中国科学 C 辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 9 期: 904 ~ 907
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

论 文

癫痫患者额叶及颞叶脑组织 A 型 GABA 受体 α_1 亚型基因表达定量研究

沈阅[①], 徐亚欧[①*], 钟勇[②], 何进宇[③], 李宁[①], 伍学英[③], 龚玉来[③], 高利民[③], 侯桂敏[③], 谢怡[①]

① 西南民族大学, 成都 610041;
② 中国生物技术集团公司成都生物制品研究所, 成都 610041;
③ 三六三医院, 成都 610041
* 联系人, E-mail: xuyaou@163.com

收稿日期: 2008-12-24; 接受日期: 2009-07-23
四川省应用基础项目(批准号: 2006J13-008-05)资助

摘要 为研究 A 型 GABA 受体α_1亚型(GABRA1)在癫痫患者病灶额叶及颞叶脑组织中的表达变化与癫痫发病机制的关系, 采用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测 GABRA1 在癫痫患者病灶额叶和颞叶脑组织及对照组额叶和颞叶脑组织中的表达量的差异. 结果表明, 对照组及癫痫患者额叶 GABRA1 平均相对表达强度为 3.785±1.444 和 4.399±2.89, 两者间无显著差异(P>0.05). 对照组颞叶脑组织中 GABRA1 平均表达量是癫痫患者的 4.5 倍, 对照组及癫痫患者颞叶 GABRA1 平均相对表达强度为 26.802±8.983 和 5.986±5.07, 结果具有统计学意义(P<0.05). 提示, 难治性癫痫患者 GABRA1 表达在不同组织中的改变并非单一性改变, GABRA1 表达量的改变导致癫痫的发生存在组织特异性; GABRA1 在颞叶脑组织中的表达减少与癫痫的发生, 尤其是难治性癫痫的发生有密切的关系, 可能是难治性癫痫致病的因素之一. 该研究结果为进一步研究癫痫的发病机制及防治提供了科学依据.

关键词
A 型 GABA 受体α_1亚型
癫痫
荧光定量 PCR
TaqMan 探针

γ-氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统内最重要的抑制性氨基酸递质, 是在人脑代谢活动中起重要作用的活性氨基酸, 其具有激活脑内葡糖糖代谢、促乙酰胆碱合成、降血氨、抗惊厥的作用. GABA 与相应离子通道型受体结合引起受体变构, 通过开放氯离子通道, 造成氯离子内流引起膜超极化从而发挥抑制作用. 根据受体对激动剂及拮抗剂的敏感性, 可将 GABA 受体分为 A, B 和 C 共 3 个亚型[1]. 现在越来越多的研究致力于 GABA 受体与癫痫的相互关系. GABAA 受体是脑内最普遍的抑制性神经递质受体, 也是与癫痫关系最密切、研究最深入的 GABA 受体. 本文采用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术对 GABRA1 在癫痫患者额叶及颞叶脑组织中的表达量变化进行了研究, 以探讨 GABRA1 表达量的变化与癫痫的关系.

1 材料与方法

1.1 病例来源及纳入标准

实验组: 18 例癫痫手术患者脑组织标本, 均系三六三医院神经外科癫痫患者, 按照国际抗癫痫联盟

引用格式: 沈阅, 徐亚欧, 钟勇, 等. 癫痫患者额叶及颞叶脑组织 A 型 GABA 受体α_1亚型基因表达定量研究. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39: 904—907

有关癫痫类型发作的规定符合难治性癫痫标准. 经长程视频脑电监测、偶极子定位明确癫痫灶位于额叶及颞叶者, 其中额叶 8 例, 颞叶 10 例. 男性 12 例、女性 6 例, 年龄 9~36 岁, 平均年龄 21 岁. 上述病例均无明显致痫病因、神经系统检查无局灶性阳性体征, 病人及家属术前签注知情书. 对照组: 7 例脑组织, 均为成都三六三医院神经外科颅内减压术, 术中采集的额叶及颞叶脑组织. 其中额叶 4 例, 颞叶 3 例. 男性 4 例、女性 3 例, 年龄 16~53 岁, 平均年龄 27 岁.

1.2 仪器与试剂

反转录试剂盒、总 RNA 提取及 PCR 所需试剂购于 TaKaRa 公司. iCycler iQ™ 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司, 美国), 凝胶成像系统 Doc2000(Bio-Rad 公司, 美国).

