

高温生理盐水局部灌注兔大脑皮层抑制青霉素诱导癫痫的研究

张云强¹⁾, 李 玉¹⁾, 王进昆¹⁾, 杨智勇¹⁾, 及时雨¹⁾, 孙志宏²⁾

(1) 昆明医学院第一附属医院神经外科, 云南昆明 650031; 2) 湖南师范大学附属湘东医院神经外科, 湖南株洲 412200)

[摘要] **目的** 探讨高温生理盐水局部灌注兔大脑皮层能抑制青霉素诱导癫痫发作. **方法** 72只兔3组(n=24): 假手术(S)组, 高温(65℃)灌注(HP)组, 常温(23℃)灌注组(OP). 于2d、3d、7d和30d观察各组灌注后毁损部位组织形态病理改变和超微结构改变, 评价运动功能障碍. 另将72只兔分3组(n=24): 假手术(S)组: 高温(65℃)灌注(HP)组, 未灌注(NHP)组, 于0h、2h、6h、24h观察各组EEG的变化和测定海马组织的GABA, Glu含量, 评价高温生理盐水局部灌注抑制癫痫发作的有效性. **结果** (1) 行为学和EEG观察: 高温生理盐水局部灌注使癫痫发作平均在2min内停止, 且EEG显示尖波, 棘波消失; (2) 病理改变: HP组皮层灌注区浅层可见有变性, 轻度局部脑水肿, 软膜下少量出血, 但深部未见异常. 电镜观察: 浅层可见神经细胞肿胀或固缩, 甚至出现胞浆胞核的溶解, 树突、线粒体肿胀, 轴突髓鞘苍白、偶有脱髓鞘现象. 深层结构未见明显异常. OP组和S组未见明显异常; (3) S组海马组织GABA和Glu含量在各时间段基本无变化. HP组GABA在各时间段逐渐增加, 而Glu含量逐渐减少, 以2h改变最为明显, 与S组、NHP组比较均 $P<0.05$, 有统计学意义. NHP组0h的GABA含量明显较S组低, 而Glu含量却明显高于S组, NHP组在2h内GABA和Glu含量变化不明显, 6h和24hGABA有所上升, Glu略有下降. **结论** 高温生理盐水局部灌注可以抑制青霉素诱导的癫痫发作.

[关键词] 高温生理盐水; 局部灌注; 兔; 大脑皮层; 癫痫

[中图分类号] R651 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0089-06

The Research of the Effect of High Temperature Normal Saline Regionally Perfusing the Epileptic Cortex of Rabbit Induced by Penicillin

ZHANG Yunqiang¹⁾, LI Yu¹⁾, Wang jinkun¹⁾, JI Shiyu¹⁾, SUN Zhihong²⁾, YANG qiurong²⁾

(1) Dept. of Neurosurgery, The 1st Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650031; 2) Department of Neurosurgery, Affiliated Xiangdong Hospital Hunan Normal University, Zhuzhou 412200, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the seizure of rabbit induced by penicillin can be inhibited by high temperature normal saline perfusing. **Methods** Part I of experiment: the rabbits were randomly divided into 3 groups: sham operation group(S), high temperature normal saline perfuse groups(HP); ordinary temperature normal saline perfuse groups(OP). We reviewed the change of pathobiology and ultramicrostructure in the damaging tissue and observed the influence of motor region in 2 hours, 3 days, 7 days 30

[作者简介] 张云强 (1975~), 瑶族, 湖南新田县人, 主治医师, 在读硕士, 主要从事癫痫外科临床工作.

[通讯作者] 李玉. E-mail: liyu@163.com

days. Part II of experiment: the rabbits were randomly divided into 3 groups: sham operation group(S), high temperature normal saline perfuse groups(HP), none high normal saline perfuse groups(NHP). We determined γ -aminobutyric acid(GABA), glutamate(Glu) in hippocampus at 0 h, 2 h, 6 h, 24 h by means of high performance liquid chromatography and observe the changes of EEG. **Results** Seizure can be inhibited by 65 °C normal saline regionally perfusing rabbit cortex in 2 minutes.the damage of the perfusing tissue is only in superficial layer. The function of the deep layer was not effected. The level of GABA was heighened postoperation at 0 h, 2 h, 6 h, 24 h, the level of Glu was degraded. The lever in 2 h was significantly changed in hippocampus.there was significantly difference between HP groups and NHP groups($P < 0.05$); HP groups and S groups($P < 0.05$). **Conclusion** The seizure induced by penicillin can be inhibited by 65 °C normal saline regionally perfusing cortex.

