DOI:10.16016/j.2097-0927.202309029

基于蛋白质组学探讨 Ppp3cb 和 Ppm1g 在 NHE1 基因敲除模型鼠海马组织中的表达

马鹏飞[1],杨 攀[2],郑 乾[1],张祥明[2],屠秋霞[2],张春林[2,3],叶 兰[2],冯占辉[1] 550000 贵阳,贵州医科大学临床医学院[1];550025 贵阳,贵州医科大学基础医学院:分子医学工程研究中心[2],生物教研室[3]

[摘要] **目的** 通过 NHE1 基因敲除模型鼠的海马组织差异蛋白质组学分析,发现并明确 Ppp3cb 和 Ppm1g 的表达特征。**方法** ①选取 6 只 2 周龄 NHE1 基因敲除模型鼠作为模型组,同周龄野生型小鼠 6 只作为对照组,采用琼脂糖凝胶电泳检测其基因型;应用旷场实验和强迫游泳实验对模型组和对照组小鼠进行行为学评估,并按照 Racine 评分标准对模型鼠进行癫痫发作分级;②通过串联质谱分析技术对模型组和对照组的海马组织进行差异蛋白筛选,基因本体论(Gene Ontology Analysis, GO)分析差异蛋白并进行注释和富集,蛋白网络数据库(search tool for the retrieval of interesting genes, STRING)分析差异蛋白之间的蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI);③应用 qPCR 和 Western blot 检测 Ppp3cb 和 Ppm1g 的转录和翻译水平,应用免疫组织化学技术分别观察其在组织中的表达量。**结果** ①模型组小鼠 NHE1 基因未见表达,旷场实验中模型鼠的运动总距离较对照组减少($P=0.007\ 3$),跨越的格子数比对照组显著减少($P<0.000\ 1$)。强迫游泳实验结果显示,模型鼠不动的时间明显延长($P<0.000\ 1$);②以表达倍数(FC)≥1.2 倍且 $P<0.05$ 为筛选标准,检测到海马组织中 845 个差异表达的蛋白质点,其中有 9 个蛋白表达上调,7 个蛋白表达下调。其中 Ppp3cb 下调,Ppm1g 上调。GO 功能注释结果表明,NHE1 敲除后,分子功能(MF)富集在蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性的差异最显著,细胞成分(CC)富集在质膜部分的差异蛋白数量最多,生物过程(BP)富集在负向调节生物过程、免疫系统过程的差异蛋白数量最多。STRING 分析显示差异蛋白 Ppp3cb 和 Slc9a1 直接作用,Ppm1g 通过 Ppp3cb 和 Slc9a1 间接作用,Ppp3cb 和 Ppm1g 之间相互作用。③Ppp3cb 的转录和翻译水平减少,在组织中的表达量下降,而 Ppm1g 转录和翻译水平增加,在组织中的表达量上升($P<0.05$)。**结论** 本研究确定了 NHE1 基因敲除小鼠海马组织中差异蛋白 Ppp3cb 表达下调,而 Ppm1g 表达上调,为进一步研究 Ppp3cb 和 Ppm1g 参与癫痫发病机制提供了依据。

[关键词] NHE1 基因敲除;癫痫;海马;蛋白质组学;Ppp3cb;Ppm1g
[中图法分类号] R338.26; R394-33; R394.2 [文献标志码] A

Expression of Ppp3cb and Ppm1g in the hippocampus of NHE1 gene knockout rats based on proteomics

MA Pengfei[1], YANG Pan[2], ZHENG Qian[1], ZHANG Xiangming[2], TU Qiuxia[2], ZHANG Chunlin[2,3], YE Lan[2], FENG Zhanhui[1] [1]School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550000; [2]Research Center of Molecular Medical Engineering, [3]Department of Biology, Basic Medical School, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550025, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate and validate the expression profiles of Ppp3cb and Ppm1g through differential proteomic analysis of hippocampal tissue in NHE1 gene knockout mice with proteomic analysis. **Method** ① Six 2-week-old NHE1 knockout mice were selected as the model group, and 6 wild-type mice of the same age served as the control group, and their genotypes were detected by agar-gel electrophoresis. Open field test and forced swimming test were used to evaluate the behaviors of mice in the model group and control group, and epileptic seizure was graded according to Racine scoring. ② Tandem

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(8186050199,8236050283)
[通信作者] 冯占辉,E-mail:h9450203@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

mass spectrometry was employed to screen the differential proteins in the hippocampus tissues from the model group and the control group. Then the obtained differential proteins were annotated and enriched in the Gene Ontology (GO) database. Search tool for the retrieval of interesting genes (STRING) database was used to analyze protein-protein interaction (PPI) among different proteins. ③ The transcriptional and translational levels of Ppp3cb and Ppm1g were detected by qPCR and Western blotting, respectively, and their expression levels in the tissues were observed with immunohistochemistry. **Results** ① NHE1 was not expressed in the model group. The mice of the model group had shorter total movement distance ($P=0.007\ 3$) and less crossing cells ($P<0.000\ 1$) in open field test, and longer period of immobility in forced swimming test ($P<0.000\ 1$) when compared with those from the control group. ② When fold change $\geqslant 1.2$ times and $P<0.05$ were set as the significant threshold for differential expression, 845 differentially expressed protein sites were detected in the hippocampus, among which 9 proteins (including Ppm1g) were up-regulated and 7 ones (including Ppp3cb) were down-regulated. Gene Ontology (GO) functional analysis showed that after NHE1 knockout, the most significant differences were observed in the concentration of molecular function (MF) related to protein serine/threonine phosphatase activity, concentration of cellular component (CC) related to the plasma membrane, and concentration of biological process (BP) related to negative regulation of biological processes and immune system processes. STRING analysis indicated that the differential proteins Ppp3cb and Slc9a1 directly acted, Ppm1g indirectly acted through Ppp3cb and Slc9a1, and Ppp3cb and Ppm1g interacted. ③The transcriptional and translational levels of Ppp3cb were decreased, and its expression level was reduced in the tissues, while those of Ppm1g were increased, and its expression was elevated in the tissues ($P<0.05$). **Conclusion** In the hippocampus of NHE1 gene knockout mice, the expression of differential protein Ppp3cb is down-regulated and that of Ppm1g is up-regulated, which provide a basis for further study on their involvement in the pathogenesis of epilepsy.

