维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)03-0276-04

基因芯片检测耐PHT点燃鼠脑突触可塑性基因的表达

文世全，王学峰，晏 勇
（重庆医科大学临床学院神经内科 重庆 400016）

【摘 要】目的：探索与鼠同源的人类已知基因在苯妥英钠(PHT)耐药和非耐药癫痫鼠脑中的差异表达，了解难治性癫痫形成机制。方法：建立PHT耐药和非耐药组癫痫大鼠模型，成功后，处死动物，取出脑组织，常规抽提mRNA，逆转录生成cDNA后，应用含有4096条人类基因的cDNA表达谱芯片，检测两者间基因表达谱的差异。结果：发现耐PHT和PHT治疗有效癫痫鼠与神经元突触可塑性有关的基因有18条存在差异表达。结论：突触可塑性增强可能是难治性癫痫形成的重要原因。

【关键词】基因芯片；难治性癫痫；突触可塑性
【中国图书分类法分类号】R742.1,Q78 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-11-14

Detection of the differential expression of genes with synapse plasticity in brains of the PHT-resistant/non-resistant epileptic rats with cDNA microarray

WEN Shiquan, et al
(Department of Neurology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To determine the differential synapse plasticity-associated gene expression in PHT-resistant and PHT-responder epilepsy rat brain. *Methods*: Phenytoin-resistant and phenytoin-responder epilepsy rat model was build and the genes expression associated with synapse plasticity by cDNA microarray were studied. The four thousand and ninety-six target genes were arrayed onto glass slide. Both the mRNA from phenytoin-resistant and phenytoin-responder brains of kindling rats were reversal transcribed to cDNAs as hybridization probes which were labeled with either Cy3-dUTP or Cy5-dUTP at the same time. After hybridization with BioDoor4096 cDNA microarray, the results were analyzed by ImaGene3.0 software. *Results*: In the PHT-resistant and non-resistant epileptic rats, eighteen differential expressed genes which are associated with snapse plasticity were identified. *Conclusion*: The enhancement of synapse plasticity may be one of the important causes of drug-resistant epilepsy.

【Key words】cDNA microarray; Intractable epilepsy; Synapse plasticity

难治性癫痫已经成为影响癫痫病人总体预后的关键因素，探索难治性癫痫的发病机制，是改变目前治疗上被动局面的有效方法，为此，我们利用基因芯片技术检测了目前公认较为理想的难治性癫痫模型-耐PHT点燃鼠脑部与神经元突触可塑性有关的基因表达，并与非耐药点燃鼠进行了比较，现报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物模型的制作

1.1.1 电极的埋植 选成年Wistar大鼠(250～300g)100只，用3.6%的水合氯醛腹腔注射（0.36g/kg）麻醉后，将其固定于脑立体定位仪上，将直径0.1mm的双极漆包镍铬电极（间距0.025mm)植于右侧杏仁基底外侧核（坐标定位为：前囟后1.0mm，旁开5.25mm，颅骨表面下8.5mm，门齿高于耳杆平面5mm），电极引入连接器，用502胶水调和牙托粉，固定于颅顶。术后7天进行下一步试验。

1.1.2 点燃前后放电阈值(ADT)的测定 以IS-2型智能刺激器输出串长10S，波宽1ms，只数160只的恒流电脉冲进行刺激，刺激强度从20μA开始，每次增加20μA，间隔1min，至出现后放电(AD)，AD时程大于3s为阳性。

1.1.3 点燃 确定ADT后5min开始进行点燃。以同型刺激器输出串长10S，波宽1ms，只数160只，电流强度500μA，串间间隔5min的恒流电脉冲反复刺激大鼠，同时观察大鼠行为反应。出现Racine V级反应（面肌痉挛、节律性点头、前肢痉挛、后肢站立，跌倒）为点燃。

1.1.4 点燃后ADT 点燃出现10次发作后，间歇24h，再次按同样方法测定ADT，作为点燃后ADT。

1.1.5 对照ADT测定 向鼠腹腔内注入与将注药物相同体积

作者介绍：文世全（1971- ），男，硕士。
主要研究方向：癫痫。

维普资讯 http://www.cqvip.com

的生理盐水，1h后开始测定ADT，并将测定值作为对照ADT。

1.1.6 耐药鼠的筛选 对照ADT测定完成后24h，向点燃鼠腹腔注入PHT(75mg/kg)，1h后开始测定用药后ADT，连续用药6次，每次间隔1周，用药后连续6次ADT不变或下降，且同步进行的血药浓度正常或高于有效浓度归为PHT耐药组，ADT增高为PHT有效组，6次给药中ADT时高时低归为变化组。

