

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.02.006

◇ 药学研究 ◇

血清铁和铁蛋白水平在海人酸诱导的大鼠癫痫模型中的意义

姚焕焕,路屹

作者单位:蚌埠医学院第一附属医院神经内科,安徽 蚌埠 233000

通信作者:路屹,女,主任医师,副教授,研究方向为脑血管病,E-mail:546881036@qq.com

基金项目:蚌埠医学院研究生创新计划项目(Byycx1518)

摘要:目的 探讨海人酸(KA)诱导的癫痫大鼠血液中铁和铁蛋白水平的变化。方法 30只SD大鼠通过随机数字表法分为模型组和对照组(每组各15只),模型组采用一次性腹腔注射KA的方式建立癫痫大鼠模型,对照组采用腹腔注射等量生理盐水,分别于给药前1周和给药后2个月取静脉血,应用原子吸收光谱仪来测定血清铁,采用放射性标记酶联免疫分析法测定血清铁蛋白,分别观察两组大鼠血清铁和血清铁蛋白的变化。结果 模型组血清铁、血清铁蛋白含量分别为 (3.502 ± 0.475) mg/L、 (29.229 ± 1.912) μ g/L,均明显高于对照组的 (2.408 ± 0.760) mg/L、 (23.449 ± 1.711) μ g/L($t = 1.328, 19.169, P = 0.0183, 0.0267$)。血清铁、血清铁蛋白与癫痫发作具有较强相关性,相关系数分别为0.633、0.732(P 值分别为0.0350、0.0139)。结论 KA诱导的大鼠癫痫模型血液中铁和铁蛋白水平升高,可能与海人酸诱导的癫痫发作有关。

关键词:癫痫; 海人酸; 脑电图; 血清铁; 血清铁蛋白

Significance of serum iron and ferritin levels in kainic acid-induced epilepsy in rats

YAO Huanhuan, LU Yi

Author Affiliation: Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233000, China

Abstract: **Objective** To explore the changes of serum iron and ferritin levels in kainic acid (KA)-induced epilepsy rats. **Methods** Thirty SD rats were randomized into model group ($n = 15$) and control group ($n = 15$) according to the random number table. Model group received an intraperitoneal injection of KA to establish the model of epilepsy, while control group was injected with normal saline. Venous blood was collected one week before the medicine was given and 2 months after. Serum iron was determined by atomic absorption spectrometer and serum ferritin was determined by radiolabeled enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in two groups of rats and the changes were observed respectively. **Results** The levels of serum iron and serum ferritin were (3.502 ± 0.475) mg/L and (29.229 ± 1.912) μ g/L, respectively, which were significantly higher than the control group [(2.408 ± 0.760) mg/L and (23.449 ± 1.711) μ g/L, respectively; $t = 1.328, 19.169; P = 0.0183, 0.0267$]. There was a close correlation between serum iron, serum ferritin and the onset of seizures, and the correlation coefficients were 0.633 and 0.732 (the P values were 0.0350, 0.0139). **Conclusions** The increase of serum iron and ferritin may be related to kainic acid induced epilepsy.

Key words: Epilepsy; Kainic acid; Electroencephalogram; Serum iron; Serum ferritin

癫痫是一种以自发性反复发作作为特征的复杂性多因素疾病^[1]。谷氨酸是人体中枢神经系统内最主要的兴奋性神经递质,通过与其特异性受体结合而介导神经元兴奋性传递,其含量的异常升高可诱发癫痫发作。很多癫痫病人脑内可见谷氨酸—谷氨酰胺循环异常^[2-3]。海人酸(KA)是脑内兴奋性氨基酸递质谷氨酸的结构类似物,目前已广泛用于癫痫发作的研究,许多学者将KA腹腔注射或立体定向脑室内注射应用^[4-5],诱导出的动物模型可出现类似于人类颞叶癫痫发作的临床表现,同时脑

内还可见海马硬化和形态改变,以及神经元丢失、胶质细胞活化等特征性病理的改变。铁是生命体不可缺少的微量元素,参与多种生物代谢过程,如氧运输、能量的生成、DNA及脂质的合成等。人体内铁含量过多或过少都会影响各器官的正常功能活动。在儿童脑组织发育过程中,铁缺乏严重将影响神经系统发育,引起儿童不可逆的行为和认知障碍^[6];而铁过量时,会导致神经元的降解死亡,诱发中枢神经系统紊乱性疾病,例如帕金森病、阿尔茨海默病等^[7]。目前有关癫痫的发病机制尚未明确,

