

A 型钾通道 Kv4.1 在戊四唑致痫大鼠海马区的表达

曾常茜¹, 李亚伟², 邹飒枫³, 胡波³

1. 大连大学医学院, 辽宁省大连市 116622

2. 遵义医学院, 贵州省遵义市 453003

3. 大连大学附属新华医院, 辽宁省大连市 116021

摘 要:目的 通过检测 A 型钾通道 Kv4.1 在戊四唑 (PTZ) 致痫大鼠海马 CA1、CA3 及齿状回区的表达变化, 探讨 A 型钾通道在癫痫发病机制中的作用。方法 SD 大鼠 40 只, 随机分为正常组、致痫后 1 h、24 h、72 h 组。腹腔注射 PTZ 制备大鼠癫痫模型, 应用免疫组化及 Western Blot 技术检测 Kv4.1 在各时间段海马 CA1、CA3 及齿状回区的蛋白表达情况。结果 致痫组大鼠海马区 Kv4.1 蛋白表达水平在致痫后 1 h、24 h、72 h 三个时间段均明显高于正常组 ($P < 0.05$); 各致痫组之间 Kv4.1 蛋白表达水平无明显差异 ($P > 0.05$)。结论 大鼠癫痫模型海马区 A 型钾通道 Kv4.1 蛋白表达增多, Kv4.1 的表达上调可能在癫痫的发生中起作用。

关键词: A 型钾通道; 戊四唑; Kv4.1; 大鼠

Expression of A-type potassium channel Kv4.1 in the hippocampus of rats with pentylenetetrazol-induced epilepsy

ZENG Chang-Qian, LI Ya-Wei, ZOU Sa-Feng, HU Bo. Department of Neurology, Medical College of Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China

Abstract: Objective To investigate the expression of A-type potassium channel Kv4.1 in the CA1, CA3 and DG regions of the hippocampus in rats with pentylenetetrazol (PTZ)-induced epilepsy. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into normal control and epilepsy groups (including 3 subgroups: 1, 24 and 72 hrs after the epilepsy events). Epilepsy was induced by injecting PTZ. Kv4.1 protein was detected in the CA1, CA3 and DG regions of the hippocampus using immunohistochemical and Western Blot analysis. **Results** The Kv4.1 protein expression in the hippocampus in the epilepsy groups was significantly higher than in the control group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the expression of Kv4.1 protein among the three epilepsy subgroups. **Conclusions**

The expression of A-type potassium channel Kv4.1 protein in the hippocampus of epileptic rats increased, and the increased expression of Kv4.1 might play a role in the pathogenesis of epilepsy.

Key words: A type potassium channel; pentylenetetrazol; Kv4.1; rats

癫痫是一组发病机制不完全清楚的慢性脑病。近年来人们不断从分子、基因及形态学方面探讨癫痫的发病机制, 很多研究表明有些癫痫是离子通道病^[1], 但具体的致病机制仍未完全清楚, 因此离子通道的研究对癫痫有重要意义。本实验通过免疫组化染色及 Western Blot 技术检测致痫前后大鼠海马区钾通道 Kv4.1 蛋白表达的情况, 探讨钾

通道 Kv4.1 是否与癫痫发病相关, 为癫痫的诊治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 雄性大鼠 40 只, 10 周龄, 体重 (180 ± 20) 克, 由大连医科大学实验动物中心提供。饲养条件为室温、光照每日 10 h、自由饮食和水。

基金项目: 大连市科学技术基金计划项目 (2008J2JH005)

