

小鼠匹鲁卡品诱导的癫痫持续状态模型改良研究

祖筠筠¹, 王晓宇¹, 陆海美¹, 杜羽¹, 于捷¹, 陈忠^{1,2}, 许正浩^{1*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江大学, 杭州 310058)

摘要: 目的 探讨小鼠匹鲁卡品癫痫持续状态模型(status epilepticus, SE)建立的优化给药策略。方法 98只ICR小鼠随机分为7组, 每组14只, 分别采用常规(一次量给药)或改良方法腹腔注射匹鲁卡品。改良方法为先给予150或200 mg·kg⁻¹匹鲁卡品, 30 min内若未发作, 则继续给予1~2次30~100 mg·kg⁻¹匹鲁卡品(给药时间间隔为30 min)。动物行为学结合海马脑电图用于评价SE成功诱导及动物猝死情况。结果 常规方法: 200 mg·kg⁻¹组(即一次量给予200 mg·kg⁻¹匹鲁卡品)造模成功4例, 5例未SE发作, 死亡5例; 250 mg·kg⁻¹组造模成功3例, 死亡11例; 300 mg·kg⁻¹组动物全部死亡。改良方法: (150+50)mg·kg⁻¹改良组(先给予150 mg·kg⁻¹匹鲁卡品, 若未发作则追加50 mg·kg⁻¹匹鲁卡品1~2次)造模成功6例, 2例未SE发作, 死亡6例; (150+100)mg·kg⁻¹改良组造模成功7例, 死亡7例; (200+30)mg·kg⁻¹改良组造模成功6例, 3例未SE发作, 死亡5例; (200+50)mg·kg⁻¹改良组造模成功9例, 死亡5例。结论 常规一次量方法诱导小鼠SE模型时匹鲁卡品有效剂量较难控制, 经改良后(200+50)mg·kg⁻¹的改良方法可能是小鼠匹鲁卡品SE模型建立的较优方法。

关键词: 癫痫; 匹鲁卡品; 癫痫持续状态; 小鼠; 动物模型

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)04-0505-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.006

Improved Method for Status Epilepticus Induction in Mice with Pilocarpine

ZU Yunyun¹, WANG Xiaoyu¹, LU Haimei¹, DU Yu¹, YU Jie¹, CHEN Zhong^{1,2}, XU Zhenghao^{1*} (1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the optimal strategies to establish pilocarpine model of status epilepticus (SE) in mice. **METHODS** The 98 ICR mice were randomly divided into seven groups, and SE model was established by intraperitoneal injection of pilocarpine with regular (single-dose of pilocarpine) or modified methods in each group. In modified methods, mice were administrated with 150 or 200 mg·kg⁻¹ pilocarpine, and then they were added 30-100 mg·kg⁻¹ pilocarpine every 30 min if SE were not induced. The SE state of mice were evaluated by the seizure behaviors and electroencephalography. **RESULTS** For regular methods: 4 mice were induced SE, 5 were no-SE and 5 died in 200 mg·kg⁻¹ group; 3 mice were induced SE and 11 died in 250 mg·kg⁻¹ group; all 14 mice died in 300 mg·kg⁻¹ group. For modified methods: 6 mice were induced SE, 2 mice were no-SE and 6 mice died in (150+50)mg·kg⁻¹ group; 7 mice were induced SE and 7 died in (150+100)mg·kg⁻¹ group; 6 mice were induced SE, 3 mice were no-SE and 5 died in (200+30)mg·kg⁻¹ group; 9 mice were induced SE and 5 mice died in (200+50)mg·kg⁻¹ group. **CONCLUSION** It may be hard to get a suitable dose to establish pilocarpine SE model when using regular single-dose method, and the (200+50)mg·kg⁻¹ modified method may be an optimal strategy to establish pilocarpine SE model in mice.