观点不一,而对于铁在癫痫及其病理生理意义的作用也知之甚少,本实验选取 KA 诱导的与人类颞叶癫痫临床表现及病理相似的癫痫动物模型,应用原子吸收光谱仪测定血清铁,采用酶联免疫分析法(ELISA)测定血清铁蛋白含量,初步探究微量元素铁与 KA 诱导的癫痫之间的关系。

1 材料

1.1 实验动物 无特定病原体动物(SPF)级雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 270~370 g,2015 年 10 月购自蚌埠医学院实验动物中心,饲养于蚌埠医学院实验动物房,2016 年 10 月进行实验动物的处置并进行研究,均完全符合实验动物伦理学原则。

1.2 药品、试剂与仪器 KA(合肥志宏生物技术有限公司,批号:H37022764),水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司,批号:H13024604),地西洋(吉林济邦药业有限公司,批号:H14021957),大鼠血清铁及血清铁蛋白试剂盒(合肥志宏生物技术有限公司,批号:S20083085);Med4101 生物信号采集处理系统(成都仪器厂生产)。Labsystems Finnpipette 100 μ L 单道移液器;Thermo 50 μ L 8 道移液器;HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);华东电子 DG5033A 酶标仪(南京华东电子集团医疗装备有限责任公司)。

2 方法

2.1 模型制备 成年雄性 SD 大鼠 30 只,按照随机数字表法分成模型组和对照组,每组 15 只。模型组大鼠经腹腔一次性注射 KA 10 mg/kg,对照组腹腔注射 0.9% 生理盐水 35 mg/kg。注射后连续监测大鼠 4~5 h,观察是否有痫性发作并进行分级。给予持续癫痫性发作超过 1 h 的大鼠腹腔注射地西洋 4 mg/kg,并给予皮下注射 1 mL 生理盐水补液治疗。癫痫性发作行为观察,参照 Racine 标准,0 级:无惊厥发作;I 级:面肉痉挛(其中包括咀嚼动作、抖动胡须、眨眼),湿狗样抖动;II 级:颈肌痉挛(表现为有节律性的点头);III 级:单侧上肢阵挛;IV 级:双侧上肢阵挛,站立;V 级:跌倒,全身阵挛发作。其中 I~III 级属于部分性发作,IV~V 级属于全面性发作。

2.2 脑电图记录 每组按照随机数字表法选取 3 只大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(400 mg/kg)进行麻醉。参照文献[8]置电极,进行脑电图描记。采用 Medlab 生物信息采集系统描记两组大鼠脑电图,纸速 5 mm/s,时间常数 0.2,滤波 50 Hz,放大倍数 2 000,连续描记 5 min。动物喂养室温 22~25 $^{\circ}$ C 专门实验室喂养 2 个月,按时给食物和水,每 2 d 取不同时段连续监测 1 h,记录实验动物的行为学表现和

存活情况。

2.3 标本采集 分别于给药前 1 周和给药后 2 个月采用眼眶静脉丛采血法采集静脉血 1 mL,离心,取上层血清。-30 $^{\circ}$ C 低温冰箱保存。

2.4 血清铁测定 标本解冻,每组标本取 100 μ L,在空白管中加入 0.1 mL 双蒸水和 0.3 mL 铁显色剂;在标准管中加入 0.1 mL 的 2 mg/L 铁标准应用液和 0.3 mL 铁显色剂;在测定管中加入 0.1 mL 血清和 0.3 mL 铁显色剂,混匀。将测定管于沸水中煮 5~10 min,其余两组不煮,冷却离心,取 0.2 mL 上清液,分别置于 96 孔板中,按说明书测各孔吸光度光密度(OD)值,记录各组数值,按照以下计算公式计算血清铁含量:

$$\text{血清铁(mg/L)} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度(mg/L)}$$

