

伴海马硬化的颞叶癫痫患者海马组织内 BDNF 表达变化

张大明¹ 李春梅^{2△} 王凤军³ 侯晓华³ 韩占强¹

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院神经外科 黑龙江 哈尔滨 150001 ;

2 哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科 黑龙江 哈尔滨 150001 ;

3 哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 研究伴海马硬化的难治性颞叶癫痫(TLE)患者海马组织内脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达变化 探讨其在难治性颞叶癫痫发病机制中的作用。方法 采集 5 例伴海马硬化的难治性 TLE 患者手术中切除的海马组织,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 BDNF mRNA 表达 并与 3 例非海马硬化 TLE 患者对照。结果 与非海马硬化组比较,伴海马硬化的难治性 TLE 患者海马组织中的 BDNF mRNA 表达明显增加($P<0.01$)。结论 伴海马硬化的难治性 TLE 患者海马组织中 BDNF mRNA 表达增高,可能在海马硬化和难治性颞叶癫痫发生、发展中具有重要作用。

关键词 颞叶癫痫 海马硬化 脑源性神经营养因子

中图分类号 R742.1 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)18-3555-03

Expression of BDNF in Hippocampi Resected from Patients with Temporal Lobe Epilepsy Associated with Hippocampal Sclerosis

ZHANG Da-ming¹, LI Chun-mei^{2△}, WANG Feng-jun³, HOU Xiao-hua³, HAN Zhan-qiang¹

(1 Department of neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 150001, Harbin, China;

2 Department of neurology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 150001, Harbin, China;

3 Department of neurology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 150001, Harbin, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampi resected from patients with intractable temporal lobe epilepsy (TLE) associated with hippocampal sclerosis and discuss its function in the pathogenesis. **Methods:** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to test the expression of BDNF mRNA in the surgically removed hippocampus tissue from 5 patients with intractable TLE associated with hippocampal sclerosis, and the results were compared with the data from 3 patients with intractable TLE without hippocampal sclerosis. **Results:** Expression of BDNF mRNA were significantly increased in hippocampus tissue ($P<0.01$) resected from patients with intractable TLE associated with hippocampal sclerosis compared with that of controls. **Conclusions:** The results indicate that the expression of BDNF mRNA increases in the hippocampi of patients with intractable TLE associated with hippocampal sclerosis, and it may play an important role in the generation and development of hippocampal sclerosis and intractable TLE.

Key words: Temporal Lobe Epilepsy; Hippocampal Sclerosis; Brain Derived Neurotrophic Factor

Chinese Library Classification(CLC): R742.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)18-3555-03

前言

颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy, TLE)常常发展为难治性癫痫,经多种抗癫痫药物治疗不佳的患者,可以选择手术治疗。伴海马硬化(hippocampal sclerosis, HS)的难治性颞叶癫痫系最常见适合外科手术的癫痫综合征,通过手术切除病变海马后多数效果良好。目前海马硬化发生机制及与癫痫的关系尚不完全清楚,硬化海马内包含着极其复杂的细胞、分子基础以维持这种病理生理状态^[1]。作为神经营养因子家族最具代表性的因子,近年来 BDNF 与癫痫的关系受到了广泛关注,大量动物

实验表明 BDNF 在癫痫发病机制中有着重要作用,可能与海马硬化的发生发展存在密切关系,但其具体的作用机制目前尚不清楚,因此本实验应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法研究伴海马硬化的难治性颞叶癫痫患者手术切除的海马组织中 BDNF 表达变化,以探讨其在难治性癫痫中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

本次实验研究的组织标本收集自哈尔滨医科大学附属第一医院神经外科 2008 年~2009 年手术治疗的 8 例难治性颞叶癫痫患者术中切除的病变海马组织。其中海马硬化组 5 例,男 3 例,女 2 例,年龄 9 岁~45 岁,平均 26.4 ± 15.0 岁,病程 8~36 年,平均 19.6 ± 12.4 年,患者符合下列条件:①有难治性颞叶癫痫的典型临床表现,并符合国际抗癫痫联盟分类标准;