1.3 引物设计及合成

参考 GenBank 中人 GABRA1 mRNA 的序列(*NM_000806*)和 β-actin(*NM_001101*)基因的核苷酸序列, 在保守区域分别设计特异性引物和探针. GABRA1 扩增片段长度为 117 bp; β-actin 扩增片段长度为 85 bp. 引物、探针由大连宝生物公司合成, 两个基因的引物、探针序列见表 1.

1.4 总 RNA 提取

采用 RNAiso Reagent 试剂(TaKaRa 公司), 按说明提取脑组织中 RNA.

1.5 反转录

按 PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒(TaKaRa 公司)的说明合成 cDNA. 具体如下, 在 10 μL 的反应体积中, 加入 5×PrimeScript™ 缓冲液 2 μL, Oligo dT 引物(50 μmol/L) 0.5 μL, Random 6 mers(100 μmol/L) 0.5 μL, PrimeScript™ RT Enzyme Mix Ⅰ 0.5 μL, 样品 RNA500 ng, RNase Free dH_2O 补足到 10 μL. 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, –20℃保存备用.

1.6 癫痫患者额叶及颞叶中 GABRA1 mRNA 表达水平的定量分析

对组织中 GABRA1 和 *β-actin* 基因 mRNA 表达水平的定量分析, 采用本实验室此前建立的荧光定量 PCR 方法进行[2]. 25 μL 的反应体系中包括: 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μL, 2.5 mmol/L dNTP Mixture 2 μL, 5 U/μL TaqDNA 聚合酶 0.125 μL, 10 μmol/L 上、下游引物各 2 μL, 10 μmol/L TaqMan 探针 1 μL, cDNA 模板 2 μL, ddH_2O 11.375 μL. GABRA1 反应条件为: 95℃, 90 s; 94℃, 20 s; 56℃, 20 s; 72℃, 20 s, 共 40 个循环; β-actin 反应条件为: 94℃, 60 s; 95℃, 20 s; 59℃, 30 s, 共 45 个循环.

采用双标准曲线相对定量法, 以 β-actin 为内参照, 对 GABRA1 mRNA 表达水平进行校正. 以对照组大脑额叶和颞叶中 GABRA1 mRNA 表达水平为对照, 计算癫痫患者相对于对照组 GABRA1 mRNA 表达水平的差异倍数. 所有数据均采用 $\bar{x}\pm$SD 表示, *t* 检验.

2 结果

2.1 RNA 纯度和完整性分析

所提取总 RNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测可见 3 条比较清晰的 RNA 带: 28, 18, 5 S, 表明 RNA 无明显降解(图 1). 紫外分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 比值约为

表 1 引物和 TaqMan 探针序列

基因及寡核苷酸	序列
GABRA1	
上游引物	5′- ATGGAAAGAAGTCAGTGGCCC-3′
下游引物	5′- GCATCGGACATTCAGCTCTCA-3′
TaqMan 探针	5′-(FAM) ACCATGCCCAACAAACTCCTGCGG (Eclipse)-3′
β-actin	
上游引物	5′- GACTACCTCATGAAGATCCTCACC-3′
下游引物	5′- TCTCCTTAATGTCACGCACGATT-3′
TaqMan 探针	5′-(FAM) CGGCTACAGCTTCACCACCACGGC (Eclipse)-3

1.80~2.0, 表明 RNA 纯度较高.

2.2 *GABRA1* 基因 mRNA 相对表达水平比较

分别对癫痫患者实验组和对照组额叶及颞叶脑组织中 *GABRA1* 基因进行定量扩增, 其平均相对表达强度比较结果见图 2 和图 3.

由图 2 可知, 额叶脑组织中, 对照组 GABRA1 平均相对表达强度为 3.785±1.444, 癫痫患者 GABRA1 平均相对表达强度为 4.399±2.89. 上述结果表明, 癫痫患者与对照组之间 GABRA1 在额叶的表达量变化不大, 统计学检验表明两者间无显著差异(P>0.05).