KEY WORDS: epilepsy; pilocarpine; status epilepticus; mice; animal model

癫痫持续状态(status epilepticus, SE)是指癫痫持续发作5 min以上未自行终止, 或频繁发作, 发作间期意识尚未完全恢复, 该病的致残率和病死率很高, 是常见的一种神经内科急症^[1-2]。临床研究发现, 经历长时间SE(>40 min)后, 患者会逐渐出现对地西洋等药物耐受, 成为难治性SE, 是目前癫痫研究的热点内容之一^[3-5]。此外, SE还是常见的癫痫诱因之一^[6]。

匹鲁卡品模型是较常用的癫痫SE动物模型,

具有操作简单方便等优点^[7], 使匹鲁卡品模型动物经历长时间SE(>40 min), 同样可以诱导耐药性SE用于抗癫痫药物筛选和机制研究^[8]。经历更长时间SE(>60 min)并且存活下来动物还可以作为慢性癫痫自发作模型, 被广泛用于颞叶癫痫治疗及发病机制等相关研究^[9]。然而, 匹鲁卡品模型存在死亡率高的缺点, 很多动物诱导SE以后短时间内就会死亡, 无法达到用于难治性SE模型及慢性癫痫模型的要求, 该模型需要进一步改良。目前,

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY16H280005); 浙江中医药大学校级科研基金(2015ZG03, 2015ZR02)

作者简介: 祖筠筠, 女, 硕士生 Tel: 18767168472 E-mail: 1038822026@qq.com *通信作者: 许正浩, 男, 博士, 副研究员 Tel: 13484032581 E-mail: xuzhenghao@zcmu.edu.cn

有关小鼠的匹鲁卡品模型优化文献报道较少。

本研究针对匹鲁卡品的不同给药剂量和不同给药方法,通过观察分析其行为学变化以及脑电图,试图寻找一种造模成功率高、死亡率低的匹鲁卡品给药方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Powerlab 电生理记录系统(澳大利亚 ADInstruments);小动物立体定位仪(美国 Stoelting);电子天平(德国 Sartorius 公司)。

匹鲁卡品(美仑生物,规格:1 g,批号:10205A);戊巴比妥钠(上海上药新亚药业有限公司,批准文号:国药准字 H31020240,规格:1 g,批号:H31020240);溴甲基东莨菪碱(东京化成工业株式会社,批号:RRSVL-EQ,规格:1 g)。

1.2 动物

实验动物为清洁级 ICR 小鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司提供),♂,体质量 22~30 g,动物许可证号:SYXK(浙)2013-0184。动物饲养在浙江中医药大学实验动物中心动物饲养区,环境温度(22±1)℃。明暗循环(光照 8:00~20:00),自由饮水摄食。动物实验均在每日 9:00~17:00 期间进行。所有实验均完全遵从浙江中医药大学实验动物中心的动物伦理学条例和关于《实验动物照顾和使用》的规定。尽量减少实验动物数量,尽量减轻实验动物痛苦。

1.3 方法

1.3.1 动物手术及脑电记录 电极植入:小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)麻醉,待翻正及角膜反射消失后固定于立体定位仪参考小鼠脑图谱^[10]在右侧腹侧海马(AP: -2.9 mm, L: -3.0 mm; V: -3.0 mm)立体定位植入电极。接地螺丝电极被固定在前额叶皮层上(AP: +2 mm, L: -1.5 mm),参考螺丝电极被固定在小脑皮层上(AP: -4.5 mm, L: 0)。电极外端与微型插座焊接,用牙科水泥固定于颅骨。术后动物休息 7~10 d。动物手术方法及脑电记录方法参考课题组前期相关报道^[11-12]。

脑电图记录和分析:脑电图(electroencephalogram, EEG)记录分析方法参照实验室前期文献^[13]。EEG 记录使用 Neuroscan-NuAmps 数字放大器,采样率为 1 000 Hz,记录的 EEG 频谱范围为 DC~200 Hz。所记录的 EEG 数据用 Scan 4.5 软件离线分析,首先进行 DC 校准,然后进行 0.3~100 Hz

