董博思,邱湘苗,赖婉琳,等. 癫痫动物模型的研究进展［J］. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 128-138.
Dong BS, Qiu XM, Lai WL, et al. Animal models of seizures and epilepsiesy［J］. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 128-138.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.03.020

癫痫动物模型的研究进展

董博思,邱湘苗,赖婉琳,李宛凌,彭安娇,陈　蕾*

(四川大学华西医院神经内科,成都　610041)

【摘要】 癫痫是一种常见的神经疾病,但我们对于其病因知之甚少,因此很难找到有效的治疗方法。在过去的 30 年里,癫痫动物模型在研究癫痫发生机制和确定潜在治疗药物等方面都起着至关重要的作用。但迄今为止,还没有任何一个理想的单一模型被证实可用于识别潜在的药物和充分解释癫痫的发生原因。本综述对目前制备癫痫动物模型的方法及优化方案进行总结,为癫痫模型的选择提供参考,并提供了未来一些癫痫模型制备方向的见解。

【关键词】 癫痫;动物模型;点燃模型;遗传性模型

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2021) 03-0128-11

Animal models of seizures and epilepsiesy

DONG Bosi, QIU Xiangmiao, LAI Wanlin, LI Wanling, PENG Anjiao, CHEN Lei*
(Department of Neurology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041)

【Abstract】 Epilepsy is a common neurological disorder, with but little acknowledge ofis known about its causes, thus leading tomaking it difficulty into finding an effective therapyies. Over the last 30 years, experimental models of epilepsiesy have contributed greatly in to improving our understanding of epilepsy and identification of potential therapeutic agents for epilepsy. However, there is notno one "ideal" animal model exists for the discoverying of new antiepileptic drugs and or fully explaining epileptogenesis. This paper provides a review of the research of using experimental models of epilepsiesy and provides new some insights on the futureand direction of for the establishment ofing epileptic models of epilepsy.

【Keywords】 seizure and epilepsy; animal model; kindling model; genetic model

癫痫是一种常见的由多种病因所致的发作性神经系统疾病,为了了解其复杂的生理病理机制,探究相关遗传因素及开发抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs),人们建立了癫痫动物模型。最初的模型是 Jackson 等人于 1869 年在狗身上建立的[1],在此基础上各种理化因素诱导的动物模型根据不同的研究目的被建立。本文将目前已有的癫痫动物模型的诱发方式、优缺点、主要应用、改良方式等做一总结。

1　常见癫痫模型的行为学特征及优缺点

常用癫痫建模方法及应用见表 1。

1.1　化学药物

常用的化学点燃方式可通过直接在动物脑内注射低剂量的兴奋剂,或通过反复系统应用阈下浓度的惊厥剂来诱发癫痫。由于点燃可以精确地确

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81871018)。
[作者简介]董博思(1996—),女,硕士研究生,主要从事癫痫及发作性疾病研究。E-mail:bosi_betsy@foxmail.com
[通信作者]陈蕾 (1981—),女,医学博士,教授,博士生导师,主要从事癫痫和围产期神经系统疾病研究。E-mail:leilei_25@126.com

定癫痫发作的时间、癫痫发作的部位,故可提供癫痫倾向性、反复癫痫发作对大脑的影响、不同结构在调节癫痫持续时间和扩散中的作用、不同区域相对易感性等大量信息。当然它也有一定的缺点:局部刺激可能无法预测其他部位的后果;在正常动物中进行的癫痫可能与癫痫动物的发作结果不同,且不同品系、年龄、性别动物对这些化学致痫剂及 AEDs 反应存在差异[2];点燃也是一个昂贵和耗时的过程,包括植入物丢失、损坏的风险。此外,许多化合物在全身给药时也能产生急性全面性起源发作,如 3-巯基丙酸、β-咔啉、美解眠等。这些模型的共同优点是制作简单,虽然致痫机制稍有不同,但药物的选择通常主要取决于研究者的熟悉程度[3]。该类模型对我们了解从刺激性癫痫到癫痫持续状态的转变有哪些变化,癫痫在什么时候加重并导致脑损伤,以及如何预防等问题至关重要。

1.1.1　戊四氮(pentylenetetrazol, PTZ)

化学药品中最经典的便是通过阻断 GABA 传递致痫的 PTZ,可用于建立急、慢性癫痫动物模型。在啮齿类动物中以阈值剂量注射 PTZ 可导致急性肌阵挛和紧张性扩张;而以较低的阈下剂量重复给药可引起点燃现象,其最初的非惊厥剂量可降低实验动物的死亡率,同时大多数动物都能诱发癫痫活动,如无需后续药物干预的改良 window-PTZ 点燃法[4],但少见明显苔藓纤维发芽及自发性癫痫发生[5]。此外,低剂量 PTZ(20~30 mg/kg)可引起失神发作,适合于相关 AEDs 筛选[6]。

1.1.2　红藻氨酸(kainic acid, KA)

KA 是一种从红藻中提取的 L-谷氨酸神经毒类似物,对海马具有特别突出的毒性作用,并呈剂量依赖性,故以中小剂量常用[7]。脑内注射 KA 可用于研究致痫灶对周围和正常脑组织的影响,而全身注射 KA 通常用来研究大脑多个区域对癫痫发生的易感性和药物研究。在此基础上的 KA 快速点燃法可节约时间、药品成本且具有永久性[8],KA 模型在潜伏期、行为症状、潜伏期持续时间以及潜伏期和慢性期的脑电图特征等方面与人类相似[9],有助于我们更好地了解颞叶癫痫过程,开发更有效的靶向治疗药物。此外,用 KA 靶向注射小鼠腹侧海马可建立一个在癫痫发作和认知表型与标准背侧海马模型相似的颞叶癫痫模型,但具有明显的情感特征,可用于进一步研究颞叶癫痫的重要共病[10]。