[**Key words**] High temperature normal saline; Regionally perfuse; Rabbit; Cortex; Seizure

随着现代医学的发展, 用神经导航系统和神经电生理技术定位在清醒状态下准确切除癫痫病灶是癫痫外科新策略, 然而术中癫痫的发作是阻碍这一技术推广的关键^[1,2]. 因此, 寻找预防和治疗术中癫痫发作的方法已成为研究热点. 目前国内外对术中癫痫发作的处理主要是用丙泊酚, 咪唑安定, 雷米芬太尼等短效镇痛麻醉药, 但不容易掌握术中唤醒的时间, 且本身这些麻醉药有致癫痫^[3]和抑制呼吸等副作用. 已有报道, 皮层热灼术可以治疗功能区癫痫^[4,5]. 本研究旨在探讨高温生理盐水局部灌注兔大脑皮层对青霉素诱导癫痫发作的抑制作用.

1 材料和方法

1.1 药物与试剂

青霉素 80 万 u/支(哈尔滨制药厂), 利多卡因 5 mL/支(扬子江药业), 异丙酚 20 mL/支(广药集团), γ -氨基丁酸(GABA)标准品(Sigma公司), 谷氨酸(Glu)标准品(Sigma公司).

1.2 主要仪器

Voyageur 型数字脑电图仪(美国, NICOLET 公司), HP1100 型高效液相色谱仪(美国, 安捷伦公司); 色谱柱: 预柱 ZORBAX SB C₈ (2.1 min × 12.5 mm, 3.5 μm), Symmetry C₁₈ (2.1 min × 50 mm, 3.5 μm) (Waters 公司), 质谱仪: (美国 ABI Q TRAP), 电子显微镜(日本, TEM-100CX), 生物光学显微镜(德国, Leica), 皮质电极(美国, Grass 公司), 电动磨钻(天津医疗器械厂)

1.3 实验动物

健康大白兔 144 只, 体重 (2.50 ± 0.50)kg, 雌

雄不拘, 由昆明医学院实验动物中心提供. 术前禁食 12 h, 不禁水.

1.3.1 实验动物癫痫模型的复制

用异丙酚 (1 mg/kg) 经耳缘静脉诱导麻醉后, 再将兔固定, 剃光顶部毛发, 用利多卡因 (5 mg/kg) 局麻, 取左顶骨矢状缝与冠状缝各旁开 10 mm, 开一个约 20 mm × 20 mm 的骨窗, 暴露出顶叶皮质, 皮质上依脑定位仪固定四根皮质电极于皮质下约 0.05 mm 注射青霉素 (1.6 ~ 4.8) 万 U/kg, 在脑电图监测仪监测下观察至出现癫痫波, 兔出现症状而制成癫痫模型, 描记兔皮质脑电图.

1.3.2 实验动物分组

运动功能障碍评价实验: 72 只, 随机分 3 组: ①假手术 (S) 组: 仅行开颅手术, 不复制癫痫模型, 也不灌注生理盐水; ②高温灌注(HP)组, 开颅手术、复制癫痫模型, 用高温 65 °C 生理盐水局部灌注皮层; ③常温灌注 (OP) 组: 开颅手术、复制癫痫模型, 用常温 23 °C 生理盐水局部灌注皮层, 每组 24 只.

海马组织的 GABA, Glu 含量测定实验: 72 只, 随机分 3 组: ①假手术 (S) 组: 仅行开颅手术, 不复制癫痫模型, 也不灌注生理盐水; ②未灌注 (NHP) 组, 开颅手术、复制癫痫模型, 但不灌注生理盐水; ③高温灌注 (HP) 组: 开颅手术、复制癫痫模型, 用高温 65 °C 生理盐水局部灌注皮层, 每组 24 只.

