

• 临床检验研究论著 •

癫痫持续状态患者神经元损伤与氧化应激的关系

肖 胜¹, 陈 婧^{2△}, 汪宏良², 肖劲松³

(湖北省黄石市中心医院: 1. 神经科, 2. 检验科 435000; 3. 武汉大学中南医院神经科, 湖北武汉 430071)

摘要:目的 探讨癫痫持续状态(SE)患者神经元损伤与氧化应激的关系。方法 以 30 例 SE 患者(SE 组)为研究对象, 检测其在癫痫发作 6 h 内的血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、8-羟基脱氧鸟苷酸(8-OHdG)及丙二醛(MDA)水平; 以 30 例健康者作为对照组。结果 SE 组血清 NSE 水平(26.98±4.16 ng/mL)高于对照组(16.34±3.11 ng/mL), T-SOD(77.22±18.42 U/mL)低于对照组(104.53±15.99 U/mL), 8-OHdG(527.36±63.94 pg/mL)高于对照组(334.09±57.51 pg/mL), MDA(10.58±1.39 nmol/mL)高于对照组(5.33±1.76 nmol/mL)($P<0.001$)。SE 组血清 NSE 水平与 T-SOD 呈负相关($r=-0.85, P<0.001$), 与 8-OHdG、MDA 呈正相关, 相关系数分别为 0.74 和 0.86($P<0.001$)。多元逐步回归分析显示, T-SOD、8-OHdG、MDA 对 NSE 有显著影响, 标准回归系数分别为 -0.474、0.055、2.870($P<0.01$)。结论 SE 患者体内存在氧化系统和抗氧化系统失衡, 氧化应激可能参与了癫痫发作的病理生理过程, 也是造成 SE 神经元损伤原因之一。

关键词:癫痫持续状态; 神经元特异性烯醇化酶; 超氧化物歧化酶; 8-羟基脱氧鸟苷酸; 丙二醛

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)06-0702-02

Relationship between injuries of neuron and oxidative stress in patients with status epilepticus

Xiao Sheng¹, Chen Jing^{2△}, Wang Hongliang², Xiao Jinsong³

(1. Department of Neurology, 2. Department of Clinical Laboratory Medicine, Huangshi Central Hospital, Huangshi Hubei 435000, China; 3. Department of Neurology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan Hubei 430071, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between injuries of neuron and oxidative stress in patients with status epilepticus(SE). **Methods** Serum levels of neuron specific enolase(NSE), total superoxide dismutase(T-SOD), 8-hydroxy-guanine(8-OHdG) and malondialdehyde(MDA) were detected in 30 cases of patients with SE(SE group) within 6 h after epileptic attack. 30 cases of healthy subjects were enrolled as control group. **Results** Serum levels of NSE, 8-OHdG and MDA in SE group were 26.98±4.16 ng/mL, 527.36±63.94 pg/mL and 10.58±1.39 nmol/mL, which were respectively higher than 16.34±3.11 ng/mL, 334.09±57.51 pg/mL and 5.33±1.76 nmol/mL in control group($P<0.001$), but T-SOD level(77.22±18.42 U/mL) was lower than control group(104.53±15.99 U/mL) ($P<0.001$). In SE group, NSE was negatively correlated with T-SOD($r=-0.85, P<0.001$), but positively correlated with 8-OHdG and MDA, correlation coefficients of which were 0.74 and 0.86, respectively($P<0.001$). Serum levels of T-SOD, 8-OHdG and MDA exerted significant effect on NSE, as demonstrated by multivariate stepwise regression analysis($P<0.01$). **Conclusion** Oxidative stress might play a role in epileptic attack and might be an important risk factor in neuron injuries of SE.

