

乌司他丁对氯化锂-匹罗卡品诱发癫痫大鼠脑保护作用及其机制研究

何保明 李素萍 喻良

【摘要】 目的 研究乌司他丁对癫痫发作时大脑的保护作用及其机制。**方法** 通过对 Wistar 大鼠建立癫痫模型,建模成功后并对其进行 4 种分组处理,即 A 组注射生理盐水;B 组注射卡马西平;C 组注射卡马西平和少量乌司他丁(10 000 U/kg);D 组注射卡马西平和大量乌司他丁(70 000 U/kg);测量每组达到惊厥标准后 24、48、72、96 h 不同时间段的 S100 β 蛋白和神经烯醇化酶(NSE)水及 96 h 后肿瘤坏死因子- α (TNF- α)与 IL-1 β 水平;通过免疫组化检测 caspase-3、bax 与 bcl-2 阳性细胞数;观察神经元凋亡情况;用水迷宫检测大鼠的认知功能,通过模型组与空白对照组和模型组间对比分析乌司他丁对癫痫大鼠的影响;空白对照组全程注射等量生理盐水。**结果** 注射乌司他丁能够降低 S100 β 和 NSE 水平,并且大剂量乌司他丁效果更显著($P<0.05$);乌司他丁对 TNF- α 与 IL-1 β 表达进行抑制,且大剂量乌司他丁效果更显著($P<0.05$);注射乌司他丁后 caspase-3 与 bax 的阳性细胞减少而 bcl-2 的阳性细胞增加,且大剂量乌司他丁效果更显著($P<0.05$);注射乌司他丁能够减少海马 CA3 区神经元凋亡,且大剂量乌司他丁效果更显著($P<0.05$);注射乌司他丁能够改善癫痫大鼠的认知功能,且大剂量乌司他丁效果更显著($P<0.05$)。**结论** 乌司他丁可能是通过抑制炎症因子的表达和 caspase-3 与 bax 的激活,促进 bcl-2 蛋白激活,并减少神经元凋亡来对癫痫大鼠的大脑进行保护。

【关键词】 乌司他丁 癫痫 氯化锂-匹罗卡品

【中图分类号】 R742.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)01-0013-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.01.003

Protective effect and mechanism of ulinastatin on brain in rats with epilepsy induced by LICI-pilocarpin He Baoming, Li Suping, Yu Liang. Department of internal medicine, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu 610072

【Abstract】 Objective To study the protective effect and mechanism of ulinastatin on brain in rats during seizures. **Methods** Wistar rats were divided into 5 groups: control group with saline, A group with saline, B group with carbamazepine, C group with carbamazepine and little amount of ulinastatin (10 000 U/kg) and D group with carbamazepine and large amount of ulinastatin (70 000 U/kg). After seizures 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, the level of S100 β and NSE were detected. After 96 h, the level of TNF- α and IL-1 β , the expression of caspase-3, bax and bcl-2, and the apoptosis of neuron in the CA3 area of hippocampus were detected. Water maze was used to assay cognitive function. **Results** The injection of ulinastatin reduced the contents of S100 β , NSE, caspase-3, bax, the expression of TNF- α and IL-1 β , and the apoptosis of neuron, increased the content of bcl-2, and ameliorated the cognitive function of rats with epilepsy. The effect was more significant when rats were treated with higher dose of ulinastatin ($P<0.05$). **Conclusion** The protective effect of ulinastatin on brain may be through inhibiting the expression of inflammatory cytokines, the activation of caspase-3 and bax, and the apoptosis of neuron, and improving the activation of bcl-2.

【Key words】 Ulinastatin Epilepsy LICI-pilocarpine

颞叶癫痫(Temporal Lobe Epilepsy, TLE)系中枢神经系统疾病,其是难治性癫痫中最常见的类型,TLE 常常自发性发作和反复发作,其病因和发

病机制目前尚不明确^[1]。癫痫的发生与神经元的凋亡、神经元兴奋性增加及突触的异常等相关^[2],大量研究表明免疫应答也参与了癫痫的发病机制^[3]。乌司他丁是一种来源于人尿液的糖蛋白水解酶抑制剂,研究发现其对中枢神经系统具有保护作用,并且具有一定的抗炎效果^[4]。本研究通过在癫痫大鼠模

