

高青,曾贵荣,欧阳冬生,等. 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.

Gao Q,Zeng GR,Ouyang DS, et al. Research progress of the 6 Hz corneal kindling seizure animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(3):393 – 398.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.03.019

6 Hz 角膜点燃癫痫动物模型的研究进展

高青^{1,2},曾贵荣^{4,5},欧阳冬生^{1,2,3*}

(1. 中南大学湘雅医院临床药理研究所,长沙 410008; 2. 中南大学临床药理研究所,遗传药理学湖南省重点实验室,长沙 410078; 3. 复杂基质样本生物分析湖南省重点实验室,长沙 410000; 4. 北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193; 5. 湖南省药物安全评价研究中心/新药药效与安全评价湖南省重点实验室,长沙 410331)

【摘要】 耐药性癫痫是临床上癫痫防治的重大难题。癫痫动物模型是研究癫痫发病机制及筛选抗癫痫药物和探究药物作用机制的有力工具,6 Hz 角膜点燃癫痫模型是一种优良的耐药性癫痫动物模型,被美国 NIH 推荐用于评价新药对抗耐药性癫痫的筛选工具。然而,迄今国内外未见 6 Hz 点燃癫痫动物模型的系统报道,现从该模型的发展历史、制作方法、症状表现、致病机制和应用现状等方面进行综述,以期提供一种探究耐药性癫痫发病机制和筛选耐药性癫痫治疗药物的有力工具和标准模型。

【关键词】 癫痫;6 Hz;点燃;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 03-0393-06

Research progress of the 6 Hz corneal kindling seizure animal models

GAO Qing^{1,2}, ZENG Guirong^{4,5}, OUYANG Dongsheng^{1,2,3*}

(1. Department of Clinical Pharmacology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China. 2. Institute of Clinical Pharmacology, Central South University; Hunan Key Laboratory of Pharmacogenetics, Changsha 410078. 3. Hunan Key Laboratory for Bioanalysis of Complex Matrix Samples, Changsha 410000. 4. Institute of Medicinal Plant Beijing Union Medical College, Beijing 100193. 5. Hunan Provincial Center for Drug Safety Evaluation and Research/Hunan Key Lab of New Drug Efficacy and Safety Evaluation, Changsha 410331)
Corresponding author: OUYANG Dongsheng. E-mail: ouyangyj@163.com

【Abstract】 Drug resistance is a major problem in the prevention and treatment of epilepsy. Animal models of epilepsy are powerful tools to study the mechanism of epilepsy, screening antiepileptic drugs, and explore the mechanisms of drug actions. The 6 Hz corneal kindling seizure model is an excellent animal model of drug-resistant epilepsy, which is recommended by the NIH as a screening tool to evaluate new drugs against drug-resistant epilepsy. However, there is currently no systematic report of this model. Here, we review the development history, production method, symptoms, pathogenesis, and application status of the model to provide a reference to explore the pathogenesis of drug-resistant epilepsy and screening drugs for the treatment of drug-resistant epilepsy.

【Keywords】 epilepsy; 6 Hz; corneal kindling; animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家科技重大专项基于药物基因组学的示范性新药临床评价技术平台建设(2017ZX09304014)。
Funded by National Development of Key Novel Drugs for Special Projects of China (2017ZX09304014)。
【作者简介】 高青(1993—),女,在读硕士,主要从事癫痫机制研究。Email:GQ972453960@163.com
【通信作者】 欧阳冬生(1967—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事遗传药理学与药物基因组学,临床药理学研究。
Email: ouyangyj@163.com

