论著

文章编号:1000-5404(2013)08-0712-05

TRPC5在结节性硬化症癫痫患者皮层致痫结节中的表达

徐广振,郑大海,树海峰,杨 辉 (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)

[摘要] **目的** 研究瞬时受体电位通道蛋白5(transient receptor potential canonical channel 5,TRPC5)在结节性硬化症(tuberous sclerosis complex,TSC)癫痫患者皮质中的表达与分布,探讨TRPC5在TSC癫痫发生中的可能机制。**方法** 收集新桥医院神经外科手术切除的TSC癫痫患者皮层致痫结节14例,与12例正常对照皮层(CTX)相比较,运用RT-PCR、Western blot、免疫组织化学和免疫荧光等方法检测TRPC5在致痫灶中的表达分布。**结果** TSC癫痫患者皮层致痫结节中,TRPC5在mRNA、蛋白表达水平较对照组明显升高($P<0.05$)。免疫组化结果显示,在正常皮层中TRPC5弱至中等强度表达于神经元上,偶在胶质细胞上表达,而在TSC癫痫患者皮层致痫结节中强表达于神经元上,特别是巨型细胞和异形神经元上,胶质细胞表达强度也较CTX组增高,免疫染色强度明显高于正常皮层(染色强度值:2.77±0.43 *vs* 1.64±0.56;相对光密度值:64.72±9.56 *vs* 30.34±9.43;$P<0.05$)。**结论** TRPC5表达增高可能与TSC患者癫痫发病密切相关,可能成为治疗难治性癫痫的新药物靶点。

[关键词] 癫痫;结节性硬化症;瞬时受体电位通道蛋白5

[中图法分类号] R341;R394.3;R749.17 [文献标志码] A

Expression of TRPC5 in epileptic cortical tubers of epilepsy patients with tuberous sclerosis complex

Xu Guangzhen, Zheng Dahai, Shu Haifeng, Yang Hui (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression and distribution of transient receptor potential canonical channel 5 (TRPC5) in the cortical tubers of epilepsy patients with tuberous sclerosis complex (TSC), and to explore the mechanism of TRPC5 involved in TSC-induced epileptic seizure. **Methods** Fourteen cases of TSC epileptic cortical tubers (TSC group) confirmed by pathological examination and twelve cases of non-epileptic cortices (CTX group) were collected. The expression and distribution of TRPC5 in the samples were examined by RT-PCR, Western blotting, immunohistochemical and double-labeling immunofluorescencestaining. **Results** The mRNA and protein levels of TRPC5 were significantly higher in the TSC group than those in the CTX group ($P<0.05$). The immunohistochemical results showed that TRPC5 was weakly or moderately expressed in the neurons and occasionally expressed in the glial cells in the CTX group. However, strong expression of TRPC5 was observed in the neurons, glial cells, dysplastic neurons (DNs) and giant cells (GCs) in the TSC group. The intensity of immunofluorescence was significantly higher in the TSC group than in the CTX group (intensity score: 2.77±0.63 *vs* 1.64±0.66; ratio of mean optical density 44.72±8.56 *vs* 30.34±9.43; $P<0.05$). **Conclusion** The up-regulation of TRPC5 in the cortical tubers of epilepsy patients with TSC may be closely associated with the pathogenesis of epilepsy, suggesting that TRPC5 might be a new potential drug target for the treatment of intractable epilepsy.

[**Key words**] epilepsy; tuberous sclerosis complex; transient receptor potential canonical channel 5

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071043) and the Natural Science Foundation for Young Scholars (81100975). Corresponding author: Yang Hui, Tel: 86-23-68755610, E-mail: 13808390069@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071043);国家自然科学基金青年科学基金(81100975)

[通信作者] 杨 辉,电话:(023)68755610,E-mail:13808390069@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130125.1139.006.html(2013-01-25)