收稿日期: 2010-11-26; 修回日期: 2011-03-09

作者简介: 曾常茜 (1964-), 女, 教授, 硕士, 主要从事癫痫的发病机制研究。

通讯作者: 邹飒枫 (1962-), 男, 教授, 硕士, 主要从事癫痫的发病机制研究。E-mail: dlzsf62@yahoo.com.cn。

1.2 试剂

抗鼠 Kv4.1 单克隆抗体购自 alomone 公司; β -actin 内参蛋白购自上海硕盟; SP 试剂盒和 DAB 显色剂购自北京中杉金桥公司; Marker 购自宝生物公司; 戊四唑 (PTZ) 购自 Sigma 公司; NP-40、SDS、PMSF、BSA、丙烯酰胺、Tris 碱、TEMED、过硫酸胺、溴酚蓝、甘氨酸、DTT、考马斯亮蓝 R-250 均为 Amresco 公司产品。

1.3 仪器设备

POWERLAB 电生理记录仪 (澳大利亚 ADInstruments); DU640 紫外分光光度计 (美国 BECKMAN); 蛋白电转仪、垂直电泳仪和凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad); 低温台式高速离心机 (日本 HITACHI 公司); -70°C 超低温冰箱 (青岛海尔); 显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.4 方法

1.4.1 实验分组 对照组 10 只, 实验组 30 只, 分别在致病后 1 h、24 h、72 h 时间段取 10 只进行实验。

1.4.2 癫痫模型的制作 所有大鼠于实验前饲养 1 周, 发现无自发癫痫发作方可入选。首先大鼠腹腔注射 1% PTZ 溶液 50 mg/kg, 观察大鼠的发作表现。所有大鼠在注射 PTZ 后出现颈部肌肉痉挛, 随后出现双侧前肢阵挛伴站立以及全身阵挛、失去平衡。大鼠成功致痫的标准采用 Racine 六级评价标准: 0 级, 无任何反应; 1 级, 湿狗样抖动、面肌痉挛如眨眼、动须及节律性咀嚼; 2 级, 颈部肌肉痉挛表现为点头或甩尾; 3 级, 一侧前肢痉挛; 4 级, 双侧前肢痉挛伴站立; 5 级, 全身痉挛, 失去平衡, 跌倒。当达到 4~5 级时, 重复惊厥发作 1 min 以上, 脑电监测为散在性棘波、尖波、棘慢波时认为致病成功。分别在癫痫发作后的 1 h、24 h、72 h 时间段取材进行实验。

1.4.3 脑电的引导与分析 每组动物取两只大鼠行脑电监测。电极安装在右额及右枕 (右额坐标为前囟前 3.0 mm, 中线旁 2.0 mm, 硬膜下 0.5 mm; 右枕坐标为前囟后 5.8 mm, 中线旁 3.0 mm, 硬膜下 0.5 mm)。通过 POWERLAB 生理记录仪进行脑电记录, 参数为高通 0.03 S, 低通 30 Hz, 量程 500 μV ~ 3 mV。在注射前后监测 EEG, 每 5 min 记录一次至 150 min。通过对脑电图的形态、频率、波幅进行痫样放电的判断。

1.4.4 脑片制作及组织冻存 10% 的水合氯醛

400 mg/kg 经腹腔麻醉后, 往左心室灌注生理盐水 100 ml。断头取脑, 将脑组织沿中线分成两半, 一半用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 4°C , 用于免疫组化染色; 另一半分离出海马组织迅速置于液氮中保存, 以备行 Western Blot 检测。

1.4.5 免疫组化染色检测钾通道 Kv4.1 的表达

A 型钾通道 Kv4.1 抗原表达检测采用 ABC 染色法, 各组大鼠脑组织做石蜡切片后常规脱蜡至水; 用柠檬酸盐进行抗原高压锅修复, 自然凉至室温; 3% H_2O_2 去离子水孵育, 以消除内源性过氧化物酶活性; 滴加试剂盒中试剂 A 室温孵育, 倾去, 勿洗; 用浓度为 1:150 稀释的兔抗羊 Anti-kv4.1 孵育, 4°C 过夜; 滴加试剂 B, 37°C 温箱孵育, 滴加试剂 C, 37°C 温箱孵育; DAB 显色 1 min, 用自来水冲洗, 然后用苏木素复染, 酒精脱水、透明, 中性树胶封固。所有切片在光镜下按统一放大倍数 (10×40 倍) 进行定量分析。计算每个高倍视野阳性染色的平均光密度。

