论著

文章编号:1000-5404(2012)12-1202-04

# 表皮生长因子对铁离子致痫大鼠脑的保护作用

陈敏若,石全红,谢延风,詹 彦,崔荣周,但 炜,方 升,蒋国辉 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

[摘要] **目的** 探讨表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)在铁离子致痫大鼠模型中的脑保护作用。**方法** 成年大鼠64只,分为正常组、假手术组、模型组、治疗组,每组16只。模型组和治疗组建立大鼠大脑皮质铁离子注射致痫模型,假手术组皮质予以生理盐水注射,正常组不作处理。应用Western blot和RT-PCR方法检测各组大鼠谷氨酸转运蛋白-1(glutamate transporter,GLT-1)及其mRNA的表达情况,皮层脑电监测记录造模后大鼠脑电图特征,并通过Racine评分评价每组大鼠造模后第2周的行为学变化。**结果** 在成功造模后第8天,模型组大鼠皮层GLT-1蛋白(0.495±0.077)及mRNA含量(0.644±0.067)较正常组降低($P<0.05$),而EGF治疗组可明显上调铁离子致痫大鼠脑皮层GLT-1蛋白(1.088±0.068)及mRNA(0.965±0.039)表达($P<0.05$);正常组、假手术组无痫性放电及癫痫发作,模型组及治疗组均出现痫样脑电及癫痫发作,但治疗组较模型组癫痫发作频次减少、程度减弱($P<0.05$)。**结论** EGF在大鼠铁离子致痫模型中可上调GLT-1蛋白及mRNA表达,降低大鼠癫痫发作频次及程度,对铁离子致痫大鼠具有一定脑保护作用。

[关键词] 表皮生长因子;谷氨酸转运蛋白-1;外伤后癫痫;铁离子

[中图法分类号] R651.15;R749.17;R977 [文献标志码] A

# Brain protective effect of EGF on iron-induced epilepsy rats

Chen Minruo, Shi Quanhong, Xie Yanfeng, Zhan Yan, Cui Rongzhou, Dan Wei, Fang Sheng, Jiang Guohui (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the brain protective effect of epidermal growth factor (EGF) on iron-induced epilepsy rats, and to further provide a new therapy for the prevention and treatment of post-traumatic epilepsy (PTE). **Methods** Sixty-four adult rats were randomly divided into four groups including a normal control group ($n=16$), a sham group ($n=16$), a model group ($n=16$) and an EGF treatment group ($n=16$). The rat models of epilepsy were established by iron injection in rat cortices in the latter two groups. Racine scale was used to evaluate the behavioral changes. Cortical electroencephalogram (EEG) monitoring was applied to record the EEG features. Western blotting and RT-PCR were applied to measure the protein and mRNA expressions of glutamate transporter 1 (GLT-1) at two weeks after modeling. **Results** Compared with those of the normal control group, the protein and mRNA expression of GLT-1 in the cerebral cortices of the model group (0.495±0.077 and 0.644±0.067) decreased significantly ($P<0.05$), while those of the EGF treatment group (1.088±0.068 and 0.965±0.039) increased significantly ($P<0.05$) at 8 d after modeling. The epileptic discharge and epileptic seizure were observed in the model group and the EGF treatment group but not in the normal control group or the sham group. The frequency and degree of epileptic seizure in the EGF treatment group were lower than those in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** EGF has a certain protective effect on the brain of iron-induced epilepsy rats through increasing mRNA and protein expression of GLT-1 in cerebral cortex and reducing the frequency and degree of epileptic seizure.