结节性硬化症(tuberous sclerosis complex,TSC)是一种由 *TSC1* 和 *TSC2* 基因突变所致的常染色体显性遗传病,其在神经系统中的主要临床表现为癫痫、智力低下和自闭症等,皮质结节的病理表现为皮层结构紊乱,出现特异性神经元,此外也广泛在皮肤、肾脏、肺和肝脏等器官表现为错构瘤[1-2]。癫痫为TSC最常见的神经系统综合征,在一项对TSC继发癫痫自然病程的调查中发现,85.2% 的TSC患者有痫性发作,84.5% 的确诊为癫痫,1/3的患者发展为药物难治性癫痫,成为难治性癫痫的主要病因之一,癫痫也是导致TSC患者出现并发症和死亡的主要原因[3]。离子通道在癫痫发生过程中所发挥的作用备受关注,瞬时感受器电位(transient receptor potential canonical channel,TRPC)离子通道是位于细胞膜或细胞器膜上的一类非选择性阳离子通道,主要介导钙离子的内流,参与神经元分化、迁移和突触可塑性的过程[4],同时,对神经元存活也有重要作用[5-6]。TRPC5主要在神经系统表达,参与磷脂酶C(PLC)激活后所介导的钙离子内流[7]。钙离子内流是痫样放电的起始和维持因素,细胞内过度钙超载也会诱导神经元凋亡。那么TRPC5在TSC患者致癫痫过程中发挥怎样的作用呢?本研究采用半定量RT-PCR、Western blot、免疫组化等技术检测TRPC5在TSC患者皮层致痫结节中的表达分布情况,探讨其在TSC患者癫痫发作中可能的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源及临床资料

收集2009年9月至2012年6月新桥医院神经外科经手术切除的TSC癫痫患者皮层致痫结节14例为TSC组,其中男性6例,女性8例;年龄1~15(7.0±4.2)岁,所有患者均符合先前文献[8]报道的手术适应证。另收集同一时期新桥医院神经外科因颅脑外伤或高血压脑出血手术患者共12例,为对照组正常脑组织(control cortex,CTX),其中男性7例,女性5例,年龄15~31(24.2±4.9)岁。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,医疗记录及临床标本仅用于研究目的。所有组织的获取与使用符合赫尔辛基(Helsinki)申明的要求。采用本组之前研究中所使用的方法固定病理标本,经梯度脱水、浸蜡后进行石蜡包埋,切片厚度为7 μm,另有一部分组织经液氮速冻后存入-80 ℃冰箱,用于分子生物学实验[8]。

1.2 主要试剂及仪器

兔抗人TRPC5单克隆抗体购自英国Abcam公司;小鼠抗人神经元核蛋白(NeuN)购自美国Millipore公司;小鼠抗人Glutamate单克隆抗体、小鼠抗人GABA单克隆抗体、Cy3标记小鼠抗人神经胶质酸性蛋白(GFAP)购自美国Sigma公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗兔IgG购自北京中杉公司;Alexa Fluor 594标记山羊抗小鼠IgG购自美国Invitrogen公司;PrimeSe 1st Strand cDNA合成试剂盒购自日本TaKaRa公司;山羊抗兔SABC免疫组化试剂盒和Western blot凝胶配制试剂盒购自武汉博士德公司;S1000 PCR仪、Mini-Port电泳系统购自美国BIO-RAD公司。

1.3 RT-PCR检测TRPC5 mRNA的表达

每份样本取100 mg组织,使用Trizol一步法提取总RNA,并检测总RNA在260 nm处的光密度值计算其浓度和纯度。使用TaKaRa反转录试剂盒反转录cDNA。以1 μL cDNA产物为模板进行PCR。RT-PCR引物序列、PCR扩增产物大小见表1。选用25 μL反应体系,PCR反应条件如下:预变性94 ℃ 5 min、94 ℃ 30 s、62 ℃ 30 s、72 ℃延伸1 min,共35个循环,72 ℃终止延伸10 min。扩增产物用含Goldview的1.5% 琼脂糖凝胶电泳,上样量为6 μL,电压120 V,时间30 min,电泳完毕后用凝胶成像系统观察并照相。图像采用Quantity One软件分析各条带的灰度值。

表1 RT-PCR引物序列及PCR扩增产物大小

目的基因	引物序列	扩增产物大小
TRPC5	上游:5′-CAATCAAATACCACCAGAAAGAGTT-3′	347 bp
	下游:5′-CAATATCATCCATTCCACGACAG-3′	
β-actin	上游:5′-GCACCACACCTTCTACAATGAGC-3′	163 bp
	下游:5′-TAGCACAGCCTGGATAGCAACG-3′	