1.4.6 Western Blot 检测钾通道 Kv4.1 蛋白水平

①蛋白样品制备: 脑组织块剪碎, 加单去污剂裂解液 (含 PMSF) 裂解 30 min 后, 在 4°C 12000 rpm 离心 5 min, 取上清液分装于离心管中。②蛋白含量测定: 取上清液加蒸馏水混匀后, 用紫外分光光度计测定 OD260 和 OD280 数值。③灌胶: 将玻璃板对齐、卡紧, 分别灌入 12% 分离胶和 5% 的浓缩胶。④上样: 用微量进样器缓慢加入样品。⑤跑胶: 浓缩胶时电压为 80 V, 当蛋白跑过浓缩胶至分离胶时转为 120 V, 电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止。⑥转膜: 利用蛋白电转仪装置, 冰中进行, 转膜完毕后封闭液封闭。⑦孵育: TBST 稀释一抗至一定的倍数, 一抗孵育, 4°C 过夜。二抗孵育 1 h, 开始显影。⑧显影: 暗室中曝光, 大约 30 s, 曝光完毕后置于显影液和定影液中, 自来水冲洗, 室温下晾干。将胶片进行拍照, 用凝胶成像系统分析目的条带, 用 Quantity one 软件对图片进行光密度测定, 取各条带累积光密度与相应的 β -action 的累积光密度之比作为蛋白表达相对量, 对此进行方差分析。

1.5 统计学方法

用 SPSS11.5 软件对免疫组化检测的 Kv4.1 蛋白平均光密度和 Western Blot 测得的 Kv4.1 蛋白表达相对量进行方差分析, 所有数据以均数 \pm 标准差表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病样行为及脑电图检测结果

实验组 30 只大鼠大多在第一次注射 PTZ 50 mg/kg 后出现抖动、动须、点头及节律性咀嚼,然后每 10 min 注射 10 mg/kg 一至两次后,28 只大鼠出现全身阵挛、角弓反张、四肢强直、跌倒,达到

Racine 标准 4~5 级,持续约 10~20 min 后逐渐停止抽搐缓解。在大鼠抽搐发作中,脑电图明显异常,表现为大量的棘波、尖波及尖慢波,节律不规则(见图 1)。对照组大鼠脑电图呈细小 α 波,波幅较均一(见图 2)。

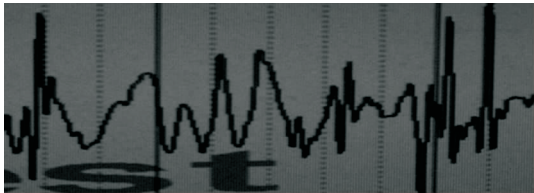


图 1 实验组大鼠抽搐时的脑电图

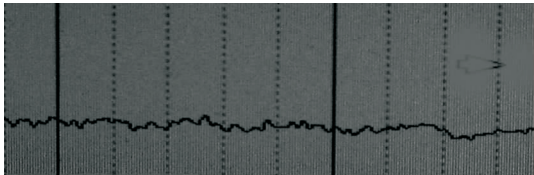


图 2 对照组大鼠的脑电图

2.2 PTZ 致病大鼠 Kv4.1 蛋白表达变化

结果如图 3、图 4 所示,瞬时外向钾通道 Kv4.1 在对照组和实验组均有表达,并且在大鼠海马中广泛分布。对照组在高倍镜下可见胞浆和胞膜上有棕黄色阳性反应颗粒,阳性细胞着色较浅。实验组

