

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.36.014

癫痫症患者脑细胞线粒体代谢功能研究*

吕云利¹ 赵波¹ 姚向荣¹ 廖军¹ 刘超² 曾乐平^{2△}

(1 兰州军区兰州总医院安宁分院神经内科 甘肃 兰州 730070;

2 中南大学基础医学院人体解剖学与神经生物学系 湖南 长沙 410013)

摘要 目的: 探讨人类大脑中主要的抑制性神经递质 GABA(γ -氨基丁酸)对癫痫患者大脑代谢的作用。**方法:** 二组接受癫痫部位颅内监测的患者: 手术治疗的海马区癫痫症患者(MTLE)和新皮质区(非海马区癫痫)癫痫症患者。在颅内监测过程中使用体内微量透析法监测胞外 GABA(ecGABA)。术前使用体内核磁共振成像技术检测 N-乙酰天冬氨酸(NAA)与肌酸(NAA/Cr)的比例。使用标准方法进行神经病理学和海马体积检测。**结果:** 在新皮质区组的海马区内, ecGABA 的升高与 NAA/Cr 的升高相关($R=+0.70$, $P<0.015$, $n=12$), 而在 MTLE 组的海马区中, ecGABA 的升高是由 NAA/Cr 的下降所引起的($R=0.94$, $P<0.001$, $n=8$)。在 MTLE 组, ecGABA 的升高和 NAA/Cr 的降低皆与神经胶质细胞数的增多有关(分别为 $R=+0.71$, $P<0.01$, $n=12$ 和 $R=0.76$, $P<0.03$)。二组中 ecGABA 的浓度和海马体积均没有明显的相关性。**结论:** 在癫痫症中, ecGABA 的升高是由一系列的代谢功能变化引起的。在癫痫部位以外, ecGABA 和 NAA/Cr 同步升高; 而在癫痫部位, 线粒体功能的下降却伴随着 ecGABA 的升高。

关键词: 癫痫; GABA; NAA; 微量透析

中图分类号: R742.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)36-7056-04

Study on the Metabolism of Brain Cells Mitochondria Function in Epilepsy Patients*

LV Yun-li¹, ZHAO Bo¹, YAO Xiang-rong¹, LIAO Jun¹, LIU Chao², ZENG Le-ping^{2△}

(1 Department of Dermatological, Anning Branch of Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of PLA, Lanzhou, Gansu, 730070, China; 2 Department of Anatomy and Neurobiology, School of Basic Medical Science, Central South University, Hunan, Changsha, 410013, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the inhibitory neurotransmitter GABA mainly in the human brain (GABA) on cerebral metabolism in patients with epilepsy. **Methods:** 2 groups of patients with epilepsy received intracranial monitoring: operation treatment of hippocampal epilepsy (MTLE) and cortex (non hippocampal epilepsy) in patients with epilepsy. In vivo microdialysis monitoring of extracellular GABA (ecGABA) was applied in the process of intracranial monitoring. In vivo nuclear magnetic resonance imaging technique was used for the detection of N-acetyl aspartic acid(NAA) and creatinine(NAA/Cr) ratio. While standard method was used to detect neuropathology and hippocampal volume. **Results:** In the group of new cortex hippocampus, the evaluation of NAA/Cr was associated with that of ecGABA($R=+0.70$, $P<0.015$, namely, $n=12$), while in group MTLE of the hippocampus, the increase of ecGABA was caused by the decrease of NAA/Cr ($R=0.94$, $P<0.001$, $n=8$). In MTLE group, both the evaluation of ecGABA and the reduction of NAA/Cr were related to the increase of glial cell number($R's +0.71=P<0.01$, namely, $n=12$ and $R's = 0.76$, $P<0.03$). The concentration of EcGABA had no obvious correlation with hippocampal volume in either group. **Conclusion:** In epilepsy, the increase of ecGABA is caused by a change in a series of metabolic function. In epilepsy outside the site, ecGABA and NAA/Cr synchronously increase; and in epilepsy parts, decrease of mitochondrial function is accompanied by the increase of ecGABA.