[**Key words**] NHE1 gene knockout; epilepsy; hippocampus; proteomics; Ppp3cb; Ppm1g

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (8186050199, 8236050283). Corresponding author: FENG Zhanhui, E-mail: h9450203@126.com

癫痫是一种常见的慢性神经系统疾病[1]。全球约有6 500万人患有癫痫[2]。有研究表明基因突变是癫痫发病的重要因素之一[3]。目前已经确定了多个与癫痫发生相关的基因突变,其中一些基因编码的蛋白与神经元兴奋性调节、离子通道的功能、突触可塑性等神经生物学机制密切相关。

Na^+/H^+交换体(Na^+/H^+ exchangers, NHEs)是一类膜转运蛋白家族,通过排出H^+来交换Na^+内流,积极参与调节细胞内和细胞器pH值,NHE1功能的改变显著影响神经元兴奋性,并在癫痫发病中发挥作用[4]。有研究表明NHE1突变的小鼠具有运动性共济失调和癫痫发作的表型,同时生长和繁殖能力也会下降[5]。一项全外显子组测序显示Lichtenstein-Knorr综合征是由于人类NHE1基因(Slc9a1)突变引起的,可导致耳聋、发育受损、共济失调和癫痫[6]。然而NHE1突变或者敲除后造成众多表型潜在的机制仍旧不清楚。

Ppp3cb是一种钙调蛋白磷酸酶,具有丝氨酸/苏氨酸活性位点,可以结合钙、铁和锌等多种离子发挥作用,Ppp3cb和神经退行性疾病[7]、神经元星形胶质细胞[8]、精神疾病[9]高度相关。Ppm1g也同属于磷酸酶家族,且Ppm1g和精神[10]、行为表型[11]以及运动神经元[12]高度相关,因此探究Ppp3cb和Ppm1g在NHE1基因敲除模型鼠海马组织中的表达水平至关重要。

蛋白质组学技术可以揭示不同个体在生理或病理的状态下,其蛋白质表达的异同,从而帮助我们更加全面地了解疾病的病理生理过程,为确定新的药物治疗靶点,以及改善新的疗法提供信息[13-14]。因此,本研究拟采用蛋白质组学技术,结合课题组前期研究结果[15-17],分析NHE1基因敲除小鼠和正常小鼠海马组织的蛋白质表达差异,并从分子水平探索差异蛋白Ppp3cb和Ppm1g的表达变化,试图为探索癫痫发病机制提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 构建NHE1基因敲除模型

使用CRISPR/Cas9技术对Slc9a1基因外显子2进行敲除,将CRISPR/Cas9系统微注射到C57BL/6JGpt小鼠受精卵中,移植受精卵获得F0代阳性小鼠,经PCR和测序鉴定其基因型,接着将F0代阳性小鼠与C57BL/6JGpt小鼠交配,获得稳定的F1代小鼠模型。

1.2 动物及分组

采用的实验动物有:3~4 周龄 SPF 级 C57BL/6JGpt-Slc9a1 雄鼠 1 只及雌鼠 3 只,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,体质量 10~14 g;6 周龄 C57BL/6J 雄鼠 2 只及雌鼠 3 只,来自贵州医科大学动物实验中心。小鼠均饲养于 SPF 级环境,室内的温度保持在 22~28 ℃,相对湿度维持在 40%~60%,昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h。基因型鉴定后选取 2 周龄野生型雄鼠 6 只作为对照(Control)组,纯合型雄鼠 6 只作为模型(Model)组。所有实验经过贵州医科大学伦理委员会批准(No. 2303414),通过戊巴比妥钠腹腔麻醉处理后取材,符合动物实验相关的伦理和福利原则。

1.3 基因型鉴定

提取鼠尾 DNA 后经 PCR 扩增鉴定。PCR 反应体系包括 2×*Taq* Master Mix (Dye Plus)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)12.5 μL,ddH_2O 9.5 μL,P1 和 P2 引物各 1 μL。PCR 方案按如下进行:95 ℃启动 5 min,98 ℃扩增 30 s,65 ℃进行 30 s,72 ℃进行 45 s,20 个循环后继续在 98 ℃下扩增 30 s,55 ℃进行 30 s,在 72 ℃进行 45 s,重复 20 个循环,接着在 72 ℃下扩增 5 min,10 ℃保持。最后通过琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪中观察拍照(图 1A)。琼脂糖凝胶电泳基因分型引物序列信息为:P1 正向 5′-GGACAGTTGGCG-AATACTCTGTG-3′和反向 5′-GCCTCCTCAGAGATTA-AATGGGC-3,P2 正向 5′-AACCTTCTGTTCTTCTGGCT-CCC-3′和反向 5′-GCAGAGATGATGCTGCCAAAGAG-3′。

1.4 癫痫发作分级

采用 Racine 标准对小鼠的发作进行分级:0 级无抽搐发作,Ⅰ级面部阵挛(眼、鼻、嘴唇),Ⅱ级面部阵挛+咀嚼、节律性点头,Ⅲ级单只前肢阵挛伴节律性点头,Ⅳ级双侧前肢持续性痉挛伴站立,Ⅴ级全身强直阵挛发作或跌倒。

1.5 蛋白质组学

1.5.1 蛋白提取、酶解与肽段标记 通过研磨、裂解、超声、离心相结合的方法对样品蛋白进行高效提取,接着用 TCA/丙酮沉淀蛋白,经丙酮清洗后溶解蛋白沉淀,进行蛋白质控。质控合格后,各组取等量(通常 100 μg)蛋白进行酶解消化。为提高酶解效率,通常在酶解前进行还原、烷基化处理,并进行二次酶解。酶解产生的肽段经脱盐处理即可进行 iTRAQ/TMT 标记反应。标记反应目的在于通过在不同样品肽段的末端分别加上异质同位素标记的报告基团,来对各组样品的肽段进行精确定量。

1.5.2 组分分离与质谱上机 为了减低单次上机的肽段复杂度,提高整体蛋白鉴定的通量,需要对标记肽段进一步组分分离。这里通过高 pH 反向 C18 色谱柱对混合后的标记肽段进行 HPLC 组分分离,根据样品蛋白的复杂程度,通常分为 8~20 个组分。接着每一个肽段组分分别进行 LC-MS/MS 鉴定,使用 nanoLC1000 对肽段梯度洗脱,然后进入 Orbitrap Elite 组合式质谱仪/Q Exactive 组合式质谱仪质谱鉴定,挑选 20 个高强度母离子进行二级质谱鉴定与定量。

1.5.3 生物信息学分析 质谱数据下机后使用 Mascot、Request 等数据库进行检索并对蛋白进行鉴定和定量分析,最后对鉴定到的差异蛋白做基因本体论(Gene Ontology Analysis, GO)分析。使用蛋白网络数据库(search tool for the retrieval of interesting genes, STRING)对所有差异蛋白进行蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析。

1.6 行为学评估

旷场实验(open field test, OFT)在透明箱(长 36 cm×宽 36 cm ×高 40 cm)内进行,观察小鼠 10 min 内运动总距离和跨越的格子数,使用视频分析系统(美国 Stoelting 公司)记录。结束时用 75%乙醇清除老鼠的排泄物。强迫游泳(forced swimming test, FST)实验在一长 30 cm×宽 20 cm×高 10 cm 桶内进行,水温 23~25 ℃,观察并记录 1 min 内小鼠在水面漂浮不动的时间。对小鼠不动状态的评估是指主动放弃挣扎,躯体呈漂浮状态,无扭动、重心稳定的时间。

