

[文章编号] 1000-4718(2006)09-1779-05

颞叶癫痫大鼠海马差异表达基因和蛋白质的筛选研究*

张进¹, 丁美萍¹, 刘照², 张宝荣¹, 李国良², 周富友^{1△}, 谷苗³
(¹ 浙江大学医学院附属二院神经内科, 浙江 杭州 310009; ² 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南 长沙 410008; ³ 军事医学科学院, 北京 100001)

[摘要] 目的: 寻找颞叶癫痫大鼠海马组织的差异表达基因和蛋白质, 以期为进一步探讨颞叶癫痫的发病机制, 寻找新的治疗靶点和研发新的治疗手段奠定基础。方法: 运用 cDNA 微阵列、二维电泳和 MALDI-TOF-MS 技术, 分析氯化锂-匹罗卡品(LiCl-PILO)致痫大鼠模型海马组织的基因表达谱和蛋白质表达谱, 并对发现的差异表达基因和差异表达蛋白质进行分析和鉴定。结果和结论: 发现 LiCl-PILO 致痫大鼠海马组织中 192 个基因差异表达, 159 条可在 GenBank 中登陆, 其中表达上调的基因 84 条, 表达下调的基因 75 条; 筛选到 78 个差异表达蛋白质斑点, 其中 31 个在癫痫组表达下调, 47 个在癫痫组表达上调。有 5 个蛋白质最终鉴定确认。本研究结果为运用蛋白质组学方法寻找癫痫治疗新靶点研究提供实验依据。

[关键词] 癫痫; 寡核苷酸序列分析; 基因表达; 海马

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Gene and protein alterations in the hippocampus of rats with temporal lobe epilepsy

ZHANG Jin¹, DING Mei-ping¹, LIU Zhao², ZHANG Bao-rong¹, Li Guo-liang², ZHOU Fu-you¹, GU Miao³

(¹ Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; ² Department of Neurology, Xiangya Hospital, Zhongnan University, Changsha 410008, China; ³ Military Medical Institute, Beijing 100001, China)

[ABSTRACT] AIM: To examine the expression profiles of both genes and proteins in hippocampus of rats with temporal lobe epilepsy (TLE) for revealing the molecular mechanisms of TLE and looking for the candidate targets and new therapeutic approaches in clinical practice. METHODS: Rat temporal lobe epilepsy was induced by administration of lithium chloride and pilocarpine (LiCl-PILO). The expression spectra of genes and proteins were constructed through the techniques of cDNA microarray, two-dimensional (2D) electrophoresis and Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Subsequently, the differentially expressed genes and proteins were identified and analyzed. RESULTS: There were 192 genes of differential expression observed in hippocampal tissues of LiCl-PILO-induced temporal lobe epilepsy, and 159 genes have been registered in Genbank database, in which 84 genes were up-regulated while 75 genes were down-regulated. 78 protein spots of differential display were screened out, in which 31 proteins were detected to be down-regulated and 47 were up-regulated. Finally, 5 proteins were identified. CONCLUSION: These genes and proteins found in our study may play pivotal roles in the pathogenic mechanisms of epilepsy and may promise new therapeutic targets for refractory epilepsy in the future.

[KEY WORDS] Epilepsy; cDNA microarray; Gene expression; Hippocampus

颞叶癫痫是成年期难治性癫痫的主要类型, 其发病机制至今仍未完全阐明, 一直是癫痫治疗的难点, 是人类征服癫痫的主要障碍, 同时也是攻克癫痫

的突破口之一。许多学者应用原位杂交、免疫组化以及一些传统的蛋白质研究方法, 发现海马多种基因及其编码蛋白质表达的变化在颞叶癫痫的发生、

[收稿日期] 2005-05-23 [修回日期] 2005-08-05

* [基金项目] 浙江省医药卫生重点科技项目(2005ZD007); 浙江省医药卫生科学研究基金项目(2005A051)

