文章编号:1000-5404(2012)10-0983-04

论著

瞬时受体电位通道蛋白3在结节性硬化症癫痫患者皮层病灶区中的表达

赵涝频[1,2],陈康宁[1],树海峰[3],余思逊[3],杨 辉[3] (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经内科[1];550002 贵阳,第一人民医院神经内科[2];400037 重庆,第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心[3])

[摘要] **目的** 研究瞬时受体电位通道蛋白3(transient receptor potential canonical channel 3,TRPC3)在结节性硬化症(tuberous sclerosis complex, TSC)癫痫患者皮层脑组织的表达与分布,探讨TRPC3离子通道参与结节性硬化致癫痫发作的可能机制。**方法** 收集自2008年6月至2010年12月手术切除并经病理检测证实是TSC癫痫患者的皮层脑组织标本12例,与7例正常对照皮层脑组织比较,通过采用Western blot、免疫组化、免疫荧光双标,检测TRPC3通道蛋白在正常脑组织与病理标本中的表达分布情况。**结果** Western blot蛋白检测结果显示,TRPC3在TSC病理标本中的相对光密度值(ROD)为(0.65±0.08),在正常脑组织(CTX)中的ROD值为(0.36±0.06),提示TRPC3在TSC标本中的表达较正常脑组织中显著增高($P<0.05$);免疫组化及免疫荧光双标结果,TRPC3在TSC病灶中免疫强度明显增高,并且特异性高表达于皮层损伤区致痫灶中的异构神经元,包括特征性的巨型细胞(giant cells, GCs)、异形神经元(dysplastic neurons, DNs)。**结论** TRPC3在结节性硬化症患者致痫皮层中表达异常增高,以及特异性的细胞分布模式可能与癫痫发病密切相关。

[关键词] TRPC3;结节性硬化症(TSC);癫痫
[中图法分类号] R741.02;R742.89;R749.17 [文献标志码] A

Expression of TRPC3 in the cortical focus of epilepsy patients with tuberous sclerosis complex

Zhao Yongpin[1,2], Chen Kangning[1], Shu Haifeng[3], Yu Sixun[3], Yang Hui[3] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, 400038, [2]Department of Neurology, First People's Hospital of Guiyang, Guiyang, Guizhou Province, 550002; [3]Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038 China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression and distribution of transient receptor potential canonical channel 3 (TRPC3) in the cortical focus of epilepsy patients with tuberous sclerosis complex (TSC), and to explore the mechanism of TRPC3 involvement in TSC-induced epileptic seizure. **Methods** Twelve cases of TSC epileptic brain tissues (TSC group) confirmed by pathological examination from June 2008 to December 2010 and seven cases of non-epileptic brain tissues (CTX group) were enrolled in our study. The expression and distribution of TRPC3 were observed by Western blotting, immunohistochemistry and immunofluorescence double labeling in these tissues. **Results** Western blot analysis showed that the TRPC3 expression was significantly higher in the TSC group than in the CTX group [relative optical density (ROD) 0.65±0.08 *vs* 0.36±0.06, $P<0.05$]. The immunohistochemistry and immunofluorescence double labeling results showed that the intensity score of TRPC3 was higher in the TSC group than in the CTX group, and TRPC3 was specifically overexpressed in the misshapen neurons of the cortical focus, including dysplastic neurons (DNs) and giant cells (GCs). **Conclusion** The abnormally increased expression of TRPC3 in epileptic cortex of TSC patients and the specific cell distribution pattern may be closely involved in the pathogenesis of intractable epilepsy.

[**Key words**] transient receptor potential canonical channel 3; tuberous sclerosis complex; epilepsy

Corresponding author: Chen Kangning, E-mail: ckn_640827@126.com

结节性硬化症(tuberous sclerosis complex, TSC)是一种常染色体显性遗传性疾病[1],主要临床表现为癫痫、智力低下和皮脂腺腺瘤(Vogt三联征)[2-3],并有超过1/3的患者发展为药物难治性癫痫,其癫痫发生的机制目前尚未阐明。近年来,癫痫被归为离子通道病的一种,研究显示癫痫发作时钙离子内流增加,TRPC作为一类可调节细胞内钙浓度非特异性阳离子通道,其功能研究备受关注[4-5]。瞬时受体电位通道蛋白3(transient receptor potential canonical channel 3, TRPC3)是非选择性阳离子通道蛋白TRP家族中的一员,主要在心肌以及中枢神经系统表达[6],参与细胞膜受体激活磷脂酶C后所介导的钙离子内流。近年有研究发现在TSC致痫病灶区的细胞中存在Ca^{2+}内流而引起的神经元电活动异常,临床病理研究也发现