1.4 标本收集

运动功能障碍评价实验, 于灌注后 2 h、3 d、7 d 和 30 d 处死, 迅速取出灌注区大脑皮层, 分成两部分: 一部分用 10 % 福尔马林固定, 用于光镜观察; 另一部分快速在冰块上切成 1 mm³ 的小块, 然后用 2.5 % 戊二醛固定. 用于电镜观察.

海马区的 GABA, Glu 含量测定实验, 于灌注后 0 h、2 h、6 h 和 24 h 处死, 迅速取出右侧海马, 并立即将海马放在 -30°C 的冰箱冷冻. 3 d 内测定 GABA 和 Glu 含量.

1.5 观察项目

运动功能障碍评价实验: ①用数码相机记录兔 24 h 行为变化, 评价运动功能; ②肉眼、光镜和电镜观察毁损部位组织病理形态学的变化.

海马组织的 GABA, Glu 含量测定实验: ①脑电图监测仪监测下观察 EEG 的变化; ②高谱液相色谱分析仪测定海马区的 GABA, Glu 含量.

1.6 统计学方法

运动功能障碍评价实验采用描述性方法比较各组的病理, 超微结构改变; 海马组织 GABA, Glu 含量测定实验, 采用描述性方法描述各组脑电图变化和用 SPSS11.5 方差分析比较各组 GABA, Glu 含量的差异.

2 结果

2.1 运动功能障碍行为学观察

S 组无抽搐, 神志清楚, 活动良好. NHP 组动物抽搐时间较长, 平均为 210 min, 动物活动较少, 未进食. HP 组动物清醒, 均能活动, 无偏瘫发生, 行走较平稳, 大部分动物能进食.

2.2 组织病理形态学改变

大体标本观察发现, HP 组 2 h 可见局部皮层表面变白, 部分有坏死, 并有脑表面小血管扩张和轻度脑肿胀, 少量软膜下出血, 深层结构未见异常. 3 d 可见局部皮层表面浅层苍白坏死, 脑肿胀基本消退. 7 d 可见脑表面浅层坏死与深层分离. 脑膜增生. 30 d 脑表面见脑膜增生和血管增生. S 组和 OP 组各时间段未见肉眼大体改变.

光镜观察病理组织形态学发现, HP 组 2 h 切片可见局部皮层其表层为嗜酸性变的坏死区, 软脑膜部分断裂, 其下可见出血, 部分神经细胞肿胀或变性坏死, 见图 1; 深层为水肿区, 神经细胞无变性坏死; 坏死区与水肿区分界清楚; 3 d 时切片可见深层水肿区部分消失; 浅层部分神经细胞脱失. 7 d 时观察水肿区完全消失, 软膜下出血已吸收. 30 d 时切片观察可见胶质和血管, 脑膜增生. S 组和 OP 组各时间段未见病理改变.

2.3 电镜病理超微结构变化

HP 组 2 h 局部浅层神经元的坏死明显, 突出表现在核染色质溶解, 神经元数量少, 水肿变性或蜕变, 浓缩胞体变小, 核浓缩. 胞质内脂褐素增加, 粗面内质网脱颗粒, 见图 2; 少数神经元呈 / 暗细胞变. 有髓神经及无髓神经病变不显著; 血脑屏障血管高度扩张, 但星形胶质足突水肿极轻微, 深层未见上述改变. 3 d 时观察神经细胞肿胀仍稍有肿胀, 部分神经细胞固缩. 胞体缩小, 染色质比正常深, 部分血管内皮细胞固缩. 偶见轴突呈脱髓鞘改变. 7 d 时观察, 浅层神经细胞水肿完全消失. 部分神经细胞固缩. 可见巨噬细胞. 30 d 时观察部分神经细胞脱失, 神经纤维未见变性. S 组和 OP 组各时间段未见病理改变.