1.4 Western blot检测脑组织中TRPC5的表达

取每份组织各100 mg放入加有液氮的研钵中,充分研磨至粉末。加入1 mL裂解液和10 μL蛋白酶抑制剂,使之充分混合,吸取组织悬液至EP管中,冰上静置30 min,于4 ℃低温离心机12 000 r/min离心10 min;取上清并测定蛋白浓度。根据蛋白浓度计算上样量进行蛋白质电泳。用10%(质量体积比)SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质。用TBST稀释的兔抗人TRPC5多克隆抗体(1∶500)和兔抗人GAPDH抗体(1∶1 000),4 ℃过夜;TBST漂洗3次,每次10 min,用TBST缓冲液稀释的辣根酶标记的山羊抗兔IgG(1∶2 000)室温孵育1 h;TBST漂洗3次,每次10 min,利用凝胶成像系统进行化学发光并记录。扫描后图像采用Quantity One软件分析各蛋白条带的灰度值。

1.5 免疫组化检测脑组织中TRPC5的表达分布

石蜡切片常规脱蜡,3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,微波法抗原修复20 min,自然冷却至室温,正常山羊血清+0.3% Triton X-100,37 ℃封闭1 h,加入一抗(TRPC5,1∶400),4 ℃,过夜。室温复温1 h,PBS漂洗3×10 min;37 ℃孵育山羊抗兔二抗1 h,PBS漂洗3×10 min;37 ℃孵育SABC试剂1 h,PBS漂洗3×10 min。高敏感二氨基联苯胺(DAB)显色试剂显色。苏木精复染细胞核,梯度脱水透明后用中性树胶封片,显微镜下观察并采图。阴性对照取相同量的一抗稀释液代替TRPC5抗体,其余步骤同上。免疫组化染色评估分析参照同组研究采用的方法[8]。

1.6 免疫荧光双标检测TRPC5的细胞定位

分别将兔抗TRPC5抗体(1∶400)与小鼠抗NeuN(1∶100)、小鼠抗GFAP(1∶500)、小鼠抗Glutamate(1∶500)、小鼠抗GABA(1∶100)等一抗混合加入一抗稀释液后加到切片上,4 ℃孵育过夜。37 ℃复温1 h,0.01 mol/L PBS漂洗3×10 min。山羊抗小鼠(1∶500)与FITC标记山羊抗兔IgG(1∶500)混合加入二抗稀释液后37 ℃避光孵育切片1 h,0.01 mol/L PBS漂洗3×10 min。经DAPI复染细胞核,0.01 mol/L PBS漂洗3×10 min,避光晾干,用抗荧光淬灭封片剂封片。使用荧光显微镜观察

(Leica,德国),激光共聚焦显微镜(Leica TCS-TIV,德国)扫描拍照。

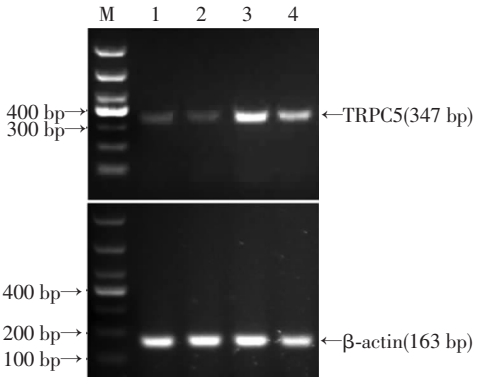
1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 18.0软件对测量的数据进行 t 检验。

2 结果

2.1 正常对照组与TSC组TRPC5 mRNA的表达水平

RT-PCR结果显示,在CTX组和TSC组,都有TRPC5 mRNA的表达(图1)。通过对RT-PCR结果的统计学分析,TSC组TRPC5的相对光密度值(ROD)为1.26±0.12,在CTX对照组中的ROD值为0.62±0.11($P<0.01$)。结果提示TRPC5 mRNA在TSC皮层致痫结节中的表达上调。

