

单侧梨状脑中间区内微量注射生理盐水对大鼠杏仁核电点燃癫痫大发作的影响

朱媛媛, 诸葛正兵, 王爽, 杨丽霞, 陈忠
(浙江大学医学院 药理学教研室, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 目的 探讨在大鼠梨状脑中间区微量注射生理盐水对杏仁核电点燃癫痫大发作的影响。方法 大鼠每日进行杏仁核电点燃直至达到大发作状态,随后在单侧梨状脑中间区内注射不同体积的生理盐水,并在注射后 10 min、30 min、1 d、4 d、7 d、10 d 观察大发作的发生率和阈值变化,以及持续时间的变化。结果 在同侧或对侧梨状脑中间区内注射 0.1 μ l 和 0.25 μ l 及 1 μ l 的生理盐水,均能剂量依赖性地降低癫痫大发作发生率,同时显著缩短大发作持续时间($P < 0.05$),而且这种作用可持续 10 d。同侧组在注射各个剂量生理盐水 10 min 后即可显著升高 GST($P < 0.05$),持续 10 d,而对侧组在注射剂量为 0.1 μ l 的生理盐水 30 min 后才显著升高 GST($P < 0.05$)。结论:单侧梨状脑中间区内注射生理盐水能够抑制大鼠杏仁核电点燃癫痫大发作,提示可能成为一种对颞叶癫痫有效的治疗手段。

[关键词] 癫痫/药物疗法;杏仁核电点燃;梨状脑中间区;生理盐水;动物,实验
[中图分类号] R 742.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2007)02-0141-05

Injection of saline into unilateral central piriform cortex inhibits amygdaloid – kindled seizures in rats

ZHU Yuan – yuan, ZHU – GE Zheng – bing, WANG Shuang, et al (Department of Pharmacology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of microinjection of saline into unilateral central piriform cortex (cPC) on the generalized seizures in amygdaloid – kindled rats. **Methods:** Different volumes of saline were injected into the right or left cPC of amygdaloid – kindled rats, and its effect on generalized seizures was observed. **Results:** Saline injection at different volumes (0.1 μ l, 0.25 μ l and 1 μ l) significantly decreased the incidence and duration of generalized seizures ($P < 0.05$), the anticonvulsant effect lasted for up to 10 d. In addition, 10 min after ipsilateral injection of saline the generalized seizure thresholds were significantly increased; while this effect was observed 30 min later when contralateral injection was used. **Conclusion:** Unilateral saline injection into cPC has a significant anticonvulsant effect, which might be used for treatment of human temporal lobe epilepsy in the future.

[Key words] Epilepsy/drug ther; Amygdaloid - kindled; Central piriform cortex; Saline; Animals, laboratory

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2007, 36(2): 141 - 145.]

梨状脑(piriform cortex)是脑内最大、研究最多的重要嗅觉皮层,可分为前、中、后三个区域^[1],除了嗅觉方面的重要作用,梨状脑在边缘系统癫痫(例如:电点燃形成的颞叶癫痫)的产生和扩散中也起着重要的作用^[2]。很多研究表明,梨状脑可能在癫痫扩散网络,也就是电点燃癫痫的形成以及痫性放电从点燃灶点向其他边缘系统和边缘系统以外脑区分布的网络中起着非常关键的作用^[3-4],尤其是梨状脑中间区在边缘系统癫痫中的作用更为重要^[5-6]。

双侧梨状脑中间区内仅仅注射微量生理盐水就能够升高癫痫大发作的阈值(GST),但是并没有关注此现象和进行进一步的研究^[5]。最近,我们发现低频刺激单侧梨状脑中间区可以抑制杏仁核电点燃癫痫的形成过程^[7],而且在癫痫大发作中也同样有重要作用(结果未显示)。我们推测单侧梨状脑中间区内微量注射生理盐水也能起到抗癫痫作用。因此,我们对此进行了初步的研究,并观察同侧和对侧梨状脑中间区在杏仁核电点燃癫痫大发作中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物 SD大鼠36只(右侧或左侧梨状脑插管各18只),雄性,体重220~300 g(浙江大学医学院动物实验中心提供),清洁级Ⅱ级,证书号22-9601018。大鼠自由进水进食,每天给予12 h的光照(光照时间8:00~20:00)。动物实验在每天10:00~17:00进行。