Key words: Epilepsy; GABA; NAA; Microdialysis

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

Article ID: 1673-6273(2014)36-7056-04

前言

研究表明, 神经递质 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的神经传导功能与线粒体功能及代谢功能有关。本研究中, 我们分析了癫痫患者海马区中胞外 ecGABA 的释放量

与线粒体功能之间的关系。所有患者均接受颅内癫痫部位监测, 但在颅内监测之前, 患者先接受核磁共振成像和海马体积测定。在颅内监测期间, 通过微量透析法测定 ecGABA 水平, 这些发作期间的数据在患者清醒时获取。所有数据均在患者接受介入性手术治疗之前获得。体外研究 NAA 发现, NAA 由神

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81100663)

作者简介: 吕云利(1964-), 男, 主任医师, 主要研究方向: 脑血管疾病, 电话: 18153996665, E-mail: rikki1980@163.com

△ 通讯作者: 曾乐平, 博士, 主要从事神经元损伤与修复, E-mail: zenglp0205@csu.edu.cn

(收稿日期: 2014-09-01 接受日期: 2014-09-20)

神经元线粒体特异性合成,且与神经元线粒体中的ATP合成相关。由于星形细胞中肌氨酸的水平很高,且在癫痫中相对保守,NAA/Cr值异常常被用作定位癫痫部位的指标。这些来自于癫痫部位与非癫痫部位的数据可用于评估GABA的病理生理学关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

24例患者,年龄在18至45岁之间,接受海马区探针植入,以监测其癫痫发作时海马区的参与程度。在24例癫痫症患者中,有12例(其中有6例女性患者)新皮质区癫痫患者和12例(其中有5例女性患者)海马区癫痫患者。在12例新皮质区癫痫患者中,有11例最终确定来源于颞叶新皮质区,1例来源于枕叶新皮质区。在新皮质区癫痫患者中,监测其发病半球同侧的海马。由于2-丙基戊酸钠对脑GABA水平有影响,因而排除使用该药的患者。对于12例进行海马切除的患者,有7例为海马硬化,5例神经元丢失少于40%,疑似海马癫痫。另收集了42例(男23例,女19例)年龄相当(18-50岁)的健康人的MRS数据作为正常对照。本实验经相关伦理委员会批准,且均签署知情同意书。

患者均在颅内监测前3个月内接受核磁共振成像,所有颅内监测(icEEG和微量透析)均在临床上评估认定为癫痫发作期的5-10天内进行。如果临床上癫痫定位成功,即在颅内监测后立即进行切除手术,或者,在4-6周后再进行二次手术。自发性癫痫被证实为海马区发病的患者要切除致癫痫的中间颞叶和连接,对切除的样本进行神经病理学评估^[9]。

1.2 微量透析和HPLC

微量透析法:将微量探针插入深部电极。通过立体定向神经导航系统将这种结合探针植入海马区。植入24h后进行MRI/CT扫描以确定探针的位置。在加护病房恢复1-2天后,对患者进行连续的颅内脑电图(intracranial EEG, icEEG)和视听监测。通常在术后3-5天停用抗癫痫药物。对患者持续监测7-14天,直至获得足够的癫痫发作次数以定位癫痫发作部位。在植入后3-5天开始进行微量透析试验。在获取数据的过程中患者还要像术前一样用药。使用微量透析法检测发作期间颅内的GABA水平。使用便携式CMA107注射泵以2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速率注入无菌的人工脑脊液并持续注射1h以达到稳定状态。以2-氨基-N-缬氨酸为标准品,BAS和ODS柱分析2 μL 样品中的GABA水平。使用二次多项式回归分析法得到基础GABA水平^[10]。GABA水平分析采用非高斯分布法,需对数据进行对数转换。

1.3 核磁共振(MRS)