1.1.3　匹罗卡品

毛果芸香碱(匹罗卡品)诱导癫痫的能力可能取决于 M1 受体的激活,并可在癫痫发作后可引起海马谷氨酸水平升高及 NMDA 受体激活,从而维持癫痫发作[11]。该模型具有反复自发性发作、典型海马硬化、苔藓纤维发芽等特点[12]。匹罗卡品模型相较于上述药物发作更加持久,更可靠、实验时间更短及成本最低。虽然其脑电图特征和神经病理学改变与 KA 相似,但全身应用匹罗卡品后,可观察到丘脑、黑质、大脑皮质等更广泛的形态学病变,但须考虑到系统性使用 KA 也可能会导致海马外区域损伤,且颞叶癫痫患者也会有海马外神经元损伤的表现。此外,锂-毛果芸香碱模型不仅可减少匹罗卡品剂量,也显示出与人类持续性癫痫非常相似的表现,杏仁核电刺激代替锂预处理也可得到类似效果[13]。

1.1.4　金属

通过损伤皮层制备癫痫模型应用最为广泛的便是植入金属,其中最具有代表性的是涂抹铝乳膏的动物模型。该模型发作间期和发作期脑电图与临床局灶性癫痫相似,偶尔会进展为继发性全面强直阵挛性发作,且该模型对标准 AEDs 的反应也与局灶性癫痫患者相同[14]。虽然植入金属模型是慢性局灶性癫痫的良好模型,但制备难度大、成本高。另外,铁离子导入蛛网膜下腔动物模型与皮层或杏仁核注射相比,虽不适合作为人类难治性癫痫的药物及发病机制研究,但其早期诱发出癫痫强烈,成功率高(95%),且能模拟人类蛛网膜下腔出血所产生的癫痫,操作起来也相对容易[15]。

1.1.5　青霉素

低剂量青霉素诱导局灶性癫痫模型适用于研究癫痫发作活动扩散的分析[16],但青霉素模型更常用于模仿具有抗药性的失神发作,且 PTZ、光刺激和 GABA 能激动剂可加剧发作。但给啮齿动物肌注时,不会持续产生与猫相似的双边同步棘慢波发放(spike wave discharges, SWDs),相反地会产生多灶性尖峰。不过用青霉素预处理大鼠后,可增加其他化学药物诱导 SWDs[17],对研究与棘慢波发放相关的细胞机制与在产生棘慢波爆发时皮质对皮质下结构的作用非常有用。

1.1.6　AY-9944

AY-9944 是一种抑制 7-脱氢胆固醇降解为胆固醇的化合物,是目前唯一永久性的不典型失神模型,其诱导机制尚不完全清楚,不过为胆固醇在抑

制癫痫发生的作用提供思路。另外 AY 结合抗有丝分裂剂 (methylazoxymethanol acetate, MAM)可模拟伴有脑发育不全的难治性不典型失神发作[18]。该模型在可靠性、自发性、复发性和诱发癫痫的慢性发作方面比遗传模型相更具优势,但在识别和量化实验性失神发作所需脑电图监测方面要求更高。

1.1.7 γ-羟基丁酸盐(γ-hydroxybutyrate, GHB)

GHB 模型是公认的失神发作模型,可观察到双侧同步的与行为停止、面部肌阵挛和颤动抽搐有关的 SWDs[19]。使用有生物活性的 GHB 前体(GBL)可产生与 GHB 完全相同的脑电图和行为效应,但其效应相对更持续和迅速。

1.2 物理方法

1.2.1 电刺激

一种局灶性癫痫发作模型是通过直接电刺激皮质产生的,重复电脉冲会导致脑急剧放电[20]。另一种更常用的是通过电点燃数周后,动物可表现出自发癫痫发作。对于电刺激参数,通常认为电刺激间隔时间才是关键变量,在波宽 1 ms, 频率 60 Hz, 刺激时间为 1 s 的标准条件下,间隔 15 min 到 7 d 都能引出点燃,但间隔 15~30 min 需要更多次刺激才能点燃[21]。在此基础上一种快速电点燃模型可使苔藓纤维发芽发展更快,减少动物痛苦[22]。

由于电点燃法需要先进的外科手术和脑电图技术,6 Hz 角膜点燃法成为了一种简单有效的替代方法。该模型在显性表现和脑电图模式上与精神运动性癫痫具有高相似性;也被认为是耐药性癫痫潜在治疗药物的筛选工具[23]。然而,电点燃与海马硬化症无关,损伤与颞叶癫痫也不相似,自发癫痫相对药物发生较少。

最大电休克(maximal electroshock, MES)是目前研究全面性发作最透彻、最适宜使用的模型。因为 MES 和 PTZ 制备方法简单,且有比较高的筛选 AEDs 的效率,故 MES 模型和 PTZ 模型通常是作为初次筛选癫痫药物的金标准。但 MES 模型对作用于离子型通道的药物有偏向性,易导致其他 AEDs (如氨基己酸、噻加宾等)被忽略[24]。

此外 Hunter 等[25]人的研究显示刺激内丘脑可产生类似失神表现和脑电图,但是由于需要长期置入电极需不断刺激,且死亡率相对较高,而很少使用于制造失神模型。

1.2.2 低温

低温损伤模型是一种不需要将外源性药物注入体内也可以引起局灶性癫痫的模型。这种液氮探针可造成致痫病灶伴随脑水肿发生,发作可持续数天,具有可重复性,死亡率较低(<5%),可发生自发性癫痫,但动物年龄、系统给药对该模型惊厥阈值的影响还不清楚[17]。

