短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)19-2140-03

重组腺相关病毒介导人源性神经肽Y基因转染对红藻氨酸致痫大鼠行为及脑电图的影响

董长征[1],赵文清[1,2],李文玲[2],王 坤[3],岳向勇[2],郭 韬[2],梁传栋[2],刘 畅[2] (050017 石家庄,河北医科大学神经外科教研室[1];050051 石家庄,河北省人民医院功能神经外科[2];061000 河北 沧州,沧州市人民医院神经外科[3])

【摘要】 目的 探讨重组腺相关病毒介导人源性神经肽Y基因(rAAV2/1-hNPY-EGFP)转染对红藻氨酸(kainic acid, KA)诱导大鼠癫痫发作行为和脑电图的影响。方法 66只雄性Wistar大鼠分为点燃组($n=54$)和对照组($n=12$)。点燃组以大鼠右侧海马CA3区注射0.4 μg/μl KA 1.5 μl 5次造成慢性癫痫大鼠模型后,又随机分为KA组、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)组和神经肽Y(neuropeptide, NPY)组($n=18$)。EGFP组脑室注射rAAV2/1-EGFP 10 μl,滴度为5×10^{11}/ml;NPY组注射rAAV2/1-hNPY-EGFP 10 μl,滴度为5×10^{11}/ml。分别于注射后2、3、4周,再次右侧海马CA3区注射1.5 μl KA诱导癫痫发作,观察各组大鼠的行为和脑电图改变。结果 对照组无癫痫发作;在发作级别、发作潜伏期、脑电痫波密度和脑电波幅方面,2、3周时NPY组与KA组、EGFP组相比无明显差异($P>0.05$);4周时NPY组与KA组、EGFP组相比有明显差异($P<0.05$),表现为发作级别降低,发作潜伏期延长,脑电痫波密度和脑电波幅均减少。结论 rAAV2/1-hNPY-EGFP基因转染可以抑制KA诱导的大鼠癫痫发作和海马神经元放电。

【关键词】 重组腺相关病毒;神经肽Y;癫痫;红藻氨酸;行为;脑电图

【中图法分类号】 R749.17;R394.2;R741.044 **【文献标志码】** A

癫痫是以在病程中有反复发作的神经元异常放电所致的暂时性中枢神经系统功能失常。神经肽Y(neuropeptide, NPY)主要分布于中枢神经系统的大脑皮层、海马、丘脑等处,其与癫痫的发生密切相关。红藻氨酸(kainic acid, KA)是一种对哺乳动物中枢神经系统具有强烈致痫作用的兴奋性毒素,是离子型谷氨酸受体的激动剂[1]。本实验利用多次KA海马内注射所致大鼠慢性癫痫模型,脑室注射介导人源性神经肽Y(hNPY)基因的腺相关病毒载体,用行为与脑电电生理研究相结合的方法,观察脑室注射介导人源性神经肽Y基因的腺相关病毒载体对癫痫发生的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级健康雄性Wistar大鼠66只,体质量250~270 g[由河北医科大学实验动物中心提供,许可证:SCXK(冀)2008-1-003,合格证编号:909106],于河北省人民医院临研中心动物室分笼喂养,20~26 ℃环境温度,自由进食水。随机分为点燃组($n=54$)和对照组($n=12$)。造模过程中出现死亡或不符合模型要求者,予以剔除。

1.2 主要实验试剂和设备

介导人源性神经肽Y治疗基因和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因的重组2/1型腺相关病毒(rAAV2/1-hNPY-EGFP)载体由北京本元正阳基因技术有限公司提供,有效滴度为5×10^{11}/ml;红藻氨酸(KA,美国Sigma公司,批号079k1737);立体定向仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);MS4000U-1生物信号定量记录分析系统(广州市龙飞达科技有限公司)。

1.3 慢性癫痫模型的建立

参考文献[2,3]的方法建立慢性癫痫模型。先用10%水合氯醛(35 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,然后将其固定于立体定向仪上,剪除术区毛发,酒精消毒处理后沿大鼠头顶部正中线切开头皮,切口长3 cm,用头皮拉钩将头皮对称地向两侧拉开并固定,根据George Paxinos大鼠脑立体定位图谱确定大鼠右侧海马CA3中心点的三维坐标:X=-5.3 mm, Y=4.0 mm, Z=-6.0 mm,将8号注射针头制成的注射引导管植入右侧海马并以牙托粉固定于颅骨上,以4号半注射针头做注射管,其下端突出引导管0.5 mm,上端经硅胶管与自动微量注射器连接。用自动推挽微量注射器于20 min内匀速向海马内注射0.4 μg/μl KA 1.5 μl,间隔2 d后再次注射1次,反复注射5次,对照组注射同等容量的生理盐水。依据Racine分级标准,连续出现3次Ⅳ级或以上的痫性发作被认为完全点燃。造模成功后,点燃组又随机分为KA组、EGFP组和NPY组。KA组不再作进一步处理,EGFP组和NPY组接着进行基因转染手术。