作者简介 张大明(1983-)男,硕士,医师,主要研究方向:神经疾病的发病机制及外科治疗

△通讯作者 李春梅, E-mail: lmei9@163.com

(收稿日期 2011-05-21 接受日期 2011-06-17)

②无明显继发病因,发作间期神经系统检查没有局灶性神经功能缺损的体征或虽有体征但与癫痫发作无关。③头部MRI检查和术后病理证实海马硬化,④所有病例均经正规抗癫痫药物治疗,仍有频繁抽搐发作,具有手术治疗指征;⑤患者及其家属术前签署知情同意书。非硬化组共3例,男2例,女1例,年龄22~43岁,平均30.7±11.0岁,病程9~34年,平均24.0±13.2年,符合下列条件:①有难治性颞叶癫痫的典型临床表现,并符合国际抗癫痫联盟分类标准;②无明显继发病因,发作间期神经系统检查没有局灶性神经功能缺损的体征或虽有体征但与癫痫发作无关。③头部MRI检查和术后病理未发现海马硬化;④所有病例均经正规抗癫痫药物治疗,仍有频繁抽搐发作,具有手术治疗指征;⑤患者及其家属术前签署知情同意书。

1.2 标本采集和保存

海马硬化组和非硬化组患者的海马标本于外科手术中采集后,立即放入液氮罐中速冻,置于-70℃冰箱中保存备用。

1.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

应用TRIZOL法从冻存的海马标本中提取总RNA,用Nanodrop ND-1000 UV微量紫外分光光度计进行RNA定量分析,琼脂糖凝胶电泳实验分析总RNA质量。应用TaKaRa cDNA逆转录试剂盒进行cDNA第一链的合成(实验条件和步骤参考试剂盒说明书)。用Pubmed上的Primer-Blast设计BDNF的引物:BDNF上游引物为5'-AAACATCCGAGGACAAGGTG-3',下游引物为5'-AGAAGAGGAGGCTC CAAAGG-3'(产物249bp)。内参照β-actin上游引物为5'-A-

GAAAATCTGGCACCACAC C-3',下游引物为5'-TAG-CACAGCCTGGATAGCAA-3'(产物173bp)。引物由南京金思特科技有限公司合成。PCR反应体系:DNA模板4μl,上游引物各1μl,10×Buffer液5μl(含MgCl₂)2.5mmol/L dNTP 4μl,5U/μl Easy Taq DNA聚合酶0.5μl(北京全式金生物技术有限公司),加双蒸水至50μl。PCR反应条件:94℃预变性4min,94℃变性30s,54℃退火40s,72℃延伸30s,循环35次后72℃后延伸7min。将扩增后的PCR产物在2%琼脂糖凝胶(溴化乙啶染色)上电泳分离,凝胶经扫描成像后用凝胶成像分析系统Gel Doc 2000(Bio-Rad)及相应的分析软件(Quantity one)分析各电泳带吸光度值,半定量分析将表达量化:目的基因表达丰度值=目的基因吸光度值/内参β-actin吸光度值。

1.4 统计学处理

实验数据用SPSS 15.0软件进行统计学处理。海马硬化组和非硬化组标本BDNFmRNA表达的半定量分析结果以($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用t检验。

2 结果

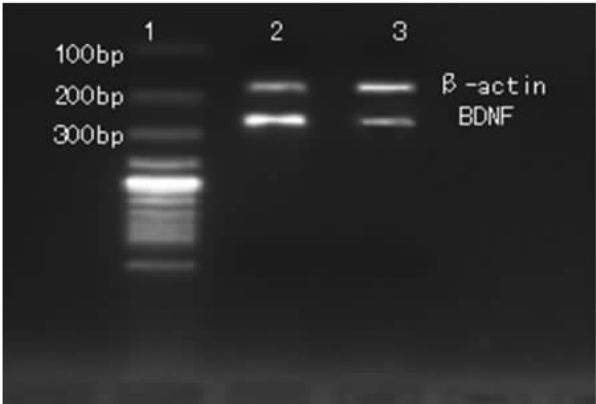
PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶中电泳后可见在200~300bp间出现一条带,与预期的目的条带位置相符。难治性颞叶癫痫患者海马硬化组和非硬化组的海马组织的BDNF总的mRNA经逆转录后的扩增片段的电泳条带分析结果见表1和图1、图2。统计检验结果表明,硬化组海马标本的BDNF mRNA表达量显著高于非硬化组,差异有统计学意义(P<0.01)。

