

TRPC6 在匹罗卡品致痫大鼠海马苔藓纤维出芽中的作用

唐薇婷¹, 曾畅², 李国良¹, 冯莉¹, 陈颢¹, 肖波¹

1. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

2. 中南大学湘雅医院健康管理中心, 湖南省长沙市 410008

摘要: **目的** 观察传统型瞬时受体电位通道 6 (TRPC6) 蛋白在匹罗卡品致痫大鼠海马中的表达变化, 探讨其在大鼠海马苔藓纤维出芽中的作用。 **方法** 72 只 SD 大鼠随机分为实验组 ($n=60$) 和对照组 ($n=12$)。实验组采用氯化锂-匹罗卡品腹腔注射法建立颞叶癫痫模型; 对照组腹腔注射等量无菌生理盐水。实验组按癫痫持续状态 (SE) 后 1 d、7 d、15 d、30 d 和 60 d 分为 5 个亚组, 每亚组 12 只大鼠。以上各亚组及对照组再分为 2 个小组, 分别进行 Western blot 检测 TRPC6 及突触重建标志蛋白 Synaptophysin 在海马中的表达和 Timm 染色观察海马苔藓纤维出芽并评分。 **结果** 实验组 TRPC6 蛋白表达量在 SE 后 1 d 达高峰 ($P<0.01$), 其他时间点均显著高于对照组 ($P<0.01$)。Synaptophysin 蛋白表达量在 SE 后 7 d、15 d、30 d 和 60 d 显著增加 (7 d: $P<0.05$; 15 d、30 d、60 d: $P<0.01$), 30 d 达峰值 ($P<0.01$)。实验组大鼠齿状回内分子层在 SE 后 7 d 出现 Timm 颗粒, 并呈进行性增加。 **结论** TRPC6 可能参与了苔藓纤维出芽这一过程。

关键词: 传统型瞬时受体电位通道 6; 匹罗卡品; 颞叶癫痫; 苔藓纤维出芽; 大鼠

Effect of TRPC6 on mossy fiber sprouting in hippocampus of rats with pilocarpine-induced epilepsy

TANG Wei-ting, ZENG Chang, LI Guo-liang, FENG Li, Chen Si, XIAO Bo. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; Corresponding author: XIAO Bo, E-mail: xiaobo_62@yahoo.com.cn

Abstract: **Objective** To observe the dynamic changes of canonical transient receptor potential channels 6 (TRPC6) expression in the rat hippocampus with pilocarpine-induced epilepsy, and to investigate its effect on mossy fiber sprouting in hippocampus. **Methods** Seventy-two healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were divided randomly into experimental group ($n=60$) and control group ($n=12$). The temporal lobe epilepsy model was established by intraperitoneal injection of lithium and pilocarpine, while the controls were injected with equal dose of saline (NS). The experimental rats were equally divided into 5 subgroups at time points 1 day, 7 days, 15 days, 30 days and 60 days after status epileptics (SE). Each subgroup and the control rats were subsequently divided into 2 panels for the following tests respectively: ① expression of TRPC6 and Synaptophysin protein in rats' hippocampus by Western blot; ② Timm staining and score. **Results** The expression of TRPC6 was markedly increased and reached its peak on 1 days after SE ($P<0.01$), and it was higher than the control at all the other time points ($P<0.01$). Compared with the control, the expression of Synaptophysin was markedly up-regulated on 15 days, 30 days, 60 days after SE ($P<0.05$ or $P<0.01$), and reached the peak on 30 days after SE. Timm granules appeared in molecular layer of gyrus dentatus in the hippocampus of experimental rats since 7 days after SE, and then gradually increased. **Conclusions** TRPC6 may play a potential role in mossy fiber sprouting, in which BDNF may involve.