△通讯作者 E-mail: medic@tom.com

发展和维持过程起着举足轻重的作用^[1]。然而,这些传统方法都仅限于对个别基因及其编码蛋白与颞叶癫痫关系的探讨,其效率有限,而且难以发现新的相关基因和蛋白。另外,基因数量的有限性和结构的相对稳定性与癫痫这类脑功能障碍疾病的复杂性和多变性之间存在着巨大反差,试图从基因的角度完全阐明癫痫的发病机制,并找到攻克癫痫的治疗手段是非常困难的。因此,将目光再次聚焦到基因功能的执行体-蛋白质的研究领域,对有关蛋白质的数量、结构、性质、相互作用和生物学功能进行全面的认识与深入的研究,已成为癫痫研究的迫切需要和新任务。

本研究联合运用 cDNA 微阵列和蛋白质组学(二维电泳和 MALDI-TOF-MS)技术,寻找 LiCl-PILO 致痫大鼠海马组织的差异表达基因和蛋白质,并对发现的差异表达基因和差异表达蛋白质进行分析和鉴定,以期为进一步探讨颞叶癫痫的发病机制,寻找新的治疗靶点和研发新的治疗手段打下基础。

材 料 和 方 法

1 动物模型复制及分组

湘雅医学院实验动物中心提供的 6-8 周龄健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 32 只,体重 220-250 g,分为癫痫组(16 只,实际制模成功 12 只)与对照组(16 只)。癫痫组参照文献^[2]建立 LiCl-PILO 癫痫大鼠模型,发作程度按 Racine 等^[3]制定的标准进行分级,达到 III-V 级的动物进入 SE,归于致痫成功组,致痫成功并存活 60 d 的大鼠归入实验组;对照组腹腔注射生理盐水 1 mL 作为对照。大鼠在 60 d 后断头取脑,分离海马组织,并即刻液氮冻存。

2 基因芯片部分

一步法抽提总 RNA 后用 Oligotex mRNA Midi Kit(Quagen 公司)纯化 mRNA。参照 Schena 等^[4]的方法反转录标记 cDNA 探针并纯化。用 Cy3-dUTP 标记对照组组织 mRNA,用 Cy5-dUTP 标记癫痫组组织 mRNA。将探针加在基因芯片上,置于 60 °C 杂交 15-17 h。然后分别用 2 × SSC + 0.2% SDS, 0.1% × SSC + 0.2% SDS, 0.1% × SSC 洗涤 10 min。扫描芯片后以 ImaGene3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值。用 40 个看家基因进行 Cy3 和 Cy5 的均衡,将 Cy3 信号值乘上均一化系数,得出调整后的 Cy3*。计算每个基因点在本次实验中的表达差异值 Ratio, Ratio = Cy5/Cy3*。筛选出 Ratio 大于 2 或小于 0.5 的基因点,作为表达差异基因。

3 蛋白质组部分

按 50 mg 样品加 1 mL 组织裂解液的比例加入裂解液(8 mol/L 尿素、4% CHAPS、100 mmol/L DTT、40 mmol/L Tris-base、0.5% Pharmaltes 3-10)。反复液氮冻融后加入 20 mg/L DNase 和 5 mg/L RNase A, 4 °C 作用 15 min 后于 4 °C 12 000 r/min 离心 30 min。收集上清即为蛋白质提取物;双向电泳操作步骤按照安发玛西亚公司的 2-DE 操作指南进行,80 μg(银染)或 850 μg(考染)总蛋白与重泡涨液混合,总体积为 350 μL。等电聚焦条件:30 V 6 h, 60 V 6 h, 200 V 1 h, 8 000 V 梯度 5 h, 8 000 V 7 h,总电压时间积为 85 000 Vh;胶条平衡后转移至 13% 的丙烯酰胺均质胶(20 cm × 20 cm × 1 mm)上端。SDS-PAGE 在 PROTEAN II xi Cell(Bio-Rad 公司)中进行,20 mA/胶电泳 45 min 后换用 30 mA/胶,直至溴酚蓝到达胶的底线。

银染采用汪家政改进的高灵敏度银染色法^[5];考染:考马斯亮蓝 R250 摇床染色 2 h,脱色过夜。

利用 GS-710 光密度仪(Bio-Rad 公司)对 2-DE 胶进行扫描,之后用 PDQUEST7.0(Bio-Rad 公司)软件对银染色的 2-DE 图像进行背景消减、斑点检测、匹配和获取斑点位置坐标等。数据在 SPSS 10.0 软件中进行 Student's *t*-test 分析。选取差异表达蛋白点,从考马斯亮蓝染色的 2-DE 胶上切下对应的斑点,作为进一步分析的差异候选蛋白。

