

论著 · 实验研究

r-HuEPO 对癫痫持续状态大鼠血清 NSE S-100β 蛋白和 MBP 表达的影响

蒋春明 杜建民 刘占利 陈丽琼 冯梅 杨一华 王洁华 黄先玫

(南京医科大学附属杭州医院/杭州市第一人民医院儿科,浙江 杭州 310006)

[摘要] **目的** 通过观察重组人促红细胞生成素(r-HuEPO)对幼年大鼠癫痫持续状态(SE)后 24 h 血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)、S-100β 蛋白和髓鞘碱性蛋白(MBP)表达的影响,以观察其在癫痫性脑损伤中的可能作用。**方法** 40 只 19~21 日龄 Sprague-Dawley 雄性大鼠随机分为正常对照组(CON 组)、SE 组、r-HuEPO 预处理 + SE 组(SE-EPO 组)、r-HuEPO 组(EPO 组)($n=10$),采用氯化锂-匹鲁卡品点燃制成 SE 模型。SE-EPO 组和 EPO 组在制模前 4 h 腹腔注射 r-HuEPO 500 IU/kg。在 SE 后 24 h 测定血清中 NSE、S-100β 蛋白、MBP 含量的变化。**结果** 与 CON、EPO 组相比,SE 组血清 NSE、S-100β 蛋白、MBP 浓度均显著升高($P<0.05$);与 SE 组比较,SE-EPO 组 NSE、S-100β 蛋白、MBP 均显著下降($P<0.05$)。**结论** r-HuEPO 可降低癫痫后神经组织损伤指标表达,对癫痫性脑损伤可能具有早期保护作用。[中国当代儿科杂志,2011,13(1):50-52]

[关键词] 癫痫持续状态;神经元特异性烯醇化酶;S-100β;促红细胞生成素;大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)01-0050-03

Effects of recombinant human erythropoietin on serum levels of neuron-specific enolase, S-100β protein and myelin basic protein in rats following status epilepticus

JIANG Chun-Ming, DU Jian-Min, LIU Zhan-Li, CHEN Li-Qiong, FENG Mei, YANG Yi-Hua, WANG Jie-Hua, HUANG Xian-Mei. Department of Pediatrics, Hangzhou People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Hangzhou 310006, China (Huang X-M, Email: hxianmei@hotmail.com)

Abstract: Objective This study examined the effect of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) on the serum levels of neuron-specific enolase (NSE), S-100β protein and myelin basic protein (MBP) in young rats 24 hrs after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus (SE) in order to study the potential role of r-HuEPO in epileptic brain damage. **Methods** Forty 19-21-day-old male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups ($n=10$): normal control group, SE, r-HuEPO pretreated-SE and r-HuEPO. SE was induced by lithium-pilocarpine. r-HuEPO (500 IU/kg) was intraperitoneally injected in the r-HuEPO pretreated-SE and r-HuEPO groups 4 hrs before SE. Serum levels of NSE, S-100β and MBP were determined 24 hrs after the SE event. **Results** Serum levels of NSE, S-100β and MBP in the SE group increased significantly compared with those in the normal control and the r-HuEPO groups ($P<0.05$). The r-HuEPO pretreated-SE group showed significantly decreased serum levels of NSE, S-100β and MBP compared with the SE group ($P<0.05$). **Conclusions** r-HuEPO may reduce the expression of NSE, S-100β and MBP and thus might provide an early protective effect against epileptic brain injury. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(1):50-52]

Key words: Status epilepticus; Neuron-specific enolase; S-100β protein; Erythropoietin; Rats

癫痫持续状态(status epilepticus, SE)是儿科常见急症之一,可导致神经元的损伤^[1-2]。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)最初是从肾脏分离出来的能刺激前体红细胞增殖、分化的一种细胞因子,已发现它具有促进造血、抗凋亡、抗炎、促干细胞迁移等多种功能^[3]。近年来越来越多的证据显示,中枢神经系统也有 EPO 及其受体(erythropoietin receptor, EPO-R)存在,在缺氧、缺血刺激下表达增加,并具有神经营养及保护作用^[4-7]。作者既往研究发现,惊厥患儿发作后血清及脑脊液中的 EPO 均有不同程度升高,提示其参与癫痫后脑损伤的发病过程^[8]。但目前对重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, r-HuEPO)对癫痫脑损伤的干预研究甚少。本研究拟使用 r-HuEPO 对匹鲁