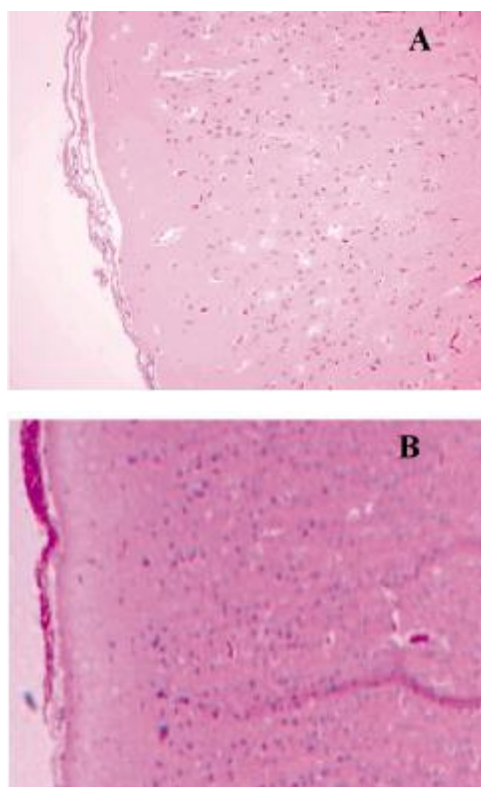


图 1 兔脑组织病理形态学变化 (HE $\times 40$)

Fig.1 The change of pathobiology of the rabbit brain (HE $\times 40$)

A: S 组; B: HP 组.

2.4 脑电图变化

2.5 海马组织 GABA 和 Glu 含量变化

S 组海马区 GABA 和 Glu 含量在各时间段基

S 组脑电活动无癫痫样放电, 而 HP 组灌注前和 NHP 组脑电图表现为典型的尖波, 棘波发放, 同时观察到癫痫波出现在癫痫发作症状之前 1~3 min, 尤其在注射青霉素该处的皮质电极先出现癫痫波, 随后各电极均出现癫痫波. NHP 组则在平均 210 min 后癫痫发作自行停止, HP 组灌注后可见尖波, 棘波消失, 见图 3.

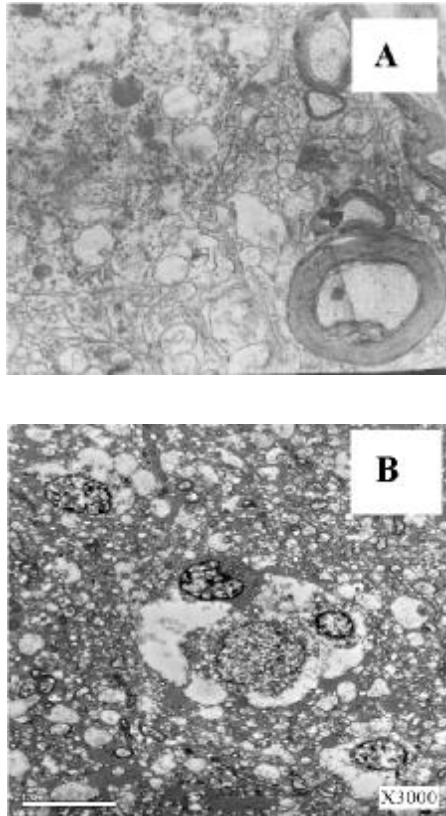


图 2 兔脑组织电镜病理超微结构

Fig.2 The change of ultrastructure of the rabbit brain

A: S 组; B: HP 组.

本无变化. HP 组 GABA 在各时间段逐渐增加, 而 Glu 含量逐渐减少, 以 2 h 改变最为明显, 与 S 组、NHP 组比较均 $P < 0.05$, 有统计学意义. NHP 组 0 h 的 GABA 含量明显较 S 组低, 而 Glu 含量却明显高于 S 组, NHP 组在 2 h 内 GABA 和 Glu 含量变化不明显, 6 h 和 24 h GABA 有所上升, Glu 略有下降, 见表 1、表 2.