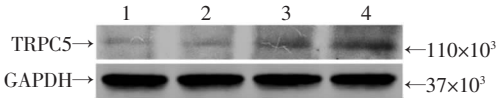


M:DNA标准;1、2:CTX组;3、4:TSC组

图1 RT-PCR检测各组TRPC5的mRNA表达

2.2 正常对照组与TSC组TRPC5蛋白的表达水平

在所有实验组均可观察到免疫反应阳性蛋白质条带,如图2所示。相对灰度分析结果显示,TSC组TRPC5的ROD为0.55±0.05,在CTX对照组中的ROD值为0.36±0.04($P<0.05$)。结果提示TRPC5蛋白在TSC皮层致痫结节中表达上调。

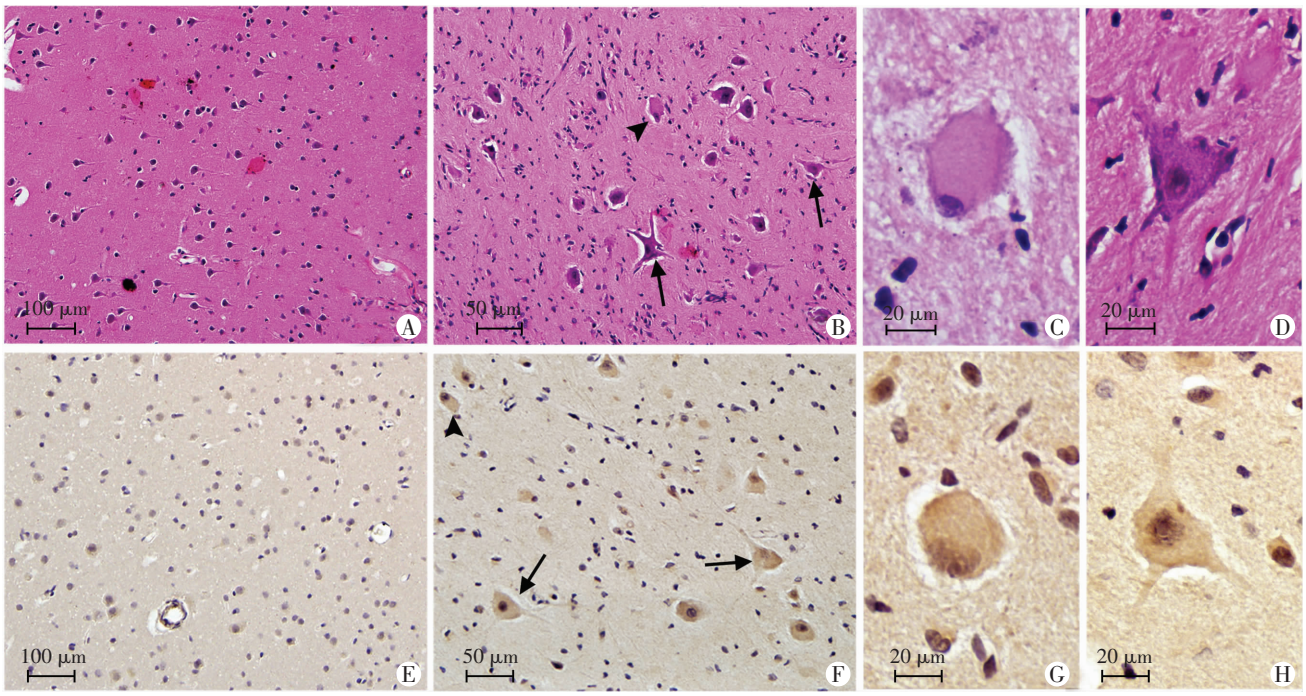


1、2:CTX组;3、4:TSC组

图2 Western blot检测各组TRPC5蛋白表达水平

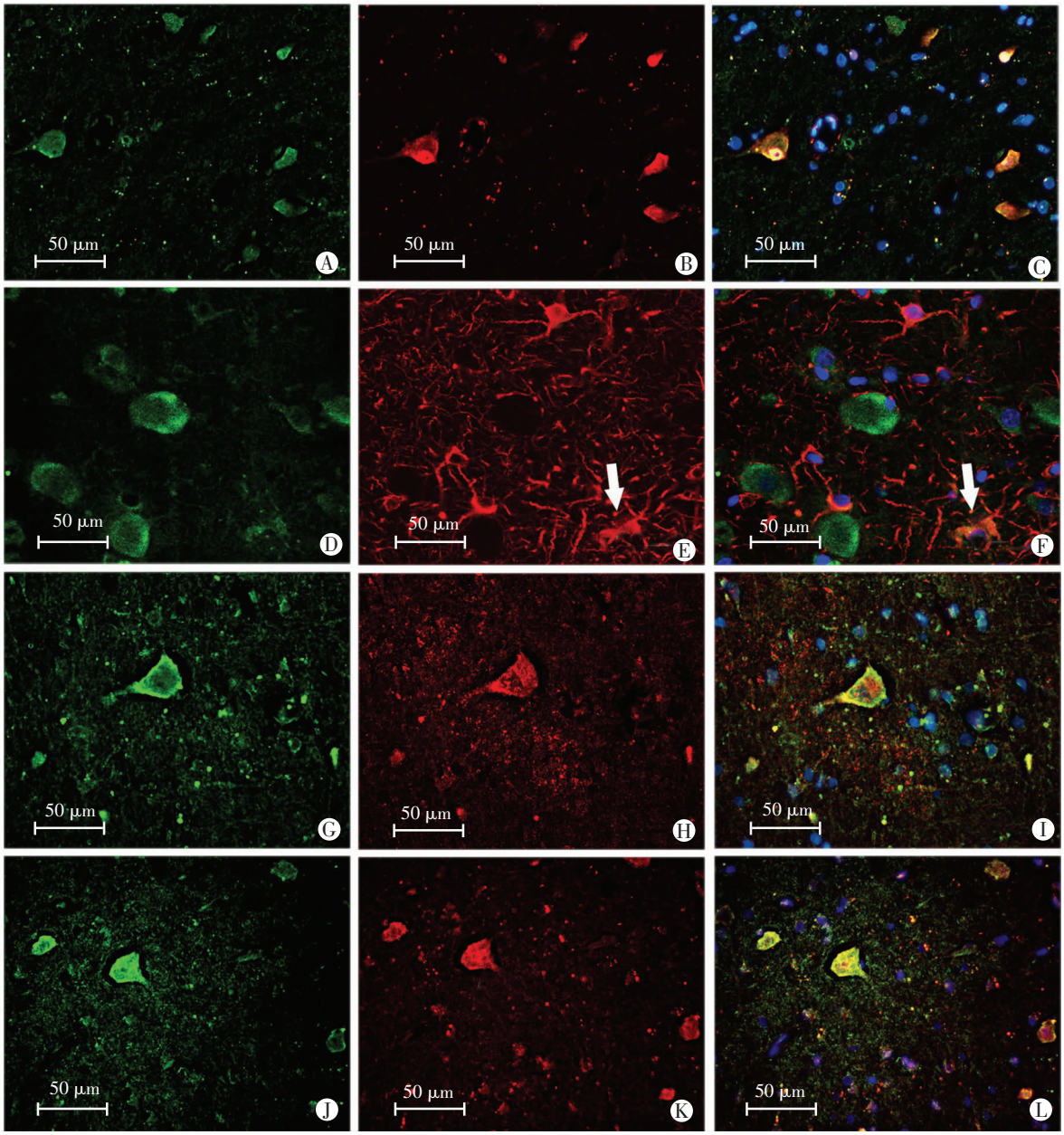
2.3 免疫组织化学检测TRPC5表达分布

HE染色显示,正常对照组结构层次和细胞形态基本正常;而TSC皮层致痫结节结构层次紊乱,并可见巨型细胞(giant cells,GCs)和异形神经元(dysmorphic neurons,DNs)(图3A~D)。免疫组化结果显示在正常脑组织中,TRPC5主要表达在的神经元上,偶见胶质细胞表达(图3E),在TSC皮层致痫结节中,TRPC5在神经元表达明显增强,胶质细胞表达强度也较CTX组明显增高(图3F),且TRPC5高表达于TSC致痫灶中的特征性细胞,进一步对TRPC5的特征性细胞分布表达分析,(83.2±6.5)%的GCs($n=173$)和(87.7±4.2)%的DNs($n=234$)中到强表达TRPC5(图3G、H)。免疫组化染色评估分析提示,TSC组染色强度值(2.77±0.43)和相对平均光密度值(64.72±9.56)均明显高于CTX皮质(1.64±0.56,30.34±9.43,$P<0.05$)。