癫痫(epilepsy, EP)是全球最常见的神经系统疾病之一,由多种病因引起,以脑神经元过度放电导致反复性、发作性和短暂性的中枢神经系统功能失常为特征^[1]。耐药性癫痫是临床上癫痫防治的重大难题,虽然近些年来已有不少抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs)面世,但仍有 20%~30% 的患者对 AEDs 治疗反应差,癫痫发作难以控制,且通常伴随多种严重并发症的发生^[2]。癫痫动物模型是研究致病机制和筛选 AEDs 的重要手段,Openchowski 等^[3]于 1883 年首次采用冷冻大脑组织制作脑内致痫灶,成为癫痫模型制备的开端。随后研究者采用不同的方法构建了多种模型,如最大电休克(maximal electroshock, MES)模型和戊四唑(pentylenetetrazol, PTZ)模型是研究药物抗惊厥活性的标准模型。然而,这两种模型筛选出的药物仅能控制癫痫症状,对耐药性癫痫无效,无法满足临床治疗需求。6 Hz 角膜点燃癫痫(6 Hz corneal kindling seizure, 6 Hz)模型作为一种较好的多药耐药癫痫模型,在沉寂了半个世纪后焕发出新的生机,本文就 6 Hz 模型的研究进展作简要综述。

1 历史发展

点燃(kindling)模型与人类癫痫的形成与发生极为相似,能贴近模拟癫痫发作的临床症状,是研究致病机制和 AEDs 的理想模型。电点燃杏仁核、苍白球、梨状皮质、海马和角膜等部位均可诱发癫痫发作,其中杏仁核和海马点燃较为常见,杏仁核模型是良好的难治性癫痫模型^[4-5]。6 Hz 模型是利用电刺激动物角膜构建的一种点燃模型,最早于上世纪 50 年代被提出,基于该模型在显性表现和脑电图模式上与精神运动性癫痫的临床表现之间的相似性,Toman 等^[6]将其作为精神运动性癫痫发作模型。但由于利用该模型考察苯妥英(phenytoin, PHT)的疗效时与临床所见不一致,被认为对 PHT 不敏感,其后 6 Hz 模型在 AEDs 开发中的使用便十分罕见^[7]。直到 2001 年,Barton 等^[8]发现了 6 Hz 模型对左乙拉西坦(levetiracetam, LEV)具有敏感性,并将其作为顽固性癫痫模型,该模型才得到重新发展。时至今日,6 Hz 模型已越来越多地应用于 AEDs 的筛选,被认为是耐药性癫痫潜在治疗药物的筛选工具,美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)已将其纳入推荐的抗惊厥药物开发计划(Anticonvulsant Drug Development,

ADD)^[9]。

2 6 Hz 模型制作和特征

2.1 制作方法

Toman 等首次设计的 6 Hz 模型是采用角膜电极,施加频率 6 Hz,电流强度 50 μ A,脉冲宽度 1 ms 的刺激,持续时间 3 s^[10]。Barton 等^[8]于 2001 年重新研究该模型,使用 7 种已确定的 AEDs 和 5 种第二代 AEDs 对电流强度进行改进。该研究在 CF1 品系小鼠中建立,使用 Grass S48 刺激器刺激角膜,固定频率 6 Hz,脉冲宽度 0.2 ms,持续时间 3 s。在放置角膜电极之前,将 0.5% 的丁卡因和 0.9% 的盐水滴入小鼠的眼睛,刺激后立即手动限制和释放动物,观察是否存在癫痫发作活动。通过概率计算 97% 的实验对象产生癫痫发作的电流强度(CC97)为 22 mA,此时 6 Hz 刺激并不能区分所测试的 AEDs 的临床类型。增加电流强度为 $1.5 \times$ CC97 即 32 mA 时,可降低 6 Hz 模型对 PHT 和拉莫三嗪(lamotrigine, LTG)的敏感性。当电流强度为 $2 \times$ CC97 即 44 mA 时,只有 LEV 和丙戊酸(valproic acid, VPA)对刺激显示出完全的保护作用,但是这些药物的疗效与较低刺激强度时相比有所降低。Barton 等的研究开启了 6 Hz 模型的新纪元,此后,模型制作方法根据研究需求不断发展改善。

