

钾离子通道相互作用蛋白 1 与 γ -氨基丁酸能神经元在戊四唑致癫痫大鼠海马部位的改变

罗爱华^{1a}, 廖卫平^{1b}, 苏涛^{1b}, 孙卫文^{1b}, 张灼华²

[摘要] 目的 研究钾离子通道相互作用蛋白 1 (KChIP1) 在癫痫发生过程中的变化及其与 γ -氨基丁酸 (GABA) 能神经元的关系。方法 成年大鼠制作急性戊四唑癫痫模型, 免疫组织化学法结合激光扫描共聚焦显微镜技术观察大鼠脑中 KChIP1 免疫阳性神经元与 GABA 能阳性神经元在海马部位的表达及改变。结果 急性戊四唑癫痫大鼠海马部 KChIP1 阳性神经元数较对照组明显增加 ($P < 0.05$), GABA 能阳性神经元、KChIP1/GABA 双标阳性神经元数与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$); KChIP1 和 GABA 能阳性神经元在海马部位的共存率约为 63.9%。结论 KChIP1 在癫痫发生中可能起重要作用; KChIP1 与 GABA 能神经元虽有密切的共存关系, 但在功能上并不完全一致。

[关键词] 癫痫; 钾离子通道相互作用蛋白 1 (KChIP1); γ -氨基丁酸能神经元; 戊四唑; 海马; 大鼠

Change of Kv Channel Interacting Protein 1 and Gamma Aminobutyric Acidergic Neurons in Hippocampus of Pentylentetrazole Induced Epilepsy Rats LUO Ai-hua, LIAO Wei-ping, SU Tao, et al. Department of Rehabilitation, the 2nd Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong, China

Abstract: **Objective** To explore the role of Kv channel interacting protein 1 (KChIP1) in the process of epileptic seizure and the relationship between KChIP1 and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic neurons. **Methods** Normal female Sprague-Dawley rats were treated with pentylentetrazole to make acute pentylentetrazole models of epilepsy. Laser Scanning Confocal Microscope (LSCM) combined with double-labeled immunohistochemical technique was applied to observe the expression of the KChIP1 and the GABAergic neurons in the hippocampus of rats. **Results** The number of KChIP1-positive neurons in the hippocampus was significantly increased in the acute pentylentetrazole model rats ($P < 0.05$). There was no significant difference in the number of double-labeled neurons ($P > 0.05$), nor of the GABA-positive neurons between the model rats and the controls. The ratio of double-labeled neurons/total positive neurons was 63.9% in the hippocampus. **Conclusion** The KChIP1 might be involved in epileptogenesis of pentylentetrazole induced seizure. The KChIP1 was associated with GABAergic neurons, whereas it may be functionally different from GABA.

Key words: epilepsy; Kv channel interacting protein1 (KChIP1); GABAergic neuron; pentylentetrazole; hippocampus; rats

[中图分类号] R742.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2007)09-0842-03

[本文著录格式] 罗爱华, 廖卫平, 苏涛, 等. 钾离子通道相互作用蛋白 1 与 γ -氨基丁酸能神经元在戊四唑致癫痫大鼠海马部位的改变[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(9): 842-844.

钾离子通道相互作用蛋白 (Kv channel-interacting proteins, KChIPs) 是近年来新发现的一种钙结合蛋白, 属于神经元钙感受器 (neuronal calcium sensor, NCS) 家族中的一员, 目前发现 KChIPs 包括 4 种亚型: KChIP1、KChIP2、KChIP3 和 KChIP4, 它们分布在不同的组织中, 调节电压依赖性钾通道 (voltage-gated potassium channels, Kv) 亚型 Kv4 通道的电生理特性^[1-2]。KChIP1 主要在脑中高度表达, 它与脑中 Kv4 通道蛋白胞浆侧的 α 亚基紧密结合, 形成 KChIP1-Kv4 通道复合体, 以 Ca^{2+} 依赖性方式影响脑中 A-型钾电流 (A-type K^+ current) 的特性。该电流对神经元动作电位发放频率的控制与树突传入信号的