Key words: status epilepticus; neuron specific enolase; superoxide dismutase; 8-hydroxy-guanine; malondialdehyde

癫痫持续状态(status epilepticus, SE)可因内环境紊乱、多器官系统功能衰竭而危及患者生命或导致永久性脑损害而致残。研究发现, SE 可导致机体耗氧量增加、呼吸暂停和血管舒缩功能异常而引发脑缺血、缺氧反应, 经氧化性损伤而导致神经组织损伤^[1]。神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)作为反映脑神经元损伤的理想指标, 其与癫痫的关系日益受到关注^[2-3]。本研究拟通过测定 SE 患者血清 NSE、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、8-羟基脱氧鸟苷酸(8-hydroxy-guanine, 8-OHdG)以及丙二醛(malondialdehyde, MDA)等氧化应激指标的水平, 探讨氧化应激在 SE 导致神经元损伤过程中可能的作用机制, 为减少神经元损伤提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 1 月至 2011 年 6 月本院神经科收治的 SE 患者 30 例(SE 组), 发作形式均为全面性强直阵挛, 男 21 例、女 9 例, 年龄 19~78 岁, 平均 42.5 岁; 均符合 2001 年国

际抗癫痫联盟(International League Against Epilepsy, ILAE)制定的癫痫发作分类标准; 症状性癫痫 22 例(脑外伤后遗症 9 例、病毒性脑炎 3 例、脑卒中后遗症 7 例、颅内肿瘤术后 3 例), 特发性(隐源性)癫痫 8 例。同期本院体检健康者 30 例(对照组), 性别、年龄与 SE 组相匹配, 均无肿瘤、高血压、颈椎病、动脉粥样硬化及全身系统性疾病。

1.2 方法 以无抗凝剂采血管采集受试者静脉全血 5 mL, 室温静置 1 h 后 4℃条件下 4 000 r/min 离心 10 min, 取血清标本用于检测。SE 组采血时间为 SE 发作后 6 h 内。NSE 和 8-OHdG 检测采用酶联免疫吸附法(ELISA), 试剂盒分别购自北京邦定生物医学公司和美国 Cayman Chemical 公司, RT6000 型酶标仪购自深圳雷杜生命科学有限公司; T-SOD、MDA 检测采用比色法, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。各项操作严格按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS15.0 统计软件进行处理; 组间比较采用 t 检验, NSE 水平与氧化应激自

△ 通讯作者, E-mail: elitechj@126.com。

变量的相关性分析采用 Pearson 相关分析,影响 NSE 水平的多因素分析采用多元线性回归分析;显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 各指标检测结果 SE 组和对照组血清 NSE、T-SOD、8-OHdG 和 MDA 水平比较见表 1。SE 组血清 NSE、8-OHdG、MDA 水平高于对照组, T-SOD 水平低于对照组 ($P < 0.001$)。

表 1 各组血清 NSE、T-SOD、8-OHdG 和 MDA 水平的比较(±s)

组别	NSE (ng/mL)	T-SOD (U/mL)	8-OHdG (pg/mL)	MDA (nmol/mL)
SE 组	26.98±4.16	77.22±18.42	527.36±63.94	10.58±1.39
对照组	16.34±3.11	104.53±15.99	334.09±57.51	5.33±1.76
<i>t</i> 值	11.22	8.28	12.04	18.11
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 SE 组血清 NSE 水平与氧化应激指标相关性分析 SE 组血清 NSE 水平与 T-SOD 呈负相关,与 8-OHdG、MDA 呈正相关 ($P < 0.001$),见表 2。

表 2 SE 组 NSE 与氧化应激指标的相关性分析(*r* 值)

氧化应激指标	<i>r</i> 值(下限、上限)*	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
T-SOD(U/mL)	-0.85(-0.86,-0.84)	6.76	<0.001
8-OHdG(pg/mL)	0.74(0.71,0.77)	5.47	<0.001
MDA(nmol/mL)	0.86(0.85,0.87)	7.53	<0.001

*:指 *r* 值 95%置信区间(95%CI)的下限与上限。

2.3 SE 组血清 NSE 水平与氧化应激指标多元线性回归分析 以血清 NSE 水平为因变量, T-SOD、8-OHdG、MDA 水平为自变量,多元逐步回归分析显示, T-SOD、8-OHdG、MDA 对 NSE 有显著影响,标准回归系数分别为 -0.474(95%CI: -0.530~-0.410)、0.055(95%CI: 0.047~0.062)、2.870(95%CI: 2.530~3.200), $r^2 = 0.675$, $F = 113.07$, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

