神经病学研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0670-03

ROCK1，TRAF3 mRNA 在耐药性癫痫患者海马组织中的表达及意义

杨 柳，王学峰
（重庆医科大学附属第一医院神经内科，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察耐药性癫痫患者脑组织中与锌离子相关的 RhoA 蛋白 1（Rho-associated，coiled-coil containing protein kinase 1，ROCK1）和肿瘤坏死因子受体相关因子 3（TNF receptor-associated factor 3，TRAF3）mRNA 的表达，探讨其在耐药性癫痫发病中的作用。方法：收集耐药性癫痫患者术后的海马脑组织，首先用基因芯片进行差异基因表达的筛选，然后用 RT-PCR 从基因水平上进行验证，并与正常对照组进行比较。结果：基因芯片检测中发现与锌离子连接相关的基因 ROCK1 和 TRAF3 在耐药性癫痫患者中表达上调。目的基因 ROCK1 和 TRAF3 mRNA 在耐药性患者脑组织中的表达明显增加（$P<0.05$），变化趋势与芯片扫描结果一致。结论：与锌离子相关的基因 ROCK1 和 TRAF3 可能参与了耐药性癫痫的形成，并在耐药性癫痫的发病机制中起着一定的作用。

【关键词】耐药性癫痫；与锌离子相关的 RhoA 蛋白 1；肿瘤坏死因子受体相关因子 3；锌离子
【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-16

Expressions of ROCK1，TRAF3 mRNA in hippocampus tissues of the patients with drug-resistant epilepsy and its significance

YANG Liu，WANG Xue-feng
（*Department of Neurology，the First Afilliate Hospital，Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To explore the expressions of ROCK1 and TRAF3 mRNA related with zinc ion in hippocampus tissues of the patients with drug-resistant epilepsy. ***Methods***：Hippocampus tissues of patients with drug-resistant epilepsy were collected and the differential genes were screened by microarray scanning. Then，the expressions of target genes were confirmed by RT-PCR. ***Results***：In this study，the expressions of ROCK1 and TRAF3 related with zinc ions were up-regulated in patients. ROCK1 and TRAF3 mRNA were significantly higher in the patients with drug-resistant epilepsy than in the control（$P<0.05$）. The gene data by RT-PCR was coincident well with the result of the microarray scanning. ***Conclusion***：It is suggested that the up-regulation of ROCK1 and TRAF3 mRNA in the cerebral tissue may play a role in epileptic pathogenesis of drug-resistant epilepsy

【Key words】drug-resistant epilepsy；Rho-associated，coiled-coil containing protein kinase 1（ROCK1）；TNF receptor-associated factor 3（TRAF3）；Zincion

锌是人体内一种重要的微量元素，参与了细胞膜的稳定、酶和 DNA 的合成、激素的合成分泌、机体的生长发育等过程。锌在脑的海马中的浓度很高，并且多分布于海马的齿状回苔藓纤维突触的囊泡中。许多研究已经明确表明，锌的异常与癫痫的发生、发展等过程有着密切的联系。为了解锌离子与耐药性癫痫的关系，我们运用了基因芯片技术和 RT-PCR 从转录水平上研究与锌离子密切相关的 RhoA 蛋白 1（Rho-associated，coiled-coil containing protein kinase 1，ROCK1）和肿瘤坏死因子受体相关因子 3（TNF receptor-associated factor 3，TRAF3）mRNA 在耐药性癫痫患者脑组织中的表达，并探索其在耐药性癫痫发病机制中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象与分组

1.1.1 难治性癫痫组 48 例，全部系 2002-2004 年期间，在重庆医科大学第一附属医院、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进行手术治疗的耐药性癫痫患者。符合以下条件：①有癫痫发作的典型表现和脑电图特征，正规服用过 3 种或 3 种以上一线抗癫痫药（苯妥英钠、卡马西平、丙戊酸、苯巴比妥），除丙戊酸外，血

作者介绍：杨 柳（1979-），女，硕士，研究方向：难治性癫痫的机制。现工作单位：重庆市急救医疗中心。
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）。

药浓度在正常高线，与发作前基线比较，发作频率没有明显减少；②无明显病因可寻，神经系统体格检查没有局灶性神经系统体征或虽有体征但与癫痫发作无关，术后脑组织检查没有发现能引起癫痫发作的病因；③头颅 CT 或 MRI 检查除海马硬化外，没有其它异常；④患者的发作类型符合国际抗癫痫联盟 1981 年有关癫痫发作类型分类的规定；⑤手术前1周放置硬膜下电极，术中用皮质电极进行监测，发现有明确和固定的癫痫放电部位，有手术适应证，且能进行手术者；⑥患者及其家属术前签署知情同意书。其中男 25 例，女 23 例，平均年龄(24.10±9.13)岁。部分发作继发全身强直。阵挛性发作 34 例，复杂部分性发作 l3 例，单纯部分性发作 1 例。取海马组织为试验标本。