整合有重要的作用, 是神经元放电的主要调节者^[1,3]。对培养神经元中的电生理研究表明, KChIP1 可通过增加 Kv4 通道在胞膜表面的密度、延长 Kv4 激活时间和加快激活频率等机制增强 A-型钾电流, 降低神经元胞体、树突兴奋性^[1-3]。Robert 等认为, 目前所发现的 KChIP1 对神经元 A-型钾电流的调节作用可能仅仅只是 KChIP1 一个方面的功能^[4]; 有研究推测, KChIP1 与经典抑制性神经元 γ -氨基丁酸 (GABA) 能神经元群存在一定相关性, KChIP1 神经元可能为 GABA 能神经元的一个亚群^[5]。本研究采用免疫组织化学法结合激光扫描共聚焦显微镜 (Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM) 研究 KChIP1 免疫阳性神经元和 GABA 能神经元在戊四唑癫痫大鼠海马部位的表达改变, 并观察了两者在大鼠海马部位的定位关系, 拟进一步探索 KChIP1 的功能及其在癫痫发病中的可能作用。

1 材料

健康成年体重 180 ~ 250 g 雌性 Sprague-Dawley 大鼠, 由广州市动物实验中心提供。随机分为 2 组, 每

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370503)。

作者单位: 1. 广州医学院第二附属医院, a. 康复科; b. 神经内科, 广州医学院神经科学研究所, 广东广州市 510260; 2. Center for Neuroscience and Aging, the Burnham Institute University of California, CA92037, San Diego, USA。作者简介: 罗爱华 (1973-), 女, 湖北京山县人, 硕士, 主治医师, 讲师, 主要研究方向: 神经康复。通讯作者: 廖卫平。

组 8 只。实验前所有大鼠均观察 1 周,入选大鼠均没有癫痫发作。

2 方法

2.1 动物模型建立 模型组大鼠以 1%戊四唑(pentylenetetrazol, PTZ, 购自 Sigma 公司)60 mg/kg 一次性腹腔注射,观察大鼠的发作表现。所有大鼠均在 PTZ 注射后 10 min 内发生头颈部肌群抽搐,四肢阵挛;15~20 min 内出现急性发作,倒地,四肢强直痉挛,尾巴直立,身体扭曲,甚至窜跳,双眼结膜充血,口唇紫绀,持续数秒~数十秒后强直程度略微缓解,但 2~5 min 后重复出现全身强直阵挛大发作,有 2 只大鼠在 PTZ 注射后 1 h 内死亡,剔出实验。

对照组 8 只大鼠分别同时注射相同体积的生理盐水,均无癫痫发作表现。

注射 1 h 后,模型组大鼠和对照组大鼠分别以 10%水合氯醛麻醉后灌注取脑。

2.2 免疫组织化学反应 大鼠脑组织置振动切片机(OTS-4000,美国)切片,片厚 50 μm ,留取海马各区完整且部位相近的切片,按 Ultrasensitive TMS-P 超敏试剂盒步骤进行免疫组织化学反应,切片 DAB 染色后显微镜下观察。小鼠抗-KChIP1 单克隆抗体由美国加州大学张灼华教授提供(浓度 1:1000),兔抗-GABA 多克隆抗体购自 Chemicon 公司(浓度 1:200)。免疫荧光双标记中分别用羊抗鼠 FITC、鼠抗兔 TRITC(浓度均为 1:50)标记 KChIP1、GABA 阳性神经元;切片反应后即刻置激光扫描共聚焦显微镜下(Leica TCS-SP2,德国)分别用波长为 488 nm、568 nm 的激发光激发扫描,同时用相应计算机软件叠加扫描图片,可见 KChIP1 免疫阳性神经元呈绿色,GABA 免疫阳性神经元呈红色,KChIP1/GABA 免疫双标阳性神经元呈桔黄色。空白对照实验用 PBS 代替一抗,结果均为阴性。

