

耐药性癫痫患者脑脊液 HSPBAP1 和 EML5 表达变化的临床研究

陈云 席志芹 郭珍立 尹虹祥 付斌 周瑞 但毕堂

【摘要】 目的 观察热休克蛋白 27 相关蛋白 1(HSPBAP1)和棘皮动物微管结合蛋白类似蛋白 5 (EML5)在耐药性癫痫患者脑脊液中的表达变化,探讨其用于耐药性癫痫早期诊断的临床价值。**方法** 根据纳入标准共选择 39 例耐药性癫痫患者和性别、年龄与之相匹配的健康志愿者 40 例入组,经腰椎穿刺术采集脑脊液标本,双抗体夹心酶联免疫吸附法检测 HSPBAP1 和 EML5。**结果** 耐药性癫痫组患者脑脊液 HSPBAP1 和 EML5 表达水平分别为(0.17 ± 0.03)和(0.13 ± 0.02),正常对照组为(0.10 ± 0.03)和(0.08 ± 0.02),低于耐药性癫痫组且差异具有统计学意义($t = 3.239, 3.294$; 均 $P = 0.002$)。**结论** 耐药性癫痫患者脑脊液 HSPBAP1 和 EML5 表达水平明显升高,可为耐药性癫痫的诊断提供新的途径,有助于耐药性癫痫的早期诊断。

【关键词】 药物耐受性; 癫痫; 热休克蛋白质类; 微管相关蛋白质类; 脑脊液

DOI: 10.3969/j.issn.1672-6731.2012.05.014

Study on expressions of heat shock 27-associated protein 1 and echinoderm microtubule-associated protein-like 5 in drug-resistant epilepsy

CHEN Yun¹, XI Zhi-qin², GUO Zhen-li¹, YIN Hong-xiang¹, FU Bin¹, ZHOU Rui¹, DAN Bi-tang¹

¹Department of Neurology, Hubei Xinhua Hospital, Wuhan 430015, Hubei, China

²Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Corresponding author: GUO Zhen-li (Email: guozhengli18@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To observe the expressions of heat shock 27-associated protein 1 (HSPBAP1) and echinoderm microtubule-associated protein-like 5 (EML5) in cerebrospinal fluid of drug-resistant epilepsy, and to explore the value in early diagnosis of epilepsy. **Methods** According to the inclusion and exclusion criteria, 79 patients admitted in Department of Neurology, Hubei Xinhua Hospital and the First and Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University were divided into drug-resistant epilepsy group ($n = 39$) and non-epileptic control group ($n = 40$). Cerebrospinal fluid (every sample 4 ml) were collected by lumbar puncture specimens, and HSPBAP1 and EML5 were detected by sandwich enzyme-linked immunosorbent assays. SPSS 13.0 software was used for statistical analysis, and $P \leq 0.05$ indicated significant differences. **Results** The expressions of HSPBAP1 and EML5 were 0.17 ± 0.03 and 0.13 ± 0.02 in drug-resistant epilepsy group, while were 0.10 ± 0.03 and 0.08 ± 0.02 in non-epileptic control group. There was significant difference between 2 groups ($t = 3.239, P = 0.002$; $t = 3.294, P = 0.002$, respectively). **Conclusion** The expressions of HSPBAP1 and EML5 were increased in drug-resistant epilepsy patients. This provides a new way for early diagnosis of drug-resistant epilepsy.

【Key words】 Drug tolerance; Epilepsy; Heat-shock proteins; Microtubule-associated proteins; Cerebrospinal fluid

Fund Project: Hubei Provincial Health Department Research Fund Project (No. JX4B41)

基金项目:湖北省卫生厅科研基金资助项目(项目编号: JX4B41)

作者单位:430015 武汉,湖北省新华医院神经内科(陈云,郭珍立,尹虹祥,付斌,周瑞,但毕堂);400016 重庆医科大学附属第一医院神经内科(席志芹)

通讯作者:郭珍立(Email:guozhengli18@yahoo.com.cn)

癫痫为临床常见的慢性中枢神经系统疾病,影响全球大约 50 亿人口^[1],其中 70% 的患者可以通过两种或更少的药物成功控制临床发作,其余 30% 患者不能通过药物治疗使其症状缓解,后者多为耐药性癫痫^[2]。近年研究发现,细胞凋亡相关蛋白、细胞骨架蛋白异常变化可导致神经元自我保护机制降低,这可能是耐药性癫痫形成的重要原因^[3-4]。据研究显示,热休克蛋白 27 相关蛋白 1(HSPBAP1)和棘皮动物微管结合蛋白类似蛋白 5(EML5)在耐药性癫痫患者脑组织中的表达水平明显升高^[5-6],本研究主要观察这两种蛋白质在耐药性癫痫患者脑脊液中的表达变化,探讨其临床意义,以为临床提供一些参考依据。