[**Key words**] EGF;GLT-1;post- traumatic epilepsy;iron ion

Supported by the Natural Science foundation of Chongqing (CSTC2011jjA0596). Corresponding author: Shi Quanhong, Tel: 86-23-89011147, E-mail:shqh69@yahoo.com.cn

癫痫是颅脑外伤严重的并发症,它在原发损伤的基础上进一步加重脑组织的病理损伤,引起神经生化改变,恶化病情,增大死亡风险,因此如何早期防治颅脑外伤后癫痫发生成为近年神经外科研究的热点。目前,对于外伤后癫痫(post-traumatic epilepsy,PTE)发病机制的研究中普遍认为外伤后出血,血色素分解产生

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2011jjA0596)

[通信作者] 石全红,电话:(023)89011147,E-mail:shqh69@yahoo.com.cn

的铁离子对细胞的过氧化损伤是PTE的启动因素,并由此继发兴奋性氨基酸增多,导致兴奋性细胞毒性等一系列病理变化,共同促使癫痫的发生及发展[1]。基于此理论,成功建立起大脑皮层注射铁离子致痫模型作为动物外伤后癫痫模型[2],且目前已被证实为一种可靠的模拟人类外伤后癫痫的动物模型[3]。目前在防治PTE的研究中,如何降低外伤后兴奋性氨基酸神经毒性逐渐成为热点,而表达于星形胶质细胞的谷氨酸转运蛋白-1(glutamate transporter, GLT-1),作为最主要的谷氨酸转运体,负责90%的谷氨酸转运,清除突触间隙蓄积的谷氨酸,有效降低过量谷氨酸导致的兴奋性神经毒性,对受损脑组织具有重要的保护作用[4]。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)已被证实在胶质细胞培养中可促进GLT-1蛋白及mRNA表达[5-6],但在体实验少见报道。本实验拟求利用EGF对GLT-1的促表达特性,通过对大鼠铁离子致痫模型侧脑室注射EGF,对比各组间GLT-1蛋白和mRNA表达变化及行为学、脑电图的差异,探讨EGF在铁离子致痫模型中能否上调GLT-1的表达,并由此在一定程度上对抗癫痫发生,对脑损伤起到保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

rhEGF(美国PeproTech公司),100 mmol/L $FeCl_3$溶液(美国Sigma公司),兔抗大鼠GLT-1单克隆抗体(北京博奥森公司),抗β-actin单克隆抗体(美国Santa Cruz公司),引物合成(宝生物工程公司)、硝酸纤维素膜(上海普易生物技术有限公司),Trizol、逆转录和扩增试剂盒。

### 1.2 动物分组

清洁级健康雄性SD大鼠64只,体质量为250~300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。用抽签法随机分为正常组、假手术组、模型组、治疗组,每组16只,治疗组和模型组均行铁离子皮层注射造癫痫模型,正常组不做任何处理,假手术组予以皮层经盐酸调定pH至1.5的生理盐水注射。治疗组在造模成功3 h后进行EGF侧脑室注射,此后每天注射1次,持续7 d;模型组除侧脑室注射液不含EGF外,余同EGF治疗组。建模成功后第8天,从各组选取8只大鼠断头取脑组织,用作RT-PCR及Western blot检测,对各组剩余8只大鼠进行为期1周(8~14 d)的行为学及脑电监测。

### 1.3 模型准备

大鼠经3.5%水合氯醛溶液(1 ml/100 g)腹腔麻醉后固定于立体定位仪上,沿中线剪开头皮约3 cm,双氧水清理皮下组织,充分暴露颅骨。依据Paxions和Waston编写的大鼠脑定位图谱[7],在感觉运动皮质区(前囟后2.5 mm、矢状缝左旁2 mm)钻一孔用以铁离子皮层注射;在前囟后0.8 mm,矢状缝左旁1.2 mm处钻孔,并安装微量注射泵,进针深度为颅骨表面一下3.8 mm,用以EGF注射入脑室;最后按照D'Ambrosio所采用的方法[8],以前囟为原点,矢状缝为y轴,过原点作垂直于y轴的直线x轴,坐标轴单位为mm,以坐标(4,0)、(4,-6)、(-4,0)、(-4,-6)分别钻4个孔,并将前端钝圆的螺丝置于上述钻好的电极孔内,深度紧贴硬脑膜并固定好,用作后期脑电监测。所有大鼠经处理后单笼饲养1周,准备癫痫模型制备。