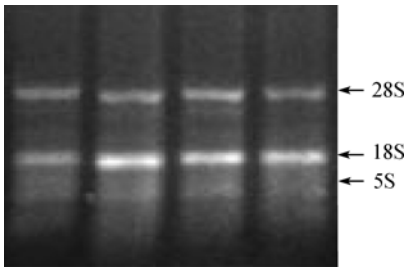

图 1 总 RNA 鉴定结果

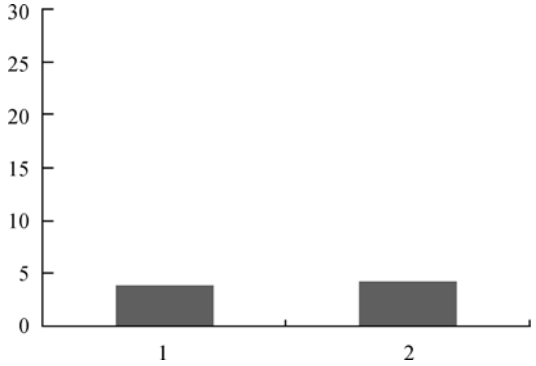

图 2 对照组及癫痫患者额叶 GABRA1 平均相对表达强度

1: 对照组; 2: 癫痫患者

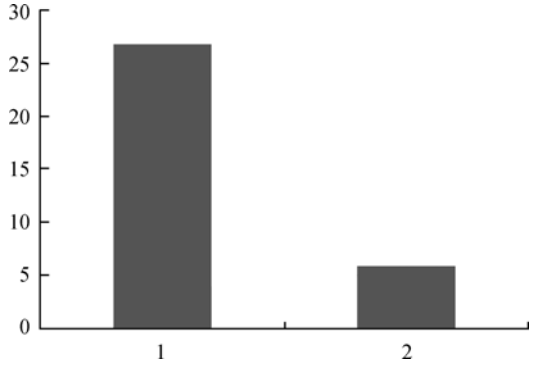

图 3 对照组及癫痫患者颞叶 GABRA1 平均相对表达强度

1: 对照组; 2: 癫痫患者

由图 3 可知, 颞叶脑组织中, 对照组 GABRA1 平均相对表达强度为 26.802±8.983, 癫痫患者 GABRA1 平均相对表达强度为 5.986±5.07. 对照组颞叶脑组织中 GABRA1 平均表达量是癫痫患者的 4.5 倍. 结果表明, 癫痫患者 GABRA1 在颞叶脑组织中的表达量显著下调, 与对照组之间有显著差异(P<0.05).

3 讨论

$GABA_A$ 受体是脑内最普遍的抑制性神经递质受体, 其由 5 个亚基 α, β, γ, δ, ε 组成, 广泛分布于整个神经系统, 以小脑最高, 海马次之, 延髓和脊髓最低. 它是一种配体门控的 Cl^-通道, 与烟碱受体, 甘氨酸受体, 5-HT 受体同属一个超家族[3]. GABAA 受体激活可增加神经元细胞膜的 Cl^-通透性, 产生抑制性突触后电位(IPSP), 发挥抑制效应. 国内外多项实验均证实兴奋 GABA 受体能抑制癫痫发作, 抑制 GABAA 受体则会诱发癫痫. 1998 年, Fukao 等人[4]曾报道, 癫痫鼠强直发作的次数和时程可剂量依赖性的被 GABAA 受体激动剂蝇草醇抑制. Aminooxy-acetic acid(AOAA)是一种 GABA 转换酶抑制剂, 可同时抑制自发癫痫鼠的强直和失神发作. 说明 GABAA 受体的兴奋或抑制, 能阻止或诱发癫痫.

本研究中, 癫痫患者大脑额叶组织中 GABRA1 表达量较对照组没有显著差异, 而在大脑颞叶组织中 GABRA1 表达量较对照组显著下调. 这表明难治性癫痫患者 GABAA 受体表达在不同组织中的改变并非单一性改变, 暗示 GABRA1 表达量的异常导致癫痫的发生存在组织特异性. 在匹鲁卡品致癫模型中, Gibbs 等人[5]在发现 CAI 区 GABA 功能降低的同时, 齿状回颗粒细胞的 GABAA 受体反应却较正常增高 78%. 所以, GABAA 受体在致癫鼠不同脑区的改变并非一致, 不能一概而论. 因此, 对人脑不同组织部位 GABRA1 的 mRNA 的表达水平进行定量研究, 对进一步了解 GABRA1 的生物学功能、组织特异性及其与癫痫发生的关系有着重要的意义.

