

FPS-ZM1 和 mNGF 对癫痫幼鼠脑内 HMGB1 和 TRX 表达的影响

李冬梅, 陈巧彬, 陈 琅, 方 琼

摘要: **目的** 研究晚期糖基化终末产物(RAGE)受体阻断剂 FPS-ZM1 和鼠神经生长因子(mNGF)对戊四氮致痫幼鼠海马区高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)和硫氧还蛋白(TRX)表达的影响。**方法** 取130只清洁级 Wistar 雄性大鼠幼崽,随机分为4组,即A组(空白对照组)、B组(癫痫对照组)、C组(mNGF 干预组)和D组(FPS-ZM1 干预组)。幼鼠腹腔注射戊四氮 40 mg/kg 建立癫痫模型,建模成功后,4组均连续干预1周,其中A组和B组腹腔注射等剂量生理盐水,C组和D组分别腹腔注射 mNGF 4 μ g/kg、FPS-ZM1 1 mg/kg,干预结束后,各组分别于3、24、72 h时段麻醉后分离海马组织。采用 Western-blot 方法测定海马 HMGB1 的含量,ELISA 法检测海马 TRX 的浓度。**结果** A组大鼠未见惊厥发作,海马区 HMGB1 表达水平在各时段均明显低于B组、TRX 浓度均高于B组,差别有统计学意义($P < 0.001$);D组和C组的 HMGB1 表达水平在各时段均低于B组、TRX 浓度均高于B组,差别有统计学意义($P < 0.05$);D组的 HMGB1 表达水平在3、24 h时段较C组下降,差别有统计学意义($P < 0.05$),在72 h时段与C组的差别则无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** FPS-ZM1 和 mNGF 具有减轻癫痫幼鼠脑损伤的作用,其机制可能是通过减轻大脑的炎症反应和氧化应激来实现的。

关键词: 癫痫; FPS-ZM1; 鼠神经生长因子; 高迁移率族蛋白 B1; 硫氧还蛋白

文献标志码: A **文章编号:** 1672-4194(2021)06-0513-04

癫痫(epilepsy, EP)是神经元异常同步放电引起的慢性脑功能障碍,以反复发作性抽搐为临床特征,可伴有各种并发症和后遗症。尽快终止 EP 发作,对于保护大脑功能以及减少后续损害尤为重要,明确其发病机制也有利于进行对因治疗。越来越多的研究表明,神经系统免疫炎症反应、氧化应激损伤与 EP 的发生、发展密不可分^[1-2],晚期糖基化终末产物(receptor for advanced glycation end products, RAGE)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及其介导的信号转导通路与 EP 的关系亦不断有文献报道^[3-4]。本研究采用戊四氮点燃大鼠幼崽建立 EP 模型,并用 RAGE 抑制剂 FPS-ZM1 和鼠神经生长因子(mouse nerve growth factor, mNGF)干预致痫幼鼠,研究慢性点燃 EP 幼鼠神经损伤的程度,探讨两种药物可能的神经保护机制,报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 清洁级 Wistar 雄性大鼠 130 只,21~28 日龄,体质量 50~60 g[许可证号:SCXK(沪)2017-0005,上海斯莱克实验动物有限责任公司]。

1.1.2 试剂 戊四氮(MKCC1690,美国 Sigma 公司);mNGF(20160311,中国未名生物医药有限公司);FPS-ZM1(2908726,美国 Meck Millipore 公司);ELISA 试剂盒(S20180318MY,上海朗顿生物科技有限公司);全蛋白抽提试剂盒(KGP250)、Western-blot 检测试剂盒(KGP1201)和显影定影试剂(KGP116)(江苏凯基生物科技发展有限公司)。

