

论著·实验研究

左乙拉西坦对癫痫大鼠海马组织中 NCAM 和 GAP-43 mRNA 表达的影响

贾天明 刘涛 栾斌 李小丽 张晓莉

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 通过氯化锂-匹罗卡品(Li-PILO)诱导的癫痫大鼠模型,观察左乙拉西坦(LEV)对大鼠海马组织中神经细胞黏附分子(NCAM)和生长相关蛋白-43(GAP-43)mRNA的表达变化,为阐明LEV的抗癫痫机制及其剂量效应提供实验依据。**方法** 将48只Wistar大鼠随机分成对照组、Li-PILO组(模型组)、150 mg/kg LEV组和300 mg/kg LEV组,每组12只。对LEV组大鼠予以LEV灌胃,首次灌胃时间为癫痫持续状态后6 h,剂量分别为150和300 mg/kg,每日一次,持续2周。Real-time PCR法测定各组大鼠海马组织中NCAM和GAP-43的mRNA表达。**结果** 模型组大鼠海马NCAM及GAP-43的mRNA表达水平明显高于正常对照组($P < 0.05$),150 mg/kg LEV组和300 mg/kg LEV组明显低于模型组($P < 0.05$),其中300 mg/kg LEV组明显低于150 mg/kg LEV组($P < 0.05$)。**结论** Li-PILO诱导癫痫大鼠海马NCAM和GAP-43 mRNA表达上调,LEV能够抑制NCAM和GAP-43 mRNA的表达,其抑制效果与剂量有关。
[中国当代儿科杂志,2011,13(5):428-431]

[关键词] 癫痫;左乙拉西坦;神经细胞黏附分子;生长相关蛋白-43;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)05-0428-04

Effects of levetiracetam on the expression of NCAM and GAP-43 mRNA in the hippocampus of rats with epilepsy

JIA Tian-Ming, LIU Tao, LUAN Bin, LI Xiao-Li, ZHANG Xiao-Li. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: JIM226@sina.com)

Abstract: Objective This study explored the effects of levetiracetam (LEV) on the expression of nerve cell adhesion molecule (NCAM) and growth-associated protein 43 (GAP-43) mRNA in the hippocampus of rats with epilepsy induced by lithium-pilocarpine (Li-PILO) in order to provide a basis for investigating the antiepileptic mechanism of LEV and its doseresponse. **Methods** Forty-eight Wistar rats were randomly divided into a normal control, a Li-PILO model and two LEV treatment groups (LEV: 150 and 300 mg/kg) ($n = 12$ each). The LEV treatment groups received LEV by intragastric administration 6 hrs after status epilepticus (once daily for 2 two weeks). The expressions of NCAM and GAP-43 mRNA in the hippocampus was determined by real-time PCR. **Results** The expression of NCAM and GAP-43 mRNA in the Li-PILO model group was significantly higher than in the normal control group ($P < 0.05$). LEV treatment of 150 and 300 mg/kg significantly decreased the expression of NCAM and GAP-43 mRNA compared with the Li-PILO model group ($P < 0.05$). The LEV treatment group at the dose of 300 mg/kg showed significantly lower expression of NCAM and GAP-43 mRNA than the 150 mg/kg LEV treatment group ($P < 0.05$). **Conclusions** Li-PILO can up-regulate the expressions of NCAM and GAP-43 mRNA in the hippocampus of rats with epilepsy. LEV can inhibit the expression of NCAM and GAP-43 mRNA and the effect is associated with the dose of LEV. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (5):428-431]

Key words: Epilepsy; Levetiracetam; Nerve cell adhesion molecule; Growth-associated protein 43; Rats

癫痫是小儿时期最常见的神经系统发作性疾病,可以导致神经元胞体及近段轴突受损,神经元死亡,突触联系中断,并引起周围颗粒细胞轴突(苔藓纤维)出芽。苔藓纤维出芽使突触发生重建,从而导致异位兴奋性突触的形成。神经细胞黏附分子