1.7 HE 染色

4%多聚甲醛(PFA)固定海马组织,常规石蜡切片脱蜡至水。接着按照试剂盒标准步骤进行染色。HE 染色试剂盒购自于北京索莱宝科技有限公司。最后使用光学显微镜(日本 Nikon 公司)观察并捕捉图像。

1.8 Western blot 检测

用 RIPA 裂解缓冲液裂解海马组织。使用 BCA 蛋白分析试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)测定总蛋白浓度。使用 SDS-PAGE 来分离蛋白的提取物,然后转移到 PVDF 膜上。接着使用高效封闭液(上海积福生命科学有限公司)30 min,一抗在 4 ℃下孵育过夜[NHE1(1∶200,Abcam,AB216573), Ppp3cb(1∶1 000, Proteintech,13340-1-AP), Ppm1g(1∶100, Proteintech, 15532-1-AP), β-actin(1∶1 000, Affinity, BS6007M)]。PBS 洗涤后二抗在 37 ℃下孵育 2 h。通过增强化学发光试剂盒(杭州弗德生物科技有限公司)蛋白质条带可视化。使用化学曝光仪(上海天能科技有限公司)观察和拍照。最后使用 Image J 软件对结果进行量化。

1.9 实时荧光定量 PCR

所有试剂由北京宝日医生物技术有限公司提供。使用 TRIzol 试剂从速冻的海马组织或收集的细胞中分离总 RNA,最终获得的 cDNA 是从使用随机引物逆转录的 1 μg 总 RNA 中获得的。使用由 cDNA、特异性

引物和 TB Green® Premix Ex Taq Ⅱ(Tli RNaseH Plus)组成的混合物进行 qPCR。简而言之,PCR 方案在 95 ℃下启动 30 s,然后使用预扩增系统在 95 ℃下进行 40 个循环的扩增阶段 5 s,在 60 ℃下进行 30 s。为了鉴定扩增特异性,使用熔解曲线分析 Ppp3cb 和 Ppm1g 基因的 PCR 产物,同时使用 β-actin 作为内参。mRNA 水平的相对定量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 测量。使用到的引物从 5′到 3′如下所示:Ppp3cb 正向 5′-GTAAAAGAA-GGGCGGGTGGA-3′和反向 5′-TGGATGTCACCACACA-CTGTA-3,Ppm1g 正向 5′- FAGAATGCTGGTGGCAAG-GTC-3′和反向 5′-GTAGAAGTGGTCTCCAATGGC-3′。

1.10　免疫组化检测

4%多聚甲醛(PFA)固定海马组织,常规石蜡切片脱蜡至水。使用 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶 10 min,用 Tris-EDTA 缓冲液修复抗原,5%BSA 缓冲液阻断 30 min,一抗在 4 ℃下孵育过夜。使用的一抗分别为:Ppp3cb(1∶1 000,Proteintech,13340-1-AP),Ppm1g(1∶100,Proteintech,15532-1-AP)。接着使用免疫组织化学检测试剂盒(美国 Boster 公司)孵育 1 h,苏木精重新复染,最后使用 DAB 染色液显色后在光学显微镜(日本 Nikon 公司)下观察并捕捉图像。

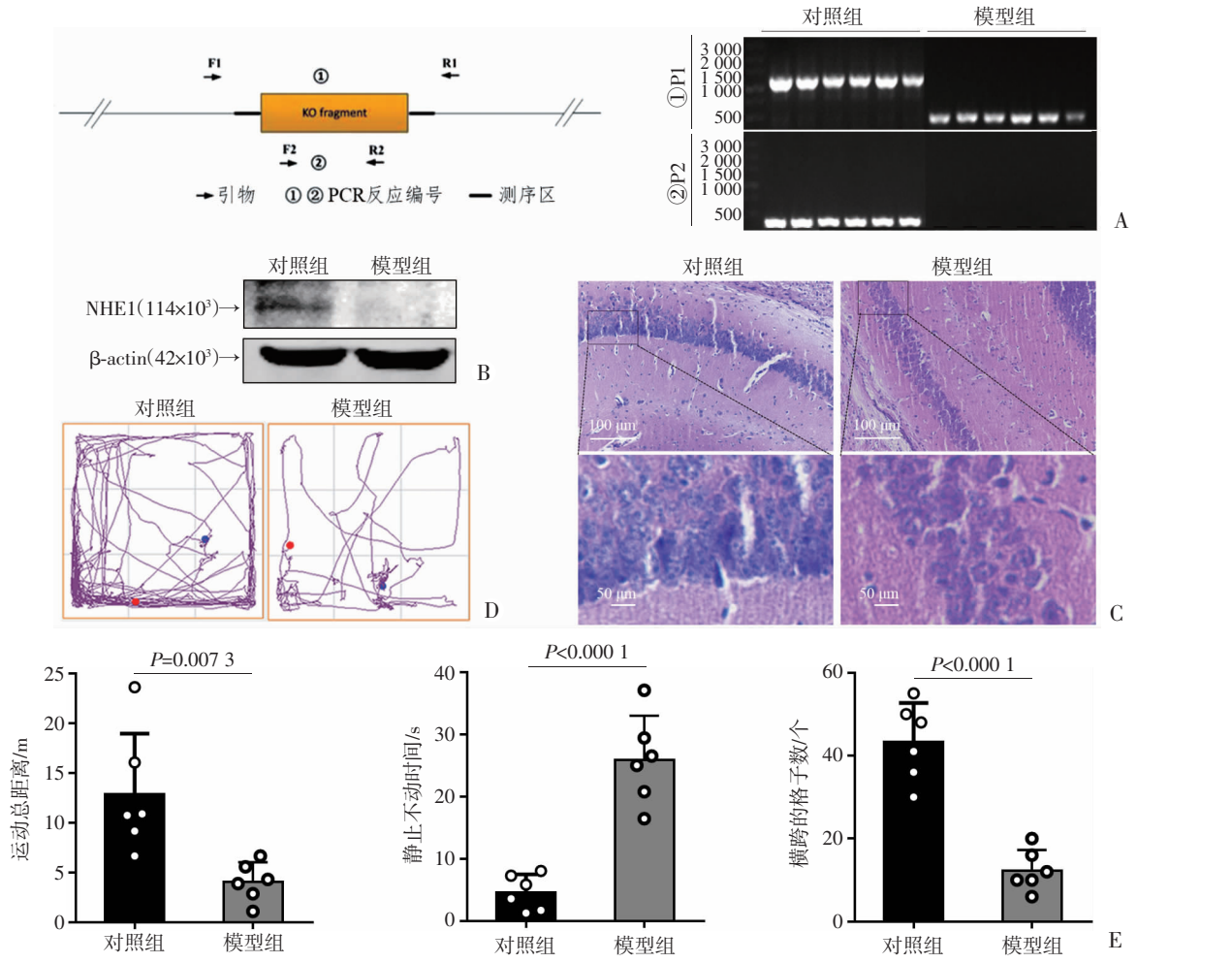
1.11　统计学分析

使用 Graphpad Prism(6.0)进行统计分析并作图,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,2 组间差异比较采用 Tukey 多重比较检验。$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　小鼠基因型鉴定