### 1.4 大鼠铁离子皮层注射模型及成功判定

用微量注射器予模型组和EGF治疗组每只大鼠大脑皮层注射pH为1.5的$FeCl_3$溶液(Sigma,USA,100 mmol/L)5 μl,进针深度为硬膜下2.5 mm,缓慢匀速注射5 min,注射完成后留针5 min以防外溢。假手术组注射pH为1.5的生理盐水5 μl,空白组不做任何处理,1 h后开始观察行为学特征,持续观察6 h,参照改良Racine法(无任何癫痫发作行为记0分;凝视发作记1分;规律性点头或湿狗样抖动,伴或不伴面部抽动记2分;单侧前肢抖动记3分;站立、双前肢抖动及持续性点头记4分;双侧肢体颤动加重,失去平衡跌倒而全身性强直阵挛性发作记5分;发作衰竭导致死亡记6分)对大鼠癫痫发作进行评分,癫痫发作判定:将3分及以上的行为学改变定义为癫痫发作,视为模型成功,对造模不成功或死亡的动物剔出实验,并通过随机抽样原则补齐动物并重新造模[9]。

### 1.5 EGF侧脑室注射

癫痫模型制作成功3 h后,用微量注射泵予以治疗组注射0.04 μg/μl EGF溶液10 μl(内含0.1 mg/ml大鼠血清白蛋白,美国Sigma公司,和0.01 mol/L PBS,pH=7.4),30 min时缓慢匀速注射入侧脑室,注射完后留针10 min,以防液体外溢,每天注射1次,持续7 d。此注射量及方法被证实具有促细胞增殖及脑保护作用[10-11]。

### 1.6 标本采集、RT-PCR及Western blot检测

分别在对应时间点采集各组大鼠脑组织,依照文献[12],取大鼠大脑皮层铁离子注射部位(3 mm×3 mm)作标本,以4 ℃ PBS缓冲液100 ml冲洗3次,再将标本装入2 ml冻存管中,按分组编号后置入-80 ℃冰箱内保存,用于RT-PCR、Western blot检测。

RT-PCR:大鼠GLT-1上游引物5′-CGTGACCAAACGACATCGAG-3′,下游引物5′-GGCACAGTCAGTCTGCTCTCTTC-3′,产物长度299 bp;GAPDH上游引物5′-CGTTGACATCCGTAAAGACCTC-3′,下游引物5′-TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3′,产物长度110 bp。把保存于-80 ℃冰箱中的标本组织取出,依次进行提取总RNA,合成第1、2链,电泳分析等处理。用凝胶图像分析系统检测灰度值,以GLT-1/GAPDH比值表示GLT-1 mRNA相对水平。

Western blot:依次进行蛋白质提取、定量(Bradford法)、SDS-PAGE电泳、考马斯亮蓝染色、转移及免疫显色。最后,使用图像分析软件分别测定各标本中GLT-1条带的灰度值及β-actin条带灰度值,以GLT-1/β-actin比值表示GLT-1蛋白相对表达量。

### 1.7 脑电记录

建模后第8天,监测各组大鼠脑电(脑电图采集参数:高频滤波35 Hz,扫描速度30 mm/s,灵敏度0.8 μV,波幅5 mm/50 μV,时间常数0.3 s),尖波或棘波波幅超过背景波2倍及以上并持续超过5 s被认为脑电图痫样波发作,每只大鼠持续监测1 h,记录并计算各组1 h内痫样放电波幅。

### 1.8 统计学分析

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 17.0 统计软件，组间差异用单因素方差分析，其中两两比较用 LSD 检验。非正态分布数据以中位数（范围）表示，采用 Mann Whitney 检验作统计分析。

## 2 结果

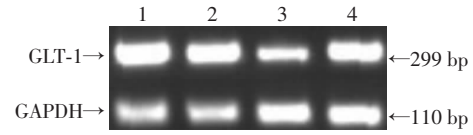
### 2.1 脑组织中 GLT-1 RT-PCR 及 Western blot 的检测结果

正常组及假手术组皮层 GLT-1 mRNA 及蛋白表达一致，无统计学差异（$P>0.05$）。模型组与治疗组较正常组均有明显下降（$P<0.05$），而治疗组较模型组有明显回升（$P<0.05$，表 1，图 1、2）