(nerve cell adhesion molecule, NCAM)属于免疫球蛋白家族,能介导神经细胞黏附,促进轴突生长、神经细胞迁移和神经元环路形成^[1]。生长相关蛋白-43(GAP-43)是分布于神经组织中的特异性胞膜磷酸化蛋白,在引导轴突生长、调节突触重建过程中起

到关键作用^[2]。NCAM 和 GAP-43 与神经细胞的发育和迁移密切相关,是研究突触可塑性的主要分子标志。NCAM 和 GAP-43 在癫痫反复发作形成的病理过程中发挥了重要作用。左乙拉西坦(LEV)是一种新型广谱抗癫痫药物,通过多种抗癫痫机制发挥其治疗作用^[3-5]。研究表明,LEV 在匹罗卡品诱发的颞叶癫痫中能够减少海马神经元死亡,显示出神经保护作用,对神经元突触重建有着重要的影响^[6-7],但 LEV 对癫痫鼠海马组织中 GAP-43 和 NCAM mRNA 表达的影响,目前国内尚未见报道。本研究通过建立氯化锂-匹罗卡品(Li-PILO)诱导的癫痫大鼠模型,并采用 LEV 进行干预,以观察 LEV 干预下大鼠海马组织中 NCAM 和 GAP-43 mRNA 表达的变化,为进一步阐明 LEV 的抗癫痫机制及其剂量效应提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

健康清洁级 1 月龄雄性 Wistar 大鼠 48 只,由郑州大学实验动物中心提供,体重 100 ~ 120 g。主要试剂:氯化锂,匹罗卡品(Sigma 公司),左乙拉西坦(UCB S. A. Belgium 公司),RT-PCR 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司),引物合成(北京赛百盛生物技术有限公司)。其他试剂均为市售分析纯产品。

1.2 动物分组及模型建立

模型制作参照文献^[8-9]并加以改进。将 48 只大鼠随机分成 4 组:对照组、Li-PILO 组(模型组)、150 mg/kg LEV 组(LEV150)和 300 mg/kg LEV 组(LEV300),每组 12 只。模型组先给予氯化锂 125 mg/kg(溶于灭菌用水,浓度为 6.35%)腹腔注射,18 ~ 20 h 后,再予 1 mg/kg 氨溴酸东莨菪碱腹腔注射,以拮抗外周胆碱能反应,30 min 后,予匹罗卡品 150 mg/kg(溶于灭菌用水,浓度为 3%)腹腔注射,观察发作情况。大鼠癫痫发作症状采用 Racine 分级标准^[10]:0 级为无惊厥,I 级为面部阵挛,II 级为面部阵挛 + 节律点头,III 级为面部阵挛 + 节律点头 + 前肢阵挛,IV 级为 III 级 + 后肢站立,V 级为 IV 级 + 跌倒。连续 IV 或 V 级发作且持续 30 min 以上被认为是达到癫痫持续状态(SE)。匹罗卡品腹腔注射 30 min 后如无 IV 以上痫性发作,继续给予 30 mg/kg 匹罗卡品,每隔 30 min 追加一次,直到出现 SE 为止,每只大鼠总量不超过 250 mg/kg,对建模不成功者予以剔除。大鼠痫性发作 1 h 后,腹腔

注射 10% 水合氯醛(3 ml/kg)终止发作;正常对照组注射等剂量水合氯醛。LEV 组在 SE 后 6 h 开始给予 LEV。将 LEV 片剂溶解于生理盐水中,制成 1% LEV 生理盐水溶液,剂量分别为 150 mg/kg 和 300 mg/kg,每日一次,持续 2 周(每天同一时间点给药);正常对照组和 Li-PILO 组灌注生理盐水。同时 SE 后 1 周内,每日给予 5% 糖盐注射液 2 ~ 3 mL 腹腔注射,2 次/d,加强能量供给。

1.3 组织取材

大鼠模型建立 2 周后,将各组大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉(3 mL/100 g 体重),迅速剪开颅骨取出海马组织,生理盐水冲洗后立即置于液氮中,用于提取 mRNA。