1.1.2 对照组 8 例，2 例来自重庆市 2004 年 8 月-2005 年 3 月因意外死亡或非自然死亡后按有关法律规定进行尸检者，符合下列条件：①无中枢神经系统疾病的病史；②尸检没有发现脑部有能够引起癫痫发作的结构和功能损伤；③部位为海马和颞叶，死亡与取材之间时间间隔<5 h；④家属同意，并签署知情同意书。另 6 例为颅内减压术术中采集的海马脑组织。其中男 2 例，女 6 例；平均年龄(5.89±13.56)岁。

1.2 标本处理

癫痫患者脑组织在术中采集，标本取出后部分立即放入液氮中保存备用。对照组海马组织在死后 5 h 内取材，保存同前。

1.3 研究方法

1.3.1 基因芯片差异表达谱分析 芯片制备由上海博星基因芯片有限责任公司制备提供，2 组总 RNA 进行配对，分为耐药性癫痫与对照实验组后，进行探针标记芯片分别编号为芯片 1(人 H40 s)、2(人 H40 s)、3(人 H140 s)。用 ScanArray 4000 扫描芯片，应用 GenePixPro 3.0 图像处理软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度和比值。筛选出：①该基因点的 Cy3、Cy5 信号值均大于 200；②比值 Cy5/Cy3 大于 2 的基因点的基因为差异表达基因。重复上述过程 2 次，以减少实验误差。

1.3.2 RT-PCR 设计和合成引物 ROCK1，5'-CTG GGA AGA AAG GGA CAT CAT-3'，5'-CAA CCG CTG TAT CAC ATC GTA-3'。TRAF3，5'-TTA CCA CTG ATG GGT GCT ACA C-3'，5'-GCA GAT AAG AAC AAC GGA ACG-3'。β-actin，5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3'，5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'。按常规步骤提取总 RNA，然后进行逆转录和 PCR 扩增。最后的产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳，终产物片段长度为分别为 334、338、205 bp。用 Bio-rad 凝胶成像系统软件分别测定 ROCK1、TRAF3 和 β-actin mRNA 的吸光度，然后计算其比值表示结果，即：相对吸光度(A Value)= 目的基因 mRNA 吸光度/β-actin mRNA 吸光度。

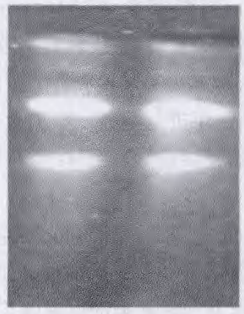
1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件包对实验数据进行正态性检验及单因素方差分析。正态分布数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，2 组数据比较时若方差齐用 t 检验，方差不齐用 t' 检验。

2 结 果

2.1 总 RNA 抽提以及质控结果

实验组和对照组脑组织样本总 RNA 浓度分别为：154.37、167.21 μg/ ml。2 组样本紫外分光光度计测得 OD_{260}/OD_{280} 分别为 1.834 和 1.908，都介于 1.7~2.2 之间；电泳结果显示 RNA 的条带清楚(图 1)，提示所有样本的总 RNA 质量合格。



有清晰的 28s，18s 条带；1 为实验组；2 为对照组

图 1 2 个样本的总 RNA 电泳图

2.2 基因芯片和 RT-PCR 结果

芯片中表达上调的基因有 104 条，下调的基因有 38 条。而与锌离子相关的基因 ROCK1 和 TRAF3 在耐药性癫痫患者的脑内的表达明显高于对照组，经双色标记后的 Cy5/Cy3 分别为 2.43 和 2.67。RT-PCR 的结果与芯片的结果一致。ROCK1 mRNA/β-actin mRNA 对照组为 0.54±0.14，癫痫组为 0.98±0.17；TRAF3 mRNA/β-actin mRNA 对照组为 0.21±0.06，癫痫组为 0.47±0.12，差异具有显著的统计学意义(P<0.01)(图 2、3)。



1~5. 均为耐药性癫痫组；6~10. 为正常对照组

图 2 ROCK1 mRNA 在耐药性癫痫组和对照组海马组织中的表达



1~5. 均为耐药性癫痫组；6~10. 为正常对照组

图 3 TRAF3 mRNA 在耐药性癫痫组和对照组海马组织中的表达

表 1 耐药性癫痫和对照组中目的基因 mRNA 和 beta-actin mRNA 的相对吸光值统计学分析

基因名称	耐药性癫痫组	对照组
ROCK1	0.98 ± 0.17#	0.54 ± 0.14
TRAF3	0.47 ± 0.12*	0.21 ± 0.06

注：与对照组比较，*，$P<0.001$，#，$P<0.005$

3 讨 论

基因芯片可对成千上万的基因进行同步检测，综合分析不同个体、组织、不同发育阶段、不同病变特征，高通量地研究基因功能，揭示疾病的发病机制，具有高效、快速及同步分析生物信息的特点。但基因芯片检测有一定的假阳性或者假阴性，所以必须对其结果进行验证。本实验首先通过基因芯片对目的基因的筛选，然后通过 RT-PCR 对其进行验证就是基于此考虑。