频带范围的数字滤波。

1.3.2 SE 模型建立 98 只小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 7 组(3 个常规组、4 个改良组),每组 14 只。按照以下方案腹腔注射匹鲁卡品,所用匹鲁卡品浓度为 50 mg·mL⁻¹,生理盐水溶解。常规方法依据文献采用一次量给予 200~300 mg·kg⁻¹ 匹鲁卡品;改良方法采用策略为先给予较低剂量 150 或 200 mg·kg⁻¹ 匹鲁卡品,30 min 内若未发作,则继续给予 1~2 次 30~100 mg·kg⁻¹ 匹鲁卡品(给药时间间隔为 30 min,直至出现 SE 或完成 3 次给药)。最后一次给药后继续观察动物发作情况 60 min。

常规方法分为 200, 250, 300 mg·kg⁻¹ 组,分别一次性给予 200, 250, 300 mg·kg⁻¹ 匹鲁卡品^[10,14-15]。改良方法分组如下:(150+50)mg·kg⁻¹ 改良组,先给予 150 mg·kg⁻¹ 匹鲁卡品,若未发作则追加 50 mg·kg⁻¹ 匹鲁卡品;同法按剂量分为(150+100), (200+30), (200+50)mg·kg⁻¹ 组。所有小鼠匹鲁卡品注射前 30 min 腹腔注射溴甲基东莨菪碱 1 mg·kg⁻¹。

癫痫发作行为学等级评分根据 Racine 分级方法^[16]:I 面部抽动,咀嚼明显;II 点头;III 单侧前肢阵挛;IV 双侧前肢阵挛和站立;V 双侧前肢阵挛,站立以及失去平衡跌倒。SE 状态定义为发作等级达到 IV 或 V 级并反复出现 III 及以上的行为发作,脑电图记录可见连续癫痫样棘波(幅度>3 倍基线,频率>2 Hz)。动物 SE 状态持续 60 min 且不死亡的视为 SE 造模成功。若动物首次 IV 或 V 级发作结束后立即死亡情况的定义为猝死。最后一次注射匹鲁卡品 60 min 后仍无 III 级以上发作的视为未发作动物。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件包对实验数据进行统计学处理,匹鲁卡品不同用法用量组小鼠 SE 发作率、死亡率等采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 不同给药策略的 SE 诱导成功率及死亡率

正常一次量匹鲁卡品给药方式造模情况如下:200 mg·kg⁻¹ 组:3 例猝死,2 例 SE 后期死亡(非猝死),4 例成功诱导 SE 症状并持续>60 min,另外 5 例未能诱导出 SE 症状。250 mg·kg⁻¹ 组:全部出现 SE 症状,其中 9 例猝死,2 例 SE 后期死亡,最后只有 3 例造模成功。300 mg·kg⁻¹ 组:全部首次发作后猝死。根据上述常规给药策略结果可以初步推断最佳的匹鲁卡品剂量为 200~250 mg·kg⁻¹,但个体差异很明显。

改良给药策略的结果如下: (150+50)mg·kg⁻¹组, 2例未发作, 2例猝死, 4例SE后期死亡, 6例造模成功; (150+100)mg·kg⁻¹组, 5例猝死, 2例SE后期死亡, 7例造模成功; (200+30)mg·kg⁻¹组3例未发作, 4例猝死, 1例SE后期死亡, 6例造模成功; (200+50)mg·kg⁻¹组3例猝死, 2例SE后期死亡, 9例造模成功。具体各组死亡率和成功率等实验数据见表1。

