基础研究 文章编号:0253-3626(2011)06-0797-03

CDK13在耐药性癫痫患者脑组织中的表达

韩 璞,王学峰,王 亮
(重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究耐药性癫痫患者脑组织内依赖细胞周期的蛋白激酶13(Cell cycle-dependent protein kinase 13,CDK13)mRNA的表达。方法:在基因芯片扫描的基础上,运用逆转录-多聚酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)技术检测CDK 13mRNA在难治性癫痫患者脑部的变化。结果:基因芯片扫描显示CDK13 mRNA在耐药性癫痫患者脑部比正常人表达上调2.159倍,RT-PCR检测同样显示CDK13 mRNA在耐药性癫痫患者脑部表达增强,信号明显增高,提示候选基因CDK-13 mRNA在耐药性癫痫患者脑组织中表达上调,RT-PCR与cDNA芯片结果一致。结论:虽然CDK13具体生物功能尚不明确,但我们认为CDK13可能作为重要的调节因子参与了神经元凋亡等分子事件。CDK13mRNA表达上调可能在耐药性癫痫发病机制中起一定作用。

【关键词】CDK13;耐药性癫痫;基因芯片;逆转录-多聚酶链反应;能量代谢
【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-25

Expression of CDK13 mRNA in the brain tissue of patients with drug-resistant epilepsy

HAN Pu, WANG Xue-feng, WANG Liang
(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the change of CDK13 mRNA expression in the brain tissue of patients with drug-resistant epilepsy so as to explore the possible mechanisms of the pathogenesis of refractory epilepsy. *Methods*: The microarray scanning and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to evaluate CDK-13mRNA expression in the brain tissue of 40 refractory epileptic patients and 8 normal controls. *Results*: As compared with the 8 normal controls, there appeared a significant increase in CDK13 mRNA expression in the patients with drug-resistant epilepsy, with the ratio of cy5/cy3 being 2.159 in microarray scanning (CDK13 mRNA expression in the patients with drug-resistant epilepsy was upregulated by 2.159 times compared with the normal controls.), and the results of RT-PCR were coincided well with those of the cDNA chip. *Conclusion*: Further study should be made to clarify the precise function of CDK13. CDK13 may take part in the molecular event in neuronal apoptosis as an important modulator. The up-regulation of CDK13 mRNA expression may play an important role in the epileptogenic mechanisms of drug-resistant epilepsy

【Key words】CDK13; drug-resistant epilepsy; complementary DNA microarray (cDNA microarray); RT-PCR; energy metabolism

细胞周期蛋白激酶13(Cell cycle-dependent protein kinase 13,CDK13)是最近新发现的细胞周期蛋白激酶,文献资料及前期实验显示,CDK13在耐药性癫痫患者脑组织中表达上调,提示参与了耐药性癫痫的形成,为了进一步验证此结论,我们通过基因芯片及RT-RCR技术2种方法,在mRNA水平上对耐药性癫痫患者脑内CDK13的表达进行了研究,旨在从一新的角度加深对耐药性癫痫的认识。

作者介绍:韩 璞(1974-),女,主治医师,硕士,研究方向:癫痫。现工作单位:武警重庆市总队医院神经内科。
通信作者:王学峰,男,教授,Email:xfyp@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81071039)。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 实验组 实验组40例,全部系首都医科大学天坛医院、宣武医院、卫生部北京医院、第三军医大学新桥医院和重庆医科大学附属第一医院神经外科的手术患者。患者都有癫痫的典型表现和脑电图特征,发作类型符合国际抗癫痫联盟1981年有关癫痫发作分类的规定[12],并符合以下纳入标准:①用3种以上一线抗癫痫药(卡马西平、苯妥英钠、丙戊酸、苯巴比妥),正规治疗2年,与发作基线相比,发作无明显减少;②神经系统体格检查没有明显阳性发现或虽有发现但与

癫痫发作无关；③头颅 CT 或 MRI 扫描没有发现中枢神经系统退行性病变；④手术中没有发现除癫痫外其他神经系统病变和可能引起癫痫发作的病因。其中男 16 例，女 24 例，年龄 10~59 岁，平均(22.3±10.1)岁；全身强直—阵挛性发作 26 例、强直性发作 4 例、复杂部分性发作 6 例、单纯部分性发作 4 例。术后获颞叶标本 30 例，海马标本 10 例。