2.5 测定血清铁蛋白 将标本解冻后,每组标本各取 40 μ L 待测。(1)试剂盒室温环境放置 45 min,轻轻摇匀。(2)稀释与加样:取 5 个分别标记为 N2、N3、N4、N5、N6 的离心管,然后用稀释液将标准品原液按照 1/32、1/16、1/8、1/4、1/2 倍数稀释成 5 种不同浓度的标准品应用液。(3)加样:先分成空白孔、标准孔、待测样品孔三组,其中空白孔不加样本、生物素标记的抗-FE 抗体及链霉亲和素-HRP;标准品孔中加入 50 μ L 不同浓度的标准品,链霉亲和素-HRP 50 μ L(标准品中已事先整合好生物素抗体,故不需要另加);待测样品孔中加入 40 μ L 的样本,然后各加入 10 μ L 的抗-FE 抗体,50 μ L 的链霉亲和素-HRP,按照要求加样混匀后,盖上封板膜后,于 37 $^{\circ}$ C 环境温育 1 h。(4)配液:以 1:20 的比例稀释浓缩洗涤液和新鲜医用双蒸水。(5)洗涤:弃去酶标板上层液体,甩干,将每孔加满洗涤液,静置 1 min 后弃去,重复洗涤 5~8 次,用吸水纸将酶标板轻轻拍干。(6)显色:每孔先后加入 50 μ L 显色剂 A 和 50 μ L 显色剂 B,混匀,37 $^{\circ}$ C 避光反应 15~20 min。(7)终止:分别于每孔加 50 μ L 终止剂,此时可见蓝色立即转黄,即终止反应。(8)测定 OD。(9)实验数据计算:根据铁蛋白试剂盒说明书计算样本含量。

2.6 统计学方法 应用 SPSS 18.0 统计学软件对所得实验数据进行分析,用 $\bar{x} \pm s$ 描述连续性资料,采用成组样本 t 检验进行正态分布资料的组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

模型组大鼠依次出现 I~V 级痫性发作,脑电图出现大量痫性波,对照组无痫性发作,脑电图描

记无异常。模型组血清铁、血清铁蛋白含量分别为 $(3.502 \pm 0.475) \text{ mg/L}$ 、 $(29.229 \pm 1.912) \mu\text{g/L}$,均明显高于对照组的 $(2.408 \pm 0.760) \text{ mg/L}$ 、 $(23.449 \pm 1.711) \mu\text{g/L}$,差异有统计学意义($t = 1.328$ 、 19.169 , $P = 0.0183$ 、 0.0267)。给药前对照组大鼠血清铁和血清铁蛋白含量分别为 $(2.474 \pm 0.412) \text{ mg/L}$ 、 $(23.107 \pm 6.684) \mu\text{g/L}$,与模型组的 $(2.457 \pm 0.535) \text{ mg/L}$ 、 $(24.258 \pm 9.304) \mu\text{g/L}$ 比较差异无统计学意义($t = 0.632$ 、 5.184 , $P = 0.7861$ 、 0.5910)。血清铁、血清铁蛋白与癫痫发作具有相关性,相关系数 $r = 0.633$ 、 0.732 ($P = 0.0350$ 、 0.0139)。

4 讨论

癫痫是一种由多病因引起的复杂的神经系统常见疾病,全世界约有7000万癫痫病人,癫痫的发病率、患病率和病死率随年龄、地点和时间的不同而变化,现有的诊断及治疗方法还不够完善,癫痫严重损害病人身体健康,降低生活质量,引起一系列的精神心理问题,给个人及社会带来沉重负担。癫痫病因复杂,发病机制尚未完全阐明,神经元的异常放电可能与离子通道异常,神经递质的合成,神经细胞异常凋亡以及突触联系、遗传及免疫等的异常有密切关系。临床通过磁共振磁敏感加权成像(SWI)测量癫痫病人脑铁含量时发现颞叶癫痫病人大脑皮质下结构铁水平降低^[9],如黑质、红核、基节区,皮质结构铁含量增加,脑铁在皮质及皮质下结构出现了再分配。此外,皮质和基底节铁水平受癫痫发作年龄、发作持续时间各种致病因素的影响。