1.3 遗传模型

一些神经元烟碱乙酰胆碱受体基因(CHRNA4, CHRNB2,CHRNA2)和 KCNT1 引起常染色体显性遗传性夜间额叶癫痫和 LGI1 与具有听觉特征的常染色体显性遗传性癫痫的啮齿类动物模型[26]使得遗传因素在局灶性癫痫中的重要作用现已得到充分证实。而利用遗传性模型来研究人类全面发作也被认为是目前最有希望的途径之一[3],主要有光敏性狒狒 Papio Papio 模型、遗传性癫痫易感鼠听源性模型、个体差异较大的癫痫易感沙土鼠(MG)等模型。此外,遗传因素在失神发作的发病机制中也发挥着重要作用,但大多数品系的小鼠与在 WAG/Rij 大鼠身上观察到的相反,并没有自发的 SWDs,而当观察到 SWDs 时,通常伴发其他神经系统疾病,如嗜睡小鼠(l h/l h)、Tottering 鼠、Stargazer 鼠、Ducky 鼠等[27]。研究人员还发现一些品系还具有其他特性,适宜用来研究癫痫与抑郁等其他疾病的关系,并有助于制定治疗这些共病的新治疗策略[28]。然而,自然界发现的癫痫动物不能确保一定是研究所筛选的基因引起的,目的性地敲除或过表达所要研究的基因、制作出特定的小鼠基因模型越来越受欢迎(见表 2)。但特定的基因表达可能导致任何年龄的动物死亡,如果转基因 DNA 随机插入基因组,在多达 5%的转基因品系中会发生中断或干扰内源性基因的表达,而这种插入突变产生的潜在表型是不可预测的,明显干扰了研究对转基因本身表达产生癫痫的解释。

1.4 新生儿惊厥模型

新生儿惊厥动物模型有助于研究自发性发作的潜伏期和降低癫痫发作阈值,有望用于探究预防癫痫发作的方法,也适宜进行细胞培养用于体外研究。目前主要有缺氧缺血(hypoxia-ischemia, HI)和热性惊厥(febrile seizures, FSs)模型成功复制了新生儿惊厥发作的一些结构异常和认知功能障碍。现快速缺血缺氧模型可没有明显脑损伤,且各品系之间差别微小[29]。但 FS 不涉及明显的神经元丢失[30],且动物癫痫发作是由高温引起的,这些都与人类的疾病过程不同;而 HI 模型在更年幼(P5)和

成年(P60)大鼠通常不会发作[31],这其中可能涉及其他机制。

此外,上述药物或技术可联合使用以实现各种模型优势互补。有研究发现苯环定(phencyclidine, PCP)对 125 mg/kg NMDA 引起癫痫表现没有干扰,但可大大降低动物死亡率[32];联合镇静剂与感觉刺激可产生无人工制品使用和脑损伤的模型,用于研究反射性癫痫产生和传播机制,以及评价 AEDs[33];还有在应用基因工程技术增加动物癫痫易感性的基础上,用点燃等方式诱发癫痫来研究遗传机制等。

表 1　常见动物模型制备

Table 1　The summary of models of seizures and epilepsy

诱导方式 Method	动物 Animal	发作类型 Classification of epileptic seizures	成功率 Success rate of modeling	死亡率 Mortality	应用情况 Application	作者,时间 Author, time
两侧运动皮层和额叶注射 500 单位青霉素 500 units of penicillin were injected into bilateral motor cortex and frontal lobe	猴 Monkey	急性局灶性癫痫发作 Acute focal seizures	60%	–	发作和扩散机制、手术治疗 Mechanism and surgical treatment of epilepsy	Walker et al., 1945[34]
25~40 万 IU/kg 青霉素钠 G i.m. 250000 ~ 400000 IU/kg penicillin G sodium	成年雄猫 Male adults cats	失神发作 Absence seizure	–	–		Taylor-Courval et al., 1984[35]
内嗅皮质注射 7.5~30 μg 荷包牡丹碱 Bicuculline methiodide was injected near the area tempestas	婴儿期猪尾猕猴 Pigtailed macaque infant monkeys	急性局灶性癫痫发作 Acute focal seizures	44%			Gunderson VM. et al., 1999[36]
1.5 mg/(kg·d)苦味毒 i.p. 20 d 20 days 1.5 mg/(kg·d) picrotoxin i.p.	雄鼠 Male Wistar	局灶性癫痫发作 Focal epilepsy	75%	–		Shandra AA. et al., 1996[37]
18.5 mg/kg 美解眠 i.p 18.5 mg/kg megimide i.p.	雄鼠 Male Wistar	急性癫痫发作 Acute convulsions	73.3%	0%		袁治,等,2001[38]
隔天 35 mg/kg PTZ s.c 35 mg / kg PTZ s. c. was injected every other day	4-5 周雄白鼠 NIHS wiss albinomic male mice(4~5 weeks)	慢性发作 Chronic epilepsy	–	–	发作与扩散机制、药物筛选 Mechanism of epilepsy and screening of AEDs	Dhir, et al., 2012[39]
80 mg/kg PTZ i.p./s.c.		急性发作 Acute convulsions	–	75%		
5 mg/kg KA i.p.,根据行为停止注射或给一半剂量,最多注射 10 次 5 mg/kg KA i. p., stop injection or give half of the dose according to the behavior, up to 10 times	雄鼠 Male Sprague-Dawley	慢性发作 Chronic epilepsy	>97%	<15%	发作机制、认知障碍、药物筛选、电刺激海马深部 Mechanism of epilepsy, cognitive impairment, screening of AEDs, and deep brain stimulation	Hellier et al., 2005[40]
每两周注入右侧杏仁核 0.12~0.24 mg/kg KA(2~4 次) The right amygdala was injected with 0.12 ~ 0.24 mg/kg KA every two weeks	雄恒河猴 Male rhesus monkey	局灶性发作 Focal seizures	66.7%			Chi et al., 2017[41]