选取考染 2D 胶上差异候选蛋白质斑点,用含 50% 乙腈,25 mmol/L 碳酸氢铵溶液脱色,胶片真空离心干燥。测序级胰蛋白酶用 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液配成 0.01 g/L 溶液,加 8-10 μL 于各样品管中,37 °C 保温 12 h。加入 5% TFA 溶液 120 μL 于 40 °C 保温 1 h,吸出上清,加入 2.5% TFA,50% ACN 溶液 120 μL 于 30 °C 保温 1 h,合并上清液冰冻干燥。加 5 μL 0.5% TFA 液溶解,混匀后质谱分析肽质量指纹谱(peptide mass fingerprint, PMF)。质谱数据用 Mascot(<http://www.matrixscience.co.uk>)软件在 SwissProt 和 NCBI nr 数据库内进行检索。

结 果

1 基因芯片

1.1 试验组、对照组双色荧光标记叠加 由于 Cy3 荧光信号和 Cy5 荧光信号分别以绿色和红色表示,因此,对于某一点的两种叠加荧光信号,如果 Cy3 信号较强,该点多显绿色(呈下调趋势);如果 Cy5 信号较强,该点多显红色(呈上调趋势);如果强度相似,即显示黄色。试验结果显示,实验组与对照组部

分基因表达差异呈红色,为上调趋势,也有部分基因表达差异呈绿色,为下调趋势,见图1。

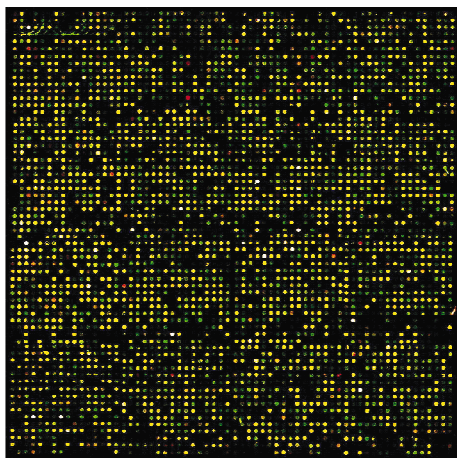


Fig 1 The fluorescent marks overlapping spectrum of epileptic and control group.

图1 癫痫组和对照组双色荧光标记叠加图谱

1.2 Cy3 与 Cy5 的荧光强度值散点图 X轴以 Cy3 荧光强度值为坐标, Y轴以 Cy5 荧光强度值为坐标, 每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号; 数据点若为红色, 则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5 - 2.0 之间, 基本属非差异表达; 数据点若为黄色, 则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5 - 2.0 范围之外(为表达差异的数据)。试验结果显示大部分基因点聚集在几乎为 45 度对角线的周围, 为红点, 表示强度差异在 0.5 至 2.0 之间, 而一些基因点分布在 45 度对角线外, 远离对角线, 为黄点, 见图 2。表明两组间存在表达显著改变的基因。

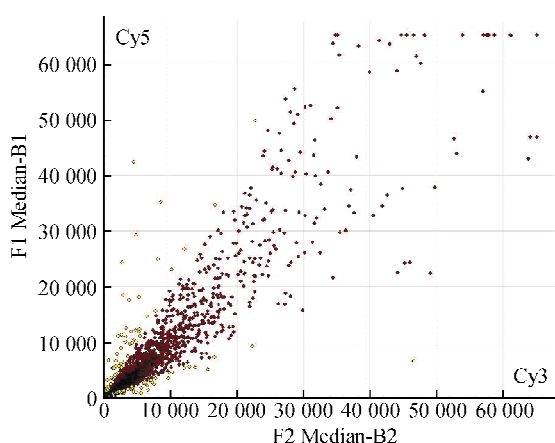


Fig 2 The graph of fluorescent intensity spots in epileptic and control group.