Key words: canonical transient receptor potential channels 6; pilocarpine; temporal lobe epilepsy; mossy fiber sprouting; rats

海马苔藓纤维出芽 (mossy fiber spouting, MFS) 及其所导致的突触重建是颞叶癫痫特征性的病理改变, 有不少研究发现钙离子通道与 MFS 密切相关。瞬时受体电位通道 (transient receptor potential

channels, TRP channels) 是位于细胞膜或胞内细胞器膜上的一类重要的非选择性阳离子通道, 可直接介导钙离子内流, 也可以膜去极化方式激活其他钙

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (中南大学 2012QNZT127)

收稿日期: 2012-04-23; **修回日期:** 2012-07-11

作者简介: 唐薇婷 (1984-), 女, 博士, 医师。主要从事癫痫的研究。

通讯作者: 肖波 (1962-), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事癫痫研究。E-mail: xiaobo_62@yahoo.com.cn。

离子通道^[1]。已知传统型 TRP 通道 (canonical TRP, TRPC) 与钙离子通道密切相关,但其是否参与 MFS 尚不清楚。本研究拟动态监测 TRPC6 蛋白在匹罗卡品致痫大鼠海马中的变化,结合突触重建标志蛋白 Synaptophysin 检测和 Timm 染色,探讨其在 MFS 中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 雄性大鼠 72 只 (6 ~ 8 周龄,体重 250 ± 20 g),由中南大学湘雅医学院试验动物部提供。氯化锂、盐酸、匹罗卡品、山羊抗兔 IgG 二抗、兔抗山羊 IgG 二抗、BSA、SDS、Tris (Sigma 公司);山羊 TRPC6 多克隆一抗 (Santa Cruz 公司);兔 Synaptophysin 多克隆一抗 (Chemicon 公司);蛋白浓度检测试剂盒 (KPL 公司);考马斯亮蓝 G-250 (USB 公司);内参 β -actin 蛋白 (上海硕盟);阿拉伯树胶 (上海国药集团化学试剂有限公司)。日本光电 5210 型脑电图机,垂直板电泳仪和凝胶成像系统 (Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及造模 SD 雄性大鼠 72 只随机分为实验组 ($n = 60$) 与对照组 ($n = 12$)。实验组按癫痫持续状态 SE 后 1 d、7 d、15 d、30 d 和 60 d 分为 5 个亚组,每亚组 12 只大鼠。以上各亚组及对照组再分为 2 个小组,分别进行:① Western blot 方法检测 TRPC 蛋白及突触素 (Synaptophysin) 在海马中的表达;② Timm 染色观察海马 MFS 并评分。实验组大鼠腹腔注射氯化锂 (LiCl) 3 mEq/kg (约 125 mg/kg),18 ~ 24 h 后予匹罗卡品 (Pilo) 20 mg/kg 腹腔注射。注射匹罗卡品后观察大鼠的行为变化,痫性发作程度按 Racine 标准^[2]进行分级,达到 Racine III ~ V 级并进入癫痫持续状态的大鼠,为致痫成功组;若无发作或发作未达 Racine III ~ V 级的大鼠继续注射匹罗卡品 10 mg/kg/次,可重复 6 次,其间达 III 级以上的动物也归为致痫成功组;6 次后仍未达到标准的为致痫不成功组。SE 持续 50 min 以上者,予 10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射终止发作。致痫不成功组和死亡大鼠予以剔除,并在后续的实验补足。对照组大鼠予腹腔注射生理盐水 125 mg/kg,并于注射后观察其行为学变化。

1.2.2 脑电图记录 急性期 (1 d)、静止期 (7 d)、慢性期 (60 d) 实验组大鼠和对照组大鼠分

别进行脑电图描记。记录方法为:大鼠麻醉后,用橡皮套套住大鼠的四肢,固定于木板上,再用细麻绳套住大鼠门齿以固定头部。参考导联描记,一根电极插入大鼠颞部头皮下,另一根电极插入对侧乳突皮下,在日本光电 5210 型脑电图机上描记脑电活动。

1.2.3 海马组织蛋白的提取及 Western Blot 检测 TRPC6 蛋白水平 将各时间点动物用 10% 水合氯醛 (3.5 ml/kg) 腹腔注射麻醉,迅速断头取脑,完整分离出海马,用组织裂解液提取海马组织全细胞蛋白。使用 BCA 法测定总蛋白浓度。37℃ 水浴箱内 30 min 使蛋白变性,用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,用免疫印迹操作 - 转膜,再封闭,然后将膜裁剪成目标条带和内参相应条带并分别置于封闭液稀释好的一抗中 (山羊 TRPC6 多克隆抗体稀释浓度为 1 : 500, Synaptophysin 多克隆抗体稀释浓度为 1 : 1000),摇床轻摇孵育 30 min 后 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 4×10 min。然后再放在另一塑料袋中加入封闭液稀释的二抗 (稀释浓度 1 : 1000),室温下摇床轻摇 1 h, TBST 洗 4×10 min。滴加 DAB 液,避光显色。将胶片进行扫描,用凝胶图像处理系统分析目标带的净光密度值,内参为 β -actin (分子量 42 KDa)。