通过琼脂糖凝胶电泳的方法鉴定小鼠的基因型,在第 1 个 PCR 反应(P1)中,1 260 bp 条带是对照组,489 bp 条带是模型组。而在第 2 个 PCR 反应(P2)中,418 bp 条带是对照组,0 bp 条带是模型组。如图 1A 所示,从左到右分别为对照组、模型组。另外,模型组 V 级发作后会立即死亡,并且使用 Western blot 证实了 NHE1 的敲除(图 1B)。



A:基因型鉴定和琼脂糖凝胶电泳;B:Western blot 检测 NHE1 的蛋白表达;C:小鼠海马区域 HE 染色;D:旷场实验代表性轨迹图;E:分别为 2 组运动总路程、强迫游泳不动时间和跨越的格子数($n=6,\bar{x}\pm s$)

图 1　小鼠基因型鉴定、行为学和 HE 染色

2.2 小鼠行为学和病理学的表现

为了进一步确定 NHE1 敲除对小鼠的影响,通过旷场实验和强迫游泳实验对 2 组小鼠进行行为学评估。结果显示,模型鼠的运动总距离相比较对照组减少(P=0.007 3),跨越的格子数比对照组显著减少(P<0.000 1),模型鼠不动的时间明显延长(P<0.000 1,图 1D、E)。另外,HE 染色发现,对照组细胞核正常,色均一,胞质淡染,而模型组海马区细胞胞质融合,轮廓模糊,细胞核固缩变圆,染色加深(图 1C)。

2.3 蛋白质组学分析

2.3.1 海马组织中的差异蛋白 以表达倍数(FC)≥1.2 倍且 P<0.05 为筛选标准,检测到海马组织中 845 个差异表达的蛋白质点,其中有 9 个蛋白表达上调,7 个蛋白表达下调。其中 Ppp3cb 下调,Ppm1g 上调(表 1)。

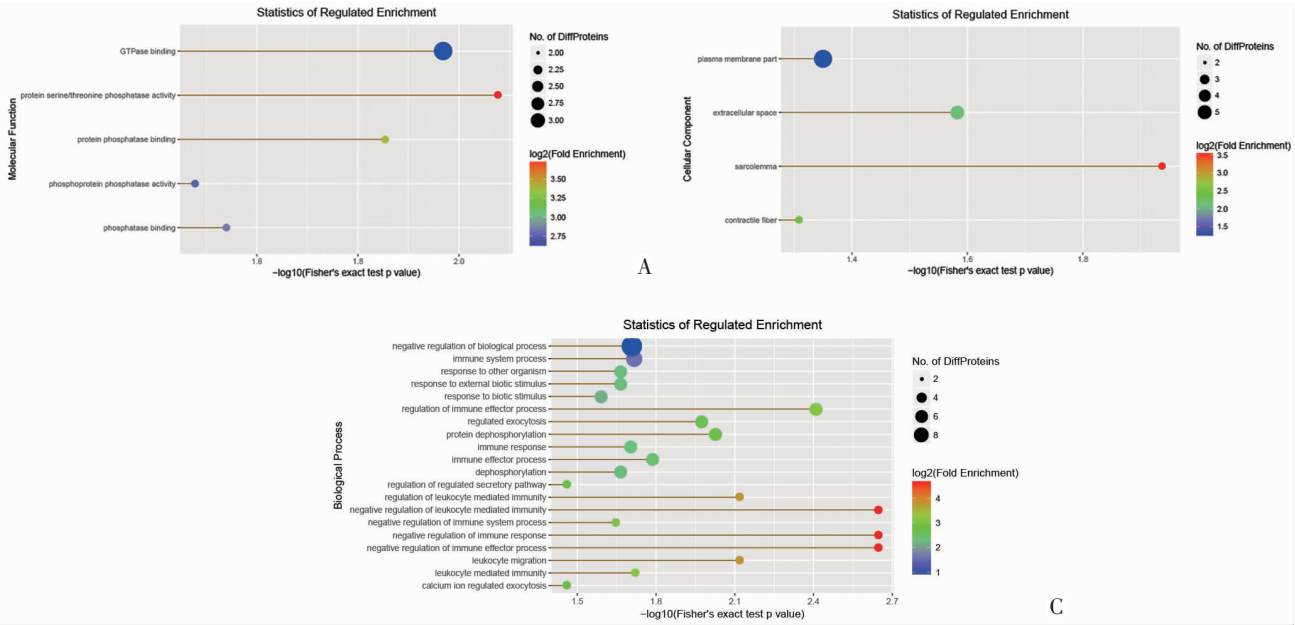
2.3.2 差异蛋白 GO、PPI 分析 GO 功能注释结果表明,NHE1 敲除后,在分子功能(MF)富集中(图 2A),对照组和模型组显著富集在蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性、GTP 酶结合、蛋白磷酸酶结合、磷酸酶活性以及磷酸酶结合等,其中富集在蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性的差异最显著。在细胞成分(CC)富集中(图 2B),对照组和模型组显著富集在质膜部分、细胞外空间、肌纤维膜以及收缩纤维等,其中富集在质膜部分的差异蛋白数量最多。在生物过程(BP)富集中(图 2C),对照组和模型组显著富集在负向调节生物过程、免疫系统过程、对其他生物的反应、对外界生物刺激的反应、对生物刺激的反应、免疫效应过程的调控、调节胞外分泌、蛋白去磷酸化、免疫反应、免疫效应过程、去磷酸化、调节分泌途径、白细胞介导的免疫调节、白细胞介导的免疫负调控、免疫系统过程的负调节、免疫应答负向调节、免疫效应过程的负向调控、白细胞介导的免疫、钙离子调节、胞吐作用等,其中富集在白细胞介导的免疫负调控、免疫应答负向调节、免疫效应过程的负向调控的差异最显著,而富集在负向调节生物过程、免疫系统过程的差异蛋白数量最多。

另外,通过 STRING 数据库,分析了全部差异蛋白之间的蛋白质相互作用关系(图 3A),其中 Ppp3cb 和 Slc9a1 有直接作用关系(图 3B),另外,Ppm1g 通过 Ppp3cb 和 Slc9a1 有间接作用关系,Ppp3cb 和 Ppm1g 之间相互作用(图 3C)。

2.3.3 差异蛋白 Ppp3cb 和 Ppm1g 在 NHE1 基因敲除小鼠模型中的表达 为了进一步确定 Ppp3cb 和 Ppm1g 的表达是否异常,采用 qPCR 和 Western blot 检测海马组织中差异蛋白 Ppp3cb 和 Ppm1g 的 mRNA 和蛋白的表达。与对照组相比,模型组 Ppp3cb 的 mRNA 和蛋白的表达量下降(P<0.05),而 Ppm1g 的表达相反(P<0.01,图 4A)。此外,免疫组织化学显示 Ppp3cb 在 NHE1 基因敲除模型鼠海马组织中的 CA1、CA3、DG 区表达减少(P<0.05,图 4B),而 Ppm1g 在 NHE1 基因敲除模型鼠海马组织中的 CA1、CA3、DG 区的表达量上升(P<0.05,图 4C)。这些结果表明 Ppp3cb 和 Ppm1g 可能参与了 NHE1 基因敲除模型小鼠癫痫发病的机制。