[收稿日期]2010-05-27;[修回日期]2010-06-28
[作者简介]蒋春明,男,硕士,医师。
[通信作者]黄先玫,主任医师。

卡品-氯化锂(lithium-pilocarpine)点燃大鼠SE模型进行干预研究,通过测定血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)、S-100 β 蛋白和髓鞘碱性蛋白(MBP),以观察r-HuEPO在癫痫性脑损伤中的可能的神经元保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF级日龄为19~21 d健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠40只,体重50~70 g,由温州医学院实验动物中心提供。实验动物先置温州医学院实验动物中心层流实验室适应性饲养2 d,自由摄食、水,室内温度25℃,相对湿度70%,12/12 h昼夜照明变化。SE模型大鼠在造模后单独笼养。

1.1.2 主要试剂 氯化锂、匹鲁卡品购于Aldrich Sigma公司;硫酸阿托品针购于浙江瑞新药业股份公司(国药准字:H33020465);10%水合氯醛注射液为杭州市第一人民医院药剂科配置。r-HuEPO注射液(CHO细胞)(商品名:利血宝;1 500 IU/0.5 mL;批号:20090640)购自麒麟鲲鹏(中国)生物药业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制作与标本制备 SE模型制作参照胡越等^[9]方法并稍做改进:按127 mg/kg剂量腹腔注射氯化锂,18 h后按1 mg/kg腹腔注射硫酸阿托品,30 min后按100 mg/kg腹腔注射匹鲁卡品。观察SE组大鼠出现惊厥发作的行为学表现。大鼠惊厥按Racine^[10]分级法分为6级。0级:无任何发作迹象;Ⅰ级:凝视、咀嚼和须动;Ⅱ级:点头、湿狗样抖动或搔抓;Ⅲ级:前肢阵挛抽搐;Ⅳ级:伴后肢站立的全身强直性发作;Ⅴ级:伴有站立并摔倒的全身强直-阵挛性发作。惊厥发作达到Ⅳ以上,持续时间达30 min以上,惊厥缓解后状态良好的大鼠为合格SE大鼠模型。当惊厥发作达30 min时,给予10%水合氯醛300 mg/kg、硫酸阿托品1 mg/kg腹腔注射终止惊厥发作;并于惊厥发作停止后24 h,用10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后断头取血。

1.2.2 实验分组 按随机数字表法分为4组:正常对照组(CON组)、SE组、r-HuEPO预处理+SE组(SE-EPO组)、r-HuEPO组(EPO组)。SE-EPO组:注射匹鲁卡品前4 h腹腔注射1次r-HuEPO,剂量为500 IU/kg^[11];EPO组:除不予以匹鲁卡品外,均

与SE-EPO组处理相同。CON组予以腹腔注射与SE-EPO组相同次数及体积的0.9%氯化钠溶液。造模过程中由于不满足模型要求或者死亡的大鼠,采用同批随机数字表法原则予以补足,实验最后各组为10只大鼠,各组间大鼠体重差异无统计学意义。

1.2.3 标本采集 实验大鼠均在实验造模完成后24 h麻醉后予快速断头取血5 mL。在0℃恒温离心机以2 000 min离心后,取上清液置-70℃冰箱内保存待测。

1.2.4 NSE、S-100 β 蛋白和MBP的测定 NSE的测定采用时间分辨荧光分析法,取固相抗体板条,依次加入NSE标准液及样本各25 μ g,每孔加入稀释抗体100 μ g,室温下振荡孵育1 h,洗板及甩干后,每孔加入增强液200 μ g,振荡5 min,Victor-1 420时间分辨荧光上进行测定(NSE试剂盒购于美国EG&G公司)。S-100 β 蛋白测定采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA),试剂盒由第四军医大学生理学教研室提供,操作按说明书进行。MBP采用ELISA测定,试剂盒由华西医科大学重组DNA室提供,操作按说明书进行。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数间比较采用单因素方差分析;两两比较用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型制作结果