1.2.4 灌注取材及 Timm 染色观察海马苔藓纤维出芽 于各时间点常规用 10% 水合氯醛 (3.5 ml/kg) 麻醉实验动物,经左心室灌注生理盐水 150 ml,再用含 0.4% 硫化钠的 0.1 MPB (pH7.2-7.6) 灌注 10 min,续用 4℃ 4% 多聚甲醛灌注 15 min (量约 250 ml)。断头取脑,置 4℃ 4% 多聚甲醛固定过夜后,常规脱水,行冰冻切片,自中脑向额叶行 20 μ m 冠状连续切片,收集有海马的脑片贴片,室温晾干。在暗室中入显影液中显色 60 ~ 80 min (Timm 显影液配方: 50% 阿拉伯树胶 60 ml,柠檬酸盐缓冲液 10 ml, 5.6% 对苯二酚溶液 30 ml, 17% 硝酸银溶液 1.5 ml),流水冲洗 5 min 终止反应,常规脱水、透明、树胶封片。各时间点每只大鼠随机选取 4 张切片,对照组大鼠选取相近断面的切片。在生物光学显微镜 10 倍物镜下观察海马 CA3 区和齿状回颗粒细胞上区 Timm 颗粒并评分,采用 0 ~ 5 分半定量评分标准^[3]如下: 0 分: 未见 Timm 颗粒; 1 分: 偶见 Timm 颗粒, Timm 颗粒不连续分布; 2 分: 较多 Timm 颗粒不连续分布; 3 分: Timm 颗粒近连续分布; 4 分: Timm 颗粒连续分布, 5 分: Timm 颗粒形成致密

的层状带。

1.3 统计学处理

实验数据均用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 成组设计多样本均数用单因素方差分析 (ANOVA), 实验组与对照组间比较用两样本 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。统计分析和图表绘制分别用 SPSS 17.0 统计软件和 Microsoft Office Excel 2003 进行。

2 结果

2.1 行为学变化及脑电图表现

用氯化锂腹腔注射后, 实验组大鼠行为活动无变化; 在匹罗卡品注射 5 ~ 30 min 后, 大鼠开始呈现外周胆碱能反应, 开始发作尚不频繁, 随着时间延长, 发作频率增高。用于致病的大鼠共 60 只, 其中 53 只大鼠达到 Racine III ~ V 级并进入 SE; 进入 SE 状态后, 有 8 只因抽搐致死, 其余大鼠在 24 ~ 72 h 后进入静止期, 静止期大部分大鼠行为正常, 少数抽搐严重的大鼠进入静止期后活动迟钝, 不能主动进食进水, 数天后衰竭死亡, 共计 6 只。存活的大鼠于 15 d 后出现自发发作, 呈强直 - 阵挛性

发作, 持续时间短暂, 约半分钟至 1 min, 发作次数从 1 d 数次至数天 1 次不等, 慢性期内大鼠无死亡。致病不成功和死亡大鼠予以剔除, 并在后续的实验补足。实验组大鼠 SE 后 1 d (急性期) EEG 均异常, 表现为 θ 节律增多及单个、多个棘波或阵发连续棘波群发放; SE 后 7 d (静止期) EEG 正常; SE 后 60 d (慢性期) 则可记录到散发尖波、棘波或棘慢波。对照组未出现诱发发作及自发发作, 用同样方法记录 EEG 亦未见癫痫样放电波。

2.2 TRPC6 蛋白表达变化

Western Blot 结果显示, 实验组 TRPC6 蛋白表达量在 SE 后 1 d 达高峰 ($P < 0.01$), 其他时间点均显著高于对照 ($P < 0.01$)。见表 1、图 1。

