Z H, et al. The establishment of mice models of Li-pilocapine induced-seizures and the experiment research of Mossy fiber sprouting [J]. The progress of anatomical Science, 2007, 13 (2) :158-160.

[10] Morimoto K, Fahnestock M, Racine R J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain [J]. Prog Neurobiol, 2004, 73 (1) : 1-60.

[11] Michael S, Gaurav K, Laureen S, et al. Early postnatal stress confers enduring vulnerability to limbic epileptogenesis [J]. Epilepsia, 2007, 48 (11) :2079-2085.

[12] Jones C, Gaurav J, Briena J, et al. Anxiolytic effects of rapid amygdala kindling and the influence of early life experience on rats behavior [J]. Brain Research, 2009, 203 (1) :81-87.

[13] Heather E, Edwards, Desiree D, et al. Prenatal stress alters seizure thresholds and the development of kindled seizures in infant and adult rats [J]. Hormones and Behavior, 2002, 42 (4) :437-447.

(责任编辑:冉明会)

# 欢迎投稿, 欢迎订阅!

## 《中华医学教育探索杂志》邮发代号:78-127

### 网址:yxjyts.alljournals.ac.cn