[通信作者] 陈康宁,E-mail:ckn_640827@126.com

TRPC3在难治性癫痫患者颞叶组织中表达上调,因此我们推测,TRPC3可能与TSC所致的癫痫发作密切相关,而相关研究还少见报道。在本研究中,我们利用Western blot、免疫组化及免疫荧光双标检测TRPC3在结节性硬化患者病灶皮层脑组织中的表达情况,探讨其在癫痫发作中的可能作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源及临床资料

收集自2008年6月至2010年12月于新桥医院手术切除并经病理检测证实是TSC的脑组织皮层损伤区标本12例,其中男性5例,女性7例;年龄0.5~13岁,平均4.5岁。对照组正常脑组织皮层标本7例来源于因脑外伤、颅内出血需要进行颅内减压或者脑组织切除的患者。本实验经本院伦理委员会许可,获得使用人体组织的书面同意书,医疗记录仅用于研究目的。所有组织的获取与使用符合赫尔辛基申明的要求。将收集的病理标本中出血、电灼的组织除去,等渗盐水冲洗干净后一部分用甲醛溶液固定,石蜡包埋,所有载玻片经过多聚赖氨酸包被处理以防脱片,连续切取约5.0 μm的切片备用。另一部分组织液氮速冻后存入-80 ℃冰箱,用于分子生物学实验。

1.2 试剂

兔抗人TRPC3多克隆抗体购自美国Abgent公司,小鼠抗人NeuN购自美国Millipol公司,DAPI、小鼠抗人波形蛋白(Vimentin)和小鼠抗人神经丝蛋白(NF200)购自武汉博士德公司,兔抗人GAPDH单克隆抗体购自美国Cell signal公司,Cy3标记小鼠抗人神经胶质酸性蛋白(GFAP)购自美国Sigma公司,CY5标记羊抗小鼠IgG购自上海碧云天公司,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记山羊抗兔IgG购自北京中杉公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔IgG购自中杉公司;Hoechst-33258购自美国Sigma公司;羊抗兔SABC免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒及Western blot试剂盒购自武汉博士德公司。

1.3 实验方法

1.3.1 Western blot检测脑组织中TRPC3的表达 取对照组及病灶组脑组织各100 mg放入研磨器中,研磨至无肉眼可见碎片(冰上操作)。加入1 000 μl裂解液+10 μl蛋白酶抑制剂,继续研磨保证充分接触,吸取组织悬液至EP管中,冰上静置30 min,离心12 000×g,20 min,4 ℃;取上清测定蛋白浓度。将备好的样品按60 μg/道上样于10%聚丙烯酰胺凝胶(体积分数)电泳后转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜;5%脱脂牛奶(质量体积分数)室温封闭1 h,Tris-盐酸+吐温缓冲液(TBST)稀释的兔抗人TRPC3多克隆抗体(1∶300)和兔抗人GAPDH抗体(1∶1 000),4 ℃过夜;用TBST缓冲液稀释的辣根酶标记的山羊抗兔IgG(1∶3 000)孵育,室温1 h;TBST漂洗后,利用凝胶成像系统进行化学发光并记录(英国,SYNGENE公司,G:BOX凝胶成像系统)。扫描后采用Quantity One软件测定各条带(待测蛋白与内参蛋白GAPDH)的灰度值,比较二者的比值。

1.3.2 链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法免疫组织化学实验检测脑组织中TRPC3的分布 石蜡切片常规脱蜡至水,3%双氧水(体积分数)+10%甲醛(体积分数)消除内源性过氧化物酶,微波抗原修复,中火,20 min。自然冷却后正常山羊血清+0.3% Triton X-100(体积分数)室温封闭1 h,加入抗体(TRPC3,1∶500)4 ℃过夜。室温复温1 h,0.01 mol/L PBS漂洗3次,每次10 min。SABC试剂盒中山羊抗兔二抗,37 ℃孵育1 h,漂洗3次,加入SABC试剂,37 ℃孵育45 min。显色试剂为高敏感二氨基联苯胺(DAB)。苏木精复染细胞核,脱水透明封片,显微镜下观察。以上各步骤结束,均使用0.01 mol/L PBS冲洗。阴性对照取相同量的一抗稀释液代替TRPC3抗体,其余步骤同前。