目前,6 Hz 模型制作方法大体相同,多采用 NMR1 小鼠,CF1 小鼠和 Swiss albino 小鼠作为研究对象。首先使用含麻醉剂的生理盐水浸泡角膜刺激电极,或刺激前在动物眼部滴加麻醉剂和生理盐水,以诱导局部麻醉,并确保良好的传导性。然后将电极完全接触眼部进行角膜刺激,大多以固定频率 6 Hz,脉冲宽度 0.2 ms,持续时间 3 s 刺激实验动物,使用 $1.5 \times$ CC97 和 $2 \times$ CC97 的电流强度诱发癫痫。电刺激时束缚小鼠,每次刺激结束后立即放开观察记录行为学情况。动物完全点燃需长期刺激,一般每天进行两次,每次刺激之间至少间隔 4 h,连续 3 周^[11-12]。因为 NMR1 和 CF1 小鼠在国内并不常见,陆海美等^[13]采用国内常用的 C57BL/6J 与 ICR 小鼠构建模型。该团队认为 44 mA 刺激下 C57BL/6J 小鼠造模成功率最高,且耐药性更强,更适合 6 Hz 模型的建立,这项研究为 6 Hz 模型在国内的应用提供了新思路。

2.2 模型特征

在点燃过程开始时,小鼠表现出一系列行为变

化,包括刻板行为,斯特劳布举尾反应,有时还有轻微的肌阵挛。此外,小鼠还表现出社交障碍,学习和记忆能力受到严重损害。一般根据 Racine 量表^[14]观察判断动物点燃情况,经过几天的刺激后,大约 50%~60%的小鼠开始出现第二次全身性惊厥(阶段 3-5),当显示至少连续 10 次继发性全身性惊厥时,判断小鼠被充分点燃。小鼠达到完全点燃状态后,通过每周两次每日刺激维持这种状态^[11]。除行为学外,小鼠脑电图和脑组织也发生变化,小鼠在 6 Hz 诱导的癫痫发作过程中,脑电图出现明显的癫痫样放电。利用免疫组化还发现 C57BL/6J-44 mA 组完全点燃的小鼠海马 GFAP 标记的胶质细胞激活明显增加,其为颞叶癫痫的特征病理标志之一^[13]。

值得注意的是,Leclercq 和 Kaminski^[15]研究认为小鼠遗传背景和实验条件对于不同 AEDs 在 6 Hz 模型中的敏感性有影响,模型制作方法和模型中 AEDs 的初始观察应当考虑小鼠品系和实验条件。

3 致病机制

3.1 脑内葡萄糖的摄取和利用

脑组织几乎完全依赖葡萄糖为能源,脑区¹⁴C-2-脱氧葡萄糖(¹⁴C-2-deoxyglucose, 2-DG)摄取的评估可作为脑葡萄糖利用和区域功能活动的指标。Gray 等^[16]通过放射自显影技术量化脑区 2-DG 摄入分布,评估 6 Hz 模型动物的脑内代谢活动。研究发现,6 Hz 刺激后大脑皮质区、外侧杏仁核和尾壳核中 2-DG 摄取显著增加,大脑皮层的不同功能区域,如运动、感觉和边缘区域被非选择性激活。然而,2-DG 摄取的增加并不均匀,这表明在细胞微电路水平上,对与癫痫发作相关的功能活动的改变有一定的选择性。其他许多大脑区域不受刺激的影响,包括海马结构、杏仁核、丘脑和下丘脑的内侧核,在激活和未激活的区域之间存在非常清晰的边界,表明特定的通路参与了癫痫的发生和传播。6 Hz 刺激后,实验动物不同脑区营养物质摄入和利用受到影响,从而影响中枢神经系统代谢活动,诱发癫痫发作。