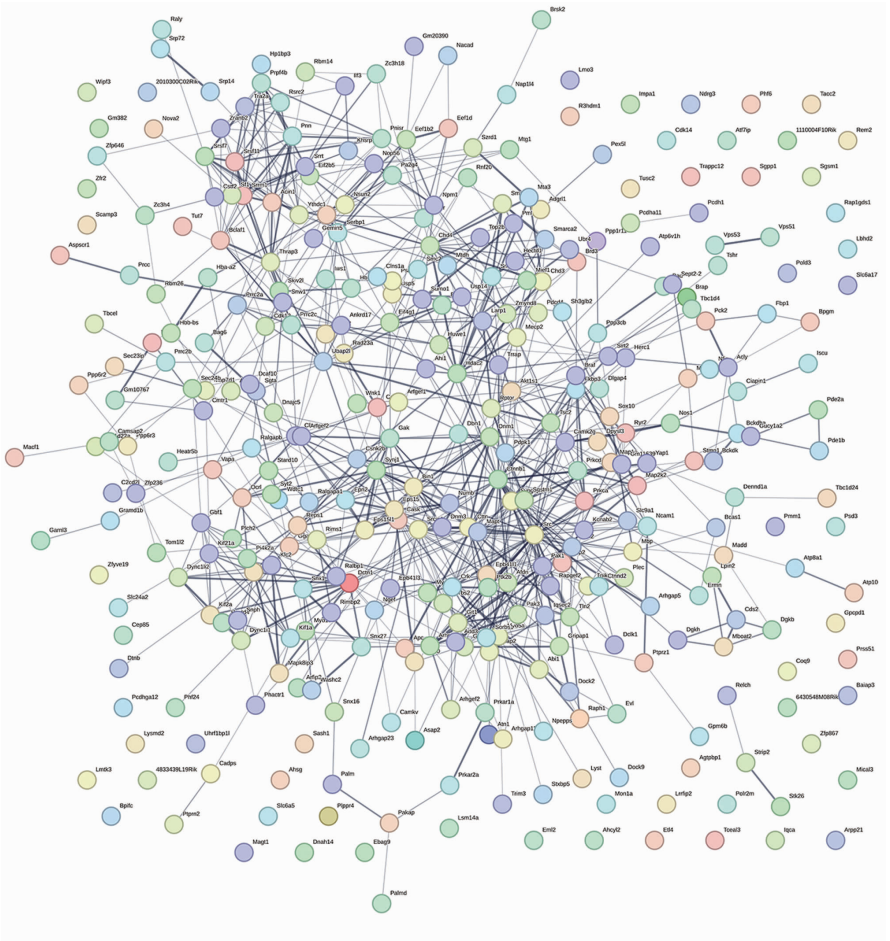
表 1 2 组小鼠海马组织中 16 个差异表达蛋白质

蛋白质编号	蛋白名称	基因名	调节	模型/对照	P 值
Q3UID0	SWI/SNF complex subunit SMARCC2	Smarcc2	下调	1.734365	0.019
G3X8U7	Serine/threonine-protein phosphatase	Ppp3cb	下调	1.220018	0.034
Q99PT1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Arhgdia	下调	1.377619	0.031
P62996	Transformer-2 protein homolog beta	Tra2b	下调	2.909768	0.033
Q03517	Secretogranin-2	Scg2	下调	2.063898	0.018
P09528	Ferritin heavy chain	Fth1	下调	2.201237	0.013
Q6PAJ1	Breakpoint cluster region protein	Bcr	下调	1.857252	0.016
G5E8R4	SAPS domain family, member 3	Ppp6r3	上调	0.594700	0.029
Q9CT10	Ran-binding protein 3	Ranbp3	上调	0.664929	0.017
A2ARP8	Microtubule-associated protein 1A	Map1a	上调	0.724632	0.029
Q9WV92	Band 4.1-like protein 3	Epb41l3	上调	0.802555	0.014
P17182	Alpha-enolase	Eno1	上调	0.811451	0.037
A0A3B2W7J8	Plectin	Plec	上调	0.470013	0.028
Q8BHE3	Caytaxin	Atcay	上调	0.821322	0.032
E9PWP6	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	Rims1	上调	0.514933	0.047
Q61074	Protein phosphatase 1G	Ppm1g	上调	0.649490	0.011



A:分子功能(MF);B:细胞成分(CC);C:生物过程(BP)