续表 1

诱导方式 Method	动物 Animal	发作类型 Classification of epileptic seizures	成功率 Success rate of modeling	死亡率 Mortality	应用情况 Application	作者,时间 Author, time
250 mg/kg 匹罗卡品 i.p.发作后 5 min 1.25 mg/kg 地西泮 i.p,4 h 后仍癫痫状态则补充 1.25 mg/kg 地西泮 i.p animals with SE caused by pilocarpine hydrochloride (250 mg/kg; i.p.) received diazepam at 1.25 mg/kg; i.p. The animals remaining in SE after 4 h received a supplementary dose of diazepam (1.25 mg/kg; i.p.)	成年狨猴 Male Callithrix jacchus	癫痫持续状态 Status epilepticus	80%	–	发生机制、认知障碍与癫痫、治疗 Mechanism of epilepsy, cognitive impairment and treatment	Perez-Mendes P et al., 2011[42]
		自发性癫痫 Spontaneous epilepsy	71.4%	–		
25~50 ng/0.5 μL 破伤风毒素注入右侧运动皮质 Injecting 25-50 ng of tetanus toxin into right motor neocortex	雄鼠 Male Sprague-Dawley	局灶性癫痫 Focal seizures	78.1%	10.9%	发生、发展机制及其致痫机制 Mechanism of epilepsy	Nilsen et al., 2005[43]
4 mmoL/kg GBL, 344.4 mg/kg i.p.	雄鼠 Male Sprague-Dawley	失神发作 Absence seizure	–	–	发作机制及药物筛选、疗效评价 Mechanism of epilepsy and screening of AEDs and evaluation	Bearden et al., 1980[44]
0.1 mL/10 g NMDLA s.c.	雄鼠 Male NMRI	全身强直阵挛发作 Generalized tonic-clonic seizures	96.4%	28.6%		Czuczwar et al., 1985[45]
从 P2~P33 每 6 d 一次 7.5 mg/kg AY s.c. 7.5 mg / kg AY s.c. every 6 days from P2 to P33	鼠 Sprague-Dawley, Long Evans, Wistar	失神发作 Absence seizure	-(Long-Evans 更易感)	–		Cortez M. et al., 2001[46]
7.5 mg/kg& 10 mg/kg THIP i.p.	雄鼠 Male Sprague-Dawley, Long Evans	失神发作 Absence seizure	65%-75%	–		Fariello et al., 1987[47]
深部结构立体定向注射 10mM/μL THIP Stereotactic injection of 10 mm / μL THIP		失神发作 Absence seizure	20%	–		
每 72 h 1.50 mg/kg 马桑内酯 i.m.,最多 60 次 1.5 mg / kg coriaria lactone i.m. was injected every 72 hours, up to 60 times	雄恒河猴 Male rhesus monkeys	颞叶癫痫及继发性全身强直阵挛发作 Temporal lobe epilepsy and generalized tonic clonic seizures	100%	0%		Hong et al., 2013[48]
直径 1.0 mm, 长度 1.5 mm 钴丝置入左侧运动皮层 Implantation of a short length of cobalt wire into the left motor cortex	鼠 Sprague-Dawley	亚急性局灶性癫痫(9 d 内消失) simple partial seizures	–			Chang et al., 2004[49]
		继发性全身发作(最常见于钴植入后 1 周) secondarily generalized seizures	–			
		自发局灶性发作(出现于继发性全身发作 1 周后) spontaneous epilepsy	44.4%	–		

续表 1

诱导方式 Method	动物 Animal	发作类型 Classification of epileptic seizures	成功率 Success rate of modeling	死亡率 Mortality	应用情况 Application	作者,时间 Author, time
一张浸泡在 1.1 g/mL NiCl·6H2 O 的滤纸放在单侧硬脑膜上 1 h A piece of Whatman filter paper, which had been soaked in a solution of $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, was quickly on top of the exposed dura	鼠 Long-Evans	慢性局灶性癫痫发作 Chronic focal epilepsy	72.4%	–		Cooper et al., 2001[50]
左中央前、后皮质区注射 0.4cc 氧化铝凝胶 4% aluminum hydroxide will be injected into surgically exposed monkey neocortex	雄恒河猴 Male Macaca mulatta	局灶性癫痫发作后 8-22 周发展为全面性发作 Partial seizures & secondarily generalized tonic-clonic seizures	–	–		Lockard et al., 1976[51]
6 Hz, 44 mA 电流刺激角膜,持续时间 3 s,每天两次,每次刺激之间最少间隔 4 h Using a current intensity of 44 mA, 0.2 ms monopolar pulses at 6 Hz and 3 s duration every 2 days	大鼠 Rats	全面性发作 Generalized seizure	90%	–		Leclercq et al., 2014[52]
3 mA 50 Hz 脉冲持续 3 s,每天刺激 2 次,刺激之间最少间隔 4 h Using 3 mA current intensity, at 50 Hz pulse frequency for 3 s duration	雄鼠 Male NMRI	慢性发作 Chronic epilepsy	60%	–	发生机制、药物筛选、认知障碍、电刺激海马深部 Mechanism of epilepsy, cognitive impairment, screening of AEDs, and deep brain stimulation	Song et al., 2007[53]
200 Hz 下 0.5 ms 脉冲持续 300 ms 0.5 ms monopolar pulses at 200 Hz and 300 ms duration	果蝇 *top1*^{JS}	急性癫痫发作 Acute convulsions	–	–		
每天用 1 s,60 Hz 正弦波刺激点燃扣带回 The left cingulate was chosen as the primary kindling site and was stimulated at the afterdischarge threshold a 1 s, 60-Hz sine wave once daily	狒狒 Papio Papio	局灶性癫痫及继发性全身强直-阵挛发作 Partial seizures/ secondarily generalized tonic-clonic seizures	75%	25%		Wada et al., 1995[54]
直径 4 mm 的液氮探针置入右侧大脑半球 A freezing lesion was produced in three adjacent sites of the right hemisphere by application of a 4 mm diameter liquid nitrogen cryode	雌兔 Female Fauve de Bourgogne	慢性局灶性癫痫发作 Chronic focal epilepsy	60.9%			Loiseau et al., 1987[55]