1.2 组织材料

取出6次结果相同的耐PHT和PHT治疗有效组大鼠脑(各10只)，以电极部位为中心，横切约1mm的脑组织(包括皮层、海马、杏仁核等结构)，立即放于液氮中保存备用。

1.3 探针制备

将液氮冻存的组织放在100mm陶瓷碾钵(RNase free)中碾碎成粉末状，加入D溶液和1%巯基乙醇，制成匀浆液，离心后，上清液用等量1:1酚-氯仿抽提，Oligotex mRNA Midi Kit分离纯化mRNA，按每一份探针4μg mRNA参照Schena方法逆转录生成cDNA，并在一链合成中掺入荧光标记dUTP，用Cy5-dUTP标记耐PHT癫痫鼠、Cy3-dUTP标记有效鼠，制成探针，并纯化。

1.4 芯片杂交

探针与芯片的杂交由上海博道基因公司按标准方法进行。

1.5 检测与分析

用ScanArray3000扫描仪扫描芯片，并用ImaGene3.0软件分析Cy3和Cy5两种相对信号强度和比值。用以下3个条件作为判定基因有差异表达的标准：(1)Cy3和Cy5信号比值的自然对数绝对值>0.69 (基因表达变化在2.5倍以上)；(2)Cy3和Cy5信号值其中之一必须＞800；(3)PCR结果良好。

2 结 果

2.1 cDNA芯片杂交体系验证

在芯片上共有4096个基因。为了监控芯片杂交体系的整个过程，在每块芯片上设定阴性对照：水稻U2RNA基因(8个点)、HCV外壳蛋白基因(8个

表1 耐PHT癫痫鼠脑组织中表达增高的突触可塑性基因

基因库号	位点	基因名称	CY5/CY3
Hsu43431	U43431	DNA拓扑异构酶ⅢmRNA	4.626
Humviph	M36634	血管活性肠肽(VIP)mRNA	5.708
Humg25Ka	M35543	GTP结合蛋白mRNA	3.048
Af005070	AF005070	神经细胞粘附分子mRNA	2.664
Hsdccg	X76133	结直肠缺失基因mRNA	2.968
Af030108	AF030108	G蛋白信号调节子mRNA	2.51
Hummarksf	M68955	肉豆蔻基富丙氨酸C激酶底物基因5`末端	2.675
Humgap43a	M25667	神经元生长相关蛋白43mRNA	2.508
Af072810	AF072810	转录因子WSTFmRNA	2.633
Humbtf2a	M95809	基础62kD亚基(BTF2)	3.137
Hshbfla	X74142	转录因子HBF-1mRNA	3.276
Hstfiiea	X 63468	转录因子TFIIE a mRNA	2.65
Humpolacca	L07540	转录因子36-KDa亚基mRNA	3.053
Humdock180	D50857	DOCK蛋白mRNA	2.735

表2 耐PHT癫痫鼠脑组织中表达降低的突触可塑性基因

基因库号	位点	基因名称	CY5/CY3
Hsppicc	X74008	蛋白磷酸化酶1γmRNA	0.344
	S64371		
Hump2a	J02902	蛋白磷酸化2A调节亚单位a同型体mRNA	0.197
Hsc1100	X68277	蛋白酪氨酸磷酸化酶 CL100mRNA	0.332
	S46269		
Humhbgr2a	L20814	谷氨酸受体AMPA-2mRNA	0.266

维普资讯 http://www.cqvip.com

点)、空白点样液(32个点)、芯片杂交后这些点的杂交信号均很低，证实数据的可靠性。

2.2 基因的差异表达

耐与非耐 PHT癫痫鼠脑与神经元突触可塑性有关的基因有18条表达存在差异(表1、2) 。

3 讨 论

突触可塑性是脑适应内外环境变化，调节机体平衡的重要手段，其完成需多个环节的基因参与，基因芯片为大通量同步检测这些基因的变化提供了可能性。将多个标本组成一个共同的“池”，其基因表达的共同部份可高强度表现而“池”中不同个体的差异基因则因强度不够而被检测所忽略或区分，从而成为研究基因差异表达的重要技术，并被广泛认同。