图2 癫痫组和对照组荧光强度散点图

1.3 差异表达基因筛选 芯片上基因点总数为 4 096 个; 作为均一化依据的有效基因点数为 3 750 个; 均一化系数为 0.8838。筛选出 Ratio 值大于 2.0 或小于 0.5 的数据, 共有 192 条差异表达的基因,

159 条可在 GenBank 中登陆, 其中表达上调的基因 84 条, 表达下调的基因 75 条(限于篇幅, 未能一一列出)。

2 蛋白质组

2.1 2-DE 图谱重复性和特征 正常对照海马组织和癫痫大鼠海马组织双向电泳重复 3 组, 获得的代表性图谱见图 3、4。对照组和癫痫组的组内凝胶匹配率分别为 89.2% 和 90.6%, 同一蛋白质斑点的等电点 (pI)、相对分子质量 (M) 和蛋白质表达量 (Volume) 在 3 次实验中的相对标准差分别为 6.21 ± 3.24 , 9.00 ± 3.16 , 7.84 ± 3.56 ($n = 50$)。

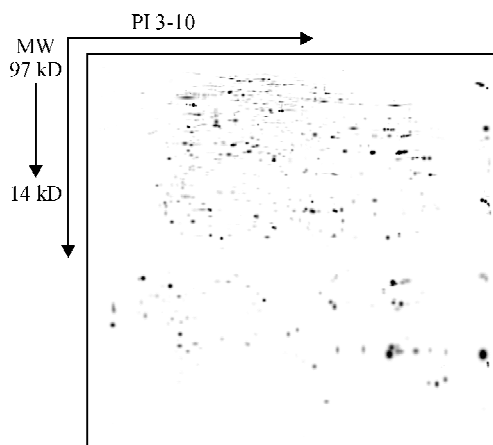


Fig 3 The 2-D electrophoresis spectrum of hippocampus from control group (Silver staining).

图3 对照组海马组织双向电泳图片(银染)

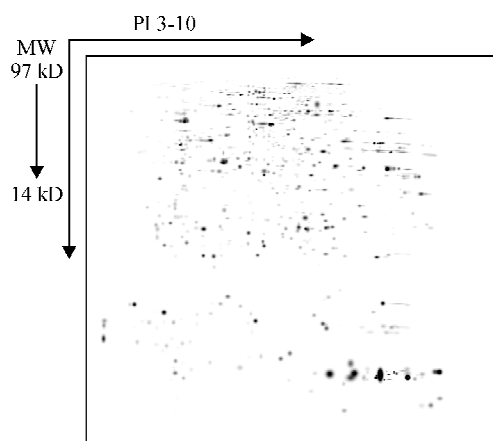


Fig 4 The 2-D electrophoresis spectrum of hippocampus from epileptic group (Silver staining).

图4 癫痫组海马组织双向电泳图片(银染)

2.2 蛋白质差异表达分析 对照组和癫痫组的斑点总数分别为 $1\,124 \pm 35$ 个和 $1\,247 \pm 42$ 个, 两组间凝胶图谱的匹配率为 80.4%。匹配后经统计学分析, 发现 78 个差异表达蛋白质斑点 ($P < 0.05$), 其中 31 个在癫痫组海马组织中表达下调, 47 个在癫痫组海马组织中表达上调。

2.3 蛋白质鉴定 由于质谱鉴定及数据分析工作量巨大,目前我们只对 10 个蛋白质斑点进行了鉴定,其他斑点的鉴定工作还在进行中(图 5 是被鉴定的其中一个蛋白质斑点的 PMF 图谱)。通过数据库检索,有 5 个蛋白质斑点得到确认,分别为突触结合蛋白(synaptotagmin) I、神经丝蛋白(neurofilaments, NF)、热休克蛋白 27(heat shock protein, HSP27)、voltage - dependent anion channel proteins 1 (VDAC1)、异柠檬酸脱氢酶(Isocitric dehydrogenase, ICD)。

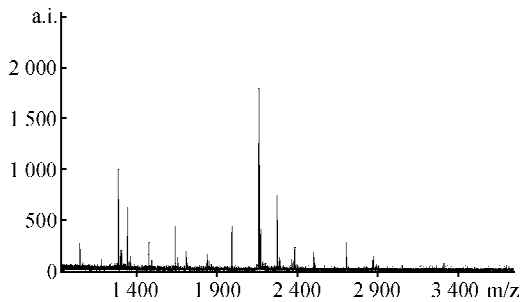


Fig 5 The PMF spectrum of synaptotagmin I .