癫痫动物模型的制备方法不一,主要包括电点燃和化学点燃,其中戊四氮、匹罗卡品、KA及青霉素为常用的四种化学点燃药物,脑内立体注射和腹腔注射是常见的化学诱导癫痫动物模型的用药方法。其中一次性腹腔注射KA诱导的癫痫动物模型,与人类颞叶癫痫的行为学表现和病理变化相似,制备方法简单,是目前较为常用的癫痫模型制备方法。李欣等^[10]发现KA诱导的癫痫大鼠海马区线粒体呼吸链复合物生理功能明显下降,而铁参与氧化呼吸链复合物的形成,铁的异常可能与KA诱导的大鼠癫痫发作有关。同时已有证据表明脑内铁的改变和癫痫之间有密切联系^[11-12],将铁或者氯化亚铁注射至实验动物大脑皮质或海马区,可导致实验动物脑电和行为性癫痫发作,由此建立癫痫动物模型,同时在治疗各种铁过载疾病过程中,具有螯合铁作用的姜黄素已被广泛应用于临床^[13],与此同时,在实验动物的研究中,姜黄素能有效抑制通过脑内铁注射所诱导的癫痫动物模型的癫痫发作和进展^[14]。

外伤性癫痫的发病机制与含铁物质沉积于脑组织引起的一系列病理变有紧密联系^[15]。铁主要以游离及结合铁的形式存在,铁蛋白是广泛存在于动物体内的贮铁蛋白,起贮存铁的作用,脑内铁主要以铁蛋白的形式存在,铁蛋白在一定程度上反映体内铁水平。一方面,铁代谢可以产生具有氧化毒性的自由基,而这些自由基可促进合成某些胍类复合物,这些胍类复合物通过对神经细胞的兴奋作用而导致癫痫发作。血脑屏障在维持脑内铁代谢平衡的过程中发挥重要^[16],Michalak等^[17]的实验可检测到KA诱导的大鼠癫痫发作后血脑屏障的通透性增加,铁参与多种生物膜的物质合成和分解,当铁过量沉积时,可破坏膜的物质合成,从而改变膜的稳定,对于血脑屏障的内皮细胞紧密连接的稳定产生威胁,破坏脑内物质平衡,从而诱发癫痫。

综上所述,血清中的铁含量可在一定程度上反映体内铁代谢水平,脑内铁主要以铁蛋白的形式存在,铁蛋白在一定程度上反映体内铁水平,该两种检测方法较为方便快捷,可为研究铁与癫痫的关系及发病机制提供新见解,或许可以成为一个潜在的监测癫痫的生物学标志物。本研究发现癫痫大鼠血中存在铁和铁蛋白含量的升高,推测癫痫大鼠存在铁和铁蛋白代谢的异常,血清铁和铁蛋白的增高与SD大鼠癫痫发作有关,而SD大鼠癫痫发作脑脊液及脑内铁含量的变化是否与血液铁含量的变化具有相关性有待于进一步探究^[17]。

参考文献

- [1] SINGH A, TREVICK S. The epidemiology of global epilepsy[J]. Neurol Clin, 2016, 34(4): 837-847.
- [2] EID T, GRUENBAUM SE, DHAHER R, et al. The glutamate-glutamine cycle in epilepsy[J]. Adv Neurobiol, 2016, 13: 351-400.
- [3] 云德波, 杨宇焦, 张逵, 等. 瘤周谷氨酸、天门冬氨酸水平与胶质瘤继发性癫痫的相关性[J]. 中国临床神经外科杂志, 2016, 21(6): 331-332, 335.
- [4] 王静, 王法祥, 杨云鹏, 等. Snail在海人酸诱导癫痫持续状态小鼠皮层中高表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(9): 1193-1196.
- [5] 王潇慧, 鄢泽然, 张青, 等. 柴贝止痛汤调节海人酸致痫大鼠脑组织耐药蛋白MRP2表达的研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(12): 4961-4965.
- [6] 高芳, 高向东, 李翔. 婴幼儿缺铁性贫血与其智能发育的关系分析[J]. 临床医药实践, 2016, 25(12): 909-911.
- [7] ACOSTA-CABRONERO J, CARDENAS-BLANCO A, BETTS MJ, et al. The whole-brain pattern of magnetic susceptibility perturbations in Parkinson's disease[J]. Brain, 2017, 140(1): 118-131.
- [8] 吴靖, 周宏斌, 潘松青. 莲心碱对氯化锂-匹鲁卡品致痫模型急性期皮层脑电图的影响[J]. 安徽医药, 2016, 20(3): 449-453.