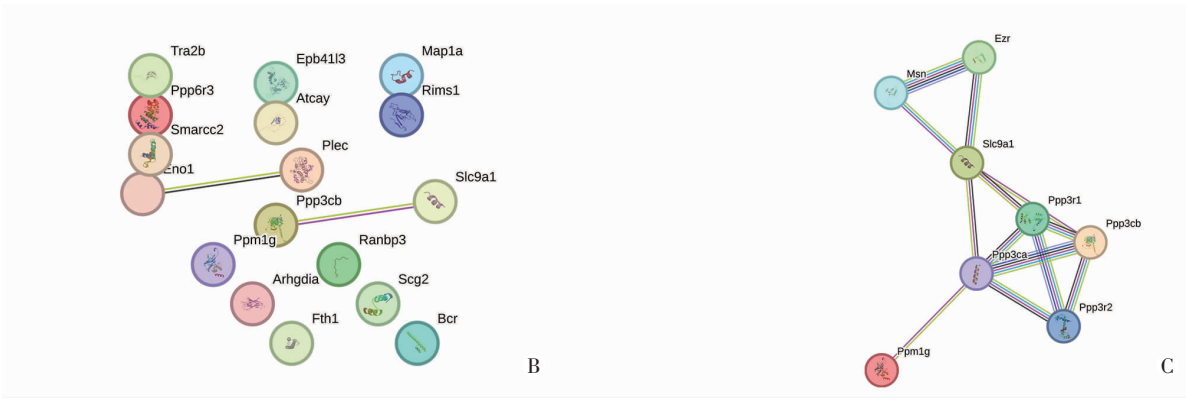
图 2 差异表达蛋白质 GO 分析



A:全部差异蛋白的蛋白互作关系

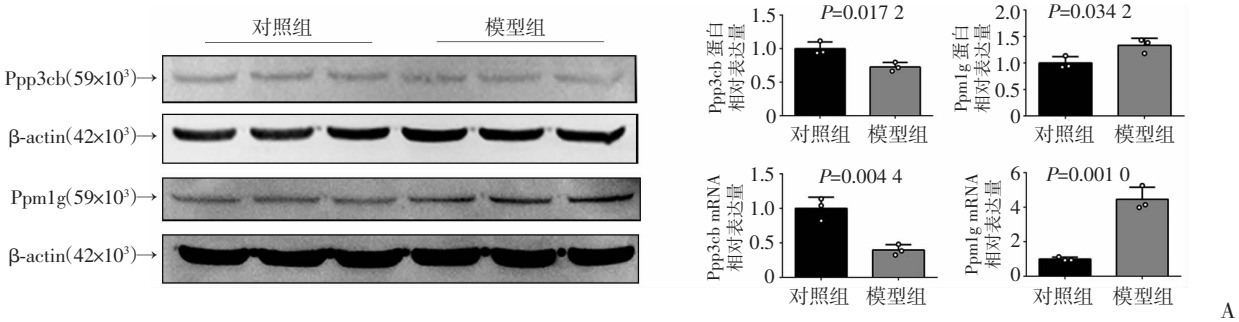
图 3 蛋白互作关系分析

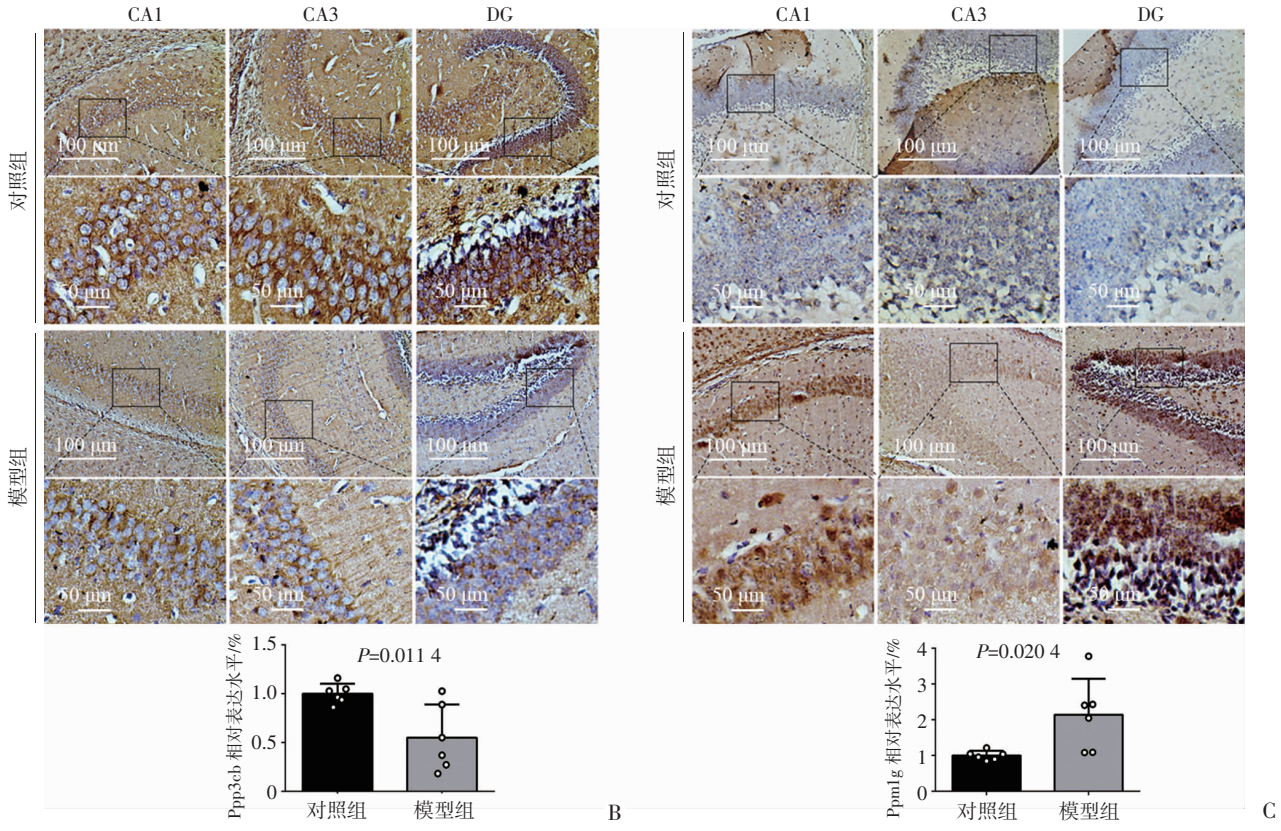
(图 3B、C 续下页)



B、C:Ppp3cb、Ppm1g 和 Slc9a1 的蛋白互作关系

续图 3 蛋白互作关系分析





A:Ppp3cb 和 Ppm1g 的蛋白和 mRNA 水平及分析($n=3$,$\bar{x}\pm s$);B:免疫组化检测小鼠 CA1、CA3、DG 区的 Ppp3cb 的表达量及分析;C 免疫组化检测小鼠 CA1、CA3、DG 区的 Ppm1g 的表达量及分析

图 4 2 组小鼠海马组织中差异蛋白 Ppp3cb 和 Ppm1g mRNA 和蛋白的表达

3 讨论

Na^+/H^+交换体 1 是一类膜转运蛋白家族之一。其活性受到钙离子的调控,细胞内的钙离子通过与钙调蛋白形成复合物来调节细胞的功能[18]。然而 NHE1 突变或者敲除后造成众多表型潜在的机制仍旧不清楚。本研究基于海马蛋白质组学的研究发现,Ppp3cb 表达下调和 Ppm1g 表达上调。

Ppp3cb 具有 4 个结构域:催化结构域、螺旋钙调蛋白 b 结合段、钙调蛋白结合段和自身抑制肽段。Ppp3cb 被激活后与靶蛋白结合,使底物蛋白去磷酸化,进而促进信号转导[19]。Ppp3cb 在人类胚胎早期的多个组织中都有表达,该基因与神经发育密切相关,与 Ppp3cb 相关的疾病有精神分裂症[20]。一项回顾性队列研究显示[21],入院的精神分裂症患者癫痫发作的风险增加,癫痫患者合并精神分裂症的风险也增加。除此之外,严重的难治性癫痫患者合并精神分裂症的风险更高。越来越多的研究表明,Ppp3cb 在癫痫和精神分裂症中都起着关键作用,它们之间存在双向关系和共享机制[22]。本研究发现,NHE1 基因敲除小鼠海马 CA1、CA3、DG 区 Ppp3cb 的表达量下降,其在转录和翻译水平也如此。这些结果表明,Ppp3cb 很可能参与了 NHE1 基因敲除鼠癫痫的发病机制。