统计分析后发现, 各常规给药组间比较, 随着匹鲁卡品剂量提高动物猝死例数明显增加, 总死亡率增加; 200 mg·kg⁻¹组与 250 mg·kg⁻¹组 SE 成功率相当, 而 300 mg·kg⁻¹组明显较低($P<0.05$); 200 mg·kg⁻¹组未发作动物例数明显高于其他2组($P=0.014$)。各改良给药组间比较, 在死亡率和成功率等方面均没有统计学差异, 其中(200+50)mg·kg⁻¹成功率相对较高。各改良给药组间与其总剂量相当的 250 mg·kg⁻¹组相比较[除(150+100)mg·kg⁻¹组, 其他各组平均总剂量均为 250 mg·kg⁻¹左右], (200+30)mg·kg⁻¹组和(200+50)mg·kg⁻¹组降低了死亡率, 但仅(200+50)mg·kg⁻¹组的SE成功率显著高于250 mg·kg⁻¹组($P=0.022$)。各改良给药组间与小剂量的 200 mg·kg⁻¹组相比较, 各组间总死亡率没有差别, 但(150+100)mg·kg⁻¹和(200+50)mg·kg⁻¹明显降低了动物的未发作率($P=0.0136$)。

表1 不同匹鲁卡品给药策略的死亡率及SE诱导成功率
Tab. 1 The mortality rate and SE success rate of different strategy of pilocarpine administration

分组	总死亡数	未发作数	成功数	死亡率/%	未发作率/%	成功率/%
200 mg·kg ⁻¹	5	5	4	35.71 ²⁾	35.71	28.57
250 mg·kg ⁻¹	11	0	3	78.57 ¹⁾	0.00 ¹⁾	21.43
300 mg·kg ⁻¹	14	0	0	100.00 ¹⁾²⁾	0.00 ¹⁾	0.00 ¹⁾²⁾
(150+50)mg·kg ⁻¹	6	2	6	42.86	14.29	42.86
(150+100)mg·kg ⁻¹	7	0	7	50.00	0.00 ¹⁾	50.00
(200+30)mg·kg ⁻¹	5	3	6	35.71 ²⁾	21.43	42.86
(200+50)mg·kg ⁻¹	5	0	9	35.71 ²⁾	0.00 ¹⁾	64.29 ²⁾

注: 与 200 mg·kg⁻¹组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 250 mg·kg⁻¹组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with 200 mg·kg⁻¹ group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with 250 mg·kg⁻¹, ²⁾ $P<0.05$.

2.2 匹鲁卡品不同给药策略下的 EEG 比较

观察动物 EEG 发现其主要可以分为 2 种不同形式的 EEG, 即猝死 EEG 和 SE EEG。猝死 EEG 出现癫痫样 EEG 后变成一条平线之后不再恢复。

SE EEG 可见连续癫痫样棘波(幅度>3 倍基线, 频率>2 Hz), 期间可夹杂有少量短暂的平线脑电, 但癫痫样脑电不会自行终止, 且给予戊巴比妥钠脑电幅度会逐渐变小但依然有少量小幅度的棘波。进一步比较各组动物 EEG, 发现各组猝死动物和 SE 成功动物的 EEG 间没有明显差别。成功动物的 SE 期间脑电均类似于图 1B 和 1D, 而猝死的动物也均类似于图 1A 和 1C。重点比较(200+50)mg·kg⁻¹改良组与总相当剂量 250 mg·kg⁻¹组中动物的 EEG, 发现与前述实验结果一致, (200+50)mg·kg⁻¹组较 250 mg·kg⁻¹组出现了更多猝死 EEG, 但(200+50)mg·kg⁻¹组 SE 成功动物较 B 组 SE 成功动物在脑电幅度等方面并没有明显差异。结果见图 1。