图 5 Synaptotagmin I 肽质量指纹图谱

讨 论

对本研究发现的 159 个差异表达基因进行了初步的归类,以胞内信号转导因子、离子通道基因、细胞间通讯因子以及凋亡和细胞周期相关基因为主。这些基因主要在神经系统的发育与分化、神经元损伤后的保护、信号转导、神经系统肿瘤的发生中起作用^[6,7]。限于篇幅,本文对部分相关基因进行讨论。

癫痫发作中普遍存在神经元内钙离子超载现象,这种异常的 Ca^{2+} 内流是神经元同步化放电的先决条件,同时也能触发神经元一系列病理生理改变导致神经元损伤和可塑性的改变^[8]。Alpha - endosulphine(Ensa)下调促使神经元胞浆和核内非致细胞死亡的持续钙离子浓度升高,可能分别通过第二信使作用和调节基因表达而影响神经元的可塑性改变。

Yang 等^[9]研究发现缺失 JNK3 的小鼠能抵抗海人酸(kainic acid)的兴奋性毒性。本研究中 JNK3 在癫痫组表达上调可能是通过 JNK/SAPK 的途径影响了相关蛋白质的磷酸化,从而促成癫痫的发生。Grewal 等^[10]的研究表明,去极化引发的神经元钙内流,通过蛋白激酶 A 激活 B - Raf 和 Rap1,二者形成复合体,然后激活 ERK1/2。本研究中 ERK1 表达上调很可能是前文提到的癫痫大鼠海马神经元“钙离子超载”的结果。

生长抑制特异蛋白(growth - arrest - specific protein ,Gas - p)是一种细胞周期相关蛋白,尚未见有关其与癫痫有关的报导。Gas - p 与神经元轴突生长有关,并能促进细胞有丝分裂过程中微丝的形成。本实验发现在癫痫组 Gas - p 相关基因的表达明显上调,可能提示癫痫大鼠海马神经元轴突的生长、延伸活动比较活跃。

髓脂蛋白(proteolipid protein, PLP)是与胶质细胞有关的癫痫候选基因,它在少突胶质细胞中的过表达可引起颤抖、惊厥、脱髓鞘综合征,但在这种胶质细胞的突变体,临床发作和严重程度完全依赖于所转基因的拷贝数^[11]。这与本研究中发现的海马组织 PLP 高度差异表达相一致,进一步证实 PLP 可能为癫痫的重要候选基因。

神经生长相关蛋白 43(growth - associated protein 43, GAP - 43)伴随着突触连接重建出现,一旦重建完成, GAP - 43 含量便骤然下降,甚至消失,表明 GAP - 43 基因表达在神经元轴突生长、突触重建过程中发挥了重要作用,可能是成年大脑海马苔藓纤维出芽的重要分子机制。本研究在致痫 60 余天后仍可见 GAP - 43 高表达,表明在癫痫自发作期仍然可能有活动性苔藓纤维出芽存在。

磷酸化与去磷酸化的动态平衡维持着细胞的正常功能^[12]。本研究结果显示癫痫组海马受体酪氨酸激酶和蛋白激酶 C 明显上调,而酪氨酸蛋白磷酸酶表达下调,表明癫痫大鼠海马中的磷酸化过程存在失衡现象,在信号转导过程中主要起启动、转导和放大作用的磷酸化被加强,而终止信号的去磷酸化过程受到抑制。

基因敲除实验证明钙结合 syt I 对于快速、同步的 Ca^{2+} 引发神经递质释放是至关重要的^[13]。目前认为, syt I 在 Ca^{2+} 引发的神经递质快速释放过程中起到 Ca^{2+} 感受器的作用,而 Ca^{2+} 引发的神经递质的释放,使得神经递质的突触囊泡与突触前膜融合与这一过程密切相关。本研究结果显示 syt I 在癫痫组表达上调,很可能导致病理性 Ca^{2+} 内流增加,从而促成癫痫的形成。因此我们认为 syt I 很可能参与了癫痫的形成过程,并有可能成为治疗的靶点之一。