A:正常皮层组织的HE染色;B:TSC皮层致痫结节皮层脑组织HE染色后可见巨型细胞(三角)和异形神经元(箭头);C、D:异形神经元和巨型细胞HE染色;E:免疫组化检测TRPC5在正常皮层脑组织中的表达,正常神经元弱到中等强度表达,偶见胶质细胞表达(S-P);F:免疫组化检测TRPC5在TSC皮层致痫结节中的表达,TRPC5在巨型细胞(三角)和异形神经元(箭头)上强表达(S-P);G、H:免疫组化检测TRPC5在巨型细胞和异形神经元上强表达(S-P)

图3 TRPC5在TSC临床标本中的表达与分布



A～C:免疫荧光双标示 NeuN 阳性(B,红色荧光)的神经元表达 TRPC5(A,绿色荧光),提示 TRPC5 阳性的 DNs 有神经元特性,C 为合成图;D～F:免疫荧光双标示 GFAP 阳性(E,红色荧光)的胶质细胞不表达 TRPC5(D,绿色荧光),偶有 GFAP 阳性的胶质细胞 TRPC5 表达(E、F 箭头所示),F 为合成图;G～I:免疫荧光双标示 Glutamate 阳性(H,红色荧光)的神经元表达 TRPC5(G,绿色荧光),I 为合成图;J～L:免疫荧光双标提示 GABA 阳性(K,红色荧光)的神经元表达 TRPC5(J,绿色荧光),L 为合成图

图 4　免疫荧光双标检测 TRPC5 在 TSC 临床标本中的表达与分布

2.4　荧光双标化学检测 TRPC5 表达分布

为了进一步验证 TRPC5 的表达定位,我们采取了荧光双标化学发光的方法检测了 TRPC5 在 TSC 皮层致痫结节中的表达。TRPC5 和 NeuN 的荧光共标结果显示,TRPC5 在神经元上表达(图 4A～C);而 TRPC5 和 GFAP 的荧光共标显示,TRPC5 偶在胶质细胞上表达(图 4D～F);TRPC5 在 Glutamate 阳性的神经元上表达(图 4G～I);TRPC5 也在 GABA 阳性的神经元上表达(图 4J～L)。

3　讨论

癫痫是 TSC 患者最常见的神经系统疾病,也是导致 TSC 患者出现并发症和死亡的主要原因[9]。TSC 继发癫痫有起病早、容易转变为难治性癫痫等特点,并且对现有的抗癫痫药物不敏感,常需要手术治疗[10]。TRPC 是位于细胞膜或细胞器膜上的一类非选择性阳离子通道,主要参与 PLC 激活后所介导的钙离子内流。钙离子内流介导的细胞爆发式放电是癫痫引起神

经元活动的主要形式,同时钙离子被视为兴奋毒性介导神经元损伤的重要介质,因此钙离子与癫痫发作之间存在密切联系[11]。而细胞内钙离子的升高依赖于包括TRPC在内的离子通道的激活[12]。因此,TRPC在癫痫发生过程中起到重要作用。

TRPC5主要在神经系统中表达,参与神经元分化、迁移和突触可塑性的过程[7]。有研究[11]发现TRPC5敲除的小鼠,在匹鲁卡品致癫痫模型中癫痫发生率降低,且癫痫引起的海马细胞死亡显著降低,提示TRPC5可能在癫痫发生中起到重要作用。Tai等[13]研究确认TRPC5介导了胆碱能M受体激活引起的长时程去极化,引起神经元兴奋性增加。本研究中,RT-PCR和Western blot的结果都表明TRPC5在TSC致痫结节中的表达较正常对照皮层升高,提示TRPC5表达上调可能通过激活胆碱能M受体从而增加神经元兴奋性,从而引起癫痫发生。

神经系统各种神经递质的释放同胞内钙离子浓度变化密切相关,研究显示TSC皮层致痫结节内的兴奋性和抑制性神经递质出现紊乱。TSC致痫结节内兴奋性神经递质,如谷氨酸及其受体的表达增高,并可见于各种不同的异常细胞,抑制性神经递质GABA也在TSC也出现异常变化,TSC致痫结节内GABA及其受体的表达下降,导致抑制性减弱,这可能参与了TSC的致痫机制[14]。本研究发现TRPC5既同谷氨酸阳性的神经元共标,同时也和GABA阳性的神经元共标,这提示TRPC5在TSC致痫灶中的发挥兴奋性还是抑制性作用尚不明确,TRPC5的具体作用机制还需要进一步的阐明。