3.2 MAPK 信号通路

6 Hz 刺激可能通过影响 MAPK 信号通路,参与癫痫发生发展。c-Fos 是参与细胞外刺激后细胞增殖和分化的早期反应基因,可作为神经活动的标记物,并且与急性刺激后的神经和行为反应有关^[17],

p38MAPK 通路可通过激活 c-Fos 诱导细胞凋亡。Barton 等^[8]通过 c-Fos 免疫定位发现 22 mA 和 32 mA 刺激时染色局限于杏仁核和梨状皮质,但海马、丘脑和下丘脑 Fos 蛋白水平没有升高。而 44 mA 刺激时,梨状皮质、杏仁核和齿状回立即出现 c-Fos 水平升高,梨状皮质反应最强。近期也有研究发现,6 Hz 刺激可增强视觉、海马旁和运动皮质及边缘系统的 c-Fos 免疫反应性,而完全点燃的小鼠眼眶皮质中的 Fos 蛋白减少^[18],该结果与 Barton 等的类似研究高度一致,阐明了 6 Hz 刺激后大脑的激活过程。Barton 的研究认为海马并未参与大脑的活动过程,Carmela 等^[19-20]改进模型,使用重复 4 次的 6 Hz 刺激对此进行了探索。该团队首先使用 FosB/ Δ FoSB 作为神经元激活标记物,刺激后海马和海马旁皮质 FosB/ Δ FoSB 免疫反应性增强,但没有神经元损伤或炎症发生。然后,该团队又使用 p-ERK1/2 作为标记物进一步验证,ERK1/2 信号通路是最早发现的经典 MAPK 信号转导途径。角膜刺激后整个海马特别是 CA1 区的 p-ERK1/2 免疫反应逐渐增加,绝大多数 p-ERK1/2 免疫阳性细胞与 FosB/ Δ FoSB 抗体共同标记,表明在癫痫激活的神经元亚群中两者之间存在关系,p-ERK1/2 的表达变化明确说明 6 Hz 模型中海马区域参与癫痫发作的加重过程。

3.3 神经递质

已知在癫痫发作中起作用的主要神经递质是谷氨酸 (glutamate, Glu)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach)、去甲肾上腺素 (noradrenaline, NA)、多巴胺 (dopamine, DA) 和 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)^[21-22]。Glu 和谷氨酰胺循环是大脑中 Glu 保持平衡的一个重要机制,谷氨酰胺合成酶缺失,细胞内及胞外 Glu 水平升高,痫性发作时 Glu 蓄积作用于受体和离子通道,使突触过度兴奋,从而诱发病理性发作^[23]。有研究将 8 种离子型 Glu 受体拮抗剂和 8 种代谢型 Glu 受体调节剂作用于 6 Hz 模型,刺激时 Glu 增高,诱发癫痫发作,所有被测试的化合物产生剂量依赖性的保护作用^[24]。此外,6 Hz 刺激可降低小鼠脑中内源性 5-HT、DA、NA 和 GABA 水平,增高 Glu 水平,这种神经递质的改变可由 VPA 恢复^[25]。Kausar 等^[26]使用 DSP-4 研究 NA 在 6 Hz 模型中的作用,DSP-4 可诱导小鼠脑内 NA 耗竭,增加小鼠精神运动性惊厥的易感性,说明脑内低 NA 含量可加重 6 Hz 小鼠的癫痫发作。上述研究说明,

6 Hz 刺激可能对实验动物脑组织产生影响,导致神经递质变化,诱发癫痫发作。

4 应用现状

4.1 AEDs 筛选

近年来,6 Hz 模型在 AEDs 的筛选中得到广泛

应用,被纳入 NIH 推荐的 ADD 计划。由于 6 Hz 模型对电压门控 Na⁺通道的经典调节剂反应性差,而 MES 模型有利于筛选 Na⁺通道调节剂,两者结合使用可用来筛选新的 AEDs^[9,27]。目前,已使用 6 Hz 模型筛选出一批具有潜在抗癫痫作用的化合物,如表 1 所示。