3 讨论

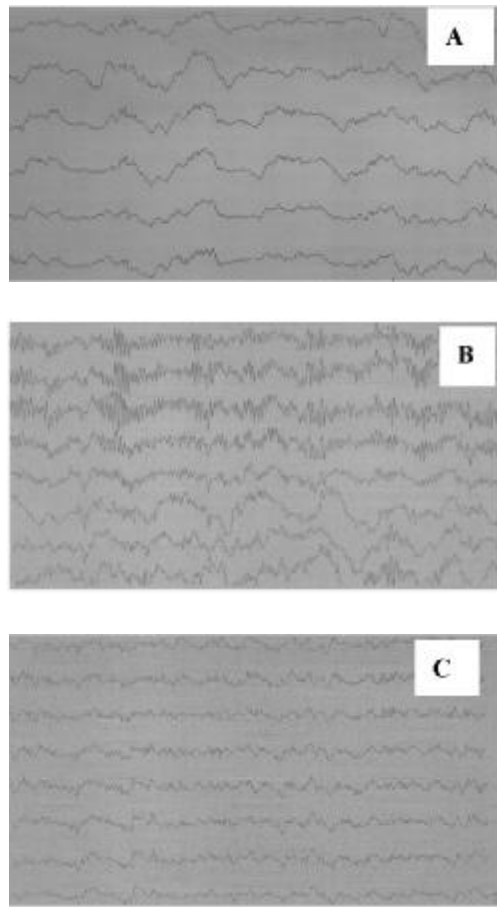


图 3 脑电图变化

Fig.3 EEG of cortex in rabbits

A: S 组; B: HP 组灌注前; C: HP 组灌注后.

功能区癫痫一直是癫痫外科的难点, 因此, 寻找预防和治疗术中癫痫发作的方法已成为研究热点. 研究表明, 局部射频热凝和皮层热凝可以阻断痫灶的同步化放电, 从而达到治疗癫痫的目的. 栾国明^[4]等人已经研究皮层热凝术可以治疗癫痫. Dunlop PRC 等^[6]研究局部高温对脑的影响时发现: 狗正常脑组织受热高限为 42 °C 45 min 或 43 °C 15 min, 在 43 °C 60 min 观察到血脑屏障的破坏. 蒋大介^[7]认为射频热凝对脑皮层损伤温度 60~80 °C 不会引起焦痂而致粘连出血. 然而, 高温生理盐水局部灌注治疗癫痫还未见报道. 我们用 65 °C 生理盐水局部灌注皮层抑制癫痫, 平均在 2 min 内停止. 且癫痫停止后, 随即灌注停止. 同时灌注后病理发现仅仅局限于局部浅层, 对深层结构没有损伤. 行为学观察, 未发现有肢体偏瘫

表 1 各组不同时间段海马组织 GABA 含量变化 $[(\bar{x} \pm s), \mu\text{mol/g}]$ Tab.1 The change of the contents of GABA in hippocampus at different time $[(\bar{x} \pm s), \mu\text{mol/g}]$

组 别	n	0 h	2 h	6 h	24 h
S 组	24	19.11 ± 6.24	17.58 ± 7.23	20.23 ± 5.98	19.33 ± 6.44
NHP 组	24	15.02 ± 5.90*	16.27 ± 6.11*	19.37 ± 5.90*	18.22 ± 6.10
HP 组	24	14.21 ± 4.99**	22.49 ± 5.23**	23.41 ± 4.67**	23.89 ± 4.56

与 S 组比较, * $P < 0.05$; 与 NHP 组比较, ** $P < 0.05$.

表 2 各组不同时间段海马组织 Glu 含量变化 $[(\bar{x} \pm s), \mu\text{mol/g}]$ Tab.2 The change of the contents of Glu in hippocampus at different time $[(\bar{x} \pm s), \mu\text{mol/g}]$

组 别	n	0 h	2 h	6 h	24 h
S 组	24	60.21 ± 13.43	59.32 ± 14.29	61.78 ± 13.44	60.65 ± 12.97
NHP 组	24	94.59 ± 12.49*	8.35 ± 11.67*	88.22 ± 13.28*	73.44 ± 12.87
HP 组	24	95.32 ± 13.45**	72.33 ± 12.24**	70.27 ± 11.39**	66.26 ± 13.25

与 S 组比较, * $P < 0.05$; 与 NHP 组比较, ** $P < 0.05$.