微量元素是促进大脑发育和维持大脑的功能所必须，其代谢紊乱会导致许多神经系统疾病的产生，如阿尔茨海默病[1]，癫痫[2]等。锌，作为一种基本的微量元素，在机体维持正常的功能以及参与形成神经系统生物化学反应，例如蛋白质和核酸的代谢等，所必须的 200 种金属酶等方面发挥了重要作用。锌离子的平衡与否直接决定着神经兴奋性和神经敏感性是否处于一种良好的状态。众所周知，在中枢神经系统中，大约有 80%的锌是以锌结合蛋白的形式存在，其余的则游离形式存在于微泡中[3]。

大量的研究已经证实在癫痫患者的脑内有过量的锌表达。Elsas SM 等[4]向大鼠的脑内注射小剂量的锌，就可引起大鼠跳跃、奔跑、强直阵挛性抽搐。Pei YQ 等[5]发现，在兔子的海马内注射硫酸锌后，成功建立了阵挛性癫痫痫性发作和继发性全身性发作的模型。在某些癫痫患者的脑内，锌离子的浓度明显高于正常人[6,7]，这些都表明锌的代谢的异常与癫痫的发生、发展密切相关。

流行病学调查发现，大约有 70%的难治性癫痫为颞叶癫痫，颞叶癫痫最显著的临床特征是长期反复出现的自发性癫痫发作，颞叶癫痫脑部出现明显的病理改变如海马硬化等，伴随不同的临床和脑电图的表现，而且颞叶癫痫对大部分的抗癫痫药物具耐药性[8]。而锌在脑内的分布主要集中在海马、颞叶、皮层和杏仁核，这与耐药性癫痫的好发部位比较一致，那么锌的表达异常与耐药性癫痫有着怎样的关系就值得我们深入研究。

本研究首先通过使用基因芯片技术对收集到的 48 例耐药性癫痫患者术后的脑组织进行差异基因表达的筛选，结果发现在患者脑组织中表达上调的基因有 104 条，下调的基因有 38 条。其中，我们发现与锌离子相关的基因有 ROCK1 和 TRAF3。然后，我们对 ROCK1 和 TRAF3 进行 Cy5、Cy3 双色标记后，结果进一步证明了上述 2 个基因为差异基因。又通过 RT-PCR 技术从基因水平上进行验证，结果发现，ROCK1 和 TRAF3 mRNA 在耐药性癫痫组的表达明显增强，与正常组相比较，差异具有显著的统计学意义。

总之，实验发现耐药性癫痫患者颞叶中，与锌离子转运相关的基因 ROCK1 和 TRAF3 mRNA 在耐药性癫痫组的表达明显增强，这说明锌与耐药性癫痫也有着密切的联系。但是，其在耐药性癫痫发病机制中究竟发挥怎样的作用值得我们进一步探讨，这可能为耐药性癫痫的发病机制提供新的理论依据，同时为抗癫痫的新药筛选提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Miller Y, Ma B, Nussinoy R. Zinc ions promote Alzheimer Abeta aggregation via population shift of polymorphic states[J]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107(21): 9490-9495.

[2] Chwiej J, Winiarski W, Ciarach M, et al. The role of trace elements in the pathogenesis and progress of pilocarpine-induced epileptic seizures [J]. J Biol Inorg Chem, 2008, 13(8): 1267-1274.

[3] Cole T B, Wenze H J, Kafer K E, et al. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene[J]. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96: 1716-1721.

[4] Bitanihirwe B K, Cunningham M G. Zinc: the brain's dark horse[J]. Synapse, 2009, 63(11): 1029-1049.

[5] Pei Y Q, Koyama I. Features of seizures and behavioral changes induced by intrahippocampal injection of zinc sulfate in the rabbit: a new experimental model of epilepsy[J]. Epilepsia, 1986, 27: 183-188.

[6] Hamed S A, Abdellah M M, El-Melegy N. Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients[J]. J Pharmacol Sci, 2004, 96(4): 465-473.

[7] Armutcu F, Ozerol E, Gurel A, et al. Effect of long-tern therapy with sodium valproate on nail and serum trace element status in epileptic children [J]. Biol Trace Elem Res, 2004, 102(1-3): 1-10.

[8] 王 尧，杜子威. 神经生物化学与分子生物学[M]. 北京：人民卫生出版社，1997.

（责任编辑：张学颖）