1.3.3 免疫荧光双标记检测TRPC3的细胞定位 切片之前处理相同,兔抗TRPC3抗体(1∶500)分别与小鼠抗GFAP(1∶500)、小鼠抗NeuN(1∶100)、小鼠抗Vimentin(1∶50)、小鼠抗NF200(1∶100)混合后加入切片,4 ℃冰箱孵育过夜。室温复温1 h,0.01 mol/L PBS漂洗3次。CY5标记山羊抗小鼠IgG(1∶500)与FITC标记山羊抗兔IgG(1∶500)混合后加入,37 ℃孵育1 h。使用Hoechst-33258复染细胞核,避光晾干后使用抗荧光淬灭封片剂封片。使用激光共聚焦显微镜(Leica TCS-TIV,德国)扫描并拍照。免疫组化染色评估分析:每个标本选取5张切片,在200倍视野下,随机选取10个非重复区域,通过半定量"三分"模式计算染色强度,即:-,阴性(0分);+,弱阳性(1分);++ 中等(2分);+++,强阳性(3分);在选定的区域计算平均染色强度值(intensity score,IR)。此外,利用光密度(optical density,OD)测量法定量评估免疫组化结果。使用装备了数码照相机的光学显微镜(Leica,德国)获取100×视野下10个连续但不重叠区域,通过Image Pro Plus图像分析软件,分别测量阳性结果OD平均值与阴性背景OD平均值,计算二者比值即相对平均光密度值(ratio of mean optical density,ODR)。

1.4 统计学分析

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 11.1统计软件进行重复测量数据的单因素方差分析。

2 结果

2.1 Western blot检测TRPC3的表达水平

Western blot检测结果显示,在TSC病理组织和正常脑组织中,在91×10^3处均有特异性蛋白条带。TRPC3在TSC病理标本中的相对光密度值(ROD)为(0.65±0.08),在正常对照组(CTX)中的ROD值为(0.36±0.06),TRPC3条带与内参GAPDH条带灰度值之比提示,TSC病理组织中TRPC3表达较正常组织增高($P<0.05$)。见图1。

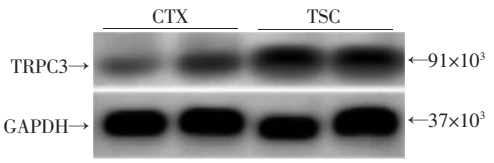
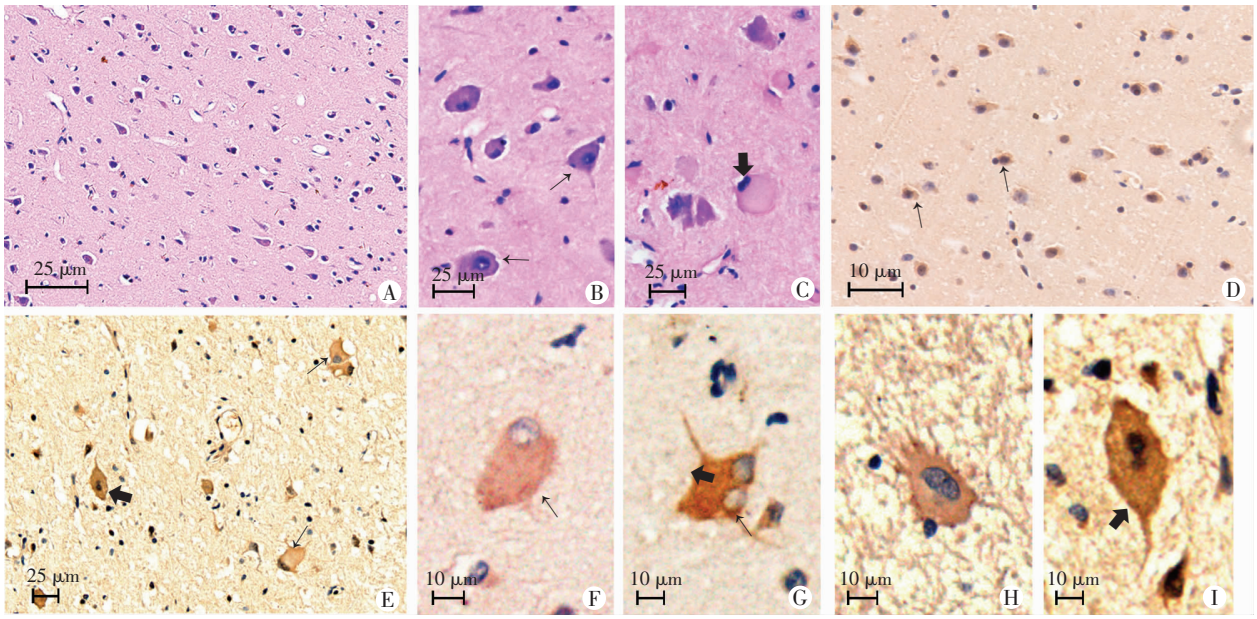