1H核磁共振成像:所有数据由一台带有1H TEM线圈的全身4T Varian Inova成像仪获得。通过翻转复原梯度回波获得Scout图像。从偏离矢状面上沿颞平面确定三重斜肌海马脑片。在scout成像后,对双侧海马使用一层,两层或三层垫片3D定位填补法。数据分析:通过追踪海马边界、计算中线及重建以海马中线为中心的海马长度的四像素图像来分析海马区数据。通过在导管水平上、重建2像素前层和1像素后层以聚焦像素#2,来选择位置。使用余弦滤波器限制点扩散函数在1cc有效

样品量内,进行立体重建。将1H数据定位到依比例确定的共振谱域中。由于微量透析探针在不同的病例间略有差异,为提供连续的MR数据比较,数据应采用海马成型点#1到#4的平均值。

1.4 神经元和神经胶质细胞的神经病理学

中后水平上的海马冠状缝切面被用于定量形态学检测。6mm厚的石蜡切片进行苏木素和伊红染色、勒克司坚牢蓝或尼尔斯染色,按现有的方法对神经元进行计数。神经胶质细胞计数,以间隔覆盖海马的冠部,将多重薄层沿侧脑室下角水平轴垂直地画上多条细线,间隔1,250 μm ,以覆盖整个海马冠状缝切面。计数100 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ 的单位面积内的星形细胞和少突胶质细胞数。当计数单位内的神经胶质细胞计数完毕,沿垂直线连续移动计数单位继续计数。

1.5 统计学分析

组间差异采用双侧t-检验,必要时采用多重比较校正。由于非正态分布的EC GABA浓度要与正态分布的成像数据和神经病理学数据进行比较,因此在分析GABA数据前应对GABA数据进行对数转换。使用Pearson分析相关性, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

手术治疗的MTLE组中,其ecGABA的平均浓度为 $375 \pm 454 \text{ nM}$ (同侧海马,12例),在新皮质区癫痫组(非癫痫海马,12例)中,其平均浓度为 $542 \pm 553 \text{ nM}$,二组间无显著性差异。

图1为典型的scout图像,显示了海马部位和海马的重建谱。MTLE组的同侧海马NAA/Cr比率(8例)均值为 0.87 ± 0.07 ,而在对照组中,同时检测其左、右侧海马(共有42例),其NAA/Cr比率均值为 1.27 ± 0.12 ,两组之间具有显著性差异($P < 0.001$)。新皮质区癫痫组(12例)的NAA/Cr比率均值为 1.25 ± 0.30 ,与对照组之间无明显差异($P > 0.05$),但与MTLE组的NAA/Cr值有显著性差异($P < 0.02$)(Holm-Sidak多重比较校正)。MTLE组中ecGABA的升高与NAA/Cr的降低密切相关($R = -0.94, P < 0.001$)(图2)。在非-MTLE组中,ecGABA的升高与NAA/Cr的升高直接相关($R = +0.70, P < 0.015$)。无论是在癫痫部位内还是在癫痫部位外,ecGABA水平的变化均与线粒体功能显著相关。图2结果显示,尽管MTLE组和非MTLE组的ecGABA水平相近,但对其回归数据的95%可信区间进行比较发现,二组与线粒体功能的关系明显不同。MTLE组中神经胶质细胞数与ecGABA水平之间存在明显正相关关系($R = +0.71, P < 0.01$)(图3),而神经元数量和ecGABA水平之间却没有明显的相关关系。

3 讨论

手术治疗的MTLE患者有一个损伤相关的过程,导致神经胶质细胞数量的增加与ecGABA水平的升高和NAA/Cr比值降低密切相关,而ecGABA水平和NAA/Cr比值之间的负相关往往更为紧密($R = 0.94, P < 0.001$)。在统计学上,这意味着这些变量中任何一个的变异都能很好地反映其他参数的变化,即在癫痫发病部位(推测的损伤部位)内,细胞外GABA和线粒体功能变化在很大程度上是一致的或相同的过程。由于只是相关