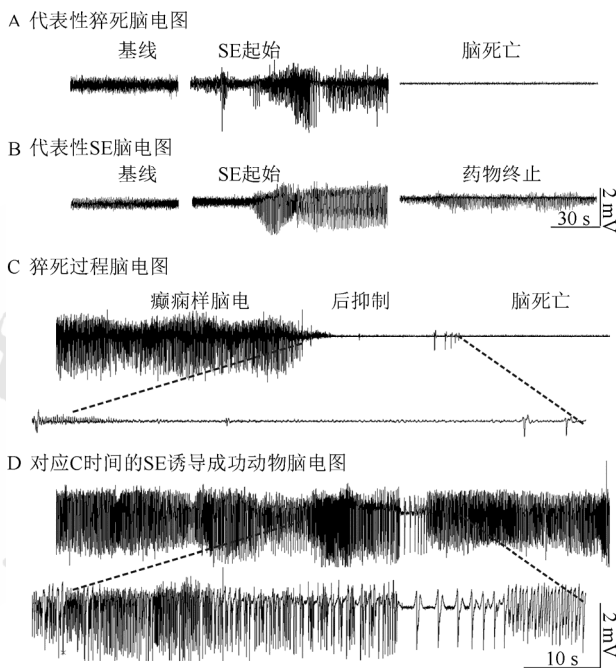


图1 发作猝死及SE成功的代表性 EEG

A—给予匹鲁卡品后猝死; B—诱导 SE 成功, 并最后利用药物终止发作; C—直接死亡; D—成功诱导 SE。

Fig. 1 The representative EEG of death and SE state

A—sudden death after administered by pilocarpine; B—SE state, and then terminated by drugs; C—sudden death; D—SE state.

3 讨论

本研究首先根据文献尝试了各种剂量一次量给药, 发现其有效剂量窗较小(200 mg·kg⁻¹死亡率低但癫痫诱导率也低, 而>250 mg·kg⁻¹癫痫诱导率高但猝死率明显增高), 且个体差异较大, 因此一次量给药较难控制。为了提高成功率和减少猝死率, 本研究尝试通过先给予接近阈剂量的匹鲁卡品然后二次追加 30~100 mg·kg⁻¹匹鲁卡品的改良给药策略。发现通过先给予小剂量匹鲁卡品

(200 mg·kg⁻¹), 随后给予更小剂量匹鲁卡品 (50 mg·kg⁻¹), SE 成功率较高、死亡率较低, 是一种较好的造模方法。减少首次剂量至 150 mg·kg⁻¹ 匹鲁卡品后续补加 1~2 次 50 或 100 mg·kg⁻¹ 并不能提高动物成功率和减少动物死亡率。其原因可能是减少首次剂量或二次剂量后很多动物需要 2 次以上的补药才能诱导出 SE, 这导致动物可能遭受了更久较高剂量匹鲁卡品的不良反应。

此外, 通过 EEG 记录发现这些造模方法中具有明显神经电生理差别。其中 300 mg·kg⁻¹ 可以诱发经典的 SE 导致的动物猝死, 具有明显的癫痫后抑制现象, 该方法可能可以被用于研究癫痫相关猝死及其干预^[17]。而改良的(200+50)mg·kg⁻¹ 方法, SE 过程中 EEG 持续呈现癫痫样放电与常规方式的 SE 脑电并无明显差异, 与经典的患者 SE 相似。在该改良模型中, SE 60 min 后戊巴比妥钠无法完全终止 SE 脑电, 这与前人在大鼠上的研究结果一致^[18]。因此, 改良模型可能可以用于直接制备难治性 SE 模型。本实验中 4 周后(200+50)mg·kg⁻¹ 改良组 9 例动物全部存活且均观察到明显的癫痫样间期放电和癫痫发作脑电, 提示匹鲁卡品改良 SE 模型经药物终止后还可以用于制备慢性癫痫自发作模型。

本研究发现通过调整匹鲁卡品的给药方式可以提高 SE 模型建立的成功率, 其中(200+50)mg·kg⁻¹ 给药方式具有较高 SE 成功率和较低死亡率, 是一种较好的造模方法。