2.3 资料收集和数据处理 每只大鼠选取 5 张切片,对激光扫描叠加后的图片(40 \times)和普通光学显微镜下(10 \times)影像,进行海马部位单、双标阳性神经元计数,所得数据用($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 11.5 软件进行独立样本 *t* 检验,检验水平 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 阳性神经元计数 显微镜下观察,KChIP1 免疫阳性神经元在大鼠海马部位主要分布于锥体细胞层、齿状回颗粒细胞层,分子层也可见少量分布;KChIP1/GABA 免疫双标阳性神经元散在分布于海马各层及齿状回部位,呈三角形、圆锥体形、圆形或椭圆形。显微镜下计数分析(10 \times),模型组大鼠海马部 CA1、CA3 区 KChIP1 阳性神经元数较对照组增加($P < 0.05$)。见表 1 及封三彩图 1.1(A1、A2)。GABA 免疫阳性神经

元、KChIP1/GABA 双标阳性神经元计数较对照组均无显著性差异($P > 0.05$)。见表 2、表 3。

3.2 KChIP1/GABA 在神经元中的共存 激光扫描共聚焦显微镜下观察对照组大鼠切片,KChIP1/GABA 双标阳性神经元约占总阳性神经元数的 63.9%。单标 KChIP1 阳性神经元群中有大约 77.7%的神经元同时为 GABA 表达阳性神经元,而单标 GABA 阳性神经元群中也有大约 77.9%的神经元同时为 KChIP1 表达阳性。见表 4、封三彩图 1.2(B1、B2、B3)。模型组大鼠海马部 KChIP1、GABA 及 KChIP1/GABA 双标阳性神经元的表达与对照组近似。

4 讨论

癫痫是由于神经元异常放电引起的一类临床综合征,是神经系统常见的一种慢性疾患,它严重危害着人类的健康。癫痫的发病机制极其复杂,研究表明,细胞内外离子分布异常可引起脑内起步神经元及神经元群出现痫性发放。离子进出细胞受离子通道的调节,作为神经元之间或神经元与效应细胞之间藉以传递各种生理和病理信息的核心媒介,离子通道与癫痫的研究已愈来愈引起人们的重视。

钾离子通道是离子通道中分布最广、类型最多的一类,它主要参与细胞静息电位和动作电位复极化过程的调节,影响神经元的兴奋性电活动。KChIP1 作为电压门控型钾通道 Kv4 的调节蛋白,直接影响 Kv4 通道的 A-型钾电流特性,在神经元的兴奋性调节方面有着十分重要的作用^[6]。

戊四唑是常用的化学致病剂,一次抽搐剂量给药可诱发大鼠急性癫痫发作;反复多次亚抽搐剂量给药可诱发点燃,直至全身强直阵挛发作;因此,戊四唑癫痫模型是癫痫发病机制及抗癫痫药物筛选研究常用的模型之一。目前,对戊四唑的致病机制尚未完全了解,多数研究认为,戊四唑促发病性活动与经典抑制性神经递质 GABA 能系统的抑制功能降低有关^[7],但也有不同观点^[8]。

本实验研究显示,在单次大剂量戊四唑诱发的急性癫痫发作模型中,1 h 内海马部 KChIP1 阳性神经元数量较对照组显著增加,提示 KChIP1 在癫痫发生中起重要作用。可能伴随神经元兴奋性冲动的大量发放,Ca²⁺内流,胞内 Ca²⁺浓度升高,KChIP1 迅速增加,以增加 Kv4 通道在胞膜表面的密度,增强 A-型钾电流,减慢神经冲动的发放频率,降低神经元兴奋性,起抗痫性活动的作用。KChIP1 阳性神经元的改变主要出现在大鼠海马的 CA1、CA3 区,说明海马 CA1、CA3 区 KChIP1 阳性神经元对痫性放电活动较为敏感。