3 讨论

表1 海马硬化组和非硬化组的海马组织中BDNF mRNA表达($\bar{x} \pm s$)
Table1 mRNA expression of BDNF in hippocampi from HS and non-HS group

Group	Case number	BDNF
HS group	5	1.133± 0.074▲
Non-HS group	3	0.979± 0.015

Note : ▲P<0.01 HS group compared with Non-HS group



1:Marker; 2: HS group; 3 Non-HS group

图1 硬化和非硬化海马组织中BDNF mRNA的RT-PCR电泳图
Fig.1 Electrophoretogram of BDNF mRNA RT-PCR results in hippocampi from HS and non-HS group

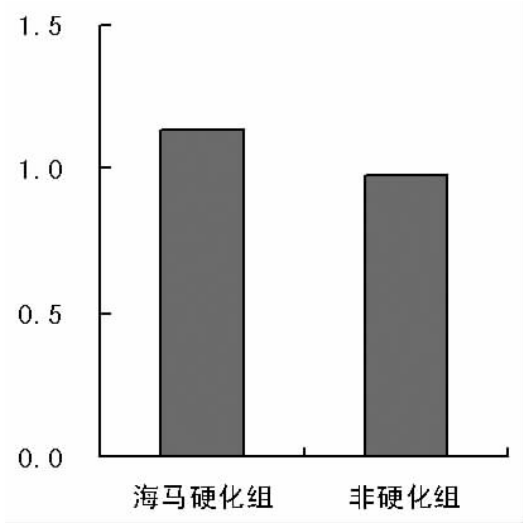


图2 硬化和非硬化海马组织中BDNF mRNA表达

Fig.2 BDNF mRNA expression in hippocampi from HS and non-HS group

癫痫是神经系统最常见病症之一,其中颞叶癫痫为最常见局灶性癫痫综合征,常发展为难治性癫痫,严重影响患者生活质量^[2]。TLE 分为外侧颞叶癫痫综合征(LTLE)和内侧颞叶癫痫综合征(MTLE)^[3]。MTLE 远较 LTLE 常见,估计在部分性癫痫中,仅 MTLE 即占 60%-70%。海马硬化相关性颞叶癫痫是主要的 MTLE。海马硬化是难治性颞叶癫痫最常见的病理学类型,其大体病理表现为海马体积变小、萎缩变硬,往往同时累及钩回、杏仁核及海马旁回。HS 组织学典型所见为海马结构的神经细胞脱失和胶质细胞增生^[4]。但目前海马硬化的发生机制尚未完全明确,硬化的海马中存在复杂的细胞和分子水平的改变,它是颞叶癫痫的病因或结果一直存在争议,有学者认为海马硬化可能是一种动态的演变过程^[5]。

颞叶癫痫经传统抗癫痫药治疗效果不佳者可考虑手术治疗,伴海马硬化的难治性颞叶癫痫为最适合外科治疗的癫痫综合征^[6]。常用的手术方式包括颞叶前部切除术和选择性杏仁核-海马切除术。颞叶前部切除术是最常见的手术方法,约占有癫痫手术的 80%,同时它也是控制发作效果较好的手术,其操作要点是切除包括杏仁核外侧部和前海马在内的前颞叶的大部分^[7]。对本次实验的 8 名患者主要采用的是颞叶前部切除术,术前辅助应用硬膜下植入 EEG 监测发作间期和发作期以确定致病病灶。其中对照组 3 例非海马硬化患者术前头部核磁共振检查没有发现海马硬化的证据,手术中切除海马组织送病理检查后除发现海马硬化病变。实验组 5 例患者术前头部核磁共振检查已发现海马硬化的表现,术后病理结果支持海马硬化诊断。