型注射乌司他丁,以了解乌司他丁对癫痫模型鼠脑的保护作用及其机制。

1 资料与方法

1.1 建模及实验分组

通过对健康成年 Wistar 大鼠(250~300 g)腹腔注射氯化锂(3 mg/kg)及 20 h 后皮下注射匹罗卡品(30 mg/kg)进行建模,并随机分组(A、B、C、D 组),每组各 10 只,对空白对照组(10 只)只进行生理盐水注射,模型组中共对 53 只进行建模处理,其中 8 只没有达到惊厥标准、5 只死亡;共 4 组模型组和 1 组空白对照组;密切观察模型组大鼠状态并进行 Simialowski 6 级评分,达到 IV 或 V 级为本次研究惊厥的标准,不达评分等级的大鼠则另用其大鼠实验,以保证每组 10 只大鼠达标,达标后对大鼠进行如下处理。A 组不进行任何治疗,也不注射乌司他丁;B 组在发生惊厥后注射卡马西平进行止惊治疗,但不注射乌司他丁;C 组在发生惊厥后注射卡马西平进行止惊治疗,并注射少量乌司他丁(10 000 U/kg);D 组在发生惊厥后注射卡马西平进行止惊治疗,并注射大量乌司他丁(70 000 U/kg)。

1.2 观察指标

1.2.1 S100β 蛋白和神经烯醇化酶(NSE)水平检测 各组大鼠在达到惊厥标准后 24、48、72、96 h 分别收集鼠尾静脉血,使用 S100β 蛋白和神经烯醇化酶(NSE)试剂盒检测其水平,操作步骤严格按照说明书执行。

1.2.2 TNF-α 与 IL-1β 水平检测 96 h 后用双抗夹心 ELISA 法检测每组大鼠脑中 TNF-α 与 IL-1β 水平,并观察注射乌司他丁后其水平的变化情况。

1.2.3 caspase-3、bax、bcl-2 阳性细胞计数 上述处理完后断头处死,对大鼠海马进行切片,每只大鼠取一个切片并进行 caspase-3、bax、bcl-2 免疫组化检测,于 400 倍光镜下随机计数阳性细胞,多少个?视野读取求平均值。阳性细胞是指 aspase-3 胞核呈棕黄色,bax 与 bcl-2 胞浆呈棕黄色。

1.2.4 TUNEL 阳性细胞计数 断头处死后对海马 CA3 区切片并 TUNEL 染色,阳性细胞是指细胞核呈棕黄色颗粒者,在 400 倍光镜下计算 10 个视野的 TUNEL 阳性细胞数并其求均值。

1.3 Morris 水迷宫实验

对建模后 4 个模型组进行水迷宫训练,水迷宫设备是一个直径为 150 cm,深度为 60 cm 的水池,

分为 4 个象限并在某一象限固定放置一个直径 12 cm 的平台;实验前将大鼠置于站台上适应 10 s,随后将大鼠随机从不同象限面壁置入池内,大鼠登上站台 5 s 后终止记录,最长记录时间为 120 s,若大鼠在 120 s 内不能上台,引导其登上站台适应 10 s,最后将大鼠擦干放入鼠笼;如此将大鼠置入游泳池,4 次/d,每次间隔 1 h,定位航行训练需要 4 d;第 5 d 撤下平台测量平台逃避潜伏期,来评价大鼠的空间记忆能力。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用单因素分析法(one-way ANOVA)进行检验分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组脑电图异常及发作次数比较 C、D 组的发作次数与 A、B 组比较无明显差异($P>0.05$),但脑电图异常情况明显改善(表 1,图 1)。

表 1 各组各时间段的发作次数和脑电图异常情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

指标		A 组	B 组	C 组	D 组
发作次数	0 h	51	49	50	50
	24 h	57	35	28	29
	48 h	53	25	24	25
	72 h	60	18	16	17
	96 h	58	7	8	9
脑电图异常(次)	0 h	10	10	10	10
	24 h	10	10	9	9
	48 h	10	8	7	6*
	72 h	10	6*	5*	4*
	96 h	10	5*	3*	2*

注:与 A 组比较,* $P<0.05$

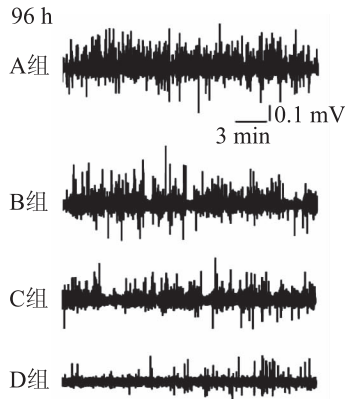


图 1 96 h 后 4 组脑电图表现

2.2 各组 S100β 蛋白和 NSE 水平比较 对 5 组在

惊厥发作后不同时间段 S100β 蛋白、NSE 水平和每小时发作次数进行检测,随着时间的持续发现两者水平都在上升,且模型组 S100β 和 NSE 水平较空白对照组高($P<0.05$);乌司他丁能够降低 S100β 和 NSE 水平,且乌司他丁剂量越大效果越显著($P<0.05$)(表 2)。