1.1.2 对照组 对照组 8 例，由 2 部分组成。其中 6 例来自重庆市 2003 年 12 月-2004 年 12 月因交通事故意外死亡，及其他非自然死亡后按有关法律规定需进行尸解的自然人，符合下列条件：①无中枢神经系统疾病的病史；②死后 6 h内尸解没有发现脑部有能够引起癫痫发作的结构和功能损伤；③家属同意，并签注知情同意书。另 2 例为脑出血微创手术中所取标本。8 例患者共获海马标本 3 例，颞叶标本 5 例。

1.2 样本的处理

取得患者及家属同意后，癫痫患者的取材在手术中进行，将取出的脑组织立即放入液氮罐(-196℃)中保存备用。对照组在死后 6 h 内尸解。标本保存与实验组相同。

1.3 基因芯片差异表达谱分析

1.3.1 总 RNA 提取与鉴定 总 RNA 提取采用 TRONL 试剂(Invetregen 公司)，按操作说明书进行，提取的总 RNA 样本保存在加入 Rnase-free 的 Mikki-Q 液完全溶解 RNA 沉淀后，-80℃液氮中保存。对总 RNA 进行质检，合格后采用mRNA 柱纯化试剂盒(Boistar 公司)纯化样品的 mRNA，然后逆转录生成 cDNA。

1.3.2 芯片制备 由上海博星基因芯片有限责任公司制备提供。芯片类型：人 H40s ×2，人 H140s× 1。

1.3.3 探针标记、杂交及洗片 以 Cy3-dCTP(Boistar 公司)标记正常对照组 cDNA，Cy5-dCTP(Boistar 公司)标记耐药性癫痫组 cDNA；将探针加在预杂交好的基因芯片 BiostarH-140 s 上，盖玻片封片，置于 42℃密封舱中杂交 16~18 h。然后揭开盖玻片，先用 2×SSC+0.2 SDS，后用 0.1×SSC+0.2 SDS 溶液洗涤 10 min，室温晾干。

1.3.4 检测与分析 用 ScanArray 4000 扫描芯片，应用 Gene Pix Pro 3.0 图像处理软件分析 Cy3、Cy5 2 种荧光信号的强度和比值。用 40 个管家基因对 Cy5、Cy3 进行均衡，同时对原始数据进行均一化处理以校正 Cy5、Cy3 标记体系间的系统误差，筛选出：①该基因点的 Cy3、Cy5 信号值皆>200，或者其中之一>800；②比值(Cy5/Cy3)>2 或<0.5 的基因点的基因为差异表达基因。用 2 张基因芯片分别重复上述过程 2 次，以减少实验误差。

1.4 RT-PCR

样本总 RNA 的提取和 cDNA 的合成同前，根据 RT-PCR 引物设计原则，设计 PCR 引物前导链：5'-ACCGTCCACCT-GAACTGCTACTG-3'；后随链：5'-ATCTCGGAGGAACTCG-CACTGAA -3'。以 hactinf(200 bp 左右)作为内参，前导链：5'-TCACGTGGACATCCGCAAAG-3'，后随链：5'-CTGGAAG-GTGGACAGCGAGG-3'，选取TIANGEN公司2×TaqPCR Master Mix进行PCR扩增。选取 Promega 公司的 M-MLV 逆转录酶，选择 18s rRNA 作为管家基因。PCR 反应体系为 25 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μl，2.5 μl 10×PCR 缓冲液，10 mmol/L dNTP 混合物 0.5 μl，Taq 酶 0.25 μl(Takara，Inc.5 U/μl)，上下游引物各 1 μl(10 tmaol/L)，补水至 25 μl。在 Rotor-Gene RG-3000 PCR 仪(Corbett Reseach，Sydney，Australia)中，按下列条件扩增：94℃ 2 min 预变性，然后 94℃30 s，61℃ 30 s，72℃ 20 s，共 40 个循环后，72℃延伸 10 min。PCR 反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察。经凝胶图像分析系统，对 RT-PCR 产物的电泳条带进行密度分析。

1.5 统计方法

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理，实验数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用 t 检验，以 $P<0.01$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 总 RNA 抽提及质量检查结果