表 1 6 Hz 模型筛选的潜在抗癫痫药物

Table 1 Potential antiepileptic drugs screened by 6 Hz corneal kindling seizure model				
化合物 Compounds	电流强度 Current (mA)	与 AEDs 合用 Combined with AEDs	结构特征 Structural characteristics	作用特征 Function characteristics
NAX810-2 ^[28]	32		甘丙肽受体 2 类似物 GalR2 analog	与 GalR2 亲和力比 GalR1 高 15 倍 The affinity with GalR2 is 15-fold greater over GalR1
大麻二醇 ^[29] Cannabidiol, CBD	44		大麻素成分 Cannabinoid constituent	不激活大麻素受体 It can't activate cannabinoid receptors
3-甲戊基, (4-磺酰胺基苯基) 氨基甲酸酯 ^[30] 3-methylpentyl, (4-sulfamoylphenyl) carbamate	32		氨基甲酸酯类衍生物, 侧链含 4-氨基苯磺酰胺 Carbamate derivatives branched with 4-aminobenzensulfonamide	
(4S,8aS)-5l ^[31]	32/44		吡咯[1,2-a]吡嗪-2,6-二酮的间三氟甲氧基衍生物 Fluorinated pyrrolo [1,2-a] pyrazine-2,6-dione meta-trifluoromethoxy derivatives	
二十二碳六烯酸 ^[32] Docosahexaenoic acid, DHA	44	DHA 长期使用与 LTG 和 PHT 协同增效 Long-term use of DHA synergizes with LTG and PHT	不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acids	
花生四烯基-2'-氯乙酰胺 ^[33] arachidonyl-2'-chloroethylamide, ACEA	32	与 LEV 协同增效 ACEA has synergistic effect with LEV		选择性大麻素 CB1 受体激动剂 A selective cannabinoid CB1 receptor agonist
WIN55212-2 ^[34]	32	与氯硝西泮(CZP)、苯巴比妥(PB)和 VPA 协同增效 WIN55212-2 has synergistic effect with CZP, PB and VPA		非选择性大麻素 CB1, CB2 受体激动剂 A non-selective cannabinoid CB1 and CB2 receptor agonist
JNJ-42153605, JNJ-40411813 ^[35]	32/44	与 LEV 协同增效 JNJ-42153605 and JNJ-40411813 has synergistic effect with LEV		选择性代谢型谷氨酸受体亚型 2 变构激活剂 Selective mGlu2-positive allosteric modulators
JNJ-46356479 ^[36]	32/44	与 LEV 协同增效, 与 VPA 和 LTG 无协同作用 JNJ-46356479 has synergistic effect with LEV and no such effect with LTG		选择性代谢型谷氨酸受体亚型 2 变构激活剂 A selective mGlu2-positive allosteric modulator

4.2 已上市 AEDs 评估

6 Hz 模型也用来评估已上市药物,研究已上市 AEDs 的联合应用,由于该模型对 LEV 具有敏感性,LEV 与其他 AEDs 的联合使用研究最多。LEV 与 PHT、VPA、CZP、卡马西平(carbamazepine, CBZ)、托吡酯(topiramate, TPM)、氨己烯酸(vigabatrin, VGT)、奥卡西平(oxcarbazepine, OXC)和噻加宾(tiagabine, TGB)以一定比例联合使用在 6 Hz 模型中具有协同作用^[37-38]。此外,拉考酰胺(lacosamide, LCM)与 CBZ、LTG、LEV、TPM 和加巴喷丁(gabapentin, GBP)的联合应用在 6 Hz 模型中同样具有协同作用^[39]。提示可以使用 6 Hz 模型评估已上市 AEDs,寻找耐药性癫痫的新疗法。