1.4 基因转染手术

再次将大鼠麻醉开颅,确定大鼠注射靶点的三维坐标,以侧脑室为注射靶点,其坐标:X=-1.0 mm, Y=1.5 mm, Z=-3.8 mm,EGFP组用微量注射器向靶点注射rAAV2/1-EGFP 10 μl,滴度为5×10^{11}/ml;NPY组注射rAAV2/1-hNPY-EGFP 10 μl,滴度为5×10^{11}/ml,注射时间20 min,注射速度0.5 μl/min,注射完毕后用少许无菌骨蜡封闭骨孔,缝合头皮。

1.5 行为学观察

大鼠惊厥发作严重程度采用修正Racine 6级评价标准进行观察和记录。各组分别于基因导入后2、3、4周,再次海马内注射1.5 μl KA 1次,诱导癫痫发作,观察并记录各组大鼠出现癫痫发作的强度和潜伏期。潜伏期为麻醉清醒到开始出现抽搐发作的时间。本实验将Ⅰ~Ⅲ级痫性发作归为轻型发作,Ⅳ

【通信作者】 赵文清,电话:(0311)85989666,E-mail:hbghwenqingzhao@126.com

~Ⅵ定为重型发作进行观察。

1.6 脑电图记录

实验动物造模成功后，分别于基因介导后 2、3、4 周，应用 MS4000U-1 生物信号定量记录分析仪观察大鼠脑电图的变化。每次记录 40 min，各组先记录 5 min，海马注射 KA 后再记录 35 min。分别记录癫痫波发放的波幅和痫波密度，癫痫波包括尖波、棘波、尖(棘)慢波综合波；痫波密度指每分钟内脑电图癫痫波的个数(个/min)。设定时间常数 0.1 s，高频滤波 50 Hz，平滑滤波 2 点，增益 1500 倍，纵向压缩 50%，采样速率 3 ms。

1.7 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS V8 统计软件，各均数间比较采用方差分析及 t 检验，率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 大鼠痫性发作时的行为学观察

对照组 12 只大鼠海马内注射生理盐水后未见发病；点燃组 43 只大鼠于注射 5 次后达到完全点燃标准，成功率 79.63%。未达到完全点燃的 11 只动物被剔除实验。对照组大鼠海马注射生理盐水后无痫性发作表现。KA 组、EGFP 组在 2~4 周多为重型发作；NPY 组在 2~3 周时多为重型发作，在 4 周时发作级别减低，多为轻型发作。基因介导后 2、3 周，NPY 组与 KA 组和 EGFP 组在潜伏期方面均无明显差异($P > 0.05$)。在 4 周时，NPY 组与其他 2 组比较有明显差异($P < 0.05$)，表现为潜伏期延长。KA 组和 EGFP 组的潜伏期比较无明显差异($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间段癫痫发作潜伏期的比较(min，$\bar{x} \pm s$)

组别	n	2 周	3 周	4 周
对照组	12	0	0	0
KA 组	14	32.86 ± 8.63	33.57 ± 10.20	35.17 ± 6.77
EGFP 组	15	35.61 ± 9.48	34.91 ± 6.37	36.05 ± 5.63
NPY 组	14	37.51 ± 6.62	54.84 ± 9.26	80.11 ± 8.26[a]

a：$P < 0.05$，与 KA 组及 EGFP 组比较

2.2 大鼠海马的电生理改变

各组大鼠脑电图示致痫前均为 α 波或 β 波，散在少量 θ 波，即基础波。对照组注入生理盐水后背景活动无明显改变，均为正常基础波。KA 组注入 KA 后，大鼠约 0 min 开始出现单个尖波、棘波、尖(棘)慢波综合波，而后逐渐转为频发的高波幅的尖波、棘波、尖(棘)慢波。EGFP 组也出现类似的波形。NPY 组在 2、3 周时，大鼠癫痫波的波幅和痫波密度与其他 2 组相比无明显差异，第 4 周时，与其他 2 组相比，大鼠出现癫痫波的波幅降低，痫波密度显著减少($P < 0.05$)(表 2)，脑电图显示背景节律以 α 波为主，间有慢波，偶见散在少量低幅棘波或尖波。