续表 1

诱导方式 Method	动物 Animal	发作类型 Classification of epileptic seizures	成功率 Success rate of modeling	死亡率 Mortality	应用情况 Application	作者,时间 Author, time
O2 7% 8 min, 5% 6 min, 4% 1 min	P10 雄鼠 Male Long-Evans (P10)	急性癫痫发作 Acute convulsions	93%	– –	发病机制、认知缺陷与细胞死亡、治疗 Mechanism of epilepsy, cognitive impairment and neuron death, treatment	Rakhade et al., 2011[56]
结扎颈动脉 Ligation of carotid artery	P7 鼠 Sprague-Dawley (P7)	自发性癫痫 Spontaneous epilepsy 自发性局灶性癫痫及全面性发作 Spontaneous epilepsy	94% 56%			Kadam et al., 2010[57]
39.5℃–42.5℃高温 39.5℃–42.5℃ hyperthermia	P11 鼠 Sprague-Dawley (P11)	自发性全面性癫痫发作 Spontaneous epilepsy	50%	–		Koyama et al., 2012[58]
放入促痫缓冲液后,用白炽光源逐渐升高缓冲液温度达(27±1)℃ Placing the worms in a seizure promoting buffer, then gradually increasing the temperature (26℃ ~ 28℃) of the buffer using a variable intensity incandescent light source to generate the heat	线虫 Caenorhabditis elegans	急性癫痫发作 Acute convulsions	–	–	痫性发作长期后果的机制、治疗 Mechanism of long-term consequences of epileptic seizures, treatment	Pandey et al., 2010[59]
右侧海马注射囊虫感染后肉芽肿提取物 10 μL,若 15 min 无反应,再注射 10 μL A single injection of 10 μL extract was administered in right dorsal hippocampus. If There was no response to the first injection within 15 min, then a second injection of 10 μL was administered.	成年鼠 Adult Sprague-Dawley	急性癫痫发作 Acute convulsions	–	–		Stringer et al., 2003[60]
HSV 病毒悬液注入硬脑膜下脑区 Aliquot of virus was inoculated directly into the bulb with a tuberculin syringe.	新西兰白兔 Adult New Zealand white rabbits	局灶性癫痫 Focal epilepsy	–	69%		Schlitt et al., 1986[61]

表 2 基因小鼠模型

Table 2 The summary of genetic models

基因 Gene	功能 Function	突变方式 Mutation type	表型 Phenotype or syndrome in mice	人类对应基因突变后表型 Phenotype or syndrome in human
AKv1.1a	电压门控性延迟性整流钾通道 Voltage gated K+ channel	转基因 Transgene	自发性皮质放电 Spontaneous cortical discharges	–
Kv1.1	电压门控性延迟性整流钾通道 Voltage gated K+ channel	敲除 Knock out (KO)	强直-阵挛 Tonic-clonic seizures	共济失调 Ataxia

基因 Gene	功能 Function	突变方式 Mutation type	表型 Phenotype or syndrome in mice	人类对应基因突变后表型 Phenotype or syndrome in human
Cacna 1a	电压依赖性钙通道 α1 A 亚基 Voltage dependent calcium channel α 1 A subunit	突变 Spontaneous	失神发作,共济失调 Absence epilepsy, ataxia	家族性偏瘫偏头痛;原发性全面性癫痫伴共济失调及轻度学习困难;失神发作 Familial hemiplegic migraine (FHM); Primary generalized epilepsy, ataxia, mild learning difficulties; absence epilepsy
Chrna4	烟碱型乙酰胆碱受体 Nicotinic acetylcholine receptor	敲入 Knock in(KI)	尼古丁诱发癫痫的阈值降低 Reduced threshold to nicotine induced seizures	常染色体显性夜间额叶癫痫 Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE)
Chrnb2	烟碱型乙酰胆碱受体 Nicotinic acetylcholine receptor	转基因 Transgene	自发性癫痫 Spontaneous seizures	常染色体显性夜间额叶癫痫 ADNFLE
Gabrb3	γ 氨基丁酸 A 受体 GABAA	敲除 KO	肌阵挛及偶发性癫痫发作;腭裂 Myoclonus and occasional epileptic seizures; cleft palate	腭裂;Angelman 综合征、Prader-Willi 综合征相关癫痫发作 Cleft palate; Human Rearrangements of 15q11-q13 Angelman syndrome (AS) and Prader-Willi syndrome (PWS)-associated seizures
Gabrg2	GABA 受体 γ2 亚基 GABAγ2	敲除 KO	癫痫发作约 4 周后死亡 Epilepsy, lethality around 4 week	全身癫痫伴热惊厥发作 Generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+)
Gad2	谷氨酸脱羧酶-2 Glutamate decarboxylase-2	敲除 KO	自发性癫痫(死亡率高) Spontaneous seizures, increased mortality	-
Glra1	甘氨酸受体, α1 Glycine receptor, α 1	敲入 KI	癫痫发作约 3 周死亡;惊跳病 Seizures and lethality by 3 week; hyperekplexia	惊跳病 Hyperekplexia
Kcna1	电压门控 K 通道 Voltage gated K+ channel	敲除 KO	成年后自发性癫痫 Frequent spontaneous seizures through adult life	强直阵挛及单纯部分性癫痫发作 Tonic-clonic and simple partial seizures
Kcnc2	电压门控 K 通道 Voltage gated K+ channel	敲除 KO	自发性强直阵挛性发作 Spontaneous tonic-clonic convulsions	-
Kcnq2	电压门控 K 通道 Voltage gated K+ channel	有条件的显阴性的转基因 Conditional dominant-negative *Kcnq*2 transgene	自发性癫痫伴海马形态改变 Spontaneous seizures, behavioral hyperactivity and morphologic changes in the hippocampus	良性家族性新生儿癫痫 Benign familial neonatal convulsions (BFNC)
Lgi1	富亮氨酸胶质瘤失活 Inactivation of leucine rich glioma	敲除 KO	自发性癫痫 Spontaneous seizures	伴听觉特征的常染色体显性遗传癫痫 Autosomal dominant epilepsy with auditory features
Scn1a	电压门控钠通道 Voltage gated Na + channel	敲除 KO	自发性癫痫 Spontaneous seizures	Drave 氏综合征;全身癫痫伴热性惊厥 DS; GEFS+
Scn1b	电压门控钠通道 Voltage gated Na + channel	敲除 KO	自发全面性癫痫 Spontaneous generalized seizures	全身癫痫伴热性惊厥 GEFS+