REFERENCES

- [1] CLAASSEN J, SILBERGLEIT R, WEINGART S D, et al. Emergency neurological life support: status epilepticus [J]. *Neurocrit Care*, 2015, 23(Suppl 2): S136-142.
- [2] BETJEMANN J P, JOSEPHSON S A, LOWENSTEIN D H, et al. Trends in status epilepticus-related hospitalizations and mortality: Redefined in US practice over time [J]. *JAMA Neurol*, 2015, 72(6): 650-655.
- [3] DE NEGRI M, BAGLIETTO M G. Treatment of status epilepticus in children [J]. *Paediatr Drugs*, 2001, 3(6): 411-420.
- [4] XU Z H, WANG Y, TAO A F, et al. Interleukin-1 receptor is a target for adjunctive control of diazepam-refractory status

- epilepticus in mice [J]. *Neuroscience*, 2016(328): 22-29.
- [5] YANG J Y, LI Y F, XU F. New drug for partial epilepsies: brivaracetam [J]. *Clin J New Drugs Clin Rem*(中国新药与临床杂志), 2017, 36(1): 20-23.
- [6] CHEN L L, FENG H F, MAO X X, et al. One hour of pilocarpine-induced status epilepticus is sufficient to develop chronic epilepsy in mice, and is associated with mossy fiber sprouting but not neuronal death [J]. *Neurosci Bull*, 2013, 29(3): 295-302.
- [7] KALEMENEV S V, ZUBAREVA O E, FROLOVA E V, et al. Impairment of exploratory behavior and spatial memory in adolescent rats in lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy [J]. *Dokl Biol Sci*, 2015(463): 175-177.
- [8] HADERA M G, MCDONALD T, SMELAND O B, et al. Modification of astrocyte metabolism as an approach to the treatment of epilepsy: Triheptanoin and acetyl-L-carnitine [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(1/2): 86-95.
- [9] WANG J G, CAI Q, ZHENG J, et al. Epigenetic suppression of GADs expression is involved in temporal lobe epilepsy and pilocarpine-induced mice epilepsy [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(7): 1751-1760.
- [10] MILLAN M H, PATEL S, MELDRUM B S. The involvement of excitatory amino acid receptors within the prepiriform cortex in pilocarpine-induced limbic seizures in rats [J]. *Exp Brain Res*, 1988, 72(3): 517-522.
- [11] 陶安风. 炎症因子白介素-1 β 对癫痫发作后抑制的拮抗作用研究[D]. 2015, 浙江大学.
- [12] ELISEVICH K, REMPEL S A, SMITH B, et al. Connexin 43 mRNA expression in two experimental models of epilepsy [J]. *Mol Chem Neuropathol*, 1997, 32(1-3): 75-88.
- [13] 钟恺. 低频率电刺激海马下托对大鼠颞叶癫痫及难治性癫痫的治疗作用研究[D]. 2013, 浙江大学.
- [14] 徐层林, 许正浩, 陈忠. 小鼠匹鲁卡品癫痫模型潜伏期 CA3 区后放电阈值及脑电频谱能量的变化[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012(3): 415.
- [15] WANG Y, LIANG J, XU C, et al. Low-frequency stimulation in anterior nucleus of thalamus alleviates kainate-induced chronic epilepsy and modulates the hippocampal EEG rhythm [J]. *Exp Neurol*, 2016(276): 22-30.
- [16] SCHMIDT-KASTNER R, HUMPEL C, WETMORE C, ET AL. Cellular hybridization for BDNF, trkB, and NGF mRNAs and BDNF-immunoreactivity in rat forebrain after pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *Exp Brain Res*, 1996, 107(3): 331-347.
- [17] 聂莉媛. 柴贝止痫汤治疗难治性癫痫的疗效观察及干预 P-gP 的机制研究[D]. 北京中医药大学, 2015.
- [18] LIU Y, LIU X Z, GAO X G. Diazepam in treatment of late status epilepticus induced by lithium and pilocarpine in rat model [J]. *Chin Gen Pract*(中国全科医学杂志), 2008, 11(2): 120-122.

收稿日期: 2016-10-28

(本文责编: 曹粤锋)