Ppm1g 也同属于磷酸酶家族。Ppm1g 和镁、锰等离子结合形成蛋白磷酸酶全酶复合体,参与 mRNA 剪接、染色质重塑、DNA 损伤应答、蛋白质翻译以及细胞凋亡等过程[12, 23]。本研究蛋白质组学结果显示,蛋白磷酸酶 Ppm1g 上调。PPI 分析表明 Ppm1g 通过 Ppp3cb 和 Slc9a1 有间接作用关系,Ppp3cb 和 Ppm1g 之间相互作用。进一步验证结果提示 Ppm1g 的蛋白和 mRNA 表达量增加,在 NHE1 基因敲除小鼠海马 CA1、CA3、DG 区表达量也增加。研究表明,Ppm1g 可以通过磷酸化、乙酰化和泛素化等许多种方式进行调节,Ppm1g 的表达量和基因突变、激酶的调控以及启动子的甲基化相关,与 Ppm1g 相关的疾病包括肿瘤[24]与品行障碍[11]。一项遗传分析证实,一名男性中年癫痫患者,因基因突变导致脊髓肿瘤发生[25],并且较高水平的 Ppm1g 与不良预后密切相关[26]。Ppm1g 甲基化的改变是品行障碍患者冒险倾向、冲动增加的原因之一,而品行障碍病史是一种和癫痫高度相关的危险因素[27]。Ppm1g 与神经元细胞凋亡增加以及应激信号升高有关,其具有显著的胚胎致死性,Ppm1g 在调节细胞的周期进程和应激反应中都在发挥着至关重要的作用[10]。Ppm1g 的过表达促进去磷酸化,从而改变细胞周期、转录和调控[28]。因此,Ppm1g 可能在参与癫痫发病机制中起着非常关键的作用。

蛋白质的磷酸化是一种普遍存在的可逆翻译后修饰,参与各种各样的生物活动过程。在人类中,98%的磷酸化存在于丝氨酸/苏氨酸,且受到蛋白激酶和蛋白磷酸酶的调节[29]。此外,丝氨酸/苏氨酸的去磷酸化由 3 种不同的磷酸酶调节,分别是钙调蛋白磷酸酶、磷酸蛋白磷酸酶,以及基于天冬氨酸的 RNA 聚合酶,其中钙调蛋白磷酸酶的作用最重要[30]。

有研究表明,缺乏钙调蛋白磷酸酶的小鼠,表现为运动能力减弱,其骨骼肌的过度磷酸化与线粒体结构异常有关[31]。本研究结果显示,NHE1 基因敲除小鼠运动能力明显下降,其海马神经元细胞胞质融合,轮廓模糊,核固缩变圆,染色加深。一项基于生物本体的分析表明,钙调蛋白磷酸酶在对环境变化的适应性代谢反应中起着高度保守的枢纽作用,介导和细胞过程相关的基因表达[32],因此,钙调蛋白磷酸酶也间接反映了神经毒性。钙调蛋白磷酸酶在控制全身能量和体重稳态中起关键作用,因此,和钙调蛋白磷酸酶相关的信号是许多生理过程的核心[33]。

本研究中 GO-MF 显著富集在蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性、GTP 酶结合、蛋白磷酸酶结合、磷酸酶活性以及磷酸酶结合等,并且蛋白质组学结果显示钙调蛋白磷酸酶家族成员 Ppp3cb 下调,PPI 结果表明,Ppp3cb 和 Slc9a1 有直接作用关系。另外,GO-CC 显著富集在质膜部分、细胞外空间、肌纤维膜以及收缩纤维等,其中质膜部分数量最多,提示缺失 NHE1,胞外区域最先受到影响,导致胞内和胞外失去联系,胞内会启动其他的结构和连接进行代偿,从而维持细胞稳态。GO-BP 富集在负向调节生物过程、蛋白质的去磷酸化、免疫应答、钙离子调节以及胞吐作用等过程,说明 NHE1 会影响蛋白质的磷酸化水平,这一机制可能和钙离子相关的调控有关。

综上所述,本研究确定了 NHE1 基因敲除小鼠海马组织中差异蛋白 Ppp3cb 和 Ppm1g 的表达变化,为进一步研究 Ppp3cb 和 Ppm1g 参与癫痫发病机制提供了依据,但具体的机制还需要深入研究。

参考文献:

[1] DUKO B, AYALEW M, TOMA A. The epidemiology of headaches among patients with epilepsy: a systematic review and meta-analysis[J]. J Headache Pain, 2020, 21(1): 3. DOI: 10.1186/s10194-020-1074-0.

[2] MESRAOUA B, TOMSON T, BRODIE M, *et al*. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): definition,

epidemiology, and significance of education[J]. Epilepsy Behav, 2022, 132: 108742. DOI: 10.1016/j.yebeh.2022.108742.

[3] SYMONDS J D, ZUBERI S M, JOHNSON M R. Advances in epilepsy gene discovery and implications for epilepsy diagnosis and treatment[J]. Curr Opin Neurol, 2017, 30(2): 193-199. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000433.

[4] 吴旭玲, 冯占辉, 叶兰. NHE1 在神经系统疾病中的研究进展[J]. 癫痫与神经电生理学杂志, 2021, 30(6): 363-367. DOI: 10.19367/j.cnki.2096-8388.2021.01.003.
WU X L, FENG Z H, YE L. Research progress of NHE1 in nervous system diseases[J]. J Epileptol Electroneuro-physiol China, 2021, 30(6): 363-367. DOI: 10.19367/j.cnki.2096-8388.2021.01.003.

[5] ZHAO H S, CARNEY K E, FALGOUST L, *et al*. Emerging roles of Na^+/H^+ exchangers in epilepsy and developmental brain disorders[J]. Prog Neurobiol, 2016, 138/139/140: 19-35. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2016.02.002.

[6] GUISSART C, LI X J, LEHEUP B, *et al*. Mutation of SLC9A1, encoding the major Na^+/H^+ exchanger, causes ataxia-deafness Lichtenstein-Knorr syndrome[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(2): 463-470. DOI: 10.1093/hmg/ddu461.

[7] RUSMINI P, CORTESE K, CRIPPA V, *et al*. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration[J]. Autophagy, 2019, 15(4): 631-651. DOI: 10.1080/15548627.2018.1535292.

[8] PFUHLMANN K, SCHRIEVER S C, LEGUTKO B, *et al*. Calcineurin A beta deficiency ameliorates HFD-induced hypothalamic astrocytosis in mice[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 35. DOI: 10.1186/s12974-018-1076-x.

[9] FORERO D A, HERTELEER L, DE ZUTTER S, *et al*. A network of synaptic genes associated with schizophrenia and bipolar disorder[J]. Schizophr Res, 2016, 172(1/2/3): 68-74. DOI: 10.1016/j.schres.2016.02.012.

[10] FOSTER W H, LANGENBACHER A, GAO C, *et al*. Nuclear phosphatase PPM1G in cellular survival and neural development[J]. Dev Dyn, 2013, 242(9): 1101-1109. DOI: 10.1002/dvdy.23990.

[11] PARK C I, KIM H W, HWANG S S, *et al*. Association of PPM_1G methylation with risk-taking in alcohol use disorder[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 5490. DOI: 10.1038/s41598-020-62504-y.

[12] SUN C, WANG G H, WRIGHTON K H, *et al*. Regulation of $p27^{Kip1}$ phosphorylation and G1 cell cycle progression by protein phosphatase PPM1G[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(10): 2207-2220.