注射匹鲁卡品后,按Racine分级标准,有5%(1/20)幼年大鼠未成功诱发SE,其余均成功诱发,其中16%(3/19)出现Ⅳ级发作,其余84%(16/19)均诱导出Ⅴ级发作,并持续发作达30 min以上。其中1只于发作后24 h死亡。后按实验设计原则补充2只大鼠,均成功SE造模,最终造模成功率为91%(20/22)。

2.2 血清NSE、S-100 β 蛋白和MBP浓度的比较

4组大鼠血清NSE、S-100 β 蛋白和MBP 3项指标组间差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与CON组、EPO组相比,SE组NSE、S-100 β 、MBP浓度均显著升高($P < 0.05$);而与SE组相比,SE-EPO组大鼠血清上述指标浓度均有显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表 1 各组血清 NSE、S-100β 和 MBP 浓度的比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	鼠数	NSE	S-100β	MBP
CON 组	10	8.3 ± 0.8	0.35 ± 0.06	7.9 ± 0.7
EPO 组	10	8.3 ± 0.7	0.36 ± 0.06	8.3 ± 0.8
SE 组	10	11.6 ± 1.2 ^{a,b}	0.99 ± 0.11 ^{a,b}	9.4 ± 0.8 ^{a,c}
SE-EPO 组	10	10.7 ± 0.9 ^{a,b,d}	0.89 ± 0.10 ^{a,b,d}	8.6 ± 0.9 ^d
F 值		33.69	147.90	5.77
P 值		<0.001	<0.001	0.003

a: 与 CON 组比较, $P < 0.01$; b: 与 EPO 组比较, $P < 0.01$; c: 与 EPO 组比较, $P < 0.05$; d: 与 SE 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

反映神经元损伤的 NSE、反映神经胶质细胞损伤的 S-100β 蛋白和反映髓鞘损伤的 MBP 是目前反映神经组织损伤较公认的 3 个客观指标。既往研究证实, 癫痫可导致患者血清及脑脊液 3 种指标出现不同程度的升高, 且 3 指标血清水平亦能很好地反映癫痫后神经组织损伤的变化^[12-13]。本研究也显示, 癫痫持续发作后 24 h 大鼠血清 NSE、S-100β 蛋白及 MBP 浓度均显著高于正常组, 提示 SE 可致神经组织出现不同程度的损伤。

EPO 是调节红细胞生成的糖蛋白, 主要产生于胎儿的肝脏和成人的肾脏。EPO 及 EPO-R 在人体的许多组织和器官细胞都有表达, 包括神经系统的神经细胞、胶质细胞和血管内皮细胞。众多研究证实, EPO 具有内源性神经保护作用, 并认为其在中枢神经系统内具有抑制活性氧家族和兴奋性氨基酸—谷氨酸的产生, 逆转血管痉挛, 刺激血管再生, 调节突触转运, 抑制凋亡, 调节炎症反应和促进干细胞的聚集等作用机制^[11, 14-15]。Kondo 等^[16]输注外源性 EPO 可抑制海马齿状核致痫神经元的形成, 从而起保护作用。Jun 等^[17]发现 EPO 预处理后, 大鼠 SE 后 1 h 即可显示脑保护作用, 并改善后期癫痫后认知状态。作者既往临床研究^[8]发现, 惊厥后血清及脑脊液 EPO 水平均显著升高, 提示惊厥发作后存在脑损伤, 并可能通过自身诱导 EPO 表达上调, 从而减轻脑损伤程度。本研究结果显示, r-HuEPO 预处理后, 幼年大鼠 SE 后 24 h 血清 NSE、S-100β 及 MBP 浓度均较未处理组显著下降 ($P < 0.05$), 提示外源性 EPO 可能对癫痫后脑损伤具有保护作用, 为癫痫性脑损伤发病机制及临床防治提供了新的研究思路。但 EPO 对 SE 后脑损伤的动态影响如何, 是否具有治疗剂量、时间窗, 作者将作进一步探讨。

[参 考 文 献]

[1] Kondratyev A, Gale K. Temporal and spatial patterns of DNA

(本文编辑:徐福兰)