3.1 肌动蛋白及其相关基因的表达

神经元树突棘(dendrite spine)是神经元间形成突触，并具最大可塑或易变的调节部位，棘浆中含有丰富的、其聚合状态,决定棘浆粘性的肌动蛋白。有人用绿色荧光标记的肌动蛋白基因转染培养的海马神经元，观察到在肌动蛋白位置上的快速运动和形态学改变，这一现象可被肌动蛋白动力阻滞剂细胞松弛素(cytochalasin) 抑制，提示树突棘形态和位置的改变与肌动蛋白有关[1]。我们的实验发现耐PHT鼠脑中肌动蛋白关联蛋白 (生长相关蛋白 43，GAP-43)、肉豆蔻基富丙氨酸C激酶底物(myristoylated alanine-rich C-kinase substrate MACS)基因表达明显增强，由于这些基因编码的蛋白质可直接或间接调节肌动蛋白，参与突触的可塑性，尤其是GAP-43，它可通过调节肌动蛋白，促使其在局部聚集而引起活动依赖性神经递质释放和树突生长，参与神经元突触可塑性的调节[2]，其过度表达的细胞或转基因小鼠均有过量芽生，进而出现神经元网络重组，此与难治性颞叶内侧癫痫病理特征相似[3],而网络重组将改变痫性放电传播的途径。

MACS是脑中的一种蛋白激酶C底物，与肌动蛋白丝结合后，可调节细胞骨架的可塑性，后者则可通过不同突触连接蛋白、突触后肌动蛋白连接神经递质受体，影响其功能，是信号传递和兴奋性突触可塑性间关键的调节因素[4]，这些基因的表达增强可增加中枢神经系统内神经元的可塑性，支持耐PHT鼠脑中突触的可塑性有明显增加的假说。

3.2 神经细胞粘附分子(NCAM)基因

本组实验发现NCAM、结直肠癌缺失基因(Deleted in colorectal cancer)表达增高，这类基因的表达产物可通过：①引起细胞骨架动力改变，影响活动依赖性突触重建；②影响细胞信号的传递；③通过影响AMPA受体参与突触可塑性的改变[5]。

3.3 DOCK180基因

DOCK180属于CDM家族的一员，仅在粘附细胞中表达，有一个SH3区与信号传递JNK(c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) 途径相互作用，另一端则与细胞骨架蛋白相联系，能使细胞延伸，参与酪氨酸激酶介导的细胞运动，并能通过激活Rac(一种小分子量的G蛋白)引起细胞骨架重组。实验中DOCK180表达增高，提示细胞骨架重组增强，这种细胞骨架重组的增强可能参与了突触可塑性改变。

3.4 谷氨酸受体AMPA亚型基因

兴奋性突触的树突棘快速、依赖肌动蛋白的形态改变可导致脑内环路的可塑性变化。谷氨酸受体AMPA 或NMDA亚型的激活可抑制树突棘中肌动蛋白动力学活性，这种活性的阻滞引起树突棘卷曲(round up)，从而使树突棘的形态变得既稳定又规则[6]，减少突触可塑性。我们的实验发现耐PHT鼠脑组织中谷氨酸受体AMPA 亚型表达降低，对树突棘中肌动蛋白动力学活性的抑制减弱，从而导致脑内环路的可塑性改变增强。

3.5 蛋白质磷酸化和去磷酸化基因

长时程电位(long-term potential LTP）是指活动依赖的突触传递效能降低[7]，有研究发现减少蛋白磷酸化酶的活性，可产生长时程抑制,本实验中蛋白磷酸化酶γ1亚基、蛋白磷酸化酶2A调节亚单位α同型体（protein phosphatase 2A regulatory subunit alpha-isotype (alpha-PR65)）和蛋白酪氨酸磷酸化酶（protein tyrosine phosphatase）表达均降低，可抑制 LTD的功能，从而导致突触传递效能的增强。