图1 Western blot检测TRPC3在TSC病理组织和正常脑组织中的表达

2.2 组织标本的HE染色鉴定以及免疫组织化学、免疫荧光双标观察TRPC3的表达

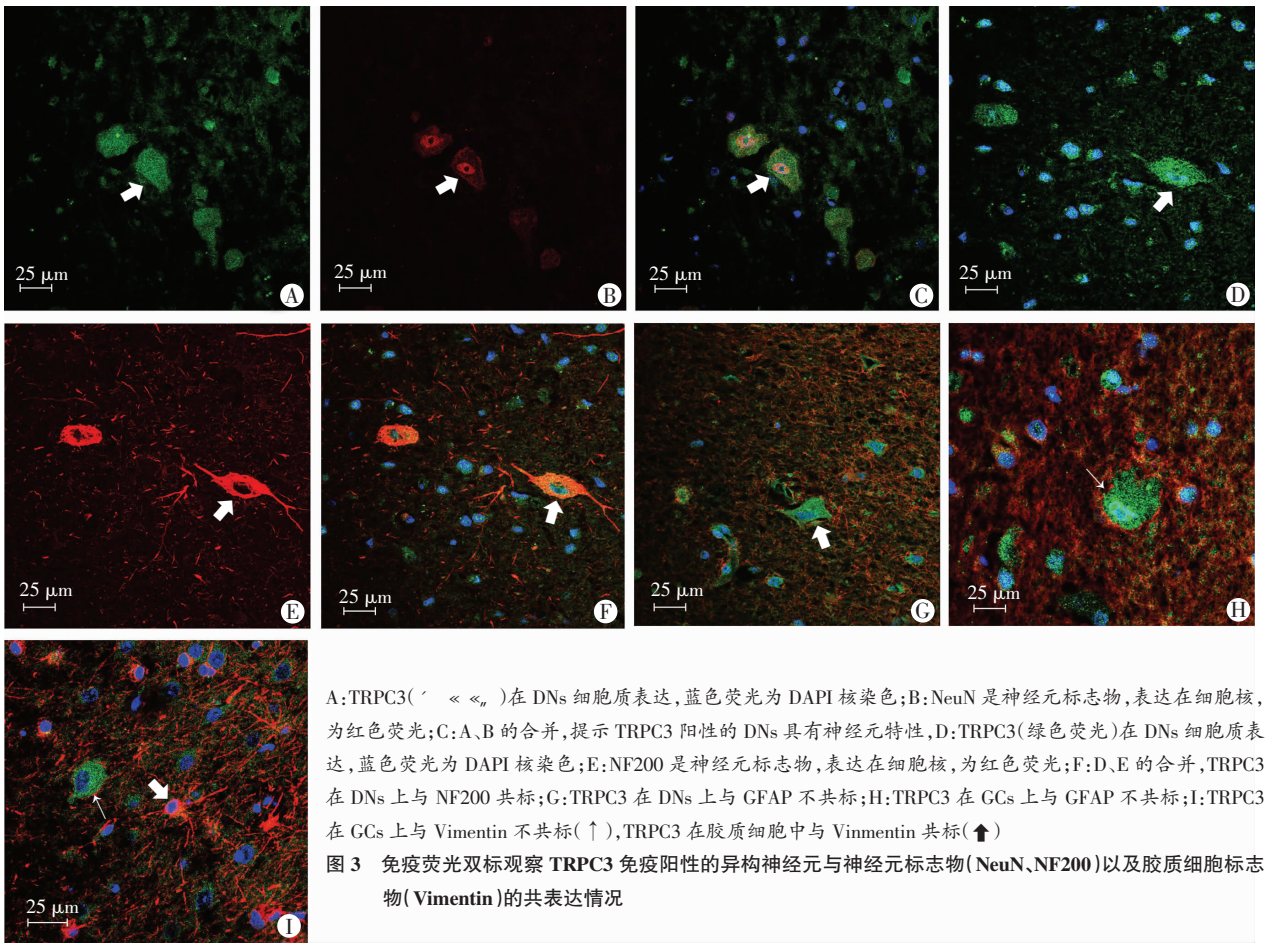
利用HE染色确定组织标本来源为正常脑组织和TSC病灶脑组织。免疫组化结果显示TRPC3在TSC病灶中平均染色强度值明显增高,并利用相对平均光密度值(ratio of mean optical density,ODR)评估免疫组化结果,提示TRPC3低度至中度表达于正常脑组织的神经元细胞,在TSC病理组织切片中,