**表 1 RT-PCR 及 Western blot 检测 GLT-1 mRNA 及蛋白相对表达**（$n=8, \bar{x} \pm s$）

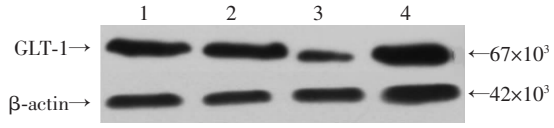
| 组别 | GLT-1/GAPDH | GLT-1/β-actin |
|---|---|---|
| 正常组 | 1.284 ±0.061 | 1.891 ±0.053 |
| 假手术组 | 1.252 ±0.059 | 1.858 ±0.039 |
| 模型组 | 0.644 ±0.067[b] | 0.495 ±0.077[b] |
| 治疗组 | 0.965 ±0.039[ab] | 1.088 ±0.068[ab] |

a：$P<0.05$，与模型组比较；b：$P<0.05$，与正常组比较




1：正常组；2：假手术组；3：模型组；4：治疗组

**图 1 RT-PCR 检测大鼠脑皮层注射区域 GLT-1 mRNA 的表达**




1：正常组；2：假手术组；3：模型组；4：治疗组

**图 2 Western blot 检测大鼠脑皮层注射区域 GLT-1 蛋白的表达**

### 2.2 脑电及行为学监测

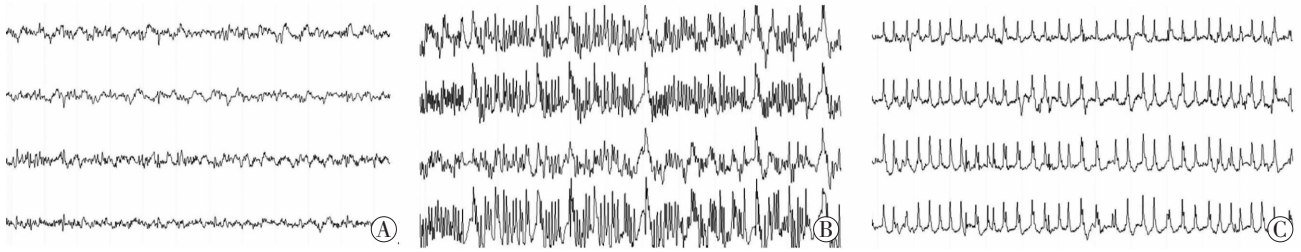
2.2.1 脑电监测结果 正常组（68.98 ±29.57）μV 与假手术组（72.32 ±28.32）μV 脑电表现无差异（$P>0.05$），全脑及单导联均无痫样放电；模型组与治疗组与正常组比较均有统计学差异（$P<0.05$）；模型组痫样放电可见典型的全脑同步爆发的极高波幅，呈快频率的全脑痫样放电，而治疗组痫样放电表现为全脑同步爆发的中等波幅（162.43 ±53.25）μV 较模型组波幅（237.67 ±49.71）μV 明显减弱（$P<0.05$）。见图 3。

2.2.2 行为学检测 各组造模后，正常组及假手术组未见癫痫发作。模型组及治疗组大鼠成功造模后 1 h 麻醉逐渐清醒时，出现程度不一的癫痫发作，如凝视、规律性点头或湿狗样抖动，伴或不伴面部抽动，单侧前肢抖动，站立、双前肢抖动及持续性点头，双侧肢体颤动加重，失去平衡跌倒而全身性强直阵挛性发作，模型成功率约为 83.7%。此后 6 h，各组仍见癫痫频繁发作，约 30 min 发作 1 次，每次持续 1 ~ 3 min。6 ~ 12 h见各组癫痫发作频次降低，1 ~ 3 h 发作 1 次。此后 1 周，模型组与治疗组大鼠每日发作次数逐渐减少，在第 2 周此两组大鼠出现规律发作。记录各组大鼠在第 2 周发作频次数并作统计分析。发现在造模后第 2 周 7 d 当中：正常组与假手术组均无癫痫发作；治疗组每只大鼠发作次数（2.78 ±0.71）次/7 d 较模型组（8.21 ±0.89）次/7 d 明显减少（$P<0.05$）。