1.4 Real-time PCR 测定 NCAM 和 GAP-43 的 mRNA 表达

大鼠海马组织匀浆后,加入 Trizol 提取总 mRNA,并用试剂盒进行逆转录合成 cDNA。将 cDNA 产物进行 Real-time PCR 循环。引物序列:NCAM 上游 5' GCCTGGAACCAAATACTACTAT3',下游 5' ACAGTCGGCTCAGAATACCC3'; GAP-43 上游 5' GGCTCTGCTACTACCGATCC3',下游 5' TTGGAG-GACGGCGAGTTA3'; 内参上游 5' CAGTGCCAGC-CTCGTCTCAT3',下游 5' AGGGGCCATCCACAGTAT-TC3',扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,用 Band Scan 5.0 凝胶分析软件分别测定 GAP-43、NCAM 及内参的灰度值,并计算 GAP-43 与内参的比值及 NCAM 与内参的比值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠行为学表现

本研究中有 6 只大鼠未能诱发 SE,SE 诱发成功率 83% (30/36),将 6 只未成功诱发癫痫的大鼠剔除,其余 30 只诱发成功的大鼠分入模型组,LEV150 组及 LEV300 组(每组 10 只)。SE 诱发成功的大鼠的行为表现为:腹腔注射匹罗卡品后 5 min 左右开始出现动作僵硬、刻板,凝视、吸鼻、动须、节奏性咀嚼等,10 min 左右可见“洗脸”、点头、“湿狗样”震颤、咀嚼加强,15 ~ 20 min 左右逐渐出现反复前肢阵挛,直立、跌倒、甚至跳跃,以至全身的强直阵

挛,体位失去控制。约在 30 min 左右导致 SE 产生。另有流涎、结膜充血、流血泪、腹泻等外周胆碱能兴奋表现,10% 水合氯醛腹腔注射后均可终止 SE。诱发 SE 后 2~5 d,模型组大鼠出现蜷伏不动,不思饮食,极易激惹。此后可观察到 I~III 级的自发反复发作。LEV 组灌胃后,仅出现极少量 I~III 级性发作。对照组大鼠无行为改变。

2.2 各组大鼠海马组织中 GAP-43 mRNA 的表达

模型组海马组织中 GAP-43 mRNA 的表达明显高于对照组 ($P < 0.05$)。LEV150 组和 LEV300 组 GAP-43 mRNA 的表达高于对照组 ($P < 0.05$),低于模型组 ($P < 0.05$),其中 LEV300 组低于 LEV150 组 ($P < 0.05$)。见图 1,图 2。

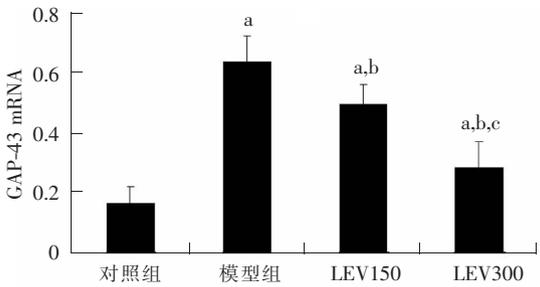


图 1 各组海马组织中 GAP-43 mRNA 表达量的比较

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与 LEV150 组比较, $P < 0.05$

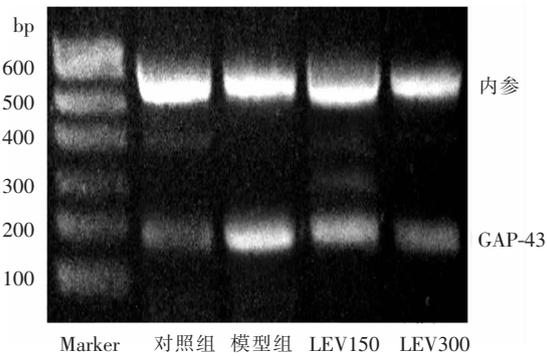


图 2 RT-PCR 方法示各组海马组织中 GAP-43 mRNA 的表达

2.3 各组大鼠海马组织中 NCAM mRNA 的表达

模型组大鼠海马组织中 NCAM 的 mRNA 表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$)。LEV 150 组和 LEV 300 组大鼠海马 NCAM mRNA 表达高于对照组 ($P < 0.05$),显著低于模型组 ($P < 0.05$),其中 LEV 300 组低于 LEV 150 组 ($P < 0.05$)。见图 3,图 4。