2.3 各组 TNF-α 与 IL-1β 水平比较 建模 96 h 后模型组 TNF-α 与 IL-1β 水平明显高于空白对照组,

模型组中 C、D 组明显低于 A、B 组($P<0.05$),其中 B 组低于 A 组,但无明显差异($P>0.05$),而 D 组明显低于 C 组($P<0.05$)(表 3)。

2.4 各组 caspase-3、bax、bcl-2 阳性细胞计数 模型组中 C、D 组的 caspase-3 和 bax 阳性细胞数明显低于 A、B 组,而 bcl-2 阳性细胞明显高于 A、B 组($P<0.05$),其中 A、B 组无明显差异($P>0.05$),但 C、D 组有明星差异($P<0.05$)(表 4)。

表 1 惊厥发作后不同时间段 S100β 蛋白、NSE 水平($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{ng/L}$)

指标		空白对照组	A 组	B 组	C 组	D 组
S100β	24 h	0.31 ± 0.025	0.93 ± 0.031*	0.87 ± 0.033*	0.75 ± 0.12*	0.61 ± 0.21*△
	48 h	0.32 ± 0.02	21.59 ± 0.027*	1.42 ± 0.022*	1.15 ± 0.21*	0.99 ± 0.17*△
	72 h	0.30 ± 0.023	1.99 ± 0.032*	1.82 ± 0.027*	1.67 ± 0.19*	1.15 ± 0.31*△
	96 h	0.31 ± 0.024	2.32 ± 0.029*	2.10 ± 0.037*	1.92 ± 0.29*	1.32 ± 0.20*△
NSE	24 h	152.7 ± 21.1	525.3 ± 35.1*	498.3 ± 29.5*	413.5 ± 31.3*	376.9 ± 28.8*△
	48 h	155.3 ± 22.3	737.5 ± 31.2*	698.3 ± 30.5*	599.2 ± 31.2*	503.8 ± 26.3*△
	72 h	153.4 ± 23.0	823.7 ± 33.5*	786.7 ± 31.3*	668.9 ± 30.4*	572.3 ± 25.9*△
	96 h	152.6 ± 22.0	993.8 ± 35.2*	813.5 ± 27.7*	701.6 ± 27.9*	592.1 ± 26.7*△

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与 C 组比较,△ $P<0.05$

表 3 建模 96 h 后各组 TNF-α 与 IL-1β 水平($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{ng/g}$)

指标	空白对照组	A 组	B 组	C 组	D 组
TNF-α	20.32 ± 3.1*	79.58 ± 3.3*	71.13 ± 2.5*	59.35 ± 2.9*△	37.69 ± 2.9*△▲
IL-1β	10.41 ± 2.5*	48.35 ± 2.4*	38.93 ± 1.7*	29.76 ± 2.0*△	18.79 ± 3.1*△▲

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与 A 组、B 组比较,△ $P<0.05$;与 C 组比较,▲ $P<0.05$

表 4 各组 caspase-3、bax 与 bcl-2 的阳性细胞数($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{个/每 400 倍视野}$)

指标	空白对照组	A 组	B 组	C 组	D 组
caspase-3	0.95 ± 0.09	65.32 ± 1.31	59.28 ± 1.52	48.91 ± 1.56△	31.21 ± 1.32△▲
bax	1.25 ± 1.03	49.27 ± 2.22	41.16 ± 1.98	31.19 ± 1.57△	20.48 ± 1.63△▲
bcl-2	5.95 ± 1.87	25.53 ± 2.17	27.59 ± 2.53	32.29 ± 1.62△	41.38 ± 2.03△▲

注:与 A 组、B 组比较,△ $P<0.05$;与 C 组比较,▲ $P<0.05$

2.5 各组 TUNEL 阳性细胞计数 模型组海马 CA3 区凋亡细胞数明显较高,模型组中 C、D 组明显低于 A、B 组($P<0.05$);C、D 组也有明显差异($P<0.05$),但 A、B 组无明显差异($P>0.05$)(表 5)。