TRPC3高度表达于 TSC 致痫皮层具有特征性的细胞,包括异形神经元(DNs)(81.4±3.7)%和巨型细胞(GCs)(79.1±2.3)%。免疫荧光双标显示,在 DNs 中 TRPC3 与神经元标志物(NeuN、NF-200)均存在共表达,TRPC3 表达阳性的胶质细胞与 Vimentin 共表达,但未观察到 TRPC3 表达阳性的 DNs 及 GCs 与胶质细胞标志物(GFAP、Vimentin)共表达。见图 2、3,表 1。



A: 正常皮层脑组织的 HE 染色;B: TSC 病理皮层脑组织 HE 染色后见异形神经元(↑);C: TSC 病理皮层脑组织 HE 染色后见巨型细胞(⬆);D: TRPC3 在正常皮层脑组织中的表达,↑所示为正常神经元;E:TRPC3 在 TSC 病理皮层脑组织中的表达,↑所示为巨型细胞,⬆所示为异形神经元; F、G:TRPC3 在巨型细胞(↑,F:单核,G:双核)上强表达;H、I:TRPC3 在异形神经元(⬆,H:多树突,I:异形树突)上强表达

图 2 组织标本的 HE 染色鉴定以及 TRPC3 在正常脑组织和 TSC 病理组织中的表达



A:TRPC3(´ « «„)在 DNs 细胞质表达,蓝色荧光为 DAPI 核染色;B:NeuN 是神经元标志物,表达在细胞核,为红色荧光;C:A、B 的合并,提示 TRPC3 阳性的 DNs 具有神经元特性,D:TRPC3(绿色荧光)在 DNs 细胞质表达,蓝色荧光为 DAPI 核染色;E:NF200 是神经元标志物,表达在细胞核,为红色荧光;F:D、E 的合并,TRPC3 在 DNs 上与 NF200 共标;G:TRPC3 在 DNs 上与 GFAP 不共标;H:TRPC3 在 GCs 上与 GFAP 不共标;I:TRPC3 在 GCs 上与 Vimentin 不共标(↑),TRPC3 在胶质细胞中与 Vinmentin 共标(⬆)

图 3 免疫荧光双标观察 TRPC3 免疫阳性的异构神经元与神经元标志物(NeuN、NF200)以及胶质细胞标志物(Vimentin)的共表达情况

表1 两种组织标本 TRPC3 免疫反应强度评分（$\bar{x} \pm s$）

标本	n	染色强度值	相对平均光密度值
TSC 病理组织	12	2.56 ± 0.29[a]	65.10 ± 4.10[a]
正常脑组织	7	1.33 ± 0.26	33.21 ± 5.60

a：$P < 0.05$，与正常脑组织比较

3 讨论

癫痫是多种病因引起大脑神经元突发性异常放电，并导致短暂的大脑功能障碍的一种慢性疾病，其发病机制迄今尚未完全阐明。探索癫痫发病机制、控制癫痫发作并保护脑细胞免受损伤一直是学者所关注的前沿课题[6]。已有的研究显示钙离子与癫痫发作之间存在密切联系，因此 TRPC 作为一类可调节细胞内钙浓度的非特异性阳离子通道，其功能研究备受关注。

TRPC 是细胞膜上一类能通透钙离子的非选择性阳离子通道，主要参与细胞膜受体激活磷脂酶 c（PLC）后所介导的钙离子内流[7]。基于序列同源性和功能相似性，哺乳动物 TRPC 被分为 TRPC1、TRPC2、TRPC4 /5、TRPC3 /6 /7 四个亚型。其中 TRPC3 广泛表达于中枢神经系统，参与众多重要的生理学功能，如神经分化、血管收缩、气道调节、淋巴细胞免疫反应及钠钙交换偶联等[8]。近期研究发现 TRPC3 在难治性颞叶癫痫患者的颞叶中高表达，提示 TRPC3 通道可能与难治性颞叶癫痫的发病有关。