1.2 手术 大鼠用水合氯醛360 mg/kg,腹腔内注射麻醉,固定于脑固定台(Narishinge, SR-5, 日本)上,暴露颅骨,根据Paxino和Waston 1998年的脑图谱,将一根直径0.2 mm的双极电极插入大鼠右侧基底旁侧杏仁核(从前囟算起,AP:-2.8, L:-4.8, V:-8.8)。双极电极由两根包裹有绝缘层的不锈钢丝组成,前端分开0.5~1.0 mm(A. M. Systems, Inc., USA),电极顶端保留约0.5 mm的无绝缘层段,并且在大鼠右侧或左侧梨状脑(从前囟算起, AP:-0.8, L:±4.9, V:-8.0)插入不锈钢给药导

管(外径700 μm)。电极用牙科水泥固定在大鼠颅骨,其尾端连接一个微型插座。手术后动物至少休息10 d。

1.3 大鼠完全点燃以及 GST 测定 在大鼠基底旁侧杏仁核每隔30 min用电刺激器(SEN-7203, SS-202J, Nihon Kohden, Tokyo, Japan)给予一次刺激,参数为60 Hz,持续2 s,间隔1 ms,刺激强度从50 μA开始每次递增20 μA,杏仁核的刺激阈值以能够引起至少5 s的后放电为判断标准,其大致范围在100 μA到300 μA(ADT)。在阈值测定后一天开始,给予基底旁侧杏仁核每天一次的阈值刺激,直至大鼠完全点燃为止,并用PowerLab系统(AD instruments, Australia)记录杏仁核脑电图。癫痫的发作级别参考Racine在1972年提出的标准判断:(1)咀嚼;(2)点头;(3)单侧前肢抖动;(4)双侧前肢抖动并且直立;(5)双侧前肢抖动,直立并且摔倒。癫痫级别中的1~3级为复杂局灶性癫痫,而4~5级则为癫痫大发作。记录每次刺激引起的后放电持续时间。大鼠连续5次达到癫痫大发作才能被认为完全点燃,完全点燃的大鼠用于微量注射生理盐水的实验。在给予生理盐水前,测定大鼠大发作阈值(GST),从50 μA开始,每隔5 min递增20%,大鼠能够达到大发作所需的最小强度即为GST。同时记录大鼠的大发作持续时间(即大鼠出现双侧前肢痉挛的时间)。

1.4 微量注射生理盐水对大鼠大发作的作用

在实验过程中,每隔3 d测定一次大鼠的GST。在大鼠清醒状态下,从给药导管给予生理盐水微量注射。大鼠给予生理盐水后,注射针在管内留置5 min,使得生理盐水能够完全留在梨状脑内。注射完毕后,继续使用管塞封闭导管防止导管堵塞。注射后立即观察大鼠的行为学改变,同时记录大鼠的脑电。所有的大鼠分别测定注射后10 min, 30 min, 1 d以及以后每隔3 d测定一次GST,直至大鼠GST回复注射前的原始值。如果GST测定时刺激增加到1 000 μA仍不能引起大发作的,为了避免电流强度过大损伤脑组织,统计时GST计为1 200 μA

(1 000 μA 增加 20%)。所有大鼠分别先给予 0.1 μl 生理盐水,然后给予 0.25 μl ,最后给予 1 μl 生理盐水。

1.5 组织学 在实验结束后,用组织学切片检验电极的位置。16 只电极正确插在基底旁侧杏仁核和注射导管正确插在右侧梨状脑中间区,以及 16 只电极正确插在基底旁侧杏仁核和注射导管正确插在左侧梨状脑中间区的大鼠,其数据用于结果分析。