2.3 Synaptophysin 蛋白表达变化

Western Blot 结果显示, 实验组 Synaptophysin 蛋白表达量在 SE 后 7 d、15 d、30 d 和 60 d 较对照组显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 30 d 达峰值 ($P < 0.01$)。见表 2、图 2。

表 1 对照组与实验组不同时间点 TRPC6 蛋白平均 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

蛋白	对照组	实验组				
		1 d	7 d	15 d	30 d	60 d
TRPC6	0.1097 ± 0.006	0.5239 ± 0.031	0.4587 ± 0.024	0.4797 ± 0.046	0.4391 ± 0.040	0.4597 ± 0.021

注: 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

表 2 对照组与实验组不同时间点 Synaptophysin 蛋白平均 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

蛋白	对照组	实验组				
		1 d	7 d	15 d	30 d	60 d
Synaptophysin	0.1366 ± 0.011	0.1387 ± 0.021	0.1699 ± 0.025 *	0.1925 ± 0.030 **	0.2369 ± 0.025 **	0.2225 ± 0.027 **

注: * 和 ** 为与对照组相比, 分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。

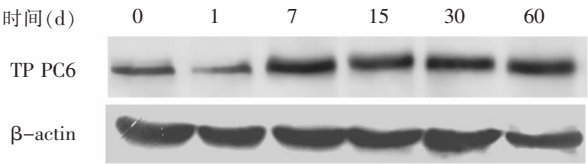


图 1 TRPC6 蛋白在对照组及实验组不同时间点的表达

2.4 Timm 染色

对照组大鼠未见苔藓纤维穿越齿状回颗粒细胞层到齿状回内分子层 (见图 3)。匹罗卡品致病大鼠 SE 后 7 d, 内分子层出现点状 Timm 颗粒, SE 后 15 d 起 Timm 颗粒进行性增加直到本研究结束 (SE 后 60 d) (见图 4 至图 6)。具体评分见表 3。

表 3 对照组与实验组各时间点齿状回内层子层 Timm 染色评分
评分分值 (例数)

对照组	实验组				
	1 d	7 d	15 d	30 d	60 d
0(6)	0(5)	1(5)	2(4)	3(2)	0(6)
1(0)	1(1)	2(1)	3(2)	4(3)	1(0)
					5(1)

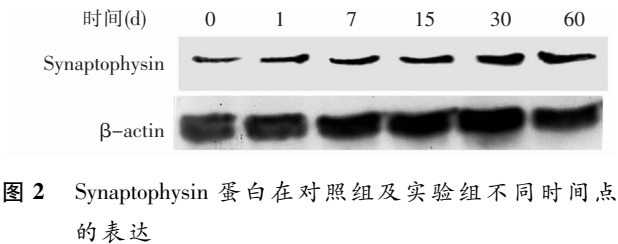


图 2 Synaptophysin 蛋白在对照组及实验组不同时间点的表达

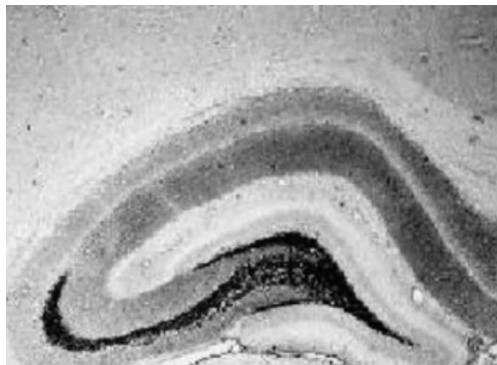


图3 Timm 染色对照组大鼠海马(×40)

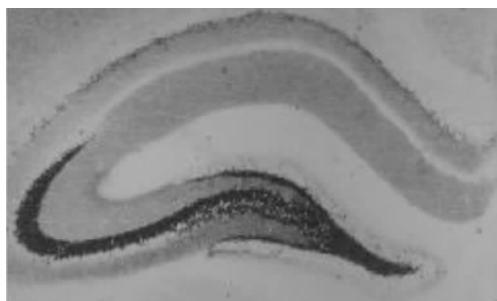


图4 Timm 染色实验组 SE 后 15 d 大鼠海马(×40)