表 2 各组大鼠不同时间段脑电痫波密度和脑电波幅的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	2 周		3 周		4 周	
		痫波密度(/min)	波幅(mV)	痫波密度(/min)	波幅(mV)	痫波密度(/min)	波幅(mV)
对照组	12	0	20.12 ± 15.61	0	21.57 ± 18.95	0	19.55 ± 16.32
KA 组	14	126.78 ± 10.65	150.25 ± 86.56	124.55 ± 18.35	148.89 ± 90.28	121.36 ± 12.11	146.99 ± 98.14
EGFP 组	15	125.77 ± 11.89	153.35 ± 99.22	122.89 ± 15.64	150.01 ± 52.69	123.56 ± 19.67	147.32 ± 79.58
NPY 组	14	116.52 ± 19.45	138.56 ± 89.32	88.58 ± 10.89	100.62 ± 46.57	60.59 ± 14.06[a]	72.83 ± 42.95[a]

a：$P < 0.05$，与 KA 组及 EGFP 组比较

3 讨论

随着对癫痫发病机制研究的不断深入，药物难治性癫痫的基因治疗已成为神经科分子生物学研究新领域的焦点之一。重组腺相关病毒(rAVV)作为转基因载体具有低免疫原性，无神经毒性和长期、高效、稳定表达目的基因等优点，成为迄今为止最受关注且具广泛应用前景的病毒载体之一[4]。本实验将介导 NPY 基因的腺相关病毒载体，通过脑室注射的方法介导神经元，观察 NPY 基因对癫痫大鼠发作及脑电图的影响。结果显示，NPY 组在基因介导 2 周时，大鼠癫痫发作级别及发作潜伏期与 KA 组和 EGFP 组比较无显著性差异。随着时间延长，在 4 周时，NPY 组的点燃率为 35.71%(5/14)，显著低于 KA 组的 85.71%(12/14)和 EGFP 组的 80.00%(12/15)($P < 0.05$)。这表明 NPY 组大鼠的癫痫发作级别降低，发作潜伏期比其他 2 组时间也有所延长。从不同时间点大鼠癫痫发作脑电波幅及痫波密度方面比较，NPY 组在 4 周时，痫波的波幅和密度均低于其他 2 组。结果提示，大鼠脑电变化与癫痫大鼠惊厥行为变化相吻合，在癫痫形成中，NPY 能明显抑制 KA 诱导慢性致痫大鼠大脑海马神经元放电和癫痫发作。

NPY 作为神经递质或神经调节递质广泛分布于中枢和外周神经系统，主要分布于中枢神经系统的大脑皮层、海马、下丘脑及脑干等处，尤以海马内浓度最高。研究发现外源性 NPY 基因具有明显的抗癫痫作用。El-Bahh 等[5]利用电生理学方法发现外源性 NPY 能抑制大鼠海马脑片的同步化兴奋性放电，具有降低神经细胞兴奋性的作用。Richichi 等[6]研究发现携有 NPY 基因的 rAVV 对 KA 诱导的急性癫痫发作和致痫性有明显的抑制作用。Noe 等[7]研究发现 NPY 基因治疗后慢性癫痫模型大鼠的发作频率降低了 40%。本实验结果与上述研究报道基本一致，提示外源性 NPY 基因能够在抑制癫痫的过程中发挥重要作用。

NPY 基因能够减轻癫痫大鼠的发作级别和抑制海马神经元的痫样放电，分析其机制可能与以下两方面有关：一是 NPY 与突触前的 Y_1 受体结合，抑制 N-钙离子通道，降低细胞内钙离子的水平，从而维持了细胞内钙离子的自然态[8]。二是 NPY 与突触前的 Y_2 受体结合后，可抑制同一神经末梢谷氨酸的释放，发挥神经保护作用[9]。Nakamura 等[10]研究发现，NPY 基因表达可以抑制突触前谷氨酸的释放，并改变谷氨酸引起的突触相关事件，抑制癫痫发作。本实验进一步发现 NPY 抗癫痫机制还涉及对突触后膜 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体功能的抑制作用，其对神经元钠钙电

流等电生理方面的影响正在探讨之中。

总之，腺相关病毒载体介导神经肽Y为临床基因治疗难治性癫痫提供了一种新的思路和途径，其在安全性、有效性等方面有待进一步研究。

参考文献：

[1] Vorobyov V, Schibaev N, Kovalev G, *et al*. Effects of neurotransmitter agonists on electrocortical activity in the rat kainate model of temporal lobe epilepsy and the modulatory action of basic fibroblast growth factor [J]. Brain Res, 2005, 1051(1/2): 123-136.

[2] 李国强，刘仕勇，周政，等. 慢性颞叶癫痫模型鼠海马结构形态学的变化[J]. 第三军医大学学报，2007，29(2)：125-128.

[3] 马玉新，阴金波，范晓棠，等. 红藻氨酸快速点燃大鼠癫痫模型的建立及其海马神经发生[J]. 第三军医大学学报，2007，29(10)：872-875.