1.1.3 仪器 电泳仪(Power Supplies Basic)和 Trans-Blot Turbo 全能型蛋白转印系统(170-4150)(美国 Bio-Rad 公司);凝胶成像系统(G:BOXChem-iXR5,英国 SYNGENE 公司);台式恒温振荡器(HY-4,江苏金坛市正基仪器厂);涡旋振荡器(XW-80A,海门市其林贝尔仪器制造有限公司);高速冷冻离心机(Sorvall ST 16R,美国 Thermo 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 建立动物模型 幼鼠适应性饲养 1 周,自由摄食、摄水,室温 22 $^{\circ}$ C,湿度 60%~70%,明暗各 12 h 照明。大鼠按体质量由大到小依次编号,利用随机数字表法进行排序,依次分为 A 组(空白对照组)、B 组(EP 对照组)、C 组(mNGF 干预组)和 D 组(FPS-ZM1 干预组)。A 组 31 只,每日腹腔注射等剂量生理盐水;其余 3 组每组 33 只,每日腹腔注射戊四氮 40 mg/kg^[5]。EP 的发作分级按照 Racine 分级法^[6],若幼鼠连续发生 5 次 II 级以上发作判断为慢性点燃。点燃成功后,B~D 组戊四氮腹腔注射改为每 2~3 天进行 1 次。2 周后,A 组和 B 组腹

收稿日期: 2021-03-26

基金项目: 福建省医学创新课题(2019-CXB-16)

作者单位: 福建医科大学 省立临床医学院,福建省立医院 儿科,福州 350001

作者简介: 李冬梅,女,住院医师,医学硕士

通信作者: 陈巧彬. Email:1542601681@qq.com

腔注射等剂量生理盐水,C组腹腔注射 $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的 mNGF^[7],D组腹腔注射 $1 \text{ mg}/\text{kg}$ 的 FPS-ZM1^[8],共持续 7 d。

1.2.2 测量幼鼠体质量 每日 8:00—10:00 用电子称量仪(精确至 0.1 g)称取各组幼鼠的体质量并记录,观察给药前后的行为学(有无异常活动、惊厥发作形式和持续时间),记录 30 min。

1.2.3 取材 4组幼鼠干预完成后(共3周),分别于 3、24、72 h 时段以 2%戊巴比妥 $40 \text{ mg}/\text{kg}$ 腹腔注射麻醉,断头取出全脑,放置于冰盒上,采用高温高压消毒刀片及眼科镊处理全脑组织,分离出海马,放入冻存管内,迅速置入液氮中保存,备用。

1.2.4 检测海马区高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box-1, HMGB1)和硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)的表达。

1.2.4.1 采用 Western-blot 法检测 HMGB1 蛋白表达水平 提取组织蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,经聚丙烯酰胺琼脂凝胶电泳后,转移至 PDVF 膜,封闭液封闭。用一抗稀释液孵育, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, TBST 洗膜 3 次。用 5%脱脂奶粉封闭液稀释羊抗兔 HRP-IgG,室温孵育 1~2 h,用 TBST 洗膜 3 次,取出 PDVF 膜,置于配置的 ECL 工作液中,成像后采用 Gel-Pro32 软件对数据进行灰度分析,以 HMGB1 和 β -actin 的灰度值比值为目的蛋白的表达水平。

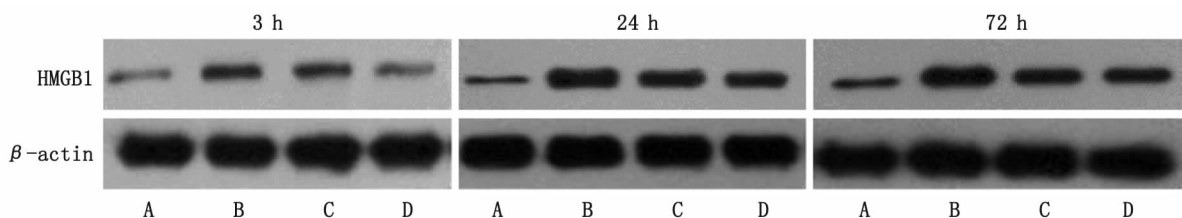
1.2.4.2 采用 ELISA 法测定 TRX 蛋白的表达水平 按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理 HMGB1 蛋白表达相对量及 TRX 浓度变化采用 $\bar{X} \pm S$ 表示,采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,多组样本均数比较采用单因素方差分析,并进行方差齐性检验,均数的两两比较采用 LSD-*t* (方差齐)或 Dunnett (方差不齐)检验, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学改变 A组幼鼠正常活动,无异常行为,无死亡。B~D组幼鼠腹腔注射戊四氮后出现 II~V 级痫性发作,如湿狗样颤动、咀嚼、节律性点头、前肢阵挛、后肢站立、四肢抽搐及全身强直阵挛。2 周后,幼鼠被慢性点燃,其中 11 只死于惊厥大发作,存活的大鼠重新编号,利用随机数字表法于各时段抽取处死的大鼠。剔除取材过程中失误和不满意的标本,最终各个时段每组均取得 9 个样本。