氧化应激是指氧自由基(oxygen free radical, OFR)生成增加或清除减少,导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程^[4]。由于 OFR 和 ROS 具有高度化学反应性,半衰期短,因此难以直接检测。过多的 ROS 会氧化损伤各种大分子物质,如蛋白质、脂质和 DNA 等,形成相应的氧化产物,这些氧化产物能够在一定程度上反映氧化应激水平,是可用于评估机体氧化应激状态或 ROS 水平的生物标志^[5]。DNA 损伤是氧化损伤的重要表现之一。鸟嘌呤具有较高的分子轨道能级,因此当 DNA 受到 OFR 攻击时,鸟嘌呤最易被氧化修饰,所生成的 8-OHdG 是反映 DNA 氧化损伤的生物标志物^[6]。MDA 是 OFR 与细胞膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的终产物之一,其含量可间接反映 OFR 含量和氧化损伤程度。体内自由基的清除主要是依赖于内源性清除系统,如包括 SOD 在内的抗氧化剂。氧化系统和抗氧化系统失衡时, OFR 过多即可导致氧化应激。 OFR 通过与细胞不同成分发生过氧化反应,破坏细胞结构和功能^[7]。以上 3 个指标是反映氧化应激水平的最常用指标,其检测方法成熟,故本研究采用了这些氧化应激指标。

全面性强直阵挛性 SE 可引起持久性神经系统损害,易导

致边缘系统神经元损伤和凋亡,促进癫痫发展,并导致患者认知和精神障碍。研究表明, OFR 既是癫痫发作时脑内异常代谢产物,又可进一步加重脑损伤,其机制主要是通过损伤线粒体,增加脑内兴奋性神经递质的合成,促进神经元凋亡^[8]。NSE 仅存在于神经元和神经内分泌细胞中,当缺血、缺氧等因素造成脑组织损伤时,上述细胞可释放 NSE 至血液中。因此,血液 NSE 水平可反映脑组织,特别是神经元的损伤程度^[9]。

本研究以 SE 患者作为研究对象,证实 SE 患者疾病发作后 6 h 内的血清 NSE 水平均明显高于健康者 ($P < 0.001$),与国外类似研究结果一致^[10];其血清 8-OHdG 和 MDA 水平亦高于健康者,而 T-SOD 水平则 ($P < 0.001$)。相关分析显示,血清 NSE 水平与 T-SOD 水平呈负相关 ($r = -0.85$, $P < 0.001$),与 8-OHdG、MDA 水平呈正相关,相关系数分别为 0.74 和 0.86 ($P < 0.001$)。以血清 NSE 水平为因变量,以血清 T-SOD、8-OHdG、MDA 水平为自变量,多元逐步回归分析显示,自变量和因变量间有较好的依存关系,即 T-SOD、8-OHdG、MDA 水平可用于预测 NSE 水平。以上结果充分说明氧化应激参与了 SE 所致神经元损伤的病理生理过程,与 Hsieh 等^[11]的研究结果一致。

随着对自由基与 SE 所致神经元损伤相关性研究的深入,采取抗 OFR 治疗以保护神经细胞免受自由基损伤日益受到重视。已有研究表明,自由基清除剂在 SE 动物模型中可通过多种途径发挥神经保护作用^[12-14]。但以自由基清除剂保护神经组织免受 SE 损伤的临床应用尚处于试验阶段,其疗效有待进一步评价。本研究证实降低机体内 OFR 水平可能有助于减轻 SE 所致神经元损伤,可作为 SE 组合治疗方案之一,也为自由基清除剂在 SE 治疗中的应用提供了理论依据。

(志谢!感谢武汉大学 985 认知-神经信息平台提供的支持)