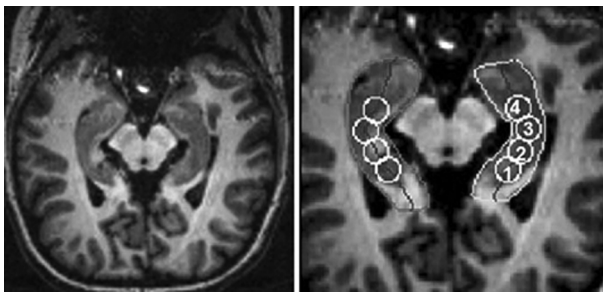


图 1 左, 颞平面上的 Scout 图; 右, 海马区容量成分的位点图。相关性分析中, 微量透析结果与 NAA/Cr 测量值来源于相同的海马区, 取 4 个容量成分位点上的平均值

Fig. 1 Scouts showing (left panel) the location of study taken along the planum temporale and (right panel) the loci of the hippocampal voxels. For the correlational analyses, the same (right or left) hippocampus from which microdialysis data were acquired was also used for NAA/Cr measurements, as an average of the hippocampal voxels loci 1-4

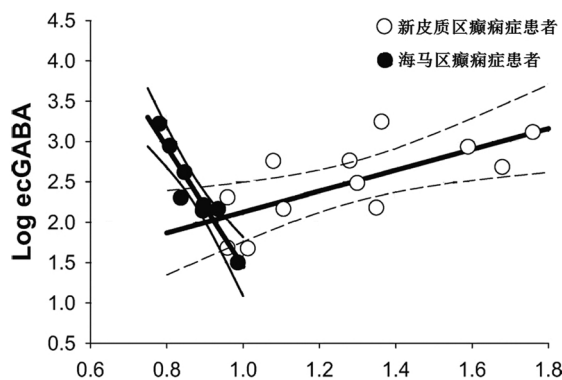


图 2 MTLE 和新皮质区癫痫患者的基础 ecGABA 水平与海马 NAA/Cr 比值之间的相关性分析, 图中同时标出出各组的 95% 可信区间

Fig. 2 Plot showing correlation between log basal ecGABA with hippocampal NAA/Cr from MTLE patients and from neocortical epilepsy patients. Individual regression lines are shown for each group with 95% confidence intervals

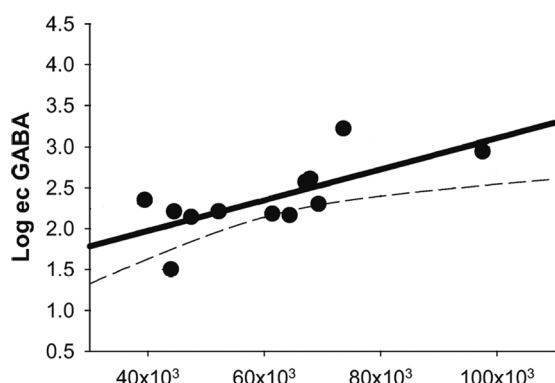


图 3 基础 ecGABA 水平与海马区胶质细胞数之间的相关性分析 ($R=+0.79, P<0.02$)

Fig. 3 Plot showing correlation between log basal ecGABA with hippocampal glial count

性分析, 故还无法确定 ecGABA 水平, 线粒体功能和损伤三者之间的因果关系之间。近年有大量的关于神经化学物质和神经生理学损伤方面的研究将代谢功能与 GABA 水平特异性联接在一起, 如 Luan G 和 Liang LP 等人^[11-14]的研究表明, 因损伤引

起的脂质过氧化产物会抑制 TCA 循环酶琥珀酸半醛脱氢酶 (SSAD), 该产物在代谢过程中能降解 GABA, 导致 TCA 循环数减少和 GABA 清除的减少。电生理学数据表明, 在损伤和转运氯化物功能异常的环境下, ecGABA 可作为一种兴奋剂, 进一步传播癫痫发作相关的损伤。虽然这些数据无法详细说明癫痫发病区域会出现哪些损伤过程, 但同侧海马中 ecGABA 水平和 NAA/Cr 比值之间的关系与非 MTLE 组中 ecGABA 的相关性显然不同。