GABA 能神经元是中枢神经系统重要的中间神经元,它合成并释放经典的抑制性神经递质 GABA。动

物实验研究表明,癫痫发作与大脑中 GABA 能神经元的选择性减少或脑中 GABA 的含量降低有关,如常用抗癫痫药物丙戊酸钠(VPA)的作用机制就认为是通过增加突触水平的 GABA 浓度而产生的^[9]。本实验研究中可见正常大鼠海马部 KChIP1 阳性神经元群中有约 77.7% 的神经元同时为 GABA 表达阳性,两者共存率约 63.9%,提示 KChIP1 阳性神经元与 GABA 能阳性神经元有密切的共存关系, KChIP1 主要与 GABA 能抑制性神经元共存,发挥其调节神经元兴奋性的功能。研究还发现,海马部位 KChIP1 阳性神经元群中大约 22.3% 为非 GABA 能神经元,其性质还有待进一步研究。

本研究发现,在模型组,仅 KChIP1 阳性神经元总数较对照组显著增加,而 GABA 能阳性神经元总数较

对照组无显著性差异,即两者在同一模型的相同时段,其表达变化不平行,提示 KChIP1 与 GABA 能神经元虽有密切的共存关系,但两者在功能上尚存在一定的差异。

近年来,随着分子生物学、膜片钳等技术的发展,有关癫痫发病机制的研究有了飞速的发展,除传统的神经递质调节外,离子通道的电压敏感性、电流内阻抗的调节等也都是调节神经元的兴奋性重要途径^[10]。对 KChIP1 这种新型钙结合蛋白的研究,包括其与经典的抑制性 GABA 能神经元关系的研究,有利于进一步探讨癫痫发作的多源性调节机制;在癫痫的治疗方面有可能从钾离子通道相互作用蛋白等方面入手,寻找治疗新途径。

表 1 大鼠海马各区 KChIP1 阳性神经元计数

组别	n	CA1	CA2	CA3	CA4	DG
模型组	6	165.4 ± 19.1	23.9 ± 8.1	119.3 ± 12.3	14.0 ± 2.5	45.2 ± 14.6
对照组	8	115.6 ± 13.2	17.6 ± 2.9	90.5 ± 12.9	12.2 ± 4.6	42.8 ± 5.4
P		0.007	0.241	0.014	0.311	0.629

表 2 大鼠海马各区 GABA 能阳性神经元计数

组别	n	CA1	CA2	CA3	CA4	DG
模型组	6	137.6 ± 18.7	21.3 ± 1.0	109.5 ± 7.1	17.9 ± 2.1	38.0 ± 1.0
对照组	8	121.5 ± 23.4	20.2 ± 2.1	99.9 ± 11.3	14.3 ± 1.9	35.2 ± 1.8
P		0.184	0.346	0.276	0.430	0.746

表 3 大鼠海马各区 KChIP1/GABA 双标阳性神经元计数

组别	n	CA1	CA2	CA3	CA4	DG
模型组	6	124.0 ± 16.5	17.7 ± 2.1	96.3 ± 10.2	10.8 ± 2.1	41.0 ± 6.7
对照组	8	126.6 ± 18.3	18.7 ± 1.3	89.2 ± 14.5	11.4 ± 2.2	37.6 ± 5.5
P		0.187	0.056	0.054	0.452	0.052

表 4 对照组大鼠海马各区 KChIP1、GABA 双标阳性神经元计数 (n=8)

部位	KChIP1 单标阳性神经元数	GABA 单标阳性神经元数	双标阳性神经元数(%)
CA1	25.6 ± 7.2	32.4 ± 7.4	89.1 ± 6.3(62.4 ± 3.4)
CA2	2.6 ± 0.2	5.2 ± 1.0	15.1 ± 2.1(69.3 ± 1.4)
CA3	16.0 ± 3.9	25.4 ± 6.7	74.5 ± 5.7(60.3 ± 2.4)
CA4	1.8 ± 0.6	3.9 ± 0.7	10.4 ± 2.2(63.4 ± 2.2)
DG	10.3 ± 2.4	2.6 ± 0.3	32.6 ± 5.5(62.4 ± 3.1)
合计	56.7 ± 10.3	73.3 ± 9.6	222.8 ± 7.24(63.9 ± 3.5)

致谢:本实验研究得到温祥来博士、何善衡基金会的支持,谨致谢意!