NF 是中间丝蛋白家族的第 IV 类型,在轴浆运输和轴突再生的过程中发挥重要的作用。本研究中发现癫痫组 NF 的表达上调,这与既往坐骨神经损伤后再生的研究结果相反,推测可能因为本研究的对象是癫痫大鼠模型的慢性期,而非急性发作期,这时大量异常突触的延伸基本完成,而刚性结构 NF 完善细胞骨架的过程正在进行。

HSP与癫痫的关系已有文献报道,目前多数学者认为它对神经元具有保护作用。上文提到的MAPK超家族成员JNK是细胞外信号影响细胞发育、分裂和分化的三大通路之一,而HSP70能阻碍JNK的激活。本研究结果表明在癫痫组中HSP27表达下调,可能导致海马应激所启动的凋亡程序的抑制减弱,引起神经元的损伤,从而影响到癫痫的形成。

VDAC1可增强外膜渗透性,对线粒体的代谢具有重要作用。Lemeshko等^[14]人的实验结果表明VDAC直接参与了线粒体功能障碍和神经元损伤的过程。VDAC在生理状态下呈间断性开放,且具有可逆性。另外VDAC也有利于线粒体跨膜电位所驱动的蛋白质输入线粒体基质。若VDAC表达过度,产生VDAC病理性开放,将导致线粒体基质和胞浆内Ca²⁺平衡的紊乱。推测本研究结果显示的VDAC上调,可能也是通过该机制影响癫痫的形成。

重复性和蛋白质鉴定率是二维电泳加MALDI-TOF-MS技术路线的蛋白质组策略的瓶颈。因此本研究发现的差异表达蛋白质是否真的参与了癫痫发病并成为新的治疗靶点,尚需要功能蛋白质组学研究的证实。但是本研究获得的结果为运用蛋白质组学方法寻找癫痫治疗新靶点的研究提供了可靠的初步数据。

(致谢: 特别感谢陈宜张院士为本研究提供启动基金资助!)

[参 考 文 献]

- [1] Buckmaster PS, Dudek FE. Network properties of the dentate gyrus in epileptic rats with hilar neuron loss and granule cell axon reorganization[J]. *J Neurophysiol*, 1997, 77(5): 2685-2696.
- [2] 王煜,肖波,龙小艳,等. GIRK1,2在慢性颞叶癫痫大鼠海马内的表达变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(10): 1882-1886.
- [3] Racine R, Rose PA, Burnham WM. Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus[J]. *Can J Neurol Sci*, 1977, 4(4): 273-278.
- [4] Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. *Science*, 1995, 270(5235): 467-470.
- [5] 汪家政 主编. 蛋白质技术手册[M]. 第1版. 北京: 科学技术出版社, 2000. 92-97.
- [6] Mandolesi G, Gargano S, Pennuto M, et al. NGF-dependent and tissue-specific transcription of *vgf* is regulated by a CREB-p300 and bHLH factor interaction[J]. *FEBS Lett*, 2002, 510(1-2): 50-56.
- [7] Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(2): 118-132.
- [8] Hailing Su, Dmitry Sochivko, Albert Becker, et al. Up-regulation of a T-type Ca²⁺ channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(9): 3645-3655.
- [9] Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene[J]. *Nature*, 1997, 389(6653): 865-870.
- [10] Grewal SS, Fass DM, Yao H, et al. Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(44): 34433-34441.
- [11] Hosokawa M, Klegeris A, Maguire J, et al. Expression of complement messenger RNAs and proteins by human oligodendroglial cells[J]. *Glia*, 2003, 42(4): 417-423.
- [12] Kaiser E, Chandrasekhar S. Distinct pathways of extracellular signal-regulated kinase activation by growth factors, fibronectin and parathyroid hormone 1-34[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(3): 573-578.
- [13] Fernandez Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, et al. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability[J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 41-49.
- [14] Lemeshko SV, Lemeshko VV. Energy flux modulation on the outer membrane of mitochondria by metabolically-derived potential[J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 256(1): 127-139.