## 3 讨论

本实验予以大鼠运动感觉皮层注射 $FeCl_3$，并在术后 1 h 观察其行为学变化，发现成功致痫大鼠有明显行为学发作（Racine≥3 分），模型成功率约 83.7%，发作时大鼠脑电图显示全脑异常放电，与人类 PTE 发作相似，证实其为一种理想、稳定的 PTE 动物模型。

GLT-1 作为一种高亲和力兴奋性氨基酸转运体，主要分布于脑和脊髓的星形胶质细胞膜上，在脑组织中负责 90% 的谷氨酸转运，并通过该作用清除突触间隙蓄积的兴奋性氨基酸，防止其过量引起的神经毒性[5,13]。Tanka 等[14]发现，GLT-1 基因缺陷大鼠更易死于癫痫持续发作，且在颅脑外伤后遭受更为严重的兴奋性毒性损害，Samuelsson 等[12]在大鼠大脑皮层铁离子致痫模型中观察到 GLT-1 在致伤处周围脑皮层表达明显减少，认为颅脑外伤后兴奋性氨基酸的增多和谷氨酸转运体表达下调可能共同作为铁离子注射导致大鼠癫痫发作的重要原因，同时，进一步推测 GLT-1 蛋白表达下调可能与铁离子引起 GLT-1 相关基因改变和直接脑细胞损伤有关。综上可见，铁离子致伤后 GLT-1 表达的下调可能促进癫痫的发生、发展。本实验发现，铁离子致痫大鼠注射部位脑皮质 GLT-1 较正常组明显下调，其 mRNA 表达也与蛋白质一致，呈现明显




A：正常组；B：模型组；C：治疗组

**图 3 建模 1 周后记录的正常组、模型组、治疗组大鼠脑电活动**

下调趋势,验证了文献[12]中关于铁离子致痫后 GLT-1 mRNA 表达发生改变的猜想。因此,我们推测,通过促进 GLT-1 的表达,可能会在一定程度达到对抗大鼠铁子注射后癫痫的发生、发展。

EGF 作为一种强力的细胞有丝分裂原,广泛分布于包括脑组织在内的各种组织和体液中,表达于细胞的细胞质[15]。利用其生物学特性,研究者不仅将其应用于神经细胞的体外培养实验,更对其在颅脑损伤中的治疗作用展开一系列研究。Sun 等[11]在大鼠大脑液压冲击模型中发现,EGF 侧脑室注射可对受损神经元起保护和营养作用,促进颅脑损伤后脑组织及认知功能的恢复,并推测可能与其降低兴奋性氨基酸损害、抗氧化、促增殖有关;同时,在大鼠脑组织缺血缺氧模型中也发现,EGF 可明显促进大鼠脑皮层梗死后早期神经细胞的增殖,加快神经功能的恢复[16],但 EGF 在颅脑损伤后保护作用的具体机制仍未有完整明了的阐述。体外细胞培养实验结果显示,星形胶质细胞培养液经 EGF 处理后,可观测到 GLT-1 蛋白及 mRNA 表达自第 3 天开始同时增加,7 d 增加达最大速率,同时 GLT-1 生物学活性也显著提高[5-6],并通过深入研究发现 EGF 促进 GLT-1 表达的机制可能为:EGF 与表皮生长因子受体(EGFR)结合后诱导受体磷酸化,活化酪氨酸蛋白激酶,使磷脂酰肌醇 3-激酶信号通路(PI3K)激活,作用于下游靶蛋白 NF-κB,从基因和蛋白质两个层面上调 GLT-1 的表达[6]。在本实验中,我们发现 EGF 治疗组 GLT-1 蛋白及 mRNA 表达虽然较正常组和假手术组低,但跟模型组比,有显著回升,提示通过侧脑室注射 EGF,可显著提高铁离子致痫大鼠脑皮质 GLT-1 蛋白及 mRNA 表达,此结果与文献报道的细胞培养结果相符。