提取 RNA，耐药性癫痫组与对照组脑组织的总 RNA 得率分别为 279.0、275.4 μg，2 个样本的总 RNA A_{260}/A_{280} 比值分别为 1.821、1.904，位于 1.7~2.2；总 RNA 电泳图谱有清晰的 28 s、18 s 条带，70℃水浴保温 1 h 后的电泳图谱与水浴保温前的图谱未见明显改变，提示所有样本的总 RNA 质量合格(图 1)。

基因芯片结果芯片扫描结果显示在扫描的 4 097 条人类基因中耐药性癫痫组与对照组共有 451 条基因表达有差异(图 2)，其中耐药性癫痫组上调的有 291 条，下调的有 160 条，候选基因 CDK13mRNA 在耐药性癫痫患者脑组织中表达较对照组增强，Cy5/Cy3 比值为 2.159。

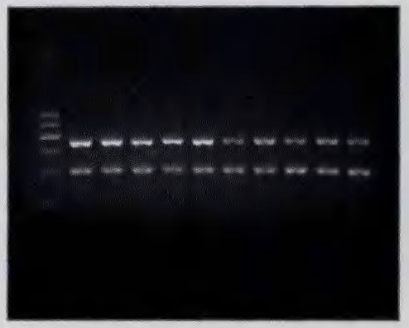
2.2 RT-PCR 结果

RT-PCR 显示耐药性癫痫 CDK13mRNA 电泳条带较对照组明显增宽，信号明显增高，与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)，支持芯片检测结果(见表 1，图 1、2)。

表 1 RE 组与对照组 CDC2L5 的 RT-PCR 结果比较

组别	例数	CDC2L5 电泳条带灰度值中位数($\bar{x}\pm s$)
RE组	40	2.15 ± 0.38
对照组	8	1.20 ± 0.30

注：P=0.001，与对照组比较，中药性癫痫组的 RT-PCR 电泳条带灰度值明显增强，$P<0.01$(99%可度区间)，差异有统计学意义



第一横排为目的条带，第二横排为内参，1~5 列为癫痫组，6~10 列为正常对照组。其中，1，3~8 为颞叶标本，2 为海马标本

图 1 耐药性癫痫与对照组脑组织 CDK13mRNA 凝胶电泳条带对比



第一横排为目的条带，第二横排为内参，1~5 列为癫痫组，6~10 列为正常对照组。其中，3~6、8 为颞叶标本；1、2、7 为海马标本

图 2 耐药性癫痫与对照组脑组织 CDK13mRNA 凝胶电泳条带对比

3 讨 论

基因芯片在筛选差异基因表达时，具有快速、高通量、高灵敏度等特点，但其假阳性和假阴性结果都可能导致实验偏差，因而需用其它方法进行验证。本实验用 cDNA 芯片和 RT-PCR 2 种方法检测耐药性癫痫患者脑组织中CDK13mRNA 均显示其表达上调，提示其可能与耐药性癫痫间有某种内在的联系。

研究发现依赖细胞周期蛋白激酶在肿瘤的发生及肿瘤耐药机制中发挥重要作用，同样我们的研究发现，在耐药性癫痫中依赖细胞周期蛋白激酶 13(CDK13)表达上调，提示它可能在癫痫耐药的机制中发挥重要作用。我们知道正常细胞增殖周期部分由依赖细胞周期蛋白激酶调控，以确定恰当的细胞分裂，故 CDKs 首先被证实作为一种细胞周期进程的决定性调节因素，在细胞周期调控上发挥极其重要的作用。CDK13 是新发现的一种细胞周期依赖蛋白激酶，又名CDC2L5，是一个分子量大约 170 kD 核蛋白质，普遍存在于人体组织中，但目前对它的研究比较少。癫痫病理研究最为重要的发现就是神经元凋亡或坏死，我们的研究发现耐药性癫痫患者海马中 CDK13 表达增加，CDK13 作为细胞周期蛋白激酶家族中一员，其过度表达必然导致细胞周期监控失调，从而导致神经元细胞的病理性凋亡。海马 CA1 区大量神经元丢失，可使其下位突触空缺。诱导存活神经元异常芽生，从而参与苔藓纤维的生长，形成异常的网络联系，促进耐药性癫痫的形成。