[参考文献]

[1] An WF, Bowlby MR, Betty M, et al. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors[J]. Nature, 2000, 403(6769):553 - 556.

[2] Morohashi Y, Hatano N, Ohya S, et al. Molecular cloning and characterization of CALP/KCHIP4 a novel EF-hand protein interacting with presenilin and voltage-gated potassium channel subunit Kv4.2[J]. J Biol Chem, 2002, 277(17):14965 - 14975.

[3] Beck EJ, Bowlby M, An WF, et al. Remodeling inactivation gating of Kv4 channels by KChIP1, a small-molecular weight calcium-binding protein[J]. J Physiol, 2002, 538(3):691 - 706.

[4] Burgoyne RD, Weiss JL. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins[J]. Biochem J, 2001, 353(Pt 1):1 - 12.

[5] Xiong H, Kovacs I, Zhang Z. Differential distribution of KChIPs mRNAs in adult mouse brain[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004,

128(2):103 - 111.

[6] Zhu XR, Wulf A, Schwarz M, et al. Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K⁺ current[J]. Receptors Channels, 1999, 6(5):387 - 400.

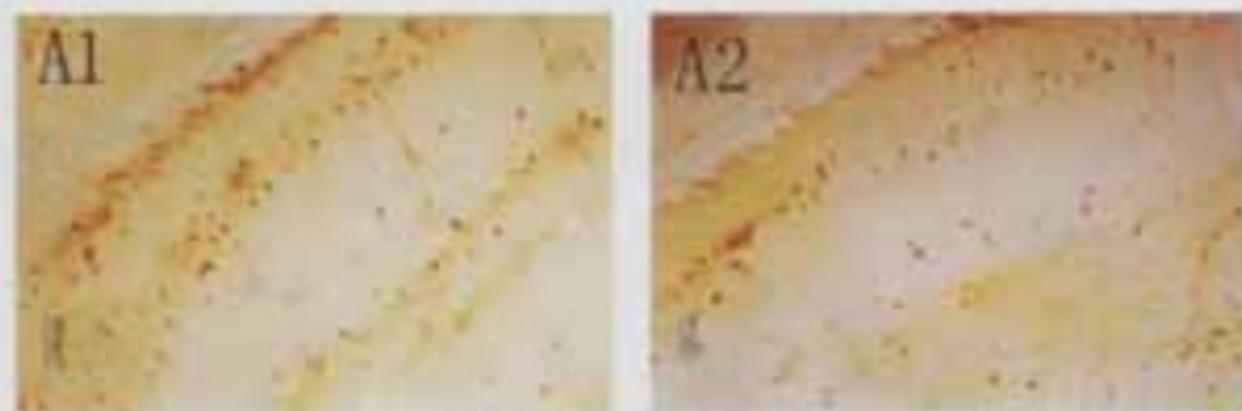
[7] Walsh LA, Li M, Zhao TJ, et al. Acute pentylentetrazol injection reduces rat GABA-A receptor mRNA levels and GABA stimulation of benzodiazepine binding with no effect on benzodiazepine binding site density[J]. Pharmacology, 1999, 289(3):1626 - 1633.

[8] Paul SM, Skolnick P. Rapid changes in brain benzodiazepine receptors after experiment seizures[J]. Science, 2002:892 - 894.

[9] Loscher W. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy[J]. CNS Drugs, 2002, 16(10):669 - 694.

[10] Beck EJ, Covarrubias M. Kv4 channels exhibit modulation of closed-state inactivation in inside-out patches[J]. Biophys J, 2001, 81(2):867 - 883.

(收稿日期:2007-04-26)



A1. 模型组大鼠, A2. 对照组

图 1.1 海马 CA3 区 KChIP1 免疫阳性神经元 (100 ×)



B1. KChIP1 免疫阳性, B2. GABA 免疫阳性, B3. KChIP1、GABA 双标记免疫阳性

图 1.2 对照大鼠海马齿状回部神经元
(激光扫描共聚焦显微镜, 400 ×)