[13] BINDILA L, EID T, MILLS J D, *et al*. A companion to the preclinical common data elements for proteomics, lipidomics, and metabolomics data in rodent epilepsy models. A report of the TASK3-WG4 omics working group of the ILAE/AES joint translational TASK force[J]. Epilepsia Open, 2022. DOI: 10.1002/epi4.12662.

[14] ZHENG Y Q, JIN M F, SUO G H, *et al*. Proteomics for studying the effects of ketogenic diet against lithium chloride/pilocarpine induced epilepsy in rats[J]. Front Neurosci, 2020, 14: 562853. DOI: 10.3389/fnins.2020.562853.

[15] 谢懂君, 郑乾, 彭爽, 等. 癫痫模型大鼠心肌组织钠氢交换体 1 的表达及与凋亡的关系[J]. 癫痫与神经电生理学杂志, 2022, 31(1): 7-11. DOI: 10.19984/j.cnki.1674-8972.2022.01.02.
XIE D J, ZHENG Q, PENG S, *et al*. The relationship of the expression of sodium hydrogen exchanger 1 and apoptosis in myo-cardial tissue of epileptic rats[J]. J Epileptol Electroneurophysiol China, 2022, 31(1): 7-11. DOI: 10.19984/j.cnki.1674-8972.2022.01.02.

[16] 马鹏飞, 彭爽, 谢懂君, 等. Cariporide 对癫痫模型大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 癫痫与神经电生理学杂志, 2022, 31(4): 193-196, 202. DOI: 10.19984/j.cnki.1674-8972.2022.04.01.
MA P F, PENG S, XIE D J, *et al*. Effect of cariporide on cardiomyocyte apoptosis in epileptic rats[J]. J Epileptol Electroneurophysiol China, 2022, 31(4): 193-196, 202. DOI: 10.19984/j.cnki.1674-8972.2022.04.01.

[17] 彭爽, 吴旭玲, 于云莉, 等. 钠氢交换体 1 在氯化锂-匹罗卡品点燃癫痫大鼠模型海马组织内的表达[J]. 贵州医科大学学报, 2021, 46(1): 16-21. DOI: 10.19367/j.cnki.2096-8388.2021.01.003.
PENG S, WU X L, YU Y L, *et al*. Expression of NHE1 in hippocampus of epileptic rat model kindled by lithium pilocarpine[J]. J Guizhou Med Univ, 2021, 46(1): 16-21. DOI: 10.19367/j.cnki.2096-8388.2021.01.003.

[18] CHEN H L, SONG L J, LI G X, *et al*. Human rotavirus strain Wa downregulates NHE1 and NHE6 expressions in rotavirus-infected Caco-2 cells[J]. Virus Genes, 2017, 53(3): 367-376. DOI: 10.1007/s11262-017-1444-0.

[19] CHEN L, HE Q L, LIU Y M, *et al*. PPP3CB inhibits migration of G401 cells via regulating epithelial-to-mesenchymal transition and promotes G401 cells growth[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2): 275. DOI: 10.3390/ijms20020275.

[20] LIU C M, FANN C S, CHEN C Y, *et al*. ANXA7, PPP3CB, DNAJC9, and ZMYND17 genes at chromosome 10q22 associated with the subgroup of schizophrenia with deficits in attention and executive function[J]. Biol Psychiatry, 2011, 70(1): 51-8. DOI: 10.1016/j.

biopsych. 2011. 02. 033.

[21] ANDERSEN K M, PETERSEN L V, VESTERGAARD M, *et al*. Premature mortality in persons with epilepsy and schizophrenia: a population-based nationwide cohort study [J]. Epilepsia, 2019, 60(6): 1200-1208. DOI: 10.1111/epi. 15158.

[22] TAO H, ZHOU X, CHEN J, *et al*. Genetic effects of the schizophrenia-related gene *DTNBP*1 in temporal lobe epilepsy[J]. Front Genet, 2021, 12: 553974. DOI: 10.3389/fgene. 2021. 553974.

[23] XIONG D L, LI Q, WANG H, *et al*. High expression of PPM1G is associated with the progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2022, 34(1): 13-22. DOI: 10. 3233/CBM-203248.

[24] LIN Y R, YANG W J, YANG G W. Prognostic and immunological potential of PPM1G in hepatocellular carcinoma[J]. Aging, 2021, 13(9): 12929-12954. DOI: 10. 18632/aging. 202964.

[25] DE SOUZA P V S, DE REZENDE PINTO W B V, SANTOS A J. Metastatic breast cancer in a man with nonprogressive ataxia and epilepsy[J]. Neurology, 2015, 85(13): 1183-1184. DOI: 10. 1212/wnl. 0000000000001977.

[26] CHEN J Y, LI J Z, SUN H, *et al*. PPM1G promotes the progression of lung adenocarcinoma by inhibiting p38 activation *via* dephosphorylation of MEK6 [J]. Carcinogenesis, 2023, 44(1): 93-104. DOI: 10. 1093/carcin/bgac090.

[27] HERZOG A G. Association between family history of alcohol use disorder and catamenial epilepsy[J]. Epilepsia, 2022, 63(6): e63-e67. DOI: 10. 1111/epi. 17261.

[28] CHEN D W, ZHAO Z G, CHEN L, *et al*. PPM1G promotes the progression of hepatocellular carcinoma *via* phosphorylation regulation of alternative splicing protein SRSF3[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(8): 722. DOI: 10.1038/s41419-021-04013-y.

[29] ZHANG W, LI J, ZHAO N, *et al*. Ratiometric fluorescence biosensor for imaging of protein phosphorylation levels in atherosclerosis mice[J]. Anal Chim Acta, 2022, 1208: 339825. DOI: 10. 1016/j. aca. 2022. 339825.

[30] KUMAR P, TATHE P, CHAUDHARY N, *et al*. PPM_1G forms a PPP-type phosphatase holoenzyme with B56δ that maintains adherens junction integrity [J]. EMBO Rep, 2019, 20(10): e46965. DOI: 10. 15252/embr. 201846965.

[31] PFLUGER P T, KABRA D G, AICHLER M, *et al*. Calcineurin links mitochondrial elongation with energy metabolism[J]. Cell Metab, 2015, 22(5): 838-850. DOI: 10. 1016/j. cmet. 2015. 08. 022.

[32] LEE B H, KIM J H, KIM J M, *et al*. The early molecular processes underlying the neurological manifestations of an animal model of Wilson's disease[J]. Metallomics, 2013, 5(5): 532-540. DOI: 10. 1039/c3mt20243g.

[33] NOLZE A, KÖHLER C, RUHS S, *et al*. Calcineurin (PPP3CB) regulates angiotensin II-dependent vascular remodelling by potentiating EGFR signalling in mice[J]. Acta Physiol (Oxf), 2021, 233(3): e13715. DOI: 10.1111/apha. 13715.

(收稿:2023-09-06;修回:2023-10-12)

(编辑 吴培红)