在新皮质区癫痫患者和癫痫发病部位以外的区域, ecGABA 水平与 NAA/Cr 比值之间的关系是明显正相关的 ($R=+0.70, P<0.015$), 表明了 ecGABA 随着 NAA/Cr 比值的升高而升高, 这与在 MTLE 组中二者之间的相关性有着明显的差异。在新皮质区患者中, 研究的海马区为皮质癫痫发病区的同侧海马, 因此, 可作为近邻传播的一个位点。然而, 由于并非是癫痫发作部位, 所以这些数据仅仅是概念上与 P Mayr 等人^[15]的研究结果相似。他们发现, 在癫痫发作部位之外 (枕叶), 若癫痫病症得到有效控制, 患者的枕叶组织中 GABA 水平更高。同样地, 这些数据也不能确定 ecGABA 和线粒体功能之间的特定关系^[16]。但由于这些数据是在相对健康的组织中得到的^[17,18], 所以这些参数之间的生理学关系与癫痫部位的参数关系似乎并不完全相同; 健康大脑中升高的 ecGABA 的一个潜在的来源可能是通过可逆的 GABA 转运体 GAT-1 产生的^[19,20]。

总之, 我们的结果与 Mayr 等的结果较为一致。他们认为 γ -氨基丁酸能药物是通过抑制癫痫传播而不是降低癫痫发作位点的兴奋性来治疗癫痫症的。由于在癫痫部位以外的 GABA 升高与线粒体功能的改善密切相关, 因此这种假设是可行的, 这在癫痫症已很好地得到控制的患者中也得到了验证。在实践水平上, 这些数据也表明了 GABA/NAA 比值有利于鉴定癫痫发病部位。例如, 一些病变中会出现 NAA/Cr 比值下降 (如神经退行性病变和神经脱髓鞘疾病等), 然而在 NAA/Cr 降低的情况下 GABA 升高可能是癫痫发病部位的一个特异性指标。

参考文献 (References)

- [1] Azakli H, Gurses C, Arikian M, et al. Whole mitochondrial DNA variations in hippocampal surgical specimens and blood samples with high-throughput sequencing: A case of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis[J]. Gene, 2013, 529(1): 190-194
- [2] Smeland OB, Hadera MG, McDonald TS, et al. Brain mitochondrial metabolic dysfunction and glutamate level reduction in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(7): 1090-1097
- [3] Rowley S, Patel M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 62(34): 121-131
- [4] Sarnat H, Flores-Sarnat L, Crino P, et al. Hemimegalencephaly: foetal tauopathy with mTOR hyperactivation and neuronal lipidosis[J]. Folia Neuropathol, 2012, 50(4): 330-345
- [5] Qin Zhe, Tian Qing-hua, Yao Li-fen. Expression of connexin 32 gap-junction proteins in medically intractable temporal lobe epilepsy in humans [J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2013, 30(9): 804-808
- [6] Carver CM, Wu X, Gangisetty O, et al. Perimenstrual-Like Hormonal Regulation of Extrasynaptic δ -Containing GABAA Receptors