3.6 G蛋白基因

G蛋白信号系统参与调节离子通道和肌动蛋白细胞骨架重组，并与突触可塑性有关[8]。实验中G蛋白和G蛋白信号系统的调节因子表达均增高，支持突触可塑性改变增强的假说。

3.7 其它

本实验还发现血管活性肠肽(Vasoactive

维普资讯 http://www.cqvip.com

intestinal polypeptide)基因表达增强，这种基因的表达产物可通过调节脑源性神经营养因子(Brain-derived neural factor BDNF)的表达而调节神经元可塑性[9]；耐药性癫痫鼠DNA拓扑异构酶III表达增强，其可能的作用是增强DNA的复制、转录、重组、和修复功能，是突触可塑性增强的物质基础；此外，我们还发现许多功能类似的基因表达增强，如转录因子HBF-1mRNA(HBF-1 mRNA for transcription factor)、基本转录因子62kD亚基(basic transcription factor 62kD subunit)、转录因子TFIIE -a (transcription factor TFIIE- alpha)、转录因子WSTF (transcription factor WSTF)等基因，这些基因从不同的环节参与了DNA的修复、复制，是神经元突触可塑性重要的物质基础，这些基因的表达增强，支持难治性癫痫中突触可塑性增强是其重要成因的假说。

实验结果提示，难治性癫痫的耐药机制是复杂的，有多个系统、多种基因参与了耐药机制的形成，其中，突触可塑性增强是其重要的成因，如何逆转这些基因的改变来防治难治性癫痫，尚有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Edwards FA. Dancing dendrites[J]. Nature, 1998;394(6689): 129-130.

[2] Laux T, Fukami K, Thelen M, et al. GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism[J]. J Cell Biol, 2000;149(7):1455-`472.

[3] De Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, et al. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy [J]. Brain Res, 1989;495:387-395.

[4] Matus A. Postsynaptic actin and neuronal plasticity[J]. Curr Opin Neurobiol, 1999;9(5):561-565.

[5] Shu T, Valentino KM, Seaman C, et al. Expression of the netrin-1 receptor, deleted in colorectal cancer (DCC),is largely confined to projecting neurons in the developing forebrain[J]. J Comp Neurol, 2000;416(2):201-212.

[6] Cr è me I, Lange R, Christoph A, et al. Inactivation of the NCAM gene in the mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning[J]. Nature, 1994;367:455-466.

[7] Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, et al. Involvment of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long -term depression[J]. Nature, 1994;369:486-488.

[8] Boshans RL, Szanto S, van Aelst L, et al. ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA[J]. Mol Cell Biol, 2000;20(10):3685-3694.

[9] Pellegri G, Magistretti PJ, Martin JL. VIP and PACAP potentiate the action of glutamate on BDNF expression in mouse cortical neurones[J]. Eur J Neurosci, 1998;10(1):272-280.

(上接第275页)

参 考 文 献

[1] Iwase T, Murakami, T Tomita T, et al. Ischemic preconditioning is associated with a delay in ischemia-induced reduction of β -adrenergic signal transduction in rabbit hearts[J]. Circulation, 1993;88:2827-2837.

[2] 徐成斌，王炳银，吕宝璋，等. 急性缺血时大鼠心肌βIAR变化及意义. 北京医科大学学报[J]. 1993;25(1):49-50.

[3] 覃 数，陈运贞. 大白鼠实验性心肌缺血再灌注模型制备与心电图改变的特点[J]. 重庆医科大学学报，1998;23(1): 8-10.

[4] Murphree SS, Saffitz JE. Distribution of β -adrenergic receptors infailing human myocardium:implication for mechanisms of down-regulation[J]. Circulation, 1989;79:1214-1225.

[5] Ungerer M, Bohm M, Elce JS. Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β 1-adrenergic receptors in the failing human heart[J]. Circulation, 1993;87:454-463.

[6] Das DK, Engelman RM, Kimura Y, et al. Molecular adaptation of cellular defences following preconditioning of the heart by repeated ischaemia[J]. Cardiovasc Res, 1993;27:578-584.

[7] Sun JZ, Tang XL, Knowlton AA, et al. Late preconditioning against myocardial stunning.An endogenous protective mechanism that confers resistans to postischemic dysfunction 24h after brief ischemia in conscious pigs[J]. J Clin Invest, 1995; 95:388-403.

[8] Lochnor A. Genade S.Ischemic preconditioning and beta-adrenergic signal transduction pathway[J]. Circulation, 1999;100 (9):958-966.