和昏迷的现象. 因此, 可以认为 65 °C 生理盐水局部灌注皮层是安全有效的.

青霉素是一种经典的致痫剂, 用于失神性癫痫和局限性癫痫模型的复制及发病机制的研究^[8]. 青霉素是中枢神经系统内抑制性递质 γ -氨基丁酸(GABA)的拮抗剂, 能抑制 GABA 能神经元, 引起抑制性突触活动减弱或兴奋性突触活动增强, 从而导致神经元兴奋性增高. 当神经元兴奋性突触后电位 (EPSP) 综合超过一定阈值即可产生阵发性去极化移位 (PDS). 脑电图记录到的棘波就是 PDS 有关动作电位的反映^[9,10]. 本实验采用青霉素皮质注射成功复制了兔癫痫模型, 观察到兔癫痫发作以左侧前肢先出现抽搐, 此与实验选取右顶叶出现癫痫症状一致, 此后再出现口, 面部肌肉阵挛, 四肢抽搐, 最终全身大发作的现象, 与人类失神发作基本接近.

垂直柱状结构是皮质的主要信息传导结构, 是大脑皮层的基本单位. 即依次 I 为分子层、II 外颗粒层, III 外锥体细胞层, IV 内颗粒层, V 为内锥体细胞层、VI 多形细胞层, I ~ II 层含少量的星形细胞. 主要是横行的神经纤维, 这种柱状结构直径约 500 μm , 是由 103 ~ 104 个互相联系的神经细胞垂直串联组成, 它与软脑膜表面垂直并贯穿于整个皮层, 每个垂直柱内有传入、传出

和联络神经纤维及各种神经细胞, 构成垂直的柱内环路, 并可通过星形细胞的轴突与邻近的细胞柱相联系^[11]. 皮质各功能区的功能主要由皮层内垂直于皮质表面的垂直纤维来完成. 除了神经细胞的垂直联系, 皮层内还有大量的水平纤维联系, 是由皮层内细胞树突间端端、侧侧联系组成, 它们也接受和传导皮层内锥体细胞、梭形细胞等神经细胞的冲动. 癫痫放电的产生和传播主要依赖于水平纤维间的联系, 由致痫灶向临近皮质放电. 引起周围皮质的广泛同步化放电, 进而产生临床发作. 多处软脑膜下横切术, 主要是通过横切刀切断水平纤维, 使癫痫的同步化放电的途径中断, 从而控制癫痫的发作, 同时又保留了大部分垂直柱状结构的功能, 在临床已得到了广泛应用^[12,13]. 根据上述原理, 用高温生理盐水局部灌注以及微量注射癫痫灶周围的脑组织使其受到热效应作用, 使脑表面浅皮层 (I ~ II 层) 的横行纤维变性, 而不损伤深层的垂直功能柱, 分割大脑皮层, 阻断痫灶的同步化放电, 从而可达到对癫痫的治疗^[14]. 我们用高温生理盐水局部灌注在 2 min 内能使癫痫发作停止, 同时比较 HP 组灌注前与灌注后 EEG 的变化, 灌注后尖波, 棘波消失. 说明应用高温生理盐水局部灌注能够有效地控制癫痫. 实验病理切片提示, 上述高温

参数造成的病变深达 0.8 mm, 达到兔皮层的 2/3, 已能有效地破坏兔皮层 I~III 层的水平纤维, 从而阻断了癫痫的同步化放电, 达到了治疗的目的。

癫痫发作是由兴奋性神经递质和抑制性神经递质失衡导致。Glu 是一种中枢兴奋性神经递质, 其含量升高可增强神经中枢的兴奋性^[15,16,17]GABA 是中枢抑制性神经递质, 故其含量升高可增加对神经中枢的保护作用^[15,18]。海马区神经递质的变化可直接反映大脑神经细胞分泌各种神经递质^[15]。我们实验中发现 S 组海马区 GABA 和 Glu 含量在各时间段基本无变化。HP 组 GABA 在各时间段逐渐增加, 而 Glu 含量逐渐减少, 以 2 h 改变最为明显, 与 S 组、NHP 组比较均 $P < 0.05$, 有统计学意义。NHP 组 0 h 的 GABA 含量明显较 S 组低, 而 Glu 含量却明显高于 S 组, NHP 组在 2 h 内 GABA 和 Glu 含量变化不明显, 6 h 和 24 h GABA 有所上升, Glu 略有下降。结果提示, 65 °C 生理盐水局部灌注皮层能够抑制癫痫发作, 其作用可能与抑制 Glu 释放有关。