神经营养因子是靶组织分泌的一组特异性蛋白分子,有促进神经细胞生长分化和维持功能的作用,主要包括 NGF、BDNF、NT-3、NT-4 和 NT-5 等^[8]。BDNF 是德国神经生物学家 Barde 等首次由猪脑提取的一种碱性蛋白,1989 年 Leibrock 等将其基因克隆,并测序成功,它是神经营养因子家族中最具代表性的成员之一。BDNF 通过与其特异的功能受体 TrkB 的相互结合和作用,在神经系统的损伤、修复及多种疾病如缺血性脑病、阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓损伤、卒中等的发生、发展中发挥着重要的作用^[9-10]。BDNF 与癫痫的关系是近年研究的热点,其在癫痫发生、发展中所起的作用尚存很大争议^[11-12]。有些研究者认为 BDNF 及其受体 TrkB 的作用可减缓和阻止癫痫发作及由发作所引起的神经元的病理改变^[13]。有些研究者认为 BDNF 对海马神经元兴奋性的调节作用以及癫痫后上调表明其具有促癫痫发作作用^[14]。我们以前的研究发现难治性 TLE 患者术中切除的颞叶和海马组织中 BDNF、TrkB 受体的表达与非癫痫患者比较明显增加,认为 BDNF 和 TrkB 受体可能通过导致海马齿状回颗粒细胞苔藓纤维发芽及突触结构和功能变化从而促进癫痫慢性发展^[15]。在本次研究中我们进一步对伴有海马硬化和不伴有海马硬化的难治性 TLE 患者的海马组织的 BDNF 表达变化进行了研究和统计分析,发现硬化组的海马组织中的 BDNF mRNA 表达明显高于非硬化组的海马组织,提示 BDNF 可能参与了海马硬化的过程。

神经营养因子与海马病变的关系以及具体的作用机制目

前尚不完全清楚。一些动物实验发现海马颗粒细胞在应对急性神经元损伤时 BDNF 和 NGF 的 mRNA 水平明显增加,在最初的几个小时内,BDNF 和 NGF mRNA 的水平与对照相比显著增加,此后这两种因子的水平都下降^[16]。在缺血和低血糖损伤中也发现了类似的神经营养因子水平变化^[17],提示这可能是海马的一种急性病理生理反应。但是目前检测存在慢性损伤的动物和人的海马中神经营养因子 mRNA 水平的研究还较少。有研究发现阿尔茨海默病患者的海马中 BDNF mRNA 水平与尸检标本比较明显减少^[18]。Lowenstein 等的研究认为神经营养因子增加可能和慢性神经元缺失及苔藓纤维重组有关^[19]。Mathern 等^[20]的研究发现与非海马硬化病例比较,伴海马硬化的颞叶癫痫患者的海马颗粒细胞中 BDNF、NGF 等神经营养因子 mRNA 水平增加,BDNF mRNA 水平与 Ammon 氏角神经元缺失情况及苔藓纤维发芽呈正相关。这些研究者认为海马硬化组织中颗粒细胞 BDNF 增加后可能通过逆行运输以支持剩余的神经元,或者支持来自海马外的神经轴突,而且神经营养因子增加还可能诱导或促进突触重组或苔藓纤维发芽时的神经突触发生。我们的实验结果进一步验证和支持了 Mathern 等的研究,证实了伴海马硬化的难治性颞叶癫痫患者的海马组织内存在 BDNF 基因表达的持续改变,而这一改变可能参与了海马硬化的病理机制,与癫痫的慢性发展具有密切的关系。

参考文献(References)

- [1] Engel T, Schindler CK, Sanz-Rodriguez A, et al. Expression of neurogenesis genes in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis[J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2011,3(1):38-47
- [2] Bertram EH. Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin? [J]. *Epilepsy Behav*, 2009, 14 Suppl 1:32-37
- [3] Sakai Y, Nagano H, Sakata A, et al. Localization of epileptogenic zone in temporal lobe epilepsy by ictal scalp EEG[J]. *Seizure*, 2002, 11(3): 163-168
- [4] Thom M, Eriksson S, Martinian L, et al. Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68(8): 928-938
- [5] Yang T, Zhou D, Stefan H. Why mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression? [J]. *J Neurol Sci*, 2010, 296(1-2):1-6
- [6] Aull-Watschinger S, Pataria E, Czech T, et al. Outcome predictors for surgical treatment of temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*, 2008, 49(8):1308-1316
- [7] Thom M, Mathern GW, Cross JH, et al. Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? [J]. *Ann Neurol*, 2010, 68(4): 424-434
- [8] Binder DK. Neurotrophins in the dentate gyrus [J]. *Prog Brain Res*, 2007,163:371-397
- [9] Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor [J]. *Growth Factors*, 2004, 22(3):123-131
- [10] Hu Y, Russek SJ. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation[J]. *J Neurochem*, 2008, 105(1):1-17