既往的研究发现细胞外游离钙离子浓度的减少可能诱发脑组织中痫样动作电位，而兴奋性细胞外钙离子的减少现在被证实是由于 Ca^{2+} 通过神经元胞膜钙通道内流所致[9]。近期有研究发现在难治性癫痫患者颞叶致痫灶中 TRPC3 的表达上调，提示 TRPC3 的表达与癫痫密切相关。此外局灶性皮质发育不良（FCD）具有与 TSC 相似的病理学改变，即在病灶区出现异构神经元，而最新的研究发现 TRPC3 在皮质致痫病灶中的异构神经元上表达上调，但 TRPC3 在 TSC 上的相关表达研究还少见报道。

研究表明，TSC 皮质结节形成于胎儿发育过程中神经细胞的异常增殖、分化和迁移。这些病灶结节由多种细胞组成，包括发育异常的神经元和星形胶质细胞、巨大的神经节细胞、无方向的锥体细胞和反应性增生的星形胶质细胞，皮质结节可能是 TSC 继发癫痫的标志，巨型细胞和异形神经元可能为 TSC 的致痫细胞[10-11]。Cepeda 等[12]研究发现 DNs 在出现癫痫样放电的同时细胞内出现明显的钙波，提示细胞内钙浓度出现明显变化。本研究通过免疫组织化学、免疫荧光以及 Western blot 等方法观察发现，与对照组皮层脑组织相比，TRPC3 的蛋白水平在 TSC 癫痫患者致痫皮层脑组织中表达上调，并且特异性高表达介导了阳离子的异常流动，可能参与了 TSC 的致痫机制。

因此我们推论 TRPC3 表达上调是 TSC 引起癫痫病灶致痫细胞内钙变化的关键因素之一。

参考文献：

[1] Moshel Y A, Elliott R, Teutonico F, *et al*. Do tubers contain function? Resection of epileptogenic foci in perirolandic cortex in children with tuberous sclerosis complex [J]. Epilepsia, 2010, 51(7): 1242 - 1251.

[2] Chu-Shore C J, Major P, Camposano S, *et al*. The natural history of epilepsy in tuberous sclerosis complex[J]. Epilepsia, 2010, 51(7): 1236 - 1241.

[3] Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis[J]. Lancet, 2008, 372(9639): 657 - 668.

[4] Moran M M, Xu H, Clapham D E. TRP ion channels in the nervous system[J]. Curr Opin Neurobiol, 2004, 14(3): 362 - 369.

[5] Venkatachalam K, Zheng F, Gill D L. Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C[J]. J Biol Chem, 2003, 278(31): 29031 - 29040.

[6] 孙素真，刘芳，施荣富，等. 奥卡西平口服混悬液对特发性癫痫患儿免疫功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2011，33(9)：964 - 966.

[7] Clapham D E. TRP channels as cellular sensors[J]. Nature, 2003, 426(6966): 517 - 524.

[8] Cepeda C, Andre V M, Levine M S, *et al*. Epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia: the dysmature cerebral developmental hypothesis [J]. Epilepsy Behav, 2006, 9(2): 219 - 235.

[9] Vreugdenhil M, Wadman W J. Modulation of sodium currents in rat CA1 neurons by carbamazepine and valproate after kindling epileptogenesis[J]. Epilepsia, 1999, 40(11): 1512 - 1522.

[10] Gallagher A, Chu-Shore C J, Montenegro M A, *et al*. Associations between electroencephalographic and magnetic resonance imaging findings in tuberous sclerosis complex[J] Epilepsy Res, 2009, 87(2/3): 197 - 202.

[11] Ramsey I S, Delling M, Clapham D E. An introduction to TRP channels[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 619 - 647.

[12] Cepeda C, Andre V M, Vinters H V, *et al*. Are cytomegalic neurons and balloon cells generators of epileptic activity in pediatric cortical dysplasia? [J]. Epilepsia, 2005, 46(Suppl 5): 82 - 88.

（**收稿**：2011-12-28；**修回**：2012-02-01）

（编辑 王小寒）