表 5 各组海马 CA3 区神经元的凋亡情况
($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{个/每 400 倍视野}$)

组别	凋亡细胞数
空白对照组	1.02 ± 0.23
A 组	31.29 ± 0.31
B 组	28.17 ± 0.29
C 组	20.16 ± 0.25△
D 组	13.27 ± 0.18△▲

注:与 A 组、B 组比较,△ $P<0.05$;与 C 组比较,▲ $P<0.05$

2.6 水迷宫检测大鼠的学习和记忆能力 模型组大鼠认知功能明显降低,模型组中 C、D 组认知功能

于 A、B 组明显改善($P<0.05$);C、D 组之间无明显差异($P>0.05$),A、B 组之间也无明显差异($P>0.05$)(表 6)。

3 讨论

癫痫是中枢神经系统第二常见的疾病,全世界发病率为 5%~8%,其特征性表现之一是自发性痉挛发作,主要是因为神经元的兴奋性增加或脑电波同步性增强所致^[5]。本研究通过对模型组的发作次数和脑电图异常情况分析发现乌司他丁对癫痫大鼠的大脑具有一定的保护作用。

S100β 蛋白和 NSE 常用于检测是否存在脑损伤与脑功能失调。本研究发现惊厥发作后不同时间段 S100β 蛋白和 NSE 的水平迅速增加,通过不同药

表 6 各组大鼠认知功能的情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	逃避潜伏期时间(S)				穿越平台 次数
	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d	
空白对照组	47.2 ± 8.3	36.2 ± 6.2	24.4 ± 5.3	15.3 ± 3.3	8.2 ± 1.9
A 组	59.4 ± 10.3	51.3 ± 7.5	45.8 ± 6.3	40.2 ± 6.1	3.6 ± 0.7
B 组	56.2 ± 7.6	49.5 ± 7.3	42.4 ± 5.2	39.2 ± 4.3	4.7 ± 0.9
C 组	48.7 ± 7.4 [△]	40.7 ± 6.3 [△]	30.4 ± 4.3 [△]	20.4 ± 3.5 [△]	5.2 ± 2.1 [△]
D 组	47.9 ± 9.8 [△]	38.9 ± 6.9 [△]	27.9 ± 3.8 [△]	17.2 ± 3.7 [△]	7.4 ± 1.8 [△]

注:与 A 组、B 组比较, $\triangle P < 0.05$

物方案处理后对照发现,注射乌司他丁后 S100 β 蛋白和 NSE 的水平低于未使用乌司他丁,并且其差异性具有统计学意义。因此,对模型大鼠经止痉治疗同时给予乌司他丁处理,对癫痫模型大鼠的脑功能具有一定的保护作用。

本研究发现注射乌司他丁后 TNF- α 与 IL-1 β 表达减少,乌司他丁剂量越大其效果越明显。TNF- α 与 IL-1 β 是重要的炎症细胞因子,在癫痫发作时对大脑的损害具有重要的作用,炎症反应不仅仅在持续性癫痫状态中存在,在慢性癫痫患者中一样存在并一直潜伏着,直到自发性癫痫发作的时候起作用^[6-8]。越来越多的证据表明,长时间的炎症反应表现不仅仅是病理组织所附带存在的,相反它极大地降低了易受影响的大脑区域中惊厥发生的阈值,炎症细胞因子在产生惊厥及自发性复发中具有重要的作用^[9-12]。实验证明, TNF- α 水平升高会导致相应组织发生炎症反应,当注射乌司他丁后对脑具有保护作用^[13]。IL-1 主要在中枢神经系统中表达,即在所有脑区都有表达,在海马和皮层神经元的表达水平最高,并且对突触神经递质的释放具有重要的作用^[14]。Yang 等^[15]通过免疫荧光和免疫组化等方法对 IL-1 在难治性癫痫中的表达进行评估,发现 IL-1 主要在神经元表达,在癫痫模型中参与影响神经递质的释放。最近一项对脑缺血再灌注损伤的模型研究中发现,乌司他丁能够明显降低 TNF- α 与 IL-1 β 表达,能够降低大脑的炎症反应^[16]。