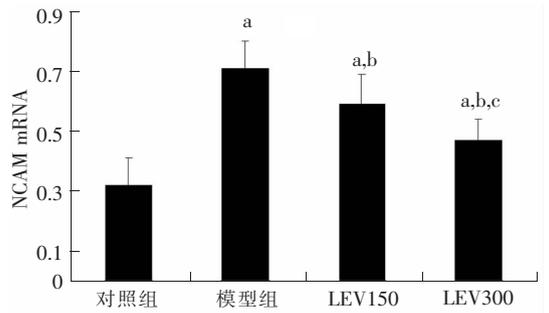


图 3 各组海马组织中 NCAM mRNA 表达量的比较

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与 LEV150 组比较, $P < 0.05$

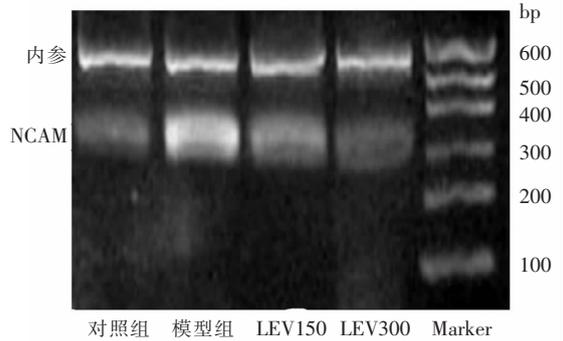


图 4 RT-PCR 法示各组海马组织中 NCAM mRNA 的表达

3 讨论

癫痫是小儿时期最常见的神经系统发作性疾病,表现为慢性反复性发作。人类颞叶癫痫主要的病理变化是海马硬化,表现为神经元丢失、胶质细胞增生、苔藓纤维出芽及突触重组。苔藓纤维出芽形成的神经回路可使颗粒细胞的兴奋性增高,与癫痫放电的产生和传播有密切的关系^[11-12]。苔藓纤维出芽及突触重构改变了门区及内分子层局部环路,在颗粒细胞间形成异常兴奋性联系,增加了发作敏感性,从而促进癫痫的形成,苔藓纤维出芽在颗粒细胞近端树突产生巨大的突触兴奋性,从而反复点燃,异化癫痫活动在齿状回的形成。海马苔藓纤维出芽被认为是癫痫发生发展过程中最主要的病理改变。

NCAM 是一种介导神经细胞识别、黏附和迁移的细胞表面糖蛋白,对于轴突生长、突触重建和神经元环路形成起到重要作用。GAP-43 是一种具有神经系统特异性的胞膜磷酸化蛋白,具有引导轴突生

长、调节侧支环路形成的作用,并与突触的递质释放密切相关^[2]。NCAM 和 GAP-43 表达的过度上调则可能导致异常神经元环路的形成,继而引发神经元的异常放电。本研究中, Li-PILO 致大鼠海马中的 NCAM 和 GAP-43 表达明显升高,与徐慧琴等^[13]戊四氮致痫大鼠模型的研究一致。表明大鼠致痫后,海马 NCAM 和 GAP-43 被大量诱导生成,并发挥其刺激苔藓纤维出芽和促进突触重建的作用,形成导致癫痫反复发作的兴奋性神经网络结构。