1.6 统计 统计学处理采用 SPSS 11.0 统计软件。单侧梨状脑微量注射生理盐水后,注射生理盐水前 GST 能否引起癫痫大发作的情况,统计为不同剂量生理盐水对大发作的抑制率。其余数据用以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计均采用非参数 ANOVA 分析,使用 Dunnett's 检验进行二次检验, $P < 0.05$ 时认为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 不同体积生理盐水注射到单侧梨状脑中间区对癫痫大发作的抑制作用 在任意一侧梨状脑中间区内微量注射 0.1、0.25 和 1 μl 的生理盐水,都能够不同程度地抑制杏仁核电点燃癫痫的大发作。同侧梨状脑中间区注射 0.1 μl 的生理盐水在 10 min 就能够显著抑制癫痫大发作的几率(降低 50%, $P < 0.05$),在 30 min 和 1 d 时下降幅度达 70% ($P < 0.05$),在 4 d 时下降幅度达最高的 80% ($P < 0.05$),在 7 d 和 10 d 逐渐恢复到注射前水平。大发作的持续时间在 30 min 时从注射前的 $44.6 \text{ s} \pm 2.5 \text{ s}$ 显著下降到 $36.9 \text{ s} \pm 2.3 \text{ s}$ ($P < 0.05$),并进一步下降到 $36.4 \text{ s} \pm 1.4 \text{ s}$ (1 d, $P < 0.05$) 和 $36.6 \text{ s} \pm 2.0 \text{ s}$ (4 d, $P < 0.05$)。同侧梨状脑中间区注射 0.25 μl 和 1 μl 的生理盐水在 10 min 就能够显著抑制癫痫大发作的几率($P < 0.05$),并在 1 d 和 4 d 时完全抑制了大发作($P < 0.05$),在 7 d 和 10 d 逐渐恢复到注射前水平。另外,对侧梨状脑中间区注射 0.1 μl 的生理盐水在 30 min 后,显著抑制癫痫大发作的几率(降低 60%, $P < 0.05$),并在 1 d 时下降幅度达最高的 70% ($P < 0.05$),在 4 d 时下降幅度恢复到 60% ($P < 0.05$),在 7 d 和 10 d 逐渐恢复到注射前水平。而对侧梨状脑中间区注射 0.25 μl 的生理盐水 10 min 后,就显著抑制癫痫大发作的几率(降低 60%, $P < 0.05$),并在 4 d 时达到

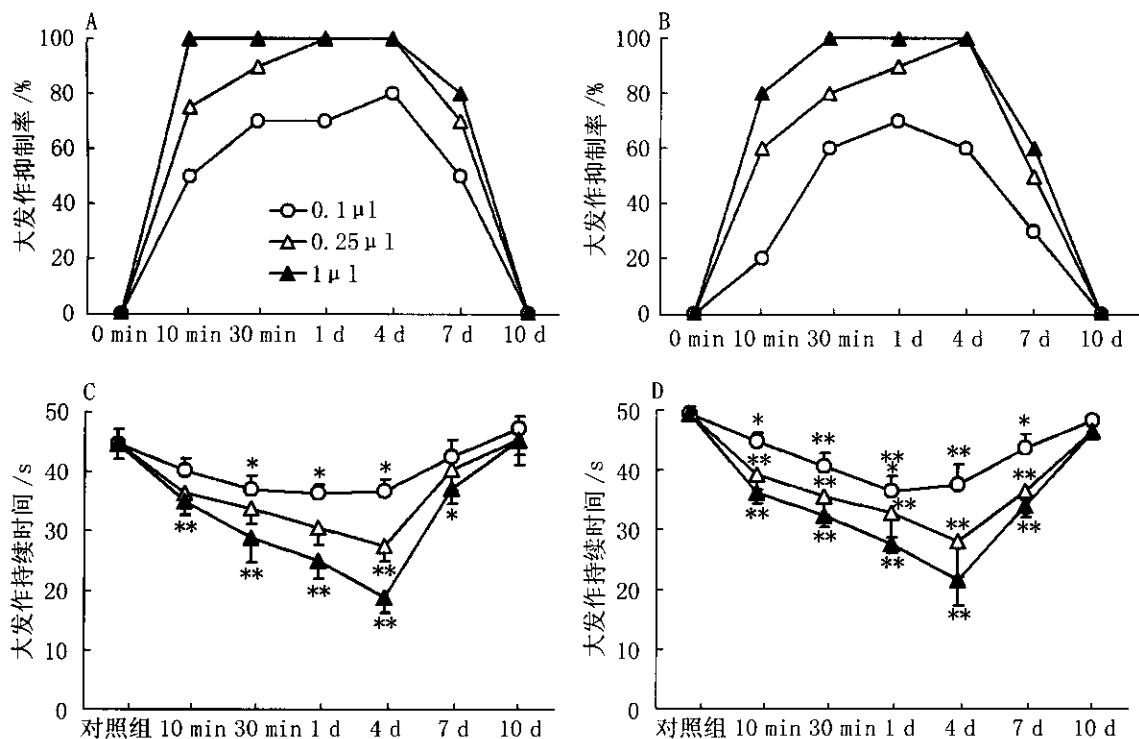
了完全的抑制($P < 0.05$),在 7 d 和 10 d 逐渐恢复到注射前水平。对侧梨状脑中间区注射 1 μl 的生理盐水也在 10 min 后就显著抑制癫痫大发作的几率(降低 80%, $P < 0.05$),并在 30 min、1 d、4 d 时达到了完全的抑制($P < 0.05$),在 7 d 和 10 d 则逐渐恢复到注射前水平(图 1)。