参考文献

- [1] Fisher RS, vall Erode Boas W, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)[J]. *Epilepsia*, 2005, 46(4): 470-472.
- [2] Palmio J, Keranen T, Alapirtti T, et al. Elevated serum neuron specific enolase in patients with temporal lobe epilepsy: a video-EEG study[J]. *Epilepsy Res*, 2008, 81(2/3): 155-160.
- [3] Luo X, Li D, Cen D, et al. Effect of intravenous immunoglobulin treatment on brain interferon-gamma and interleukin-6 levels in a rat kindling model[J]. *Epilepsy Res*, 2010, 88(2/3): 162-167.
- [4] Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis[J]. *Pathophysiology*, 2006, 13(1): 129-142.
- [5] Liu J, Wang A, Li L, et al. Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus[J]. *Seizure*, 2010, 19(3): 165-172.
- [6] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis[J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2009, 27(1): 120-139.
- [7] Lushchak VI. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2007, 72(8): 809-827.
- [8] 王志平, 孙红斌. 氧自由基在癫痫发病及治疗中的作用[J]. *实用医院临床杂志*, 2010, 7(3): 118-120.
- [9] 蒋春明, 杜建民, 刘占利, 等. r-HuEPO 对癫痫持(下转第 705 页)

203)和 76.4%(155/203);日龄大于 3 d 者阳性率分别为 7.6%(5/66)、28.8%(19/66)和 53.0%(35/66);前者游离试验、释放试验阳性率高于后者(χ^2 值分别为 14.926、13.063, $P < 0.05$)。

2.4 壮族患儿直接 Coombs 试验、游离试验、释放试验阳性率分别为 13.0%(35/269)、49.4%(133/269)和 70.6%(190/269);汉族患儿阳性率分别为 10.5%(31/295)、47.8%(141/295)、66.1%(195/295);两组阳性率比较差异无统计学意义(χ^2 值分别为 0.853、0.153、1.333, $P > 0.05$)。

3 讨论

ABO 血型系统导致的 HDN 好发生于 O 型母亲分娩的 A 或 B 型新生儿,因存在于母亲血液中的抗 A 或抗 B 抗体可与胎儿的 A 或 B 抗原发生免疫反应^[5-7]。目前尚缺乏关于少数民族新生儿 ABO 溶血病的相关报道。本研究以 269 例疑似 HDN 壮族患儿进行了 ABO 溶血三项试验检测,结果显示,当母亲血型均为 O 型时,A 型患儿直接 Coombs 试验、游离试验、释放试验阳性率均高于 B 型患儿($P < 0.05$),与相关文献报道相符^[8-9]。其原因可能是胎儿红细胞上 A 位点的抗原决定簇数量多于 B 位点,因此 A 型新生儿 HDN 发病率高于 B 型。本研究对壮族和汉族新生儿进行了 HDN 患儿血型分布及溶血三项试验检测阳性率比较,结果显示,壮族和汉族 HDN 患儿 A、B 血型分布基本相同,且各试验检测阳性率也不存在民族差异($P > 0.05$)。曾有研究报道壮族新生儿血清胆红素水平高于汉族,但差异无统计学意义,这与本组资料中壮族患儿阳性率高于汉族有一定的联系,其原因有待进一步探讨^[10]。

溶血三项试验检测是早期诊断 HDN 的金标准。直接 Coombs 试验用于检测新生儿红细胞是否受 IgG 抗体致敏,但 IgG 抗体通过胎盘进入胎儿体内后,部分被中和,故只有直接 Coombs 试验呈阳性时,临床免疫反应较轻;游离试验阳性表示有 IgG 抗体的存在,但此类抗体在新生儿出生数天后迅速减退或消失,阴性并不说明病情较轻,阳性则说明病情还有可能持续^[11];释放试验灵敏度在三项试验中最高,是诊断 HDN 的最有力证据,单项释放试验阳性即可确诊。本组资料显示,以出生 3 d 为临界点,日龄不超过 3 d 的壮族患儿新生儿溶血三项试验检测阳性率均高于日龄大于 3 d 者($P < 0.05$),说明新生儿日龄与溶血三项试验检测阳性率有很大关系,患儿越早接受检测,其阳性率越高,与文献报道一致^[12]。因此,应根据患儿临床表现,尽早(出生 3 d 内)检测溶血三项试验,并结合检