4.3 其他应用

除筛选新型 AEDs 和评估已上市 AEDs 外,6 Hz 模型还有其他应用。在 6 Hz 模型中,小鼠产生癫痫的电流强度对正常饮食喂养小鼠的体重不敏感,因此,6 Hz 模型可以用来评估体重为混杂影响因素的抗惊厥方案^[40]。此外,6 Hz 模型小鼠表现出异常的行为表型,小鼠极度活跃,不会产生类似焦虑的行为,但快感缺失,有社交障碍,学习和记忆能力也受到严重损害。因此,6 Hz 模型也可以用来模拟一些神经行为合并症,研究癫痫的严重并发症^[18]。

5 模型优缺点

6 Hz 模型通过角膜电刺激造模,制作简单,耗时短,点燃后脑内异常痫性放电持续时间长。比起化学点燃模型,电点燃可避免外来物质的相互作用对后续实验的影响,并且有助于发作阈值的测定。但是,造模过程中电刺激过大易导致实验动物死亡,且作为一个急性模型,6 Hz 模型不能很好的反应导致耐药癫痫治疗失败的慢性神经网络和神经细胞的改变^[34]。该模型虽已成功使用小鼠造模,并应用于各种 AEDs,但在大鼠中极少建立类似的模型^[41]。对于给定的电流强度,6 Hz 角膜刺激后小鼠和大鼠癫痫发作的程度和性质并不相同^[42]。应当通过模拟小鼠造模方式研究大鼠模型,完善 6 Hz 模型体系,弥补小鼠造模的缺陷。

6 结语

耐药是临床上癫痫防治的重大课题,6 Hz 角膜点燃癫痫模型对多种 AEDs 产生抵抗,在行为学、脑电图和病理改变上与人类耐药性癫痫表型极为相似,是一种优良的耐药性癫痫模型,已被 NIH 纳入推荐为癫痫治疗筛选的必备模型。然而,目前对 6 Hz 模型构建方法有待完善,发病机制研究较少,评估标准缺乏。因此,未来需深入系统优化造模方案、探究模型病理机理、建立动物模型标准,为探究

耐药性癫痫发病机制和开发新的 AEDs 提供应用基础和保障。

参 考 文 献(References)

- [1] 中国抗癫痫协会. 临床诊疗指南-癫痫病分册(2015 修订版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 7.
China Association Against Epilepsy. Clinical Practice Guidelines — Epilepsy [M]. Beijing: People's Medical Publishing House Co., LTD, 2015: 7.
- [2] Schmidt D, Schachter SC. Drug treatment of epilepsy in adults [J]. BMJ, 2014, 348: g254.
- [3] 孔淑贞, 彭森. 难治性癫痫动物模型研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2009, 26(1): 93-96.
Kong SZ, Peng S. Research progress in intractable seizure animal models [J]. J Chongqing Technol Business Univ (Nat Sci Ed), 2009, 26(1): 93-96.
- [4] Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005, 76(8): 1046-1057.
- [5] 张瑞华, 王玉平. 电刺激点燃癫痫大鼠的皮层脑电及行为学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(12): 54-58.
Zhang RH, Wang YP. Electrocorticogram and behavior of electrically kindled epileptic rats [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(12): 54-58.
- [6] Toman JE. Neuropharmacologic considerations in psychic seizures [J]. Neurology, 1951, 1(6): 444-460.
- [7] Brown WC, Schiffman DO, Swinyard EA, et al. Comparative assay of antiepileptic drugs by "psychomotor" seizure test and minimal electroshock threshold test [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1953, 107(3): 273-283.
- [8] Barton ME, Klein BD, Wolf HH, et al. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy [J]. Epilepsy Res, 2001, 47(3): 217-227.
- [9] Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs [J]. Seizure, 2011, 20(5): 359-368.
- [10] 于美娟, 刘学伍. 动物模型在抗癫痫药物筛选中的应用[J]. 国外医学(神经病学神经外科学分册), 2003, 30(2): 141-144.
Yu MJ, Liu XW. Application of animal models in screening antiepileptic drugs [J]. Foreign Med (Neurol Neurosurg Section), 2003, 30(2): 141-144.
- [11] 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.
- [12] Socala K, Nieoczym D, Pieróg M, et al. Role of the adenosine system and glucose restriction in the acute anticonvulsant effect of caprylic acid in the 6 Hz psychomotor seizure test in mice [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2015, 57: 44-51.
- [13] 陆海美, 谢美娟, 李姗, 等. 6 Hz 角膜点燃耐药癫痫小鼠模型改良及 3 种中药方剂的作用 [J]. 药学报, 2018, 53(7): 1048-1053.
Lu HM, Xie MJ, Li S, et al. Modification of 6 Hz corneal kindled mouse model for drug-resistant epilepsy and its treatment by three traditional Chinese medicine prescriptions [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2018, 53(7): 1048-1053.
- [14] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. Electroencephalogr Clin