(下转第3585页)

- gene HE4 (WFDC 2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms [J]. *Oncogene*, 2002, 21(17):2768-2773
- [7] Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, et al. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas [J]. *Gene*, 1999, 238(2):375-385
- [8] Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, et al. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(22):6281-6287
- [9] Drapkin R, Von Hogen H, Lin YF, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is over-expressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6):2162-2169
- [10] Havrilesky LJ, Whitehead CM, Rubatt JM, et al. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(3):374-382
- [11] Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(2):402-408
- [12] Montagnana M, Lippi G, Ruzzenente O, et al. The utility of serum human epididymis protein 4 (HE4) in patients with a pelvic mass [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2009, 23(5):331-335
- [13] Andersen MR, Goff BA, Lowe KA, et al. Use of a Symptom Index, CA125, and HE4 to predict ovarian cancer [J]. *Gynecologic Oncology*, 2010, 116(3):378-383
- [14] Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter, et al. The HE4(WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(13):3695-3700
- [15] Huhtinen K, Survitie P, Hiissa J, et al. Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumors from ovarian endometriotic cysts [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(8):1315-1319
- [16] Anastasi E, Marchei GG, Viggiani V, et al. HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer [J]. *Tumor Biology*, 2010, 31(2):113-119
- [17] Brown A, Miller C, Robisan K, et al. Differential expression of CA125 and a novel serum tumor marker HE4 epithelial ovarian cancer [J]. *Clin Oncol*, 2008, 26(15):5533-5538
- [18] 王术艺, 谢永红, 张杰等. HE4 和 CA125 联合检测在卵巢癌术后临床价值评价 [J]. *河北医药*, 2009, 31(4):564-565
- Wang Shu-Yi, Xie Yong-Hong, Zhang Jie, et al. HE4 and CA125 joint test the postoperative clinical value evaluation in ovarian cancer [J]. *Hebei Medical Journal*, 2009, 31(4):564-565

(上接第 3557 页)

- [11] Tongiorgi E, Domenici L, Simonato M. What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development [J]. *Mol Neurobiol*, 2006, 33(1):17-32
- [12] Koyama R, Ikegaya Y. To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus [J]. *Neuroscientist*, 2005, 11(4):282-287
- [13] Palma E, Torchia G, Limatola C, et al. BDNF modulates GABAA receptors microtransplanted from the human epileptic brain to *Xenopus* oocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(5):1667-1672
- [14] Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL, et al. Spontaneous limbic seizures after intra-hippocampal infusion of brain derived neurotrophic factor [J]. *Exp Neurol*, 2002, 174(2):201-214
- [15] Li CM, Hou XH, Zhang LM, et al. Expression of BDNF and its receptor TrkB in brain tissue resected from patients with intractable mesial temporal lobe epilepsy [J]. *J Apoplexy and Nervous Diseases*, 2009, 26(3):336-339
- [16] Lauterborn JC, Isackson PJ, Gall CM. Seizure-induced increases in NGF mRNA exhibit different time courses across forebrain regions and are biphasic in hippocampus [J]. *Exp Neurol*, 1994, 125(1):22-40
- [17] Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, et al. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(2):648-652
- [18] Halbach OB. Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus [J]. *Front Aging Neurosci*, 2010, 2: pii: 36
- [19] Lowenstein DH, Arsenault L. The effects of growth factors on the survival and differentiation of cultured dentate gyrus neurons [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(5):1759-1769
- [20] Mathern GW, Babb TL, Micevych PE, et al. Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus [J]. *Mol Chem Neuropathol*, 1997, 30(1-2):53-76