2.2 HMGB1 蛋白的表达水平 B组海马中各时段的 HMGB1 蛋白表达量均较 A 组明显升高,差别有统计学意义 ($P < 0.01$);A 组各时段的蛋白表达量差别无统计学意义 ($P > 0.05$);B 组各时段的蛋白表达量均高于 C 组和 D 组,差别有统计学意义 ($P < 0.01$);D 组在 3、24 h 时段的蛋白表达量较 C 组低,差别有统计学意义 ($P < 0.05$),在 72 h 时段较 C 组略有升高,但差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。具体见图 1 及表 1。



EP:癫痫;mNGF:鼠神经生长因子;HMGB1:高迁移率族蛋白 B1。A 组:空白对照组;B 组:EP 对照组;C 组:mNGF 干预组;D 组:FPS-ZM1 干预组。

图 1 不同时段海马区 HMGB1 蛋白表达水平

Fig. 1 HMGB1 protein expression levels in hippocampus at different times

2.3 TRX 蛋白的表达水平 B 组各时段的 TRX 含量均较 A 组降低,差别有统计学意义 ($P < 0.05$);A 组各时段的 TRX 含量差别均无统计学意义 ($P > 0.05$);C 组和 D 组各时段的 TRX 含量均较 B 组高,差别有统计学意义 ($P < 0.05$);C 组和 D 组各时段的 TRX 含量差别均无统计学意义 ($P > 0.05$,表 2)。

3 讨论

临床中 75%~80% EP 起源于儿童时期,且常用的抗 EP 药物对 1/3 的患儿疗效不佳。儿童处于生长发育的重要时期,反复发作的 EP 易造成大脑损伤。因此,探讨 EP 发作后脑损伤标志物的研究以及采用何种药物进行干预以减轻脑损伤是目前国内外研究的热点。

表 1 不同时段海马区 HMGB1 蛋白表达水平比较

Tab. 1 Comparison of HMGB1 protein expression levels in hippocampus at different times

分组	3 h	24 h	72 h
A 组	0.08±0.02	0.09±0.02	0.09±0.03
B 组	0.24±0.05☆	0.45±0.06☆	0.40±0.05☆
C 组	0.16±0.05▲	0.34±0.03▲	0.23±0.04▲
D 组	0.12±0.04▲△	0.29±0.04▲△	0.25±0.03▲

$n=9$ 。HMGB1 高迁移率族蛋白 B1。A 组:空白对照组;B 组:癫痫对照组;C 组:mNGF 干预组;D 组:FPS-ZM1 干预组。与 A 组比较,☆: $P<0.01$;与 B 组比较,▲: $P<0.01$;与 C 组比较,△: $P<0.05$ 。

表 2 不同时段海马区 TRX 含量比较

Tab. 2 Comparison of TRX content in hippocampus at different times

分组	3 h	24 h	72 h
A 组	27.51±6.36	27.71±5.71	27.24±7.40
B 组	17.63±3.64☆	16.72±4.67☆	16.22±4.25☆
C 组	22.21±3.26▲	21.74±4.54▲	21.37±3.91▲
D 组	22.87±4.30▲	22.03±3.25▲	22.10±4.43▲

$n=9$ 。TRX:硫氧还蛋白。A 组:空白对照组;B 组:癫痫对照组;C 组:mNGF 干预组;D 组:FPS-ZM1 干预组。与 A 组比较,☆: $P<0.01$;与 B 组比较,▲: $P<0.01$ 。