2.2 不同体积生理盐水注射到单侧梨状脑中间区升高 GST 的作用 对侧和同侧梨状脑中间区注射生理盐水均可升高 GST。同侧组所有剂量均在 10 min 即显著升高了 GST ($P < 0.05$),而对侧组注射 0.1 μl 生理盐水 30 min 后才显著升高 GST ($P < 0.05$),双侧均表现为注射体积越大作用越显著,到第 10 天 GST 回复注射前水平(图 2)。

3 讨 论

本实验发现,不同体积生理盐水注射到单侧梨状脑中间区,能够长时间抑制癫痫大发作和升高癫痫大发作的 GST,并且显著减少了大发作持续时间,这提示单侧梨状脑中间区注射生理盐水能够长时有效地抑制癫痫大发作。我们还发现生理盐水的注射体积越大,其抗癫痫作用越强,提示这种抗癫痫作用具有体积依赖性的特点。

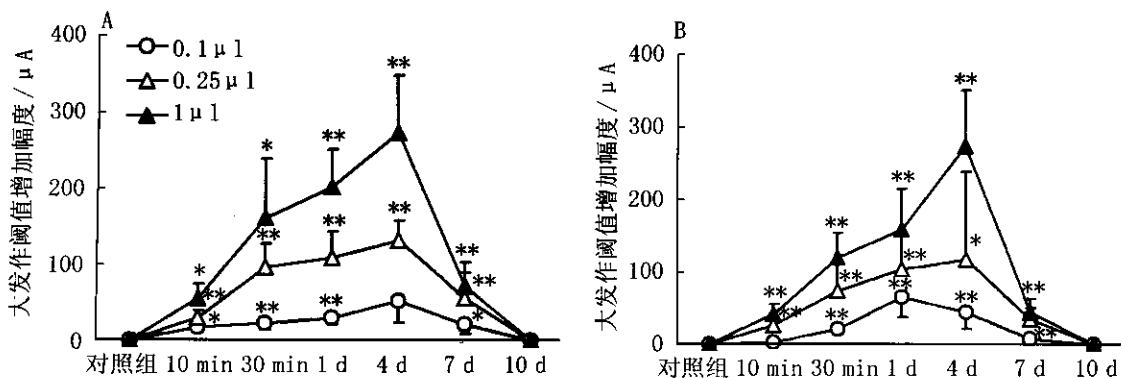
以往研究表明,海马、杏仁核、黑质以及丘脑下核团等多数脑区内微量注射生理盐水并没有抗癫痫作用^[8-9],而在梨状脑的前、中、后区以及横核等少数脑区内,注射生理盐水有抗癫痫作用。而且,梨状脑中间区注射生理盐水后升高 GST 作用比梨状脑其他部分强,而横核内注射生理盐水不能抑制癫痫的发作,只能够减少癫痫大发作持续时间^[2,10]。梨状脑中间区和横核在杏仁核电点燃癫痫中都起着重要作用,而且他们之间有着密切的相互纤维投射^[2,11]。虽然它们之间的其他联系并不是很清楚,但至少说明这两个脑区的组织对于物理压力是非常敏感的,尤其是梨状脑中间区。为了进一步研究生理盐水抗癫痫作用的机制,我们在单侧梨状脑中间区微量注射 0.1 μl 人工脑脊液,结果发现仍然有显著的抗癫痫作用(结果未显示)。因此,我



A,C 同侧梨状脑中间区注射生理盐水 B,D 对侧梨状脑中间区注射生理盐水 和空白对照组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 不同体积生理盐水注射到单侧梨状脑中间区对杏仁核电点燃癫痫大发作率及大发作持续时间的作用

Fig. 1 The effects of saline microinjection into unilateral central piriform cortex on the inhibition rate and the duration of generalized seizures



A 同侧梨状脑中间区注射生理盐水 B 对侧梨状脑中间区注射生理盐水 和空白对照组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 不同体积生理盐水注射到单侧梨状脑中间区对杏仁核电点燃癫痫大发作的 GST 的影响

Fig. 2 The effects of saline microinjection into unilateral central piriform cortex on the GST increment