测结果做出正确诊断和及时治疗,以避免病情进一步进展。

治疗 ABO 血型系统所致 HDN 一般采用蓝光光疗、静脉注射丙种球蛋白或换血疗法。根据本研究中患儿临床表现及溶血三项试验检测结果,对出生不超过 3 d 的患儿采用静脉注射丙种球蛋白和蓝光光疗联合治疗;出生超过 3 d 的患儿中,黄疸程度较轻者采用蓝光光疗,黄疸程度较重且有换血指征者采用换血疗法,伴贫血者进行输血治疗,均取得较好疗效。

参考文献

- [1] 李笑天. 母儿血型不合的类型及特点[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2001, 17(10): 577-578.
- [2] Cianciarullo MA, Ceecon ME, Vaz F. Prevalence of immunohematologic tests at birth and incidence of hemolytic disease in the newborn[J]. Rev Assoc Med Bras, 2003, 49(1): 45-53.
- [3] Vento M, Tudela BF, Escrig R, et al. Haemolysis alters plasma flecainide levels in newborn infants[J]. Acta Paediatr, 2007, 96(3): 466-468.
- [4] Jeffery J, Sharma A, Ayling RM. Detection of haemolysis and reporting of potassium results in samples from neonates[J]. Ann Clin Biochem, 2009, 46(3): 222-225.
- [5] 李耀军, 王莉. 1 785 例孕妇血型抗体效价检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(4): 325-326.
- [6] 阮元萍, 姚翔, 陈燕. 引起胎儿和新生儿溶血性疾病的抗体研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(8): 768-769, 772.
- [7] 薛向阳, 金春子, 吕胜利. 105 例母婴血型不合的新生儿中溶血病的实验室检测结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 8(14): 67-68.
- [8] Santavy J. Hemolytic disease in the newborn-history and prevention in the world and the Czech Republic[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2010, 154(2): 147-151.
- [9] 魏鹏, 刘衍春, 刘毅, 等. 母婴 ABO 血型不配合引起的新生儿溶血病检测与讨论[J]. 现代诊断与治疗, 2007, 18(3): 143-144.
- [10] 符宝铭, 林超琼, 潘光合, 等. 219 例壮族正常足月新生儿血清胆红素的动态监测[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(16): 2250-2252.
- [11] 高志峰, 胡丽华, 雒维. 新生儿溶血病血清学检查 2 种方法的对比研究[J]. 临床血液学杂志: 输血与检验版, 2008, 21(8): 409-410.
- [12] 曹文武, 刘渝霞. 153 份母婴 ABO 血型不合新生儿溶血病血标本检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(6): 494-495.

(收稿日期: 2011-10-09)

(上接第 703 页)

续状态大鼠血清 NSE S-100 β 蛋白和 MBP 表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(1): 50-52.

- [10] Palmio J, Keranen T, Alapirtti T, et al. Elevated serum neuron-specific enolase in patients with temporal lobe epilepsy: a video-EEG study[J]. Epilepsy Res, 2008, 81(2-3): 155-160.
- [11] Hsieh PF, Hon CW, Yao PW, et al. Sesamin ameliorates oxidative stress and mortality in kainic acid-induced status epilepticus by inhibition of MAPK and COX-2 activation[J]. J Neuroinflammation, 2011, 24(8): 57.
- [12] 焦颖, 邓小龙, 李广乾. 依达拉奉对惊厥持续状态大鼠海马

IRE1mRNA 表达及神经元凋亡的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(6): 471-475.

- [13] 王海萍, 李光乾. 达拉奉预处理对惊厥持续状态幼年大鼠海马神经元保护及 IL-1 β 表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(3): 205-210.
- [14] 薛国芳, 李光来, 赵宝珍, 等. 依达拉奉对大鼠癫痫持续状态后脑自由基代谢及海马神经元凋亡的影响[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(4): 385-387.

(收稿日期: 2011-12-13)