对象与方法

一、研究对象

1. 耐药性癫痫组 耐药性癫痫病例需符合以下入组条件:(1)具有癫痫发作的典型临床表现和脑电图特征,正规服用过两种或两种以上的一线抗癫痫药物(如苯妥英钠、卡马西平、丙戊酸、苯巴比妥),除丙戊酸外其余药物血药浓度均位于正常值高限,与服药前基线比较,发作频率无明显减少。(2)发作类型符合 1981 年国际抗癫痫联盟(ILAE)发作类型判断标准。(3)无明显病因,神经系统体格检查未见局灶性神经系统体征或虽然有阳性体征但与癫痫发作无关。(4)头部 CT 或 MRI 检查除海马硬化外,无其他异常。

2. 正常对照组 (1)无癫痫发作病史及家族遗传性疾病病史。(2)受试者本人或其家属对研究内容知情,并签署知情同意书。

二、研究方法

1. 脑脊液 HSPBAP1 和 EML5 检测 (1)标本采集:所有入组患者均于侧卧位施行腰椎穿刺术,观察脑脊液压力变化、椎管阻塞情况,同时留取脑脊液标本 4 ml 置于 TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),离心半径为 20 cm、2500 r/min 高速离心 20 min,收集上清液置 -70 °C 冰箱保存备用。(2)检测方法:采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)进行检测,试剂盒为上海森雄科技实业有限公司进口分装产品,最低灵敏度为 6 pg/ml,批内变异 < 10%,均在同一批次内测定;操作方法由专人严格按照试剂盒说明书进行,所有脑脊液标本重复

检测 2 次。试剂盒恢复至室温 3 h 时,建立标准曲线,设定标准孔 8 孔,每孔加入样品稀释液 100 μ l,并向第一孔加入标准品 100 μ l,混匀后用加样器吸出 100 μ l 移至第二孔,如此反复倍比稀释至第七孔,第八孔作为空白对照;然后向每孔中加入待测样品 100 μ l,置于 37 °C 反应 2 h 后洗涤并加入酶标抗体(50 μ l/孔),37 °C 温育 60 min 后洗涤,加入底物液 100 μ l,全波长酶标仪(德国 BMG 公司)测定光密度(OD)值,获得相应 HSPBAP1 和 EML5 浓度。

2. 统计分析方法 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,两组间均数的比较行两独立样本的 *t* 检验;计数资料以相对数构成比(%)或率(%)表示,采用 χ^2 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、社会人口学特征

1. 耐药性癫痫组 根据上述纳入标准,选择湖北省新华医院、重庆医科大学附属第一医院和附属第二医院神经内科 2005 年 1 月-2010 年 12 月住院治疗的耐药性癫痫患者的脑脊液标本共计 39 例,其中全面性强直-阵挛发作 23 例、强直性发作 7 例、复杂部分性发作 5 例和单纯部分性发作 4 例;男性 22 例,女性 17 例;年龄 8~57 岁,平均(23.20 \pm 8.10)岁;病程 2~31 年,平均病程 5 年。

2. 正常对照组 选择与耐药性癫痫组患者年龄、性别相匹配,并同期在湖北省新华医院体检中心进行体格检查的健康志愿者共 40 例,男性 20 例,女性 20 例;年龄 18~60 岁,平均(30.60 \pm 10.20)岁。

对两组受试者平均年龄($t = 1.983, P = 0.070$)和性别($\chi^2 = 0.326, P = 0.500$)特征进行比较,差异无统计学意义。

二、脑脊液 HSPBAP1 和 EML5 的变化

ELISA 检测结果显示,耐药性癫痫组患者脑脊液中 HSPBAP1 和 EML5 表达水平高于对照组,且差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$, 表 1)。

讨 论

脑脊液是存在于脑室及蛛网膜下隙内的无色透明液体,循环流动于脑和脊髓表面,大部分由脑室脉络丛分泌。由于血-脑脊液屏障的存在,血液和其他体液中的大分子物质如蛋白质是不能进入脑

表 1 两组受试者脑脊液 HSPBAP1 和 EML5 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, OD 值)

Table 1. Comparison of the level of HSPBAP1 and EML5 in cerebrospinal fluid between the two groups ($\bar{x} \pm s$, OD)

组别	例数	HSPBAP1	EML5
正常对照组	40	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.02
耐药性癫痫组	39	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.02
<i>t</i> 值		3.239	3.294
<i>P</i> 值		0.002	0.002