海马阳性细胞较对照组增加,阳性细胞一般为梭形,以 CA1 和 CA3 区表达明显。实验组(1 h、24 h 和 72 h)海马各区的平均光密度值与对照组相比均有显著性差异($P < 0.05$)。实验组各时间段之间无明显差异($P > 0.05$),见表 1。

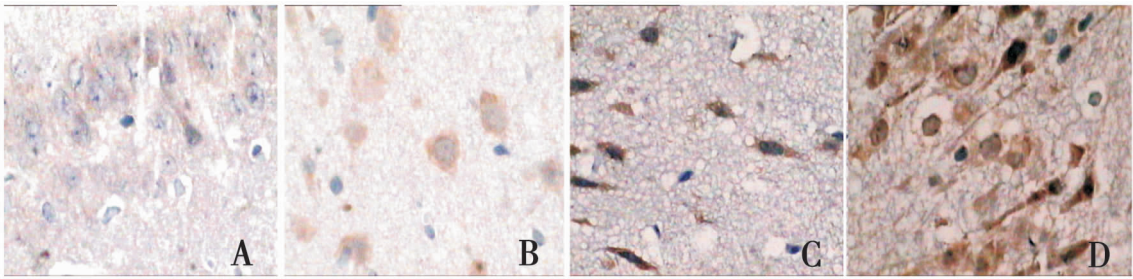


图 3 大鼠 CA1 区 Kv4.1 表达的免疫组织化学染色(DAB 染色,苏木素复染,400 \times)。A:对照组;B:致病后 1 h 大鼠;C:致病后 24 h 大鼠;D:致病后 72 h 大鼠。

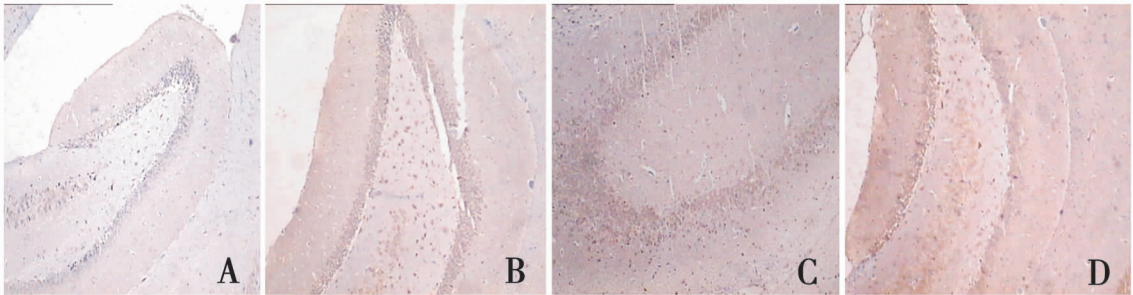


图 4 大鼠 DG 区 Kv4.1 表达的免疫组织化学染色(DAB 染色,苏木素复染,100 \times)。A:对照组;B:致病后 1 h 大鼠;C:致病后 24 h 大鼠;D:致病后 72 h 大鼠。

表1 免疫组化染色检测钾通道 Kv4.1 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

分组	海马分区		
	CA1	CA3	DG
对照组	0.213 ± 0.009	0.200 ± 0.005	0.227 ± 0.008
1 h 组	0.240 ± 0.012 *	0.243 ± 0.009	0.270 ± 0.011 *
24 h 组	0.262 ± 0.016 *	0.233 ± 0.012 *	0.253 ± 0.013
72 h 组	0.280 ± 0.015 *	0.253 ± 0.015 *	0.273 ± 0.015

注: * 为与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 Kv4.1 蛋白相对浓度的检测结果

结果如图 5 所示:在 65 KD 处有明显的蛋白条带,各实验组与对照组相比蛋白条带明显宽厚,而各实验组蛋白条带之间基本相同。结果提示,海马神经元有 Kv 4.1 表达,实验组大鼠海马区 Kv4.1 表达上调,这与免疫组化染色检测的结果一致。致痫后 1 h、24 h、72 h 大鼠海马区 Kv1.4 蛋白相对浓度与对照组相比均有明显差异 ($P < 0.05$),见表 2。