在各组大鼠成功致痫后第 2 周,通过对其行为学及脑电图的观测,我们发现,治疗组癫痫发作次数较模型组明显下降,且脑电图痫样放电波幅明显减弱。因此,从脑电图和行为学的观察结果提示通过 EGF 促进 GLT-1 表达可减少癫痫发作频次及减弱癫痫发作严重程度,在一定程度上对铁离子致痫大鼠的脑组织起到保护作用。

综上所述,大鼠铁离子致痫后,致伤区域 GLT-1 蛋白及 mRNA 的表达均显著下降,而 EGF 可明显上调铁离子致痫大鼠大脑皮层 GLT-1 mRNA 及蛋白表达,一定程度上抑制癫痫发作的频次,减弱痫样放电程度,提示其在铁离子致痫大鼠中可能通过上调 GLT-1 的表达,对受损脑组织起保护作用,对抗癫痫发生、发展,但其作用效果是否具有时效和量效关系,以及其疗效的具体产生机制,仍有待进一步研究。

## 参考文献:

[1] Willmore L J, Ueda Y. Posttraumatic epilepsy: hemorrhage, free radicals and the molecular regulation of glutamate[J]. Neurochem Res, 2009, 34(4): 688-697.

[2] Willmore L J, Sypert G W, Munson J B. Recurrent seizures induced by cortical iron injection: a model of posttraumatic epilepsy[J]. Ann Neurol, 1978, 4(4): 329-336.

[3] Pitkanen A, McIntosh T K. Animal models of post-traumatic epilepsy[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(2): 241-261.

[4] Belanger M, Magistretti P J. The role of astroglia in neuroprotection[J]. Dialogues Clin Neurosci, 2009, 11(3): 281-295.

[5] Figiel M, Maucher T, Rozyczka J, *et al*. Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors[J]. Exp Neurol, 2003, 183(1): 124-135.

[6] Zelenaia O, Schlag B D, Gochenauer G E, *et al*. Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB[J]. Mol Pharmacol, 2000, 57(4): 667-678.

[7] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. 6th. Amsterdam: Academic Press, 2007: 29-31.

[8] D'Ambrosio R, Fairbanks J P, Fender J S, *et al*. Post-traumatic epilepsy following fluid percussion injury in the rat[J]. Brain, 2004, 127(Pt 2): 304-314.

[9] 蒋国辉, 方升, 石全红, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶对皮层注射 $FeCl_3$ 所致早期癫痫的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(24): 2579-2582.

[10] Craig C G, Tropepe V, Morshead C M, *et al*. *In vivo* growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain[J]. J Neurosci, 1996, 16(8): 2649-2658.

[11] Sun D, Bullock M R, Altememi N, *et al*. The effect of epidermal growth factor in the injured brain after trauma in rats[J]. J Neurotrauma, 2010, 27(5): 923-938.

[12] Samuelsson C, Kumlien E, Flink R, *et al*. Decreased cortical levels of astrocytic glutamate transport protein GLT-1 in a rat model of posttraumatic epilepsy[J]. Neurosci Lett, 2000, 289(3): 185-188.

[13] Moreira J D, de-Siqueira L V, Lague V M, *et al*. Short-term alterations in hippocampal glutamate transport system caused by one-single neonatal seizure episode: implications on behavioral performance in adulthood[J]. Neurochem Int, 2011, 59(2): 217-223.

[14] Tanaka K, Watase K, Manabe T, *et al*. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1[J]. Science, 1997, 276(5319): 1699-1702.

[15] 卢永超, 齐建国, 王廷华, 等. 表皮生长因子在成年恒河猴中枢神经系统的分布[J]. 四川大学学报: 医学版, 2005, 36(5): 618-621.

[16] Alagappan D, Lazzarino D A, Felling R J, *et al*. Brain injury expands the numbers of neural stem cells and progenitors in the SVZ by enhancing their responsiveness to EGF[J]. ASN Neuro, 2009, 1(2): 95-111.

(**收稿**:2012-02-10;**修回**:2012-03-10)

(编辑 王小宴)