续表 2

基因 Gene	功能 Function	突变方式 Mutation type	表型 Phenotype or syndrome in mice	人类对应基因突变后表型 Phenotype or syndrome in human
Scn2a	电压门控钠通道 Voltage gated Na + channel	转基因 Transgene	自发性癫痫发作 Spontaneous seizures	全身癫痫伴热性惊厥;良性家族性新生儿癫痫 GEFS+; BFNC
Slc2a1	易化葡萄糖转运蛋白 Facilitated glucose transporters	反义转基因 Antisense transgene	发育迟缓和发育畸形 Growth retardation and developmental malformations	婴儿痉挛发作,后天小头畸形,发育迟缓 Infantile seizures, acquired microcephaly, developmental delay
cystatin B	半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Cysteine protease inhibitor	敲除 KO	共济失调;癫痫发作及肌阵挛(仅睡眠时发生) Ataxia; seizures and myoclonus (sleep only)	进行性肌阵挛癫痫 Progressive myoclonus epilepsy
FMR1	脆性 X 智力低下蛋白 Fragile X mental retardation protein	敲除 KO	听源性癫痫 Audiogenic seizure	脆性 X 综合征 Fragile X syndrome

2 模拟特殊病因模型的行为学特征及优缺点

2.1 外伤

目前创伤后癫痫动物模型都是模仿创伤后晚期癫痫发作,即初始损伤后超过一周发生癫痫,主要用于探究创伤后癫痫发病机制、认知缺陷与细胞死亡、治疗等方面。流体冲击损伤是创伤后癫痫最广泛使用和研究最深入的模型,可模仿创伤性脑损伤相关的组织病理学,且在伤后 1 年内表现出持续的神经运动和认知缺陷,但该模型缺乏对治疗药物有效性的预测;控制性皮质撞击可模仿急性硬膜下血肿、轴突损伤、血脑屏障功能障碍等,数周后癫痫易感性增加,表现为与颞叶癫痫相关的特征,但需要复杂的技术装置;加速冲击模型相对制造简单且造成损伤严重程度易控制,但再现可靠率低,死亡率高,不能产生自发性发作[62]。

2.2 微生物感染

虽然病毒、寄生虫等感染模型有炎症和神经元死亡、高兴奋性和行为性癫痫的证据,可用于相关脑炎治疗药物的检测,但因模型的高死亡率和癫痫活动的变异性,不适于 AEDs 的检测。

2.3 脑肿瘤

癫痫发作频率和发生率与肿瘤的位置、病理特征和病变进展有关,故而了解肿瘤性癫痫的病因是准确有效治疗的前提。目前通常将鼠 C6 胶质瘤细胞移植到稳定转染绿色荧光蛋白(GFP)基因的大鼠的皮质中进行造模,在组织学上类似于人类胶母细胞瘤的弥漫性侵袭性胶质瘤[17]。

2.4 脑卒中

脑卒中后痫性发作模型是确定发作关键步骤或途径并制定预防卒中后痫性发作干预策略的关键,目前尚无标准的动物模型,主要因为技术要求高、病变的大小和分布不一、死亡率高。近年来光血栓模型备受关注,其痫性发作发生在光血栓形成数周后,在海马区可发现苔藓状纤维,死亡率相对较低[63]。

3 展望

动物模型除了应用于探究癫痫机制及 AEDs 外,当代社会一些环境对癫痫患者发作的影响也值得探究制作相关的癫痫动物模型来进行研究。有研究发现在一次严重的空气污染事件中,癫痫的急救呼叫明显增加[64];居民暴露于道路交通噪声和空气污染与高热惊厥的风险增加有关[65];睡眠紊乱和低氧状态也可以导致航空飞行中癫痫发作[66];基础实验也有发现噪声暴露下的豚鼠神经递质 GABA 及下丘的电生理发生改变[67],提示噪声暴露会导致中枢听觉相关通路的损伤;妊娠期小鼠暴露在空气细颗粒物下不仅影响胚胎神经发育,而且通过干扰神经发生/胶质形成事件、髓鞘形成和突触发生,干扰小鼠出生后大脑的生长和成熟[68]。这些都提示一些特殊环境下的癫痫模型制备有重要的研究意义。

综上所述,在揭示癫痫发生的基本机制、确定药物治疗特定癫痫类型和预防癫痫发展的疗效等方面,这些动物模型发挥了关键的作用。但我们很难设计一个能概括癫痫所有特征的动物模型,而且目前的模型都不完美,故应意识到各种模型的局限性。但需要强调的是,动物模型应该是复杂系统的简单表示,模拟疾病的特定方面,而决不是试图复

制具有人类疾病的所有复杂性。因此,无论何时使用动物模型,定义一个特定的问题并确保所选模型符合目的,根据目的制造和选择模型才是至关重要的。

参考文献:

[1] 朱飞, 郎森阳, 王群. 啮齿类癫痫动物模型研究进展[J]. 慢性病学杂志, 2015, 16(6): 661-668.

[2] 肖波, 王蓉, 谢光洁. 难治性癫痫动物模型研究进展[J]. 中华神经科杂志, 2000, 33(2): 115-117.

[3] Fisher RS. Animal models of the epilepsies[J]. Brain Res Brain Res Rev, 1989, 14(3): 245-278.

[4] Davoudi M, Shojaei A, Palizvan MR, et al. Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylenetetrazol kindled seizures in the rat[J]. Epilepsy Res, 2013, 106(1-2): 54-63.

[5] 胡琳, 张华丹, 陈亚天, 等. 不同药物诱导的小鼠癫痫模型的差异性研究[J]. 浙江大学学报(医学版), 2013, 42(6): 609-614.