FPS-ZM1 是一种高亲和力的新型 RAGE 受体抑制剂,可透过血脑屏障,对动物模型无毒性作用^[9],即使治疗剂量的 500 倍亦属安全范围。RAGE 广泛表达于细胞表面,与相应配体结合后可启动相应的信号通路,从而激活细胞内氧化应激损伤和免疫炎症反应,进而引起一系列疾病。mNGF 是从小鼠颌下腺提纯的活性蛋白,可降低炎症反应,改善过氧化反应,减轻神经元的损伤,已成功应用于治疗脑卒中和脑出血等神经系统疾病^[10]。

本研究结果显示,戊四氮致痫幼鼠海马中 HMGB1 蛋白表达水平在 3 个时段均明显高于空白对照组。采用 FPS-ZM1 及 mNGF 干预后, HMGB1 的表达在病程的早期阶段即显著下降,在 3 和 24 h 时段,FPS-ZM1 干预组的 HMGB1 表达明显低于 mNGF 干预组,但 72 h 时段二者的表达差别无统计学意义。HMGB1 是一种炎性因子,同时也是一种促炎细胞因子,与炎症反应密切相关。既往研究认为, HMGB1 在中枢神经系统内通常不表达或者表达量很少。但近来动物实验和临床资料均表明,EP 个体中 HMGB1 的表达明显增高^[11]。本研究提示,在 EP 幼鼠病程的早期阶段,FPS-ZM1 减轻免疫炎症的作用较 mNGF 更为显著,随着时间

的推移,二者降低炎症反应的效果趋于一致。FPS-ZM1 可通过抑制 RAGE 的表达,进而中断其后续的信号通路及病理改变。有学者通过移植瘤体相关细胞实验证实,FPS-ZM1 可通过抑制 RAGE 受体的活性,进而降低 HMGB1 的表达^[12]。本实验进一步从 EP 的动物模型验证了 FPS-ZM1 干预后 HMGB1 表达下降,从而减轻机体的炎症反应,减轻 EP 大鼠的脑损伤,且在病程初期就可发挥较好的作用。mNGF 的抗炎作用很大程度取决于其与体内相应的受体结合后所产生的生物学效应。

TRX 是一类高度保守、多功能、广泛表达的小分子蛋白质,可催化多种氧化还原反应,在神经系统疾病的发展和神经元的保护中发挥作用。当体内氧化应激失调时,其表达反而受到抑制。本研究发现,戊四氮致痫幼鼠海马组织中的 TRX 含量均低于空白对照组,TRX 的含量在应用 FPS-ZM1 和 mNGF 干预后均较 EP 对照组升高,但二者各时段的表达差别均无统计学意义。表明在 EP 幼鼠的病程早期,二者改善氧化应激损伤的效果相近。FPS-ZM1 可通过抑制 RAGE 减少 TRX 内源性抑制剂的表达,从而使 TRX 的表达增多,进而发挥抗氧化应激作用。既往研究推测,mNGF 可通过和体内受体结合产生的级联反应发挥抗氧化作用。在临床上 mNGF 对 EP 的作用尚存争议,但其抗氧化、抗炎作用仍值得肯定,后续将进一步研究以明确其临床疗效。

本研究验证了免疫炎症、氧化应激参与 EP 的发病过程。FPS-ZM1 和 mNGF 具有减轻 EP 幼鼠脑损伤的作用,其机制可能是通过减轻大脑炎症反应和氧化应激来实现的。

参考文献:

- [1] 张伊佳,秦 炯. 免疫炎症因素在癫痫中的作用机制[J]. 中国免疫学杂志, 2019,35(8):1024-1026.
- [2] Li Y, Thom M, Jacques T S. Novel therapeutic targets in epilepsy: Oxidative stress and iron metabolism[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2020,46(6):519-521.
- [3] Luan G, Gao Q, Zhai F, et al. Upregulation of HMGB1, toll-like receptor and RAGE in human Rasmussen's encephalitis[J]. *Epilepsy Res*, 2016,123:36-49.
- [4] 袁 艳,李庆全. 鼠神经生长因子与左乙拉西坦对难治性癫痫患者认知功能及血清 NSE 水平的影响[J]. 中国合理用药探索, 2019,16(8):159-161.
- [5] 荆丽丽,高 平,解水杉,等. 氯喹对戊四氮慢性致痫大鼠的抗癫痫作用及对脑组织内 mGluR5、mGluR1 表达的影响[J]. 山东医药, 2017,57(13):49-51.
- [6] Racine R J, Steingart M, Dan M I. Development of kindling-

- prone and kindling-resistant rats; Selective breeding and electrophysiological studies [J]. *Epilepsy Res*, 1999, 35(3): 183-195.
- [7] 臧欢欢,陈 琅,刘 蕊,等.鼠神经生长因子对癫痫幼鼠脑保护作用的研究[J]. *临床儿科杂志*,2014(12):1176-1180.
- [8] Sanajou D, Ghorbani Haghjo A, Argani H, *et al*. Reduction of renal tubular injury with a RAGE inhibitor FPS-ZM1, valsartan and their combination in streptozotocin-induced diabetes in the rat[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019,842:40-48.
- [9] Shen C, Ma Y, Zeng Z, *et al*. RAGE-specific inhibitor FPS-ZM1 attenuates AGEs-induced neuroinflammation and oxidative stress in rat primary microglia[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(10):2902-2911.
- [10] 庞正彦.用鼠神经生长因子治疗脑出血的效果研究[J]. *当代医药论丛*, 2017,15(21):80-81.
- [11] Choy M K, Celine M D, Patterson K, *et al*. A novel, noninvasive, predictive epilepsy biomarker with clinical potential[J]. *J Neurosci*, 2014,34(26):8672-8684.
- [12] 王新军,杨 卓,杨如意,等.高级糖基化终末产物受体下调对高迁移率族蛋白 B1 表达及移植瘤体积的影响[J]. *实用医学杂志*, 2017,33(14):2295-2298.

Effect of FPS-ZM1 and mNGF on the Expression of HMGB1 and TRX in the Brain of Young Rats with Epilepsy

LI Dongmei, CHEN Qiaobin, CHEN Lang, FANG Qiong

Department of Pediatrics, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

ABSTRACT: **Objective** To explore the effect of receptor for advanced glycation end products (RAGE) inhibitor FPS-ZM1 and mouse nerve growth factor(mNGF) on the expression of high mobility group box-1 (HMGB1) and thioredoxin (TRX) in the brain of young rats with chronic epilepsy induced by pentylentetrazole. **Methods** 130 clean level of male Wistar rats were randomly divided into group A (blank control group), group B (epilepsy control group), and group C (mNGF intervention group), group D (FPS-ZM1 intervention group), the rats were intraperitoneal injected with pentylentetrazol 40 mg/kg to establish an epilepsy model. After successful modeling, groups A and B were given equal doses of normal saline, group C were given mNGF 4 μ g/kg, and group D were given FPS-ZM1 1 mg/kg by intraperitoneal injection for 7 days. The hippocampus was isolated at 3, 24 and 72 h after anesthesia. The Western-blot method was used to detect the expression of HMGB1 in hippocampus, and the ELISA was used to determine and the concentration of TRX. **Results** There was no seizure in group A, the expression level of HMGB1 in hippocampus was significantly lower than that in group B at different time points, the TRX content was higher than that in group B ($P < 0.001$). The expression level of HMGB1 in group C and group D were lower than those in group B at different time points, the TRX concentration were higher than group B, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); The expression level of HMGB1 in group D was decreased at 3 and 24 h compared with group C, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); And there was no significant difference between 72 h in this two groups ($P > 0.05$).

Conclusion Both FPS-ZM1 and mNGF could reduce the brain injury in young epileptic rats, and its possible mechanism was to reduce the cerebral inflammatory reaction and oxidative stress.

KEY WORDS: epilepsy; FPS-ZM1; mouse nerve growth factor; HMGB1 protein; TRX

(编辑:何佳凤)