注: HSPBAP1, 热休克蛋白 27 相关蛋白 1; EML5, 棘皮动物微管结合蛋白类似蛋白 5

脊液的。脑脊液中的蛋白质主要来自脑组织, 对耐药性癫痫患者脑组织进行的研究发现, 其脑组织表达增强的基因和蛋白质产物均为人类自身固有的蛋白质或基因, 而脑脊液是这些物质排泄的重要通道, 另外, 脑脊液中同样存在致病物质, 因此在脑脊液中可以检出这些物质^[7]。在本研究中, 我们发现耐药性癫痫患者的脑脊液中 HSPBAP1 和 EML5 表达水平明显升高。HSPBAP1 最早是由 Jiang 等^[8]于 2001 年从人胚胎 cDNA 文库中克隆鉴定的一种蛋白质, 属于蛋白相关小应力蛋白 1 家族, 正常成年人主要存在于胸腺、卵巢、胰腺, 而在脑组织中无表达, 但在耐药性癫痫患者的脑组织中其表达水平明显升高。该蛋白的具体功能尚不清楚, 目前广泛认为热休克蛋白 27 (Hsp27) 对中枢神经系统具有保护作用^[8-9], 它能够减少应激反应导致的神经元凋亡^[10], 增加神经元内谷胱甘肽表达水平, 从而保护谷胱甘肽活性^[11], 可通过磷酸化抑制肌动蛋白聚合作用, 阻止肌动蛋白加合到微丝纤维上, 促进微丝的去组装^[12], 而 HSPBAP1 却抑制了 Hsp27 的这些神经元保护功能, 进而诱导神经元发生凋亡或坏死, 以及神经网络的重构^[13], 后者正是耐药性癫痫形成的重要病理学基础。EML5 属于微管去组装蛋白, 其相对分子质量约为 180×10^3 , 主要分布在海马齿状回、CA1 区、CA3 区、嗅球和大脑皮质, 具有细胞骨架动力学及纺锤体形成的功能, 其内含有的高度保守疏水基团结构域可能与微管的结合有关^[14], 这些均可能与难治性癫痫苔藓纤维芽生有关。这两种蛋白质参与了耐药性癫痫的形成, 而且在脑脊液中表达水平明显升高, 可为耐药性癫痫的诊断提供一种新的途径, 与耐药性癫痫患者脑组织重复取材比较,

多次获取脑脊液的可能性更为便利。然而, 这两种蛋白质在中枢神经系统的代谢途径、表达的时空关系尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia*, 1993, 34:453-468.
- [2] Boon P, Vonck K, De Reuck J, et al. Vagus nerve stimulation for refractory epilepsy. *Seizure*, 2001, 10:448-455.
- [3] Dawodu S, Thom M. Quantitative neuropathology of the entorhinal cortex region in patients with hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2005, 46:23-30.
- [4] Jamali S, Bartolomei F, Robaglia-Schlupp A, et al. Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain*, 2006, 129: 625-641.
- [5] Xi ZQ, Sun JJ, Wang XF, et al. HSPBAP1 is found extensively in the anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy. *Synapse*, 2007, 61:741-747.
- [6] Sun JJ, Wang XF, Gong Y, et al. Eml 5mRNA overexpression in the brain of intractable epilepsy. *Zhonghua Shen Jing Wai Ke Za Zhi*, 2007, 23:138-141. [孙纪军, 王学峰, 龚云, 等. 难治性癫痫患者脑组织中 Eml 5mRNA 表达及其意义. *中华神经外科杂志*, 2007, 23:138-141.]
- [7] Hyland K, Arnold L. Value of lumbar puncture in the diagnosis of infantile epilepsy and folinic acid-responsive Seizures. *J Child Neurol*, 2002, 17 Suppl 3:48-56.
- [8] Jiang M, Ma Y, Cheng H, et al. Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HSPBAP1) from human fetal brain. *Cytogenet Cell Genet*, 2001, 95:48-51.
- [9] Shchors K, Yehiely F, Kular RK, et al. Cell death inhibiting RNA (CDIR) derived from a 3'-untranslated region binds AUF1 and heat shock protein 27. *J Biol Chem*, 2002, 277:47061-47072.
- [10] Son GH, Geum D, Chung S, et al. A protective role of 27-kDa heat shock protein in glucocorticoid-evoked apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338:1751-1758.
- [11] Mehlen P, Hickey E, Weber LA, et al. Large unphosphorylated aggregates as the active form of HSP - 27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241:187-192.
- [12] Lopez - Picon F, Puustinen N, Kukko - Lukjanow TK, et al. Resistance of neurofilaments to degradation, and lack of neuronal death and mossy fiber sprouting after kainic acid-induced status epilepticus in the developing rat hippocampus. *Neurobiol Dis*, 2004, 17:415-426.
- [13] Jenson SD, Robetorye RS, Bohling SD, et al. Validation of cDNA microarray gene expression data obtained from linearly amplified RNA. *Mol Pathol*, 2003, 56:307-312.
- [14] O'Connor V, Houtman SH, De Zeeuw CI, et al. Eml 5, a novel WD40 domain protein expressed in rat brain. *Gene*, 2004, 336: 127-137.

(收稿日期: 2012-09-03)