- Neurophysiol, 1972, 32(3): 281–294.
- [15] Leclercq K, Kaminski RM. Genetic background of mice strongly influences treatment resistance in the 6 Hz seizure model [J]. *Epilepsia*, 2015, 56(2): 310–318.
- [16] Duncan GE, Kohn H. The novel antiepileptic drug lacosamide blocks behavioral and brain metabolic manifestations of seizure activity in the 6 Hz psychomotor seizure model [J]. *Epilepsy Res*, 2005, 67(1–2): 81–87.
- [17] Velazquez FN, Caputto BL, Boussin FD. c-Fos importance for brain development [J]. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(12): 1028–1029.
- [18] Albertini G, Walrave L, Demuyser T, et al. 6 Hz corneal kindling in mice triggers neurobehavioral comorbidities accompanied by relevant changes in c-Fos immunoreactivity throughout the brain [J]. *Epilepsia*, 2018, 59(1): 67–78.
- [19] Giordano C, Vinet J, Curia G, et al. Repeated 6-Hz corneal stimulation progressively increases FosB/ Δ FosB levels in the lateral amygdala and induces seizure generalization to the hippocampus [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0141221.
- [20] Giordano C, Costa AM, Lucchi C, et al. Progressive seizure aggravation in the repeated 6-Hz corneal stimulation model is accompanied by marked increase in hippocampal p-ERK12 immunoreactivity in neurons [J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 281.
- [21] 刘新民, 于澍仁. 动物癫痫模型与中枢神经递质 [J]. *中国实验动物学杂志*, 1993, 3(1–2): 96–98.
Liu XM, Yu SR. Animal epilepsy models and central neurotransmitter [J]. *Chin J Comp Med*, 1993, 3(Z1): 96–98.
- [22] Brodie MJ, Besag F, Ettinger AB, et al. Epilepsy, antiepileptic drugs, and aggression: an evidence-based review [J]. *Pharmacol Rev*, 2016, 68(3): 563–602.
- [23] Cho CH. New mechanism for glutamate hypothesis in epilepsy [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 127.
- [24] Barton ME, Peters SC, Shannon HE. Comparison of the effect of glutamate receptor modulators in the 6 Hz and maximal electroshock seizure models [J]. *Epilepsy Res*, 2003, 56(1): 17–26.
- [25] Jahan K, Pillai KK, Vohora D. Parachlorophenylalanine-induced 5-HT depletion alters behavioral and brain neurotransmitters levels in 6-Hz psychomotor seizure model in mice [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2017, 31(4): 403–410.
- [26] Jahan K, Pillai KK, Vohora D. DSP-4 induced depletion of brain noradrenaline and increased 6-hertz psychomotor seizure susceptibility in mice is prevented by sodium valproate [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 142: 263–269.
- [27] Potschka H. Animal models of drug-resistant epilepsy [J]. *Epileptic Disord*, 2012, 14(3): 226–234.
- [28] Metcalf CS, Klein BD, McDougle DR, et al. Preclinical evaluation of intravenous NAX 810-2, a novel GalR2-preferring analog, for anticonvulsant efficacy and pharmacokinetics [J]. *Epilepsia*, 2017, 8(2): 239–246.
- [29] Klein BD, Jacobson CA, Metcalf CS, et al. Evaluation of cannabidiol in animal seizure models by the epilepsy therapy screening program (ETSP) [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(7): 1939–1948.