[6] Snead OC 3rd, Depaulis A, Vergnes M, et al. Absence epilepsy: advances in experimental animal models[J]. Adv Neurol, 1999, 79: 253-278.

[7] 张川, 申长虹. 海人酸癫痫模型[J]. 天津医科大学学报, 2002, 8(3): 399-402.

[8] 马玉新, 阴金波, 范晓棠, 等. 红藻氨酸快速点燃大鼠癫痫模型的建立及其海马神经发生[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 872-875.

[9] Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2013, 37(10): 2887-2899.

[10] Zeidler Z, Brandt-Fontaine M, Leintz C, et al. Targeting the mouse ventral hippocampus in the intrahippocampal kainic acid model of temporal lobe epilepsy[J]. eNeuro, 2018, 5(4): ENEURO.0158-18. 2018.

[11] Curia G, Longo D, Biagini G, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy[J]. J Neurosci Methods, 2008, 172(2): 143-157.

[12] Cavalheiro EA, Santos NF, Priel MR. The pilocarpine model of epilepsy in mice[J]. Epilepsia, 1996, 37(10): 1015-1019.

[13] Buterbaugh GG, Michelson HB, Keyser DO. Status epilepticus facilitated by pilocarpine in amygdala-kindled rats[J]. Exp Neurol, 1986, 94(1): 91-102.

[14] Lockard JS, Uhlir V, DuCharme LL, et al. Efficacy of standard anticonvulsants in monkey model with spontaneous motor seizures[J]. Epilepsia, 1975, 16(2): 301-317.

[15] 杜鹏, 木依提, 栾新平, 等. 不同部位诱发癫痫动物模型对比研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30(6): 542-544.

[16] Noebels JL, Pedley TA. Anatomic localization of topically applied [14C] penicillin during experimental focal epilepsy in cat neocortex[J]. Brain Res, 1977, 125(2): 293-303.

[17] Pitkanen A, Schwartzkroin P, Moshe S. Models of seizures and epilepsy[M]. Amsterdam: Elsevier, 2006.

[18] Serbanescu I, Cortez MA, McKerlie C, et al. Refractory atypical absence seizures in rat: a two hit model[J]. Epilepsy Res, 2004, 62(1): 53-63.

[19] Snead OC 3rd, Yu RK, Huttenlocher PR. Gamma hydroxybutyrate. Correlation of serum and cerebrospinal fluid levels with electroencephalographic and behavioral effects[J]. Neurology, 1976, 26(1): 51-56.

[20] Adrian ED. The spread of activity in the cerebral cortex[J]. J Physiol, 1936, 88(2): 127-161.

[21] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 281-294.

[22] Lothman EW, Williamson JM. Rapid kindling with recurrent hippocampal seizures[J]. Epilepsy Res, 1993, 14(3): 209-220.

[23] 高青, 曾贵荣, 欧阳冬生. 6 Hz 角膜点燃癫痫动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(3): 393-398.

[24] Löscher W, Schmidt D. Strategies in antiepileptic drug development: is rational drug design superior to random screening and structural variation?[J]. Epilepsy Res, 1994, 17(2): 95-134.

[25] Hunter J, Jasper HH. Effects of thalamic stimulation in unanaesthetised animals: The arrest reaction and petit Mal-like seizures, activation patterns and generalized convulsions[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1949, 1(3): 305-324.

[26] Boillot M, Baulac S. Genetic models of focal epilepsies[J]. J Neurosci Methods, 2016, 260: 132-143.

[27] 周峰, 王小姗. 失神癫痫动物模型的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2008, 37(7): 13-15.

[28] Gilby KL. A new rat model for vulnerability to epilepsy and autism spectrum disorders[J]. Epilepsia, 2008, 49(8): 108-110.

[29] Justice JA, Sanchez RM. A rat model of perinatal seizures provoked by global hypoxia[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1717: 155-159.

[30] Toth Z, Yan XX, Haftoglou S, et al. Seizure-induced neuronal injury: Vulnerability to febrile seizures in an immature rat model[J]. J Neurosci, 1998, 18(11): 4285-4294.

[31] Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2014, 10: 1693-1705.

[32] Leander JD, Lawson RR, Ornstein PL, et al. N-methyl-D-aspartic acid-induced lethality in mice: selective antagonism by phencyclidine-like drugs[J]. Brain Res, 1988, 448(1): 115-120.

[33] Bortel A, Yao ZS, Shmuel A. A rat model of somatosensory-evoked reflex seizures induced by peripheral stimulation[J]. Epilepsy Res, 2019, 157: 106209.

[34] Walker AE. Convulsive factor in commercial penicillin[J]. Arch Surg, 1945, 50(2): 69-73.

[35] Taylor-Courval D, Gloor P. Behavioral alterations associated with generalized spike and wave discharges in the EEG of the cat[J]. Exp Neurol, 1984, 83(1): 167-186.

[36] Gunderson VM, Dubach M, Szot P, et al. Development of a model of status epilepticus in pigtailed macaque infant monkeys [J]. Dev Neurosci, 1999, 21(3-5): 352-364.

[37] Shandra AA, Mazarati AM, Godlevsky LS, et al. Chemical kindling: implications for antiepileptic drugs - sensitive and resistant epilepsy models [J]. Epilepsia, 1996, 37(3): 269-274.

[38] 袁治, 王维平, 丁永忠. 美解眠致大鼠点燃性癫痫有效剂量探讨 [J]. 兰州医学院学报, 2001, 27(3): 14-17.

[39] Dhir A. Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy [J]. Curr Protoc Neurosci, 2012, Chapter 9: Unit9. 37.

[40] Hellier JL, Dudek FE. Chemoconvulsant model of chronic spontaneous seizures [J]. Curr Protoc Neurosci, 2005, Chapter 9: 9-19.