本研究发现注射乌司他丁后 caspase-3 与 bax 的阳性细胞数减少而 bcl-2 的阳性细胞数增加,乌司他丁的剂量越高阳性细胞的变化越明显。众所周知,惊厥和癫痫持续状态会激活内在和外在的凋亡通路,进而导致神经元凋亡, caspase-3 与 bax 的激活进一步导致神经元形成不可逆死亡。caspase-3 蛋白酶在细胞凋亡过程中直接导致细胞凋亡, Amorim 等^[8]发现海马在癫痫持续发作时活性较高,并通过对癫痫模型在持续发作时进行深部脑刺

激发现海马区 caspase-3 的活性明显减低,能够减轻大鼠大脑的伤害。据报道,乌司他丁也可抑制 caspase-3 蛋白与 bax 蛋白的表达,并对 bcl-2 蛋白的表达进行上调^[17]。

本研究通过对模型癫痫大鼠的海马 CA3 区进行切片发现,注射乌司他丁后神经元凋亡数低于未注射乌司他丁,并且乌司他丁的剂量越高其神经元凋亡率越低。据报道,通过建立癫痫大鼠模型发现,乌司他丁抑制 caspase-3 与 bax 的激活,从而减少脑细胞凋亡,对大脑产生保护作用,最终在整体水平上改善大鼠的认知功能^[18],本研究与此观点一致。

综上所述,乌司他丁对癫痫模型大鼠脑部具有明确的保护作用,其作用机制可能是通过对炎症因子的表达和 caspase-3、bax 的激活进行抑制及加速对 bcl-2 进行激活,并减少神经元细胞的凋亡来对癫痫大鼠的大脑进行保护。

参 考 文 献

[1] Sinha S, Siddiqui KA. Definition of intractable epilepsy[J]. Neurosciences (Riyadh), 2011, 16(1): 3-9.

[2] Kai K, Ruusuvaari E, Seja P, et al. GABA actions and Ionic plasticity in epilepsy[J]. Curr Opin Neurobiol, 2014, 26(5): 34-41.

[3] Maroso M, Balosso S, Ravizza T, et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures[J]. Nat Med, 2010, 16(4): 413-419.

[4] Cui T, Zhu G. Ulinastatin attenuates brain edema after traumatic brain injury in rats[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(2): 595-600.

[5] Syvertsen M, Nakken KO, Edland A, et al. Prevalence and etiology of epilepsy in a Norwegian countyA population based study[J]. Epilepsia, 2015, 56(5): 699-706.

[6] Duffy BA, Choy MK, Riegler J, et al. Imaging seizure-induced inflammation using an antibody targeted Iron oxide contrast agent[J]. Neuroimage, 2012, 60(2): 1149-1155.

[7] Fabien P, Christophe H, Barbier L, et al. Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy[J]. Epilepsia, 2011, 52(12): 2315-2325.

[8] Amorim BO, Covolan L, Ferreira E, et al. Deep brain stimula-

- tion induces antiapoptotic and anti-inflammatory effects in epileptic rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12(1): 1-5.
- [9] Lee TH, Lee JG, Yon JM, et al. Capsaicin prevents kainic acid-induced epileptogenesis in mice[J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(6): 634-640.
- [10] Vezzani A, Maroso M, Balosso S, et al. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures[J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(7): 1281-1289.
- [11] Gao F, Liu YF, Li XW, et al. Fingolimod (FTY720) inhibits neuroinflammation and attenuates spontaneous convulsions in lithium-pilocarpine induced status epilepticus in rat model[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 103(2): 187-196.
- [12] Wang N, Mi X, Gao B, et al. Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus[J]. *Neuroscience*, 2015, 287(2): 144-156.
- [13] 曹立军. 乌司他丁对心脑缺血再灌注损伤的保护作用及分子生物学机制[D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [14] Sakaba T, Kononenko NL, Bacetic J, et al. Fast neurotransmitter release regulated by the endocytic scaffold intersectin[J]. *J Neurochem*, 2013, 125(1, SI): 159.
- [15] Yang XY, Xu X, Zhang YJ, et al. Altered expression of intersectin1-L in patients with refractory epilepsy and in experimental epileptic rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(6): 871-880.
- [16] 罗江辉, 李文瑶, 陶国才. 乌司他丁对缺血再灌注大鼠脑保护及其机制研究[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2016, 35(2): 199-201.
- [17] Jiang LY, Yang LH, Zhong W, et al. Effect of ulinastatin on apoptosis in ileal mucosa of rats with hemorrhagic shock[J]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2006, 18(9): 542-545.
- [18] 吴倩佳. 乌司他丁对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的保护作用及机制[D]. 太原: 山西医科大学, 2011.

(2016-07-18 收稿)