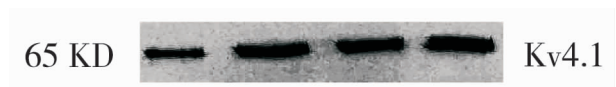


图5 对照组与致痫后 1 h、24 h、72 h 组的凝胶成像结果

表2 Western Blot 检测海马电压门控钾通道 Kv4.1 与相应内参光密度比值 ($\bar{x} \pm s$)

分组	Kv4.1 蛋白
对照组	1.597 ± 0.019
1h 组	1.873 ± 0.111 *
24h 组	1.956 ± 0.009 *
72h 组	1.838 ± 0.012

注: * 为与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

癫痫是由广泛神经元异常同步化放电所致,此过程中,细胞内外离子分布和转运的异常起了重要作用。这些离子进出细胞受离子通道的调节,离子通道的异常可以促发癫痫。在电休克诱导的惊厥中新皮质和海马细胞外钾离子浓度较正常值高 4 倍,从而导致癫痫的异常神经元放电^[2]。钾通道 Kv4.1 属于瞬时外向钾通道或 A 型钾通道,该通道具有快速激活和快速失活的特性。去极化时通道暂时开放,产生短暂外向电流,即 IA 电流。IA 电流是动作电位复极化早期外向电流的主要成分。当 A 型钾通道持续失活时,动作电位时程延长导致 Ca^{2+} 内流增加,触发神经递质大量释放并调节钙依赖的后续进程,并介导兴奋性突触后电位

(EPSP),增强神经元兴奋性,导致癫痫发作^[3]。到目前为止,用实验手段证实在哺乳类细胞至少存在 5 种表达 IA 电流的钾离子通道亚基:Kv1.4、Kv3.4、Kv4.1、Kv4.2 和 Kv4.3^[4]。有研究表明 Kv4 家族成员是海马神经元中产生 IA 电流的最主要成分,它能通过阻止动作电位在树突处的产生并限制动作电位的反向传播,延长神经冲动发放的间隔时间等来降低神经元的兴奋性^[5]。这种 A 型钾通道广泛分布在许多类型的神经元上,并在海马锥体 CA1 区神经元树突末梢呈高密度分布。它们参与调节突触的输入、动作电位的起始和反向传播、改变神经元兴奋性突触后电位幅度、影响神经元的兴奋性及信号传导。A 型钾通道的快速激活和失活使我们假设在 EPSP 中有一个潜在的抑制作用,该通道参与了同步性的抑制性输入,从而抑制神经元兴奋^[6]。

戊四唑是一种中枢神经系统致惊厥剂,可增加中枢神经细胞膜的通透性,通过阻止 GABA 自发释放,进一步导致离子通道功能异常而引发癫痫^[7,8]。本实验在 PTZ 致痫模型上对不同时间段大鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区电压门控钾通道 Kv4.1 行免疫组化染色和 Western Blot 检测。结果显示:实验组各时间段(1 h、24 h、72 h)免疫组化染色平均光密度高于正常对照组,以 CA1 和 CA3 区最为显著,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。Western Blot 检测出大鼠海马区电压门控钾通道 Kv4.1 蛋白相对浓度在致痫组各时间段蛋白表达均高于对照组,而致痫组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。以上实验结果表明,在癫痫发作的急性期,机体通过增加通道 Kv4.1 蛋白的表达,进而增加 A 型钾电流,限制动作电位的产生和兴奋性的传导,从而阻止癫痫的发作,对癫痫发作起到保护作用。国内学者^[9]在戊四唑致痫模型上同样发现大鼠海马 CA3 区钙超载严重,与钙超载的荧光钙离子成像的研究结果一致,所以可以认为 CA3 区的钙超载参与了癫痫的发病机制。有实验证明 Kv4.2 和 Kv4.3 表达水平升高后,可增强 A 型钾电流,减慢神经冲动的发放频率,抑制神经元兴奋性,从而限制异常放电扩散,起到抗痫性发放的作用。这提示 Kv4.2 和 Kv4.3 表达水平升高可能是神经元在产生异常电兴奋后出现代偿性自我保护反应^[10]。Western Blot 分析表明在海马硬化症和神经胶质瘤中,在损害处和 EPK 激活途径中总的 Kv4.2 是增加的^[11]。