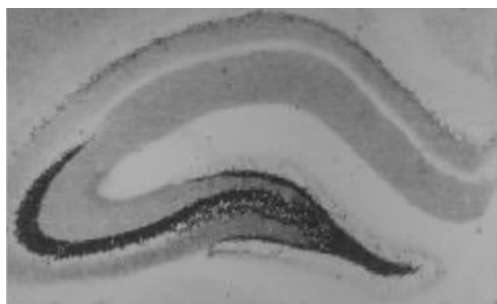


图5 Timm 染色实验组 SE 后 30 d 大鼠海马(×40)

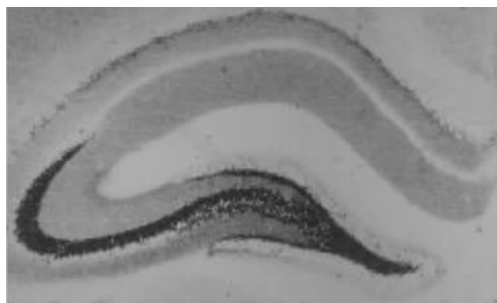


图6 Timm 染色实验组 SE 后 60 d 大鼠海马(×40)

3 讨论

氯化锂-匹罗卡品致病大鼠模型在行为、EEG 及病理改变上与人类颞叶癫痫非常类似,近年来一

直被视为理想的颞叶癫痫模型而广泛应用于颞叶癫痫发病机制和抗癫痫药物的研究。约 60% ~ 70% 的颞叶癫痫患者伴有海马硬化,包括神经细胞脱失,胶质增生和海马苔藓纤维出芽(MFS)及其所导致的突触重建。目前占主导地位的假说是 MFS 引起的突触重建导致海马内回返兴奋性环路的形成,促使海马兴奋性增高,使癫痫易感性进一步增强,从而导致癫痫的反复发作和长期维持,形成难治性颞叶癫痫。

Timm 染色法是利用苔藓纤维比周围神经纤维网有较高的含锌量这一特性,对苔藓纤维进行特异性染色。Timm 染色颗粒实质是苔藓纤维突触末端,Timm 颗粒增多即提示突触发生增加。本研究中 Timm 染色揭示,异常出芽的苔藓纤维在齿状回内分子层的生长具有时间依赖性,随 SE 后时间延长,其程度进行性增加,至本研究终点 60 d 达高峰。MFS 的变化趋势提示突触重建对促进颞叶癫痫的发生发展有重要意义。

突触蛋白(Synaptophysin)是一种相对分子质量为 38000 的钙结合蛋白,在神经元胞体合成后主要转运至轴突终末,特异性地分布于突触前囊泡膜上,是突触终末特异性标志物。它既是突触发生的标志,又能反映突触的传递效能。Coulté^[4]认为在癫痫形成过程中,神经元突触重建需持久的基因表达及一定的物质基础。Synaptophysin 直接参与了神经元间信息的传递,对突触传递效能的变化有显著影响,与突触可塑性密切相关^[5]。Hinz 等^[6]发现点燃癫痫模型大鼠反复抽搐后,随着囊泡合成增加,Synaptophysin 表达增多,以满足突触活动增强对突触囊泡的需要。本研究结果显示,与对照组相比,实验组大鼠在 SE 后 15 d,海马 Synaptophysin 蛋白的表达显著上升,SE 后 30 d 达到最高峰,直至本研究终点 60 d 仍然明显高于正常,与本研究 Timm 颗粒增多基本一致,表明伴随苔藓纤维出芽有新的突触联系形成。

有不少研究发现钙通道与 MFS 密切相关,例如 L 型钙通道参与 BDNF 诱导出芽的作用^[7],钙通道阻断剂尼卡地平可阻滞匹罗卡品致痫诱导的 MFS^[8]。TRP 通道主要介导钙离子、钠离子和镁离子流的跨膜转运,最早发现于果蝇的视觉系统,迄今在哺乳动物已发现 28 种亚型,分属于 7 个亚家族:TRPC、TRPV、TRPM、TRPA、TRPP、TRPML 和 TRPN。TRP 通道表达广泛,调节机制各异,参与痛温