们认为生理盐水在梨状脑中间区的抗癫痫的作用,可能是注射后引起梨状脑中间区局部组织

受到物理挤压,细胞间隙发生了相应的机械变化,导致 GABA 等一些抑制性神经递质的释

放,从而阻碍了癫痫的扩散所致。这些猜测还有待于我们进一步实验证实。

同时,实验还发现对侧梨状脑中间区内注射生理盐水,也能够起到和同侧注射生理盐水强度相当的抗癫痫大发作作用。这提示对侧和同侧梨状脑中间区一样,在杏仁核电点燃癫痫大发作重起着重要作用。我们最近的实验发现,单侧低频电刺激梨状脑中间区,能够显著抑制杏仁核电点燃癫痫的发作过程,而且,低频电刺激同侧梨状脑中间区的抗癫痫作用,比低频电刺激对侧更强,提示同侧和对侧梨状脑中间区在杏仁核电点燃癫痫的发展过程中,都起着重要的作用,其中,同侧的作用可能更加重要^[7]。结合我们以往的研究结果,可以得出以下结论:同侧和对侧梨状脑中间区在杏仁核电点燃癫痫的形成过程中都起着重要作用,其中同侧作用稍强,而在大发作中两者起着同样重要的作用。

我们实验中还惊奇地发现,不同剂量的生理盐水的抑制作用持续长达 10 d,抑制作用消失后,大鼠仍能回复到原有水平。这与 Schwabe 等人 2004 年的研究结果相符合^[6]。至少说明生理盐水对梨状脑中间区的组织影响,只是一过性而且无损伤的。对于生理盐水在梨状脑中间区的长时程抗癫痫作用,我们还很难解释,可能引起了梨状脑中间区短时间内的早期基因的表达和神经递质释放量的改变,以及局部的蛋白表达变化等一过性改变,生理盐水在梨状脑中间区内的抗癫痫作用的具体机制还有待后续实验的进一步探讨。

总之,我们的实验主要发现了:(1)单侧梨状脑中间区内微量注射生理盐水有显著地抗癫痫作用;(2)同侧和对侧梨状脑中间区在杏仁核点燃癫痫大发作中都起着重要作用。我们的实验结果为临床治疗癫痫大发作提供了新的线索,而且梨状脑中间区也可能成为癫痫(特别是颞叶癫痫)治疗的新靶点。然而,生理盐水注射到梨状脑中间区的副作用还需要进一步研究,特别是局部组织形态学的改变以及辨别、学习等行为学的改变。

References :

[1] WILLSON D A,STENVENSON R J. The fundamen-

tal role of memory in olfactory perception [J]. *Trends Neurosci*,2003,26(5) 243 - 247.

[2] LOSCHER W,EBERT U. The role of the piriform cortex in kindling [J]. *Prog Neurobiol*,1996,50 : 427 - 481.

[3] LI Qing,LIU Lu - ying,ZHU Yuan - yuan,et al(李青,刘路英,朱媛媛,等). Effect of chronic transauricular kindled seizures on passive - voidance test memory retention in rats [J]. *Journal of Zhejiang University Medical Sciences* (浙江大学学报 医学版)2006,35(4) 419 - 423. (in Chinese)

[4] ZHANG Li - san,MA Yuan - yuan,LI Qing,et al(张立三,马袁英,李青,等). Effects of endogenous histamine on memory impairment induced by pentylenetetrazole - kindled epilepsy in rats [J]. *Journal of Zhejiang University Medical Sciences* (浙江大学学报 医学版)2006,35(6) 630 - 634. (in Chinese)

[5] SCHWABE K,EBERT U,LOSCHER W. The central piriform cortex : anatomical connections and anticonvulsant effect of GABA elevation in the kindling model [J]. *Neuroscience*,2004a,126 727 - 741.

[6] SCHWABE K,EBERT U,LOSCHER W. Bilateral microinjections of vigabatrin in the central piriform cortex retard amygdala kindling in rats [J]. *Neuroscience*,2004b,129 425 - 429.

[7] YANG L X,JIN C L,ZHU - GE Z B,et al. Unilateral low - frequency stimulation of central piriform cortex delays seizure development induced by amygdaloid kindling in rats [J]. *Neuroscience*,2006,138 1 089 - 1 096.

[8] DAVID D,KAREN G. Postural and anticon - vusant effect of inhibition of the rat subthalamic nucleus [J]. *J Neurosci*,2000,20(17) 6 728 - 6 733.

[9] GERNERT M,LOSCHER W. Lack of robust anticonvulsant effects of muscimol microinjection in the anterior substantia nigra of kindled rats [J]. *European J Pharmacol*,2001,432 35 - 41.

[10] WAHNSCHAFTE U,LOSCHER W. Anticon - vusant effects of ipsilateral but not contralateral microinjection of the dopamine D2 agonist LY 171555 into the nucleus of the accumbens of amygdala - kindled rats [J]. *Brain Res*,1991,553 : 181 - 187.

[11] EBERT U,LOSCHER W. Strong induction of c - fos in the piriform cortex during focal seizures evoked from different brain sites. *Brain Res*,1995,671 338 - 344.