LEV 是一种新型的广谱抗癫痫药物,通过多种途径发挥抗癫痫作用。LEV 能够与中枢神经元内广泛分布的突触小泡蛋白 2A (synaptic vesicle protein 2A) 发生作用,调节突触囊泡的胞外分泌功能和突触前神经递质的释放^[14];对抗 γ -氨基丁酸受体阻滞剂,从而间接增强 γ -氨基丁酸受体的作用、抑制海马 CA3 区等处神经元的兴奋性;抑制高压电激活的 N 型钙离子通道^[5];分子研究表明,神经元兴奋性增高与海马内用于合成脑源性神经营养因子及神经肽 Y 的 mRNA 水平上调有关^[4]。有报道,LEV 在匹罗卡品和红藻氨酸药物诱发的颞叶癫痫中能够减少海马神经元死亡,显示出神经保护作用,且大剂量时对行为影响极小,说明其特殊的抗癫痫机制和安全性^[15]。本研究中,使用 LEV 的癫痫大鼠仅出现极少量 I ~ III 级痫性发作,证实了 LEV 的抗癫痫疗效。而使用 150 mg/kg 和 300 mg/kg 剂量的 LEV 治疗后,癫痫大鼠海马组织中 NCAM 和 GAP-43 mRNA 的表达明显低于未使用 LEV 的大鼠,提示 LEV 可以通过抑制癫痫大鼠海马组织中 NCAM 和 GAP-43 的过度表达,来抑制神经元轴突再生和突触重建,从而达到控制癫痫反复发作的目的;300 mg/kg 剂量 LEV 对癫痫大鼠 NCAM 和 GAP-43 mRNA 表达的下调作用大于 150 mg/kg 剂量的 LEV,提示 LEV 对海马 NCAM 和 GAP-43 mRNA 表达的抑制效果与剂量有关。

[参 考 文 献]

[1] Sato K, Iwai M, Nagano I, Shoji M, Abe K. Temporal and spa-

cial changes of highly polysialylated neural cell adhesion molecule immunoreactivity in amygdala kindling development[J]. *Neurological Res*, 2003, 25 (1): 79-82.

[2] Longo B, Vezzani A, Mello LE. Growth-associated protein 43 expression in hippocampal molecular layer of chronic epileptic rats treated with cycloheximide[J]. *Epilepsia*, 2005, 46 (Suppl 5): 125-128.

[3] 高志杰,姜玉武. 左乙拉西坦单药治疗小儿癫痫的疗效和安全性随访研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(6): 711-714.

[4] Bootsma HP, Ricker L, Diepman L, Gehring J, Hulsman J, Lambrechts D, et al. Levetiracetam in clinical practice: long-term experience in patients with refractory epilepsy referred to a tertiary epilepsy center[J]. *Epilepsy Behav*, 2007, 10 (2): 296-303.

[5] De Smedt T, Raedt R, Vonck K, Boon P. Levetiracetam; part II, the clinical profile of a novel anticonvulsant drug[J]. *CNS Drug Rev*, 2007, 13 (1): 57-78.

[6] De Smedt T, Raedt R, Vonck K, Boon P. Levetiracetam; the profile of a novel anticonvulsant drug-part I: preclinical data[J]. *CNS Drug Rev*, 2007, 13(1): 43-56.

[7] Racine RJ, Steingart M, McIntyre DC. Development of kindling-prone and kindling-resistant rats; selective breeding and electrophysiological studies[J]. *Epilepsy Res*, 1999, 35(3): 183-195.

[8] Muller CJ, Bankstahl M, Groticke I, Loscher W. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 619(1-3): 15-24.

[9] 程敏,黄志,李思秀. 左乙拉西坦预防动物热性惊厥的实验研究[J]. *儿科学杂志*, 2009, 15(4): 16-18.

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

[11] Leite JP, Neder L, Arisi GM, Carlotti CG Jr, Assirati JA, Moreira JE. Plasticity, synaptic strength, and epilepsy: what can we learn from ultrastructural data? [J]. *Epilepsia*, 2005, 46 (Suppl 5): 134-141.

[12] Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ. Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy[J]. *Neuroscience*, 2004, 126 (3): 677-688.

[13] 徐慧琴,朱遂强,郑荣远,王开颜,李安乐,杨学志. 托吡酯对戊四氮点燃慢性癫痫大鼠海马神经细胞黏附分子的影响[J]. *中国临床神经科学*, 2006, 14(5): 491-493.

[14] Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, et al. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (26): 9861-9866.

[15] 王学禹,李明霞. 左乙拉西坦在癫痫治疗中的应用进展[J]. *山东医药*, 2008, 48(11): 110-111.

(本文编辑:王庆红)