本实验中 GABRA1 在颞叶脑组织中表现为显著

下调. 一方面, 说明 GABAA1 在颞叶脑组织中表达下调, 可能是导致难治性癫痫发生的原因. 1999 年, Poulter 等人[6]发现, 癫性发作易感鼠株脑杏仁体和邻近古皮质α_1的 mRNA 和蛋白表达只有正常鼠的一半, 而γ_2, β_2, α_5的表达过度, 耐癫性发作鼠株α_1表达为正常鼠的 2 倍以上, γ_2, γ_2, α_5几乎不见表达异常现象. 近年来利用 PCR, 免疫印迹法等多种方法研究发现, 癫痫症候群与 $GABA_A$ 受体α_1, γ_2, δ, β_3亚基基因变异密切相关, 其变异通过改变苯二氮卓结合区域高度保守的氨基酸残基、缩减功能性 GABAA 受体复合物的表面表达、导致抑制性配体门控通道功能的丧失、影响受体到细胞表面的运输等途径, 最终导致癫痫的发生[7].

Baulac 等人[8]首先发现了特发性癫痫家系存在 $GABA_A$ 受体 γ_2 亚单位的基因突变. 随后有人对全面癫痫伴热性惊厥附加症($GEFS^+$)、儿童失神发作等 4 个家系进行了研究, 发现编码 $GABA_A$ 受体 γ_2 亚单位的基因 *GABRG2* 存在突变, 并进一步证实这种突变引起了 $GABA_A$ 受体 Cl^-内向电流减弱甚至消失或 $GABA_A$ 受体敏感性下降. 2003 年, Cossette 等人[9]报道了一个编码 $GABA_A$ 受体α_1亚单位的基因 *GABRA1* 突变常染色体显性遗传青少年肌阵挛癫痫家系, 受体动力学研究进一步证实这种突变引起了 $GABA_A$ 受体 Cl^-内向电流下降. 本实验结果表明, GABRA1 在颞叶脑组织中的表达差异与癫痫的产生, 尤其是难治性癫痫的发生有密切的关系, 说明有进一步对颞叶脑组织中 *GABRA1* 基因变异与癫痫发生的相关性进行检测的必要. 另一方面, 也有可能是癫痫的发生引起GABRA1表达的改变. Vick 等人[10]与 Rice 等人[11]在低 Mg^{2+}致癫的小鼠海马切片模型中发现, 早期有 $GABA_A$ 受体亚基 mRNA 水平下降, 尤其是γ_2, α_5亚基, 提示癫痫发作可引起特定 GABA 亚基的选择性减少.

综上所述, 难治性癫痫患者GABAA受体表达在不同组织中的改变并非单一性改变, 暗示 GABRA1 表达量的异常导致癫痫的发生存在组织特异性; GABRA1 在颞叶脑组织中的表达下调与癫痫的发生, 尤其是难治性癫痫的发生有密切关系, 其可能是难治性癫痫致病的因素之一. 本实验对进一步了解 GABRA1 的生物学功能及其与癫痫发生的关系提供了一定的理论依据.

参考文献

1 郑红发, 黄亚辉, 刘霞林, 等. γ-氨基丁酸的药理作用. 茶叶通讯, 2004, 21(4): 12—17

2 李宁, 何进宇, 刀筱芳, 等. 人GABRA1实时荧光定量TaqMan PCR检测方法的建立. 西南民族大学学报(自然科学版), 2008, 34: 94—97

3 Chebib M, Johnston G A. The "ABC" of GABA receptors: a brief review. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999, 26: 937—940

4 Fukao K, Momiyama T, Ishihara K, et al. Inhibition by γ-aminobutyric acid system activation of epileptic seizures in spontaneously epileptic rats. JJP, 1998, 76: 387—396

5 Gibbs J, Shumate M D, Coulter D A. Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABAA receptor function in dentate granule and CAI neurons. J Neurophysiol, 1997, 77: 1924—1938

6 Poulter M O, Brown L A, Tynan S, et al. Differential expression of α_1 and GABAA receptor subunits in seizure-prone and seizure-resistant rat models of temporal lobe epilepsy. J Neurosci, 1999, 1900: 4654—4661

7 索国玲. γ-氨基丁酸 A 型受体基因变异与癫痫关系的研究进展. 国际儿科学杂志, 2006, 33(3): 170—172

8 Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, et al. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. Nat Genetics, 2001, 28: 46—48

9 Cossette P, Liu L, Brisebois K, et al. Childhood absence epilepsy and febrile seizures: a family with a GABA(A) receptor mutation. Brain, 2003, 126: 230—240

10 Vick R S, Rafiq A, Coulter D A, et al. GABAA 2 mRNA levels are decreased following epileptogenesis in hippocampal-entorhinal cortical slices. Brain Res, 1996, 721: 111—119

11 Rice A, Rafiq A, Shapiro S M, et al. Long-lasting reduction of inhibitory function and GABAA subunit mRNA in a model of temporal lobe epilepsy. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 9665—9669