本实验通过对 Kv4.1 的研究,证实 Kv4.1 参与癫痫的发病机制,为以 A 型钾通道为靶点的抗癫痫药物的开发提供依据。

参 考 文 献

[1] Hirose S, Okada M, Kaneko S, et al. Aresome idiopathic epilepsies disorders of ion channels? Aworking hypothesis. *Epilepsy Res*, 2000, 41(3): 191.

[2] 李冬平,曾常茜,邹飒枫. 钾离子通道在癫痫发病机制中的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2008, 35(5): 452-454.

[3] 李亚伟,邹飒枫,曾常茜. 电压门控钾离子通道与癫痫. *中风与神经疾病杂志*, 2010, 27(6): 575-576.

[4] 龚波,黄美燕,马义才,等. 海马神经元的瞬间外向钾电流. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(4): 337-342.

[5] Rakulendran S, Schorge S, Kullmann DM, et al. Episodic ataxia type 1: a neuronal potassium channelopathy. *Neurotherapeutics*, 2007, 4(2): 258-266.

[6] Fransén E, Tigerholm J. *Hippocampus*. 2010, 20(7):

877-887.

[7] Massey SC, Linn DM, Kittla CA, et al. Contributions of GABAA receptor and GABAC receptor to acetylcholine release and directional selectivity in the rabbit retina. *Vis Neurosci*, 1997, 14(5): 939-948.

[8] Bell Horner CL, Dibas M, Huang RQ, et al. Influence of subunit configuration on the interaction of picrotoxin-site ligands with recombinant GABAA receptor. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 10(76): 47-55.

[9] 孔庆霞王,王凯,刘昌勤. 癫痫大鼠海马 CA3 区钙超载与癫痫发病机制的相关性研究. *脑与神经疾病杂志*, 2004, 12(5): 342-345.

[10] 常好会,苏涛,孙卫文,等. 钾离子通道 KV4.2、KV4.3 及其相互作用蛋白 KChIP1 在电点燃癫痫模型中的表达变化. *中华医学杂志*, 2006, 86(47): 3315-3318.

[11] Aronica E, Boer K, Doorn KJ, et al. Expression and localization of voltage dependent potassium channel Kv4.2 in epilepsy associated focal lesions. *Neurobiol Dis*, 2009, 36(1): 81-95.

《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于 1974 年,由教育部主管,中南大学主办,中南大学湘雅医院承办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个相联学科的专业学术期刊。本刊已被收录为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”。

《国际神经病学神经外科学杂志》现主要栏目有论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道、专家论坛和综述等。杂志立足于国内神经病学、神经外科学领域的前沿研究,及时报道国内外神经科学领域最新的学术动态和信息。促进国内外学术的双向交流,为中国神经科学走向世界搭建新的平台。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿,通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为 CN43-1456/R, ISSN1673-2642,邮发代号 42-11,全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊,每期定价 13 元,全年定价 78 元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

为更好地筹集办刊资金,保证刊物的健康发展,本刊竭诚为药品厂商、医疗器械厂商和广告公司提供优质服务,并长期向各级医疗单位征集协办单位,具体事宜请与本刊编辑部联系。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号(中南大学湘雅医院内),《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部,邮编:410008,电话/传真:0731-84327401, E-mail 地址:jinn@vip.163.com,网址:http://www.jinn.org.cn/。