- Mediating Tonic Inhibition and Neurosteroid Sensitivity [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(43): 14181-14197
- [7] Napoli E, Hung C, Wong S, et al. Toxicity of the flame-retardant BDE-49 on brain mitochondria and neuronal progenitor striatal cells enhanced by a PTEN-deficient background[J]. *Toxicol Sci*, 2013, 132(1): 196-210
- [8] Tang Ji-hong, Qi Yu-feng, Zhu Yu-xia, et al. Effects of clonazepam pretreatment on expression of γ -aminobutyric acid A receptor $\gamma 2$ subunit of hippocampus in epileptic rats [J]. *Journal of Clinical Neurology*, 2013, 26(3): 195-197
- [9] Yang X, Wang S, Lin Y, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition protects epileptic hippocampal neurons from apoptosis via suppressing Akt-mediated apoptosis-inducing factor translocation in vitro[J]. *Neuroscience*, 2013, 231(34): 353-362
- [10] Koyama R. Cellular and molecular mechanisms underlying aberrant network reorganization in the epileptic brain [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2014, 134(11): 1171-1177
- [11] Luan G, Zhao Y, Zhai F, et al. Ketogenic diet reduces Smac/Diablo and cytochrome c release and attenuates neuronal death in a mouse model of limbic epilepsy[J]. *Brain Res Bull*, 2012, 89(3-4): 79-85
- [12] Mishra AM, Bai X, Motelow JE, et al. Increased resting functional connectivity in spike-wave 12.epilepsy in WAG/Rij rats[J]. *Epilepsia*, 2013, 54(7): 1214-1222
- [13] Liang LP, Waldbaum S, Rowley S, et al. Mitochondrial oxidative stress and epilepsy in SOD2 deficient mice: attenuation by a lipophilic metalloporphyrin[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(3):1068-1076
- [14] Ni Wen-jie, Zhao Li-xin, Duan Shu-qin, et al. Effects of Nuclear Factor-kappa B Expression in Hippocampal Nerve Cells of Epileptic Rats through Dazhen Acupuncture Manipulation on Du Meridian[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease*, 2014, 12(4): 471-474
- [15] Mayr JA, Zimmermann FA, Fauth C, et al. Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation[J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 89(6): 792-797
- [16] Deng Y, Wang M, Jiang L, et al. A comparison of extracellular excitatory amino acids release inhibition of acute lamotrigine and topiramate treatment in the hippocampus of PTZ-kindled epileptic rats[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2013, 9(6): 1123-1128
- [17] Cordelli DM, Pellicciari A, Kiriazopoulos D, et al. Epilepsy in Mowat-Wilson syndrome: is it a matter of GABA? [J]. *Epilepsia*, 2013, 54(7): 1331-1332
- [18] Feldmann M, Asselin MC, Liu J, et al. P-glycoprotein expression and function in patients with temporal lobe epilepsy: a case-control study [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(8): 777-785
- [19] Christian CA, Herbert AG, Holt RL, et al. Endogenous positive allosteric modulation of GABA (A) receptors by diazepam binding inhibitor[J]. *Neuron*, 2013, 78(6): 1063-1074
- [20] Abbasian M, Sayyah M, Babapour, et al. Intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide increases gene expression of connexin32 gap junction in rat hippocampus[J]. *Basic Clin Neurosci*, 2013, 4(4): 334-340

(上接第 7167 页)

- [16] Wang S, Zhang C, Wang JP, et al. Development of colloidal gold-based flow-through and lateral-flow immunoassays for the rapid detection of the insecticide carbaryl Anal [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 546(2): 161-166
- [17] de Souza MQ, Galdino AS, Dos Santos JC, et al. A recombinant multi-epitope protein for hepatitis B diagnosis [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013, Article ID 148317
- [18] Zhang L, Meng H, Han X, et al. The relationship between HBV serum markers and the clinicopathological characteristics of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis (HBV-GN) in the northeastern chinese population[J]. *Virol J*, 2012, 9(200): 1-9
- [19] Akinbami AA, Oshinaike OO, Dosunmu OA, et al. Seroprevalence of hepatitis B e antigen (HBe antigen) and B core antibodies (IgG anti-HBcore and IgM anti-HBcore) among hepatitis B surface antigen positive blood donors at a Tertiary Centre in Nigeria [J]. *BMC Res Notes*, 2012, 5(167): 1-5
- [20] Wang XJ, Zhan WB, Xing J. Development of dot-immunogold filtration assay to detect white spot syndrome virus of shrimp [J]. *J. Virol Methods*, 2006, 132(1-2): 212-215
- [21] Xiang X, Tianping W, Zhigang T. Development of a rapid, sensitive, dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis: a colloidal dye immunofiltration assay[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 280(1-2): 49-57