觉、机械感觉、视觉、味觉、维持细胞内外的离子稳态和细胞生长调控等众多生命活动^[1]。由于它们可能与各种人类疾病相关,引起了越来越多国内外学者的关注。

TRPC 在哺乳动物的脑组织中有较高的表达。依据氨基酸序列的同源性及功能的相似性,哺乳动物 TRPC 家族可分为 7 个亚家族:TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 以及 TRPC4/5, 其中 TRPC2 仅表达于大鼠和小鼠,在人类属伪基因^[1]。TRPC 主要参与细胞膜受体激活磷脂酶 C (PLC) 后所介导的钙离子进入。G 蛋白偶联受体 (GPCR) 及受体酪氨酸激酶 (Trk) 分别通过激活磷脂酶 C β 和 γ 激活 TRPC 通道^[1]。BDNF 与受体酪氨酸激酶 B (TrkB) 结合后,可激活磷脂酶 C 继而激活 TRPC 通道。有研究指出,TRPC 通道介导了 BDNF 引起的小脑颗粒细胞轴突导向的作用,提示 TRPC 可能参与了神经元发育和可塑性的过程^[9]。Mottell 等^[10]报道 BDNF 通过激活 PLC/IP3 R 来开放 TRPC 通道,从而起到对神经元的保护作用。

TRPC6 在脑组织中表达最多。大量研究表明 TRPC6 mRNA 及蛋白表达于大鼠海马,同时还表达于人脑海马组织。而且 TRPC6 大量表达于海马神经元兴奋性突触尤其是突触后^[11]。TRPC6 通道可通过磷脂酶 C (PLC) 依赖机制由 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 和受体酪氨酸激酶 (Trks) 激活,活化后可能通过 CaMK IV-CREB 通路发挥促树突生长的作用^[12]。本研究发现,实验组大鼠 TRPC6 在 SE 后 1 d 表达显著性上调 ($P < 0.01$),呈进行性上升,60 d 时升至最高峰 ($P < 0.01$),TRPC6 表达显著上调与 Timm 颗粒及 Synaptophysin 表达增多在时间上相关,提示 TRPC6 在癫痫的病理情况下表达上调,可能参与苔藓纤维异常出芽,但其具体机制尚不明,尚有待于进一步研究。

通过本实验发现 TRPC6 可能参与了苔藓纤维出芽,这为阐明癫痫发病机制,开发抗癫痫新药提供新的思路和理论依据。

参 考 文 献

- [1] Clapham DE, Runnels LW, Strubing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(6): 387-396.
- [2] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation II Motor Seizure. *Electroencephogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32: 781-794.
- [3] Holmes GL, Gairas JL, Chevassus-Au-Louis N, et al. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects. *Ann Neurol*, 1998, 44(6): 845-857.
- [4] Coulter DA. Chronic epileptogenic cellular alterations in the limbic system after status epilepticus. *Epilepsia*, 1999, 40 (Suppl 1): S23-33.
- [5] Hanaya R, Boehm N, Nehlig A. Dissociation of the immunoreactivity of synaptophysin and GAP-43 during the acute and latent phases of the lithium-pilocarpine model in the immature and adult rat. *Exp Neurol*, 2007, 204(2): 720-732.
- [6] Hinz B, Becher A, Mitter D, et al. Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur J Cell Biol*, 2001, 80(10): 615-619.
- [7] Koyama R, Yamada MK, Fujisawa S, et al. Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 2004, 24(33): 7215-7224.
- [8] Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N. L-type Ca^{2+} channel blocker inhibits mossy fiber sprouting and cognitive deficits following pilocarpine seizures in immature mice. *Neuroscience*, 2000, 98(4): 647-659.
- [9] Li Y, Jia YC, Cui K, et al. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, 2005, 434: 894-898.
- [10] Sossin WS, Barker PA. Something old, something new: BDNF-induced neuron survival requires TRPC channel function. *Nat Neurosci*, 2007, 10(5): 537-538.
- [11] Zhou J, Du WL, Zhou KC, et al. Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nature Neuroscience*, 2008, 11(7): 741-743.
- [12] Tai YL, Feng SJ, Ge RL, et al. TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *J Cell Sci*, 2008, 121(14): 2301-2307.