[4] 董晓宇，井申荣. 重组腺相关病毒载体在基因治疗中的应用[J]. 中国生物制品学杂志，2009，22(7)：734-736.

[5] El-Bahh B, Balosso S, Hamilton T, *et al*. The anti-Epileptic actions of europeptide Y in the hippocampus are mediated by Y and not Y receptors[J]. Eur J Neurosci, 2005, 22(6): 1417-1430.

[6] Richichi C, Lin E J, Stefanin D, *et al*. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects mediated by adeno-associated virus vector neuropeptide Y expression in the rat hippocampus[J]. J Neurosci, 2004, 24(12): 3051-3059.

[7] Noe F, Pool A H, Nissinen J, *et al*. Neuropeptide Y gene therapy decreases chronic spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy[J]. Brain, 2008, 131(Pt 6): 1506-1515.

[8] Wang S J. Activation of neuropeptide Y Y1 receptors inhibits glutamate release through reduction of voltage-dependent Ca^{2+} entry in the rat cerebral cortex nerve terminals: suppression of this inhibitory effect by the protein kinase C-dependent facilitatory pathway[J]. Neuroscience, 2005, 134(3): 987-1000.

[9] Smialowska M, Domin H, Zieba B, *et al*. Neuroprotective effects of neuropeptide Y-Y2 and Y5 receptor agonists *in vitro* and *in vivo*[J]. Neuropeptides, 2009, 43(3): 235-249.

[10] Nakamura N H, Akama K T, Yuen G S, *et al*. Thinking outside the pyramidal cell: unexplored contributions of interneurons and neuropeptide Y to estrogen-induced synapse formation in the hippocampus [J]. Rev Neurosci, 2007, 18(1): 1-13.

（收稿：2010-05-18 修回：2010-06-27）

（编辑　汪勤俭）

短篇论著

文章编号：1000-5404(2010)19-2142-03

关节镜下射频治疗注射性臀肌挛缩症的临床观察

丁雪勇[1]，王　敏[2]，陈波涛[3]，丁煜恒[4]　（400062 重庆，重庆市第五人民医院骨科[1]；400037 重庆，第三军医大学新桥医院骨科[2]；400080 重庆，重庆市九龙坡区第三人民医院骨科[3]；400016 重庆，重庆医科大学附属第二医院骨科[4]）

【摘要】 目的　观察关节镜下射频治疗注射性臀肌挛缩症的适应证、方法及临床疗效。方法　2005年3月至2009年1月收治的37例注射性臀肌挛缩症患者，均行关节镜下射频治疗。术后患者以步态、并膝下蹲、交腿试验、对运动的影响作为评价标准。结果　37例患者术后伤口均Ⅰ期愈合，平均住院时间6 d。经门诊、电话随访，5例患者失访，32例平均随访30(14~56)个月。32例随访患者优良率93.8%，无血管神经损伤等严重并发症。结论　关节镜下射频治疗注射性臀肌挛缩症具有手术创伤较小、疗效肯定、恢复快、功能障碍改善明显等优点。

【关键词】 挛缩；臀；肌疾病；注射，肌肉内；关节镜检查；导管消融术

【中图法分类号】 R685.05；R454.1　　**【文献标志码】** A

注射性臀肌挛缩症又称臀肌挛缩症、臀肌纤维化、臀肌纤维化继发髋关节挛缩。大多发病于儿童期，多有反复臀部肌肉注射药物病史。由臀部肌肉及其筋膜的纤维变性挛缩，继发髋关节外展、内收、内旋、屈曲等功能障碍，表现为步态异常，跳步征，坐位时双膝分开不能靠近，不能跷二郎腿等。国内外已有大量文献报道，认为手术治疗是目前唯一有效的方法[1-3]。传统手术治疗臀肌挛缩症预后较好，但存在手术切口长、创伤大、出血多、恢复较慢等缺点。近年有临床报道关节镜下治疗臀肌挛缩创伤小、恢复快、并发症少[4-6]。我科近5年对关节镜下臀肌挛缩松解治疗进行了探索，现报告如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料

2005年3月至2009年1月收治37例臀肌挛缩症患者，男性17例，女性20例，年龄3~31岁，13岁以下儿童20例。符合卢浩浩等[7]臀肌挛缩症诊断标准。轻型22例，中型7例，重型8例。其中双侧发病病例28例。均有臀部反复肌肉注射病史；均有步态异常，出现跳步征，其中8例有尖臀征，坐位双膝分开，不能靠拢不能跷二郎腿，蹲位时一部分患者表现为划圈

【通信作者】 丁雪勇，E-mail：dingxueyong@yahoo.com.cn