- [30] Bibi D, Mawasi H, Nocentini A, et al. Design and comparative evaluation of the anticonvulsant profile, carbonic-anhydrase inhibition and teratogenicity of novel carbamate derivatives of branched aliphatic carboxylic acids with 4-aminobenzensulfonamide [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(7): 1972–1982.
- [31] Dawidowski M, Chońska J, Mika W, et al. Novel fluorinated pyrrolo[1,2-a]pyrazine-2,6-dione derivatives: synthesis and anticonvulsant evaluation in animal models of epilepsy [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22(19): 5410–5427.
- [32] Moezifar M, Sayyah M, Zendehdel M, et al. Docosahexaenoic acid prevents resistance to antiepileptic drugs in two animal models of drug-resistant epilepsy [J]. *Nutr Neurosci*, 2018, 16: 1–9.
- [33] Luszczki JJ, Patrzybas P, Zagaja M, et al. Effects of arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA) on the protective action of various antiepileptic drugs in the 6-Hz corneal stimulation model in mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0183873.
- [34] Florek-Luszczki M, Wlaz A, Kondrat-Wrobel MW, et al. Effects of WIN 55,212-2 (a non-selective cannabinoid CB1 and CB2 receptor agonist) on the protective action of various classical antiepileptic drugs in the mouse 6 Hz psychomotor seizure model [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2014, 121(7): 707–715.
- [35] Metcalf CS, Klein BD, Smith MD, et al. Efficacy of mGlu₂-positive allosteric modulators alone and in combination with levetiracetam in the mouse 6 Hz model of psychomotor seizures [J]. *Epilepsia*, 2017, 58(3): 484–493.
- [36] Metcalf CS, Klein BD, Smith MD, et al. Potent and selective pharmacodynamic synergy between the metabotropic glutamate receptor subtype 2-positive allosteric modulator JNJ-46356479 and levetiracetam in the mouse 6-Hz (44-mA) model [J]. *Epilepsia*, 2018, 59(3): 724–735.
- [37] Florek-Luszczki M, Wlaz A, Luszczki JJ, et al. Interactions of levetiracetam with carbamazepine, phenytoin, topiramate and vigabatrin in the mouse 6Hz psychomotor seizure model — A type II isobolographic analysis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 723: 410–418.
- [38] Wojda E, Wlaz A, Patsalos PN, et al. Isobolographic characterization of interactions of levetiracetam with the various antiepileptic drugs in the mouse 6 Hz psychomotor seizure model [J]. *Epilepsy Res*, 2009, 86(2–3): 163–174.
- [39] Shandra A, Shandra P, Kaschenko O, et al. Synergism of lacosamide with established antiepileptic drugs in the 6-Hz seizure model in mice [J]. *Epilepsia*, 2013, 54(7): 1167–1175.
- [40] Hartman AL, Lyle M, Rogawski MA, et al. Efficacy of the ketogenic diet in the 6-Hz seizure test [J]. *Epilepsia*, 2008, 49(2): 334–339.
- [41] Metcalf CS, West PJ, Thomson KE, et al. Development and pharmacological characterization of the rat 6Hz model of partial seizures [J]. *Epilepsia*, 2017, 58(6): 1073–1084.
- [42] Esneault E, Peyon G, Castagné V. Efficacy of anticonvulsant substances in the 6Hz seizure test: Comparison of two rodent species [J]. *Epilepsy Res*, 2017, 134: 9–15.