TSC的病理学改变主要有:①皮质分层紊乱和神经元排列紊乱,纵形皮质柱结构消失;②出现特异性神经元:巨型细胞、异形神经元和巨型神经元等;③出现异位神经元:在分子层和灰白质交界处出现大量异位神经元[15]。Cepeda[14]的研究显示气球样细胞和异形神经元是TSC内的致痫细胞,它们有丰富的突起,异常的树突棘和轴突,低细胞膜阻抗,异常增高的胞内钙离子,具有典型的兴奋性特性,这种病理改变形成于胎儿发育过程中神经细胞的异常增殖、分化和迁移。Greka等[16]研究发现TRPC5在海马神经元神经突生长和生长锥形态的调控中起到关键作用,从而影响神经元的迁移方向,同时对神经元兴奋性和可塑性的调节也有重要作用。我们的研究发现,TRPC5高表达于TSC致痫灶中的特征性细胞,包括异形神经元(DNs)和巨型细胞(GCs)。说明TRPC5可能通过影响神经元的增殖、分化以及迁移,促使巨型细胞和异形神经元等特异性细胞和异位神经元的出现,从而参与了TSC致痫过程。

综上,本研究通过RT-PCR、Western blot和免疫组化等发现,与CTX组皮层脑组织相比,TRPC5异常高表达于TSC癫痫患者致痫皮层中,且特异性高表达于GCs和DNs上,提示TRPC5表达上调可能参与了TSC致痫过程,TRPC5可能成为一种新的抗癫痫治疗靶点,但具体的作用机制还有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Crino P B, Nathanson K L, Henske E P. The tuberous sclerosis complex [J]. N Engl J Med, 2006, 355(13): 1345-1356.

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

[3] 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.

[4] Li Y, Jia Y C, Cui K, *et al*. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor [J]. Nature, 2005, 434(7035): 894-898.

[5] Jia Y, Zhou J, Tai Y, *et al*. TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival [J]. Nat Neurosci, 2007, 10(5): 559-567.

[6] Tai Y, Feng S, Du W, *et al*. Functional roles of TRPC channels in the developing brain [J]. Pflugers Arch, 2009, 458(2): 283-289.

[7] Beech D J. Canonical transient receptor potential 5[J]. Handb Exp Pharmacol, 2007, (179): 109-123.

[8] 李松, 余思逊, 贺教江, 等. 难治性颞叶癫痫患者颞叶皮层金属基质蛋白酶-9的表达[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(6): 492-495.

[9] Thiele E A. Managing and understanding epilepsy in tuberous sclerosis complex [J]. Epilepsia, 2010, 51(Suppl. 1): 90-91.

[10] Holmes G L, Stafstrom C E. Tuberous sclerosis complex and epilepsy: recent developments and future challenges[J]. Epilepsia, 2007, 48(4): 617-630.

[11] Phelan K D, Shwe U T, Abramowitz J, *et al*. Canonical Transient Receptor Channel 5 (TRPC5) and TRPC1/4 Contribute to Seizure and Excitotoxicity by Distinct Cellular Mechanisms [J]. Mol Pharmacol, 2013, 83(2): 429-438.

[12] Gross S A, Guzman G A, Wissenbach U, *et al*. TRPC5 is a Ca^{2+}-activated channel functionally coupled to Ca^{2+}-selective ion channels [J]. J Biol Chem, 2009, 284(49): 34423-34432.

[13] Tai C, Hines D J, Choi H B, *et al*. Plasma membrane insertion of TRPC5 channels contributes to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons [J]. Hippocampus, 2011, 21(9): 958-967.

[14] 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.

[15] Wong M. Mechanisms of epileptogenesis in tuberous sclerosis complex and related malformations of cortical development with abnormal glioneuronal proliferation [J]. Epilepsia, 2008, 49(1): 8-21.

[16] Greka A, Navarro B, Oancea E, *et al*. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology [J]. Nat Neurosci, 2003, 6(8): 837-845.

(**收稿**:2012-12-25;**修回**:2013-01-23)

(编辑 王 红)