综上所述, 本研究证实 65 °C 生理盐水局部灌注皮层能够抑制癫痫发作, 且该温度短时间内不会对兔大脑功能造成影响。为抑制清醒手术中癫痫发作提供了一种最简单的方法。具有重要的应用前景和临床实用价值。但兔脑与人脑有很大的差异, 用高温生理盐水灌注人脑皮层抑制术中癫痫发作还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] DUFFAUH, CAPELLEL, SICHEZJ, et al. Intra-operative direct electrical stimulations of the central nervous system: the Salpetriere experience with 60 patients [J]. *Acta Neurochir*, 1999, 141: 1157~1167
- [2] GUMPRECHT H, EBEL G K, AUER D P, et al. Neuronavigation and functional MRI for surgery in patients with lesion in eloquent brain areas [J]. *Minim Invasive Neurosurg*, 2002, 45: 151-153
- [3] KALDMANC J. Effect of propofol etomidate, midazolam and fentanyl on motor evoked responses to transcranial electrical at magnetic stimulation in humans [J]. *Anesthesiology*, 1992, 76: 502-505
- [4] 栾国明, 张伟丽. 脑皮层热灼治疗功能区顽固性癫痫的可行性研究 [J]. *中华神经外科杂志*, 1999, 12 (3): 1-4
- [5] BENIFLAM. Multiple subpial transections in pediatric epilepsy: indications and outcomes [J]. *Childs Nerv Syst*. 2006, 22 (8): 992-998
- [6] DUNLOP PRC et al. An assessment of Local hyperthermia in clinical practice [J]. *Hyperthermia*, 1986, 2 (1) 39-43
- [7] 蒋大介. 实用神经外科手术学 [M]. 上海: 科技出版社, 1990: 224
- [8] 谭启富, 李龄, 吴承远. 癫痫外科学 [M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 588-590
- [9] 宋立群, 肖洪彬, 宋淑娟, 等. 安痢宁冲剂对青霉素诱导的大鼠癫痫模型影响的实验研究 [J]. *中国中医药科技*, 2002, 9 (3): 151-153
- [10] DEVAX B, LAMARCHE M FALLET B C, et al. Multiple conical photolesion and penicillin epileptogenic focus, study of a model in rabbit [J]. *Neurosci surgical*, 1999, 4: 80-84
- [11] ASANUMA H, SAKATA H. Functional organization of a cortical system examined with focal depth stimulation in cats [J]. *Neurophysiol*, 1967, 30: 35-54
- [12] SHIMIZU H, KAWAI K. Hippocampal transection for treatment of left temporal lobe epilepsy with preservation of verbal memory [J]. *Clin Neurosci*, 2006, 13 (3): 322-328
- [13] ZHAO Q. Evaluation of the combination of multiple subpial transection and other techniques for treatment of intractable epilepsy [J]. *Chin* 2003, 116 (7): 1004-1007
- [14] YANGZ, LUANG. Treatment of symptomatic epilepsy with lesion ectomies combined with bipolar coagulation of the surrounding cortex [J]. *Chin*, 2003, 116 (12): 1930-1932
- [15] MELDRUM B S. Neurotransmission in epilepsy [J]. *Epilepsia*, 1995, 36: 530-534
- [16] JANJUAN A, KABATO H, MORI A. Increased plasma glutamate in a genetic model of epilepsy [J]. *Neurochem Res*, 1992, 17: 293-296
- [17] LELDRUMB S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders [J]. *Neurology*, 1994, 44: 514-517
- [18] SATZINGCR G. Antiepilepsy from gamma-aminobutyric acid [J]. *Arznei-Forsch Drag Res*, 1994, 44: 261-265

(2007-09-15 收稿)