[41] Chi Y, Wu B, Guan J, et al. Establishment of a rhesus monkey model of chronic temporal lobe epilepsy using repetitive unilateral intra-amygdala kainic acid injections [J]. Brain Res Bull, 2017, 134: 273-282.

[42] Perez-Mendes P, Blanco MM, Calcagnotto ME, et al. Modeling epileptogenesis and temporal lobe epilepsy in a non-human primate [J]. Epilepsy Res, 2011, 96(1-2): 45-57.

[43] Nilsen KE, Walker MC, Cock HR. Characterization of the tetanus toxin model of refractory focal neocortical epilepsy in the rat [J]. Epilepsia, 2005, 46(2): 179-187.

[44] Bearden LJ, Snead OC, Healey CT, et al. Antagonism of gamma-hydroxybutyric acid-induced frequency shifts in the cortical EEG of rats by dipropylacetate [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1980, 49(1-2): 181-183.

[45] Czuczwar SJ, Frey HH, Löscher W. Antagonism of N-methyl-D, L-aspartic acid-induced convulsions by antiepileptic drugs and other agents [J]. Eur J Pharmacol, 1985, 108(3): 273-280.

[46] Cortez MA, McKerlie C, Snead OC 3rd. A model of atypical absence seizures: EEG, pharmacology, and developmental characterization [J]. Neurology, 2001, 56(3): 341-349.

[47] Fariello RG, Golden GT. The THIP-induced model of bilateral synchronous spike and wave in rodents [J]. Neuropharmacology, 1987, 26(2-3): 161-165.

[48] Hong Z, Yang T, Tang M, et al. A novel kindling model of temporal lobe epilepsy in rhesus monkeys induced by Coriaria lactone [J]. Epilepsy Behav, 2013, 29(3): 457-465.

[49] Chang JH, Yang X, Zempel JM, et al. The unilateral cobalt wire model of neocortical epilepsy: a method of producing subacute focal seizures in rodents [J]. Epilepsy Res, 2004, 61(1-3): 153-160.

[50] Cooper RM, Legare CE, Campbell Teskey G. Changes in (14) C-labeled 2-deoxyglucose brain uptake from nickel-induced epileptic activity [J]. Brain Res, 2001, 923(1-2): 71-81.

[51] Lockard JS, Congdon WC, Ducharme LL, et al. Prophylaxis with diphenylhydantoin and phenobarbital and alumina-gel monkey model. I. Twelve months of treatment: seizure, EEG, blood, and behavioral data [J]. Epilepsia, 1976, 17(1): 37-47.

[52] Leclercq K, Matagne A, Kaminski RM. Low potency and limited efficacy of antiepileptic drugs in the mouse 6 Hz corneal kindling model [J]. Epilepsy Res, 2014, 108(4): 675-683.

[53] Song J, Hu J, Tanouye M. Seizure suppression by top1 mutations in drosophila [J]. J Neurosci, 2007, 27(11): 2927-2937.

[54] Wada JA, Tsuchimochi H. Cingulate kindling in senegalese baboons, papio papio [J]. Epilepsia, 1995, 36(11): 1142-1151.

[55] Loiseau H, Averet N, Arrigoni E, et al. The early phase of cryogenic lesions: an experimental model of seizures updated [J]. Epilepsia, 1987, 28(3): 251-258.

[56] Rakhade SN, Klein PM, Huynh T, et al. Development of later life spontaneous seizures in a rodent model of hypoxia-induced neonatal seizures [J]. Epilepsia, 2011, 52(4): 753-765.

[57] Kadam SD, White AM, Staley KJ, et al. Continuous electroencephalographic monitoring with radio-telemetry in a rat model of perinatal hypoxia-ischemia reveals progressive post-stroke epilepsy [J]. J Neurosci, 2010, 30(1): 404-415.

[58] Koyama R, Tao K, Sasaki T, et al. GABAergic excitation after febrile seizures induces ectopic granule cells and adult epilepsy [J]. Nat Med, 2012, 18(8): 1271-1278.

[59] Pandey R, Gupta S, Tandon S, et al. Baccoside A suppresses epileptic-like seizure/convulsion in Caenorhabditis elegans [J]. Seizure, 2010, 19(7): 439-442.

[60] Stringer JL, Marks LM, White AC, et al. Epileptogenic activity of granulomas associated with murine cysticercosis [J]. Exp Neurol, 2003, 183(2): 532-536.

[61] Schlitt M, Lakeman AD, Wilson ER, et al. A rabbit model of focal herpes simplex encephalitis [J]. J Infect Dis, 1986, 153(4): 732-735.

[62] Ka K, Jh H. Animal models of post-traumatic epilepsy [J]. Diagnostics (Basel), 2019, 10(1): 4.

[63] Leo A, De Caro C, Nesci V, et al. Modeling poststroke epilepsy and preclinical development of drugs for poststroke epilepsy [J]. Epilepsy Behav, 2020, 104: 106472.

[64] Cui L, Conway GA, Jin L, et al. Increase in medical emergency calls and calls for central nervous system symptoms during a severe air pollution event, January 2013, Jinan city, China. [J]. Epidemiology, 2017, 28(1): S67-S73.

[65] Hjortebjerg D, Nybo Andersen AM, Ketzel M, et al. Exposure to traffic noise and air pollution and risk for febrile seizure: a cohort study [J]. Scand J Work Environ Health, 2018, 44(5): 539-546.

[66] Alonso-Canovas A, de Felipe-Mimbrera A, Gonzalez-Valcarcel J, et al. Neurology at the airport [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011, 82(9): 981-985.

[67] 王丰. 噪声暴露后豚鼠下丘可塑性和 r-氨基丁酸(GABA)的改变 [D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2010.

[68] Allen JL, Oberdorster G, Morris-Schaffer K, et al. Developmental neurotoxicity of inhaled ambient ultrafine particle air pollution: Parallels with neuropathological and behavioral features of autism and other neurodevelopmental disorders [J]. Neurotoxicology, 2017, 59: 140-154.

〔收稿日期〕2020-07-13