最近的研究发现人类的 CDK13 基因编码一种未知的生理功能的蛋白质。这种蛋白质和细胞周期依赖性蛋白家族密切相关，而且包括了一种氨基胍基戊酸/富含丝氨酸(RS)的域。RS 域主要参与蛋白质调节前-mRNA 的拼接，同时 CDK13 与 ASF/SF2 伴生的蛋白质 p32 直接地互动，后者参与蛋白质的拼接[11]。通过上述途径，CDK13 介入了翻译和 mRNA 进程，从而在基因表达上发挥重要作用。脑部神经网络由神经元、神经胶质通过轴突、树突联系而成。神经网络病理性重组是耐药性癫痫最为常见的病理改变之一，而生长锥(Growth cone)决定着树突或轴突的生长及生长的方向。我们的研究发现耐药性癫痫患者海马中 CDK13 表达增加，提示其可能通过参与 mRNA 转录和蛋白质翻译的进程，在耐药性癫痫患者脑组织中的过度表达导致生长锥顶端的整合素胞外段得到了错误信号，通过肌动蛋白、磷酸化 TAU 蛋白环路，促进神经元突起的形成、极化、轴突的生长以及再生，调节树突的生长与分支，刺激树突棘生长，进而影响细胞的形态和运动功能，传导并放大了这种疾病信号，使生长锥发生了非生理性的改向，与下位突触形成了错误的接触，导致轴突导向异常，异常网络形成。从而改变了耐药性癫痫患者痫性放电传播的方向，避开了内源性抗癫痫系统对其的抑制作用，导致了癫痫的耐药性的产生。

目前对 CDK13 的研究才刚刚开始，其在耐药性癫痫患者脑组织中上调的原因及机制尚不完全清楚。但是，通过基因芯片和 RT-PCR 我们发现 CDK13 在耐药性癫痫患者的颞叶和海马中表达较对照组明显增加，其高表达的 CDK13 可能通过多种途径影响神经元凋亡和神经网络重组，研究 CDK13 的表达有可能为人类提供一种新的癫痫治疗方法，成为新药研究与开发的一个新途径。

参 考 文 献

[1] Even Y, Durieux S, Escande M L, et al.CDC2L5, a Cdk-like kinase with RS domain, interacts with the ASF/SF2-associated protein p32 and affects splicing in vivo[J].Cell Biochem, 2006, 99(3):890-904.

[2] Marqués F, Moreau J L, Peaucellier G, et al.A new subfamily of high molecular mass CDC2-related kinases with PITAI/VRE motifs[J].Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(3):832-837.

[3] Chen H H, Wong Y H, Geneviere A M, et al.CDK13/CDC2L5 interacts with L-type cyclins and regulates alternative splicing[J].Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(3):735-740.

[4] 王学峰，肖 波，孙红斌.耐药性癫痫[M].上海：上海科学技术出版社，2002.1-2.

[5] 吴 逊.难治性癫疴的定义[J].中国实用儿科杂志，2000，15(9)：546-550.

[6] 王学峰.耐药性癫痫：概念、组成、发病机制研究[J].当代医学，2001，7(12)：43-47.

[7] Berro R, Pedati C, Kehn-Hall K, et al.CDK13, a new potential human immunodeficiency virus type 1 inhibitory factor regulating viral mRNA splicing[J].Virol, 2008, 82(14):7155-7166.

[8] 李红丽，蔡文琴.周期素依赖性蛋白激酶 5 及其激动剂在神经系统发育中的作用[J].解剖学杂志，2009，32(6)：825-827.

[9] Lapidot-Lifson Y, Patinkin D, Prody C A, et al.Cloning and antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a human homolog of cdc2 required in hematopoiesis[J].Proc Natl Acad Sci U S A.1992, 89(2):579-583.

[10] 王学峰.耐药性癫痫的发病机制及治疗进展[J].中国医师进修杂志，2007，13(30)：7-10.

[11] 席志芹，王学峰，郭珍立.耐药性癫痫患者颞叶中细胞周期依赖性蛋白激酶 5 的表达[J].中华神经科杂志，2007，5(40)：318-321.

[12] 国际抗癫痫联盟和名词委员会推荐的癫痫发作的临床和脑电图分类(1981)[J].中华神经科杂志，2001，34:187-188.

[13] Cermak I, Stoica B, Bymes K R, et al.Role of the cell cycle in the pathobiology of central nervous system trauma[J].Cell Cycle, 2005, 4:1286-1293.

[14] 汪建华，王学峰，龚 云，等.耐药性癫痫患者术后脑组织中 Tau 蛋白的表达[J].中华神经科杂志，2005，38(6)：534-546.

（责任编辑：冉明会）